

УДК: 616.379-008.64-07:577.112]-0929

Д.А. Путілін,  
О.М. Камишиний,  
В.А. Камишина,  
І.Є. Сухомлінова

Запорізький державний медичний  
університет

## ЗМІНИ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ mTOR, Foxp3, IL1 $\beta$ І IL17A У ПАРАПАНКРЕАТИЧНІЙ ЖИРОВІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМУ ДІАБЕТИ ТА ПІСЛЯ ВВЕДЕНЬ МЕТФОРМІНУ

**Ключові слова:** цукровий діабет, жирова тканина, mTOR, Foxp3

**Резюме.** mTOR є не тільки центральним регулятором ліпідного метаболізму, що контролює процеси адипогенезу та ліполізу, але і регулятором імунометаболізму імунних клітин, що інфільтрують жирову тканину. В свою чергу, рівень прогресії діабету багато в чому лімітується субпопуляцією Treg, складність і гетерогенність якої підтверджується виявленням чисельних тканиноспецифічних Tregs, в тому числі так званих VAT Tregs (visceral adipose tissue CD4+Foxp3+ regulatory T cells). Тому, метою роботи було з'ясувати рівень експресії мРНК генів mTOR, Foxp3, IL1 $\beta$  і IL17A у парапанкреатичній жировій тканині щурів з експериментальним стрептозотин-індукованим цукровим діабетом і після введення метформіну. Матеріали і методи: дослідження проведені на самцях щурів лінії Вістар. Для індукції цукрового діабету щурам вводили стрептозотин. Молекулярно-генетичні дослідження проведені методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу. Висновки: розвиток діабету викликає транскрипційну активацію гена протеїнкінази mTOR, не впливає на експресію мРНК Foxp3, збільшує рівень експресії мРНК прозапальних цитокінів IL1 $\beta$  і IL17A. При цьому введення метформіну діабетичним щурам пригнічує експресію мРНК mTOR та призводить до зростання рівня транскрипційної активності гена Foxp3 у парапанкреатичній жировій тканині.

### Вступ

Наші попередні дослідження показали, що розвиток експериментального стрептозотин-індукованого цукрового діабету (ЕСЦД) викликає транскрипційну індукцію генів транспортерів глюкози Glut 1 і протеїнкінази mTOR в клітинах панкреатичних лімфатичних вузлів (ПЛВ) [2], а також збільшує кількість TLR2+ та TLR4+ адипоцитів і переважно підвищує щільність TLR2+ і TLR4+ рецепторів на їх мембрані у парапанкреатичній клітковині [1]. Виявлене збільшення рівня мРНК протеїнкінази mTOR (mammalian target of rapamycin) в клітинах ПЛВ при діабеті може бути тригером їх диференціювання в ефекторні прозапальні субпопуляції Th1 і Th17. Разом з тим, жирова тканина (ЖТ) містить цілі кластери клітин вродженої та адаптивної імунної системи [12], які інфільтрують адипоцити та від балансу яких залежить рівень прозапальної сигналізації в ЖТ та продукція таких цитокінів як IL1 $\beta$ , IL17A, TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IFN $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ), здатних безпосередньо впливати на прогресію інсуліту [15]. В свою чергу, важливим регулятором

ліпідного гомеостазу [3], а також імунометаболізму інфільтруючих ЖТ лімфоцитів є mTOR [13]. Тому, метою роботи було з'ясувати рівень експресії мРНК генів mTOR, Foxp3, IL1 $\beta$  і IL17A у парапанкреатичній жировій тканині (ПЖТ) щурів з ЕСЦД і після введення метформіну.

### Матеріал і методи

Дослідження проведені на 60 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 12 щурів: контрольні щури, яким одноразово внутрішньочеревно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН = 4,5) (група 1); щури з 3-тижневим ЕСЦД (група 2); щури з 5-тижневим ЕСЦД (група 3); щури з 3 тижневим ЕСЦД (група 4) та 5-тижневим ЕСЦД (група 5), яким внутрішньо-шлунково (в/ш) щоденно на протязі 3 та 5 тижнів вводили метформін у дозі 50 мг/кг починаючи з 1 дня індукції діабету.

Для індукції ЕСЦД стрептозотин (STZ)

© Д.А. Путілін, О.М. Камишиний, В.А. Камишина, І.Є. Сухомлінова, 2016

(SIGMA Chemical, США) вводили щурам внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг, розчиненого в 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН 4,5) перед самим моментом уведення. 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 "BIONIMERigh testTMGM 110" (Швейцарія) через 12 годин і на 1, 3, 21 і 35 доби після ін'єкції STZ. 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 ділянки ПЖТ, які на 20 годин занурювали в фіксатор Буена і після промивки заливали в парапласт.

Молекулярно-генетичні дослідження проведені на архівному матеріалі віком 3 роки методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). 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 "Trizol RNA Prep 100" (Ізоген Lab., LTD, Росія), який містить Trizol reagent (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіюніонат 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 Н<sub>2</sub>О, 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 Foxp3 (NM\_001108250.1), mTOR (NM\_019906.1), IL1β (NM\_031512.2) та IL17A (NM\_001106897.1) використовували ампліфікатор CFX96™Real-Time PCR Detection Systems ("Bio-Rad Laboratories, Inc.", США) і набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК - полімераза Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального об'єму 25 мкл додаванням деіонізованої Н<sub>2</sub>О. Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) та виготовлені фірмами Metabion (Німеччина) і ThermoScientific (США) (див. табл.).

Після початкової денатурації протягом 10 хв. при 95°C ампліфікація складалася з 45 циклів та проводилася за таких умов: денатурація - 95°C, 15 сек., віджиг - 59-61°C, 30-60 сек., елонгація - 72°C, 30 сек. В якості референс-гена для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген гліцераальдегід-3-фосфат дегідрогенази (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GAPDH). Віднос-

Таблиця

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>mTor</i>	F = TCTGGCCAAAAGACAGGTGG R = CTGTCCCAGGGTCCACAAAG	60 60	40	2577/ 2578
<i>Foxp3</i>	F = CGAGACTTGGAAGTCAGCCAC R = TCTGAGGCAGGCTGGATAACG	60 61	61	214/ 215
<i>IL-1β</i>	F = TCTTTGAAGAAGAGCCCGTCC R = GGTCGTCATCATCCCACGAG	60 60	48	354/ 355
<i>IL-17A</i>	F = CTGGACTCTGAGCCGCAATG R = TGCCTCCCAGATCACAGAAG	61 59	58	297/ 298
<i>GAPDH</i>	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTACCACCTTCT	61 60	52	825/ 826

ну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом  $\Delta\Delta Ct$ . 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.

### Обговорення результатів дослідження

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

Стрептозотоцин-індуковані метаболічні зміни викликали транскрипційну активацію гена протеїнкінази mTOR в клітинах ПЖТ. Зокрема, розвиток діабету призводив до зростання вмісту мРНК mTOR в 6,8 раза ( $p < 0,05$ ) на 3 тиждень та в 3,6 раза ( $p < 0,05$ ) на 5 тиждень патологічного процесу (Рис. 1А). Ці зміни не впливали на експресію мРНК транскрипційного регулятора дифе-

ренціювання Т-регуляторних клітин Foxp3 на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу та знижували її в 4,6 раза ( $p < 0,05$ ) при 5-ти тижневому ЕСПЦД (Рис. 1В) порівняно з контрольною групою щурів. Виявлене нами раніше зростання кількості TLR2+ та TLR4+ адипоцитів та щільності їх рецепторів на мембрані жирових клітин у парапанкреатичній клітковині [1] закономірно індукує прозапальну сигналізацію. Так, рівень експресії мРНК прозапального цитокіну IL1 $\beta$  збільшувався в 77,7 раза ( $p < 0,05$ ) на 3 тиждень та 51,3 рази ( $p < 0,05$ ) на 5 тиждень розвитку ЕСПЦД (Рис. 1С), а Th17-залежного цитокіну IL17А відповідно у 23,5 ( $p < 0,05$ ) та 5,5 рази ( $p < 0,05$ ) (Рис. 1D).

Введення метформіну діабетичним щурам пригнічувало експресію mTOR: ми спостерігали зменшення рівня мРНК мішені рапаміцина в ПЖТ у 4,5 раза ( $p < 0,05$ ) при 3-х тижневому та в 5,9 рази ( $p < 0,05$ ) при 5-ти тижневому ЕСПЦД (Рис. 2 А-В). Така транскрипційна репресія mTOR призводила до зростання рівня транскрипційної активності гена Foxp3 в Treg-клітинах ПЖТ. Так, відносна нормалізована кількість мРНК гена Foxp3 збільшувалася на 80% ( $p < 0,05$ ) на 3 тиждень та в 3,1 раза ( $p < 0,05$ ) на 5 тиждень розвитку ЕСПЦД (Рис. 2 С-Д).

mTOR є не тільки центральним регулятором ліпідного метаболізму, що контролює процеси адипогенезу та ліполізу, але і регулятором імуно-

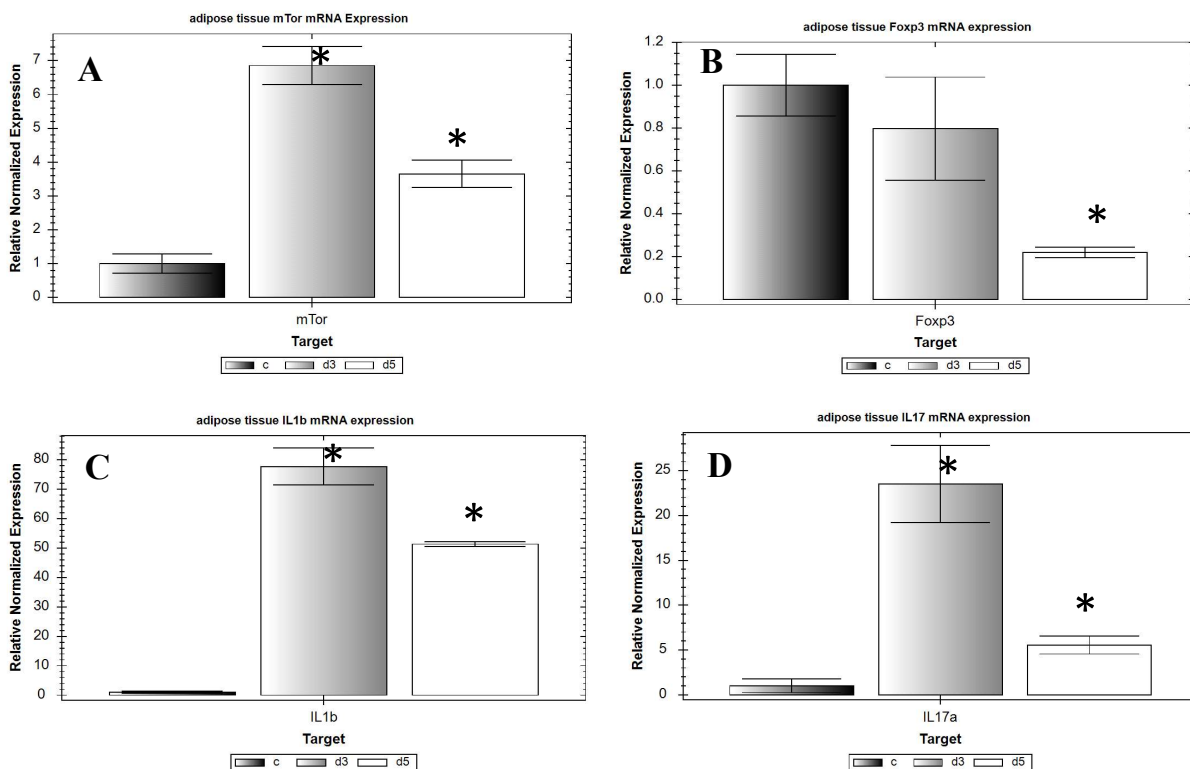
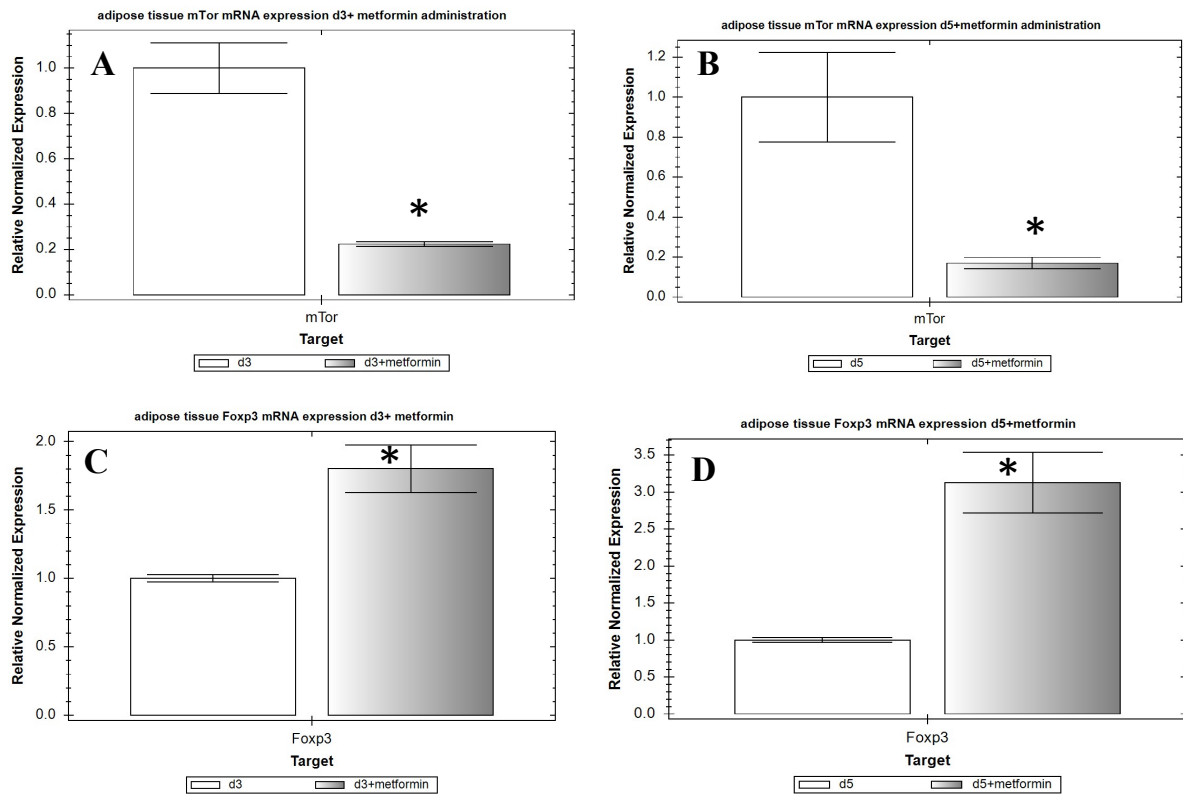


Рис. 1. Відносна нормалізована кількість мРНК генів mTOR (А), Foxp3 (В), IL1 $\beta$  (С) і IL17А (D) в парапанкреатичній клітковині. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta Ct$  з референс-геном GAPDH. c-контроль; d3, d5 - діабет 3 і 5 тижнів. \* -  $p < 0.05$



**Рис. 2.** Відносна нормалізована кількість мРНК генів mTOR (A-B), Foxp3 (C-D) в парапанкреатичній клітковині після введення метформіну діабетичним щурам. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta$  Ст з референс-геном GAPDH. c-контроль; d3, d5 - діабет 3 і 5 тижнів. \* -  $p < 0.05$

метаболізму інфільтруючих ЖТ імунних клітин [9]. Рівень прогресії діабету багато в чому лімітується субпопуляцією Treg [18], складність і гетерогенність якої підтверджується виявленням чисельних тканиноспецифічних Tregs, в тому числі так званих VAT Tregs (visceral adipose tissue CD4+Foxp3+ regulatory T cells) або "Fat Tregs" [21, 5]. Такі VAT Tregs характеризуються цілим рядом унікальних властивостей: 1) по-перше, Foxp3+-експресуючі VAT Tregs становлять 40-60% серед усіх CD4+ T-клітин ЖТ, що складає набагато більший процент порівняно з їх аналогами в селезінці та лімфатичних вузлах (5-20%) або нелімфоїдних тканинах (наприклад, легенях і печінці), а також в підшкірній жировій клітковині [10]; 2) по-друге, VAT Tregs характеризуються більш високим рівнем транскрипції супресорного цитокіну IL-10 (майже у 136 разів вище порівняно з його експресією в звичайних Tregs). У свою чергу, IL-10, що продукується VAT Tregs пригнічує вироблення запальних цитокінів і хемокінів, індукованих TNF $\alpha$ , підвищує експресію GLUT4 в адипоцитах і відновлює чутливість ЖТ до інсуліну; 3) по-третє, VAT Tregs відрізняються більш високою експресією таких хемокінів і хемокінотичних рецепторів як CCR1, CCR2, CCR9, CCL6, CXCL2 і CXCL10, та більш низькими патернами

експресії CCL5 і CXCR3 [6]; 4) важливе значення для акумуляції в ЖТ і функціонуванні VAT Tregs мають ядерні рецептори PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), їх специфічна делеція в Tregs перешкоджає накопиченню даних клітин в ЖТ, але не в лімфоїдних органах [7]; 5) і, нарешті, VAT Tregs експресують специфічний репертуар T-клітинного рецептора (ТКР), що відрізняється від репертуару ТКР Tregs лімфатичних вузлів.

Виявлена нами залежність диференціювання Treg від рівня експресії mTOR показана і в ряді інших робіт [20, 4]. При високій активності mTOR відбувається диференціювання наївних CD4+клітин в ефекторні прозапальні субпопуляції Th1, Th2, Th17, а також активація цитотоксичних CD8+клітин [19]. І навпаки, якщо активність mTOR в CD4+ клітинах низька, то вони диференціюються в Treg клітини, які блокують розвиток інсуліту і прогресію діабету [14].

Отримані нами результати свідчать, що введення метформіну, який здатний через АМФ-активуюему протеїнкіназу (АМФК) пригнічувати активність mTOR призводить до зростання рівня транскрипційної активності гена Foxp3 в Treg-клітинах ПЖТ. Аналогічно Shin N. et al. (2014) продемонстрували, що метформін збільшує

кількість і процентну частку VAT Treg клітин у мишей, що знаходились на високо-жировій дієті [17], однак не відомо чи зачіпає цей ефект метформіну виключно VAT Treg і які молекулярні механізми опосередковують цей ефект [8].

Кореляція між дисфункцією ЖТ та розвитком запальних і автоімунних захворювань була продемонстрована в ряді досліджень. Коепен Т. et al. (2011) показали, що вісцеральна жирова тканина (ВЖТ) володіє більш вираженим прозапальним потенціалом у порівнянні з підшкірною ЖТ [11]. Зокрема, процент CD8<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів в ВЖТ був значно вище, ніж у підшкірній ЖТ (41,6 проти 30,4%,  $p < 0,05$ ). Адипоцити ВЖТ характеризувалися більш високою продукцією IL-1 $\beta$  (у 10 раз,  $p < 0,05$ ), IL-18 (у 3 рази,  $p < 0,05$ ), IL-6 і IL-8 (у 3 і у 4 рази відповідно,  $p < 0,05$ ) у порівнянні з підшкірною ЖТ [11]. І нарешті, активність каспази-1 в адипоцитах ВЖТ була у 3 рази вище, що створює умови для активації інфламасоми та пояснює більш високу "схильність" ВЖТ до розвитку запалення [11].

Періпанкреатичні адипоцити (ППА) чинять як системні, так і паракринні ефекти на функцію підшлункової залози. У мишей з адипоцит-специфічною делецією SUMO-специфічної протеази (Small ubiquitin-like modifier) SENP1 розвиваються симптоми ЦД 1 типу. В нещодавньому дослідженні Shao L. et al. (2016) показано, що ППА таких SENP1-дефіцитних мишей збільшують вироблення прозапальних цитокінів IL-6, TNF $\alpha$  і IL-1 $\beta$  порівняно з іншими жировими депо [15]. Причому ці цитокіни не тільки надають пряму цитотоксичну дію на панкреатичні острівці, але й збільшують експресію CCL5 та інших хемокинів (CCL2, CCL21, CXCL9 і CXCL10) в сусідніх острівцях, що викликає стійке запалення в підшлунковій залозі шляхом рекрутування в них ефекторних Th1 і Th17 клітин і редукції числа Treg. SUMO може посттрансляційно зв'язуватись з клітинними білками та модулювати їх біологічні функції. Автори припускають, що сумоїлірування білка NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) підсилює активність NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) та впливає на NF- $\kappa$ B-залежну продукцію цитокінів, що викликають інсуліт [16]. Таким чином, ППА можуть відігравати важливу роль в прогресії діабету, забезпечуючи нове розуміння молекулярного патогенезу ЦД 1-го типу.

## Висновки

1. Розвиток діабету викликає транскрипційну активацію гена протеїнкінази mTOR в клітинах ПЖТ, не впливає на експресію мРНК транскрип-

ційного регулятора диференціювання Т-регуляторних клітин Foxp3 на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу та знижує її в 4,6 рази ( $p < 0,05$ ) при 5-ти тижневому ЕСПЦД. Ці зміни супроводжуються збільшенням рівня експресії мРНК прозапальних цитокінів IL1 $\beta$  і IL17A в клітинах ПЖТ.

2. Введення метформіну діабетичним щурам пригнічує експресію мРНК mTOR у 4,5-5,9 рази ( $p < 0,05$ ), призводить до зростання рівня транскрипційної активності гена Foxp3 в Treg-клітинах ПЖТ - на 80% ( $p < 0,05$ ) на 3 тиждень та в 3,1 рази ( $p < 0,05$ ) на 5 тиждень розвитку ЕСПЦД.

## Перспективи подальших досліджень

Потребує подальшого поглибленого вивчення особливостей імунометаболізму лімфоцитів жирової тканини при цукровому діабеті.

**Література.** 1.Камишний О.М., Путілін Д. А., Коновова О.О., Камишна В.А. Особливості експресії TLR2 і TLR4 адипоцитами парапанкреатичної клітковини при експериментальному цукровому діабеті // Biomedical and biosocial anthropology. - 2014. - Т.22, №2. - С. 121-126. 2.Путілін Д.А., Камышний А.М. Изменения уровня экспрессии генов GLUT1, mTOR и AMPK1 $\alpha$  лимфоцитами панкреатических лимфатических узлов крыс при экспериментальном сахарном диабете // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18. № 4. - С. 339-346. 3.Cai H., Dong L.Q., Liu F. Recent Advances in Adipose mTOR Signaling and Function: Therapeutic Prospects // Trends Pharmacol Sci. 2016 Apr;37(4) P. 303-17. 4.Chapman N.M., Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. // Immunotherapy. 2014; 6(12) P. 1295-311. 5.Chen X., Wu Y., Wang L. Fat-resident Tregs: an emerging guard protecting from obesity-associated metabolic disorders // Obes Rev. 2013 Jul;14(7) P. 568-78. 6.Cipolletta D., Kolodin D., Benoist C., et al. Tissue-resident Foxp3+CD4+ T cells that impact organismal metabolism. // Semin Immunol 2011; 23 P. 431-7. 7.Cipolletta D., Feuerer M., Li A., et al. PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. // Nature 2012; 486 P. 549-53. 8.Daniela Cipolletta. Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential // Immunology. 2014 Aug; 142(4) P. 517-525. 9.Ferrante A.W. The immune cells in adipose tissue // Diabetes Obes Metab. 2013 Sep;15 Suppl 3 P.34-8. 10.Feuerer M., Herrero L., Cipolletta D., et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. // Nat Med 2009; 15 P. 930-9. 11. Koenen T., Stienstra R., van Tits L. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. // J. Endocrinology. 2011 Oct.-V.3769.- P.78. 12.Kohlgruber A.C., LaMarche N.M., Lynch L. Adipose tissue at the nexus of systemic and cellular immunometabolism // Semin Immunol. 2016 Oct 24. (16) P. 30098-7. 13.Lamming D.W., Sabatini D.M. A Central role for mTOR in lipid homeostasis // Cell Metab. 2013 Oct 1;18(4) P. 465-9. 14.Powell J.D., Pollizzi K.N., Heikamp E.B., et al. Regulation of immune responses by mTOR. // Annu Rev Immunol. 2012; V. 30. P. 39-68. 15.Shao L., Feng B., Zhang Y., et al. The role of adipose-derived inflammatory cytokines in type 1 diabetes // Adipocyte. 2016 Mar 17;5(3) P. 270-4. 16.Shao, L., et al. SENP1-mediated NEMO deSUMOylation in adipocytes limits inflammatory responses and type-1 diabetes progression. // Nature communications V. 6, (2015) article 8917. 17.Shin N.R., Lee J.C., Lee H.Y., et al. An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. // Gut. 2014 May; 63(5) P. 727-35. 18.Spence A., Tang Q. Restoring Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes // Curr Diab Rep. 2016 Nov;16(11)

P.110. 19. Waickman A.T., Powell J.D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. // *J. Immunol Rev.* 2012; Sep; 249(1): P. 43-58. 20. Zeng H., et al. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish Treg-cell function. // *Nature.* 2013; 499: 485-490. 21. Zhou X., Tang J., Cao H., et al. Tissue resident regulatory T cells: novel therapeutic targets for human disease // *Cell Mol Immunol.* 2015 Sep; 12(5) P. 543-52.

**ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ MTOR, FOXP3, IL1 $\beta$  И IL17A В ПАРАПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЙ МЕТФОРМИНА**

*Д.А. Путилин, А.М. Камышный, В.А. Камышная, И.Е. Сухомлинова*

**Резюме.** mTOR является не только центральным регулятором липидного метаболизма, контролирующим процессы адипогенеза и липолиза, но и регулятором иммунометаболизма инфильтрирующей жировую ткань иммунных клеток. В свою очередь, уровень прогрессии диабета во многом лимитируется субпопуляцией Treg, сложность и гетерогенность которой подтверждается обнаружением многочисленных тканеспецифических Tregs, в том числе так называемых VAT Tregs (visceral adipose tissue CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells). Поэтому, целью работы было выяснить уровень экспрессии мРНК генов mTOR, Foxp3, IL1 $\beta$  и IL17A в парапанкреатической жировой ткани крыс с экспериментальным стрептозотокцин-индуцированным сахарным диабетом и после введения метформина. Материалы и методы: исследования проведены на самцах крыс линии Вистар. Для индукции сахарного диабета крысам вводили стрептозотокцин. Молекулярно-генетические исследования проведены методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Выводы: развитие диабета вызывает транскрипционную активацию гена протеинкиназы mTOR, не влияет на экспрессию мРНК Foxp3, увеличивает уровень экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов IL1 $\beta$  и IL17A. При этом введение метформина диабетическим крысам угнетает экспрессию мРНК mTOR и приводит к росту уровня транскрипционной активности гена Foxp3 в парапанкреатической жировой ткани.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, жировая ткань, mTOR, Foxp3.

**CHANGES OF EXPRESSION OF GENES MTOR, FOXP3, IL1 $\beta$  I IL17A IN PARAPANCREATIC ADIPOSE TISSUE OF EXPERIMENTAL RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES AFTER INTRODUCTION OF METFORMIN**

*D.A. Putilin, O.M. Kamyshnyi, V.A. Kamyshna, I.E. Sukhomlinova*

**Abstract.** mTOR is not only a central regulator of lipid metabolism, controlling the processes of adipogenesis and lipolysis, but also a regulator of immunometabolism of immune cells infiltrating the adipose tissue. In its turn, the level of progression of diabetes is largely limited by Treg subpopulation, the complexity and heterogeneity of which is confirmed by the detection of numerous tissue-specific Tregs, including the so-called VAT Tregs (visceral adipose tissue CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells). Therefore, the purpose of the work was to find out the level of expression of mRNA genes of mTOR, Foxp3, IL1 $\beta$  and IL17A in parapancreatic adipose tissue of rats with experimental streptozotocin-induced diabetes after introduction of metformin. Materials and methods: the research was conducted in male Wistar rats. For induction of diabetes mellitus, the rats were injected with streptozotocin. The molecular genetic studies were conducted by polymerase chain reaction with reverse transcription in real time.

**Conclusion:** the development of diabetes causes the transcriptional activation of the gene of the protein kinase mTOR, does not affect the expression of mRNA of Foxp3, increases the level of expression of mRNA of proinflammatory cytokines IL1 $\beta$  and IL17A. At the same the introduction of metformin in diabetic rats inhibits the expression of mRNA of mTOR and increases the level of transcriptional activity of the gene Foxp3 in parapancreatic adipose tissue.

**Keywords:** diabetes mellitus, adipose tissue, mTOR, Foxp3.

**Zaporozhye State Medical University**

*Clin. and experim. pathol.* - 2016. - Vol. 15, №4 (58). - P.92-97.

*Надійшла до редакції 09.12.2016*

*Рецензент – проф. С.С. Ткачук*

*© Д.А. Путилін, О.М. Камышный, В.А. Камышная,*

*І.Е. Сухомлінова, 2016*