

Разработка и валидация метода скрининга ингибиторов инфламмасомы NLRP3 на первичных макрофагах мышей C57bl/6j

Р.Д. Данилов , Е.В. Соколова, Е.К. Захарова, Д.А. Бабков

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Инфламмасомы представляют собой высокомолекулярные белковые комплексы, активируемые различными клеточными паттернами и играющие ключевую роль в сигнальных путях врожденного иммунного ответа. Наиболее изученной является инфламмасома NLRP3, благодаря ее способности распознавать широкий спектр эндогенных и экзогенных активаторов, что обуславливает ее участие в патогенезе воспалительных и метаболических заболеваний, включая диабет, атеросклероз и нейродегенеративные патологии. Ингибирование активации NLRP3 является перспективным направлением поиска новых способов терапии ассоциированных с воспалением заболеваний. Выполнено выделение перитонеальных мышиных макрофагов и проведено исследование активности инфламмасомы NLRP3. Определены оптимальные условия проведения эксперимента и выполнена оценка качества методики по Z-фактору с использованием в качестве стандартного препарата глибенкламида.

Ключевые слова: NLRP3, ингибиторы, макрофаги, ИЛ-1 β , клеточная площадь

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №24-25-20154.

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2024-21-4-51-55>

Development and validation of a method for screening NLRP3 inflammasome inhibitors on primary macrophages from C57bl/6j mice

R.D. Danilov , E.V. Sokolova, E.K. Zakharova, D.A. Babkov

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. Inflammasomes are high-molecular-weight protein complexes that are activated by various cellular patterns and play a key role in the signalling pathways of the innate immune response. The NLRP3 inflammasome is the most studied due to its ability to recognise a wide range of endogenous and exogenous activators, which explains its involvement in the pathogenesis of inflammatory and metabolic diseases, including diabetes, atherosclerosis and neurodegenerative pathologies. Inhibition of NLRP3 activation is a promising avenue for finding novel therapies for inflammation-associated diseases. Peritoneal murine macrophages were isolated and NLRP3 inflammasome activity was investigated. Optimal experimental conditions were determined and the quality of the technique was assessed using the Z-factor.

Keywords: NLRP3, inhibitors, macrophages, IL-1 β , cell area

Funding. The study was carried out with the financial support of the RGNF grant No. 24-25-20154.

Инфламмасомы можно определить как высокомолекулярные белковые олигомеры, образующиеся в ответ на различные паттерны, и, являющиеся важными сигнальными молекулами врожденного иммунного ответа [1]. В настоящее время NLRP3 является наиболее распространенной и изученной инфламмасомой из-за ее набора активаторов и aberrантной активации в ряде воспалительных заболеваний [2]. Канонический путь активации инфламмасомы NLRP3 является каспаза-1-зависимым, в результате которого увеличивается уровень транскрипции неактивных предшественников про-ИЛ-1 β , про-ИЛ-18 и прокаспазы-11. Вторичный воспалительный сигнал запускает формирование инфламмасомы. Неканонический путь

активации инфламмасомы NLRP3 запускается внутриклеточным бактериальным липополисахаридом (ЛПС) и активирует другие каспазы, такие как каспаза-11.

В отличие от других сенсорных белков, NLRP3 может распознавать множество различных факторов, обусловленных не только патогеном, но и окружающей средой или хозяином, поэтому умеренная активация инфламмасомы NLRP3 повышает защиту организма от бактерий, вирусов и паразитов, а аномальная активация инфламмасомы NLRP3 считается инициатором при различных заболеваниях человека, таких как метаболический синдром, сахарный диабет 2-го типа, подагра, атеросклероз и нейродегенеративные заболевания [1, 3].

В частности, длительная активация инфламмосомы NLRP3 в макрофагах, инфильтрирующих жировую ткань, приводит к метаболическому воспалению, которое еще больше усиливает воспалительную среду в чувствительных к инсулину тканях [4].

Также было обнаружено, что инфламмосома NLRP3 играет важную роль в различных физиологических патологических процессах, в том числе, связана с некоторыми возрастными заболеваниями: развитием резистентности к инсулину, болезни Альцгеймера, Паркинсона, старением сердечно-сосудистой системы, потерей слуха и зрения [5].

Известны молекулы, которые действуют как ингибиторы воспаления NLRP3, что достигается путем ингибирования АТФ-чувствительных калиевых каналов (Глибурид), ингибирования активации каспазы-1 (Партенолид), ингибирования активности АТФазы NLRP3 (Партенолид, Bay 11-7082, производное акриламида), ингибирования высвобождения ИЛ-1 β (MCC950) и ингибирования АТФ-рецептора P2X7 (AZD9056) [6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оптимизация метода определения активности NLRP3 в целях поиска новых ингибиторов активации инфламмосомы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и оборудование. Используются мыши-доноры линии C57BL/6J, без специфических патогенов, в возрасте 3–6 мес. Содержание животных должно осуществляться в оборудованных вивариях и отвечать Международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях и правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ. Активность NLRP3 определяется по образованию ИЛ-1 β с помощью коммерческих ИФА-наборов (Cloud-Clone, Китай) и изменению площади стимулированных ЛПС + АТФ мышечных макрофагов. Реактивы, используемые в эксперименте, предпочтительно приобретать у проверенных поставщиков – Sigma Aldrich (США), Диа-М (Россия), ПанЭко (Россия) и других.

Выделение перитонеальных макрофагов. Животным в асептических условиях с помощью стерильного одноразового шприца на 5 мл вводят внутрибрюшинно по 2 мл 3%-го раствора ферментативного пептона. Следует избегать попадания иглы в мочевой пузырь, кишечник и печень. Мышей экспонируют в течение 3 суток и подвергают эвтаназии методом цервикальной дислокации с последующей фиксацией на препаровальном столе. Важно делать эвтаназию быстро и аккуратно во избежание попадания крови в брюшную полость. Одновременно возможно умерщвление 2–5 мышей в зависимости от опыта специалиста. Место разреза

обрабатывают 70%-м спиртом и послойно стерильными ножницами вскрывают брюшину «конвертом», обнажая стенку брюшной полости (рис. 1). Заполняют брюшную полость 10 мл охлажденным до +4–6 °С раствором Хенкса (без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, без фенолового красного) в объеме 5 мл с помощью стерильного одноразового шприца. Используя одноканальный дозатор со стерильным наконечником, лаваж аспирируют и переносят в стерильные пробирки объемом 15 мл, которые держат на льду в целях предотвращения адгезии клеток перитонеального экссудата к пластиковой стенке (рис. 1). Пробирки заполняются до метки. После каждой мыши инструменты и препаровальный стол тщательно обрабатывают 70%-м спиртом.

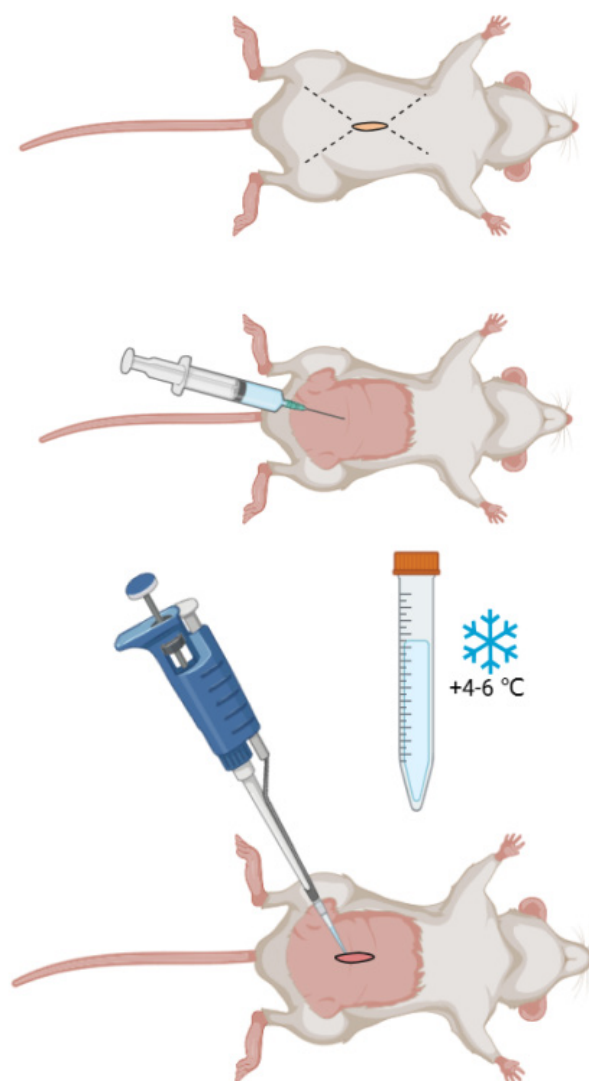


Рис. 1. Схема сбора перитонеального экссудата

Лаваж центрифугируют при 250 г в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, осадок ресуспендируют охлажденным раствором Хенкса. Суспензию центрифугируют при 250 г в течение 5 мин, надосадочная

жидкость снова отбрасывается, осадок тщательно ресуспендируют охлажденной полной питательной средой до объема 1 мл, представляющей собой раствор питательной среды DMEM с 2 мМ глутамина и содержанием глюкозы 4,5 г/л, дополненный 10%-й инактивированной телячьей эмбриональной сывороткой и смесью пенициллина и стрептомицина в концентрации 50 ЕД/мл. Из пробирок отбирают 10 мкл первичной клеточной суспензии и проводят окраску с 10 мкл 0,4%-го трипанового синего в стерильных эппендорфах. Проводят подсчет клеток на камере Горяева. Разводят суспензию охлажденной полной питательной средой до концентрации $1,5-2 \times 10^6$ клеток/мл. Полученную клеточную суспензию вносят по 100 мкл в лунку культурального планшета (активные лунки). Краевые лунки заполняются только 250 мкл дистиллированной воды (рис. 2).

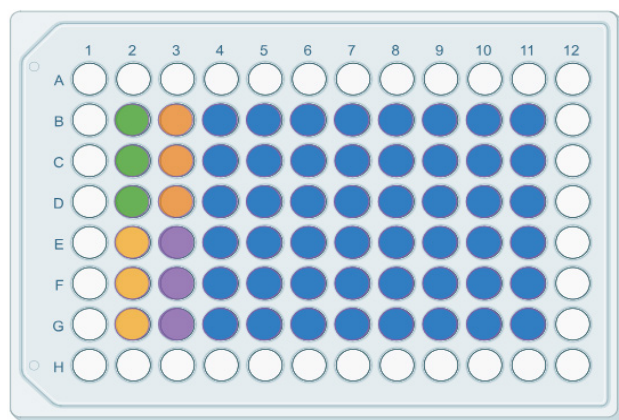


Рис. 2. Схема 96-луночного культурального планшета. Белым цветом обозначены краевые лунки, зеленым – интактные, желтым – ЛПС-контроль, оранжевым – ЛПС+АТФ-контроль, фиолетовым – лунки препарата сравнения, синие – опытные

Инкубируют в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе (уровень CO₂ 5 %, температура 37 °C). Затем промывают лунки планшета от погибших и не прикрепившихся макрофагов и других клеточных субпопуляций с помощью раствора Хенкса или DMEM (37 °C). После промывки доводят полной питательной средой до объема 180 мкл/лунка и инкубируют в течение 18 ч.

Исследование активности инфламмосомы NLRP3. Вносят ЛПС (*E. coli* O127:B8, Sigma, США) в лунки планшета (за исключением интактных) в конечной концентрации 10 мкг/мл (рис. 2). Инкубируют в течение 24 ч и вносят исследуемые вещества. Конечная концентрация составляет 100 мкМ (скрининговая концентрация) или используется диапазон концентраций 0,1–100 мкМ для определения зависимости «концентрация-активность». Обработка клеток веществами длится 1 ч в инкубаторе, после чего в лунки (за исключением ЛПС-контроля и интактных) вносят раствор АТФ с конечной концентрацией 5 мМ (рис. 2). После

1,5-часовой инкубации с раствором АТФ делается забор супернатанта для определения ИЛ-1β с помощью ИФА-наборов (Cloud-Clone, Китай). Супернатант допустимо заморозить, если не планируется использовать его сразу. Также целесообразно определение цитотоксичности соединений методом ЛДГ-теста [7]. После забора супернатанта клетки проводят окраску макрофагов по Май-Грюнвальду с целью измерения клеточной площади и оценки морфологических изменений.

Обработка результатов. Измерения и расчет IC₅₀ исследуемых веществ и препарата сравнения проводятся в трех независимых экспериментах. Данные обрабатываются с использованием MS Excel и GraphPad Prism 8.4.3. Величины IC₅₀ вычисляют с помощью нелинейной 3-параметрической регрессии. Статистическая значимость определяется с применением непараметрического критерия Краскела – Уоллиса с пост-тестом Данна.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определили влияние различных факторов на продукцию ИЛ-1β, таких как продолжительность стимуляции макрофагов (время инкубации) и конечная концентрация ЛПС и АТФ в питательной среде. Показано, что наиболее оптимальной является 24-часовая обработка клеток 10 мкг/мл ЛПС. При этом последующая активация инфламмосом раствором АТФ в конечной концентрации 5 мМ существенно увеличивает продукцию интерлейкина. Напротив, при концентрации 1 мМ АТФ в питательной среде эффект менее выражен, а использование более концентрированных растворов (10 мМ) не дает значимого прироста продукции ИЛ-1β, что, по-видимому, свидетельствует о достижении клетками «метаболического максимума» (рис. 3).

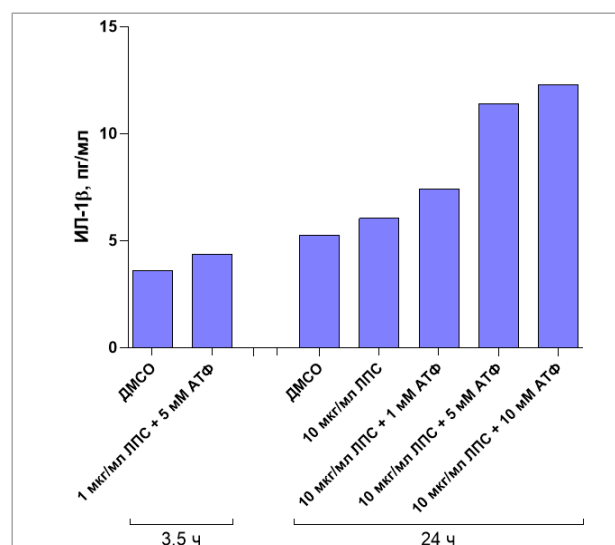


Рис. 3. Секреция ИЛ-1β через 3,5 ч и 24 ч после стимуляции ЛПС перитонеальных макрофагов

Было оценено влияние глибенкламида на синтез ИЛ-1 β в диапазоне концентраций 0,001–50 мкМ (рис. 4). Также оценивали изменение площади макрофагов, обработанных данным препаратом в диапазоне концентраций 0,1–100 мкМ (рис. 5).

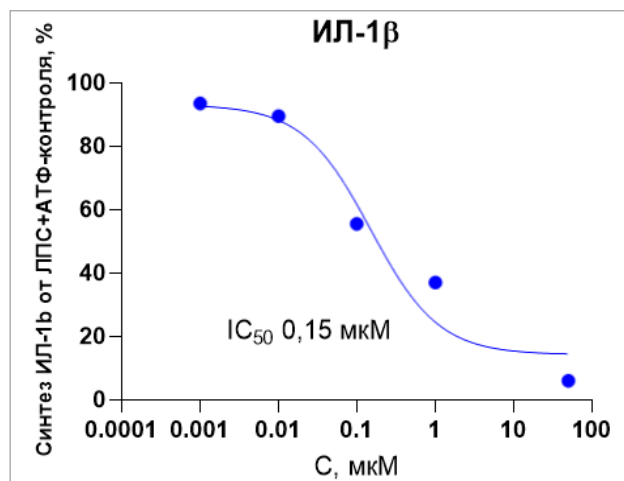
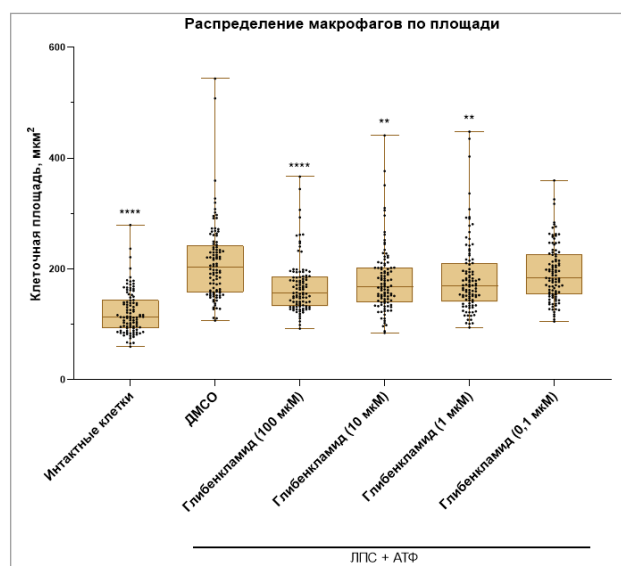


Рис. 4. Зависимость «концентрация-активность» глибенкламида на секрецию ИЛ-1 β



* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Рис. 5. Снижение площади стимулированных ЛПС + АТФ макрофагов под действием глибенкламида в диапазоне концентраций 0,1–100 мкМ ($n = 100$). Статистическая значимость по сравнению с контролем ЛПС + АТФ. Тест Краскела – Уоллиса с посттестом Данна

Для оценки качества методики рассчитали Z-фактор по формуле:

$$Z = 1 - \frac{3 * (\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|},$$

где σ_p и σ_n – стандартные отклонения положительно-го (ЛПС + АТФ) и отрицательного (интакт) контроля; μ_p и μ_n – средние значения положительного и отрицательного контроля соответственно. $Z < 0$ является неприемлемым; $0 \leq Z < 0,5$ означает среднее качество; $0,5 \leq Z < 1$ – отличное качество; $Z = 1$ – идеальный показатель [8]. В использованных нами условиях значение Z-фактора составило 0,81.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были подобраны оптимальные концентрации ЛПС и АТФ, а также время инкубации перитонеальных макрофагов мышей. Оценкой оптимальных условий проведения исследования послужило значение Z-фактора. На основании выбранных условий была оценена ингибиторная активность глибенкламида в отношении активации NLRP3 стимулированных ЛПС + АТФ мышинных макрофагов по показателям синтеза ИЛ-1 β и клеточных площадей.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Angosto-Bazarra D., Molina-López C., Peñín-Franch A. et al. Techniques to study inflammasome activation and inhibition by small molecules. *Molecules*. 2021;26(6):1704. doi: 10.3390/molecules26061704.
- Blevins H. M., Xu Y., Biby, S. et al. The NLRP3 inflammasome pathway: A review of mechanisms and inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;14:879021. doi: 10.3389/fnagi.2022.879021.
- Jiang H., He H., Chen Y. et al. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *Journal of Experimental Medicine*. 2017;214(11):3219–3238. doi: 10.1084/jem.20171419.
- Jiang H., Gong T., Zhou R. The strategies of targeting the NLRP3 inflammasome to treat inflammatory diseases. *Advances in immunology*. 2020;145:55–93. doi: 10.1016/bs.ai.2019.11.003.
- Yuan Z., Yu D., Gou T. et al. Research progress of NLRP3 inflammasome and its inhibitors with aging diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2020;957:175931. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175931.
- Abdullaha M., Mohammed S., Ali M. et al. Discovery of quinazolin-4(3H)-ones as NLRP3 inflammasome inhibitors: computational design, metal-free synthesis, and in vitro biological evaluation. *The Journal of Organic Chemistry*. 2023;84(9):5129–5140. doi: 10.1021/acs.joc.9b00138.
- Allen M., Millett P., Dawes E. et al. Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers in vitro. *Clinical Materials*. 1994;16(4):189–194. doi: 10.1016/0267-6605(94)90116-3.
- Zhang J., Chung T.D.Y., Oldenburg K.R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening*. 1999;4(2):67–73. doi: 10.1177/108705719900400206.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Роман Дмитриевич Данилов – аспирант кафедры фармакологии и биоинформатики, лаборант-исследователь лаборатории метаботропных лекарственных средств, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; ✉ romkan43@gmail.com

Елена Вячеславовна Соколова – аспирант кафедры фармакологии и биоинформатики Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; sokolova210795@gmail.com

Екатерина Константиновна Захарова – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры химии, лаборант-исследователь лаборатории метаботропных лекарственных средств, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; ekzakharova1@gmail.com

Денис Александрович Бабков – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики, директор Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, старший научный сотрудник лаборатории метаботропных лекарственных средств, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; denis.a.babkov@gmail.com

Статья поступила в редакцию 14.08.2024; одобрена после рецензирования 26.10.2024; принята к публикации 18.11.2024.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Roman D. Danilov – postgraduate student of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, laboratory assistant researcher at the Laboratory of Metabotropic Medicines, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; ✉ romkan43@gmail.com

Elena V. Sokolova – Postgraduate student of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; sokolova210795@gmail.com

Ekaterina K. Zakharova – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Chemistry, Laboratory Assistant Researcher at the Laboratory of Metabotropic Medicines, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; ekzakharova1@gmail.com

Denis A. Babkov – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Professor of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Director of the Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Senior Researcher at the Laboratory of Metabotropic Medicines, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; denis.a.babkov@gmail.com

The article was submitted 14.08.2024; approved after reviewing 26.10.2024; accepted for publication 18.11.2024.