

Влияние аминалона и пикамилон на активацию инфламмосомы NLRP3 в панкреатоцитах при аллоксан-индуцированном сахарном диабете

И.Н. Тюренков¹, Ю.И. Великородная^{1,2}, Д.А. Бакулин¹, А.В. Смирнов^{1,2}

¹Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

²Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

Аннотация. Выдвинуто предположение, что активация NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) является критическим триггером функционального нарушения и повреждения β -клеток поджелудочной железы (ПЖ) при сахарном диабете (СД) 2-го типа. В данной работе с помощью иммуногистохимического метода было изучено влияние аминалона и пикамилон на раннюю модуляцию активности инфламмосомы NLRP3 при экспериментальном аллоксан-индуцированном СД у лабораторных крыс. При пероральном введении аминалона (500 мг/кг) и пикамилон (250 мг/кг) на протяжении 5 суток до инъекции аллоксаном и в течение 2 суток после экспозиции отмечалось подавление активности NLRP3, на что указывало достоверное снижение площади иммунопозитивных панкреатоцитов до $(21,30 \pm 5,44)$ и $(39,31 \pm 5,24)$ % соответственно относительно значения в группе животных, которым терапию не проводили $(75,19 \pm 7,69)$ %. Полученные результаты исследования показали, что исследуемые препараты с ГАМК-ергическим действием способствовали коррекции функциональных нарушений поджелудочной железы при аллоксан-индуцированном СД через ингибирование активации инфламмосомы NLRP3 в панкреатоцитах.

Ключевые слова: NLRP3 инфламмосома, ГАМК, поджелудочная железа, экспериментальный сахарный диабет, ГАМК-ергические препараты

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-15-00192 от 19.04.2021 г.

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2023-20-1-132-136>

Effect of aminoron and picamilon on NLRP3 inflammasome activation in pancreatic cells during alloxan-induced diabetes mellitus

I.N. Tyurenkov¹, Yu.I. Velikorodnaya^{1,2}, D.A. Bakulin¹, A.V. Smirnov^{1,2}

¹Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

²Volgograd Medical Scientific Center, Volgograd, Russia

Abstract. It has been suggested that NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) activation is a critical trigger for functional impairment and damage to pancreatic β -cells in type 2 diabetes mellitus (DM). In this work, using the immunohistochemical method, we studied the effect of aminoron and picamilon on the early modulation of NLRP3 inflammasome activity during experimental alloxan-induced DM in laboratory rats. Per os administration of aminoron (500 mg/kg) and picamilon (250 mg/kg) for 5 days before the administration of alloxan and for 2 days after the injection, suppression of NLRP3 activity was noted, as indicated by a significant decrease in the area of immunopositive pancreaticocytes to $(21,30 \pm 5,44)$ and $(39,31 \pm 5,24)$ %, respectively, relative to the value in the group of animals that were not treated $(75,19 \pm 7,69\%)$. The results of the study showed that the studied preparations with GABAergic action promoted correction of functional disorders of the pancreas during alloxan-induced DM by inhibiting activation of NLRP3 inflammasome in pancreaticocytes.

Keywords: NLRP3 inflammasome, GABA, pancreas, experimental diabetes mellitus, GABAergic drugs

Funding. The work was carried out with the financial support of the RGNF grant No. 21-15-00192 dated 04/19/2021.

Инфламмосома NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3), или криопирин, – цитоплазматический мультибелковый комплекс, который расщепляет и активирует про-каспазу-1, что приводит к секреции ключевых провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [1, 2]. Выдвинуто предположение, что активация NLRP3 является критическим триггером функционального нарушения и повреждения

β -клеток поджелудочной железы (ПЖ) при сахарном диабете (СД) 2-го типа. Устойчивая гипергликемия индуцирует образование активных форм кислорода в островках поджелудочной железы, что приводит к увеличению синтеза тиоредоксин-взаимодействующего белка (TXNIP), который, в свою очередь, активирует инфламмосомы NLRP3. Кроме того, высокое содержание глюкозы в крови может привести к повышению

экспрессии островкового амилоидного пептида (IAPP)/амилина в макрофагах, который является вторым стимулом активации воспаления NLRP3 посредством иницирования взаимодействия NLRP3 с апоптоз-ассоциированным белком, содержащим домен для рекрутирования каспазы (ASC) [3].

Во многих отечественных и зарубежных работах показано, что ГАМК подавляет иммунные и воспалительные реакции, ингибирует пролиферацию Т-клеток [4], ингибирует активацию транскрипционного фактора NF- κ B, который отвечает за продукции провоспалительных цитокинов [5] и инфламмосомы NLRP3 [4, 6]. Однако влияние ГАМК на активность инфламмосомы при сахарном диабете не изучалось.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Сравнительное изучение влияние коммерческих ГАМК-ергических препаратов (аминалон и пикамилон) на раннюю модуляцию активности инфламмосомы NLRP3 при экспериментальном аллоксан-индуцированном сахарном диабете у лабораторных крыс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. Исследование выполняли на 24 (4 группы по 6 животных в каждой) белых половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ВолГМУ, протокол № 2022/116 от 04.03.2022 г. При проведении эксперимента соблюдали международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Повреждение ПЖ у крыс моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения аллоксана (Sigma) в дозе 130 мг/кг. Аллоксан (5,5-дигидроксил пириимидин-2,4,6-трион) является производным мочевины и аналогом глюкозы, который широко используется в качестве диабетогенного препарата в фармакологических исследованиях [7]. Были протестированы два препарата с ГАМК-ергическим действием: аминалон (гамма-аминомасляная кислота, «Органика») и пикамилон (никотиноил-гамма-аминомасляная кислота, «Фармстандарт-УфаВИТА»). Таблетки измельчали в дистиллированной воде и в виде взвеси перорально вводили животным в дозе 500 мг/кг (аминалон) и 250 мг/кг (пикамилон) на протяжении 5 суток до введения аллоксана и далее в течение 2 суток, после чего оценивали уровень гликемии после 4-часового голодания с использованием глюкометра Countur TS (Германия). Изучаемые препараты и дозы выбраны на основании данных литературы и по результатам собственных предварительных исследований. В качестве негативного контроля служили крысы, которым до (5 суток) и после (2 суток) введения аллоксана вводили физиологический раствор, а интактным контролем выступали крысы, которым проделывали все манипуляции с использованием изотонического раствора.

Иммуногистохимическое исследование. По окончании эксперимента (через 2 суток после введения аллоксана) крыс декапитировали под хлоралгидратным наркозом (800 мг/кг, в/бр.). Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования образцы тканей поджелудочной железы фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. Затем образцы обезвоживали в батарее спиртов восходящей крепости, просветляли в хлороформе и заключали в парафиновую среду Histomix (Биовитрум, Россия). Парафиновые блоки резали на ротационном микротоме HM340E (MICROM, Германия), получали срезы толщиной 4 мкм и монтировали их на предметные стекла, обработанные поли-L-лизинном (Menzel, Германия). При выполнении ИГХ исследования парафиновые срезы после депарафинизации и регидратации инкубировали 20 мин в 3%-й перекиси водорода для блокирования эндогенной пероксидазы. Постановку иммуногистохимических реакций проводили с помощью пероксидаза-полимерной системы визуализации N-Histofine MAX PRO (Nichirei, Япония) согласно инструкции производителя. Демаскировку антител осуществляли путем кипячения срезов при 100 °C в 0,01 М цитратном буфере с pH = 6,0 в течение 20 мин. Срезы поджелудочной железы инкубировали с первичными антителами к NLRP3 (кроличьи, поликлональные, Abcam, Великобритания) при комнатной температуре в течение 1 ч. Пероксидазу проявляли 3-3-диаминобензидином из набора протокола. На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Морфометрия. Микропрепараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа AxioScope A1 (ZEISS, Германия), оборудованного цифровой камерой AxioCam MRc5 A1 (ZEISS, Германия). Площадь, занимаемая иммунопозитивными экзокринными панкреатоцитами, оценивалась на 5 рандомизированных микрофотографиях образцов поджелудочной железы (ув. $\times 200$) и рассчитывалась в % относительно общей оцениваемой площади среза с помощью программного обеспечения ZENpro 2012 (ZEISS, Германия).

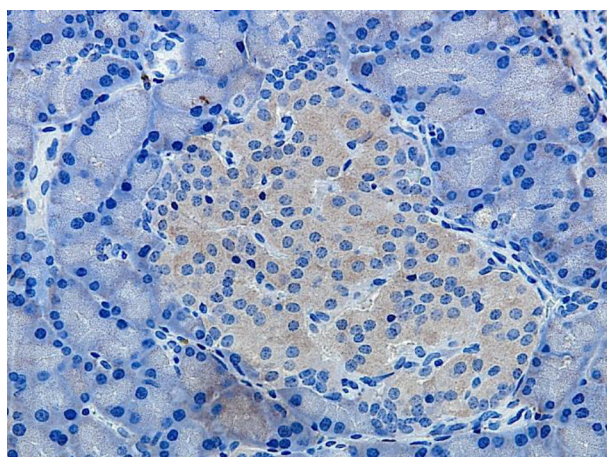
Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов программ Statistica 7.0 (StatSoft, США). Характер распределения полученных данных определяли по критерию Шапиро – Уилка. В связи с наличием нормального распределения данных межгрупповые различия выявляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Апостериорные попарные сравнения выполняли с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок с поправкой Бонферрони (Bonferroni). Обобщенные данные представляли в виде среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения (SD). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

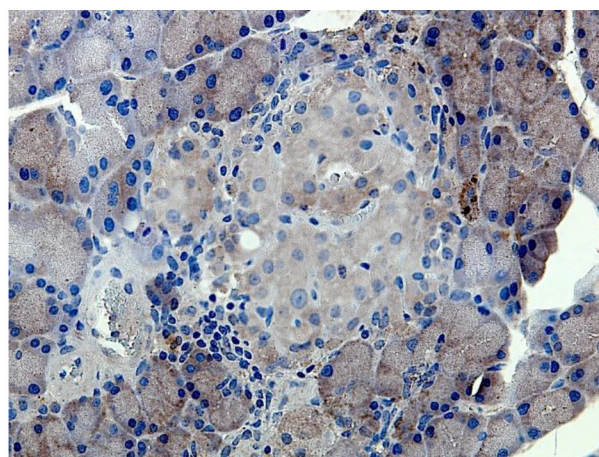
Изучение экзокринной части ПЖ контрольных интактных животных с помощью ИГХ показало, что клетки, меченные антителами к NLRP3, составляли менее 5 % от их общего количества (табл. 1). В то же время в островках ПЖ положительная реакция на NLRP3 в виде нежной мелкодисперсной зернистости выявлялась в цитоплазме практически всех эндокринных клеток (рис. А).

В поджелудочной железе крыс из группы негативного контроля, которым до и после введения ал-

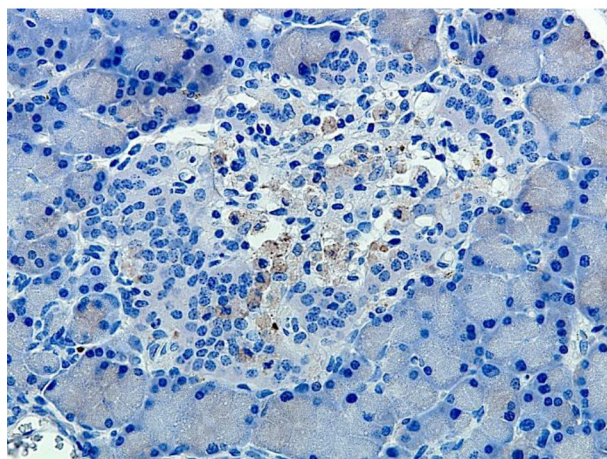
локсана вводили физиологический раствор, отмечали резкое увеличение площади панкреатоцитов (до 75 %), дающих положительную реакцию на инфламмасому NLRP3. При этом в части клеток, составляющих панкреатические ацинусы, иммунопозитивный материал выявлялся в виде крупных гранул, локализованных под мембранным пространством цитоплазмы. В единичных сохранившихся островках Лангерганса после аллоксан-индуцированного СД отмечали незначительное увеличение содержания NLRP3 по сравнению с контрольными животными (рис. Б).



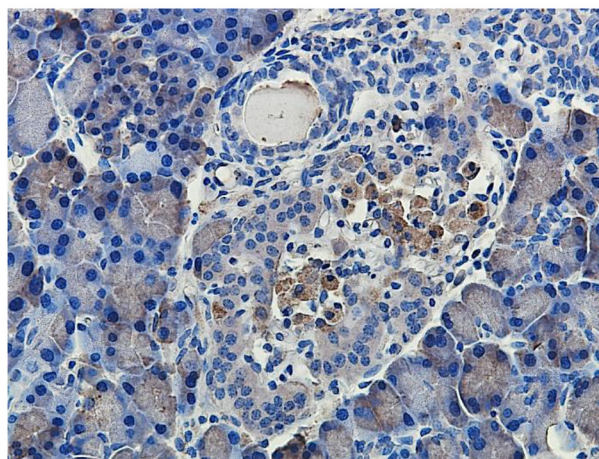
А



Б



В



Г

Рис. Иммунолокализация NLRP3 в поджелудочной железе (Антитела к NLRP3. Peroксидазно-антипероксидазный-метод. Ядра окрашены гематоксилином Майера. Ув. ×400):

А – интактной крысы; Б – опытной крысы с индуцированным СД; В – опытной крысы, получавшей аминалон до и после индуцированного СД; Г – опытной крысы, получавшей пикамилон до и после индуцированного СД

Профилактическое введение подопытным крысам аминалона в течение 5 суток до острого аллоксан-индуцированного СД с последующей пролонгацией еще 2 суток эффективно подавляло активность NLRP3, на что указывало значимое снижение общей площади иммунопозитивных панкреатоцитов до 21 %

по сравнению с показателем в группе животных, которым терапию не проводили (табл. 1, рис. В). В инсулоцитах сохранившихся островков экспрессия NLRP3, определяемая иммуногистохимическим методом, отсутствовала. Однако обращало на себя внимание присутствие в эндокринных островках клеток

с положительной реакцией на NLRP3, фенотипические признаки которых соответствовали плазматическим клеткам (рис. В).

У животных, которым профилактически вводили пикамилон за 5 суток до введения панкреотоксина и в течение 2 суток после его инъекции, регистрировали значимое снижение активности NLRP3: площадь иммунопозитивных панкреатоцитов составляла не более 40 %. При этом большая часть NLRP3+ клеток имела очаговый характер пространственного распределения в экзокринной части ПЖ. В островках ПЖ иммунопозитивный материал обнаруживался не только в цитоплазме эндокриноцитов, но и в цитоплазме плазматических клеток (табл. 1, рис. Г).

Анализ гликемического статуса у экспериментальных крыс показал, что уровень глюкозы в группах животных, получавших аминалон и пикамилон, был незначительно ниже, чем в группе с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом (табл. 2).

Таблица 1

Площадь NLRP3+ клеток в экзокринной части поджелудочной железы (M ± SD), %%

Группа животных			
Контроль (n = 30)	СД + физраствор (n = 30)	СД + аминалон (n = 30)	СД + пикамилон (n = 30)
4,10 ± 0,79	75,19 ± 7,69*	21,30 ± 5,44*#	39,31 ± 5,24*#

Статистически значимые различия (p ≤ 0,05) по сравнению с *интактным контролем, #группой животных с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом, получавших физиологический раствор.

Примечание: n – количество исследуемых полей зрения препаратов поджелудочной железы.

Таблица 2

Уровень глюкозы в крови подопытных животных (M ± SD), ммоль/л

Группа животных			
Контроль (n = 6)	СД + физраствор (n = 6)	СД + аминалон (n = 6)	СД + пикамилон (n = 6)
4,4 ± 0,6	32,2 ± 1,9*	29,1 ± 3,4*	27,8 ± 4,5*

Статистически значимые различия (p ≤ 0,05) по сравнению с *интактным контролем.

Аллоксан как панкреатотоксический фактор является клеточным стрессором, нарушающим гомеостаз, запускающим процессы гибели клеток. В эти патологические процессы вовлекаются инфламмосомы. Эти мультибелковые гетеромерные комплексы, вследствие активации каспазы 1, провоспалительных интерлейкинов в значительной степени влияют на развитие процессов, приводящих к апоптозу клеток [2].

Некоторые исследователи при изучении антидиабетического потенциала ГАМК отмечали дефицит аминокислоты в панкреатических островках на фоне уменьшения массы β-клеток [6], что обосновывает целесообразность применения производных ГАМК для профилактики гибели β-клеток вследствие подавления активности инфламмосомы NLRP3 и продукции провоспалительных цитокинов. Наше исследование косвенным образом подтверждает эти данные, демонстрируя, с одной стороны, увеличение содержания иммунореактивного материала в экзокриноцитах ПЖ к антителам против NLRP3 при моделировании аллоксанового СД, а с другой – ингибирование воспалительной инфламмосомы при применении ГАМК-ергических препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что препараты с ГАМК-ергическим действием – аминалон и пикамилон, при введении в течение 5 суток до инъекции аллоксана и в течение 2 суток после его введения значительно подавляли активацию инфламмосомы NLRP3 в панкреатоцитах, тем самым способствуя сохранению функций поджелудочной железы.

REFERENCES

1. Ding S., Xu S., Ma Y. et al. Modulatory mechanisms of the NLRP3 inflammasomes in diabetes. *Biomolecules*. 2019;9(12):850. doi: 10.3390/biom9120850.
2. Martinon F., Burns K., Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2): 417–426. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00599-3.
3. Morikawa S., Kaneko N., Okumura C., et al. IAPP/amylin deposition, which is correlated with expressions of ASC and IL-1β in β-cells of Langerhans' islets, directly initiates NLRP3 inflammasome activation. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018;32. doi:10.1177/2058738418788749.
4. Sparrow E.L., James S., Hussain K. et al. Activation of GABA(A) receptors inhibits T cell proliferation. *PLoS One*. 2021;16(5). doi:10.1371/journal.pone.0251632.
5. Bhandage A.K., Jin Z., Korol S.V. et al. GABA regulates release of inflammatory cytokines from peripheral blood mononuclear cells and CD4+ T cells and is immunosuppressive in Type 1 Diabetes. *E Bio Medicine*. 2018;30:283–294. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.019.
6. Tian J., Yong J., Dang H., Kaufman D.L. Oral GABA treatment downregulates inflammatory responses in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 2011;44(6):465–470. doi: 10.3109/08916934.2011.571223.
7. Kottaisamy C.P., Raj D.S., Prasanth Kumar V., Sanakaran U. Experimental animal models for diabetes and its related complications – a review. *Laboratory Animal Research*. 2021;37(1):23. doi:10.1186/s42826-021-00101-4.

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

Информация об авторах

Иван Николаевич Тюренков – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и фармации, Институт непрерывного медицинского и фармакологического образования, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, fibfuv@mail.ru

Юлия Ивановна Великородная – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств, научный сотрудник лаборатории патоморфологии, Волгоградский медицинский научный центр, аспирант кафедры фармакологии и фармации, Институт непрерывного медицинского и фармакологического образования, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, [✉]alta-u@mail.ru

Дмитрий Александрович Бакулин – кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии, Волгоградский государственный медицинский университет; старший научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств, Научный центр инновационных лекарственных средств, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, mbfdoc@gmail.com

Алексей Владимирович Смирнов – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии, Волгоградский государственный медицинский университет, заведующий лабораторией патоморфологии, Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия, alexeysmirnov.volggmu@gmail.com

Статья поступила в редакцию 07.10.2022; одобрена после рецензирования 23.12.2022; принята к публикации 16.03.2023.

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

Information about the authors

Ivan N. Tyurenkov – Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Pharmacy of Institute of Continuing Medical and Pharmacological Education, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, fibfuv@mail.ru

Yuliya I. Velikorodnaya – Junior Researcher of Laboratory of Toxicology, Research Center for Innovative Medicines, Volgograd State Medical University; Researcher of Laboratory of Pathomorphology, Volgograd Medical Research Center, Postgraduate Student of Department of Pharmacology and Pharmacy, Institute of Continuing Medical and Pharmacological Education, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, [✉]alta-u@mail.ru

Dmitry A. Bakulin – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Intensive Care Medicine, Volgograd State Medical University; Senior Researcher of Laboratory of Pharmacology of Cardiovascular Drugs, Research Center for Innovative Medicines, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, mbfdoc@gmail.com

Alexey V. Smirnov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, Volgograd State Medical University; Head of the Laboratory of Pathomorphology, Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia, alexeysmirnov.volggmu@gmail.com

The article was submitted 07.10.2022; approved after reviewing 23.12.2022; accepted for publication 16.03.2023.