

Д.А.Путілін
О.М.Камишний

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: стрептозотин-індукований цукровий діабет, панкреатичні лімфатичні вузли, *Glut1*, *mTOR*, *AMPK1α*.

Надійшла: 24.04.2016

Прийнята: 15.05.2016

УДК: 616.428:616.37]-008.953.2:[616.379-008.64+616.379-008.64-085.252.349.7]-092.9

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОМЕТАБОЛІЗМУ ЛІМФОЦИТІВ ПАНКРЕАТИЧНИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМУ ДІАБЕТИ ТА ПІСЛЯ ВВЕДЕНЬ МЕТФОРМІНУ

Дослідження виконано в межах науково-дослідної роботи «Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного і епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології» (номер державної реєстрації 0112U005642).

Реферат. За допомогою молекулярно-генетичних методів досліджували рівень експресії мРНК генів *Glut1*, *mTOR* і *AMPK1α* у ПЛВ щурів з експериментальним стрептозотин-індукованим цукровим діабетом (ЕСІЦД) і після введення метформіну. Для визначення рівня мРНК досліджуваних генів проводили ОТ-ПЛР в реальному часі на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Виявлено збільшення рівня мРНК генів транспортерів глюкози *Glut 1* та протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЛВ при діабеті можуть бути важливим тригером їх диференціювання в ефекторні прозапальні субпопуляції Th1 і Th17, а зростання рівня мРНК *AMPK1α* та пригнічення експресії *mTOR* в ПЛВ після введення метформіну діабетичним щурам свідчить про можливість його використання для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 2. – С. 61-68.

© Д.А.Путілін, О.М.Камишний, 2016

✉ des.doctor@mail.ru; alexkamyshny@yandex.ru

Putilin D.A., Kamyshny A.M. Features of immune metabolism of lymphocytes in pancreatic lymph nodes during experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus and after introduction of metformin.

ABSTRACT. Background. Metabolic changes in terms of developing diabetes, especially hyperglycemia, can directly affect immune metabolism of lymphocytes. **Objective:** The aim was to find out the level of mRNA gene expression of *Glut1*, *mTOR* and *AMPK1α* in pancreatic lymphatic nodes (PLN) in rats with experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus (ESIDM) and after introduction of metformin. **Methods.** *Glut1*, *mTOR* and *AMPK1α* mRNA expression were analyzed by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Total RNA was extracted from PLN tissue by Trizol RNA Prep 100 (Isogen, Russia), according to the manufacturer's instructions. RNA was re-suspended in RNase free water, quantified and subjected to RT-PCR reaction using RT-PCR kit; RT (Syntol, Russia). To determine the level of *Glut1*, *mTOR* and *AMPK1α* mRNA, RT-PCR was performed in real-time by thermal cycler CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). The relative level of gene expression were studied with rat reference genes GAPDH by the method $\Delta\Delta C_t$. Statistical analysis were conducted using available software «Bio-Rad SFX Manager 3.1» (Bio-Rad, USA). **Results.** It was established that hyperglycemia caused the transcript induction of genes of glucose transporter *Glut1* (in 9.9-28.9 times, $p<0.05$) and protein kinase *mTOR* (in 5.3-3.3 times, $p<0.05$) in cells of PLN. Introduction of metformin to the diabetic rats resulted in an increased level of mRNA gene of *AMPK1α* by 87% ($p<0.05$) on the 3rd week and 38 fold ($p<0.05$) on the 5th week of ESIDM development and inhibition of *mTOR* expression in PLN (in 3-14.7 times, $p<0.05$). Revealed increase of *Glut1* and *mTOR* mRNA genes level in the PLN cells during diabetes can trigger their differentiation in effective pro-inflammatory subpopulation of Th1- and Th17-lymphocytes. **Conclusion.** Increased level of *AMPK1α* mRNA and inhibition of *mTOR* expression in PLN after *metformin* introduction to diabetic rats gives evidence about the possibility for correction of immune violations that develop during diabetes.

Key words: experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus, pancreatic lymph nodes, *Glut1*, *mTOR*, *AMPK1α*.

Citation:

Putilin DA, Kamyshny AM. Features of immune metabolism of lymphocytes in pancreatic lymph nodes during experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus and after introduction of metformin. *Morphologia*. 2016;10(2):61-8. Ukrainian.

Вступ

В останні роки стало зрозуміло, що важливу роль в механізмах розвитку цукрового діабету (ЦД) відіграють зміни функціонального стану панкреатичних лімфатичних вузлів (ПЛВ), дрекуючих панкреатичні островці та екзокринну частину підшлункової залози, а також окремі сегменти кишечника [1]. Саме в ПЛВ відбувається початкова активація діабетогенних CD8⁺ та CD4⁺ Т-клітин до їх міграції в панкреатичні островці, а хірургічне видалення ПЛВ у NOD мишей перешкоджає розвитку діабету через відсутність праймування Т-клітин панкреатичними антигенами [2].

З іншого боку, метаболічні зміни, що розвиваються в умовах ЦД, перш за все гіперглікемія, здатні безпосередньо впливати на імунометаболізм лімфоцитів [3]. Т-клітини експресують низку транспортерів глюкози, основним з яких є Glut 1 [4; 5]. Продіабетогенні Th1 і Th17-клітини, що викликають інсуліт, характеризуються високим рівнем експресії Glut1 і схильністю до гліколізу [6]. У суп ресорних Treg, навпаки, низький рівень експресії Glut1 і висока швидкість окислювального метаболізму [7]. В свою чергу, важливим регулятором імунометаболізму лімфоцитів є протеїнкіназа mTOR (англ. Mammalian target of rapamycin), яка існує як субодинаця внутрішньоклітинних мультимолекулярних сигнальних комплексів mTORC1 і mTORC2 [8]. У складі цих комплексів mTOR є «провідником» як внутрішньоклітинних так і позаклітинних сигналів і служить одним з центральних регуляторів метаболізму, росту, проліферації та виживання лімфоцитів та інших клітин [9], а одним із її блокує є метформін, який діє через AMPK (AMP-activated protein kinase) [10; 11]. Висока активність mTOR здатна посилювати прогресію діабету через активацію ефекторних прозапальних субпопуляцій лімфоцитів [12; 13], і, навпаки, низька сприяє диференціюванню Treg [14; 15], блокуючих інсуліт. Тому, **метою** роботи було з'ясувати рівень експресії мРНК генів *Glut1*, *mTOR* і *AMPK1α* у ПЛВ щурів з експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом (ЕСЦД) і після введення *метформіну*.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на 100 самцях щурів лінії Вістар вагою 115-135 грам, отриманих з розплідника Об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» (Київ). Тварини були розділені на 5 експериментальних груп по 20 щурів: контрольні щури, яким одноразово внутрішньочеревно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН = 4,5) (група 1); щури з 3-тижневим експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом (ЕСЦД) (група 2); щури з 5-тижневим експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом (ЕСЦД) (група 3); щури з 3 тижне-

вим ЕСЦД (група 4) та 5-тижневим ЕСЦД (група 5), яким внутрішньо-шлунково (в/ш) щоденно на протязі 3 та 5 тижнів вводили *метформін* в дозі 50 мг/кг починаючи з 1 дня індукції діабету.

Для індукції ЕСЦД стрептозотоцин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили щурам внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг, розчинений в 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН 4,5) перед самим моментом введення. Час, що минув з дня введення препарату, в подальшому викладенні матеріалу інтерпретувався як тривалість перебігу діабету. Визначення концентрації глюкози в крові, яку брали з хвостової вени, проводили глюкозооксидазним методом із застосуванням приладу "BIONIMERightest™ GM 110" (Швейцарія) через 12 годин і на 1, 3, 21 і 35 добу після ін'єкції стрептозотоцину. Вимірювання рівня глікемії здійснювали через 6 годин з моменту останнього прийому їжі. На 21 та 35 добу після введення STZ тварин виводили з експерименту декапітуванням під тіопенталовим наркозом. Вилучали ПЛВ, які на 20 годин занурювали в фіксатор Буена і після промивки заливали в парапласт.

Об'єктом для молекулярно-генетичних досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) у експериментальних тварин були ПЛВ, які поміщали в фіксатор Буена, проводили дегідратацію в висхідних концентраціях етанолу і укладали в парафінові блоки. Молекулярно-генетичні дослідження проведені на архівному матеріалі віком 2 роки. РНК отримували з гістологічних зрізів завтовшки 15 мкм, для цього проводили їх депарафінізацію в ксилолі та регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%). Виділення тотальної РНК проводили з використанням набору «TrizolRNA Prep 100» (ІзогенLab., LTD, Росія), який містить *Trizolreagent* (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат та фенол с рН = 4.0) та *ExtraGene E* (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли відповідно протоколу до набору.

Для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 фірми «Синтол» (Росія). Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої Н₂О, очищеної від нуклеаз, 12,5 мкл 2,5х реакційної суміші та 1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотну транскрипцію проводили при 45°C впродовж 45 хвилин з наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT протягом 5 хв. при 92°C.

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів *GLUT1* (NM_138827.1), *mTOR* (NM_019906.1) та *AMPK1α* (*Prkaa1*) (NM_019142.2) використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-

RadLaboratories, Inc.», США) і набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCRMasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК – полімераза MaximaHotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загально-

го об'єму 25 мкл додаванням деіонізованої H₂O. Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast) та виготовлені фірмою Metabion (Німеччина) (див. табл.1).

Таблиця 1
Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>mTor</i>	F = TCTGGCCAAAAGACAGGTGG	60	40	2577/
	R = CTGTCCCAGGGTCCACAAAG	60		2578
<i>Slc2a1</i> (<i>GLUT1</i>)	F = CGTCGTTGGGATCCTTATTGC	59	41	724/
	R = AGTCTAAGCCGAACACCTGG	59		725
<i>Prkaa1</i> (<i>AMPK</i>)	F = GGGAAAGTGAAGGTGGGCAA	60	40	127/
	R = TATGTCCAGTCAACTCGTGCT	59		128
<i>GAPDH</i>	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG	61	52	825/
	R = GCCTGCTTACCACCTTCT	60		826

Після початкової денатурації протягом 10 хв. при 95°C ампліфікація складалася з 45 циклів та проводилася за таких умов: денатурація - 95°C, 15 сек., отжиг - 59-61°C, 30-60 сек., елонгація - 72°C, 30 сек. В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген глицеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*GAPDH*). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом $\Delta\Delta C_t$. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В експеримент були включені негативні контролю: без додавання кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання мРНК матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у трьох повторах.

Результати та їх обговорення.

Введення експериментальним тваринам стрептозотозину призводило до розвитку патологічного процесу: так, на 3 тижень ЕСЦД концентрація глюкози в крові у щурів лінії Вістар збільшувалася в 3,6 рази ($12,23 \pm 0,4$ ммоль/л, $p < 0,05$) порівняно з контролем ($3,37 \pm 0,08$ ммоль/л), а на 5 тижень зростала до $14,39 \pm 0,7$ ммоль/л. Спостерігалися полідипсія, гіперфагія і поліурія, тобто всі основні симптоми, характерні для ЦД 1 типу.

Гіперглікемія викликала транскрипційну індукцію гену транспортерів глюкози *Glut 1* в клітинах ПЛВ. Зокрема, розвиток діабету призводив до зростання вмісту мРНК *Glut 1* в 9,9 разів ($p < 0,05$) на 3 тижень та в 28,9 разів ($p < 0,05$) на 5 тижень патологічного процесу (рис. 1А-В). Ці зміни супроводжувались збільшенням рівня

мРНК протеїнкінази mTOR в 5,3 разів ($p < 0,05$) при 3-х тижневному та в 3,3 рази ($p < 0,05$) при 5-ти тижневному ЕСЦД (рис. 1 С-Д) порівняно з контрольною групою щурів.

Введення метформіну діабетичним щурам призводило до зростання рівня транскрипційної активності АМФ-активуємої протеїнкінази АМРК1 α в ПЛВ. Так, відносна нормалізована кількість мРНК гену АМРК1 α збільшувалася на 87% ($p < 0,05$) на 3 тижень та майже в 38 разів ($p < 0,05$) на 5 тижень розвитку ЕСЦД (рис. 2 А-В). Індукція АМРК1 α закономірно пригнічувала експресію mTOR: ми спостерігали зменшення рівня мРНК мішені рапаміцина в ПЛВ у 14,7 разів ($p < 0,05$) при 3-х тижневному та в 3 рази ($p < 0,05$) при 5-ти тижневному ЕСЦД (рис. 2 С-Д) порівняно з контрольною групою щурів.

Імунні порушення приводять до розвитку ЦД 1 типу, а гіперглікемія, що при цьому розвивається, підсилює автоімунну атаку, призводячи до формування "ганебного" кола. Так, CD4⁺T-клітини експресують цілий ряд транспортерів глюкози (*Glut*), зокрема *Glut 1*, 3, 6, і 8 [5]. *Glut1* функціонує головним чином на активованих, але не на перебуваючих у спокої CD4⁺T-клітинах, а зміна його експресії, напевне, може впливати на рівень диференціювання CD4⁺Th1 і Th17 клітин. Було показано *in vitro*, що різні субпопуляції CD4⁺T-ефекторних і T-регуляторних клітин віддають перевагу гліколітичним або окислювальним метаболічним програмам, що відрізняються, контролюючи рівень поглинання ними глюкози. Незважаючи на експресію різних транспортерів глюкози, дефіцит *Glut1* вибірково порушує метаболізм та функції тимоцитів і T-ефекторних клітин, запобігаючи їх проліферації та зменшуючи виживання та диференціювання [5]. Важливо

також те, що дефіцит *Glut1* зменшує експансію ефektorних лімфоцитів та їх здатність викликати запальні захворювання *in vivo*. Клітини Tregs, навпаки, виявились не чутливими до рівня експресії *Glut1* та їх здатність до супресії при цьому не страдала. Таким чином, метаболічні відмінності субпопуляцій лімфоцитів полягають в тому, що Th1, Th2, та клітини Th17, характеризуються високим рівнем експресії транспортера глюкози *Glut1* і надзвичайно високою здатністю

до гліколізу. У Treg, навпаки, низький рівень експресії *Glut1* і висока швидкість окислювального метаболізму. Таким чином, впливаючи на метаболічні програми лімфоцитів, можна маніпулювати чисельністю їх окремих субпопуляцій. Так, автори показали, що стимуляції AMP-активованої протеїнкінази було достатньо, щоб зменшити експресію *Glut1* і збільшити генерацію Treg в моделі астми [16].

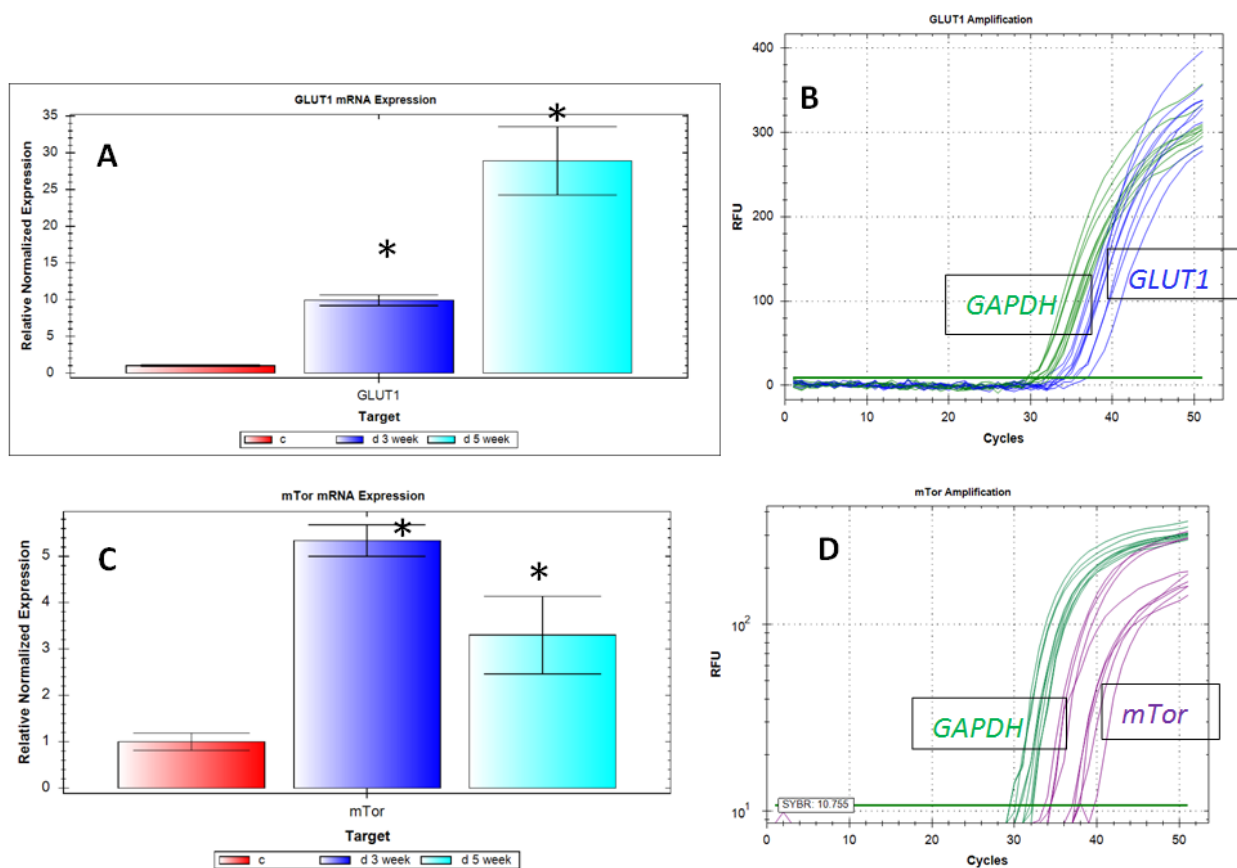


Рис. 1. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *GLUT1* (A) та *mTOR* (C) з графіками їх ампліфікації (B, D) в клітинах ПЛВ. Нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном *GAPDH*. c-контроль; d3, d5- 3-х і 5-ти тижневий ЕСІЦД відповідно.

Іншим важливим регулятором метаболізму лімфоцитів є mTOR – протеїнкіназа серин-треонінової специфічності, яка в клітині існує як субодиниця внутрішньоклітинних сигнальних комплексів mTORC1 і mTORC2. mTOR-сигналізація є однією із основних детермінант Т-клітинного диференціювання [17; 18]. При високій активності mTOR відбувається диференціювання наївних CD4⁺-клітин в ефektorні прозапальні субпопуляції Th1, Th2, Th17, а також активація цитотоксичних CD8⁺-клітин [19] (рис. 3). І

навпаки, якщо активність mTOR в CD4⁺ клітинах низька, то вони диференціюються в Treg клітини, які блокують розвиток інсуліту і прогресію діабету [20; 21]. Таким чином, встановлене нами збільшення рівня мРНКгенів транспортерів глюкози *Glut 1* та протеїнкінази mTOR в клітинах ПЛВ при діабеті є важливим тригером їх диференціювання в ефektorні прозапальні субпопуляції Th1 і Th17.

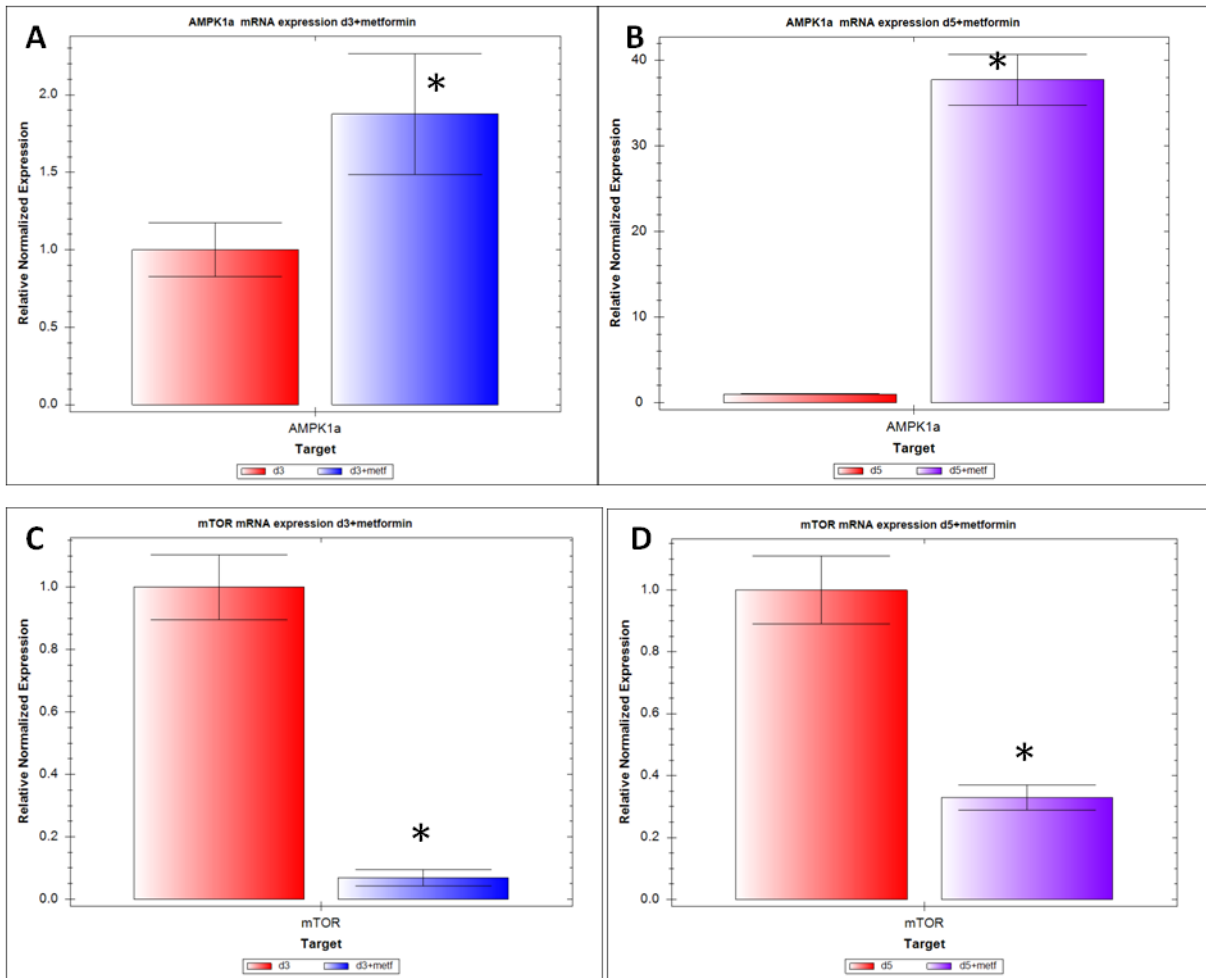


Рис. 2. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *AMPK1α* (A,B) та *mTOR* (C,D) в клітинах ПЛВ після введення метформіну діабетичним щурам. Нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном *GAPDH*. d3, d5 - 3-х і 5-ти тижневий ЕСІЦД відповідно.

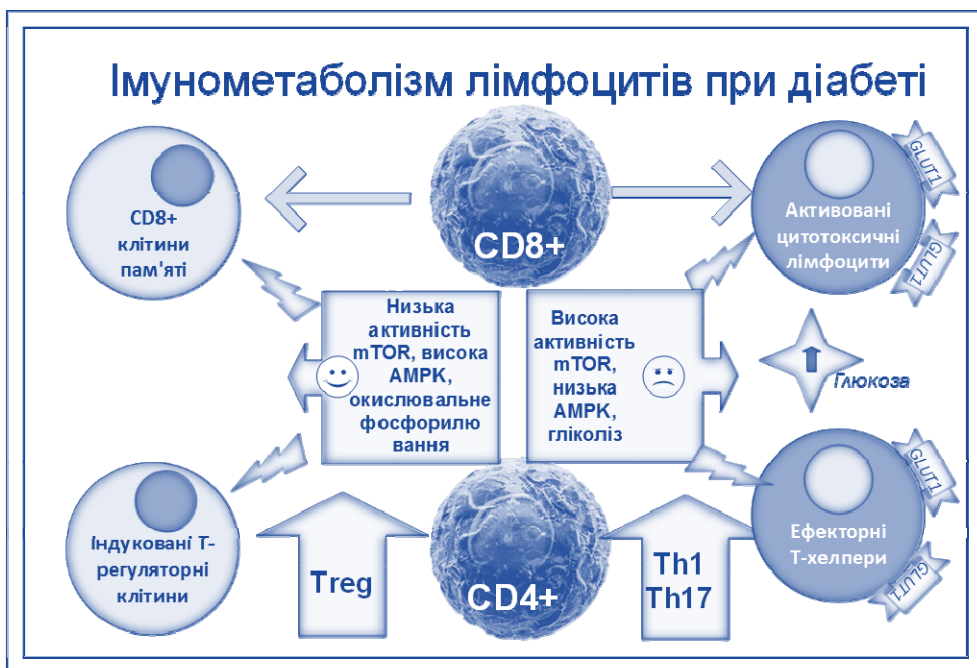


Рис. 3. Імунометаболізм лімфоцитів при діабеті.

В свою чергу, важливим стратегічним завданням є пошук ефективних шляхів корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД та підтримують його прогресію. Однією із перспективних терапевтичних мішеней при ЦД є інгібітори mTOR. В зв'язку з цим ми зупинили свій вибір на метформіні, що здатний знижувати концентрацію глюкози в крові через АМФ-активуєму протеїнкіназу (АМФК) [22]. Метформін, як і рапаміцин, але більш м'яко, без розвитку імуносупресії, пригнічує активність mTOR [23]. Цікаво, що сигналізація через mTOR викликає метаболічне перепрограмування лімфоцитів, стимулюючи гліколіз с-МҮС – залежним шляхом, що підвищує проліферацію імунних клітин [24]. Метформін здатен і безпосередньо, без участі mTOR, як АМФК-залежним, так і АМФК-незалежним шляхом [25] впливати на метаболізм лімфоцитів. Так, у Т-лімфоцитів АМПК-залежна сигналізація важлива для утворення Т-клітин пам'яті в динаміці імунної відповіді [26]. Здатність метформіну через активізацію АМПК пригнічувати вироблення ефекторних Т-лімфоцитів і стимулювати диференціювання Т-клітин пам'яті була підтверджена цілою низкою досліджень [27; 28]. Протизапальні дії метформіну пояснюють його здатність пригнічувати розвиток аутоімунних захворювань [29]. Крім того, метформін інгібує проліферацію і виживання пухлинних клітин в умовах гострого мієлоїдного і Т-клітинного гострого лімфобластного лейкозів [30], впливає на еміграцію Т-клітин з тимуса у пацієнтів з ЦД 2 типу [31]. Kang K. et al. (2013) продемонструва-

ли здатність метформіну зменшувати кількість ROR γ t+CD4+Th17-клітин в лімфатичних вузлах у мишей з аутоімунним ревматоїдним артритом, знижувати рівень сироваткових прозапальних цитокинів TNF α і IL1 β [27]. Здатність метформіну блокувати активацію Th17-клітин, продукцію IFN- γ і IL-17 була продемонстрована і на моделі системного червоного вовчака [32]. Ефекти метформіну на рівень імунної відповіді також реалізуються через інгібування МНС-рестрикованої презентації антигенів АПК, зокрема шляхом супресії продукції дендритними клітинами костимулюючих факторів, таких як CD54, CD80 і CD86 [33]. В нещодавньому дослідженні Forslund K. et al. (2015) продемонстрована здатність метформіну викликати зміни у кишковому мікробіомі у пацієнтів з ЦД2 типу, зокрема впливати на продукцію коротколанцюгових жирних кислот [34], які через свої рецептори, зокрема FFAR2 - впливають на диференціювання Т-клітин, особливо Treg.

Підсумок

Встановлене нами зростання рівня мРНК АМПК1 α та пригнічення експресії mTOR в ПЛВ після введення метформіну діабетичним щурам свідчить про можливість його використання для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД.

Перспективи подальших досліджень полягають у з'ясуванні рівнів експресії мРНК різних генів у ПЛВ щурів з експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом і після введення метформіну.

Літературні джерела References

1. Calderon B, Unanue E. Antigen presentation events in autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24(1): 119–128.
2. Gagnerault M, Luan J, Lotton C, Lepault F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of β cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med.* 2002; 196:369–377.
3. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *J Exp Med.* 2015; 24;212(9):1345-60.
4. Palmer CS, Hussain T, Duette G, Weller TJ, Ostrowski M, Sada-Ovalle I, Crowe SM. Regulators of glucose metabolism in CD4+ and CD8+ T cells. *Int Rev Immunol.* 2015; 25:1-12.
5. Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, Michalek RD, Rudolph MC, Deoliveira D, Anderson SM, Abel ED, Chen BJ, Hale LP, Rathmell JC. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.* 2014; 1;20(1):61-72.
6. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, Sullivan SA, Nichols AG, Rathmell JC. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *J Immunol.* 2011; 15;186(6):3299-303.
7. Basu S, Hubbard B, Shevach EM. Foxp3-mediated inhibition of Akt inhibits Glut1 (glucose transporter 1) expression in human T regulatory cells. *J Leukoc Biol.* 2015; 97(2):279-83.
8. Pollizzi KN, Patel CH, Sun IH, Oh MH, Waickman AT, Wen J, Delgoffe GM, Powell JD. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8+ T cell differentiation. *J Clin Invest.* 2015; 125(5):2090-108.
9. Pollizzi KN, Powell JD. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and the known unknowns. *Trends Immunol.* 2015; 36(1):13-20.
10. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 2014; 2;20(6):953-66.
11. Hardie DG, Ashford ML. AMPK: regulat-

ing energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology* (Bethesda). 2014;29(2):99-107.

12. Shan J, Feng L, Sun G, Chen P, Zhou Y, Xia M, Li H, Li Y. Interplay between mTOR and STAT5 signaling modulates the balance between regulatory and effective T cells. *Immunobiology*. 2015;220(4):510-7.

13. Liu Y, Zhang DT, Liu XG. mTOR signaling in T cell immunity and autoimmunity. *Int Rev Immunol*. 2015;34(1):50-66.

14. Chapman NM, Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. *Immunotherapy*. 2014;6(12):1295-311.

15. Zeng H, Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol*. 2015; 36(1):3-12.

16. Gerriets V, Rathmell J. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol*. 2012; 33(4):168-73.

17. Xu X, Ye L, Araki K, Ahmed R. mTOR, linking metabolism and immunity. *Semin Immunol*. 2012; 24(6):429-35.

18. Yang K, Chi H. mTOR and metabolic pathways in T cell quiescence and functional activation. *J Semin Immunol*. 2012;421:8.

19. Waickman AT, Powell JD. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *J Immunol Rev*. 2012; 43-58.

20. Chi H. Regulation and function of mTOR-signalling in T cell fate decisions. *J Nat Rev Immunol*. 2012; 325:38.

21. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol*. 2012; 39-68.

22. Russo GL, Russo M, Ungaro P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. *J Biochem Pharmacol*. 2013;339:50.

23. Hardie D. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *J Diabetes*. 2013;62(216):72.

24. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, McCormick L, Fitzgerald P, Chi H, Munger J, Green DR. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*. 2011;35:871-82.

25. Zarrouk M, Finlay DK, Foretz M, Viollet B, Cantrell DA. Adenosine-mono-phosphate-activated protein kinase independent effects of metformin in T cells. *PLoS One*. 2014;9(9):e106710.

26. Rolf J, Zarrouk M, Finlay DK, Foretz M, Viollet B. AMPK α 1: A glucose sensor at control of CD8 T-cell memory. *Eur J Immunol*. 2013;43(4):889-96.

27. Kang KY, Kim Y-K, Yi H, Kim J, Jung H-R. Metformin down regulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *International Immunopharmacology*; 2013;16(1):85-92.

28. Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, Harms GM, Shen H, et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*. 2009;460:103-7.

29. Nath N, Khan M, Paintlia MK, Hoda MN, Giri S. Metformin Attenuated the Autoimmune Disease of the Central Nervous System in Animal Models of Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2009;182:8005-14.

30. Green AS, Chapuis N, Trovati Maciel T, Willems L, Lambert M, et al. The LKB1/AMPK signal in gp130 pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood*. 2010;116:4262-73.

31. Dworacki G, Urazayev O, Bekmukhambetov Y, Iskakova S, Frycz BA, Jagodziński PP, Dworacka M. Thymic emigration patterns in patients with type 2 diabetes treated with metformin. *Immunology*. 2015;146(3):456-69.

32. Yin Y, Choi SC, Xu Z, Zeumer L, Kanda N, Croker BP, Morel L. Glucose Oxidation Is Critical for CD4+ T Cell Activation in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 2015;pii: 1501537.

33. Shin S, Hyun B, Lee A, Kong H, Han S, Lee CK, Ha NJ, Kim K. Metformin Suppresses MHC-Restricted Antigen Presentation by Inhibiting Co-Stimulatory Factors and MHC Molecules in APCs. *Biomol Ther*. 2013;21(1):35-41.

34. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015;528(7581):262-6.

Путилин Д.А., Камышный А.М. Особенности иммунометаболизма лимфоцитов панкреатических лимфатических узлов при экспериментальном стрептозотоциновом диабете и после введения метформина.

Реферат. С помощью молекулярно-генетических методов исследовали уровень экспрессии мРНК генов *Glut1*, *mTOR* и *AMPK1 α* в ПЛУ крыс с экспериментальным стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом (ЭСИСД) и после введения метформина. Для определения уровня мРНК исследуемых генов проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Установлено, что гипергликемия вызывала транскрипционную индукцию генов транспортеров глюкозы *Glut1* (в 9,9-28,9 раз, $p < 0,05$) и протеинкиназы *mTOR* (в 5,3-3,3 раза, $p < 0,05$) в клетках ПЛУ. Введения метформина диабетическим крысам приводило к

увеличению уровня мРНК гена *AMPK1α* на 87% ($p < 0,05$) на 3 неделе и в 38 раз ($p < 0,05$) на 5 неделе развития ЭСИСД и угнетение экспрессии *mTOR* в ПЛУ (в 3-14,7 раз, $p < 0,05$). Обнаруженное увеличение уровня мРНК генов *Glut1* и *mTOR* в клетках ПЛУ при диабете может быть триггером их дифференцировки в эффекторные провоспалительные субпопуляции Th1-и Th17-лимфоцитов. Увеличение уровня мРНК *AMPK1α* и угнетение экспрессии *mTOR* в ПЛУ после введения *метформина* диабетическим крысам свидетельствует о возможности его применения для коррекции иммунных нарушений, развивающихся при диабете.

Ключевые слова: стрептозотоцин-индуцированный сахарный диабет, панкреатические лимфатические узлы, *Glut1*, *mTOR*, *AMPK1α*.