

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *Glut1*, *mTOR* И *AMPK1 α* ЛИМФОЦИТАМИ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Путилин Д.А., Камышный А.М.

Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Резюме. С помощью молекулярно-генетических методов исследовали уровень экспрессии мРНК генов *Glut1*, *mTOR* и *AMPK1 α* в ПЛУ крыс с экспериментальным стрептозототин-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). Иммунопозитивные *mTOR*⁺ лимфоциты были идентифицированы с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител. 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. Развитие диабета также сопровождалось увеличением общего числа *mTOR*⁺ клеток в ПЛУ на 5 неделе патологического процесса на 24–34% ($p < 0,05$) и концентрации мишени рапамицина в иммунопозитивных клетках. Введения метформина диабетическим крысам приводили к увеличению уровня мРНК гена *AMPK1 α* на 87% ($p < 0,05$) на 3 неделе и в 38 раз ($p < 0,05$) на 5 неделе развития ЭСИСД и угнетению экспрессии *mTOR* в ПЛУ (в 3–14,7 раз, $p < 0,05$), сопровождаясь снижением на 40% ($p < 0,05$) суммарной плотности *mTOR*⁺ клеток в мягкотных тяжах ПЛУ у животных с 5-ти недельным ЭСИСД.

Ключевые слова: стрептозототин-индуцированный сахарный диабет, панкреатические лимфатические узлы, *Glut1*, *mTOR*, *AMPK1 α* , экспрессия генов

CHANGES OF *Glut1*, *mTOR* AND *AMPK1 α* GENE EXPRESSION IN PANCREATIC LYMPH NODE LYMPHOCYTES OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Putilin D.A., Kamyshnyi A.M.

Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Abstract. With the help of molecular genetic method we have investigated the level of mRNA gene expressions *Glut1*, *mTOR* and *AMPK1 α* in PLN in pancreatic lymph nodes (PLN) of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus (SIDM) and after administration of metformin. The levels of *Glut1*, *mTOR* and *AMPK1 α* mRNA were determined by means of RT-PCR using CFX96™ thermocycler (Real-Time PCR Detection

Адрес для переписки:

Камышный Александр Михайлович
Запорожский государственный медицинский университет
69035, Украина, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26.
Тел.: +38 (061) 234-26-31.
E-mail: alexkamyshnyi@yandex.ru

Address for correspondence:

Kamysnyi Aleksandr M.
Zaporozhye State Medical University
69035, Ukraine, Zaporozhye, Mayakovsky ave, 26.
Phone: +38 (061) 234-26-31.
E-mail: alexkamyshnyi@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.А. Путилин, А.М. Камышный «Изменения уровня экспрессии генов *Glut1*, *mTOR* и *AMPK1* лимфоцитами панкреатических лимфатических узлов крыс при экспериментальном сахарном диабете» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 339–346.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-339-346

© Путилин Д.А., Камышный А.М., 2016

For citation:

D.A. Putilin, A.M. Kamysnyi “Changes of *Glut1*, *mTOR* and *AMPK1* gene expression in pancreatic lymph node lymphocytes of rats with experimental diabetes mellitus”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 339–346. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-339-346

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-339-346>

Systems, Bio-Rad, USA). Relative gene expression levels were calculated as ratios to *GAPDH* reference gene using Ct method. Statistical analysis was performed with available "Bio-Rad CFX Manager 3.1" software (Bio-Rad, USA). The mTOR⁺ positive lymphocytes were identified by means of monoclonal antibodies, using an indirect immunofluorescence method. Hyperglycemia was accompanied by transcriptional induction of glucose transporter *Glut1* gene (9.9 to 28.9-fold, $p < 0.05$), and *mTOR* protein kinase gene (5.3 to 3.3-fold, $p < 0.05$) in PLN. Development of diabetes was also associated with increase by 24-34% in total mTOR⁺ cell numbers in PLN at the 5th week of developing diabetes ($p < 0.05$) and increased concentrations of rapamycin target in the immunopositive cells. Metformin administration to diabetic rats was followed by increased *AMPK1 α* mRNA level of by 87% ($p < 0.05$) at the 3rd week, and 38-fold ($p < 0.05$), at the 5th week of SIDM development and inhibition of mTOR expression in PLN (3 to 14.7-fold, $p < 0.05$) accompanied by a 40 per cent decrease ($p < 0.05$) in total density of mTOR⁺ cells in PLN lymph cords of the rats following 5 weeks of SIDM.

Keywords: streptozotocin-induced diabetes mellitus, lymph nodes, pancreatic, *Glut1*, *mTOR*, *AMPK1 α* , gene expression

Введение

В последние годы стало понятно, что важную роль в механизмах развития сахарного диабета (СД) играют изменения функционального состояния панкреатических лимфатических узлов (ПЛУ), дренирующих панкреатические островки и экзокринную часть поджелудочной железы, а также отдельные сегменты кишечника [3]. Именно в ПЛУ происходит начальная активация диабетогенных CD8⁺ и CD4⁺T-клеток к их миграции в панкреатические островки, а хирургическое удаление ПЛУ у NOD мышей препятствует развитию диабета из-за отсутствия праймирования T-клеток панкреатическими антигенами [9].

С другой стороны, метаболические изменения, которые развиваются в условиях СД, прежде всего гипергликемия, способны непосредственно влиять на иммунометаболизм лимфоцитов [2]. T-клетки экспрессируют ряд транспортеров глюкозы, основным из которых является *Glut1* [19, 16]. Продиабетогенные Th1- и Th17-клетки, вызывающие инсулит, характеризуются высоким уровнем экспрессии *Glut1* и склонностью к гликолизу [17]. У супрессорных Treg, наоборот, низкий уровень экспрессии *Glut1* и высокая скорость окислительного метаболизма [1]. В свою очередь, важным регулятором иммунометаболизма лимфоцитов является протеинкиназа mTOR (англ. mammalian target of rapamycin), которая существует как субъединица внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2 [21]. В составе этих комплексов mTOR является «проводником» как внутриклеточных, так и внеклеточных сигналов и служит одним из центральных регуляторов метаболизма, роста, пролиферации и выживания лимфоцитов и других клеток [22], а одним из ее блокаторов является метформин, который действует через AMPK (AMP-activated protein kinase) [7, 13]. Высокая активность mTOR способна усиливать прогрессию диабета через активацию эффекторных провоспалительных субпопуляций лимфоцитов [26, 15], и наоборот, низкая способствует дифференцировке Treg [4, 34], блоки-

рующих инсулит. Поэтому целью работы было выяснить уровень экспрессии мРНК генов *Glut1*, *mTOR* и *AMPK1 α* , а также распределение mTOR⁺ лимфоцитов в ПЛУ крыс с экспериментальным стрептозотоксин-индуцированным сахарным диабетом (ЭСИСД) и после введений метформина.

Материалы и методы

Исследования проведены на 100 самцах крыс линии Вистар весом 115-135 грамм, полученных из питомника Объединение ветеринарной медицины ЧП «Биомодельсервис» (Киев). Животные были разделены на 5 экспериментальных групп по 20 крыс: контрольные крысы, которым однократно внутрибрюшинно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН = 4,5) (группа 1); крысы с 3-недельным экспериментальным стрептозотоксин-индуцированным сахарным диабетом (ЭСИСД) (группа 2); крысы с 5-недельным экспериментальным стрептозотоксин-индуцированным сахарным диабетом (ЭСИСД) (группа 3); крысы с 3-недельным ЭСИСД (группа 4) и 5-недельным ЭСИСД (группа 5), которым внутрибрюшинно (в/б) ежедневно на протяжении 3 и 5 недель вводили метформин в дозе 50 мг/кг начиная с 1 дня индукции диабета.

Для индукции ЭСИСД стрептозотоксин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг, растворенного в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН = 4,5) перед самым моментом введения. Время, прошедшее с дня введения препарата, в дальнейшем изложении материала интерпретировалось как длительность течения диабета. Определение концентрации глюкозы в крови, которую брали из хвостовой вены, проводили глюкозооксидазным методом с применением прибора "BIONIMERigh testTMGM 110" (Швейцария) через 12 часов и на 1, 3, 21 и 35 сутки после инъекции стрептозотоксина. Измерение уровня гликемии осуществляли через 6 часов с момента последнего приема пищи. На 21 и 35 сутки после введения STZ животных выводили из эксперимента декапитированием под тиопенталовым

наркозом. Изымали ПЛУ, которые на 20 часов помещали в фиксатор Буэна и после промывки заливали в парапласт.

Структуру популяции mTOR⁺-лимфоцитов изучали на основании анализа серийных гистологических срезов ПЛУ и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Для проведения данного исследования на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия) делали 5-микронные серийные срезы ПЛУ, которые потом депарафинизировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (pH = 7,4) и красили с первичными кроличьими поликлональными антителами (ПКАТ) к mTOR (Santa Cruz Biotechnology, США, sc-1550-R) в течение 18 часов во влажной камере при T = 4 °C. После отмыкания излишка первичных антител в 0,1 М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 минут (T = 37 °C) с вторичными антителами к полной молекуле IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology, США), конъюгированными с FITC. После инкубации все срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером и помещали в смесь глицерина и фосфатного буфера (1:9) для дальнейшей люминесцентной микроскопии. Обработанные гистологические срезы изучали с помощью компьютерной программы Image J (NIH, США). Изображения, полученные на микроскопе Primo Star (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) при помощи высокочувствительной камеры Axio Cam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображения к публикации Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводили в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флуоресценцией, характерной для лимфоцитов, экспрессирующих mTOR. Вычислялись морфометрические и денситометрические характеристики иммуноположительных клеток. Определяли абсолютную (количество клеток на 1 мм² площади среза) и относительную (%) плотность распределения иммуноположительных клеток различных классов в исследованных зонах ПЛУ. Концентрацию транскрипционного фактора mTOR определяли, учитывая интенсивность флуоресценции идентифицированных иммуноположительных клеток и неспецифическую флуоресценцию препарата (так называемый фон). На основании этих показателей вычислялась скорректированная клеточная флуоресценция (в условных единицах интенсивности флуоресценции УЕИФ): Integrated Density (интегрированная плотность) — (площадь

выделенных клеток * среднюю флуоресценцию фона).

Объектом для молекулярно-генетических исследований методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) у экспериментальных животных были ПЛУ, которые помещали в фиксатор Буэна, проводили дегидратацию в восходящих концентрациях этанола и укладывали в парафиновые блоки. Молекулярно-генетические исследования проведены на архивном материале возрастом 2 года. РНК получали из гистологических срезов толщиной 15 мкм, для этого проводили их депарафинизацию в ксилоле и регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%). Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора “Trizol RNA Prep 100” (Изоген Lab., LTD, Россия), который содержит *Trizol reagent* (лизирующий реагент, в состав которого входит денатурирующий агент гуанидинтиоционат и фенол с pH = 4,0) и *ExtraGene E* (суспензия смеси ионообменников). РНК выделяли согласно протоколу к набору.

Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор ОТ-1 фирмы «Синтол» (Россия). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальной РНК, 8,5 мкл деионизированной H₂O, очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл 2,5х реакционной смеси и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при 45 °C в течение 45 минут с последующим нагреванием для инактивации MMLV-RT в течение 5 минут при 92 °C.

Для определения уровня экспрессии исследованных генов *GLUT1* (NM_138827.1), *mTOR* (NM_019906.1) и *AMPK1α* (*Prkaa1*) (NM_019142.2) использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США) и набор реактивов Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК — полимеразу Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл добавлением деионизированной H₂O. Специфические пары праймеров (5'-3') для анализа исследованных и референсного генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмой Metabion (Германия) (см. табл. 1).

После начальной денатурации в течение 10 минут при 95 °C амплификация состояла из 45 циклов и проводилась при таких условиях: денатура-

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ мРНК ИССЛЕДОВАННЫХ И РЕФЕРЕНСНОГО ГЕНОВ

Ген	Праймер	Тпл, °С	Длина продукта (пн)	Экзонный стык
<i>mTor</i>	F = TCTGGCCAAAAGACAGGTGG R = CTGTCCCAGGGTCCACAAAG	60 60	40	2577/ 2578
<i>Slc2a1</i> (<i>Glut1</i>)	F = CGTCGTTGGGATCCTTATTGC R = AGTCTAAGCCGAACACCTGG	59 59	41	724/ 725
<i>Prkaa1</i> (<i>AMPK</i>)	F = GGGAAAGTGAAGGTGGGCAA R = TATGTCCAGTCAACTCGTGCT	60 59	40	127/ 128
<i>GAPDH</i>	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTCACCACCTTCT	61 60	52	825/ 826

ция – 95 °С, 15 сек., отжиг – 59–61 °С, 30–60 сек., элонгация – 72 °С, 30 сек. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследованных генов был использован ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*). Относительное нормализованное количество кДНК таргетных генов определяли по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В эксперимент были включены негативные контроли: без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы в синтезе кДНК, без добавления фермента в синтезе кДНК. Все реакции амплификации проводили на индивидуальных образцах в трех повторах.

Результаты

Введение экспериментальным животным стрептозотоцина приводило к развитию патологического процесса: так, на 3 неделю ЭСИСД концентрация глюкозы в крови у крыс линии Вистар увеличивалась в 3,6 раза ($12,23 \pm 0,4$ ммоль/л, $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($3,37 \pm 0,08$ ммоль/л), а на 5 неделю возрастала до $14,39 \pm 0,7$ ммоль/л. Наблюдались полидипсия, гиперфагия и полиурия, то есть все основные симптомы, характерные для СД 1 типа.

Гипергликемия вызывала транскрипционную индукцию гена транспортеров глюкозы *Glut1* в клетках ПЛУ. В частности, развитие диабета приводило к возрастанию уровня мРНК *Glut1* в 9,9 раз ($p < 0,05$) на 3 неделе и в 28,9 раз ($p < 0,05$) на 5 неделе патологического процесса (рис. 1А, Б). Эти изменения сопровождались увеличением уровня мРНК протеинкиназы *mTOR* в 5,3 раза ($p < 0,05$) при 3-недельном и в 3,3 раза ($p < 0,05$) при 5-недельном ЭСИСД (рис. 2В, Г) по сравнению с контрольной группой крыс.

Введение метформина диабетическим крысам приводило к возрастанию уровня транскрипционной активности АМФ-активируемой протеинкиназы *AMPK1α* в ПЛУ. Так, относительное нормализованное количество мРНК гена *AMPK1α* увеличивалось на 87% ($p < 0,05$) на 3 неделе и почти в 38 раз ($p < 0,05$) на 5 неделе развития ЭСИСД (рис. 2А, Б). Наблюдаемая индукция *AMPK1α* закономерно угнетала экспрессию *mTOR*: мы наблюдали уменьшение уровня мРНК мишени рапамицина в ПЛУ в 14,7 раз ($p < 0,05$) при 3-недельном и в 3 раза ($p < 0,05$) при 5-недельном ЭСИСД (рис. 2В, Г) по сравнению с контрольной группой крыс.

Структуру популяции *mTOR*⁺ лимфоцитов изучали на основании анализа серийных гистологических срезов ПЛУ и данных их морфометрических и денситометрических характеристик.

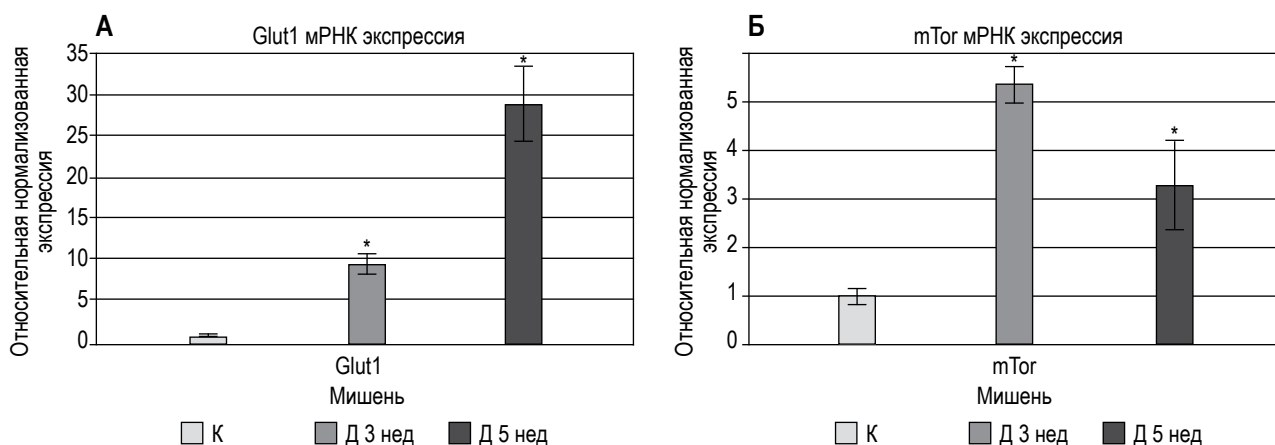


Рисунок 1. Относительное нормализованное количество мРНК генов *Glut1* (А) и *mTOR* (Б) в клетках ПЛУ

Нормализация по методу $\Delta\Delta Ct$ с референс-геном *GAPDH*. к-контроль; д 3 нед., д 5 нед. – 3-х и 5-ти недельный ЭСИСД соответственно.

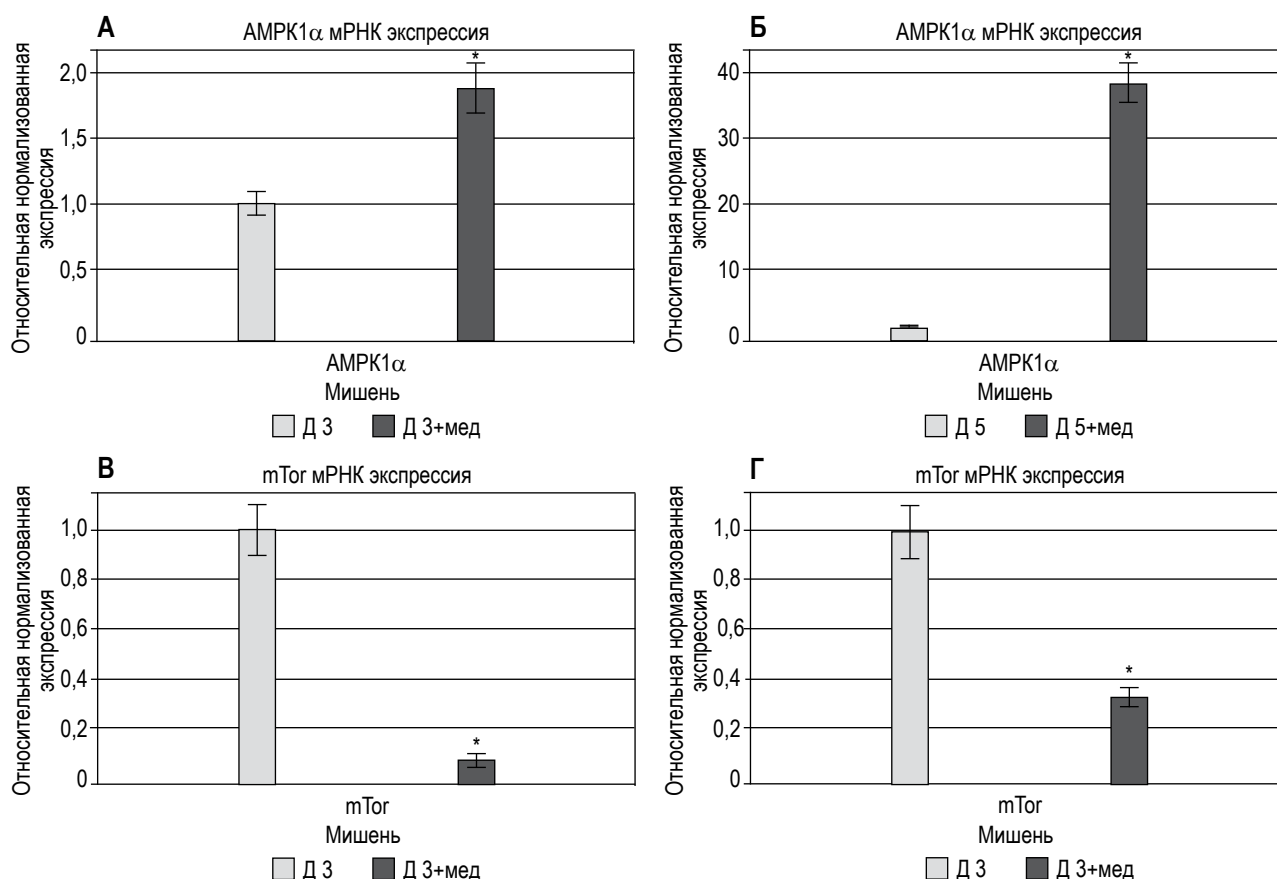


Рисунок 2. Относительное нормализованное количество мРНК генов *AMPK1α* (А, Б) и *mTOR* (В, Г) в клетках ПЛУ после введений метформина диабетическим крысам

Примечание. Нормализация по методу $\Delta\Delta Ct$ с референс-геном *GAPDH*. д 3 нед., д 5 нед. – 3-х и 5-ти недельный ЭСИСД соответственно; д3+метф, д5+метф – введения метформина диабетическим крысам.

Нами установлено, что развитие диабета не влияло на суммарную плотность $mTOR^+$ клеток в ПЛУ на 3 неделю патологического процесса и приводило к их увеличению у крыс с 5-недельным ЭСИСД – на 24% ($p < 0,05$) в паракортикальной зоне и на 34% ($p < 0,05$) в мягкотных тяжах. Изучение распределения отдельных классов $mTOR^+$ клеток показало, что данное увеличение общего количества иммунопозитивных к протеинкиназе $mTOR$ лимфоцитов было вызвано главным образом ростом плотности популяции (ПП) $mTOR^+$ малых лимфоцитов – на 23% ($p < 0,05$) в паракортикальной зоне и на 46% ($p < 0,05$) в мягкотных тяжах и $mTOR^+$ средних лимфоцитов (соответственно, на 22% и 50%, $p < 0,05$).

Введение метформина не влияло на общую численность $mTOR^+$ клеток у крыс с 3-недельным ЭСИСД и приводило к снижению их количества на 40% ($p < 0,05$) в мягкотных тяжах ПЛУ у животных с 5-недельным ЭСИСД. При этом в структуре популяции достоверно изменялась только ПП $mTOR^+$ средних лимфоцитов.

Измерение интенсивности флуоресценции иммунопозитивных клеток показало увеличение

концентрации протеинкиназы $mTOR$ у $mTOR^+$ лимфоцитов и $mTOR^+$ малых лимфоцитов на 3-ю неделю и $mTOR^+$ средних лимфоцитов паракортикальной зоны ПЛУ на 5-ю неделю развития диабета. Введение метформина снижало концентрацию мишени рапамицина в $mTOR^+$ лимфоцитах у животных с 3-недельным ЭСИСД в паракортикальной зоне ПЛУ на 17% ($p < 0,05$) и в мягкотных тяжах на 28% ($p < 0,05$). При увеличении длительности ЭСИСД до 5-ти недель отмечалось также достоверное снижение концентрации $mTOR$ у $mTOR^+$ средних и $mTOR^+$ малых лимфоцитов.

Обсуждение

Лимфоциты чутко реагируют на изменения метаболизма. В качестве таких основных лимфоцитарных сенсоров иммунометаболизма можно выделить: киназу $mTOR$, воспринимающую сигналы от аминокислот, ростовых факторов и др., и являющуюся одним из центральных регуляторов пролиферации и выживания лимфоцитов; ключевой сенсор глюкозы и регулятор энергетического баланса клеток АМФ-активируемая

протеинкиназа (АМРК); рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами PPAR, эндогенными лигандами которых являются свободные жирные кислоты и эйкозаноиды; образ-распознающие рецепторы врожденного иммунитета (TLR, NLR, RLR и др.), активирующиеся не только микробными лигандами, но и целым рядом эндогенных паттернов повреждения, таких как HSP70, HMGB1; сенсоры внеклеточной АТФ с P2XR; сенсоры ксенобиотиков арил-гидрокарбоновые рецепторы (AHR); рецепторы короткоцепочечных жирных кислот FFAR2, лигандами для которых являются такие микробные метаболиты, как бутират, ацетат и пропионат (рис. 3).

Иммунные нарушения приводят к развитию СД 1 типа, а гипергликемия, развивающаяся при этом, усиливает аутоиммунную атаку, приводя к формированию «порочного» круга. Так, CD4⁺T-клетки экспрессируют целый ряд транспортеров глюкозы (Glut), в частности Glut1, 3, 6, и 8 [16]. Glut1 функционирует главным образом на активированных, но не на пребывающих в покое CD4⁺T-клетках, а изменение его экспрессии, наверное, может влиять на уровень дифференцировки CD4⁺Th1- и Th17-клеток. Было показано *in vitro*, что разные субпопуляции CD4⁺T-эффекторных и T-регуляторных клеток отдают предпочтение гликолитическим или окислительным метаболическим программам, которые отличаются, контролируя уровень поглощения ими глюкозы. Несмотря на экспрессию различных транспортеров глюкозы, дефицит Glut1 избирательно нарушает метаболизм и функции тимоцитов и T-эффекторных клеток, предотвращая их

пролиферацию и уменьшая выживание и дифференцировку [16]. Важно также то, что дефицит Glut1 уменьшает экспансию эффекторных лимфоцитов и их способность вызывать воспалительные заболевания *in vivo*. Клетки Treg, наоборот, оказались нечувствительными к уровню экспрессии Glut1 и их способность к супрессии при этом не страдала. Таким образом, метаболические отличия субпопуляций лимфоцитов состоят в том, что Th1, Th2 и клетки Th17 характеризуются высоким уровнем экспрессии транспортера глюкозы Glut1, и чрезвычайно высокой способностью к гликолизу. У Treg, наоборот, низкий уровень экспрессии Glut1 и высокая скорость окислительного метаболизма. Таким образом, влияя на метаболические программы лимфоцитов, можно манипулировать численностью их отдельных субпопуляций. Так, авторы показали, что стимуляции AMP-активированной протеинкиназы было достаточно, чтоб уменьшить экспрессию Glut1 и увеличить генерацию Treg в модели астмы [10].

Другим важным регулятором метаболизма лимфоцитов является mTOR — протеинкиназа серин-треониновой специфичности, которая в клетке существует как субъединица внутриклеточных сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2. mTOR-сигнализация является одной из основных детерминант T-клеточной дифференцировки [30, 31]. При высокой активности mTOR происходит дифференцировка наивных CD4⁺ клеток в эффекторные провоспалительные субпопуляции Th1, Th2, Th17, а также активация цитотоксических CD8⁺ клеток [28] (рис. 3).

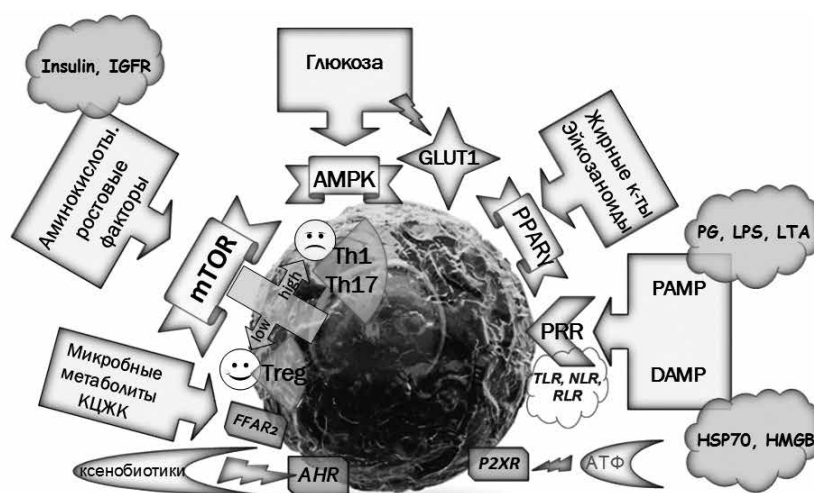


Рисунок 3. Лимфоцит как сенсор изменений метаболизма

Примечание. Условные обозначения: mTOR — мишень рапамицина, AMPK — АМФ-активируемая протеинкиназа, PPARγ — рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами, Glut1 — транспортеры глюкозы 1 типа, P2XR — пуринергические рецепторы, FFAR2 — рецепторы короткоцепочечных жирных кислот, AHR — арил-гидрокарбоновые рецепторы, PRR — образ-распознающие рецепторы врожденного иммунитета, PAMP — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, DAMP — молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением.

И наоборот, если активность mTOR в CD4⁺ клетках низкая, то они дифференцируются в Treg-клетки, которые блокируют развитие инсулита и прогрессию диабета [5, 23].

Таким образом, установленное нами увеличение уровня мРНК генов транспортеров глюкозы Glut1 и протеинкиназы mTOR в клетках ПЛУ при диабете является важным триггером их дифференцировки в эффекторные провоспалительные субпопуляции Th1 и Th17.

В свою очередь, важным стратегическим заданием есть поиск эффективных путей коррекции иммунных нарушений, развивающихся при СД и поддерживающих его прогрессию. Одной из перспективных терапевтических мишеней при СД есть ингибиторы mTOR. В связи с этим мы остановили свой выбор на метформине, который способен снижать концентрацию глюкозы в крови через АМФ-активируемую протеинкиназу (АМФК) [25]. Метформин, как и рапамицин, но более мягко, без развития иммуносупрессии, угнетает активность mTOR [12]. Интересно, что сигнализация через mTOR вызывает метаболическое перепрограммирование лимфоцитов, стимулируя гликолиз *c-MYC* — зависимым путем, что повышает пролиферацию иммунных клеток [29]. Метформин способен и непосредственно, без участия mTOR, как АМФК-зависимым, так и АМФК-независимым путем [33] влиять на метаболизм лимфоцитов. Так, у Т-лимфоцитов АМРК-зависимая сигнализация важна для образования Т-клеток памяти в динамике иммунного ответа [24]. Способность метформина через активизацию АМРК угнетать выработку эффекторных Т-лимфоцитов и стимулировать дифференцировку Т-клеток памяти была подтверждена целым рядом исследований [14, 20]. Провоспа-

лительные действия метформина объясняют его способность угнетать развитие аутоиммунных заболеваний [18]. Кроме того, метформин ингибирует пролиферацию и выживание опухолевых клеток в условиях острого миелоидного и Т-клеточного острого лимфобластного лейкозов [11], влияет на эмиграцию Т-клеток из тимуса у пациентов с СД 2 типа [6]. Kang K. et al. (2013) продемонстрировали способность метформина уменьшать количество RORγt⁺ CD4⁺Th17-клеток в лимфатических узлах у мышей с аутоиммунным ревматоидным артритом, снижать уровень сывороточных провоспалительных цитокинов TNFα и IL-1 [14]. Способность метформина блокировать активацию Th17-клеток, продукцию IFNγ и IL-17 была продемонстрирована и на модели системной красной волчанки [32]. Эффекты метформина на уровень иммунного ответа также реализуются через ингибирование МНС-рестриктированной презентации антигенов АПК, в частности путем супрессии продукции дендритными клетками костимулирующих факторов, таких как CD54, CD80 и CD86 [27]. В недавнем исследовании Forslund K. et al. (2015) продемонстрирована способность метформина вызывать изменения в кишечном микробиоме у пациентов с СД 2 типа, в частности влиять на продукцию короткоцепочечных жирных кислот [8], которые через свои рецепторы, в частности FFAR2, влияют на дифференцировку Т-клеток, особенно Treg. Установленные нами возрастание уровня мРНК АМРК1α и угнетение экспрессии mTOR в ПЛУ после введений метформина диабетическим крысам свидетельствуют о возможности его использования для коррекции иммунных нарушений, развивающихся при СД.

Список литературы / References

1. Basu S., Hubbard B., Shevach E.M. Foxp3-mediated inhibition of Akt inhibits Glut1 (glucose transporter 1) expression in human T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 97, no. 2, pp. 279-283.
2. Buck M.D., O'Sullivan D., Pearce E.L. T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.*, 2015, Vol. 212, no. 9, pp. 1345-1360.
3. Calderon B., Unanue E. Antigen presentation events in autoimmune diabetes. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, Vol. 24, no. 1, pp. 119-128.
4. Chapman N.M., Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. *Immunotherapy*, 2014, Vol. 6, no. 12, pp. 1295-1311.
5. Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *J. Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 325, p. 38.
6. Dworacki G., Urazayev O., Bekmukhambetov Y., Iskakova S., Frycz B.A., Jagodziński P.P., Dworacka M. Thymic emigration patterns in patients with type 2 diabetes treated with metformin. *Immunology*, 2015, Vol. 146, no. 3, pp. 456-469.
7. Foretz M., Guigas B., Bertrand L., Pollak M., Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.*, 2014, Vol. 20, no. 6, pp. 953-966.
8. Forslund K., Hildebrand F., Nielsen T., Falony G. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*, 2015, Vol. 528, no. 7581, pp. 262-266.
9. Gagnerault M., Lua J., Lotto C., Lepau F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of β cell reactive T cells in NOD mice. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, pp. 369-377.
10. Gerriets V., Rathmell J. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 168-173.

11. Green A.S., Chapuis N., Trovati M.T., Willems L., Lambert M., Arnoult C. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood*, 2010, Vol. 116, pp. 4262-4273.
12. Hardie D. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *J. Diabetes*, 2013, Vol. 216, p. 72.
13. Hardie D.G., Ashford M.L. AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology (Bethesda)*, 2014, Vol. 29, no. 2, pp. 99-107.
14. Kang K.Y., Kim Y.K., Yi H., Kim J., Jung H.R., Kim I.J., Cho J.H., Park S.H., Kim H.Y., Ju J.H. Metformin down regulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *Int. Immunopharmacol.*, 2013, Vol. 16, no. 1, pp. 85-92.
15. Liu Y., Zhang D.T., Liu X.G. mTOR signaling in T cell immunity and autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 34, no. 1, pp. 50-66.
16. Macintyre A.N., Gerriets V.A., Nichols A.G., Michalek R.D., Rudolph M.C., Deoliveira D., Anderson S.M., Abel E.D., Chen B.J., Hale L.P., Rathmell J.C. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.*, 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 61-72.
17. Michalek R.D., Gerriets V.A., Jacobs S.R., Macintyre A.N., MacIver N.J., Mason E.F., Sullivan S.A., Nichols A.G., Rathmell J.C. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 6, pp. 3299-3303.
18. Nath N., Khan M., Paintlia M.K., Hoda M.N., Giri S. Metformin Attenuated the Autoimmune Disease of the Central Nervous System in Animal Models of Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*, 2009, 182, pp. 8005-8014.
19. Palmer C.S., Hussain T., Duette G., Weller T.J., Ostrowski M., Sada-Ovalle I., Crowe S.M. Regulators of glucose metabolism in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Int. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 25, pp. 1-12.
20. Pearce E.L., Walsh M.C., Cepas P.J., Harms G.M., Shen H., Wang L.S., Jones R.G., Choi Y. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*, 2009, Vol. 460, pp. 103-107.
21. Pollizzi K.N., Patel C.H., Sun I.H., Oh M.H., Waickman A.T., Wen J., Delgoffe G.M., Powell J.D. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8⁺ T cell differentiation. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, no. 5, pp. 2090-2108.
22. Pollizzi K.N., Powell J.D. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and the known unknowns. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 1, pp. 13-20.
23. Powell J.D., Pollizzi K.N., Heikamp E.B., Horton M.R. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev. Immunol.*, 2012, pp. 39-68.
24. Rolf J., Zarrouk M., Finlay D.K., Foretz M., Viollet B., Cantrell D.A. AMPK α 1: A glucose sensor that controls CD8 T-cell memory. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 4, pp. 889-896.
25. Russo G.L., Russo M., Ungaro P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. *J. Biochem. Pharmacol.*, 2013, Vol. 339, p. 50.
26. 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, Vol. 220, no. 4, pp. 510-517.
27. Shin S., Hyun B., Lee A., Kong H., Han S., Lee C.K., Ha N.J., Kim K. Metformin Suppresses MHC-Restricted Antigen Presentation by Inhibiting Co-Stimulatory Factors and MHC Molecules in APCs. *Biomol. Ther.*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 35-41.
28. Waickman A.T., Powell J.D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *J. Immunol Rev.*, 2012, pp. 43-58.
29. Wang R., Dillon C.P., Shi L.Z., Milasta S., Carter R., Finkelstein D., McCormick L.L., Fitzgerald P., Chi H., Munger J., Green D.R. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*, 2011, Vol. 35, pp. 871-882.
30. Xu X., Ye L., Araki K., Ahmed R. mTOR, linking metabolism and immunity. *Semin. Immunol.*, 2012, Vol. 24, no. 6, pp. 429-435.
31. Yang K., Chi H. mTOR and metabolic pathways in T cell quiescence and functional activation. *Semin. Immunol.*, 2012, Vol. 421, p. 8.
32. Yin Y., Choi S.C., Xu Z., Zeumer L., Kanda N., Croker B.P., Morel L. Glucose Oxidation Is Critical for CD4⁺ T Cell Activation in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 25, pp. 80-90.
33. Zarrouk M., Finlay D.K., Foretz M., Viollet B., Cantrell D.A. Adenosine-mono-phosphate-activated protein kinase-independent effects of metformin in T cells. *PLoS One.*, 2014, Vol. 2, no. 9, e. 106710.
34. Zeng H., Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 1, pp. 3-12.

Авторы:

Путилин Д.А. — ассистент кафедры нормальной физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина
Камышный А.М. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, заведующий молекулярно-генетической лабораторией, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Authors:

Putilin D.A., Assistant Professor, Department of Normal Physiology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine
Kamyshnyi A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Head, Laboratory of Molecular Genetics, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Поступила 22.04.2016
Отправлена на доработку 31.05.2016
Принята к печати 20.06.2016

Received 22.04.2016
Revision received 31.05.2016
Accepted 20.06.2016