

## LAVORO ORIGINALE

# Le HDL inibiscono la produzione di citochine nel modello murino di infiammazione da microcristalli di urato monosodico\*

## *HDL inhibit cytokine production in a mouse model of urate crystal-induced inflammation*

A. Scanu<sup>1</sup>, F. Oliviero<sup>1</sup>, R. Luisetto<sup>1</sup>, P. Sfriso<sup>1</sup>, J.-M. Dayer<sup>1</sup>, D. Burger<sup>2</sup>, L. Punzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cattedra e U.O.C. di Reumatologia, Università di Padova;

<sup>2</sup>Division of Immunology and Allergy, Inflammation and Allergy Research Group, Hans Wilsdorf Laboratory, Department of Internal Medicine, University Hospital and Faculty of Medicine, University of Geneva, Switzerland

### SUMMARY

**Objectives:** To evaluate whether high density lipoproteins (HDL) affect monosodium urate (MSU) crystal-induced inflammation in the murine air pouch model.

**Methods:** MSU crystals were prepared by Denko's method and sterilized by heating at 180°C for 2 h before each experiment. Human HDL were isolated from peripheral blood of healthy volunteers. MSU crystals (2 mg in 1 ml of PBS) were injected into subcutaneous air pouches in mice in the presence or absence of HDL (0.1 mg). Negative control pouches received 1 ml of PBS. To recover pouch fluid, the pouches were washed with 2 ml of PBS after the animals were sacrificed. The leukocyte count in the lavage fluids was obtained using a hemocytometer and differential leukocyte count was determined by May-Grünwald-Giemsa staining. IL-6, KC, CCL2 and TNF- $\alpha$  levels were measured in exudates by ELISA.

**Results:** MSU crystals increased the number of leukocytes and the neutrophil migration, as well as the concentrations of IL-6, KC and CCL2 in pouch fluids, while the TNF- $\alpha$  levels were not detectable. The treatment with HDL led to a reduction in all inflammatory parameters: the leukocyte count decreased by 73%; the neutrophil density decreased by 35%; the IL-6, KC and CCL2 concentration decreased by 4-, 6- and 5-fold respectively.

**Conclusions:** This study shows that HDL may limit the inflammatory process by inhibiting leukocyte recruitment and cytokine release. HDL are likely to represent a mechanism of control of crystal-induced inflammation.

Reumatismo, 2010; 62(4):266-272

### INTRODUZIONE

Il deposito di microcristalli di urato monosodico (UMS) nelle articolazioni causa uno dei processi infiammatori più intensi che si conoscano. L'infiammazione da cristalli di UMS è caratterizzata da un attacco acuto iniziale i cui meccanismi sono noti e ampiamente descritti e da una risoluzione spon-

tanea i cui meccanismi rimangono ancora in parte poco conosciuti (1). L'interazione tra cristalli di UMS e cellule sinoviali, monociti-macrofagi e neutrofili nelle articolazioni scatena la risposta infiammatoria che comporta il rilascio di diversi agenti proinfiammatori come TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 e fattori chemotattici (2, 3) che a loro volta amplificano il processo infiammatorio (4, 5). È stato recentemente dimostrato che i cristalli di UMS sono in grado di attivare l'inflammasoma NALP3 e i TLR conferendo all'immunità innata un ruolo fondamentale anche in questo tipo d'infiammazione (6, 7). L'attacco acuto di gotta tende a risolversi spontaneamente in 3-10 giorni. Sono stati descritti diversi meccanismi coinvolti nella sua risoluzione tra cui l'effetto di alcune lipoproteine. È

\*Lavoro premiato al XLVI Congresso SIR, Rimini 2009.

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Anna Scanu  
Cattedra e U.O.C. di Reumatologia  
Università di Padova  
Via Giustiniani, 2 - 35128 Padova  
E-mail: anna.scanu@unipd.it

stato infatti dimostrato che le lipoproteine, la cui concentrazione è aumentata nel liquido sinoviale delle artropatie infiammatorie (8) sono in grado di modulare la risposta infiammatoria. Tra queste, le lipoproteine contenenti l'apolipoproteina (apo) B e l'apo E sono in grado di inibire la stimolazione dei neutrofili indotta dai cristalli tramite legame alla superficie dei cristalli (9, 10). Le lipoproteine a bassa densità (LDL) e le lipoproteine ad alta densità (HDL) inibiscono la citolisi dei neutrofili indotta dai cristalli di calcio e di UMS (11). Le HDL contenenti apo A-I possono inoltre svolgere un'azione antinfiammatoria prevenendo il rilascio di citochine infiammatorie mediante l'inibizione del contatto monocita/macrofago con linfociti T attivati o con microparticelle (MP) derivate da linfociti T attivati (12, 13).

Recentemente abbiamo dimostrato che le HDL possono inibire il rilascio di CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) da parte di sinoviociti stimolati con i cristalli di UMS. In particolare abbiamo osservato che l'inibizione è indipendente dal coating delle lipoproteine sui cristalli (14). Per supportare questi risultati abbiamo deciso di utilizzare un modello di infiammazione più complesso e quindi di valutare l'effetto antinfiammatorio delle HDL in vivo sul modello murino della tasca d'aria.

## MATERIALI E METODI

### *Animali*

Per gli esperimenti sono stati utilizzati 28 topi CD1 maschi, di circa 8-9 settimane di età e peso medio di 35 g provenienti dall'allevamento interno del centro di Chirurgia Sperimentale dell'Università di Padova. Gli animali sono stati randomizzati in 4 gruppi (7 topi per gruppo) e alimentati con dieta standard. Un gruppo è stato trattato con i cristalli di UMS per determinare il livello d'infiammazione; in un gruppo sono state somministrate contemporaneamente le HDL e i cristalli di UMS per valutare l'effetto delle lipoproteine sull'infiammazione indotta; in un gruppo di controllo è stato iniettato solo del PBS e un gruppo è stato trattato solamente con HDL per controllare che queste non avessero alcun effetto infiammatorio.

### *Preparazione dei cristalli di UMS*

I cristalli di UMS sono stati preparati usando il metodo descritto da Denko (15). La loro forma e birifrangenza è stata verificata al microscopio a luce po-

larizzata e compensata. Prima di ogni esperimento i cristalli sono stati triturati e sterilizzati per 2 ore a 180°C. La concentrazione di endotossina è stata misurata nelle preparazioni di cristalli di UMS mediante Limulus amoebocyte lysate assay (E-toxate kit, Sigma) ed è risultata inferiore a 0,015 EU/ml.

### *Isolamento delle HDL*

Le HDL umane sono state isolate mediante ultracentrifugazione dal sangue periferico di volontari sani ed il loro contenuto proteico è stato determinato come descritto precedentemente (12).

### *Preparazione delle tasche d'aria*

Le tasche d'aria sono state indotte mediante l'iniezione di 3,5 ml di aria sterile nel tessuto sottocutaneo del dorso dei topi dopo anestesia con sevoflurano al 4%. La stessa operazione è stata ripetuta 3 giorni dopo la prima iniezione. Dopo 6 giorni, 2 mg di cristalli di UMS in 1 ml di PBS o 1 ml di PBS da solo sono stati iniettati nelle tasche d'aria in presenza o in assenza di HDL alla concentrazione di 0,1 mg/ml. Dopo 24 ore i topi sono stati sacrificati tramite eccesso di CO<sub>2</sub>, le tasche d'aria sono state lavate con 2 ml di PBS ed è stato misurato il volume di liquido rimosso (che include i 2 ml di PBS per il lavaggio e l'essudato). Dopo aver effettuato la conta leucocitaria totale e differenziale i liquidi di lavaggio sono stati centrifugati (1.500 g per 10 min) e conservati a -20°C.

### *Conta leucocitaria totale e differenziale*

Il numero totale dei globuli bianchi (GB) nei liquidi di lavaggio è stato determinato mediante camera di Burkner e viene espresso come numero di leucociti/mm<sup>3</sup>, mentre la conta leucocitaria differenziale è stata determinata mediante colorazione May Grunwald-Giemsa e viene riportata come percentuale di cellule polimorfonucleate (PMN) e mononucleate (M).

### *Dosaggio di citochine e proteine*

La concentrazione di IL-6, KC, CCL2 e TNF- $\alpha$  è stata determinata negli essudati mediante metodica ELISA. La concentrazione proteica totale è stata determinata tramite metodo di Bradford (Sigma).

### *Analisi statistica*

Tutti i dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Il test ANOVA è stato utilizzato per l'analisi delle differenze tra i gruppi e il test post hoc di Dunnett è stato eseguito per i confronti multipli. Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### *I cristalli di UMS inducono l'infiammazione nelle tasche d'aria*

Per stabilire il profilo infiammatorio della risposta indotta dai cristalli di UMS sono state valutate nei

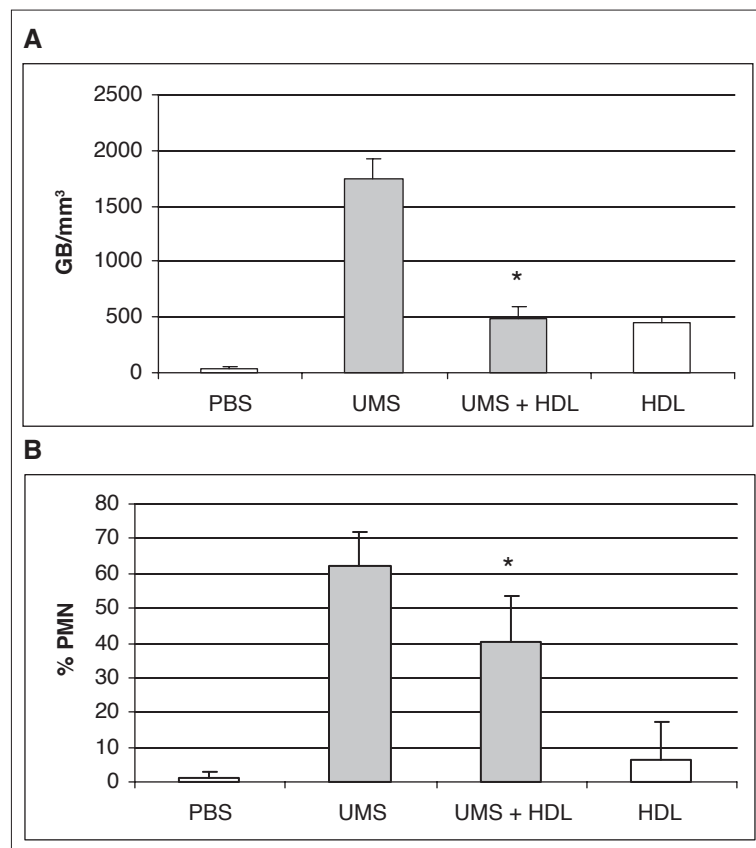
**Tabella I** - Effetto dei cristalli di UMS nel reclutamento cellulare e nella produzione di citochine proinfiammatorie nelle tasche d'aria. Cristalli di urato monosodico (UMS; 2 mg in 1 ml di PBS) o 1 ml di PBS sono stati iniettati nelle tasche d'aria. Dopo 24 h i topi sono stati sacrificati e sono stati determinati negli essudati raccolti il volume, la conta leucocitaria totale e differenziale, la concentrazione delle proteine totali, di IL-6, KC, CCL2 e TNF- $\alpha$ . I valori sono riportati come media  $\pm$  DS. ND, non determinabile (<2 pg/ml). \* $p \leq 0,05$  vs PBS.

Trattamento	PBS	UMS
Volume (ml)	2,40 $\pm$ 0,19	2,79 $\pm$ 0,35*
GB (n. leucociti/mm <sup>3</sup> )	40 $\pm$ 17,32	1746 $\pm$ 172,43*
PMN (%)	1,25 $\pm$ 1,89	62,5 $\pm$ 6,81*
M (%)	98,75 $\pm$ 4,67	37,5 $\pm$ 6,24*
Proteine Totali ( $\mu$ g/ml)	146,28 $\pm$ 62,65	453,84 $\pm$ 59,05*
IL-6 (pg/ml)	0,22 $\pm$ 0,59	53,69 $\pm$ 27,60*
KC (pg/ml)	26,42 $\pm$ 13,34	154,35 $\pm$ 106,50*
CCL2 (pg/ml)	9,28 $\pm$ 6,86	306,78 $\pm$ 32,24*
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	ND	ND

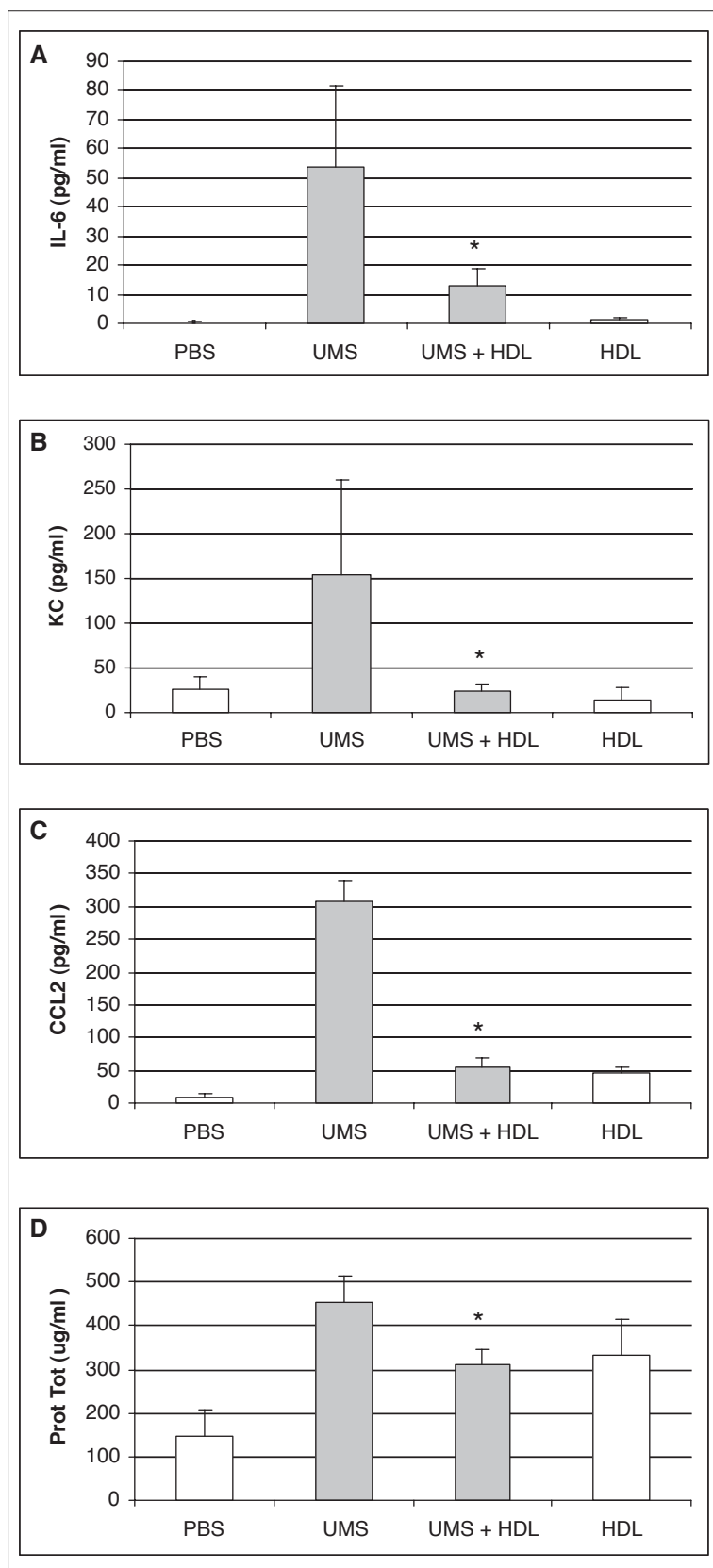
liquidi raccolti dopo lavaggio delle tasche d'aria, il volume, l'infiltrazione leucocitaria, la concentrazione proteica totale e la produzione di citochine proinfiammatorie. L'iniezione della sospensione dei cristalli di UMS induceva un accumulo di leucociti nel sito dell'infiammazione di circa 43 volte superiore a quello osservato allo stesso tempo (24 ore) dopo l'iniezione di un egual volume di PBS sterile (Tab. I). Come mostrato in tabella I le cellule reclutate durante l'infiammazione erano prevalentemente polimorfonucleate. Inoltre, il volume degli essudati aumentava lievemente negli animali trattati con i cristalli di UMS rispetto a quelli in cui era stato iniettato solo il PBS (Tab. I). Anche le concentrazioni delle proteine totali, di IL-6, di KC, e di CCL2 risultavano aumentate dopo l'iniezione dei cristalli (Tab. I). La concentrazione del TNF- $\alpha$  risultava invece sotto il limite di determinabilità del test effettuato.

### *Le HDL inibiscono l'infiammazione indotta dai cristalli di UMS*

Per valutare l'attività antinfiammatoria delle HDL, queste sono state iniettate nelle tasche alla concentrazione di 0,1 mg/ml contemporaneamente ai



**Figura 1** - Effetto delle lipoproteine ad alta densità (HDL) nel reclutamento cellulare indotto dai cristalli di urato monosodico (UMS). Cristalli di UMS (2 mg in 1 ml di PBS) o 1 ml di PBS sono stati iniettati nelle tasche d'aria in presenza o in assenza di HDL alla concentrazione di 0,1 mg/ml. Dopo 24 h i topi sono stati sacrificati e negli essudati è stata determinata la conta leucocitaria totale (A) e la percentuale di cellule polimorfonucleate (B). I valori sono riportati come media  $\pm$  DS. \* $p \leq 0,05$  vs UMS.



**Figura 2** - Effetto delle lipoproteine ad alta densità (HDL) nella produzione di fattori proinfiammatori indotta dai cristalli di urato monosodico (UMS). Cristalli di UMS (2 mg in 1 ml di PBS) o 1 ml di PBS sono stati iniettati nelle tasche d'aria in presenza o in assenza di HDL alla concentrazione di 0,1 mg/ml. Dopo 24 h i topi sono stati sacrificati e negli essudati è stata determinata la concentrazione di IL-6 (A), KC (B), CCL2 (C) e delle proteine totali (D). I valori sono riportati come media  $\pm$ DS. \* $p \leq 0,05$  vs UMS.

cristalli. Per quanto riguarda l'effetto sul reclutamento cellulare indotto dai cristalli di UMS, abbiamo osservato che le HDL riducevano il numero dei leucociti e la migrazione dei neutrofili nelle tasche d'aria. Alla concentrazione utilizzata, il numero di cellule infiammatorie reclutate era diminuito del 73% e quello dei polimorfonucleati del 35% rispetto al trattamento con i soli cristalli (Fig. 1a-b).

Non sono state invece riscontrate variazioni significative nei volumi degli essudati dei topi in cui erano state iniettate le HDL.

Successivamente abbiamo valutato se le HDL fossero in grado anche di inibire il rilascio di citochine e chemochine proinfiammatorie. Abbiamo osservato che i liquidi recuperati dalle tasche in cui erano state somministrate le HDL mostravano concentrazioni di IL-6, KC e CCL2 più basse rispetto a quelli delle tasche stimulate solamente con i cristalli di UMS. L'inibizione risultava di circa 4 volte per IL-6, di circa 6 volte per KC e di circa 5 volte per CCL2 (Fig. 2a-c). I nostri esperimenti mostravano anche una diminuzione della concentrazione delle proteine totali (Fig. 2d).

L'iniezione di sole HDL non ha indotto alcun effetto infiammatorio.

L'analisi delle differenze tra i gruppi (ANOVA) è risultata significativa per tutte le variabili considerate ad eccezione del volume: GB  $p < 0,0001$ , PMN  $p < 0,0001$ , IL-6  $p = 0,0016$ , KC  $p = 0,0112$ , CCL2  $p < 0,0001$ , proteine totali  $p < 0,0001$ .

## DISCUSSIONE

Con questo studio abbiamo dimostrato che il trattamento con HDL è in grado di limitare l'infiammazione indotta dai cristalli di UMS nel modello animale della tasca d'aria, riducendo il reclutamento dei leucociti e la produzione di fattori chemiotattici e proinfiammatori nel sito dell'infiammazione.

Il modello murino della tasca d'aria rappresenta uno dei pochi modelli d'infiammazione locale che si prestano alla valutazione degli effetti dei microcristalli nell'animale. Si tratta di una procedura facilmente manipolabile e largamente utilizzata per lo studio di numerosi agenti antinfiammatori e antireumatici perché è in grado di mimare l'ambiente sinoviale. L'iniezione dei cristalli di UMS nella tasca induce una transitoria infiltrazione neutrofila simile a quella che si verifica nell'uomo durante l'attacco acuto di gotta (16, 17) e promuove

il rilascio di fattori proinfiammatori attivi nelle artropatie infiammatorie croniche (18, 19).

Nei nostri esperimenti, l'iniezione dei cristalli di UMS promuoveva l'accumulo dei neutrofili e la produzione di IL-6, KC e CCL2 mentre quella di TNF- $\alpha$  non era determinabile. Questo probabilmente era dovuto al fatto che il TNF- $\alpha$  viene rilasciato immediatamente dopo la somministrazione dei cristalli di UMS e per un periodo di poche ore (20). Il trattamento con le HDL provocava una riduzione del rilascio di tutti questi fattori proinfiammatori e parallelamente della conta leucocitaria negli essudati delle tasche d'aria.

Studi precedenti hanno dimostrato che i cristalli di UMS stimolano le cellule sinoviali, i monociti-macrofagi e i neutrofili a produrre una grande varietà di mediatori dell'infiammazione (21). Tra questi, KC svolge un ruolo chiave nella migrazione dei neutrofili nel modello della tasca d'aria durante la fase iniziale del processo infiammatorio (22), mentre IL-6, prodotta sia da monociti che da polimorfonucleati esposti ai cristalli di UMS (3), sembra regolare, mediante il legame con il suo recettore solubile (sIL-6R), l'espressione di CCL2, una chemochina in grado di promuovere il reclutamento di leucociti mononucleati e di sopprimere quello dei neutrofili nel sito dell'infiammazione (23). Nei nostri esperimenti, l'inibizione di tutti questi mediatori dell'infiammazione dimostra non solo che le HDL svolgono un'azione antinfiammatoria, ma anche che queste possono agire a diversi livelli del processo infiammatorio.

Numerosi studi hanno suggerito che le HDL potrebbero essere considerate un fattore di controllo chiave nel mantenere bassi i livelli d'infiammazione in condizioni normali. È stato dimostrato infatti che le HDL sono in grado di esercitare un potente effetto antinfiammatorio sia in modelli d'infiammazione in vivo che in vitro. Le HDL inibiscono l'espressione di molecole di adesione indotta da citochine nelle cellule endoteliali (24) e riducono fortemente l'attivazione e l'espressione dell'Integrina CD11b nei monociti (25). Altri studi suggeriscono che le HDL e l'Apo-AI inibiscono la risposta infiammatoria indotta da lipopolisaccaride (26). Inoltre le HDL possono ridurre notevolmente la produzione di radicali di ossigeno indotta nei neutrofili dopo il contatto con cellule T attivate (27) e le HDL associate ad apo-AI inibiscono la produzione di citochine indotta nei monociti-macrofagi dal contatto con cellule T o con MP (12, 13). Recentemente abbiamo dimostrato che le HDL riducono la produzione e l'espressione di CCL2

nei sinoviociti stimolati con i cristalli di UMS (14) e che i livelli di apo A-I, HDL e colesterolo totale aumentano nei liquidi sinoviali di pazienti con artropatie infiammatorie (8). Con questo studio dimostriamo che le HDL svolgono la loro attività antinfiammatoria anche in vivo inibendo la produzione di citochine nel modello murino d'infiammazione da microcristalli di urato monosodico. Nonostante il meccanismo d'azione delle HDL non sia chiaro, i nostri risultati suggeriscono che queste

potrebbero svolgere un ruolo importante nella fase di autoremissione dell'infiammazione indotta dai microcristalli di UMS. Inoltre terapie che comportino un aumento delle HDL nel sito dell'infiammazione potrebbero essere considerate una strategia nel controllo del processo infiammatorio. In conclusione, il nostro lavoro conferma la funzione antinfiammatoria delle HDL e suggerisce un loro possibile ruolo nello spegnimento dell'attacco acuto di gotta.

## RIASSUNTO

*Scopo dello studio:* Valutare l'effetto delle lipoproteine ad alta densità (HDL) nell'infiammazione indotta da microcristalli di urato monosodico (UMS) nel modello murino della tasca d'aria.

*Materiali e Metodi:* I cristalli di UMS sono stati sintetizzati secondo metodica di Denko e sterilizzati per 2 h a 180°C. Le HDL sono state isolate mediante ultracentrifugazione dal sangue periferico di volontari sani. Le tasche d'aria sono state indotte mediante l'iniezione di 3,5 ml di aria sterile nel tessuto sottocutaneo del dorso di topi ceppo CD1. Dopo 6 giorni, 2 mg di cristalli di UMS in 1 ml di PBS sono stati iniettati nelle tasche d'aria in presenza o in assenza di HDL alla concentrazione di 0,1 mg/ml. Dopo 24 h, negli essudati recuperati dalle tasche mediante lavaggio con 2 ml di PBS, è stato valutato il grado d'infiammazione mediante conta leucocitaria totale e differenziale. La concentrazione di IL-6, KC, CCL2 e TNF- $\alpha$  è stata determinata negli essudati mediante ELISA.

*Risultati:* L'iniezione della sospensione di cristalli di UMS ha indotto una risposta infiammatoria caratterizzata dall'accumulo di leucociti, prevalentemente polimorfonucleati, e dall'aumento della concentrazione di IL-6, KC e CCL2 negli essudati raccolti dopo lavaggio delle tasche d'aria. La concentrazione del TNF- $\alpha$  risultava invece sotto il limite di determinabilità del test effettuato. Il trattamento con le HDL ha ridotto la conta leucocitaria del 73%, il numero di neutrofili del 35% e le concentrazioni di IL-6, KC e CCL2 di 4, 6 e 5 volte rispettivamente.

*Conclusioni:* Con questo studio abbiamo dimostrato che il trattamento con HDL è in grado di limitare l'infiammazione indotta dai cristalli di UMS nel modello animale della tasca d'aria, riducendo il reclutamento dei leucociti e la produzione di fattori chemiotattici nel sito dell'infiammazione. I nostri risultati confermano la funzione antinfiammatoria delle HDL e suggeriscono un loro possibile ruolo nello spegnimento dell'attacco di gotta acuto.

**Parole chiave** - HDL, urato monosodico, tasca d'aria.

**Key words** - HDL, urate crystals, air-pouch.

## BIBLIOGRAFIA

1. Terkeltaub RA. What stops a gouty attack? *J Rheumatol* 1992; 19: 8-10.
2. Weinberger A. Gout, uric acid metabolism, and crystal-induced inflammation. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7: 359-63; Terkeltaub RA. Gout and mechanisms of crystal-induced inflammation. *Curr Opin Rheumatol* 1993; 5: 510-6.
3. Guerne PA, Terkeltaub R, Zuraw B, Lotz M. Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1443-52.
4. Terkeltaub R, Zachariae C, Santoro D, Martin J, Peveri P, Matsushima K. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 894-903.
5. Hachicha M, Naccache PH, McColl SR. Inflammatory microcrystals differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by human neutrophils: a possible mechanism of neutrophil recruitment to sites of inflammation in synovitis. *J Exp Med* 1995; 182: 2019-25.
6. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440: 237-41.
7. Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2936-46.
8. Oliviero F, Sfriso P, Baldo G, Dayer J-M, Giunco S, Scanu A, et al. Apolipoprotein A-I and cholesterol in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27: 79-83.
9. Terkeltaub R, Martin J, Curtiss LK, Ginsberg MH. Apolipoprotein B mediates the capacity of low density



- lipoprotein to suppress neutrophil stimulation by particulates. *J Biol Chem* 1986; 261: 15662-7.
10. Terkeltaub RA, Dyer CA, Martin J, Curtiss LK. Apolipoprotein (apo) E inhibits the capacity of monosodium urate crystals to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular apo E and demonstration of apo E binding to urate crystals in vivo. *J Clin Invest* 1991; 87: 20-6.
  11. Burt HM, Jackson JK, Rowell J. Calcium pyrophosphate and monosodium urate crystal interactions with neutrophils: effect of crystal size and lipoprotein binding to crystals. *J Rheumatol* 1989; 16: 809-17.
  12. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, Kohno T, Edwards CK, Roux-Lombard P, et al. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 2001; 97: 2381-9.
  13. Scanu A, Molnarfi N, Brandt KJ, Gruaz L, Dayer JM, Burger D. Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 921-7.
  14. Scanu A, Oliviero F, Gruaz L, Sfriso P, Pozzuoli A, Frezzato F, et al. High-density lipoproteins downregulate CCL2 production in human fibroblast-like synoviocytes stimulated by urate crystals. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R23.
  15. Denko CW, Whitehouse MW. Experimental inflammation induced by natural occurring microcrystalline salts. *J Rheumatol* 1976; 3: 54.
  16. Gordon TP, Kowanko IC, James M, Roberts-Thomson PJ. monosodium urate crystal-induced prostaglandin synthesis in the rat subcutaneous air pouch. *Clin Exp Rheumatol* 1985; 3: 291-6.
  17. Tate GA, Mandell BF, Schumacher HR Jr, Zurier RB. Suppression of acute inflammation by 15 methyl prostaglandin E1. *Lab Invest* 1988; 59: 192-9.
  18. Murakami Y, Akahoshi T, Hayashi I, Endo H, Hashimoto A, Kono S, et al. Inhibition of monosodium urate crystal-induced acute inflammation by retrovirally transfected prostaglandin D synthase. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2931-41.
  19. Nalbant S, Chen LX, Sieck MS, Clayburne G, Schumacher HR. Prophylactic effect of highly selective COX-2 inhibition in acute monosodium urate crystal induced inflammation in the rat subcutaneous air pouch. *J Rheumatol* 2005; 32: 1762-4.
  20. Matsukawa A, Miyazaki S, Maeda T, Tanase S, Feng L, Ohkawara S. Production and regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in lipopolysaccharide- or monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits: roles of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1, and interleukin-8. *Lab Invest* 1998; 78: 973-85.
  21. Di Giovine FS, Malawista SE, Nuki G, Duff GW. Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL-1. *J Immunol* 1987; 138: 3213-8.
  22. García-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol* 2002; 169: 6467-73.
  23. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 2001; 14: 705-14.
  24. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1987-94.
  25. Murphy AJ, Woollard KJ, Hoang A, Mukhamedova N, Sturzaker RA, McCormick SPA, et al. High-Density Lipoprotein Reduces the Human Monocyte Inflammatory Response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 2071-7.
  26. Baumberger C, Ulevitch RJ, Dayer JM. Modulation of Endotoxic Activity of Lipopolysaccharide by High-Density Lipoprotein. *Pathobiology* 1991; 59: 378-83.
  27. Cettour-Rose P, Nguyen TX, Serrander L, Kaufmann MT, Dayer JM, Burger D, et al. T cell contact-mediated activation of respiratory burst in human polymorphonuclear leukocytes is inhibited by high density lipoproteins and involves CD18. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 52-8.