

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук  
(УФИЦ РАН)**

**Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского  
федерального исследовательского центра Российской академии наук  
(ИБГ УФИЦ РАН)**

*На правах рукописи*

**ТУХВАТУЛЛИН АРТУР ВАДИМОВИЧ**

**РОЛЬ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В РЕГУЛЯЦИИ  
ЛЕЙКОЦИТАРНО–ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ  
РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ**

06.06.01 Биологические науки

1.5.4. Биохимия

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**

Уфа – 2024

**Работа выполнена в Институте биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук**

**Научный руководитель:** **Кузьмина Ульяна Шафкатовна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной фармакологии и иммунологии института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

**Научный консультант:** **Бахтиярова Клара Закиевна** – доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Рецензенты:** **Кутлубаев Мансур Амирович** – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой неврологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Авальбаев Азамат Мэлсович** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессам института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

**Пролыгина Диляра Дамировна** – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры лабораторной диагностики с курсом клинической иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный внештатный специалист детский иммунолог Министерства здравоохранения Республики Башкортостан

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Рассеянный склероз (РС) – хроническое прогрессирующее инвалидизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС), характеризующееся диссеминированными очагами воспаления и демиелинизации с формированием вторичной диффузной дегенерации. В мире насчитывается от 2.5 до 3 млн. больных РС. По данным Минздрава РФ распространенность заболевания в России на 2017 г. составила 54.8 случаев на 100 000 населения. В последнее время отмечается увеличение соотношения женщин к мужчинам с РС (3–4:1).

Сложная этиология заболевания включает генетические и эпигенетические факторы, вирусные инфекции, дефицит витамина D, курение, изменения кишечного микробиома и т.д. Патогенез РС складывается из трёх основных патологических процессов: воспаление, демиелинизация и нейродегенерация. Нарушение иммунологической толерантности и миграция иммунных клеток через ГЭБ в ЦНС считаются основой иммунопатогенеза заболевания. Начальным этапом является активация аутореактивных клонов периферических Т–лимфоцитов, которые начинают пролиферировать и дифференцироваться в эффекторные субпопуляции, проникающие в ЦНС посредством механизмов клеточной адгезии. За счет презентации макрофагами аутоантигенов, энцефалитогенные Т–клетки реактивируются и начинают вырабатывать провоспалительные цитокины. Происходит активация микроглии. Это, в свою очередь, запускает целый каскад патологических реакций и приводит к местному повреждающему действию на клетки нервной системы.

Как известно, при РС наблюдаются нарушения со стороны глутаматэргической системы. Увеличение внеклеточной концентрации глутамата под влиянием провоспалительных цитокинов и энцефалитогенных Т–лимфоцитов приводит к гибели нейронов (Pitt et al., 2000). Это явление описывается как глутаматная эксайтотоксичность и представляет собой первичный повреждающий механизм в формировании и поддержании нейродегенерации при РС. Кроме того, имеются данные о повышении содержания нейромедиатора в плазме и цельной

крови больных РС, что может влиять на взаимодействие иммунных клеток с церебральными эндотелиоцитами (Calderon et al., 2006). Известно, что глутамат влияет на функции Т-лимфоцитов и эндотелиальных клеток путем связывания с глутаматными NMDA- и AMPA-рецепторами (NMDAR и AMPAR) на их мембране (Krumbholz et al., 2006), однако точные механизмы реализации данного влияния изучены частично. Изучение роли глутамата в качестве нейроиммуномодулятора важно для выявления и понимания механизмов межклеточного взаимодействия при РС и поиска новых терапевтических мишеней для его лечения.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время имеются лишь отдельные работы, посвященные изучению роли рецепторов глутамата в процессах пролиферации, дифференцировки лимфоцитов, а также их миграции через ГЭБ при РС (Miglio et al., 2005; Зайнуллина и др., 2011; Ganor et al., 2012). Однако молекулярные и клеточные механизмы с участием его рецепторов в процессах адгезии и миграции до конца не известны.

**Цель исследования:** Изучение опосредованных ионотропными рецепторами глутамата клеточных и молекулярных механизмов регуляции адгезии лейкоцитов у здоровых лиц и больных РС к эндотелиальным клеткам в системе *in vitro*.

**Задачи исследования:**

1. Изучить влияние агонистов (глутамат, глицин, sAMPA, NMDA) и антагонистов (МК-801, NBQX) ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность лимфоцитов, полученных от здоровых лиц и больных РС;
2. Оценить эффекты агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность клеток HUVEC на фоне активации провоспалительным цитокином TNF $\alpha$ ;
3. Изучить характер влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезионную активность Т-клеток, полученных от здоровых лиц и больных РС, к эндотелиальным клеткам *in vitro*;
4. Провести корреляционный анализ субпопуляционного состава CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных РС с клинико-лабораторными показателями;

5. Определить влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на экспрессию молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, полученных от здоровых лиц и больных РС;

6. Провести анализ изменения экспрессии молекул адгезии, локализованных на клетках HUVEC (PECAM-1, VCAM-1), под действием агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата в условиях TNF $\alpha$ -активации.

**Научная новизна.** В проведенном исследовании впервые получены данные о роли ионотропных рецепторов глутамата в лейкоцитарно-эндотелиальном взаимодействии при РС.

Обнаружены изменения жизнеспособности лимфоцитов периферической крови и клеток HUVEC на фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата. Иммунные клетки больных РС в стадии обострения по сравнению со здоровыми лицами менее чувствительны к действию глутамата и глицина.

Установлена вовлеченность ионотропных рецепторов глутамата лимфоцитов периферической крови в регуляцию их адгезии к клеткам HUVEC, в том числе за счет изменения экспрессии молекулы адгезии VLA-4. Показано, что блокада NMDA-рецепторов сопровождается снижением экспрессии VLA-4 Т-хелперами 1, 2, 17 и 17.1 типов. На фоне блокады AMPA-рецепторов экспрессия уменьшается в провоспалительных субпопуляциях Т-клеток. Т-лимфоциты больных РС в стадии обострения более чувствительны к действию лигандов глутаматных рецепторов.

Выявлено снижение доли высокопатогенных субпопуляций Th17 и Th17.1 клеток при обострении заболевания. Обнаружена корреляция между относительным содержанием Th17 клеток в периферической крови больных РС и тяжестью заболевания по шкале EDSS, а также со скоростью его прогрессирования.

Выявлено снижение поверхностной экспрессии молекулы адгезии VCAM-1 эндотелиоцитами в модели воспаления *in vitro* при блокаде NMDA-рецепторов антагонистом МК-801, что подтверждает предположения о протективных свойствах блокаторов данного подтипа глутаматных рецепторов.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Выполненная работа имеет как фундаментальное, так и практическое значение. Полученные новые экспериментальные данные расширяют и углубляют молекулярные и биохимические представления о роли ионотропных рецепторов глутамата в регуляции лейкоцитарно–эндотелиального взаимодействия при РС. Результаты работы указывают на модулирующий эффект глутамата на адгезию лимфоцитов к эндотелию сосудов посредством регуляции активности его NMDA– и AMPA–рецепторов, локализованных как на иммунных клетках, так и эндотелиоцитах. Полученные сведения позволяют раскрыть возможности использования данных рецепторов, дополнительно, как фармакомишени для иммунокоррекции и восстановления эндотелиальной дисфункции при РС.

**Методология и методы исследования.** Основные подходы, лежащие в методологии данной работы, были определены в соответствии с новыми знаниями об иммунопатогенезе РС и базировались на использовании актуальных иммунологических и биохимических методах исследования. Для проведения исследования была сформирована репрезентативная выборка больных с достоверным диагнозом РС различной половой и этнической принадлежности. Осуществлено анкетирование участников исследования для уточнения клинических и эпидемиологических характеристик, изучена медицинская документация пациентов с РС. Выделение и культивирование первичных клеточных линий (лимфоцитов периферической крови, клеток HUVEC) проводилась по установленным общеизвестным протоколам. Жизнеспособность и адгезию оценивали колориметрическими методами. Субпопуляционный состав Т–лимфоцитов и экспрессию молекул адгезии определяли методом непрямого иммунофлюоресцентного анализа с помощью проточной цитофлуометрии. Статистическая обработка данных проводилась с использованием релевантных статистических критериев и методов анализа.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Ионотропные рецепторы глутамата, экспрессируемые на лимфоцитах периферической крови и эндотелиоцитах HUVEC, участвуют в регуляции их

жизнеспособности, однако имеются различия в ответе иммунных клеток больных РС по сравнению со здоровыми лицами.

2. Ионотропные рецепторы глутамата принимают участие в регуляции адгезии лимфоцитов периферической крови к клеткам HUVEC, в том числе за счет влияния на экспрессию молекул адгезии, локализованных на T-клетках (VLA-4) и эндотелиоцитах (VCAM-1).

3. Эффекты лигандов NMDA- и AMPA-рецепторов на адгезию лимфоцитов периферической крови к клеткам HUVEC сходны у здоровых лиц и больных РС в зависимости от стадии заболевания, однако степень их выраженности отличается.

4. Субпопуляционный состав CD4<sup>+</sup> T-лимфоцитов периферической крови больных РС имеет свои особенности, в частности, при обострении уменьшается доля Th17 и Th17.1 клеток. Относительное содержание Th17 лимфоцитов может служить предиктором тяжести и прогрессирования РС.

5. На фоне блокады ионотропных рецепторов глутамата наблюдается изменение экспрессии молекулы адгезии VLA-4 отдельными субпопуляциями CD4<sup>+</sup> T-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных РС. Выявленные изменения носят неоднородный характер, что предполагает разную чувствительность клеток к действию антагонистов.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность полученных результатов в ходе комплексного изучения роли ионотропных рецепторов глутамата в регуляции лейкоцитарно-эндотелиального взаимодействия при РС подтверждается проведением исследования на репрезентативной выборке с использованием релевантных иммунологических, биохимических и статистических методов. Результаты научной работы были доложены на III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов ♦ VII съезде биохимиков России ♦ X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» ♦ VII съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2021); Всероссийской научной конференции с международным участием «Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства» (Уфа, 2022); VI Инновационном Петербургском медицинском форуме «Медицина 2023 – наука, инновации и практика» (Санкт-Петербург, 2023);

Нейрофоруме–2023 (Москва, 2023); I Междисциплинарной всероссийской молодежной научной школе–конференции с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (Казань, 2023); Пятом Конгрессе Российского Комитета исследователей рассеянного склероза с международным участием «Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Вопросы патогенеза, диагностики и терапии» (Уфа, 2023); Всероссийской научно–практической конференции «Перспективные направления диагностики и терапии демиелинизирующих заболеваний» и «Конференция молодых ученых по итогам Конгресса РОКИРС 2023» (Ярославль, 2023 г.).

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объект исследования.** Объектом исследования были лимфоциты периферической крови больных РС и условно–здоровых доноров, а также клетки HUVES, выделенные из пупочной вены человека. Основную группу составили 58 пациентов с достоверным диагнозом РС (30 (51.7 %) женщин и 28 (48.3 %) мужчин, средний возраст составил 31.5 [22; 48] год), контрольную – 58 условно–здоровых добровольцев (29 женщины (50 %) и 29 мужчин (50 %), средний возраст 27 [23; 33] лет).

Выделение лимфоцитов из периферической крови проводили по стандартной методике центрифугирования в градиенте плотности фиколла с последующей 2–часовой элиминацией моноцитов. Клетки HUVES выделяли из пупочной вены по модифицированному протоколу Jaffe и др. У всех доноров было получено добровольное информированное согласие. Работа получила одобрение в Локальном этическом комитете при ИБГ УФИЦ РАН.

**Определение жизнеспособности лимфоцитов периферической крови.** После инкубации лимфоцитов с агонистами и антагонистами глутаматных рецепторов жизнеспособность клеток оценивали колориметрическим методом с помощью витального красителя PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen, США) на мультипланшетном анализаторе «EnSpire® Multimode Plate Readers» (Perkin



Elmer, США).

**Определение жизнеспособности клеток HUVEC.** Жизнеспособность активированных клеток HUVEC оценивали после их инкубации с агонистами и антагонистами глутаматных рецепторов с помощью витального красителя PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen, США) на мультипланшетном анализаторе «EnSpire® Multimode Plate Readers» (Perkin Elmer, США).

**Имунофенотипирование лимфоцитов и определение уровня поверхностной экспрессии молекулы адгезии VLA-4.** Имунофенотипирование периферических CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных РС осуществляли с использованием моноклональных антител к CD маркерам и хемокиновым рецепторам методом непрямого и прямого иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США).

**Оценка уровня поверхностной экспрессии молекул адгезии, локализованных на эндотелиальных клетках HUVEC, в условиях моделирования повреждения *in vitro*.** Для моделирования повреждения ГЭБ при РС эндотелиоциты HUVEC обрабатывали провоспалительным цитокином TNF $\alpha$  (100 нг/мл, 24 ч). После инкубации активированных клеток HUVEC с агонистами и антагонистами ионотропных рецепторов глутамата проводили оценку уровня поверхностной экспрессии молекул адгезии PECAM-1 и VCAM-1 методом непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания с моноклональными антителами с последующей окраской вторичными антителами. Интенсивность флуоресценции детектировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США).

**Анализ адгезии лимфоцитов к эндотелиоцитам HUVEC.** Анализ адгезии активированных и окрашенных CFSE лимфоцитов периферической крови проводили путем их добавления к монослою эндотелиоцитов HUVEC. Детекцию флуоресценции проводили, используя мультипланшетный анализатор 2300 EnSpire® Multimode Plate Readers (Perkin Elmer, США).

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью MS Excel, Statistica 6.0, GraphPad Prism 5.0 с применением непараметрических  $U$ -критерия Манна–Уитни,  $t$ -критерия Вилкоксона. Корреляционный анализ проводили с помощью подсчета рангового коэффициента корреляции Спирмена ( $r$ ). Различие групп считали статистически достоверным при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования было изучено влияние лигандов ионотропных рецепторов глутамата на регуляцию жизнеспособности лимфоцитов периферической крови. Полученные данные показали достоверное повышение жизнеспособности лимфоцитов периферической крови здоровых доноров до 127.0 % [116.5; 128.9] и больных РС в стадии ремиссии до 119.4 % [112.1; 121.3] и обострения до 112.7 % [104.5; 116.3] на фоне действия глутамата во всем диапазоне концентраций ( $p < 0.05$ ) (рис. 1). Клетки пациентов РС в стадии обострения оказались менее чувствительны к действию глутамата. При совместной стимуляции глутаматом в концентрации 100 мкМ и коагонистом глицином (100 мкМ) отмечалось достоверное повышение жизнеспособности лимфоцитов здоровых доноров до 128.1 % [101.8; 133.7] ( $p < 0.05$ ). Селективная стимуляция NMDA-рецепторов глутамата достоверно повышала жизнеспособность клеток при концентрации NMDA 0.1 мкМ до 114.2 % [106.3; 120.3] в группе здоровых доноров, при этом, не оказывая влияния на клетки больных РС ( $p < 0.05$ ).

Антагонист AMPA-рецепторов глутамата NBQX достоверно повышал жизнеспособность лимфоцитов в группе здоровых доноров до 109.6 % [105.2; 114.9], в группе больных РС в стадии ремиссии до 111.0 % [106.8; 113.4], в группе больных РС в стадии обострения до 115.4 % [111.7; 115.7] ( $p < 0.05$ ).

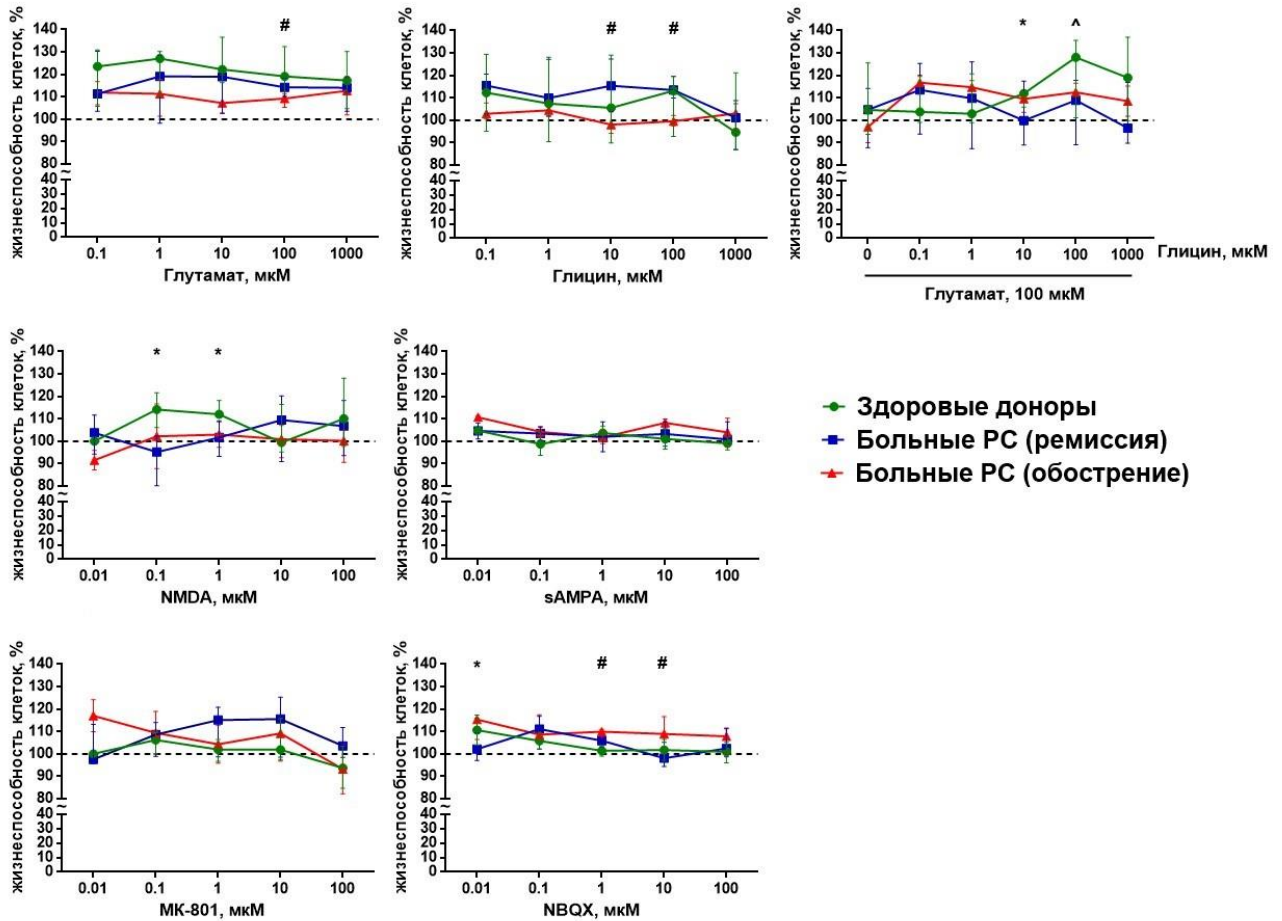


Рисунок 1. Влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров ( $n=5$ ), больных РС в стадии ремиссии ( $n=5$ ) и больных РС в стадии обострения ( $n=5$ ). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью  $U$ -критерия Манна–Уитни. (\* –  $p < 0.05$  между группами здоровых доноров и больных РС (ремиссия), ^ –  $p < 0.05$  между группами здоровых доноров и больных РС (обострение), # –  $p < 0.05$  между группами больных РС (ремиссия) и больных РС (обострение)).

На следующем этапе исследования была изучена роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции жизнеспособности клеток HUVES в условиях  $TNF\alpha$ -активации *in vitro* (рис. 2). При одновременном действии глутамата и глицина на неактивированные клетки HUVES отмечено повышение их жизнеспособности до 115.8 % [111.8; 118.2] ( $p < 0.05$ ).

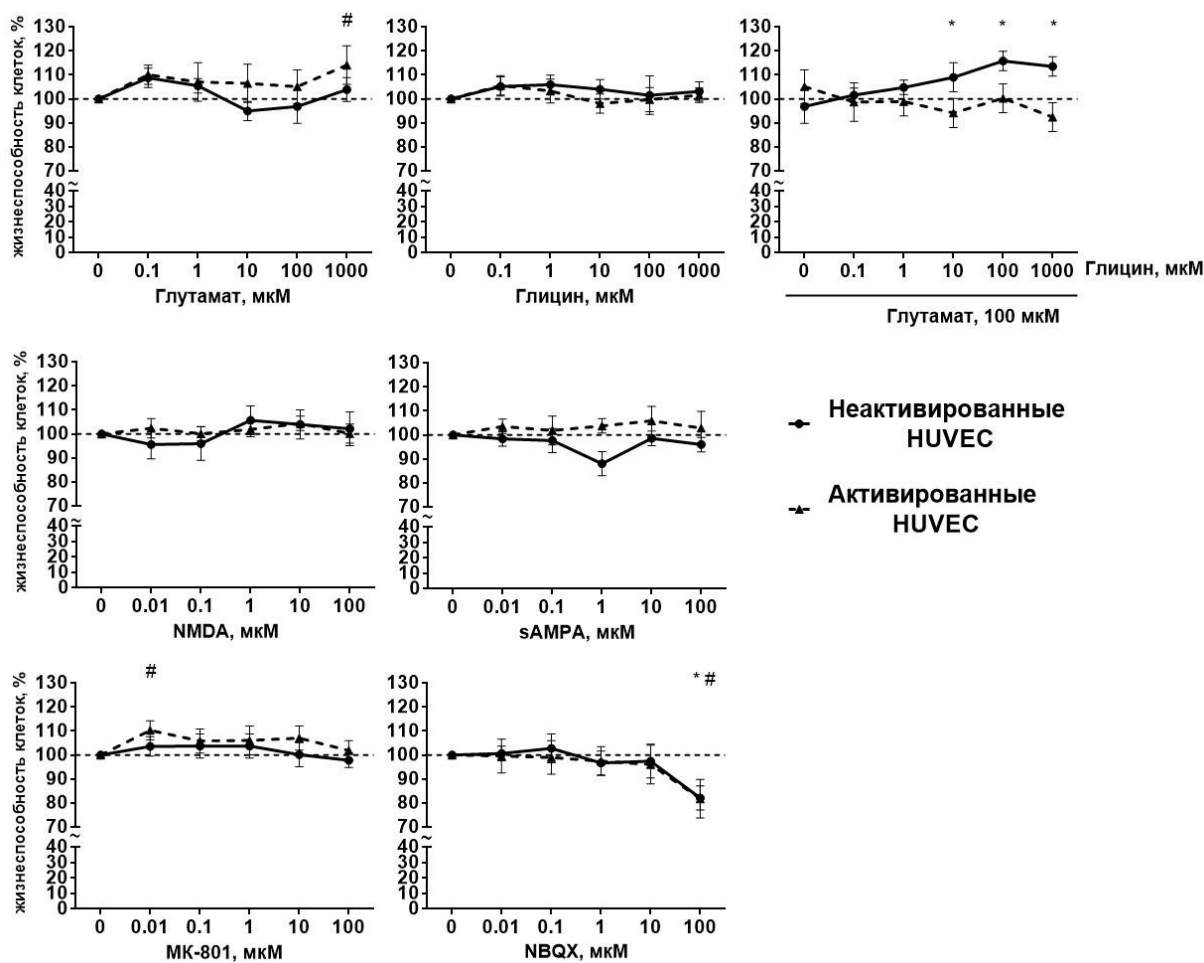


Рисунок 2. Влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность клеток HUVEC ( $n=3$ ). В качестве контроля использовали эндотелиоциты без добавления веществ. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью  $t$ -критерия Вилкоксона. (\* –  $p < 0.05$  между группой интактных клеток HUVEC относительно контроля, # –  $p < 0.05$  между группой активированных клеток HUVEC относительно контроля).

В модели нейровоспаления МК–801 в малых концентрациях вызывал повышение жизнеспособности эндотелиоцитов до 110.2 % [106.3; 114.2] ( $p < 0.05$ ). Блокада AMPA–рецепторов глутамата приводила к снижению жизнеспособности, как в состоянии покоя, так и в модели воспаления (до 82.1 % [78.2; 85.6] и 81.8 % [74.2; 88.7] соответственно при  $p < 0.05$ ), демонстрируя вовлеченность рецепторов данного подтипа в регуляцию жизнеспособности клеток HUVEC.

В настоящем исследовании *in vitro* проведен анализ оценки адгезии лимфоцитов периферической крови к эндотелиальным клеткам на фоне действия лигандов ионотропных рецепторов глутамата. С учетом стадии заболевания между исследуемыми группами выявлено, что на фоне глутамата, глицина, и их совместного действия наблюдалось снижение адгезии нестимулированных Т-лимфоцитов, более выраженное в группе больных РС в стадии ремиссии (рис. 3). Обнаружено, что стимуляция NMDA-рецепторов глутамата оказывала угнетающее действие на адгезию Т-клеток во всех исследуемых группах. Выявлено, что МК-801 оказывал более ингибирующее действие на адгезию Т-лимфоцитов среди больных РС в стадии обострения. Такие же эффекты обнаружены на фоне блокады AMPA-рецепторов глутамата.

В совокупности, полученные данные свидетельствуют о том, что лиганды ионотропных рецепторов глутамата оказывают преимущественно ингибирующее действие на адгезию иммунных клеток. Кроме того, обнаружены различия в ответе Т-клеток в зависимости от стадии заболевания – лимфоциты больных РС при обострении оказались более чувствительны к действию лигандов, а однонаправленные изменения, обнаруженные при селективной стимуляции и блокаде NMDAR и AMPAR, могут говорить, о модулирующей роли данных рецепторов в процессе адгезии.

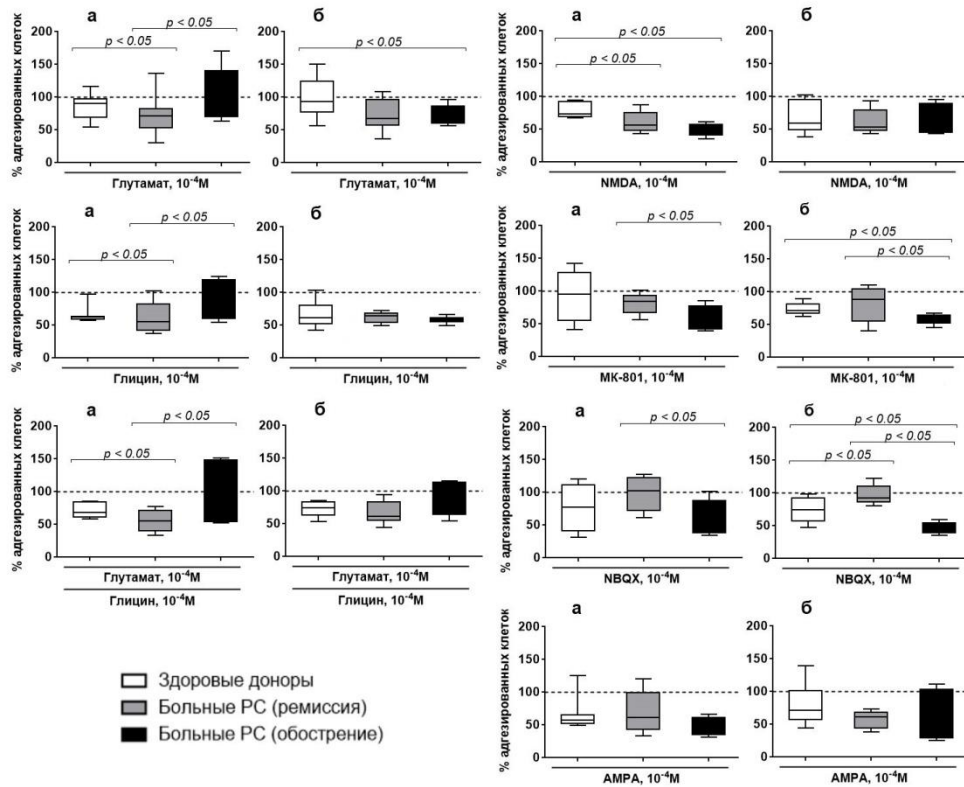


Рисунок 3. Сравнительный анализ влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезию нестимулированных (а) и антиген-стимулированных (б) периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров (n=5), больных РС в стадии ремиссии (n=5), больных РС в стадии обострения (n=5) к эндотелиальным клеткам HUVEC. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни.

При анализе субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови обнаружено достоверное повышение относительного содержания CD4<sup>+</sup> Т-клеток в группе больных РС по сравнению с группой здоровых доноров (55.9 % [50.4; 59.6] и 45.3 % [38.9; 53.8] при p=0.02). На фоне aCD3/aCD28-активации Т-лимфоцитов наблюдалась схожая картина (54.9 % [49.1; 59.0] и 43.7 % [34.1; 49.1] при p=0.004).

Выявлено снижение доли Th17 клеток в группе больных РС при ремиссии (4.8 % [4.0; 6.2] при p=0.009) и при обострении заболевания (6.2 % [5.0; 7.4] при p=0.008) по сравнению со здоровыми донорами (7.6 % [6.9; 12.9]) (рис. 4). На фоне активации

также наблюдалось снижение при ремиссии до 3.8 % [3.0; 4.9] при  $p=0.004$ , при обострении до 5.3 % [4.4; 7.0] при  $p=0.018$ . Как следует из графиков, содержание Th17 лимфоцитов увеличивается при обострении по сравнению с ремиссией заболевания ( $p=0.03$ ). Доля нестимулированных Th17.1 клеток в периферической крови больных РС при обострении (2.8 % [2.0; 4.4]) была достоверно ниже по сравнению с группами здоровых доноров (8.1 % [5.4; 14.5] при  $p=0.004$ ) и больных РС в стадии ремиссии (4.4 % [3.0; 4.8] при  $p=0.009$ ). На фоне aCD3/aCD28-активации Т-лимфоцитов наблюдались схожие изменения (снижение доли Th17.1 лимфоцитов при обострении (2.0 % [1.4; 3.4]) по сравнению с группами здоровых доноров (4.5 % [3.7; 7.3] при  $p=0.0015$ ) и больных РС в стадии ремиссии (2.5% [1.5; 3.5] при  $p=0.015$ ).

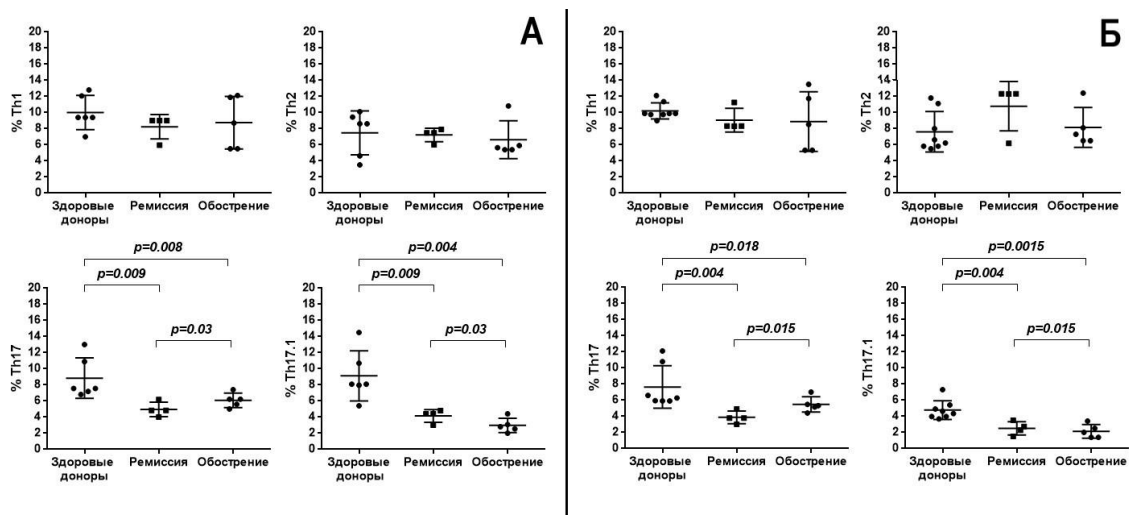


Рисунок 5. Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляций нестимулированных (А) и антиген-стимулированных (Б) периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ( $n=5$ ), больных РС в стадии ремиссии ( $n=5$ ), больных РС в стадии обострения ( $n=5$ ). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]) Достоверность различий оценивали с помощью  $U$ -критерия Манна-Уитни.

Корреляционный анализ выявил достоверную сильную положительную зависимость доли Th17 клеток и тяжести РС по шкале EDSS ( $r=0.76$ ,  $p < 0.05$ ), а также скорости прогрессирования заболевания ( $r=0.76$ ,  $p < 0.05$ ). Учитывая

полученные результаты и данные литературы можно предположить, что субпопуляция Th17 лимфоцитов может служить предиктором тяжести и прогрессирования РС.

В работе было исследовано влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 отдельными субпопуляциями неактивированных и aCD3/aCD28-активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток здоровых доноров и больных РС. При анализе влияния глутамата на экспрессию VLA-4 нестимулированными Th1 лимфоцитами выявлено снижение ее представленности во всех исследуемых группах (рис. 6), наибольшая выраженность наблюдалась среди больных РС в стадии обострения (до 94.7 % [92.3; 97.2] при  $p < 0.05$  по сравнению с группой условно здоровых доноров).

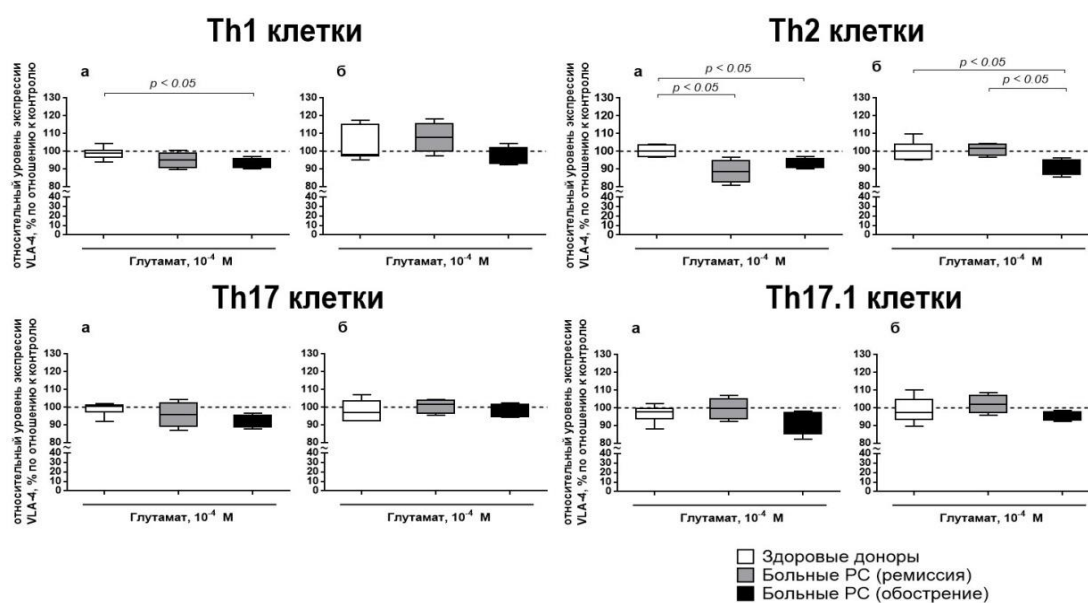


Рисунок 6. Сравнительный анализ влияния глутамата ( $10^{-4}$  M) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями нестимулированных (а) и антиген-стимулированных (б) периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ( $n=5$ ) и больных РС в стадии ремиссии ( $n=5$ ), больных РС в стадии обострения ( $n=5$ ). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью  $U$ -критерия Манна-Уитни.



Глутамат в нестимулированных Т–хелперах 2 типа больных РС, не зависимо от стадии заболевания, оказывал более негативное действие на экспрессию VLA–4, по сравнению со здоровыми донорами. Значимых различий во влиянии глутамата на экспрессию VLA–4 нестимулированными Th17 и Th17.1 клетками между исследуемыми группами не обнаружено.

Блокада NMDA–рецепторов сопровождалась снижением экспрессии молекулы адгезии VLA–4 на нестимулированных Th1 лимфоцитах во всех исследуемых группах (рис. 7).

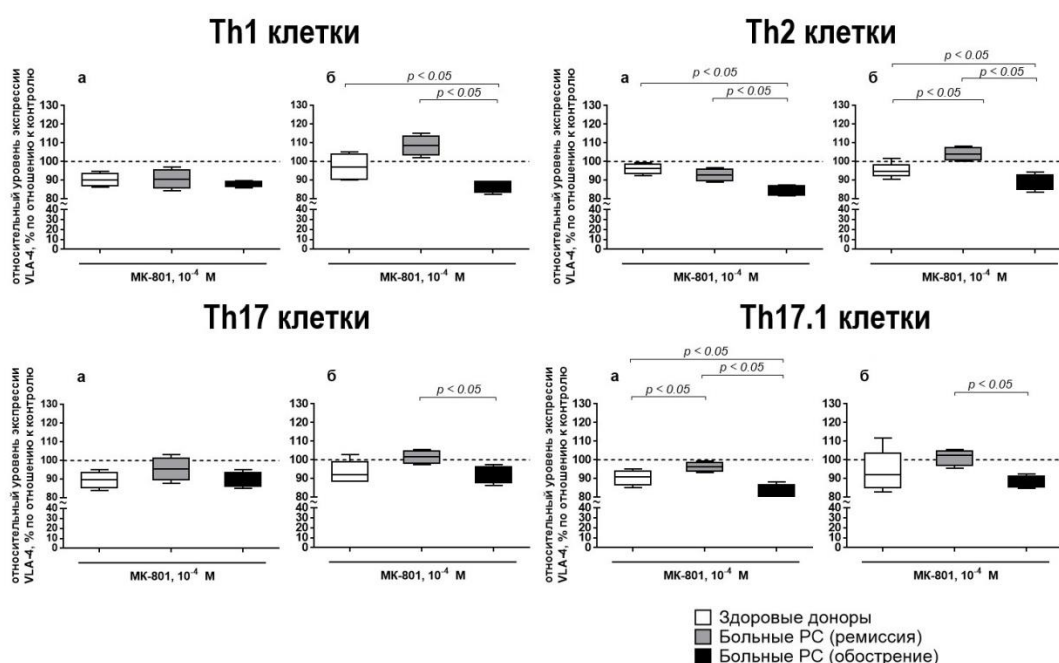


Рисунок 7. Сравнительный анализ влияния МК–801 ( $10^{-4}$  М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA–4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями нестимулированных (а) и антиген–стимулированных (б) периферических Т–лимфоцитов, полученных от здоровых доноров (n=5) и больных РС в стадии ремиссии (n=5), больных РС в стадии обострения (n=5). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U–критерия Манна–Уитни.

При aCD3/aCD28–активации отмечено повышение экспрессии VLA–4 на клетках больных РС в стадии ремиссии на фоне действия МК–801. Обнаружено

снижение поверхностной экспрессии VLA-4 нестимулированными Th2 лимфоцитами на фоне блокады NMDA-рецепторов во всех исследуемых группах, наибольшая выраженность наблюдалась среди больных РС в стадии обострения (до 84.7 % [81.4; 87.5] при  $p < 0.05$ ).

На фоне действия МК-801 выявлена тенденция к снижению экспрессии VLA-4 Th17 и Th17.1 клетками во всех исследуемых группах, наибольшая выраженность наблюдалась среди больных РС в стадии обострения (до 89.4 % [85.0; 95.0] и 81.2 % [72.4; 88.2] соответственно при  $p < 0.05$ ).

Блокада AMPA-рецепторов негативно влияла на экспрессию молекулы адгезии нестимулированными Th1 лимфоцитами во всех исследуемых группах, наибольшая выраженность отмечалась среди больных РС в стадии ремиссии (снижение до 83.0 % [82.0; 88.0] при  $p < 0.05$ ) (рис. 8). На фоне aCD3/aCD28-активации, наоборот, наблюдалось достоверно значимое повышение экспрессии VLA-4 в группе больных РС в стадии ремиссии (до 125.4 % [122.0; 127.1] при  $p < 0.05$ ).

Обнаружено снижение экспрессии VLA-4 нестимулированными Th2, Th17, Th17.1 клетками в исследуемых группах на фоне действия NBQX. Блокада AMPA-рецепторов aCD3/aCD28-активированных Th2, Th17, Th17.1 лимфоцитов больных РС в стадии ремиссии приводила к повышению экспрессии VLA-4.

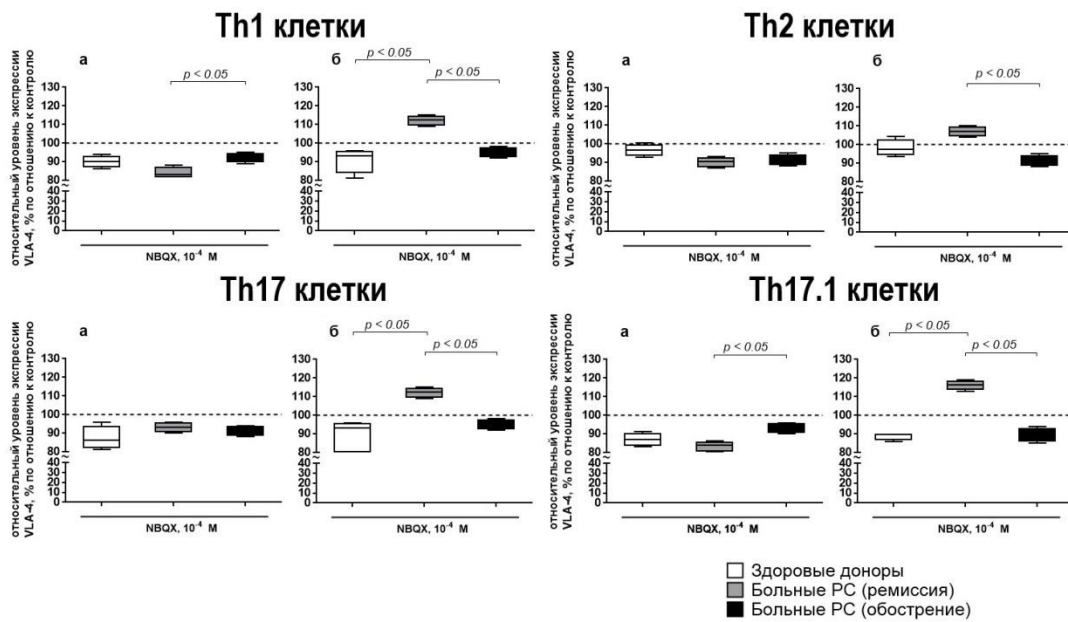


Рисунок 8. Сравнительный анализ влияния NBQX ( $10^{-4}$  М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями нестимулированных (а) и антиген-стимулированных (б) периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ( $n=5$ ) и больных РС в стадии ремиссии ( $n=5$ ), больных РС в стадии обострения ( $n=5$ ). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью  $U$ -критерия Манна-Уитни.

Следующим этапом исследования было изучение роли ионотропных рецепторов глутамата в регуляции экспрессии молекул адгезии (PECAM-1, VCAM-1) клетками HUVEC. В нашей работе не было выявлено влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на представленность молекулы PECAM-1.

На фоне активации TNF $\alpha$  отмечалось значительное увеличение экспрессии VCAM-1 в 14–15 раз. При инкубации эндотелиоцитов с глутаматом, глицином и при их совместном действии наблюдались тенденции к снижению экспрессии VCAM-1 (рис. 9).

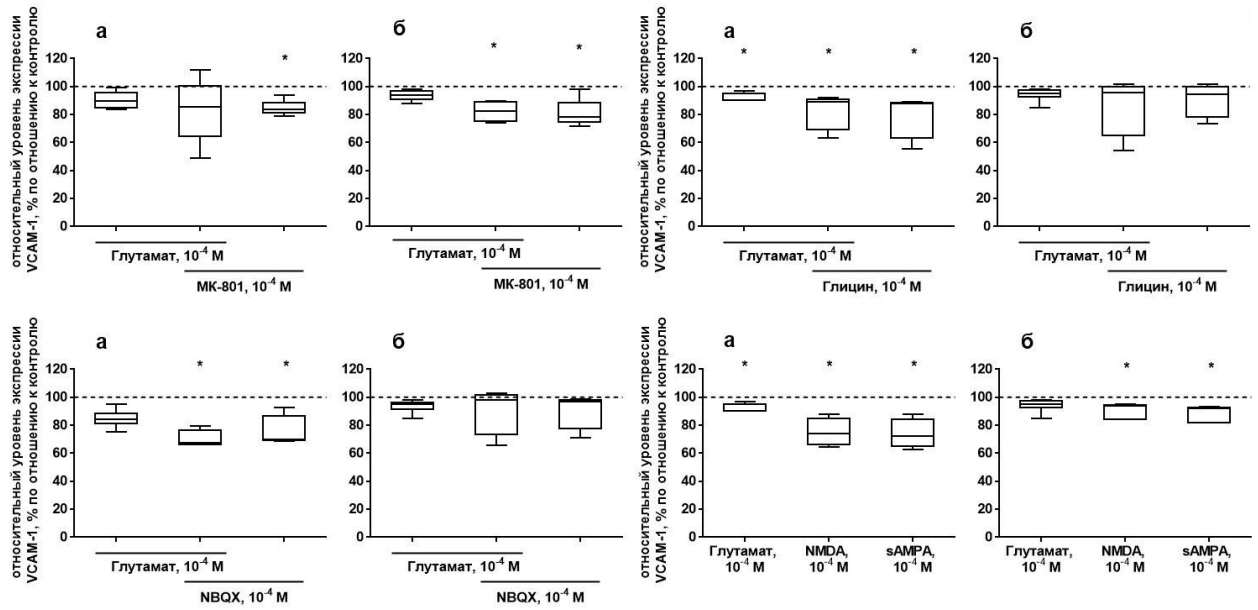


Рисунок 9. Влияние агонистов (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA) и антагонистов (МК–801, NBQX) ионотропных рецепторов глутамата на экспрессию молекулы адгезии VCAM–1 неактивированными (а) и TNF $\alpha$ –активированными (б) клетками HUVEC (n=3). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью *t*–критерия Вилкоксона. \*  $p < 0.05$  относительно контроля (клетки HUVEC без добавления веществ).

При стимуляции глутаматных рецепторов селективными агонистами NMDA и sAMPA представленность VCAM–1 также достоверно снижалась до 94.0 % [84.1; 95.2] и до 91.9 % [82.2; 93.4] соответственно ( $p < 0.05$ ). На фоне активации TNF $\alpha$  блокада NMDA–рецепторов вызывала достоверное снижение экспрессии молекулы VCAM–1 до 78.3 % [71.5; 98.1] ( $p < 0.05$ ). Данные были подтверждены и при последующем внесении к клеткам глутамата – представленность также достоверно снижалась до 82.6 % [73.9; 89.8] ( $p < 0.05$ ). При блокаде AMPA–рецепторов статистически значимых изменений в уровне экспрессии обнаружено не было.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было проведено исследование функциональной значимости ионотропных рецепторов глутамата NMDA и AMPA подтипов в

реализации лимфоцитарно–эндотелиального взаимодействия в условиях *in vitro* моделирования ключевых этапов патогенеза РС.

Обнаружены изменения жизнеспособности лимфоцитов периферической крови на фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата. У больных РС по сравнению со здоровыми лицами установлены различия в ответе, в частности, клетки больных РС в стадии обострения менее чувствительны к действию лигандов NMDA– и AMPA–рецепторов.

Выявлены изменения жизнеспособности клеток HUVEC на фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата. Показано, что блокада AMPA–рецепторов глутамата приводит к снижению жизнеспособности эндотелиоцитов, как в состоянии покоя, так и в модели воспаления *in vitro*. На фоне стимуляции глутаматом и глицином неактивированных клеток HUVEC выявлено повышение их жизнеспособности.

Обнаружен ингибирующий эффект агонистов глутаматных рецепторов на адгезию лимфоцитов периферической крови к клеткам HUVEC. На фоне антигенной стимуляции Т–лимфоцитов выявлено усиление их адгезионной активности в группе здоровых доноров на фоне действия глутамата. Показано, что блокада ионотропных рецепторов глутамата в группе больных РС в стадии обострения приводит к более выраженному угнетающему эффекту на адгезию нестимулированных и стимулированных Т–лимфоцитов.

Установлено увеличение относительного содержания CD4<sup>+</sup> Т–лимфоцитов периферической крови у больных РС, независимо от стадии заболевания. Не выявлено значимых различий процентного содержания Th1 и Th2 клеток между здоровыми донорами и пациентами с РС. Показано, что доля Th17 и Th17.1 лимфоцитов уменьшается при обострении заболевания. Относительное содержание Th17 клеток периферической крови больных РС коррелирует с тяжестью болезни по шкале EDSS и со скоростью ее прогрессирования.

Выявлены изменения экспрессии молекулы адгезии VLA–4 периферическими CD4<sup>+</sup> Т–лимфоцитами здоровых доноров и больных РС на фоне действия антагонистов ионотропных рецепторов глутамата. Показано, что высокопатогенные

Th17.1 клетки обладают повышенной экспрессией VLA-4. Обнаружено снижение представленности VLA-4 во всех исследованных группах на фоне блокады NMDA-рецепторов. Показано, что при блокаде AMPA-рецепторов экспрессия уменьшалась в провоспалительных фенотипах T-хелперов. Эффекты лигандов ионотропных рецепторов глутамата более выражены в группе больных РС в стадии обострения.

На фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата не обнаружены изменения экспрессии молекулы адгезии PECAM-1 клетками HUVEC. Блокада NMDA-рецепторов сопровождалась снижением повышенной поверхностной экспрессии VCAM-1 на фоне активации TNF $\alpha$ .

Таким образом, ионотропные рецепторы глутамата участвуют в регуляции жизнеспособности лимфоцитов периферической крови больных РС, эндотелиальных клеток HUVEC, также адгезионной активности иммунных клеток и эндотелиоцитов, в том числе, за счет изменения экспрессии молекул адгезии. Полученные сведения о влиянии ионотропных рецепторов глутамата на лейкоцитарно-эндотелиальное взаимодействие способствуют углублению знаний о патогенетических механизмах межклеточных коммуникаций при РС. Выявленные особенности регуляции ионотропными рецепторами глутамата процессов жизнеспособности и адгезии иммунных клеток указывают на их важную роль в иммунопатогенезе заболевания, и в перспективе позволят рассматривать данные рецепторы в качестве потенциальной мишени для фармакотерапии.

**Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:**

1. **Тухватуллин, А.В.**, Клинико-эпидемиологическая характеристика рассеянного склероза у студентов в Республике Башкортостан / А.В. Тухватуллин, У.Ш. Кузьмина, Н.Ф. Утягулова, Р.Ф. Талисов, В.А. Вахитов, К.З. Бахтиярова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. — 2021. — № 13(1S). — С. 15–20.

2. Кузьмина, У.Ш., Рассеянный склероз с эпизодом шизофреноподобного синдрома / У.Ш. Кузьмина, **А.В. Тухватуллин**, К.З. Бахтиярова, М.А. Кутлубаев, О.В. Лютов, Т.Р. Гизатуллин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.

Корсакова. — 2023. — № 123(4). — С. 120–124.

3. Кузьмина, У.Ш., Клинический случай COVID–ассоциированной энцефалопатии у пациента с рассеянным склерозом / У.Ш. Кузьмина, **А.В. Тухватуллин**, О.В. Лютов, И.Д. Талипова, Э.Н. Закирова, А.Р. Рахматуллин, М.А. Кутлубаев, К.З. Бахтиярова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2024. — № 124(4). — С. 159–163.

#### **Статьи в других журналах и материалах конференций:**

1. Кузьмина У.Ш., **Тухватуллин А.В.**, Бахтиярова К.З., Вахитова Ю.В. Эндогенные лиганды ионотропных глутаматных рецепторов модулируют лимфоцитарно–эндотелиальное взаимодействие при рассеянном склерозе // III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов ♦ VII съезд биохимиков России ♦ X Российский симпозиум «Белки и пептиды» ♦ VII съезд физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021). Научные труды / Под редакцией А.Г. Габиева и М.А. Островского. – Том 2. – М.: Издательство «Перо», 2021. – С. 221.

2. **Тухватуллин А.В.**, Кузьмина У.Ш., Бахтиярова К.З., Вахитова Ю.В. Влияние агонистов и антагонистов глутаматных рецепторов на жизнеспособность мононуклеаров периферической крови больных рассеянным склерозом // Болезни мозга: проблемы и решения / под редакцией Е.И. Гусева, А.Б. Гехт. – М.: ООО «Сам Полиграфист», 2021. – С. 391.

3. **Тухватуллин А.В.**, Кузьмина У.Ш., Бахтиярова К.З., Вахитова Ю.В. Влияние агонистов и антагонистов глутаматных рецепторов на жизнеспособность эндотелиальных клеток HUVEC на фоне активации провоспалительным цитокином TNF $\alpha$  // Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства. Тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60–летию Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН. 30 ноября – 1 декабря 2022 г. Уфа: ИБГ УФИЦ РАН, 2022. 72 с.

4. **Тухватуллин А.В.**, Кузьмина У.Ш., Вахитов В.А. «Участие глутаматных рецепторов AMPA подтипа в регуляции адгезионной функции эндотелиоцитов». I

Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа–конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты», посвященная 120–летию со дня рождения академика Б.А. Арбузова (Казань, 2023): тезисы докладов. – Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, 2023. – С. 114.

5. **Тухватуллин А.В.**, Кузьмина У.Ш., Бахтиярова К.З., Вахитов В.А. Участие глутаматных NMDA–рецепторов в регуляции экспрессии молекулы адгезии VCAM–1 эндотелиальными клетками в условиях модели воспаления *in vitro*. Тезисы 5–го Конгресса по рассеянному склерозу и другим демиелинизирующим заболеваниям (Уфа, 28—30 сентября 2023 г.). Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. 2023;123(7–2):136–180. <https://doi.org/10.17116/jnevro2023123072136>

6. Бахтиярова К.З., Лютов О.В., Талипова И.Д., **Тухватуллин А.В.**, Кутлубаев М.А. Быстро прогрессирующий рассеянный склероз. Тезисы 5–го Конгресса по рассеянному склерозу и другим демиелинизирующим заболеваниям (Уфа, 28—30 сентября 2023 г.). Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. 2023;123(7–2):136–180. <https://doi.org/10.17116/jnevro2023123072136>

7. Кузьмина У.Ш., **Тухватуллин А.В.**, Бахтиярова К.З., Вахитов В.А. Важные аспекты в изучении роли нейромедиаторов в функционировании Т–лимфоцитов при рассеянном склерозе. Тезисы 5–го Конгресса по рассеянному склерозу и другим демиелинизирующим заболеваниям (Уфа, 28—30 сентября 2023 г.). Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. 2023;123(7–2):136–180. <https://doi.org/10.17116/jnevro2023123072136>

8. Кузьмина У.Ш., **Тухватуллин А.В.**, Вахитов В.А., Бахтиярова К.З. Клиническое наблюдение COVID–энцефалопатии на фоне рассеянного склероза // Болезни мозга: современные технологии и перспективы развития/ под редакцией Е.И. Гусева, А.Б. Гехт, М.: ООО «Сам Полиграфист», 2023, – С. 222–223.