

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**

1.5.4. Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Кузьмина Ульяна Шафкатовна

Уфа – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

	стр
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. УЧАСТИЕ ГЛУТАМАТА В ЛЕЙКОЦИТАРНО– ЭНДОТЕЛИАЛЬНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	15
1.1. Этиопатогенез рассеянного склероза.....	15
1.2. Особенности гематоэнцефалического барьера при рассеянном склерозе	21
1.3. Характеристика отдельных субпопуляций Т–хелперов периферической крови.....	30
1.4. Трансэндотелиальная миграция лимфоцитов через ГЭБ и участие молекул адгезии	37
1.5. Глутамат и рассеянный склероз	47
1.5.1. Общие сведения	47
1.5.2. Глутамат и рассеянный склероз	49
1.5.3. Терапевтические подходы при РС	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	60
2.1. Материалы исследования.....	60
2.1.1. Объект исследования.....	60
2.1.2. Перечень использованных реактивов.....	60
2.1.3. Перечень использованных материалов.....	62
2.2. Методы исследований.....	62
2.2.1. Забор крови/биоматериала.....	62
2.2.2. Выделение и культивирование лимфоцитов периферической крови ...	62
2.2.3. Определение жизнеспособности лимфоцитов периферической крови.....	63
2.2.4. Иммунофенотипирование лимфоцитов	64
2.2.5. Определение уровня поверхностной экспрессии молекулы адгезии VLA–4 Т–клетками	65
2.2.6. Выделение и культивирование клеток HUVEC.....	66
2.2.7. Определение жизнеспособности клеток HUVEC	67
2.2.8. Оценка уровня поверхностной экспрессии молекул адгезии, локализованных на эндотелиальных клетках HUVEC, в условиях моделирования повреждения <i>in vitro</i>	67
2.2.9. Анализ адгезии лимфоцитов к клеткам HUVEC	68
2.2.10. Статистическая обработка полученных результатов	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	71
3.1. Клинико–эпидемиологическая характеристика доноров	71
3.2. Влияние ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови.....	77

3.3.	Роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции жизнеспособности клеток HUVEC на фоне активации провоспалительным цитокином TNF α	89
3.4.	Влияние ионотропных рецепторов глутамата на адгезионную активности Т-клеток, полученных от здоровых лиц и больных рассеянным склерозом, к эндотелиальным клеткам <i>in vitro</i>	96
3.5.	Анализ субпопуляционного состава CD4 ⁺ Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных рассеянным склерозом.....	109
3.6.	Влияние ионотропных рецепторов глутамата на регуляцию экспрессии молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4 ⁺ Т-лимфоцитах, полученных от здоровых лиц и больных рассеянным склерозом.....	119
3.6.1.	Анализ экспрессии молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4 ⁺ Т-лимфоцитах, полученных от здоровых лиц и больных рассеянным склерозом.....	120
3.6.2.	Влияние ионотропных рецепторов глутамата на регуляцию экспрессии молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4 ⁺ Т-лимфоцитах, полученных от здоровых доноров.....	123
3.6.3.	Влияние ионотропных рецепторов глутамата на регуляцию экспрессии молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4 ⁺ Т-лимфоцитах, полученных от больных РС.....	126
3.7.	Роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции экспрессии молекул адгезии, локализованных на клетках HUVEC (PECAM-1, VCAM-1) в условиях TNF α -активации.....	138
3.7.1.	Роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции экспрессии молекулы адгезии PECAM-1 клетками HUVEC в условиях TNF α -активации.....	138
3.7.2.	Роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции экспрессии молекулы адгезии VCAM-1 клетками HUVEC в условиях TNF α -активации.....	142
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	149
	ВЫВОДЫ.....	154
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	155

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- АПК – антигенпрезентирующие клетки
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВЭБ – вирус Эпштейн–Барра
- ГА – глатирамера ацетат
- ГКГС – главный комплекс гистосовместимости
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ДК – дендритные клетки
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИФН- β – интерферон-бета
- САМК II – кальмодулин-зависимая протеинкиназа II
- КИС – клинически изолированный синдром
- МКА – моноклональные антитела
- ММП – матриксные металлопротеиназы
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- НВЕ – нейроваскулярная единица
- ОБМ – основной белок миелина
- ПИТРС – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза
- ППРС – первично-прогрессирующий рассеянный склероз
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РС – рассеянный склероз
- РРС – ремиттирующий рассеянный склероз
- САП – субарахноидальное пространство
- СМЖ – спинномозговая жидкость
- ТЭМ – трансэндотелиальная миграция
- ФМА – форбол-миристан-ацетат

ЦНС – центральная нервная система

ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

СО – угарный газ

DAMP – молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями

ESL-1 – лиганд E-селектина 1

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека

IgSF – суперсемейство иммуноглобулинов

IL-17 – интерлейкин-17

IL-12 – интерлейкин-12

IL-2 – интерлейкин-2

IL-4 – интерлейкин 4

IL-6 – интерлейкин-6

INF γ – интерферон гамма

MIDAS – металл-ионзависимый сайт адгезии

NMDA – N-метил-D-аспартат

NO – оксид азота

PBMC – мононуклеары периферической крови

PBS – натрий-фосфатный буфер

PSGL 1 – гликопротеиновый лиганд P-селектина 1

S1PR – сфингозин-1-фосфатные рецепторы

TCR – T-клеточный комплекс

Th – T-хелперы

TNF α – фактор некроза опухоли альфа

Treg – T-регуляторные клетки

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы.

Рассеянный склероз (РС) – это хроническое прогрессирующее демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС), в основе которого лежат аутоиммунные и нейродегенеративные изменения, приводящие к множественному поражению головного и спинного мозга, характеризующееся разнообразной неврологической симптоматикой, следствием которого является инвалидизация пациентов и значительное снижение качества жизни (Гусев и др., 2009). РС обычно выявляется в возрасте от 20 до 40 лет. В последние десятилетия отмечается рост заболеваемости РС среди подростков и детей. Психоэмоциональные факторы, связанные с учебой, способны отягощать развитие и течение заболевания. Глобальная распространенность РС оценивается в 2.5–3 миллиона человек, и, согласно данным Минздрава РФ, на 2022 год распространенность в России колеблется в разных регионах от 36 до 78.5 случаев на 100 тыс. населения. За последние годы наблюдается устойчивая тенденция к увеличению заболеваемости. В последнее время отмечается тенденция к увеличению количества женщин среди больных РС (3–4:1). На начальных стадиях РС наблюдается преимущественно ремиттирующее течение, сопровождаемое периодами обострений и ремиссии. В 10 % случаях выявляется первично–прогрессирующий РС (ППРС), который может сочетаться с активностью по данным магнитно–резонансной томографии (МРТ). Вторично–прогрессирующее течение возникает после периода ремиттирующего РС (РРС) и характеризуется наличием подтвержденного прогрессирования инвалидизации, независимого от обострений (Thompson et al., 2017). Клиническая картина заболевания разнообразна. В основном наблюдаются двигательные, мозжечковые, стволовые нарушения, ретробульбарный неврит, в редких случаях психотические нарушения. В последние годы неврологические осложнения на фоне новой коронавирусной инфекции у больных РС осложняют диагностику и назначение терапии (Кузьмина и др., 2024).

Этиология заболевания до конца неизвестна. Считается, что наследственная предрасположенность к РС реализуется при участии внешних факторов, среди которых рассматриваются вирусные инфекции (особенно ретровирусы и вирус Эпштейн–Барра (ВЭБ)), недостаток витамина D, курение, изменения микробиома кишечника, урбанизация и др. Взаимодействие этих факторов приводит к хроническим нарушениям регуляции иммунного гомеостаза, таким как активация транскрипции генов, прямое цитотоксическое повреждение, митохондриальная дисфункция и др. (Вахитов и др., 2020).

При РС наблюдаются изменения как со стороны Т–клеточного, так и гуморального иммунитета (Бойко и др., 2020). Считается, что нарушение иммунологической толерантности и миграция аутореактивных иммунных клеток через ГЭБ в ЦНС является основной гипотезой иммунопатогенеза РС (теория outside–out). Начальным этапом является активация периферических аутореактивных Т–лимфоцитов. Далее наивные Т–клетки дифференцируются в субпопуляции, в основном, Т–хелперы 1 типа (Th1), 17 типа (Th17), Th1–подобные 17 клетки (Th17.1) и мигрируют через ГЭБ в паренхиму ЦНС, где за счет презентации макрофагами антигенов реактивируются, пролиферируют и начинают вырабатывать провоспалительные цитокины (интерферон–гамма (IFN γ), интерлейкин–17 (IL–17)). Это, в свою очередь, вызывает целый каскад воспалительных реакций и приводит к местному повреждающему действию на клетки нервной системы. Существует также гипотеза inside–out, согласно которой имеется нарушение внутри ЦНС, вызывающее экспрессию молекул повреждения DAMP (damage associated molecular pattern), приводя к дестабилизации гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и к местному воспалительному процессу (Tsunoda et al., 2002).

Важная роль в патогенезе РС отводится изменениям со стороны ГЭБ. Процесс взаимодействия иммунных клеток с эндотелиоцитами многоэтапный, и подвержен многочисленным эндогенным и экзогенным факторам, таким как цитокины, хемокины, нейромедиаторы и др. ГЭБ представляет собой высокоселективный интерфейс, обеспечивающий иммунопривелигированный

статус ЦНС. Большинство препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза (ПИТРС), способно влиять на трансэндотелиальную миграцию иммунных клеток непосредственно или косвенно (Якушина и др., 2024; Elsbernd et al., 2021). Лейкоциты взаимодействуют с эндотелиоцитами посредством молекул адгезии, локализованных на их поверхности и представляющих собой мембранные белки, обеспечивающих прочный контакт между клетками. Выделяют четыре основных семейства этих соединений – интегрины, кадгерины, селектины и суперсемейство иммуноглобулинов (IgSF), среди которых функции первых трех групп зависимы от ионов кальция (Hu et. al., 2023). Межрецепторное взаимодействие способствует фиксации Т-хелперов на эндотелии и последующему проникновению через ГЭБ. Изменение экспрессии молекул адгезии может повлиять на иммунную инфильтрацию ЦНС.

В настоящее время имеются лишь отдельные работы, посвященные изучению роли рецепторов глутамата, экспрессированных на клетках иммунной системы и эндотелиоцитах, в процессах адгезии и миграции лимфоцитов через ГЭБ. По данным литературы известно, что при РС нарушается обмен нейромедиаторов, в частности, глутамата. Глутаматная эксайтотоксичность представляет собой повреждающий механизм, приводящий к гибели нейронов за счет увеличения его внеклеточной концентрации в ЦНС (Kostic et al., 2013; Lazo–Gomez et al., 2019). Как известно, глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером, обеспечивающим синаптическую передачу. Однако его высокие концентрации могут негативно влиять на астроциты, микроглию, эндотелиоциты ГЭБ, иммунные клетки, а также их взаимодействие. Свои эффекты глутамат осуществляет за счет экспрессии рецепторов на мембране клеток. На данный момент известно 2 вида глутаматных рецепторов: ионотропные (iGluR) и метаботропные (mGluR), и в литературе имеется ряд исследований, подтверждающих их наличие на иммунокомпетентных клетках (Зайнуллина, 2013). В данном контексте глутамат можно рассматривать как нейроиммуномедиатор, регулирующий взаимодействие нервной и иммунной систем. По данным литературы имеется достаточно сведений о влиянии глутамата

на пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и миграцию иммунных клеток (Ganor et al., 2003; Lombardi et al., 2004; Зайнуллина и др., 2011). Показано наличие функционально активных рецепторов глутамата на эндотелиальных клетках (Sharp et al., 2003). Частично установлено их роль в регуляции ГЭБ (Chen et al., 2016). Однако молекулярные и клеточные механизмы участия глутамата и его рецепторов в лейкоцитарно–эндотелиальном взаимодействии 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 глутаматана жизнеспособность лимфоцитов, полученных от здоровых лиц и больных РС;
2. Оценить эффекты агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность клеток HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) на фоне активации провоспалительным цитокином TNF α ;
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⁺ 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 (very late antigen–4), локализованной на CD4⁺ Т–лимфоцитах, полученных от здоровых лиц и больных РС;
6. Провести анализ изменения экспрессии молекул адгезии, локализованных на клетках HUVEC (PECAM–1 (platelet endothelial cell adhesion

molecule 1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1)), под действием агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата в условиях TNF α -активации.

Научная новизна.

Данная научно-исследовательская работа раскрывает молекулярные механизмы влияния ионотропных рецепторов глутамата на лейкоцитарно-эндотелиальное взаимодействие при РС. Продемонстрированы непосредственные эффекты лигандов в регуляции функций иммунных клеток и эндотелиоцитов HUVEC в модели *in vitro*. Обнаружены изменения жизнеспособности лимфоцитов периферической крови 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.

Также выявлены изменения жизнеспособности клеток HUVEC на фоне действия глутамата, глицина и антагониста NBQX. Блокада AMPA-рецепторов глутамата приводит к снижению жизнеспособности эндотелиоцитов в модели воспаления *in vitro*.

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. Выявлено усиление адгезионной активности антиген-стимулированных T-лимфоцитов среди здоровых доноров на фоне действия глутамата. Впервые показано, что блокада NMDA- и AMPA-рецепторов (NMDAR и AMPAR) глутамата в группе больных РС в стадии обострения приводит к более выраженному ингибирующему эффекту на адгезионную активность T-клеток. Выявлено изменение экспрессии молекулы адгезии VLA-4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями T-лимфоцитов среди здоровых доноров и больных РС на фоне антагонистов ионотропных рецепторов глутамата. Установлено, что высокопатогенные Th17.1 клетки экспрессируют повышенные уровни VLA-4. Показано, что блокада NMDA-рецепторов сопровождается снижением экспрессии VLA-4 T-хелперами 1, 2, 17 и 17.1 типов, тогда как на фоне блокады AMPA-рецепторов экспрессия

уменьшалась провоспалительными фенотипами Т-клеток. Эффекты лигандовионотропных рецепторов глутамата более выражены в группе больных РС в стадии обострения.

Проведен анализ субпопуляционного состава CD4⁺ Т-лимфоцитов периферической крови. Выявлено их повышенное содержание среди больных РС по сравнению со здоровыми донорами. Установлено, что доля высокопатогенных субпопуляций Th17 и Th17.1 клеток уменьшается при обострении заболевания, что вероятно, связано с их усиленной миграцией в ЦНС. Не обнаружено значимых различий в уровнях Th1 и Th2 лимфоцитов между здоровыми донорами и больными РС. Относительное содержание Th17 клеток периферической крови больных РС коррелирует с тяжестью заболевания по шкале EDSS (expanded disability status scale) и со скоростью прогрессирования.

Проведен анализ экспрессии молекул адгезии PECAM-1 и VCAM-1 клетками HUVEC на фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата, в ходе которого не обнаружено изменений в представленности PECAM-1. Выявлено снижение поверхностной экспрессии молекулы адгезии VCAM-1 эндотелиоцитами HUVEC в модели воспаления *in vitro* на фоне блокады NMDA-рецепторов антагонистом МК-801, что подтверждает защитные свойства данной группы веществ при дисфункции ГЭБ.

Научно-практическая значимость.

Полученные в ходе исследования 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 NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата на адгезию лимфоцитов к эндотелию сосудов ГЭБ, который препятствует их миграции в очаги нейровоспаления. Эти данные отрывают перспективы для возможного использования лигандов в качестве фармакомишени для патогенетического лечения и восстановления эндотелиальной дисфункции при РС. Кроме того, выявлены предполагаемые предикторы для оценки прогрессирования заболевания, предсказания тяжести его развития и течения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Стимуляция ионотропных рецепторов глутамата, экспрессируемых на лимфоцитах периферической крови, вызывает повышение их жизнеспособности, однако у пациентов с РС клетки оказались менее чувствительны к действию лигандов по сравнению со здоровыми донорами.
2. Ионотропные рецепторы глутамата, экспрессируемые на эндотелиальных клетках HUVEC, принимают участие в регуляции их жизнеспособности: при стимуляции глутаматом отмечается повышение жизнеспособности, при блокаде AMPA–рецепторов, наоборот, снижение.
3. Лиганды ионотропных рецепторов глутамата оказывают негативное действие на адгезию лимфоцитов периферической крови к клеткам HUVEC. У больных РС в стадии обострения данные эффекты более выражены по сравнению со здоровыми лицами.
4. Субпопуляционный состав CD4⁺ Т–лимфоцитов периферической крови больных РС в стадии обострения выявил уменьшение доли Th17 и Th17.1 клеток. Относительное содержание Th17 лимфоцитов в периферической крови может служить предиктором тяжести и прогрессирования РС.
5. Блокада ионотропных рецепторов глутамата вызывает преимущественно ингибирующее действие на экспрессию молекулы адгезии VLA–4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями периферических Т–лимфоцитов, наибольшая выраженность наблюдается среди больных РС в стадии обострения.
6. Блокада NMDA–рецепторов вызывает снижение экспрессии молекулы адгезии VCAM–1, локализованной на клетках HUVEC, тем самым оказывая негативный эффект на адгезию лимфоцитов периферической крови к эндотелиальному монослою.

Личное участие автора.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех этапах диссертационного исследования: углубленном анализе отечественной и зарубежной научной литературы, выборе темы работы, определении ее цели, постановке и решении задач, выборе объекта и предмета исследования.

Экспериментальная часть выполнена лично автором, и заключалась в сборе материала, анкетировании, выделении и культивировании клеточных линий, постановке опытов с применением биохимических и иммунологических методов исследования, проточной цитофлуометрии. При участии соискателя проведены анализ и интерпретации полученных данных, их систематизация, статистическая обработка с описанием, оформлением рукописи диссертации, основных публикаций по выполненной работе. Разработанные автором теоретические положения и практические рекомендации являются результатом самостоятельного исследования.

Апробация работы.

Результаты диссертационной 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); Всероссийской научно–практической конференции «Новые направления диагностики и терапии демиелинизирующих заболеваний» (г. Ярославль, 2024).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 6 статей в журнале из перечня ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа включает введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2), результаты исследования и обсуждение (глава 3), заключение, выводы. Список литературы содержит 304 наименования, в том числе 32 работы отечественных и 272 иностранных авторов. Работа изложена на 193 страницах и иллюстрирована 11 таблицами, 29 рисунками.

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность и признательность своему научному руководителю к.б.н. Кузьминой Ульяне Шафкатовне и профессору, д.м.н. Бахтияровой Кларе Закиевне за полученный опыт, переданный в процессе научных исследований, за помощь в проведении экспериментальной работы, за наставничество.

ГЛАВА 1. УЧАСТИЕ ГЛУТАМАТА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Этиопатогенез рассеянного склероза

РС является многофакторным заболеванием, при котором генетическая предрасположенность реализуется под действием фактором окружающей среды. Эти агенты способны запускать каскад иммунных реакций, который в конечном итоге приводит к дисфункции и гибели нейронов, сопровождающейся их демиелинизацией. К факторам окружающей среды относят вирусные и бактериальные агенты (вирус Эпштейна–Барра, вирус герпеса человека 6 типа (Баранова и др., 2024), микоплазменная инфекция (Fujinami et al., 2006), а также курение (O'Gorman et al., 2014), дефицит витаминов, диета (Bäärnhielm et al., 2014) и воздействие УФ–излучения (Sloka et al., 2011).

Выявлен повышенный риск развития РС после перенесенного инфекционного мононуклеоза (Handel et al., 2010). Высокий титр антител и их аффинность к ВЭБ может ассоциироваться с возникновением заболевания в детском возрасте. Данные о механизмах, посредством, которых вирус увеличивает риск развития РС, до конца неясны. Молекулярная мимикрия считается основной теорией иммунопатогенеза заболевания. (Guan et al., 2019). Также полагается, что иммортализация и/или трансформация В–клеток, индуцированная ВЭБ, играет важную роль в развитии болезни. Вирус герпеса 6 типа обнаруживается в очагах демиелинизации, а высокие титры антител к нему выявляются у больных РС. К вероятным патогенам также относят хламидии, микоплазмы, вирус кори, ретровирусы и др. Иммунные клетки могут активироваться инфекционными агентами, содержащими ядерный антиген, который структурно гомологичен компонентам миелиновой оболочки (основной белок миелина (ОБМ) и миелин–ассоциированный гликопротеин). Это может привести к демиелинизации.

Существует все больше доказательств, указывающих на значительную роль курения в развитии РС. Ключевыми факторами, связывающими эти два явления, являются оксид азота (NO) и угарный газ (CO), образующиеся в процессе курения. Эти газы запускают каскад патологических процессов, приводящих к повреждению нервной системы. Heydarpour и соавторы подробно описали этот механизм, подчеркивая разрушительное воздействие курения на миелиновую оболочку нервных волокон (Heydarpour et al., 2018).

Оксид азота, хоть и является важным нейротрансмиттером в физиологических концентрациях, в избытке становится токсичным. Он способен прямо повреждать нейроны и олигодендроциты – клетки, образующие миелиновую оболочку. Исследования Silva (2024) и Ghasemi (2017) подтверждают эту токсичность, демонстрируя, как высокие концентрации NO, образующиеся при курении, приводят к нарушению функционирования этих клеток (Silva et al., 2024; Ghasemi et al., 2017). Механизмы повреждения включают перекисное окисление липидов. Помимо этого, NO повреждает митохондрии, что приводит к апоптозу олигодендроцитов. Результат – дегенерация аксонов и демиелинизация, характерные признаки РС. Важно отметить, что повреждение миелиновой оболочки не ограничивается непосредственным токсическим действием NO. Нарушение целостности миелиновой оболочки также происходит из-за воспалительной реакции, которая запускается в ответ на повреждения, нанесенные NO.

CO обладает высоким сродством к гемоглобину, в несколько раз превосходящим сродство кислорода. Это приводит к снижению уровня кислорода в крови и тканях, что особенно опасно для нейронов, которые крайне чувствительны к недостатку кислорода. Гипоксия вызывает деградацию аксонов и усиливает воспалительную реакцию в ЦНС. Thom с коллегами показали, что CO активирует микроглию и CD4⁺ лимфоциты, что приводит к усилению воспалительного процесса (Thom et al., 2004). Более того, хроническое воздействие CO может вызывать дисфункцию эндотелия сосудов головного мозга, ухудшая кровоснабжение нейронов и олигодендроцитов.

Дефицит витаминов, особенно витаминов D и B12, выступает в качестве дополнительного фактора риска развития РС. Витамин D, жирорастворимый стероидный прогормон, представлен в двух основных формах: витамином D3 (холекальциферол), который синтезируется в коже под воздействием ультрафиолетового излучения, и витамином D2 (эргокальциферол), получаемым из пищи. В печени витамин D3 превращается в 25-гидроксихолекальциферол [25(OH)D3]. В почках часть 25-гидроксихолекальциферола заменяется на кальцитриол, который является биологически активной формой витамина D. В системе кровообращения кальцитриол связывается с белком-переносчиком, и транспортируется в различные ткани-мишени, откуда он связывается со специфическими внутриклеточными рецепторами и играет важную роль в пролиферации и дифференциации клеток (Sintzel et al., 2018). Кроме того, витамин D принимает участие в регуляции экспрессии различных генов, связанных с иммунными реакциями (VanAmerongen et al., 2004), в том числе в снижении секреции IL-2, INF γ , а также в инициации апоптоза иммунцитов (Banwell et al., 2011; Chen et al., 2007; Disanto et al., 2012).

Одним из компонентов миелиновой оболочки нейронов является витамин B12. Его дефицит связывают с причинами развития демиелинизирующих заболеваний, полинейропатий и др. Было продемонстрировано, что состояние пациентов с РС улучшалось после начала инъекций витамина B12 (Wade et al., 2002).

Одним из факторов развития РС является также низкая инсоляция. Особенно это проявляется в промышленных городах с загрязненной атмосферой. Достаточная инсоляция, способствующая синтезу витамина D, снижает риск развития РС (Sloka et al., 2011). Витамин D3 посредством индукции регуляторных T-клеток (Treg) и цитокинов, таких как IL-10 и TNF α , способен оказывать иммуномодулирующее действие на организм человека (Väärnhielm et al., 2012).

Следующим фактором окружающей среды, участвующим в развитии РС, является диета. Модуляция микробиома посредством диетических вмешательств, употребление пробиотиков могут использоваться в комплексе интегративной

персонализированной терапии (Nitzan et al., 2023). В настоящее время в литературе описываются несколько диетических моделей и имеются конкретные биологически активные вещества, замедляющие прогрессирование заболевания (Tryfonos et al., 2024). Однако имеются исследования с применением определенных схем питания, в которых участвовало большее число пациентов с РС, которые предоставили противоречивые данные в этой области (Titcomb et al., 2020; Dean et al., 2022; Shemirani et al., 2023).

Генетическая предрасположенность может стать причиной РС (Тимашева и др., 2023). Роль генетического вклада в развитие заболевания установлена в исследованиях, как близнецов, так и семейных случаев (Галиуллин и др., 2020). Уровень риска у монозиготных близнецов, имеющих 100 % генетическое сходство, составляет примерно 25 %. У всех людей, имеющих 50 % генетическое сходство, таких как дизиготные близнецы и родственники первой линии, этот риск составляет 2–5 % (Oksenberg et al., 2008). Семейный анамнез РС зарегистрирован у 15–20 % пациентов с РС, что намного выше, чем распространенность в общей популяции (Compston et al., 2002). Кроме того, риск у родственников второй степени родства при генетическом сходстве 25 % составляет 1–2 %, тогда как у родственников третьей степени родства при генетическом сходстве 12.5 % этот риск составляет менее 1 % (Ghasemi et al., 2017).

Патогенез РС не раскрыт до конца. Считается, что в основе механизма повреждения нервной ткани лежат два общепатологических процесса: очаговое воспаление, приводящее к образованию макроскопических бляшек и повреждению ГЭБ; нейродегенерация с микроскопическим повреждением различных компонентов ЦНС, включая аксоны, нейроны и синапсы.

Развитие РС – сложный многостадийный процесс, характеризующийся аутоиммунным повреждением ЦНС. Условно его можно разделить на пять стадий, каждая из которых играет критическую роль в прогрессировании заболевания.

1 стадия – активация аутореактивных Т–лимфоцитов. На периферии, преимущественно в лимфоидных органах, происходит активация специфических Т–лимфоцитов, распознающих собственные антигены организма как чужеродные. Ключевую роль в иницировании этого процесса играют два основных механизма: молекулярная мимикрия и расширение эпитопов. Молекулярная мимикрия подразумевает сходство между антигенами патогена (вируса, бактерии) и антигенами ЦНС. Иммунная система, реагируя на патоген, одновременно атакует похожие структуры в мозге и спинном мозге. Расширение эпитопов описывает процесс, при котором иммунная система начинает распознавать большее количество антигенов на миелиновой оболочке нейронов, чем в норме. Это происходит из–за модификации белков миелина под воздействием различных факторов, таких как воспаление или окислительный стресс. В результате, Т–лимфоциты, прежде всего субпопуляции Th1, Th17 и Th17.1, активируются и начинают пролиферацию. Субпопуляция Th17.1, продуцирующая IFN γ и гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM–CSF), играет особенно важную роль в патогенезе РС. Высокие уровни VLA–4, адгезивного белка, способствующего миграции лейкоцитов, на Th17.1 клетках свидетельствуют об их активном участии в воспалительном процессе в ЦНС. Исследования спинномозговой жидкости (СМЖ) пациентов с клинически изолированным синдромом (КИС) и ремиттирующим РС подтверждают повышенное содержание именно Th17.1 клеток (van Langelaar et al., 2018). Кроме активации Т–клеточного иммунитета, в патогенезе РС также участвует гуморальный иммунитет за счет продукции аутоантител, а также резидентная микроглия.

2 стадия – это трансэндотелиальная миграция Т–лимфоцитов в ЦНС. Аутореактивные Т–клетки должны пересечь ГЭБ, представляющий собой сложную гетерогенную структуру, выполняющую разграничительную функцию и функцию поддержания гомеостаза ЦНС. Это высокоселективный фильтр между периферическим кровотоком паренхимой мозга. ГЭБ состоит из эндотелиоцитов, базальной мембраны, астроцитов и перицитов. В условиях воспаления при РС

повышается проницаемость ГЭБ, в том числе за счет перестройки плотных контактов, экспрессии молекул адгезии, что способствует проникновению иммунных клеток через сосудистую стенку. Этот процесс регулируется также хемокинами и цитокинами, среди которых особое значение имеет CCL20, который привлекает Т-лимфоциты, экспрессирующие рецептор CCR6. Далее, Т-клетки взаимодействуют с клетками ГЭБ, активируя их и усиливая воспалительный процесс. Известно, что при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ) Th1 лимфоциты преимущественно мигрируют в спинной мозг, а Th17 клетки в головной мозг (Stromnes et al., 2008).

3 стадия – развитие аутоиммунного воспаления. Проникнув в ЦНС, аутореактивные Т-клетки начинают взаимодействовать с антигенами миелина, что приводит к активации микроглии и астроцитов. Они выделяют провоспалительные цитокины ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$), которые усиливают воспаление и повреждают миелиновую оболочку нейронов, что приводит к нарушению проведения нервных импульсов и развитию неврологических симптомов. В этот процесс вовлечены также В-лимфоциты, продуцирующие аутоантитела против компонентов миелина (Tangye et al., 2023). Кроме того, в развитии воспаления участвуют нейтрофилы и макрофаги, способствующие разрушению миелина и повреждению нейронов. На этом этапе формируются характерные для РС очаги демиелинизации, видимые на МРТ.

4 стадия – нейродегенерация. Хотя демиелинизация является доминирующим процессом на ранних стадиях РС, со временем происходит нейродегенерация – гибель нейронов. Причины нейродегенерации при РС до конца не изучены, но предполагается участие, как прямых эффектов воспаления, так и опосредованных эффектов, таких как накопление токсичных белков и нарушение нейротрофической поддержки. Нейродегенерация объясняет прогрессирующее ухудшение неврологического статуса у пациентов с РС.

5 стадия – это процесс ремиелинизации. Со временем процесс демиелинизации ослабевает, а противовоспалительные механизмы запускают активацию и дифференцировку предшественников олигодендроцитов. Вновь

образованный миелин функционально неполноценен, тоньше и имеет сниженную скорость проведения нервных импульсов. Изменения в структуре миелина могут также способствовать хроническому течению заболевания.

1.2. Особенности гематоэнцефалического барьера при рассеянном склерозе

Головной и спинной мозг находятся за гематоэнцефалическим барьером, обладающим избирательной проницаемостью. Согласно современным представлениям, нервная и иммунная системы находятся в организме в тесной взаимосвязи и фактически образуют единую систему управления организмом и его самозащиты от многообразных внешних воздействий. Открытие иммунопривилегированного статуса ЦНС основано на том, что реакция отторжения трансплантата в головном мозге не происходит в течение продолжительного времени (Волков и др., 2021). Позже было установлено, что активированные циркулирующие Т-клетки могут пересекать ГЭБ в отсутствие нейровоспаления. Исследования на трансгенных мышах привели к открытию лимфатических сосудов в твердой мозговой оболочке и их вклада в дренаже СМЖ в глубокие шейные лимфатические узлы. Систему данных сосудов назвали «глимфатической системой», обеспечивающей эффективное смешивание интерстициальной жидкости ЦНС с ликвором (Proulx, 2021). Таким образом, иммунная и центральная нервная система активно взаимодействуют, несмотря на наличие анатомических и физиологических барьеров. Особая анатомия ЦНС, локализация и функция различных мозговых барьеров, которые различаются по степени доступности для медиаторов и клеток врожденной и адаптивной иммунной системы, создают концепцию иммунной привилегированности (Engelhardt et al., 2017). Эта особенность позволяет отдавать приоритет правильному функционированию нейронов над иммунным ответом, в то время как желудочковые, субарахноидальные и периваскулярные пространства предназначены для иммунного контроля.

Ограничение входа потенциально опасных соединений и клеток, а также доставка питательных веществ в ЦНС и удаление из нее продуктов обмена веществ обеспечивает комплекс структур, который называется «гематоэнцефалический интерфейс», состоящий из следующих компонентов: гемато–энцефалический барьер; гемато–цереброспинальный барьер; барьер между кровью и церебральной жидкостью включает сосудистые сплетения желудочков мозга; арахноидный барьер состоит из эпителиальных клеток паутинной (арахноидальной) оболочки мозга; гемато–ретикулярный барьер – барьер между кровью и сетчаткой глаза; гемато–опухолевый барьер – появляется в ЦНС только в случае развития опухоли (Varichello et al., 2019).

Несмотря на всю важность ограничения транспорта веществ из крови в мозг, ГЭБ не является непрерывным. В некоторых областях мозга необходимо, чтобы между нервной тканью и кровью наоборот происходил активный поток веществ, в таких местах церебральный эндотелий видоизменен и больше схож с периферическими сосудами. В таких областях из крови в мозговую ткань попадают сигнальные вещества и метаболиты, необходимые для анализа и контроля состояния организма. С другой стороны, из мозговой ткани в кровь поступают разнообразные гормоны и регуляторные вещества. Области, в которых ГЭБ прерывается:

1. Самое заднее поле (*area postrema*) в области IV желудочка, отвечает за детекцию токсинов, провоцирующих рвоту;
2. Эпифиз (пинеальная, или шишковидная железа) – секреция в кровь мелатонина, гормона, регулирующего циклы сна и бодрствования;
3. Нейрогипофиз (задний гипофиз) – секреция гормонов;
4. Гипоталамус (некоторые области) – секреция гормонов, сенсор сигнальных веществ, водно–солевого баланса.

Наличие прерывистости ГЭБ в некоторых областях мозга не означает, что обмен веществ между кровью и мозгом становится неконтролируемым. Регуляцию этого обмена берут на себя нейроглиальные клетки: питуициты (в районе гипофиза) и танициты (в остальных областях).

ГЭБ представляет собой сложную структуру церебральных эндотелиальных клеток, перицитов, а также базальной мембраны, которые окружены и поддерживаются астроцитами и периваскулярными макрофагами (Тухватуллин и др., 2026; Zierfuss et al., 2024). Несмотря на исследования, причина развития заболевания в значительной мере остается неясной. Однако недавние достижения в медикаментозной терапии показали, что проникновение лейкоцитов через ГЭБ играет ключевую роль в патофизиологии РС (Zierfuss et al., 2024).

Церебральные эндотелиальные клетки вместе с перицитами и прилегающей к ним базальной мембраной окружают и соединяются с астроцитами и периваскулярными макрофагами, образуя нейроваскулярную единицу (НВЕ) (Xiao et al., 2020). Эндотелиальные клетки очень тесно связаны плотными контактами (ТJ) (окклюдин, клаудин–5, ZO–1, –2 и –3) и адгезивными соединениями (AJ) (VE–кадгерин и катенины) (Chow et al., 2015; Sheikh et al., 2020; Sweeney et al., 2019). Современный подход к изучению нарушения церебрального эндотелия при РС учитывает сосудистые изменения на уровне НВЕ, которые обнаруживаются на ранних стадиях и находятся под влиянием одной и той же окружающей среды (ВЭБ, курение, высокое потребление соли и дефицит витамина D) и генетических факторов риска.

ГЭБ служит «физическим барьером» для клеток крови и других молекул (Xiao et al., 2020). В нормальных условиях ГЭБ, в отличие от эндотелия периферических капилляров, не имеет трансэндотелиальных фенестраций, но обладает более крупной транспортной системой для лучшего контроля трансклеточного потока (Langen et al., 2019). Трансцеллюлярный и параклеточный транспорт обеспечивают прохождение клеток и различных других веществ через ГЭБ; они строго контролируются и происходят соразмерно с потреблением энергии (Xiao et al., 2020; Chow et al., 2015; Sweeney et al., 2019; Langen et al., 2019).

Менингеальные оболочки (твердая мозговая оболочка, паутинная оболочка и мягкая мозговая оболочка) покрывают всю поверхность головного и спинного мозга, и в основном состоят из фибробластов (Dorrier et al., 2021) (рис. 1). Твердая

мозговая оболочка – это наружная оболочка, прилежащая к черепу. Она состоит из двух эпителиальных слоев плотных коллагеновых волокон – периостального и менингеального (Benakis et al., 2018). Нервы, артерии, вены и лимфатические сосуды проходят между двумя слоями твердой мозговой оболочки, подобно периферической ткани (Rua et al., 2018). Артерии фенестрированы, поэтому возможен транспорт небольших молекул крови (Rustenhoven et al., 2021). Кроме того, в венозных синусах твердой мозговой оболочки существует уникальный интерфейс связи между ЦНС и иммунной системой. Хотя в эндотелиальных клетках твердой мозговой оболочки наблюдается низкая экспрессия клаудина-5 и окклюдина, но высокая экспрессия VCAM-1 и ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) вместе с наличием лимфатических сосудов позволяют предположить осуществление иммунологического надзора в данной структуре. Эта особенность иллюстрируется наличием различных подтипов иммунных клеток в синусах твердой мозговой оболочки, включая макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, врожденные лимфоидные клетки, Т-клетки и В-клетки (Fitzpatrick et al., 2020). Паутинную и мягкую мозговую оболочку вместе часто называют лептоменингеальной, поскольку они структурно связаны. Непосредственно к менингеальному слою твердой мозговой оболочки прилегает паутинная оболочка, полупрозрачный многослойный слой плотных лептоменингеальных клеток. Внешний слой ее соединен плотными контактами и десмосомами, образующие непроницаемый барьер для молекул и клеток, подобный ГЭБ. Между паутинной и мягкой мозговой оболочкой находится субарахноидальное пространство (САП), которое заполнено СМЖ, способной реабсорбироваться в системный кровоток или лимфатические узлы через паутинные грануляции и ворсинки, а также менингеально-дуральные синусы. Арахноидальный барьер не только контролирует дренаж СМЖ из САП в твердую мозговую оболочку, но и регулирует приток иммунцитов из дуральных артерий. Внутри субарахноидального пространства присутствуют коллагеновые нити, которые образуют своеобразные трабекулы, покрытые слоем лептоменингеальных клеток, играющие важную роль в поддержании структуры и функции этого пространства.

Мягкая мозговая оболочка, являющаяся самым внутренним слоем мозговых оболочек, содержит множество кровеносных сосудов, которые проникают в паренхиму головного мозга. Эти сосуды не только обеспечивают кровоснабжение нейронов, но и участвуют в формировании ГЭБ (Dorrier et al., 2021).

Для проникновения в САП клетки должны пересечь гемато–менингеальный барьер, который состоит из эндотелиоцитов, соединенных плотными контактами и мягкой мозговой оболочкой. Хотя характеристики менингеальных эндотелиоцитов остаются по большей части неизвестными, этот барьер немного отличается от особенностей ГЭБ отсутствием перицитов и астроцитарных концов. Кроме того, менингеальный эндотелий имеет более высокую конститутивную экспрессию молекул адгезии даже в невоспалительной среде, что может обеспечить трансмиграцию иммунных клеток в отсутствие патологии (Dorrier et al., 2021).

В условиях воспаления лимфоциты и миелоидные клетки могут легко пересекать гемато–менингеальный барьер, поскольку менингеальные кровеносные сосуды проницаемы (Lyon et al., 2017). Следовательно, эти капилляры являются первичными местами входа иммунных клеток в САП. Исследования 2015 года показали, что при ЭАЭ Т–клетки и дендритные клетки способны проникать в лептоменингеальное пространство еще до начала воспаления ЦНС (Barkauskas et al., 2015). Это подтверждает тот факт, что миграция через гемато–менингеальный барьер происходит раньше, чем через ГЭБ. Данный процесс может быть опосредован Р–селектином, который активируется раньше, чем другие молекулы адгезии в мозговых оболочках и сосудистом сплетении. Более того, менингеальное воспаление также возникает на ранних стадиях РС и часто локализуется около очагов поражения серого вещества, в местах повреждения ГЭБ и кортикальной демиелинизации. Таким образом, проникновению иммунных клеток в ЦНС, вероятно, будет предшествовать инфильтрация ими мозговых оболочек через менингеальные кровеносные сосуды.

Обнаружение скоплений В-клеток и формирование В-клеточных фолликулов в субарахноидальном пространстве головного мозга пациентов с РС стало одним из ключевых открытий последних лет, существенно изменившим наше понимание патогенеза этого заболевания. Наличие этих менингеальных кластеров, первоначально описанных при ЭАЭ, подчеркивает важную роль мозговых оболочек в развитии РС. Более того, недавние исследования продемонстрировали, что В-лимфоциты могут мигрировать в ЦНС через специализированные сосуды, расположенные в своде черепа, что указывает на существование специфических путей проникновения иммунных клеток в мозг (Brioschi et al. 2021; Schafflick et al., 2021). Эти лимфоидные фолликулоподобные структуры, локализующиеся в субарахноидальном пространстве, тесно прилегают к мягкой и паутинной мозговым оболочкам, в непосредственной близости от менингеальных сосудов. Лептоменингеальные фолликулы встречаются как на поверхности извилин, так и в глубине борозд полушарий головного мозга, покрывая обширную площадь субарахноидального пространства у пациентов с РС (Schafflick et al., 2021). Это указывает на системный характер воспалительного процесса, затрагивающий значительную часть мозга. Однако, эти фолликулоподобные структуры представляют собой не просто скопление CD20⁺ В-клеток, здесь также выявляются различные субпопуляции Т-лимфоцитов, цитотоксические CD8⁺ Т-клетки, дендритные клетки, моноциты, макрофаги (Ostkamp et al., 2022).

В-лимфоциты в третичных лимфоидных фолликулах подвергаются клональной экспансии, быстрой пролиферации клеток, специфично вырабатывающих антитела к определенному антигену. Затем проходит селективный отбор и дифференцировка в клетки памяти. Клетки памяти характеризуются высоким уровнем синтеза аффинных антител, обеспечивающих более эффективное связывание с антигенами. Эти процессы протекают благодаря тесному взаимодействию между В- и Т-лимфоцитами, опосредованному цитокинами и другими сигнальными молекулами. Дендритные клетки играют в этом процессе ключевую роль, выступая в качестве профессиональных

антигенпрезентирующих клеток (АПК) и обеспечивая как презентацию антигена, так и выработку необходимых для выживания и пролиферации В-клеток факторов (Абрамова и др., 2019).

Считается, что иммунные клетки в составе третичных лимфоидных фолликулов участвуют и в синтезе олигоклональных IgG и IgM. Кроме того, эти лимфатические сосуды отчетливо визуализируются на обычных T1–взвешенных МРТ–сканированиях в виде усиления рисунка твердой мозговой оболочки (Бойко и др., 2023). При РС отмечается ее аномальное диффузное или локальное утолщение (Antony et al., 2015). Наличие этих фолликулоподобных структур в ЦНС у пациентов с прогрессирующим РС коррелирует с более быстрым и тяжелым течением заболевания (Cunill et al., 2018).

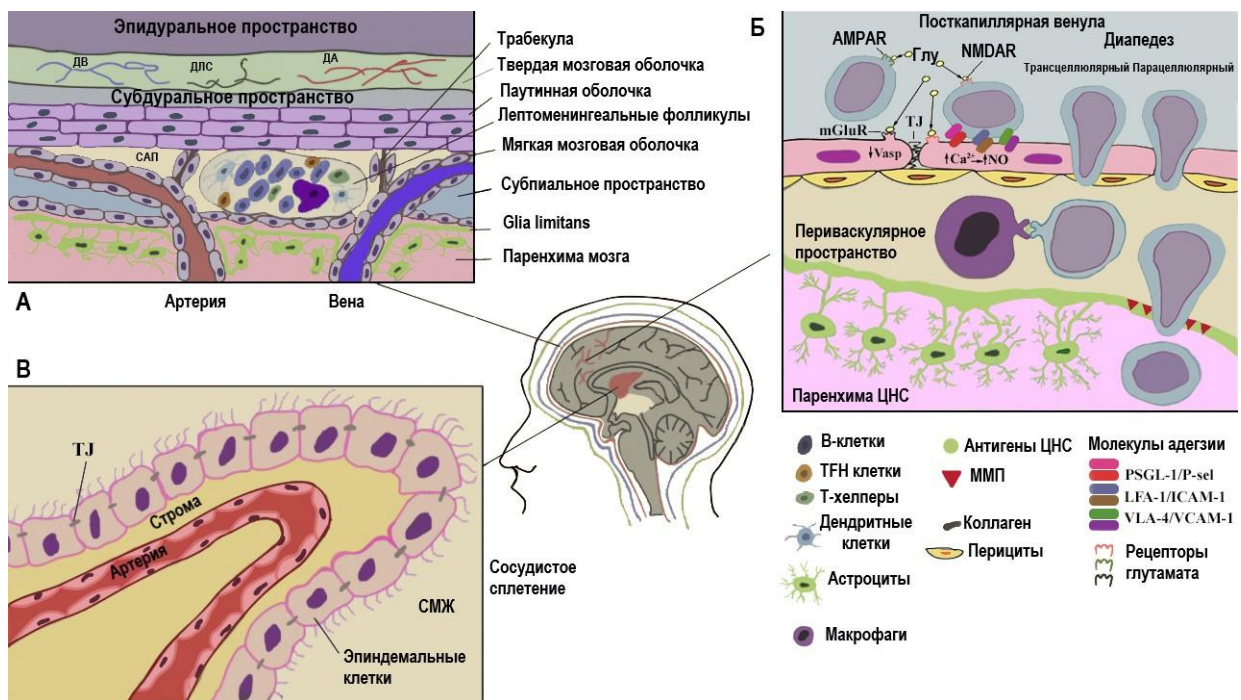


Рисунок 1. Структурные особенности гематоэнцефалического барьера на разных уровнях. (А) Головной мозг окружают 3 оболочки: твердая мозговая оболочка, паутинная и мягкая мозговая оболочки. Последние две обычно называют лептоменингеальной. В твердой мозговой оболочке находятся дуральные артерии, вены и дуральные лимфатические сосуды. Они не образуют гематоэнцефалический барьер. Между паутинной и мягкой мозговыми оболочками находится субарахноидальное пространство, заполненное СМЖ,

содержащей макрофаги. Паутинная оболочка состоит из нескольких слоев паутинных клеток. При РС в САП также содержатся эктопические лимфоидные структуры, представляющие собой кластеры В-клеток, окруженные Th клетками, макрофагами и дендритными клетками. Кровеносные сосуды покрыты слоем мягкой мозговой оболочки, а также соединены с паутинной оболочкой трабекулами. Центр трабекул состоит из коллагенового ядра, покрытого клетками мягкой мозговой оболочки. Тонкий слой мягкой мозговой оболочки также покрывает артерии, впадающие в головной мозг. Glia limitans состоит из паренхиматозной базальной мембраны и концов астроцитов и покрывает всю поверхность паренхимы ЦНС. Вены в САП и субпиаальном пространстве образуют ГЭБ, хотя они не покрываются концами астроцитов. (Б) Показаны особенности паренхиматозных микрососудов ГЭБ и механизм трансэндотелиальной миграции (ТЭМ) Т-клеток при РС. Эндотелиальные клетки удерживаются вместе плотными контактами, перицитами и базальной мембраной. В посткапиллярных венах имеется периваскулярное пространство, заполненное СМЖ, в которой находятся макрофаги. На первом этапе трансмиграции Т-лимфоциты прилипают к эндотелию за счет взаимодействия Р-селектина, находящегося на поверхности эндотелиальных клеток, с его лигандом PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1), экспрессируемого на Т-лимфоцитах. Экспрессия Р-селектина зависит от выработки цитокинов, уровень которых увеличивается при РС. Следует отметить, что взаимодействие Р-селектин/PSGL-1 является нестабильным и быстроразрушающимся. Затем Т-клетки начинают "катиться" вдоль эндотелия, двигаясь против кровотока. Этот процесс называется "rolling". Т-лимфоциты таким образом ищут сайт для связывания. Далее происходит прочная адгезия, обусловленная взаимодействием молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1 на поверхности эндотелиоцитов, с их соответствующими лигандами на Т-клетках – LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) и VLA-4. Эти молекулы образуют прочные "стыковочные структуры", что обеспечивает надежную фиксацию Т-клеток. Активация Т-клеток еще более усиливает аффинность LFA-1 и VLA-4 к ICAM-1 и VCAM-1. Глутамат за счет стимуляции NMDA-рецепторов на

эндотелиоцитах, повышает уровень их внутриклеточного кальция. Это в свою очередь приводит к выработке NO, вызывающий перестройку плотных контактов, расширение сосудов, увеличивая проницаемость ГЭБ. Кроме того, глутамат, воздействуя на AMPA- и NMDA-рецепторы на T-клетках, усиливает их пролиферацию, хемотаксис и активацию, тем самым повышая их способность к миграции через ГЭБ. Этот каскад событий, инициированный глутаматом, значительно ускоряет и облегчает проникновение T-лимфоцитов в ЦНС. Диапедез может происходить параклеточно и трансцеллюлярно. Проникнув в периваскулярное пространство, T-лимфоциты реактивируются за счет презентации антигенов ЦНС макрофагами на молекулах ГКГС II. И, наконец, последним этапом ТЭМ является пересечение *glia limitans*. T-клетки пересекают паренхиматозную базальную мембрану и *glia limitans* за счет взаимодействия VLA-6 с ламинином $\alpha 4$. За счет матриксных металлопротеаз (ММП) T-клетки способны расщеплять концы астроцитов и проникать в паренхиму ЦНС. (B) Сосуды сосудистого сплетения фенестрированы. Эпендимоциты, покрывающие сосудистое сплетение, имеют плотные соединения, которые отвечают за формирование гемато-ликворного барьера (Тухватуллин и др., 2026).

Эпителиальные клетки сосудистых сплетений, формирующие внутреннюю выстилку желудочков, образуют плотные контакты, которые, тем не менее, не столь герметичны, как TJ в эндотелии капилляров мозга. Эти контакты обеспечивают селективную проницаемость, регулируя прохождение веществ из крови в СМЖ. Эпендимоциты связаны с базальной мембраной, посредством ламининов, коллагена и фибронектина, обеспечивающие структурную целостность. Люминальной стороной эпителиальные клетки взаимодействуют с фенестрированными капиллярами, в которых отсутствуют плотные контакты, благодаря чему небольшие молекулы и вещества способны проникать в СМЖ.

Сосудистые сплетения не являются полностью изолированными от иммунной системы, и это становится особенно важным при развитии аутоиммунных заболеваний. В частности, сосудистые сплетения выступают как

«ворота» для проникновения аутореактивных Т–лимфоцитов, в первую очередь, Th17 клеток, в ЦНС. Этот процесс опосредуется хемокиновым сигналом: CCL20, вырабатываемый клетками сосудистых сплетений, взаимодействует с CCR6 рецептором на поверхности Th17 лимфоцитов, индуцируя их миграцию через СМЖ. Первая волна проникновения Th17 клеток, зависящая от CCR6/CCL20 взаимодействия, инициирует последующую, независимую от CCR6, вторую волну воспалительного процесса, приводящую к демиелинизации. Это свидетельствует о сложной каскадной реакции, запускаемой начальным проникновением аутореактивных клеток через сосудистые сплетения (Balasa et al., 2021; Restoricket. al., 2017).

Исследования Schulz M. и др. показали значительное накопление аутореактивных Th лимфоцитов в сосудистых сплетениях у животных с ЭАЭ, а также повышенную экспрессию молекул клеточной адгезии на этих клетках, что способствует их прилипанию к эндотелию и прохождению через барьер (Schulz et al., 2005). Кроме того, активация микроглии наблюдалась в области сосудистых сплетений, указывая на развитие воспалительной реакции.

Таким образом, ЦНС имеет свои механизмы и структуры, препятствующие проникновению патологических процессов в паренхиму головного мозга, а также пути оттока и дренирования ликвора обратно в кровотоки. ГЭБ представляет собой сложную гетерогенную систему с несколькими уровнями избирательного транспорта, регуляции и защиты, способную поддерживать внутренний гомеостаз. Понимание того, как иммунокомпетентные клетки проникают в паренхиму мозга, и как иммуномодулирующее лечение влияет на нейровоспаление, требует надлежащего знания специальной анатомии ЦНС и механизмов, регулирующих адгезию, миграцию и межклеточное взаимодействие лимфоцитов и эндотелиоцитов.

1.3. Характеристика отдельных субпопуляций Т–хелперов периферической крови

В очагах демиелинизации обнаруживается высокое содержание лимфоидных клеток, проникших через ГЭБ. Следует отметить, что к направленной миграции в воспаленные ткани способны антиген-специфические Т-клетки, прошедшие дифференцировку и обладающие выраженными эффекторными свойствами.

Среди различных субпопуляций Т-хелперов ведущую роль в патогенезе РС отводилась Т-хелперам 1 типа, способным к продукции $IFN\gamma$. Однако современные исследования значительно расширили наши представления о роли различных субпопуляций $CD4^+$ Т-лимфоцитов в патогенезе РС (Li et al., 2026). Оказалось, что Т-хелперы 17 и 17.1 типов играют, возможно, ещё более значительную роль. Th17 лимфоциты продуцируют IL-17, который привлекает нейтрофилы в очаг воспаления в ЦНС, что приводит к повреждению миелина и аксонов. Этот процесс значительно способствует развитию характерных для РС очагов демиелинизации. Более того, IL-17 способствует образованию новых аутоиммунных клеток, усиливая воспалительную реакцию в виде замкнутого цикла.

Th1 клетки

Долгое время считалось, что ключевую роль в его развитии играют Т-хелперы 1 типа, продуцирующие $IFN\gamma$. Эти клетки, открытые в конце 1980-х годов, представляют собой подгруппу $CD4^+$ Т-лимфоцитов, эффективно борющихся с внутриклеточными патогенами. Механизм их действия включает в себя секрецию $IFN\gamma$, стимуляцию макрофагов для фагоцитоза и повышение эффективности выработки антител, что, казалось бы, должно препятствовать развитию аутоиммунного процесса. Однако $IFN\gamma$ также способен усиливать воспалительную реакцию, повреждая миелиновую оболочку нервных волокон, что и лежит в основе патогенеза РС (Sallusto et al., 2016). Поэтому, хотя Th1 клетки и важны для защиты от инфекций, их чрезмерная активация в контексте аутоиммунитета приводит к повреждению собственных тканей. Th1 клетки можно идентифицировать по поверхностной экспрессии цепей $\beta 1/\beta 2$ рецептора хемокинов CXС 3 (CXCR3) и рецептора интерлейкина-12 (IL-12R) (Annunziato et

al., 2014). Увеличение IFN γ -продуцирующих миелин-реактивных Т-лимфоцитов в крови больных РС коррелировало с активным течением заболевания и ухудшением неврологических симптомов (Arbor et al., 2003). Также было обнаружено, повышенное содержание IFN γ^+ Т-клеток в СМЖ у пациентов с РС по сравнению со здоровыми людьми (Wallström et al., 2000). Соответственно, уровни IFN γ были значительно повышены в ликворе и ЦНС (Arellano et al., 2017), а переноса Th1 лимфоцитов было достаточно, чтобы индуцировать ЭАЭ у мышей-реципиентов. IFN γ способен регулировать экспрессию нескольких поверхностных молекул на эндотелии головного мозга, включая ГКГС I, ГКГС II, VCAM-1, (Mad)CAM-1 и ICAM-1 (Sonar et al., 2017). Эксперименты с покадровой конфокальной микроскопией показали, что IFN γ определяет быструю релокализацию ICAM-1 с базальной на апикальную сторону эндотелиальных клеток (Sonar et al., 2017). Основной клеточной мишенью Th клеток является микроглия, представляющую собой резидентные макрофаги, которые могут дифференцироваться в воспалительные M1-подобные или противовоспалительные M2-подобные фенотипы (Aguzzi et al., 2013). Th1 лимфоциты активируют микроглиальные клетки, увеличивая секрецию ими оксида азота, простагландинов и хемокинов.

Th17 клетки

Th17 клетки были идентифицированы в 2005 году (Langrish et al., 2005) как важная субпопуляция CD4⁺ Т-лимфоцитов, которая опосредует иммунные ответы против внеклеточных бактерий и грибов. Т-хелперы 17 типа можно идентифицировать на основе специфических поверхностных маркеров, таких как CD161, хемокиновых рецепторов CCR6 и CCR4, цитокиновых рецепторов IL-23R и IL-1R (Annunziato et al., 2012), и продукцию специфических цитокинов, таких как IL-17A-F, IL-21 и IL-22. В частности, IL-17A и IL-17F действуют на макрофаги, эпителиальные и эндотелиальные клетки, индуцируя экспрессию воспалительных цитокинов и хемокинов и способствуя привлечению нейтрофилов в участки воспаления. IL-21 обеспечивает петлю положительной обратной связи для успешной пролиферации субпопуляции Th17 клеток, а IL-22

действует на эпителиальные клетки, способствуя выработке антимикробных пептидов и слизи. Результатом этих действий является усиление защиты от патогенов, а также повреждение тканей, что может привести к хроническим воспалительным заболеваниям (Stadhouders et al., 2018). Th17 клетки также участвуют в патогенезе нескольких аутоиммунных заболеваний, включая РС (Volpe et al., 2015), где они играют решающую роль в разобщении ГЭБ (Tahmasebinia et al., 2017) и, нацеливаясь на резидентные астроциты и микроглию в ЦНС, способствуют их активации и усиливают нейровоспаление при ЭАЭ. (Prajeeth et al., 2017). В частности, Th17 лимфоциты высокоэффективны в регуляции астроцитов, а не микроглии. Астроциты представляют собой резидентные клетки с различным анатомическим расположением, а также морфологическими и функциональными свойствами. Они расположены на границе между ГЭБ и нейронами и регулируют движение молекул и клеток между кровообращением и ЦНС. Более того, продуцируя нейротрофические факторы, они также регулируют нейрогенез и восстановление тканей. В ответ на повреждение ЦНС астроциты претерпевают глубокие морфологические и функциональные изменения – явление, известное как астроглиоз (Brambilla et al., 2019). Описано, что IL-17 усиливает выработку воспалительных цитокинов и хемокинов (Elain et al., 2014), а нарушение опосредованной IL-17 передачи сигналов способствует уменьшению ЭАЭ (Kang et al., 2010). Таким образом, было показано, что Th1 и Th17 клетки регулируют функции астроцитов, вызывая подавление нейротрофических факторов и усиление воспалительных стимулов (Prajeeth et al., 2017; Prajeeth et al., 2018).

Другие предполагаемые патологические функции Th17 лимфоцитов и IL-17 включают ингибирование созревания и выживания олигодендроцитов (Kang et al., 2013). При РС стойкая демиелинизация и нейродегенерация связаны с дисфункцией и апоптозом олигодендроцитов, вызванными прямой цитотоксичностью антигенспецифических Т-клеток и аутоантител, а также опосредованными Т-клетками провоспалительными цитокинами, которые активируют резидентную микроглию (Dulamea et al., 2018).

Th17 клетки обладают высокой пластичностью и могут принимать различные функциональные профили в зависимости от воспалительной или противовоспалительной среды (Cosmi et al., 2014). Дифференцировка возможна в высокопатогенную субпопуляцию Th1-подобных Th17 клеток, экспрессирующих высокие уровни IFN γ , или в непатогенные регуляторные T-клетки, продуцирующие IL-10. В недавнем исследовании на мышах было показано, что во время разрешения воспаления T-хелперы 17 типа подвергаются транскрипционному перепрограммированию, приводящему к их дифференцировке в Treg клетки (Singer et al., 2024). Высокая пластичность Th17 лимфоцитов была недавно подтверждена при РС. Carone и др. обнаружили, что Th17 клетки человека, поляризованные из наивных CD4⁺ T-хелперов периферической крови пациентов с РС, демонстрируют отчетливые воспалительные особенности по сравнению со здоровыми донорами (Carone et al., 2019). В частности, T-лимфоциты 17 типа пациентов с РС повышают экспрессию IL-1R и производят более высокие уровни IL-21, IL-2 и TNF β , что приводит к приобретению патогенного профиля.

Была обнаружена повышенная экспрессия CXCR3, рецептора для хемокина CXCL10, указывающая на миграцию Th17 клеток в очаг воспаления, где CXCL10 продуцируется в больших количествах активированными клетками иммунной системы (Hu et al., 2017). Одновременно с этим наблюдалось снижение экспрессии IL-10, важнейшего противовоспалительного цитокина, способствующего регуляции иммунного ответа и предотвращению чрезмерного воспаления. Этот дисбаланс в сторону преобладания провоспалительных цитокинов над противовоспалительными свидетельствует о дефекте иммунной регуляции и пояснению патогенеза заболевания. Более того, Th17 клетки также синтезируют гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор GM-CSF, помимо своей роли в стимуляции роста и дифференцировки гранулоцитов и макрофагов, в контексте аутоиммунных заболеваний действует как мощный провоспалительный медиатор (Volpe et al., 2015). В экспериментальных моделях ЭАЭ GM-CSF усиливает патологический процесс,

способствуя инфильтрации воспалительных клеток в ЦНС и усугубляя повреждение миелина. Предполагается, что усиленная продукция GM-CSF клетками Th17 в условиях дисбаланса цитокинов (высокий IFN γ , низкий IL-10) синергически увеличивает патогенный потенциал этих клеток (Ghezzi et al., 2019; Muls et al., 2017).

Th17.1 клетки

Недавно открытая новая подгруппа Th1 клеток, известная как Th1-подобные клетки Th17, которые продуцируют как IFN γ , так и IL-17, была идентифицирована как у человека, так и у мышей (Acosta-Rodriguez et al., 2007). Эти лимфоциты синтезируют меньшее количество IL-17A, но более высокие уровни IFN γ по сравнению с классическими Th17 клетками (Annunziato et al., 2012). Происхождение субпопуляции Th17.1 лимфоцитов полностью не установлено, но несколько исследований подтверждают представление о том, что они происходят из Th17 клеток в присутствии IL-12, TNF α и/или IL-1 β (Duhon et al., 2014). У мышей более высокая патогенность Th1-подобных Th17 клеток была связана с продукцией нескольких воспалительных цитокинов и хемокинов, таких как GM-CSF, IL-22, CCL4 и CXCR3 (Lee et al., 2012). Эти данные были также подтверждены у человека путем анализа транскрипционного профиля Th17 и Th17.1 лимфоцитов периферической крови при РС (Hu et al., 2017). Изучение транскриптома отдельных клеток при ЭАЭ расширило эти данные, показав, что дифференцировка Th1-подобных Th17 клеток в ЦНС из предшественников Th17 в лимфатических узлах регулируется четырьмя специфическими генами: *Gpr65*, *Toso*, *Plzp* и *Cd51*, которые также были вовлечены в восприимчивость к заболеваниям (Gaublomme et al., 2015).

Участие высокопатогенных Th17.1 клеток в нейровоспалении было подтверждено исследованиями как в животных моделях РС, так и у пациентов (Becher et al., 2011). Например, Th1-подобные Th17 клетки способны пересекать ГЭБ и накапливаться в ЦНС при ЭАЭ. Они также были обнаружены в тканях мозга больных РС (Kebir et al., 2009) и повышались при обострении (Edwards et al., 2010). Миелин-специфические Th17.1 лимфоциты увеличились как в

периферической крови, так и в СМЖ (Cao et al., 2015; Paroni et al., 2017). Субпопуляция Th17.1 клеток, экспрессирующая высокие уровни $IFN\gamma$, GM-CSF, VLA-4 и низкие уровни IL-17, была связана с активностью РС (van Langelaar et al., 2018). Нейропатические эффекты Th1-подобных Th17 лимфоцитов в ЦНС все еще выясняются, но, вероятно, перекрываются с эффектами, выявленными для Th1 и Th17 клеток.

Th2 клетки

T-хелперы 2 типа – это важная субпопуляция $CD4^+$ T-лимфоцитов, играющих ключевую, но сложную роль в иммунном ответе, особенно в контексте РС. Открытие группы клеток, которые секретируют интерлейкин-4 (IL-4), стало важным событием в понимании контексте дуализма Th1/Th2. Th2 лимфоциты играют ключевую роль в гуморальном иммунитете, способствуя как пролиферации и дифференцировке В-клеток, так и продукции антител класса IgE, которые критически важны для борьбы с паразитарными инфекциями (Fort et al., 2001).

Существуют исследования, которые указывают на нейропротекторные свойства Th2 клеток при РС и ЭАЭ (Fernando et al., 2014) за счет их иммуносупрессивного действия. В тоже время Th2 клетки способны активировать В-лимфоциты, усиливая синтез антител, ухудшая нейровоспаление (Planas et al., 2015).

Имеются противоречивые данные по поводу миграционной активности Th2 клеток. Например, в исследовании 2005 года Th2 лимфоциты в отличие от Th1 и Th17 субпопуляций показали слабую адгезионную активность к эндотелию ГЭБ, что может быть связано с низкой экспрессией PSGL-1 и LFA-1 (Piccio et al., 2005).

В другом же исследовании Th2 клетки показали повышенную миграцию в *in vitro* модели ГЭБ (Biernacki et al., 2001). Авторы связали этот факт с взаимодействием рецептора CCR2 с лигандом CCL2 и молекулой адгезии ICAM-1. Однако в более поздних работах Th2 лимфоциты показали низкую миграционную активность (Wimmer et al., 2019; Nishihara et al., 2020). Такие противоположные данные предполагают дальнейшее изучение с учетом моделей

и методов исследования, а также влияния микроокружения, а разработка целевых терапевтических стратегий, направленных на модуляцию активности Th2 клеток, может стать прорывом в лечении РС и других аутоиммунных заболеваний ЦНС.

Таким образом, имеются свидетельства о фундаментальной роли энцефалитогенных Т-лимфоцитов, в частности, Th1, Th17 и Th17.1 клеток в иницировании и поддержании воспалительных реакций и последующей нейродегенерации при РС. Эти знания и будущие направления необходимы для определения значимости каждой из субпопуляций и их цитокинов в развитии болезни, и поиска потенциально эффективных терапевтических нейропротекторных мишеней при лечении заболевания.

1.4. Трансэндотелиальная миграция лимфоцитов через ГЭБ и участие молекул адгезии

Молекулы клеточной адгезии – это белки, связанные с плазматическими мембранами, которые обеспечивают механическое взаимодействие между клетками. Обычно они встроены в мембрану и соединены с цитоскелетом, с их помощью клетки могут присоединяться к другим клеткам или перемещаться по внеклеточному матриксу по мере их движения. Во многих случаях данные соединения способны взаимодействовать с несколькими лигандами через различные сайты связи. Общая характеристика молекул адгезии представлена в таблице 1 (Hu et. al., 2023).

Всего существует пять структурных семейств мембранных белков: интегрины, адгезивные рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов, селектины, кадгеринины, хоминговые рецепторы.

Таблица 1. Общая характеристика молекул адгезии

Молекула адгезии	Лиганды	Клеточное представление	Роль при РС
Р-селектин (CD62P)	PSGL-1	эндотелиоциты	Ранний захват,

Е-селектин (CD62E)	L-селектин	эндотелиоциты	перекатывание лейкоцитов во время ТЭМ
L-селектин (CD62L)	MAdCAM 1, GlyCAM-1, PSGL-1, E-селектин	лейкоциты	
VLA-1 (CD49a)	коллагены, ламинины	мезенхимальные, некоторые эпителиальные клетки, активированные Т-лимфоциты, макрофаги	
VLA-2 (CD49b)	коллагены, ламинины	эпителиальные, эндотелиальные клетки, фибробласты, тромбоциты, определённые подтипы лейкоцитов	
VLA-3 (CD49c)	фибронектин, коллагены, ламинины	эпителиоциты почек, щитовидной железы	
VLA-4 (CD49d)	VCAM-1, фибронектин	моноциты, Т-, В-лимфоциты, базофилы, эозинофилы	прочное прилипание, ползание лимфоцитов по эндотелию ГЭБ
VLA-5 (CD49e)	фибронектин, протеазы	широкое	
VLA-6 (CD49f)	ламинины	широкое	Миграция Т-лимфоцитов за счет взаимодействия с ламинином $\alpha 4$ паренхиматозной базальной мембраны
LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3	гемопозитические клетки (кроме тромбоцитов)	прочное прилипание, ползание лимфоцитов по эндотелию ГЭБ
VCAM-1 (CD106)	VLA-4	клетки лимфатических узлов, кожи, стромальные клетки костного мозга, синовиальные клетки, дендритные клетки	прочное прилипание и ползание лимфоцитов по эндотелию ГЭБ
ICAM-1 (CD54)	LFA-1, Mac-1, CD43	эндотелиоциты, лейкоциты	прочное прилипание и ползание лимфоцитов по эндотелию ГЭБ
ICAM-2 (CD102)	LFA-1	эндотелиоциты	ползание лимфоцитов по воспалённому эндотелию ГЭБ
ICAM-3 (CD50)	LFA-1	лейкоциты, В-клетки, моноциты	образование цепочек лимфоцитов во время ТЭМ

Миграция лейкоцитов опосредована совместным действием молекул межклеточной адгезии и хемотаксических факторов, и происходит за счет морфологических изменений, как лейкоцитов, так и эндотелиальных клеток (Wilson et al., 2010). Чтобы инициировать воспалительный ответ, лимфоциты в кровяном русле должны вступить в контакт с сосудистой стенкой и прицепиться к ней, выдерживая сдвиг сил (рис. 1 Б). Связывание и перекатывание лейкоцитов по активированному эндотелию являются первыми шагами последовательного процесса экстравазации. За ними следуют прочная адгезия и трансэндотелиальная миграция (Hernández–Pedro et al., 2013). Хотя селектины и их лиганды имеют тенденцию взаимодействовать с переменным сродством, высокая частота ассоциативно–диссоциативных взаимодействий позволяет им опосредовать лабильные и временные связи между лейкоцитами и эндотелием. Связывание замедляет скорость движения лейкоцитов и позволяет им катиться по поверхности эндотелиоцитов, облегчая последующее взаимодействие, опосредованное их интегринами и их лигандами, и увеличивая прилипание лейкоцитов. Механизм трансэндотелиальной миграции через ГЭБ представляет собой многоступенчатый процесс, характеризующийся серией последовательных и тщательно контролируемых фаз, следуя парадигме экстравазации лейкоцитов через все кровеносные сосуды (Barreiro et al., 2009; Profaci et al., 2020).

Среди молекул адгезии выделяются селектины, которые обеспечивают слабое взаимодействие лейкоцитов с эндотелием, а также интегрины VLA–4 и LFA–1, экспрессируемые на Т–клетках и VCAM–1 и ICAM–1, члены суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессирующиеся на эндотелиальных клетках, отвечающие за прочный арест.

L–селектин, экспрессируется на лейкоцитах, а P– и E–селектины на эндотелиальных клетках. Их основным лигандом является PSGL–1. Взаимодействие PSGL–1/P–селектин приводит к "ползанию" лимфоцитов вдоль эндотелия. L–селектин же обеспечивает взаимодействие между иммунными клетками (вторичное рекрутирование), усиливая привязку циркулирующих

лейкоцитов. Селектины также могут связываться с CD44 и ESL-1 (E-selectin ligand 1) в случае E-селектина. PSGL-1 в первую очередь участвует в начальном привязывании лейкоцитов, тогда как ESL-1 необходим для преобразования временных начальных связей в более медленное и стабильное перекатывание. Наконец, CD44 контролирует скорость вращения и поляризацию PSGL-1 и L-селектина, вероятно, для обеспечения вторичного связывания (Barreiro et al., 2009). В головном мозге P-селектин в норме преимущественно экспрессируется в менингеальных и хориоидальных сосудах и активируется во всей сосудистой сети ЦНС при нейровоспалении. Его роль в поддержке экстравазации лейкоцитов остается спорной, поскольку недавние исследования показали, что, несмотря на блокаду или отсутствие P-селектина, у мышей развивается клинический ЭАЭ (Ortiz et al., 2014). Напротив, экспрессия E-селектина наблюдается только в менингеальных сосудах, но не в паренхиматозных сосудах при воспалительных состояниях (Alvarez et al., 2011). Хемокины действуют как хемоаттрактанты, привлекая лейкоциты к месту повреждения. Более того, хемокины играют важную роль в регуляции адгезии лейкоцитов, усиливая аффинность связывания между интегринами и их лигандами. Воспаленный эндотелий сосудов в паренхиме ЦНС активируют экспрессию молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1 и их соответствующие лиганды LFA-1 и VLA-4. Показано, что образование пар адгезионных молекул ICAM-1/LFA-1 и VCAM-1/VLA-4 являются обязательными для устойчивой адгезии CD4⁺ T-клеток на воспаленном эндотелии сосудов головного мозга (Sonar et al., 2017).

Важно отметить, что взаимодействие VCAM-1/VLA-4 обеспечивает захват Th1 лимфоцитов на капиллярах спинного мозга, тогда как ICAM-1/LFA-1 регулирует адгезию Th17 клеток к ГЭБ в головном мозге. Этот факт предполагает, что трансмиграция T-хелперов 17 типа через ГЭБ не зависит от VLA-4 (Kant et al., 2018; Hussain et al., 2019).

После остановки T-клетки начинают ползти против направления кровотока в поиске сайтов для последующего диапедеза. Кластеризация ICAM-1 и VCAM-1

соответствующими интегринными на лейкоцитах сопровождается путем образования эндотелиальных «стыковочных структур», которые облегчают трансэндотелиальную миграцию (Schäringer et al., 2021; Schimmel et al., 2020). Остановимся подробнее на основных характеристиках этих молекул.

Интегрины – это трансмембранные рецепторы, играющие критическую роль в клеточной адгезии, миграции и сигнальной трансдукции. Они представляют собой гетеродимеры, состоящие из α - и β -субъединиц, которые нековалентно связаны друг с другом. Разнообразие интегринов обеспечивается наличием не менее 15 различных α - и 8 β -субъединиц. Эти субъединицы комбинируются, формируя приблизительно 24 различных типа интегринов, каждый из которых обладает специфичностью к определённым лигандам. Классификация интегринов производится, прежде всего, на основе гомологии их β -субъединиц, выделяя восемь основных подсемейств ($\beta 1$ – $\beta 8$). Различные комбинации α - и β -субъединиц приводят к значительным вариациям в сродстве к лигандам, а также в способности передавать сигналы внутрь клетки.

Интегрины $\beta 1$ (подсемейство VLA) действуют в роли молекулы межклеточной адгезии и внутриклеточной передачи. Считается, что они играют важную роль в заживлении ран и миграции клеток в эмбриогенезе. Подсемейство VLA состоит из шести членов: VLA–1 (CD49a), VLA–2 (CD49b), VLA–3 (CD49c), VLA–4 (CD49d), VLA–5 (CD49e) и VLA–6 (CD49f). Эти молекулы широко распространены и взаимодействуют преимущественно с белками внеклеточного матрикса, такими как ламинин, коллаген и фибронектин (FN).

Интегрин VLA–4 ($\alpha 4\beta 1$) представляет собой димер. Он состоит из CD49d ($\alpha 4$) и CD29 ($\beta 1$) субъединиц, массой 155 кДа и 150 кДа соответственно. VLA–4 экспрессируется на моноцитах, Т- и В-лимфоцитах, базофилах и эозинофилах, но не на нейтрофилах, что, возможно, обеспечивает механизм селективного рекрутирования гранулоцитов при различных патологических состояниях (Fowell et al., 2021; Kumaravel et al., 2020).

Интегрин также стимулирует воспалительный ответ иммунной системы, способствуя миграции лейкоцитов в поврежденную ткань. Однако VLA–4 не

прикрепляется к соответствующим лигандам до тех пор, пока лейкоциты не активируются хемотаксическими агентами или другими стимулами. Первичные лиганды VLA-4 включают VCAM-1 и фибронектин. После связывания с хемокином интегрин претерпевает конформационное изменение α - и β -доменов, которое необходимо для высокоаффинного связывания с лигандами на эндотелиальных клетках.

Экспрессия VLA-4 на плазматической мембране регулируется в зависимости от типа клетки различными факторами роста или хемокинами. В T-клетках IL-4 подавляет экспрессию VLA-4. Антитела против VLA-4 использовались для блокирования инфильтрации лейкоцитов при ЭАЭ (Hollen et al., 2020). В настоящее время существуют препараты (натализумаб, тизабри), которые блокируют взаимодействие VLA-4 с его лигандом VCAM-1 на поверхности эндотелиоцитов ГЭБ, что уменьшает миграцию лейкоцитов из сосудов в паренхиму мозга. Они также способны снижать выраженность текущего воспалительного процесса в ЦНС, опосредованного уже имеющимися в нервной ткани лимфоцитами (Elsbernd et al., 2021).

LFA-1 (интегрин α L β 2, CD11a/CD18) является гетеродимерным гликопротеином с нековалентно связанными субъединицами. Сайт связывания с ICAM находится на α -субъединице.

В неактивном состоянии молекула LFA-1 находится в изогнутой конформации с низким сродством к ICAM-1. Хемокины стимулируют активацию внутриклеточного G-белка Rap1 (repressor/activator Protein 1), который помогает разрушить ограничение между α - и β -субъединицами LFA-1. Конформационные изменения приводят к образованию белкового активационного комплекса, который дополнительно дестабилизирует α - и β -субъединицы. Хемокины также стимулируют I-подобный домен на β -субъединице, обнажая и открывая сайт MIDAS (metal ion-dependent adhesion site) на α -субъединице для связывания. Молекула LFA-1 претерпевает изменения до полностью вытянутой конформации. Эти изменения позволяют молекуле переходить от низкого сродства к высокому за счет открытия сайта связывания лиганда.

Интегрин LFA-1 обнаруживается на всех гемопоэтических клетках, за исключением тромбоцитов (Haghayegh et al., 2020). Он имеет три основных лиганда: ICAM-1 и ICAM-2 на эндотелиальных клетках и лейкоцитах и ICAM-3 только на лейкоцитах. LFA-1 в передней части мигрирующих лимфоцитов может взаимодействовать с ICAM-3 на заднем крае соседних клеток (Mastrogiovanni et al. 2020). Таким образом, лейкоциты могут образовывать цепочки во время трансэндотелиальной миграции (Filippi, 2019). Предполагают, что ведущая клетка может направлять последующие на их выходе из капилляров.

Лигандами для $\beta 2$ -интегринов являются члены суперсемейства иммуноглобулинов, включающих ICAM, VCAM-1, PECAM-1, MAdCAM-1. Эти молекулы играют центральную роль в гуморальных и клеточно-опосредованных иммунных ответах, функционируя вместе с другими рецепторами, как части сигнальных систем (Piechocka et al., 2021; Arif et al., 2021).

VCAM-1 (CD106) представляет собой гликопротеин массой 90 кДа, который преимущественно экспрессируется в эндотелиальных клетках. Молекула VCAM-1 была первоначально идентифицирована как молекула адгезии, активируемая цитокинами, на эндотелиоцитах, опосредующая связывание с лейкоцитами и клетками меланомы. VCAM-1 является лигандом VLA-4.

Структурно VCAM-1 человека содержит внеклеточный домен с шестью или семью иммуноглобулиновыми (Ig)-подобными доменами, трансмембранный домен и цитоплазматический домен. VCAM-1, как и ICAM-1, является регуляторами экстравазации лимфоцитов в очаги воспаления. VCAM-1 также экспрессируется в лимфатических узлах, коже, стромальных клетках костного мозга, синовиальных клетках в воспаленных суставах, дендритных клетках.

В настоящее время идентифицировано пять членов ICAM: ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), ICAM-4 (CD242), и ICAM-5 (телэнцефалин). ICAM-1 является наиболее изученным и экспрессируется на поверхности клеток при воспалении (например, эндотелиальные клетки, лейкоциты, дермальные фибробласты, меланоциты). Он связывается с LFA-1 и Mac-1 на нейтрофилах, T-

клетках и макрофагах и обеспечивает механизм селективного рекрутирования в патологических процессах.

ICAM-1 – это трансмембранный белок, обладающий внеклеточным доменом на N-конце, трансмембранным доменом и цитоплазматическим доменом на C-конце. Внеклеточный домен белка состоит из множества петель, созданных дисульфидными мостиками внутри белка. Доминирующей вторичной структурой белка является β -лист. ICAM-1 представляет собой молекулу межклеточной адгезии, конститутивно присутствующей на низком уровне на мембранах лейкоцитов и эндотелиальных клеток. Многие цитокины, такие как $IFN\gamma$, IL-1 и $TNF\alpha$, повышают экспрессию ICAM на поверхности эндотелия. ICAM-2, состоящий из двух Ig-подобных доменов, конститутивно экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток и связывается с LFA-1. ICAM-3 играет роль в начальной локализации нейтрофилов в местах повреждения тканей и воспалении. Подобно ICAM-1, ICAM-3 имеет пять доменов, экспрессируется на лейкоцитах, и связывается с LFA-1. ICAM-4 взаимодействует с LFA-1 и Mac-1. ICAM-5 (телэнцефалин) экспрессируется на нейронах головного мозга и служит лигандом для LFA-1.

PECAM-1 представляет собой важный трансмембранный гликопротеин, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов. Эта молекула играет ключевую роль в процессе адгезии клеток и взаимодействии между различными типами клеток в организме. PECAM-1 экспрессируется не только на тромбоцитах, но и на эндотелиальных клетках, нейтрофилах, моноцитах и некоторых подмножествах лимфоцитов. PECAM-1 участвует в диапедезе иммунных клеток. Он расположен в межэндотелиальных соединениях, способствуя поддержанию целостности ГЭБ.

В *in vivo* исследованиях на мышах была подтверждена роль PECAM-1 как важного регулятора миграции лимфоцитов в ЦНС. При снижении ее экспрессии наблюдался ухудшение неврологического дефицита из-за повышенной проницаемости ГЭБ (Sharp et. al., 2003).

PECAM-1 способен связываться с такими же молекулами, например, с интегрином $\alpha\beta_3$, который также участвует в адгезии клеток, формируя мультикомплексы. Увеличение сывороточного PECAM-1 было обнаружено в крови и СМЖ пациентов с активным РС (Losy, 2013).

После этапа прочной адгезии лейкоциты способны пересекать ГЭБ между эндотелиоцитами (парацеллюлярно) или через тело клетки (трансцеллюлярно) (Sonar et al., 2017). В первом случае происходит кластеризация ICAM-1 и VCAM-1 вокруг лимфоцитов, что приводит к образованию трансмиграционной чашки за счет актиновых филаментов (Filippi, 2016). Далее запускаются различные сигнальные пути, приводящие к генерации внутриклеточного притока ионов Ca^{2+} , фосфорилирования ключевых молекул, которые регулируют актиновый цитоскелет и генерацию АФК и NO. В конечном счете, происходит разобщение межклеточных соединений (Dragoni et al. 2020).

Показано, что трансцеллюлярная миграция увеличивается при РС (Wu et al., 2016). Как и при парацеллюлярном пути, трансцеллюлярному диапедезу всегда предшествует ICAM-зависимое ползание лейкоцитов на поверхности эндотелиоцитов, формирование трансмиграционной чашки, состоящей из кластеров ICAM-1 и стыковочных структур (Khire et al., 2020).

Недавние исследования подтверждают роль подосомоподобных выпячиваний в поиске путей миграции (Alonso et al., 2019). Подосомы представляют собой актин-зависимые протрузивные органеллы, которые формируются преимущественно на вентральной части мигрирующих клеток. Вскоре после их открытия было показано, что подосомы образуются в лейкоцитах, прикрепленных к эндотелию, и, предположительно, функционируют при экстравазации (Kuo et al., 2018).

В исследовании на модели первичных микрососудистых эндотелиальных клеток головного мозга мышей было показано, что Th1 клетки мигрируют преимущественно посредством трансцеллюлярного диапедеза (Lutz et al., 2017), в то время как Th17 лимфоциты пересекают ГЭБ, используя параклеточный путь (Engelhardt et al., 2012). Исследования на животных с ЭАЭ показали, что Th17

клетки проникают в мозг, главным образом, через сосудистое сплетение посредством LFA-1-опосредованного взаимодействия (Glatigny et al., 2011). Напротив, Th1 субпопуляция проникает через микрососуды спинного мозга за счет молекулы VLA-4 (Glatigny et al., 2011).

После диапедеза трансмиграция происходит в ответ на аблюминальные хемокины в соответствии с хемотаксическим градиентом. Лейкоциты пересекают базальную мембрану эндотелия, попадая в периваскулярное пространство. Для проникновения в паренхиму головного мозга необходимо пройти через *glia limitans* и связанную с ней базальную мембрану, что требует действия матриксных металлопротеиназ. Связь между специфическими уровнями ММП в сыворотке, клиническими данными и активностью МРТ была описана у пациентов с РС (Losy, 2013). ММП, вырабатываемые микроглией в местах проникновения Т-клеток, высвобождаются для разрушения ГЭБ, облегчая миграцию в эндоневральное пространство. Т-лимфоциты распознают специфический аутоантиген в ЦНС, затем реактивируются и размножаются, клонально усиливая иммунный ответ.

Взаимодействие Th1-клеток и АПК, в первую очередь периваскулярных макрофагов, запускает сложный каскад событий, включающий выброс провоспалительных цитокинов и хемокинов, нарушение ГЭБ, рекрутирование дополнительных иммунных клеток, демиелинизацию и аксональное повреждение.

Воспалительный инфильтрат, состоящий из активированных Th1 клеток, макрофагов, микроглии и других иммунных клеток, запускает деструктивные процессы в нервной ткани. Макрофаги и микроглия, активированные IFN γ и TNF α , начинают активно фагоцитировать миелин. Кроме того, высвобождаемые ими протеолитические ферменты, такие как матриксные металлопротеиназы и лимфотоксин повреждают аксоны, нарушая проведение нервных импульсов. Глиальные клетки также участвуют в презентации антигенов Th лимфоцитам, но их патогенное значение до конца не изучено. Активация макрофагов Th1 клетками вызывает высвобождение цитокинов, таких как TNF α , протеазы, NO и

АФК. Некоторые из этих патогенных медиаторов воспаления, в частности $TNF\alpha$ и лимфотоксин, вызывают повреждение миелина (Hernández–Pedro et al., 2013).

Таким образом, координированная передача сигналов, индуцированная цитокинами, хемокинами и молекулами клеточной адгезии на эндотелиоцитах ГЭБ, а также мигрирующих Т–клеток, организует многоступенчатую миграцию энцефалитогенных Т–клеток в паренхиму ЦНС при РС. Молекулы межклеточной адгезии, участвующие в миграции лейкоцитов через ГЭБ при РС, широко представлены на многих соматических клетках, и являются терапевтическими мишенями в лечении РС.

1.5. Глутамат и рассеянный склероз

1.5.1. Общие сведения

Нарушение обмена нейротрансмиттеров может повлиять на процессы не только внутри ЦНС, но и на иммунную регуляцию, в том числе и на периферии, на сосуды ГЭБ, на лейкоцитарно–эндотелиальное взаимодействие (Teleanu et al., 2022). С этой стороны, нейромедиаторы могут быть рассматриваться как иммуномедиаторы. Новые данные показывают, что изменения уровней нейротрансмиттеров в синаптической щели могут способствовать патофизиологии РС, однако их конкретная роль еще не выяснена. Нарушение метаболизма глутамата может способствовать патофизиологии РС, вызывая эксайтотоксическое повреждение нейронов (Акуз et al., 2023). Дизрегуляция взаимодействия между глутаматом и ГАМК приводит к потере синапсов. ГАМКергическая система также играет важную роль, модулируя активность и пластичность нейронных сетей (Wen et al., 2022). Ацетилхолин и дофамин могут влиять на опосредованные Т–клетками воспалительные реакции, тем самым принимая участие в нейровоспалении, связанным с РС (Teleanu et al., 2022). Мелатонин способен влиять на частоту обострений РС, регулируя цикл сна–бодрствования. Дофамин является прямым медиатором нейроиммунных взаимодействий путем модуляции функций клеток как врожденного, так и

адаптивного иммунного ответа (Мельников и др., 2021). Таким образом, дисбаланс нейротрансмиттеров может иметь решающее значение в патофизиологии заболевания, и возникает необходимость в исследованиях для более глубокого понимания их роли при аутоиммунных процессах в ЦНС.

Глутаматергическая передача сигнала – сложный процесс, включающий множество рецепторов и транспортных белков. Воздействие глутамата на нейроны зависит от типа рецептора и его локализации. AMPA– и NMDA–рецепторы играют ключевую роль в быстрой синаптической передаче и эксайтотоксическом повреждении при избытке глутамата (Bowie, 2022). Менее изучены, но не менее важны метаботропные глутаматные рецепторы, которые модулируют синаптическую пластичность и нейрональную возбудимость. Они классифицируются на основе гомологии их последовательностей, механизмов передачи сигналов и фармакологии на три группы (I, II и III) (Hansen et al., 2021; Ribeiro et al., 2017). Изменения экспрессии и функции этих рецепторов могут значительно влиять на патофизиологию РС (Zhou et al., 2014).

Концентрация глутамата в плазме и цельной крови составляет 50–100 мкМ и 150–300 мкМ соответственно, а в межклеточной жидкости (МКЖ) 1–10 мкМ (Boyko et al., 2023). Количество нейромедиатора в нервных окончаниях варьирует около 110 мМ, в СМЖ может колебаться в пределах 2 – 1000 мкМ (Macrez et al., 2016). Этот баланс тщательно поддерживается астроцитами и эндотелиальными клетками (Al Gawwam et al., 2017).

Глутамат вырабатывается из глюкозы или глутамина внутри нейронов и высвобождается в процессе экзоцитоза с помощью синаптических пузырьков, и оказывает влияние на постсинаптические нейроны через его рецепторы. Регуляция внеклеточной концентрации глутамата происходит с помощью белков–переносчиков глутамата (EAAT1–5) (Rose et al., 2018; Zhou et al., 2014). При РС высвобождение глутамата и его транспортеров, а также экспрессия рецепторов или передача сигналов непропорционально увеличиваются (Levite, 2017). Следовательно, эти белки–переносчики необходимы для поддержания концентрации глутамата на нетоксичном уровне. Исследования последних лет

показали, что нарушение функции транспортеров может оказывать влияние на развитие неврологических заболеваний (Pittaluga et al., 2022).

1.5.2. Глутамат и рассеянный склероз

При РС резко увеличивается концентрация глутамата внутри ЦНС. Нейроны чувствительны к этим изменениям, и поддержание баланса нейромедиатора жизненно необходимо. Синаптический глутамат, высвобожденный из пресинаптической мембраны, является основным источником внеклеточного глутамата (Rusakov et al., 2021). Если баланс нарушается, и внеклеточная концентрация нейромедиатора неконтролируемо увеличивается, нейрональные клетки неизбежно погибают из-за его кумулятивного токсического воздействия. Это явление описывается как глутаматная эксайтотоксичность и представляет собой первичный повреждающий механизм, вызывающий гибель нейронов (Kaplan–Arabaci et al., 2022). Каждый из рецепторов глутамата может вовлечься в процесс эксайтотоксичности и вызвать повреждение нейронов. Например, активация NMDA–рецепторов приводит к гибели нервных клеток, пропуская внутрь большое количество ионов Ca^{2+} . Нарушение обмена глутамата, вторичное по отношению к дегенерации нейронов, в течение некоторого времени было связано с более поздними стадиями РС (Al Gawwam et al., 2017; Pal, 2022). Однако совсем недавно исследования начали указывать на то, что изменения в уровнях нейротрансмиттера и экспрессии глутаматных рецепторов могут быть значительными в процессе заболевания на более ранних стадиях, чем первоначально предполагалось (Pittaluga et al., 2022). В двухлетнем исследовании было показано, что уровни глутамата и глутамина заметно меняются с течением времени в белом веществе пациентов с РС, причем в ходе исследования наблюдалось значительное снижение (MacMillan et al., 2016). В целом, экспрессия ферментов, ответственных за выработку и утилизацию глутамата, при РС не сбалансирована (Al Gawwam et al., 2017), что потенциально вызывает тип петли положительной обратной связи, в которой

эксайтотоксичность индуцирует апоптоз аксонов, высвобождая больше количество нейромедиатора (Kuzmina et al., 2020). Это наблюдение предполагает, что в системе гомеостаза глутамата может существовать потенциальная терапевтическая мишень.

В очагах демиелинизации при РС отмечается повышение концентрации глутамата в том числе за счет активации иммунных клеток и дисфункции транспортеров глутамата. По данным МРТ было выявлено увеличение концентрации глутамата в различных отделах головного мозга пациентов с обострением РС, что коррелировало с активностью и тяжестью по шкале EDSS (Malekzadeh Shafaroudi et al., 2018). Увеличение уровня глутамата у пациентов в стадии ремиссии указывает на дисрегуляцию глутаматергической системы при РС (MacMillan et al., 2016; Magdaleno Roman et al., 2024).

Активированные лимфоциты в очагах поражения РС и секретируют цитокины, способствуя увеличению высвобождения глутамата нейронами (Тухватуллин и др., 2026). Демиелинизация и повреждение аксонов, приводят к дисрегуляции транспортеров глутамата (EAAT1–5), расположенных на мембранах нейронов и глиальных клеток. Эти транспортеры, регулируют уровень внеклеточного глутамата, предотвращая эксайтотоксичность. Дисфункция EAAT1 и EAAT2, локализованных в астроцитах, приводит к увеличению внеклеточного глутамата, усилению нейровоспаления и нейродегенерации.

Глутамат может влиять на функциональное состояние ГЭБ. Na^+ –зависимые переносчики глутамата обнаружены на мембранах эндотелиальных клеток, и играют важную роль в регуляции обмена глутамата во внеклеточном пространстве для поддержания его низких концентраций. На аблюминальной стороне эндотелиоцитов присутствуют не менее 3 EAAT, способные перемещать глутамат внутрь клетки, откуда возможен выход через вспомогательные механизмы в просветной мембране (Zaragoza, 2020).

Глутамат способен проникать в эндотелиальные клетки с просветной стороны из кровотока, однако дальнейший его транспорт в мозг невозможен. ГЭБ непроницаем для нейротрансмиттера даже в высоких концентрациях, за

исключением сосудистых сплетений желудочков мозга. Распределение переносчиков глутамата в эндотелиоцитах может способствовать диффузии нейротрансмиттера из паренхимы головного мозга в кровь в соответствии с градиентом его концентрации. Следовательно, снижение уровня нейромедиатора в плазме может снизить его внеклеточные уровни внутри ЦНС (Teichberg et al., 2009).

По данным литературы известно, что избыточное высвобождение глутамата приводило к повышению проницаемости сосудов в коре головного мозга крыс на фоне повторяющихся судорог за счет активации NMDA–рецепторов эндотелиоцитов (Vazana et al., 2016). Блокада этих рецепторов снижала проницаемость барьера в периишемизированной зоне. В нескольких исследованиях показано, что активированные нейтрофилы высвобождают избыточный глутамат, и за счет стимуляции mGluR на эндотелиальных клетках, вызывают дисфункцию ГЭБ (Liu et al., 2018).

Имеется ряд работ, посвященных исследованию влияния глутамата на иммунные клетки, которые также экспрессируют на своей клеточной поверхности несколько типов функциональных глутаматных рецепторов (Pittaluga et al., 2022). При физиологической концентрации, в наномолярном диапазоне, например, в СМЖ (10нМ), нейромедиатор оказывает множественное воздействие на покоящиеся Т–лимфоциты человека (Levite, 2017). Глутамат за счет стимуляции AMPA–рецепторов, высоко экспрессируемых на этих клетках, способен индуцировать или усиливать их ключевые функции: активацию интегринов $\beta 1$ и адгезию к фибронектину и ламинину; хемотаксическую миграцию к хемокину CXCL12/SDF–1 посредством хемокинового рецептора CXCR4, экспрессируемого на Т–клетках; миграцию лимфоцитов при Т–клеточной лимфоме; активацию потенциал–зависимых калиевых токов и др. (Ganor et al., 2012; Ganor et al., 2014).

Кроме того, глутамат способен модулировать эффекторные функции Т–лимфоцитов, стимулированных форболовыми эфирами, антителами к CD3 маркеру, цитокинами или др. Нейромедиатор увеличивает внутриклеточный содержание ионов Ca^{2+} в Т–клетках, усиливает секрецию $\text{IFN}\gamma$ и IL–10 ,

модулирует экспрессию ключевых генов и поверхностную экспрессию некоторых белков в Т-клетках (Levite, 2017; Fatkullina et al., 2013). Глутамат защищает активированные Т-клетки от апоптотической гибели, вызванной активацией клеток, посредством mGluR группы I, и тем самым продлевает жизнь этих лимфоцитам.

Более того, Т-лимфоциты могут вырабатывать глутамат, который способен влиять на другие клетки, например, индуцировать высвобождение нейропротекторных тиолов в астроцитах (Kuzmina et al., 2020). Аутоиммунные Т-клетки 1 и 17 фенотипов участвуют в развитии РС на ранних стадиях (Setiadi et al., 2019). Th17 лимфоциты, вероятно, вырабатывают и выделяют высокие уровни глутамата при патологических состояниях (Kuzmina et al., 2020).

NMDA при очень высокой концентрации (100 – 1000 мкМ) повышает внутриклеточные уровни Ca^{2+} и АФК и индуцирует эксайтотоксичность в Т-клетках человека, а также влияет на секрецию IL-8 и IL-10 в мононуклеарах периферической крови (Mashkina et al., 2007).

Таким образом, нарушение обмена глутамата при РС оказывает влияние не только на аутоиммунные реакции и нейродегенерацию внутри ЦНС, но также на взаимодействие иммунных клеток с церебральными эндотелиоцитами. Изучение функциональной значимости глутамата и его рецепторов в процессах адгезии, миграции Т-лимфоцитов через ГЭБ представляется крайне важным и актуальным для лучшего понимания механизмов межклеточных коммуникаций и поиска новых терапевтических мишеней для лечения РС.

1.5.3. Терапевтические подходы при РС

В настоящее время РС остается неизлечимым заболеванием. Однако современная медицина предлагает широкий спектр терапевтических подходов, направленных на замедление прогрессирования РС и облегчение симптомов. Эти подходы базируются на модуляции иммунной системы, основного фактора, участвующего в развитии аутоиммунного воспаления. Активно исследуются

новые терапевтические мишени, направленные на борьбу с эксайтотоксичностью, процессом чрезмерной стимуляции нейронов, который играет важную роль в патогенезе РС и других нейродегенеративных заболеваний (Pittaluga et al., 2022). Разрабатываются препараты, блокирующие рецепторы глутамата или ингибирующие его высвобождение, что потенциально может замедлить нейродегенеративные процессы при РС.

Одним из широко используемых иммуномодуляторов является интерферон-бета (ИФН-β) (Спирин и др., 2022; Compston et al., 2008). Его механизм действия достаточно сложен и многогранен. После связывания с соответствующими рецепторами на поверхности иммунных клеток, ИФН-β запускает каскад внутриклеточных сигнальных событий. Это приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов (например, TNFα, IL-1β, IL-6), регулирующих молекул, ответственных за воспалительный процесс в ЦНС. Одновременно ИФН-β подавляет пролиферацию Th1 и Th17 лимфоцитов, клеток иммунной системы, играющих ключевую роль в развитии аутоиммунного ответа при РС. Кроме того, ИФН-β влияет на миграцию лейкоцитов через ГЭБ, предотвращая проникновение воспалительных клеток в мозг и спинной мозг. Обнаружена способность ИФН-β регулировать экспрессию нейротропных факторов, что приводит к иммуномодулирующим эффектам (Dhib-Jalbut et al., 2010).

Помимо этих известных эффектов, препарат уменьшает возбуждающие постсинаптические токи, воздействуя на глутамат посредством нового постсинаптического механизма с участием ионов Ca²⁺ в полосатом ядре, которое подвержено дегенерации при прогрессировании РС (DiFilippo et al., 2016). Механизм действия в этом аспекте связан с регуляцией внутриклеточной концентрации кальция. ИФН-β, предположительно, подавляет активацию САМК II (кальмодулин-зависимая протеинкиназа II), связанной с субъединицей GluN2A NMDA-рецепторов (Coultrap et al., 2012).

В исследовании *in vivo* было показано, что глатирамера ацетат (ГА) эффективно снижает индуцированные высокой концентрацией глутамата постсинаптические изменения. ГА способен подавлять активную микроглию и

снижать уровень провоспалительных цитокинов, проявляя нейропротекторный эффект (Levite, 2017). Таким образом, показано его комплексное защитное при лечении РС.

Диметилфумарат (ДМФ) – один из таких препаратов. ДМФ метаболизируется внутри клеток до монометилфумарата (ММФ) и фумарата. ММФ и фумарат воздействуют на различные клеточные сигнальные пути, включая Nrf2–зависимый путь, ответственный за клеточную защиту от окислительного стресса. Стимуляция Nrf2–пути приводит к усиленной экспрессии антиоксидантных ферментов и белков, защищающих от апоптоза. Кроме того, ДМФ и его метаболиты могут модулировать активность микроглии, снижая её провоспалительную активность. Иными словами, ДМФ, помимо своей способности влиять на иммунный ответ при РС, оказывает и прямое нейропротекторное действие, защищая нейроны от повреждения, вызванного эксайтотоксичностью и окислительным стрессом (Luchtman et al., 2016). Монометилфумарат также ингибирует высвобождение глутамата из патогенных Th17 лимфоцитов. Благодаря антинейрональному эксайтотоксическому действию диметилфумарата его предложили в качестве перорального препарата для лечения РС (Luchtman et al., 2016).

Эксайтотоксичность глутамата, опосредованная NMDA–рецепторами, играет решающую роль в патогенезе РС. Сфингозин–1–фосфатные рецепторы (S1PR) являются важными медиаторами нейродегенерации и нейровоспаления в головном мозге и сетчатке (Basavarajappa et al., 2023). Сипонимод является иммуномодулирующим препаратом для лечения РС, селективным модулятором S1PR подтипов 1 и 5 и, как было показано, оказывает благотворное влияние на ЦНС при дегенеративных состояниях. В недавнем исследовании было показано, что сипонимод защищает внутреннюю структуру и функцию сетчатки у мышей от острой эксайтотоксичности, опосредованной NMDA, которая приводила к усилению воспалительного пути NF–kB и увеличению экспрессии TNF α , IL1– β и IL–6 (Miao et al., 2023). Лечение сипонимодом значительно снижало активацию глии и подавляло провоспалительные пути (Basavarajappa et al., 2023). Кроме того,

NMDA–опосредованное воспаление, в том числе, за счет нейротоксической индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS) было значительно уменьшено на фоне препарата. Эти данные показали, что сипонимод вызывает противовоспалительные эффекты за счет подавления активации глии и воспалительных путей, которые могут защитить нервные клетки от эксайтотоксичности.

Исследование 2015 года продемонстрировало многообещающие нейропротекторные свойства финголимода (Landi et al., 2015). Помимо своего основного действия на лимфоциты, подавляя их миграцию из лимфатических узлов в ЦНС, финголиמוד оказывает прямое воздействие на нейрональные процессы. Ключевым аспектом его нейропротекторного механизма является избирательное снижение глутамат–опосредованной кортикальной возбудимости. Исследования на животных моделях показали, что он способствует восстановлению глутаматергической передачи. Это восстановление, по-видимому, связано с регенерацией дендритов. Важную роль в нейропротекторном действии финголимода играет подавление активации микроглии, снижая тем самым ее вредное воздействие на нейроны (Landi et al., 2015). Этот эффект является дополнительным механизмом его нейропротективного действия, способствующим созданию благоприятной среды для восстановления нервной ткани.

Лаквинимод – иммуномодулирующий препарат, находящийся на стадии клинических исследований для лечения прогрессирующей формы РС, обладающий как противовоспалительным, так и нейропротекторным действием. Лечение *in vivo* лаквинимодом уменьшало клиническую картину ЭАЭ на пике заболевания без заметного воздействия на маркеры воспаления. Применение лаквинимода *in vitro* на срезах мозжечка в модели ЭАЭ снижало глутаматергические изменения, без уменьшения астроглиоза и воспаления. Более того, такое лечение вызывало увеличение количества мРНК Slca3, кодирующей глиальный транспортер глутамат–аспартат (GLAST), не влияя при этом на содержание белка. Одновременно с этим лаквинимод значительно повышал

уровни глиального белка–переносчика глутамата 1 (GLT–1), а фармакологическая блокада функции GLT–1 полностью устраняла антиэксайтотоксический эффект лаквинимода (Gentile et al., 2018).

Хотя антагонисты NMDA– и AMPA–рецепторов могут снижать эксайтотоксичность глутамата при РС, ни один из подходов не является достаточно эффективным в лечении, не вызывая при этом серьезных побочных эффектов (Green et al., 2021). До сих пор не существует терапии патологий ЦНС, при которых нарушается баланс глутамата с сопутствующей эксайтотоксичностью. Поэтому важен поиск новых эффективных терапевтических стратегий.

Некоторые исследования на животных моделях РС показали, что антагонисты AMPA–рецепторов способны эффективно снижать симптомы заболевания и замедлять развитие патологических изменений, в частности, нейродегенерацию (Coultrap et al., 2012). Механизм действия этих препаратов заключается в блокировании связывания глутамата с AMPA–рецепторами, тем самым снижая уровень возбуждения нейронов и предотвращая их повреждение. Конкурентные антагонисты, такие как NBQX, PNQX, YM–90K и ZK200775, конкурируют с глутаматом за связывание с рецептором. Их эффективность обусловлена способностью блокировать активность рецептора, предотвращая вход ионов натрия и кальция в нейрон и тем самым уменьшая его возбудимость. Исследования показали, что блокада AMPA–рецепторов приводит к улучшению клинической картины на животных моделях РС, что проявляется в улучшении аксональной дегенерации и повышении жизнеспособности олигодендроцитов (French et al., 2012). Неконкурентные антагонисты, такие как алампанел и перампанел, связываются с AMPA–рецепторами в аллостерических центрах, изменяя их конформацию и снижая их чувствительность к глутамату. Перампанел, например, является селективным антагонистом AMPA–рецепторов, одобренным в США и Европе для лечения фокальной эпилепсии (Hanada et al., 2011). Исследования, посвященные оценке эффективности перампанела при лечении РС, болезни Паркинсона или профилактике мигрени, показали, что

препарат практически неэффективен при этих патологиях. В работе 2014 года показано, что блокада AMPA–рецепторов аутореактивных Т–лимфоцитов предотвращает их активацию глутаматом, снижая тем самым цитокин–опосредованные эффекты (Ganor et al., 2014). Антагонист NMDA–рецепторов мемантин конкурентно ингибирует активность глутамата и используется для лечения болезни Альцгеймера.

Амантадин и мемантин, блокаторы NMDA–рецепторов показали эффективность в уменьшении секреции провоспалительных цитокинов в модели ЭАЭ (Pittaluga et al., 2022). Однако исследование EMERITE (Peuro et al., 2016) не подтвердило эффективность мемантина при лечении РС. Рилузол, неконкурентный антагонист NMDA–рецепторов, не только блокирует NMDA–рецепторы, но также ингибирует высвобождение глутамата как из нейронов, так и из микроглии (Levite, 2017). Амитриптилин, трициклический антидепрессант, способен блокировать NMDA–рецепторы и снижать эксайтотоксичность (Levite, 2017).

Стимуляция метаботропных глутаматных рецепторов, особенно mGluR II и III, приводит к снижению высвобождения глутамата, проявляя нейропротекторный эффект (Baskys et al., 2005). Это снижает вероятность запуска каскада эксайтотоксических событий. В отличие от них, стимуляция mGluR I может, наоборот, усиливать эксайтотоксичность, что обусловлено их постсинаптическим расположением и механизмом действия. Активация mGluR I приводит к активации фосфолипазы C, которая, в свою очередь, вызывает образование инозитолтрифосфата и диацилглицерина (Pittaluga et al., 2022), повышающие уровень внутриклеточного кальция.

Было доказано, что потеря взаимодействия между GluR2, который является субъединицей AMPA–рецепторов, и глицеральдегид–3–фосфатдегидрогеназой может снизить эксайтотоксичность (Zhai et al., 2013). В 2015 году субъединицы метаботропных глутаматных рецепторов были представлены в качестве фармакологических мишеней для лечения РС (Malekzadeh Shafaroudi et al., 2018). Сообщалось, что умеренное увеличение экспрессии переносчиков глутамата

стабилизирует концентрацию внеклеточного глутамата, что свидетельствует об их терапевтической ценности.

Миноциклин, тетрациклиновый антибиотик второго поколения, используемый для лечения акне и подавления воспаления, был протестирован в качестве препарата для терапии РС. Препарат *in vitro* снижает выработку ММП–9 и ослабляет трансмиграцию Т–клеток через фибронектиновый барьер (Collongues et al., 2022). Антиапоптотический эффект миноциклина изучали на смешанных культурах спинного мозга, обработанных глутаматом или каинатом в течение 24 часов. Препарат ингибировал, вызванную эксайтотоксичностью, гибель нейронов и пролиферацию клеток путем снижения высвобождения метаболитов оксида азота и $\text{IL-1}\beta$. Более того, миноциклин уменьшал активацию микроглии в культурах клеток головного мозга, обработанных $\text{IFN}\gamma$ и липополисахаридами, и способствовал ремиелинизации за счет усиления клеток–предшественников олигодендроцитов и незрелых олигодендроцитов (Defaux et al., 2013). Предварительное лечение препаратом *in vivo* задерживало течение заболевания у мышей в модели ЭАЭ с минимальными признаками воспаления и демиелинизации в ЦНС, что приводило к улучшению координации движений (Collongues et al., 2022). Нейропротекторный эффект миноциклина является следствием индукции антиапоптотических внутриклеточных сигнальных путей.

В 2016 году был разработан глуномаб – моноклональное антитело, избирательно взаимодействующее с регуляторным сайтом субъединицы GluN1 NMDA–рецептора. Ключевым аспектом является его специфическое воздействие на сайт, чувствительный к тканевому активатору плазминогена, сериновой протеазе, вовлечённой в процессы воспаления и репарации тканей при повреждении ГЭБ. Механизм действия глуномаба заключается в модуляции активности NMDA–рецепторов, он также способен снижать миграцию лейкоцитов через монослой эндотелиальных клеток *in vitro*. В мышинных моделях Глуномаб уменьшал прогрессирование клинической картины за счет восстановления функции ГЭБ (Macrez et al., 2016).

Было также предложено удаление избыточного глутамата из мозговой ткани за счет аспаратаминотрансферазы (АСТ), помогающей перенести аминокетильные группы от глутамата к оксалоацетату (Li et al., 2014). Внутривенное введение АСТ позволяет «выкачивать» глутамат из мозга в кровяное русло, где он затем превращается в менее активные метаболиты. Подобный подход интересен тем, что он не блокирует глутаматергическую передачу полностью, а регулирует её интенсивность, тем самым избегая потенциальных нарушений когнитивных функций. Однако на данный момент отсутствуют данные о применении этой технологии в контексте ЭАЭ или РС. Необходимо оценить эффективность и безопасность такого подхода, а также решить проблемы, связанные с проницаемостью ГЭБ для АСТ и потенциальным накоплением метаболитов глутамата в периферической крови. Также исследователи рассматривают варианты доставки АСТ непосредственно в ЦНС, например, используя наночастицы, что потенциально повысит эффективность метода.

Таким образом, изменения в глутаматергической системе, непосредственные эксайтотоксические эффекты на нейроны, а также глутамат-индуцированные клеточные повреждения, включая влияние на олигодендроциты, астроциты, эндотелиальные и иммунные клетки, являются одними из доминантных при РС. Глутамат и его рецепторы могут являться перспективной фармакомишенью при лечении заболевания. Дальнейшее изучение патогенеза РС и молекулярных механизмов, лежащих в основе нейроиммунного взаимодействия, будет способствовать улучшению диагностики и прогнозированию течения заболевания, разработке новых терапевтических подходов и эффективных препаратов для лечения РС.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

2.1.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования выделяли мононуклеары из периферической крови пациентов с РС и условно-здоровых доноров, а также эндотелиальные клетки HUVEC, полученные из пупочной вены человека. Клинико-эпидемиологическая характеристика доноров представлена в подглаве 3.1.

2.1.2. Перечень использованных реактивов

В работе использовались реагенты, красители, антитела и растворы, представленные в таблицах 2, 3, 4.

Таблица 2. Список реагентов и красителей, использованных в работе

Наименование	Производитель
Бычий сывороточный альбумин (БСА)	Диаэм, Россия
Антагонист NMDA-рецепторов (+)-МК 801 ((5S,10R)-(+)-5-метил-10,11-дигидро-5H-дибензо[a,d]циклогентен-5,10-имин малеат)	Tocris, Великобритания
Антагонист AMPA-рецепторов NBQX disodium salt (2,3-диоксо-6-нитро-7-сульфамоилбензо[f]хиноксалин)	Tocris, Великобритания
Гентамицина сульфат	Дальхимфарм, Россия
Гепарин Натрия 5000 МЕ/мл	Эллара, Россия
Желатин тип В	ПанЭко, Россия
Индикатор жизнеспособности клеток PrestoBlue® Cell Viability Reagent	Invitrogen, США
Среда культивирования DMEM/F-12 (1:1)	Gibco, Великобритания
Среда культивирования RPMI 1640 Medium без L-глутамина	Gibco, Великобритания
Трипсина раствор 0.25%	ПанЭко, Россия
Фиколл	ПанЭко, Россия
ЭДТА (Этилендиаминтетрауксусная кислота)	Serva, Германия
Эмбриональная бычья сыворотка	HyClone, США

Этанол	Химреактивснаб, Россия
4-форбол-12-мирилат-13-ацетата (ФМА)	Tocris, Великобритания
CellTrace™ CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester), набор для определения пролиферации клеток	Thermo Fisher Scientific, США
ECGS (Endothelial cell growth supplement) из нервной ткани крупного рогатого скота	Sigma, США
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	AppliChem, Германия
Glycine	Tocris, Великобритания
HEPES Na-соль	ПанЭко, Россия
L-глутамин	ПанЭко, Россия
L-glutamin acid	Tocris, Великобритания
CaCl ₂ KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ NaOH	Химреактивснаб, Россия
NMDA (N-methyl-D-aspartate)	Tocris, Великобритания
Phosphate buffered saline tablet	Sigma, США
(S)-АМРА ((S)-альфа-аминометилизоксазолпропионовая кислота)	Tocris, Великобритания
TNF α (Tumor necrosis factor alpha)	Promega, США

Таблица 3. Список антител, использованных в работе

Антитело	Производитель/кат. №
APC Mouse Anti-Human CD4	BDBiosciences / 555349
BB515 Mouse Anti-Human CD49d	BD Biosciences / 564593
BB700 Mouse Anti-Human CD183	BD Biosciences / 588532
BV421 Mouse Anti-Human CD196	BD Biosciences / 562515
PE Mouse Anti-Human CD194	BD Biosciences / 551120
Anti-Human CD3, клон ОКТ3	eBioscience / 2067619
Purified NA/LE Mouse Anti-Human CD28, клон CD28.2	BD Biosciences / 555725
Anti-mouse IgG Fab2 Alexa Fluor® 488	Cell Signaling / 144083
BB515 Mouse Anti-Human CD49d	BD Biosciences / 564593
Human CD31 (PECAM-1)	Invitrogen / QA214042
VCAM-1 / CD106	Invitrogen / QG2051454
Mouse IgG1	Invitrogen / UE2777450

Таблица 4. Составы растворов и буферов

1 [×] натрий–фосфатный буфер (PBS)	137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na ₂ HPO ₄ , 1.76 мМ KH ₂ PO ₄ ; pH 7.2–7.4
0.02 % раствор Версена	0.2 г/л ЭДТА, 0.2 г/л KCl, 2.89 г/л Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O, 8 г/л NaCl, вода деионизованная

Вещества, использованные для приготовления буферных растворов, имели маркировку особо чистые или химически чистые.

2.1.3. Перечень использованных материалов

В исследованиях использовались следующие материалы: 6–, 12–, 48– и 96–луночные планшеты (Corning, США); культуральные фласки с поверхностью роста клеток 25 и 75 см², микропробирки объемом 0.6 мл и 1.5 мл (Eppendorf, Германия); пробирки типа Falcon объемом 15 мл и 50 мл (Eppendorf, Германия), серологические пипетки объемом 10 мл и 25 мл (Corning, США).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Забор крови/биоматериала

Кровь (20 мл) забирали пункцией локтевой вены натоцак в условиях процедурного кабинета. Кровь, собранную в стеклянный флакон, содержащую 30 мл 1[×] PBS и ЭДТА (конечная концентрация 1.8 мМ) в качестве антикоагулянта, доставляли не позднее 2 часов от момента забора при комнатной температуре в условиях, исключающих резкое встряхивание и перемешивание.

2.2.2. Выделение и культивирование лимфоцитов периферической крови

Мононуклеары выделяли из периферической венозной крови больных РС и условно–здоровых доноров по стандартной методике центрифугирования в

градиенте плотности фиколла (1.077 г/см^3) (Вюит, 1968). Все работы проводили в стерильном ламинарном боксе.

Моноцитарную фракцию элиминировали адгезией в 6-луночных планшетах в течение 2 ч при 37° в атмосфере 5 % CO_2 . Лимфоциты отмывали дважды (5 мин, 400 г) $1 \times \text{PBS}$, затем инкубировали в 6-луночных планшетах (37°C , 5 % CO_2) в 2 мл полной среды культивирования RPMI-1640 без *L*-глутамин, содержащей 10 % эмбриональную телячью сыворотку (FBS), 50 мкг/мл гентамицина сульфата.

Содержание CD3^+ клеток оценивали с помощью проточной цитометрии с применением моноклональных антител к CD3. Чистота популяции составляла более 90 % (данные не приведены).

2.2.3. Определение жизнеспособности лимфоцитов периферической крови

Лимфоциты после 2-часовой элиминации моноцитов отмывали от среды культивирования $1 \times \text{PBS}$, разводили в 500 мкл 2 % FBS (в $1 \times \text{PBS}$) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Клетки рассаживали в 96-луночные культуральные планшеты, плотность составила 10^5 на 100 мкл среды RPMI-1640 без *L*-глутамин, содержащей 10 % эмбриональную телячью сыворотку, 50 мкг/мл гентамицина сульфата.

Для изучения роли NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата в регуляции функций T-клеток и эндотелиоцитов HUVEC использовали агонисты и антагонисты данных рецепторов. В качестве агонистов применяли глутамат, глицин (коагонист NMDA-рецепторов), NMDA (N-метил-D-аспартат), sAMPA ((S)-альфа-аминометилизоксазолпропионовая кислота). Блокада NMDA-рецепторов производилась неконкурентным антагонистом МК-801, блокада AMPA-рецепторов – неселективным антагонистом NBQX.

Клетки инкубировали в течение 72 ч с добавлением агонистов (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA в диапазоне концентраций от 0.01 до 1000 мкМ) и антагонистов (МК-801, NBQX в диапазоне концентраций от 0.01 до 100 мкМ) глутаматных рецепторов. Дополнительно исследовали совместное влияние

глутамата в концентрации 100 мкМ и глицина в диапазоне концентраций от 0.1 до 1000 мкМ. Жизнеспособность лимфоцитов оценивали колориметрическим методом с помощью витального красителя PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen, США) на мультипланшетном анализаторе «EnSpire® Multimode Plate Readers» (Perkin Elmer, США) согласно протоколу фирмы–производителя. Уровень жизнеспособности в контрольной группе интактных клеток принимали за 100 %.

2.2.4. Иммунофенотипирование Т–лимфоцитов

Выделенные лимфоциты активировали течение 24 ч моноклональными антителами к CD3 (αCD3 МКА, 2.5 мкг/мл) и к CD28 (αCD28 МКА, 1.25 мкг/мл) с последующим добавлением агонистов (глутамат) и антагонистов (МК–801, NBQX) глутаматных рецепторов в конечной концентрации 100 мкМ. Концентрации используемых веществ были выбраны на основании данных предыдущих этапов научно–исследовательской работы (НИР) (Зайнуллина, 2013; Фаткулина, 2015), а также результатов исследования цитотоксичности изучаемых веществ, приведенных в подглаве 3.2. Затем клетки (10^6 клеток/образец) отмывали от среды культивирования холодным $1\times$ PBS, разводили в 500 мкл 2 % FBS (в холодном $1\times$ PBS) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре (для блокировки Fc–рецепторов). Далее добавляли моноклональные антитела, меченные флюорохромами к хемокиновым рецепторам. Рабочая концентрация антител соответствовала протоколу фирмы производителя (CD4 – 20 мкл/образец, CD183 – 5 мкл/образец, CD194 – 5 мкл/образец, CD196 – 5 мкл/образец). Клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте, после чего отмывали $1\times$ PBS.

Иммунофенотипирование Т–лимфоцитов осуществляли путем окрашивания клеток моноклональными антителами к поверхностным CD–маркерам лимфоцитов: CD4, конъюгированным с флуоресцентным красителем алофикоцианином (APC), CD183 (CXCR3), конъюгированным с танденным

красителем бриллиантовым синим 700 (BB700), CD194 (CCR4), меченным фикоэритрином (PE), CD196 (CCR6), конъюгированным с Brilliant™ Violet 421 (BV421). Th1 клетки идентифицировали как CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻, Th2 лимфоциты обладали фенотипом CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺, Th17 и T17.1 клетки описывали как CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ и CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ соответственно (Yu et al., 2020).

Интенсивность флуоресценции детектировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, США). В каждой пробе анализировали 100000 событий. Анализ экспрессии молекул адгезии проводили по медиане гистограммы флуоресценции в программе BD FACSDiva™ Software (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, США). В качестве контроля использовали окрашенные клетки без добавления веществ.

2.2.5. Определение уровня поверхностной экспрессии молекулы адгезии VLA-4 T-клетками

Клетки (10⁶ клеток/образец) инкубировали с моноклональными антителами (МКА) к CD3 молекуле (2.5 мкг/мл) совместно с глутаматом (100 мкМ), МК-801 (100 мкМ), NBQX (100 мкМ) в течение 24 ч. Оценку уровня поверхностной экспрессии молекул адгезии проводили методом непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания. Клетки отмывали от среды культивирования 1× PBS, разводили в 500 мкл 0.5 % БСА в 1× PBS (для блокировки Fc-рецепторов) и инкубировали 10 мин. Затем добавляли антитела к CD49d (VLA-4), конъюгированным с BV515 (рабочая концентрация антител – 5 мкл/образец). Клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте, далее однократно отмывали 1× PBS.

Интенсивность флуоресценции детектировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, США). В каждой пробе анализировали 100000 событий. Анализ

экспрессии молекул адгезии проводили по медиане гистограммы флуоресценции в программе BD FACSDiva™ Software (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, США). В качестве контроля использовали окрашенные клетки без добавления веществ.

2.2.6. Выделение и культивирование клеток HUVEC

Клетки HUVEC выделяли из пупочной вены согласно модифицированному протоколу (Jaffe et al., 1973). Пуповину получали после родоразрешения от неосложненной беременности. От рожениц было получено информированное согласие на участие в исследовании. Транспортировка осуществлялась в стеклянном флаконе, содержащем 100 мл 1×PBS и 50 мкг/мл гентамицина.

Материал отмывали от сгустков крови и слизи раствором 1×PBS. С помощью насадки урологического катетера и шприца полость вены промывали теплым раствором 1×PBS до полного удаления крови, заполняли раствором трипсина/версена (1:3) для ферментативной обработки при 37 °C в течение 20 мин. Раствор трипсина, содержащий клетки, собирали в пробирку объемом 50 мл путем перфузии полости вены 20 мл неполной среды DMEM/F12. Полученный элюат осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин, и клеточный осадок ресуспендировали в полной среде DMEM/F12, содержащей 20 % эмбриональную бычью сыворотку, 30 мкг/мл добавки для роста эндотелиальных клеток ECGS, 2 mM L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина. Предварительно готовили фласки, покрытые раствором 1 % желатина в 1×PBS. Ресуспензированный осадок клеток переносили в подготовленные фласки и культивировали до формирования монослоя при 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO₂. Смену ростовой среды производили через 24 ч после посева клеток и далее через каждые 2–3 дня. Культуры пассировали с использованием раствора трипсина/версена (1:3). Формирование монослоя клеток HUVEC отслеживали с помощью световой микроскопии. Жизнеспособность клеток при пересеве

оценивали при инкубации клеток с раствором 0.04 % трипанового синего. В экспериментах использовали клетки 3–6 пассажа.

2.2.7. Определение жизнеспособности клеток HUVEC

Для анализа жизнеспособности клетки HUVEC рассаживали в 96–луночные культуральные планшеты, обработанные 1 % желатином, плотность составила 10^4 клеток на лунку (конфлюентность монослоя 80 – 90 %) в 100 мкл среды. Эндотелиоциты активировали инкубацией в течение 24 ч с провоспалительным цитокином TNF α в концентрации 100 нг/мл (концентрация цитокина экспериментально подобрана титрованием на основании предыдущих результатов НИР). Еще через 24 ч добавляли агонисты (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA в диапазоне концентраций от 0.1 до 1000 мкМ) и антагонистов (МК–801, NBQX в диапазоне концентраций от 0.01 до 100 мкМ) глутаматных рецепторов. Дополнительно исследовали совместное влияние глутамата в концентрации 100 мкМ и глицина в диапазоне концентраций от 0.1 до 1000 мкМ. Жизнеспособность эндотелиоцитов HUVEC оценивали через 48 часов после инкубации клеток с веществами с помощью витального красителя PrestoBlue Cell Viability Reagent на мультипланшетном анализаторе «EnSpire® Multimode Plate Readers» (Perkin Elmer, США) согласно протоколу фирмы–производителя. Уровень жизнеспособности в контрольной группе интактных клеток принимали за 100 %.

2.2.8. Оценка уровня поверхностной экспрессии молекул адгезии, локализованных на эндотелиальных клетках HUVEC, в условиях моделирования повреждения *in vitro*

Для моделирования повреждения ГЭБ *in vitro* эндотелиоциты HUVEC обрабатывали провоспалительным цитокином TNF α в концентрации 100 нг/мл. Одновременно добавляли агонисты (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA) и

антагонисты (МК–801, NBQX) глутаматных рецепторов в конечной концентрации 100 мкмоль/мл.

После 24–часовой инкубации клеток с веществами проводили оценку уровня поверхностной экспрессии молекул адгезии VCAM–1, PECAM–1 методом непрямого иммуофлуоресцентного окрашивания с моноклональными антителами с последующей окраской вторичными антителами Anti–mouse IgG Fab2 Alexa Fluor® 488. В качестве отрицательного контроля использовали рекомендованные производителем изотипические антитела. При поверхностном окрашивании молекул адгезии клетки отмывали от среды культивирования 1× PBS, разводили в 100 мкл 0.5 % FBS (для блокировки Fc–рецепторов) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования 4 мин при 400 g и отмывания 1× PBS добавляли первичные антитела к соответствующим молекулам адгезии VCAM–1, PECAM–1 (рабочая концентрация для всех первичных антител 1 мкг/мл) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После отмывания и блокировки Fc–рецепторов проводили инкубацию с вторичными антителами, конъюгированными Alexa Fluor® 488 (разведение 1:200), в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте.

Интенсивность флуоресценции детектировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, США). В каждой пробе анализировали 10000 событий. Анализ представленности молекул адгезии проводили по медиане гистограммы флуоресценции в программе BD FACSDiva™ Software (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, США). В качестве контроля использовали окрашенные клетки HUVEC без добавления веществ.

2.2.9. Анализ адгезии лимфоцитов к клеткам HUVEC

После 24–часовой активации с МКА к CD3 и CD28 (концентрация 2.5 и 1.25 мкг/мл соответственно) лимфоциты предварительно окрашивали красителем

CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) в течение 10 мин при комнатной температуре, согласно протоколу фирмы производителя. Затем клетки 30 мин инкубировали при 37 °С с агонистами (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA) и антагонистами (МК-801, NBQX) глутаматных рецепторов в конечной концентрации 100 мкмоль/мл, после чего помещали в лунки 96-ти луночного культурального планшета (10⁵ клеток на лунку) с монослоем эндотелиоцитов HUVEC (30000 клеток на лунку, конфлюэнтность монослоя 80–90 %). Адгезию проводили в течение 30 мин, лунки дважды отмывали от неприкрепившихся клеток буфером, содержащим 1× PBS, 1 мМ CaCl₂ и 2 мМ HEPES. Детекцию флуоресценции проводили, используя мультипланшетный анализатор EnSpire® Multimode Plate Readers» (Perkin Elmer, США). Уровень адгезии определяли по следующей формуле (1).

$$\text{Адгезия} = ((A - B) / (C - B)) \times 100, (1)$$

где

A – уровень флуоресценции в опытной лунке, после отмывки неприкрепившихся клеток, окрашенных CFSE;

B – уровень флуоресценции в лунке без добавления окрашенных CFSE клеток (минимальный уровень флуоресценции);

C – уровень флуоресценции в лунке с окрашенными CFSE клетками, без отмывки неприкрепившихся клеток (максимальный уровень флуоресценции).

Процент адгезии рассчитывали по отношению к контролю, который принимали за 100 %.

2.2.10. Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью MS Excel (Microsoft, США), Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, США), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в

виде медианы с указанием в скобках 90 % – интерпроцентильного размаха (5– 95 процентиля) (Me [Q1; Q2]). Для выявления значимости различий между двумя независимыми выборками (здоровые доноры и доноры – больные РС) применяли непараметрический U -критерий Манна–Уитни, для сравнения зависимых выборок внутри экспериментальных групп – t -критерий Вилкоксона. Корреляционный анализ проводили с помощью подсчета рангового коэффициента корреляции Спирмена (r). Различие групп считали статистически достоверным при $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Клинико–эпидемиологическая характеристика доноров

В исследование было включено 58 больных с достоверным диагнозом РС согласно критериям W. McDonald от 2017 г. (Hartung et al., 2019), состоящих на учете в центре рассеянного склероза Республики Башкортостан на базе РКБ им. Г.Г. Куватова и в студенческом центре при ГБУЗ РБ ГКБ № 5 г. Уфа. У всех больных, включенных в исследование, при осмотре выявлены характерные клинические проявления РС в виде симптомов многоочагового поражения ЦНС («диссеминация в пространстве»). Перед началом экспериментов у всех доноров было получено письменное информированное согласие. Работа получила одобрение в локальном этическом комитете при ИБГ УФИЦ РАН.

Группа больных РС состояла из 30 (51.7 %) женщин и 28 (48.3 %) мужчин (табл. 5). Средний возраст составил 21.5 [20.0; 22.5] год (от 19 до 24 лет). Длительность заболевания определялась от момента постановки диагноза врачом-неврологом до момента исследования и составила 2.8 [2.0; 4.0] лет (от 10 месяцев до 8 лет).

Распределение больных РС по национальности: 28 человек (48.3 %) – русские, 19 (32.8 %) – татары, 3 (5.2 %) – башкиры, 2 (3.4 %) – чуваш, 1 (1.7 %) – украинец, 1 (1.7 %) – дагестанец, 4 (6.9 %) – смешанной национальности.

Тип течения заболевания уточнялся при непосредственном сборе анамнеза во время осмотра, а также на основании изучения данных амбулаторных карт и регионального регистра больных РС.

Ремиттирующий РС был установлен у 57 (98.3 %) пациентов, ППРС у 1 (1.7 %) пациента. Стадия обострения наблюдалась у 27 (46.5 %) пациентов, стадия ремиссии у 31 (53.5 %). Активность РС оценивалась по данным МРТ, характеризующихся появлением новых и/или увеличением размера старых очагов

на Т2–ВИ и/или наличием накапливающих парамагнитный контраст очагов на Т1–ВИ в головном и/или спинном мозге. Активный РС наблюдался у 28 (48.3 %) больных, из них высокоактивный рассеянный склероз (ВАРС) у 2, неактивный у 30 (51.7 %).

Выраженность неврологического дефицита у больных РС определялась однократно на момент взятия крови с помощью расширенной шкалы оценки степени инвалидизации EDSS, позволяющей оценить трудоспособность больного и степень его адаптации к патологическим изменениям (Kurtzke, 1983). Средний показатель по шкале EDSS составил 2.2 [2.0; 4.0] балла. Оценивалась скорость прогрессирования (СП) заболевания, которая рассчитывалась как отношение показателя EDSS (балл) к длительности болезни (год). Были выделены три варианта прогрессирования: медленный (СП < 0.25 балла в год), умеренный (0.25 < СП < 0.75 балла в год), быстрый (СП > 0.75 балла в год). Средняя скорость прогрессирования заболевания составила 0.5 [0.2; 2.0] балла EDSS в год.

Средний возраст дебюта РС, который определялся по появлению первых симптомов, зафиксированных в медицинской документации, составил 18.0 [16.5; 20.0] лет. В начале заболевания наблюдались следующие нарушения: ретробульбарный неврит у 22 человек (37.9 %), двигательные – у 13 (22.4 %), мозжечковые – у 9 (15.5 %), стволовые – у 7 (12.1 %), сенсорные нарушения – у 6 (10.4 %), полисимптомное начало – у 1 (1.7 %).

Городскими жителями были 48 (82.8 %) больных РС, сельскими – 10 (17.2 %). Семейный анамнез РС имелся у 8 пациентов.

ПИТРС принимали 36 (62.1 %) больных РС, из них интерферон бета (Ребиф, Инфибета, Авонекс, Синновекс, Плегриди) принимали 24 (66.7 %), окрелизумаб (Окревус) – 4 (11.1 %), глатирамера ацетат (Копаксон, Тимексон) – 3 (8.4 %), натализумаб (Тизабри) – 2 (5.5 %), кладрибин – 2 (5.5 %), терифлунамид – 1 (2.8 %). Остальные пациенты не находились на терапии ПИТРС.

Контрольную группу составили 58 условно–здоровых добровольцев, среди которых 29 женщины (50 %) и 29 мужчин (50 %), соответствующие исследуемой группе по полу, возрасту, национальности и месту проживания. Средний возраст

составил 22.0 [20.0; 23.5] лет. В исследовании не участвовали доноры с острой неврологической патологией, врожденными пороками развития органов и систем, аутоиммунными заболеваниями, а также в период обострения хронических заболеваний, в том числе аллергических и инфекционных.

Распределение контрольной группы по национальному составу: 29 человека (50 %) – русские, 19 (32.8 %) – татары, 8 (13.8 %) – башкиры, 2 (3.4 %) – смешанной национальности.

Таблица 5. Клинико–эпидемиологическая характеристика исследуемых групп

Показатель	Больные РС, (n=58) Me [Q1; Q2]	Контрольная группа, (n=58) Me [Q1; Q2]
Мужчины/Женщины	28/30	29/29
Национальность:		
Русские	28	29
Татары	19	19
Башкиры	3	8
Чуваши	2	
Украинцы	1	
Дагестанцы	1	
Смешанные	4	2
Обострение/Ремиссия	27/31	–
Активный/Неактивный	28/30	–
Возраст, годы	21.5 [20.0; 22.5]	22.0 [20.0; 23.5]
Возраст дебюта, годы	18.0 [16.5; 20.0]	–
Возраст постановки диагноза, годы	19.0 [18.0; 21.0]	–
Интервал «дебют болезни – диагноз», годы	0.5 [0; 1.0]	–
Длительность первой ремиссии, годы	2.0 [0.5; 3.0]	–
Длительность заболевания, годы	2.8 [2.0; 4.0]	–

Тяжесть по шкале EDSS, баллы	2.2 [2.0; 4.0]	–
Скорость прогрессирования, баллы EDSS / год	0.5 [0.2; 2.0]	–

Примечание: Количественные переменные описывали следующими параметрами: числом пациентов, медианой, 5–ым и 95–ым перцентилями (Me [Q1; Q2]).

Исследование выявило ряд интересных закономерностей. Результаты показали, что клиническая картина РС у молодых людей, обучающихся в высших и средних специальных учебных заведениях, в целом схожа с картиной заболевания у других пациентов в возрасте от 15 до 24 лет (Тухватуллин и др., 2021). На начальной стадии болезни, у обеих групп преобладали схожие симптомы: ретробульбарный неврит, двигательные и мозжечковые нарушения. Это наблюдение весьма значимо, так как известно, что начальные проявления РС обладают прогностической ценностью. Например, полисимптомный дебют (несколько симптомов одновременно) и наличие нарушений со стороны ствола головного мозга и мозжечка указывают на более неблагоприятное течение заболевания.

Большинство студентов, участвующих в исследовании, имели ремиттирующий тип РС, что соответствует общепринятым данным о типичном течении РС в первые годы заболевания. В клинической картине больных РС студентов преобладают двигательные нарушения в виде центральных парезов и мозжечковой атаксии. Однако среди студентов зафиксировано много случаев быстро прогрессирующего и высокоактивного РС, а дебют и течения схожи с педиатрическим РС (Тухватуллин и др., 2021). Педиатрический РС (до 18 лет) составляет около 4–5 % от общего числа случаев, характеризуется преимущественным поражением головного мозга, тяжелым течением с частыми обострениями и полиморфной симптоматикой.

Примечательно, что у студентов начало заболевания и его диагностика происходят в период обучения, что вероятно связано с ежегодным прохождением периодических медицинских осмотров, а также с психоэмоциональными

трудностями, испытываемыми из-за учебы (Тухватуллин и др., 2021). В данной группе был отмечен короткий период между началом заболевания и установлением диагноза. Это позитивный момент, свидетельствующий о своевременном обращении к медицинским специалистам и эффективной диагностике. Короткий интервал «дебют болезни – диагноз» может быть связан с повышенной бдительностью как самих студентов, так и медицинских работников, что позволяет быстрее начать лечение и улучшить прогноз.

Для студентов характерна высокая СП заболевания, несмотря на применяемую терапию ПИТРС. Выявленные клинические особенности РС у студентов, возможно, являются следствием меньшей длительности заболевания и короткого периода применения ПИТРС, недостаточных для оценки эффективности терапии. Основными препаратами для терапии РС в группе студентов являлись ПИТРС первой линии (препараты интерферона бета и глатирамера ацетат), которые требуют наблюдения за эффективностью лечения. Учитывая активный социальный образ жизни студентов, возникает проблема контроля приверженности их применяемому лечению и соблюдению всех рекомендаций, что также может отражаться на стабильности заболевания. Применение указанных препаратов сопровождается рядом нежелательных факторов (необходимость частых инъекций, местные кожные реакции на препарат, боязнь самостоятельных инъекций), негативно влияющих на приверженность терапии. Кроме того, известно, что эффективность препарата может снижаться из-за выработки у пациентов нейтрализующих антител к интерферону бета (Попова и др., 2017). На сегодняшний день многочисленными исследованиями доказано наличие сложной системы психонейроиммунного взаимодействия и активно изучаются механизмы его реализации. Считается, что данное взаимодействие осуществляется через гипоталамо–гипофизарно–надпочечниковую ось, автономную (симпатическую и парасимпатическую) нервную систему, иннервирующую, в том числе лимфоидные органы, а также посредством циркулирующих биологически активных молекул (цитокинов, хемокинов, нейропептидов, нейромедиаторов и др.) (Dantzer, 2018). Признается

существование тесной взаимозависимости между хроническим стрессом, психическим состоянием и иммунитетом человека. Таким образом, наблюдаемые у студентов особенности РС могут быть следствием влияния образовательного процесса, а именно – связанных с обучением психоэмоциональных факторов и особенностей образа жизни человека в период студенчества, на течение болезни через указанные механизмы (Тухватуллин и др., 2021). Ассоциированные с заболеванием психологические, психические и когнитивные расстройства при этом служат дополнительным стрессом для молодого организма (Кузьмина и др., 2023). Важным моментом является то, что в случае возникновения заболевания до поступления на учебу больной и его родители к моменту поступления в высшее или среднее специальное учебное заведение более адекватно оценивают возможности и принимают решение о дальнейшем образовании, лучше понимают заболевание, рациональнее планируют процесс обучения, в отличие от заболевших в период обучения и их родственников (Тухватуллин и др., 2021).

В заключение, исследование показало, что хотя клиническая картина РС у студентов в целом схожа с картиной заболевания у других молодых людей, существуют и специфические особенности, связанные с их образом жизни и социальной средой. Это подчеркивает важность более детального изучения влияния различных факторов на течение РС у этой категории пациентов. Дальнейшие исследования должны быть направлены на выявление этих факторов и разработку специфических стратегий лечения и профилактики, учитывающих особенности течения РС у студентов. Понимание этих особенностей позволит улучшить качество жизни молодых людей, страдающих рассеянным склерозом, и обеспечить им своевременную и эффективную медицинскую помощь. Необходимо отметить, что данные, полученные в данном исследовании, могут быть использованы для разработки программ ранней диагностики и реабилитации студентов с РС, что существенно улучшит их адаптацию к учебе и дальнейшей профессиональной деятельности. И, наконец, важно продолжить исследования, направленные на изучение влияния стресса, связанного с учебным процессом, на прогрессирование РС.

3.2. Влияние ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови

В патогенезе рассеянного склероза принимают участие аутореактивные Т-лимфоциты, способные проникать в ЦНС, вызывая демиелинизацию и повреждение аксонов. После активации они подвергаются клональной экспансии и приобретают различные эффекторные функции. Небольшая их часть становится долгоживущими клетками памяти. Уже давно признано, что механизмы апоптоза различаются среди наивных и активированных Т-лимфоцитов (Krammer et al., 2007). Гибель клеток, вызванная отменой цитокинов (CWID), запускаемой снижением уровня ИЛ-2 после устранения патогена, является критической программой апоптоза, ответственной за элиминацию большинства эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов (Larsen et al., 2017).

Как упоминалось ранее, эффекты глутамата опосредуются ионотропными и метаботропными рецепторами, которые также экспрессируются Т-клетками. Кроме того, глутамат сам по себе активирует покоящиеся Т-лимфоциты и индуцирует их ключевые функции, среди которых: адгезия, хемотаксическая миграция, секреция цитокинов, экспрессия генов и др. Нейромедиатор также оказывает воздействие на Т-клетки, активированные антигеном/митогеном/цитокином. Более того, Т-лимфоциты могут сами высвобождать глутамат, тем самым влияя на другие клетки. При рассеянном склерозе и ЭАЭ наблюдаются избыточные уровни нейромедиатора в СМЖ и множественные нарушения в ферментах, участвующих в его метаболизме, глутаматных транспортерах и рецепторах, а также передаче внутриклеточных сигналов, связанных с ним. Более того, глутамат, высвобождаемый из аутореактивных Т-лимфоцитов, вызывает эксайтотоксическую гибель нейронов (Levite, 2017).

Накопленные к настоящему времени данные указывают на то, что аномальные уровни нейромедиатора в нервной системе, прямая активация Т-

клеток глутаматом могут способствовать развитию РС. Действие нейромедиатора также может привести к опосредованной Т-лимфоцитами цитотоксичности в ЦНС, гибели нейронов и глиальных клеток, что впоследствии обуславливает увеличение внеклеточного содержания глутамата, и усиливает эксайтотоксичности.

На первом этапе исследования было изучено влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови. Клетки инкубировали 72 часа с глутаматом и агонистами/антагонистами рецепторов AMPA и NMDA подтипа. В эксперименте исследовали влияние нейромедиатора в градиенте концентраций от 0.1 до 1000 мкМ, имитируя концентрации глутамата в межклеточном пространстве, крови, плазме и при эксайтотоксичности.

Полученные данные продемонстрировали достоверное повышение жизнеспособности лимфоцитов периферической крови здоровых доноров на фоне действия глутамата во всем диапазоне концентраций, наибольшая выраженность отмечалась при концентрации 1 мкМ до 127.0 % [116.5; 128.9]. При повышении концентрации нейромедиатора наблюдалась тенденция к уменьшению его влияния на жизнеспособность клеток (рис. 2).

В группе больных РС в стадии ремиссии глутамат также повышал жизнеспособность лимфоцитов во всем диапазоне концентраций, наибольшая выраженность действия отмечалась при концентрации 10 мкМ до 119.4 % [112.1; 121.3].

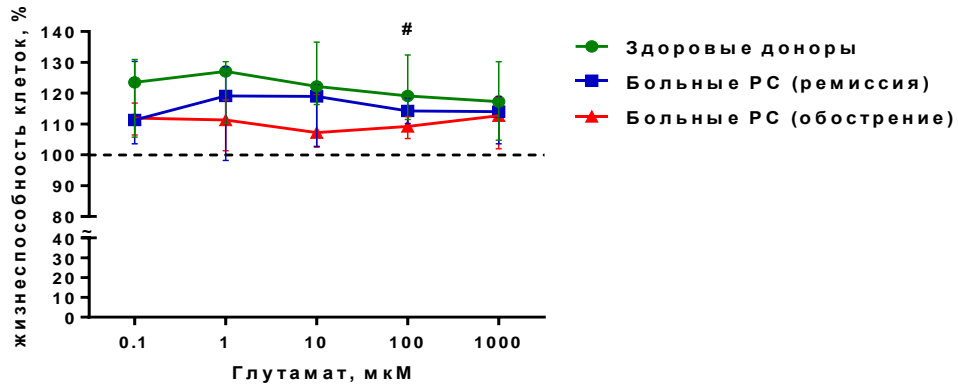


Рисунок 2. Влияние глутамата на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС в стадии ремиссии ($n=10$) и больных РС в стадии обострения ($n=10$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни (# – $p < 0.05$ между группами больных РС (ремиссия) и больных РС (обострение)).

В группе больных РС в стадии обострения глутамат достоверно повышал жизнеспособность лимфоцитов больных во всем диапазоне концентраций, наибольшая выраженность наблюдалась при концентрации 1000 мкМ до 112.7 % [104.5; 116.3]. Следует отметить, что если в группе здоровых доноров выявлено концентрационно–зависимое повышение жизнеспособности клеток здоровых людей на фоне действия глутамата (низкие концентрации глутамата (0.1–10 мкМ) повышали жизнеспособность на 20–25 %, тогда как высокие концентрации повышали на 10–15 %), то лимфоциты больных РС менее чувствительны к действию глутамата. В данной группе отмечалась наименьшая выраженность его действия ($p < 0.05$).

Глицин является важным коагонистом NMDA–рецептора. Он имеет свой сайт связывания, активация которого необходима для нормального функционирования рецептора. В то же время, глицин является нейромедиатором защитного торможения в спинном мозге и в стволе мозга млекопитающих (Nguyen et al., 2019).

Из полученных данных следует, что глицин повышал жизнеспособность лимфоцитов здоровых доноров в диапазоне концентраций 0.1–100 мкМ, наибольшая выраженность действия отмечалась при концентрации 0.1 мкМ до 112.3 % [98.4; 121.5] ($p < 0.05$) (рис. 3).

Во время ремиссии заболевания наблюдалось достоверное повышение жизнеспособности лимфоцитов на фоне действия глицина в диапазоне концентраций 0.1–100 мкМ, наибольшая выраженность действия отмечалась при концентрации 0.1 мкМ до 115.5 % [109.9; 118.0].

Не выявлено влияния глицина на жизнеспособность клеток в группе больных РС в стадии обострения. При сравнительном анализе установлены достоверные различия между группами больных РС в стадиях ремиссии и обострения при концентрации глицина 10 и 100 мкМ.

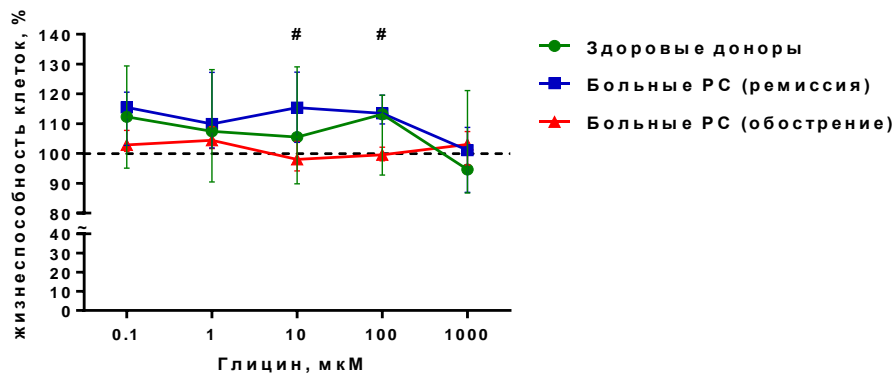


Рисунок 3. Влияние глицина на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС в стадии ремиссии ($n=10$) и больных РС в стадии обострения ($n=10$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни (# – $p < 0.05$ между группами больных РС (ремиссия) и больных РС (обострение)).

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] (рис. 4).

В группе больных РС в стадии ремиссии не выявлено достоверных изменений жизнеспособности клеток на фоне совместного влияния глутамата и глицина. При обострении наблюдалось повышение жизнеспособности лимфоцитов, наибольшая выраженность отмечалась при концентрации глицина 1 мкМ до 108.5 % [99.9; 114.8].

При сравнительном анализе влияния глутамата и глицина выявлены достоверные различия между группами здоровых доноров и больных РС при концентрации глицина 10 и 100 мкМ. Не установлено достоверной разницы между группами больных РС в стадиях обострения и ремиссии.

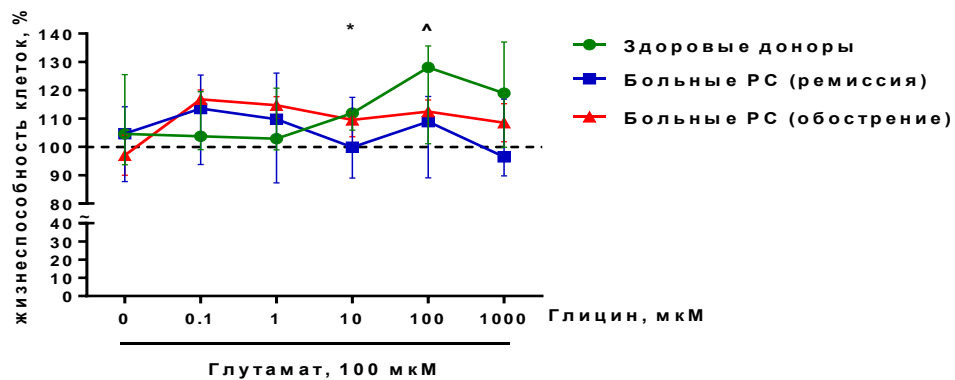


Рисунок 4. Совместное влияние глутамата и глицина на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров (n=10), больных РС в стадии ремиссии (n=10) и больных РС в стадии обострения (n=10). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность 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)).

Селективная стимуляция NMDA-рецепторов глутамата достоверно повышала жизнеспособность лимфоцитов в группе здоровых доноров при концентрации NMDA 0.1 мкМ до 114.2 % [106.3; 120.3] (рис. 5).

В группах больных РС в стадии ремиссии и обострения не выявлено значимых изменений жизнеспособности клеток на фоне стимуляции NMDA.

Выявлены достоверные различия между группами условно–здоровых доноров и больных РС в стадии ремиссии при концентрации NMDA 0.1 и 1 мкМ ($p < 0.05$).

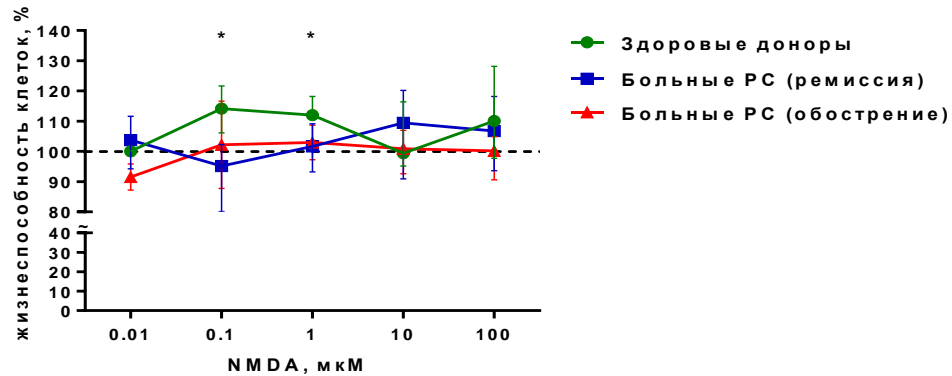


Рисунок 5. Влияние NMDA на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС в стадии ремиссии ($n=10$) и больных РС в стадии обострения ($n=10$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни (* – $p < 0.05$ между группами здоровых доноров и больных РС (ремиссия)).

Не выявлено значимых изменений жизнеспособности лимфоцитов во всех исследуемых группах на фоне селективной стимуляции AMPA–рецепторов глутамата (рис. 6).

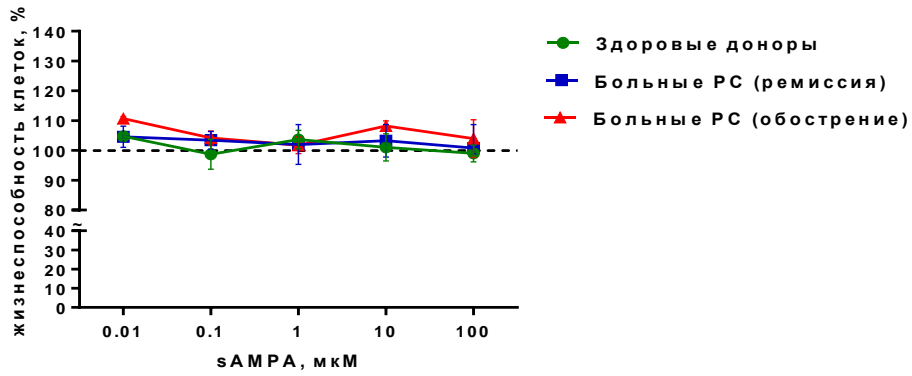


Рисунок 6. Влияние AMPA на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС в стадии ремиссии ($n=10$) и больных РС в стадии обострения ($n=10$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни.

Не выявлено значимых изменений жизнеспособности клеток во всех исследуемых группах на фоне блокады NMDA-рецепторов глутамата МК-801 (рис. 7).

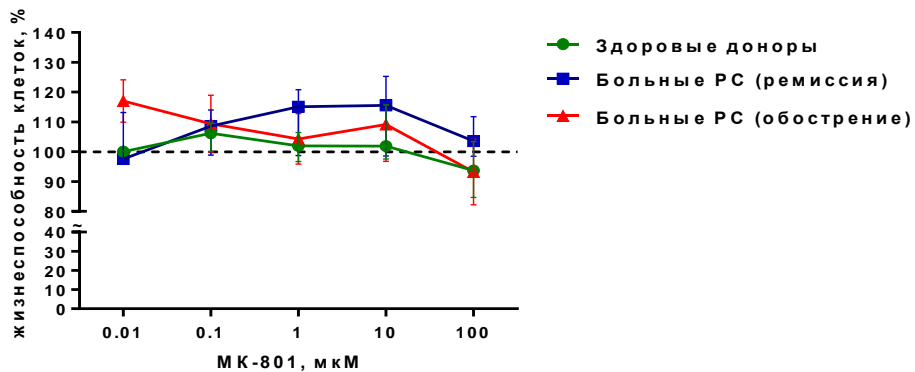


Рисунок 7. Влияние МК-801 на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС в стадии ремиссии ($n=10$) и больных РС в стадии обострения ($n=10$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни (# – $p < 0.05$ между группами больных РС (ремиссия) и больных РС (обострение)).

Антагонист АМРА–рецепторов глутамата NBQX достоверно повышал жизнеспособность лимфоцитов здоровых доноров при концентрации 0.01 мкМ до 109.6 % [105.2; 114.9] (рис. 8).

В группе больных РС в стадии ремиссии на фоне блокады АМРА–рецепторов глутамата также выявлено увеличение жизнеспособности клеток до 111.0 % [106.8; 113.4] при концентрации NBQX 0.1 мкМ.

Наблюдалось достоверное повышение жизнеспособности лимфоцитов в группе больных РС в стадии обострения на фоне действия NBQX при концентрации 0.01 мкМ до 115.4 % [111.7; 115.7].

Выявлены достоверные различия между группами больных РС в стадиях ремиссии и обострения при концентрации NBQX 1 и 10 мкМ, и между группами здоровых доноров и больных РС в стадии ремиссии при концентрации NBQX 0.01 мкМ ($p < 0.05$).

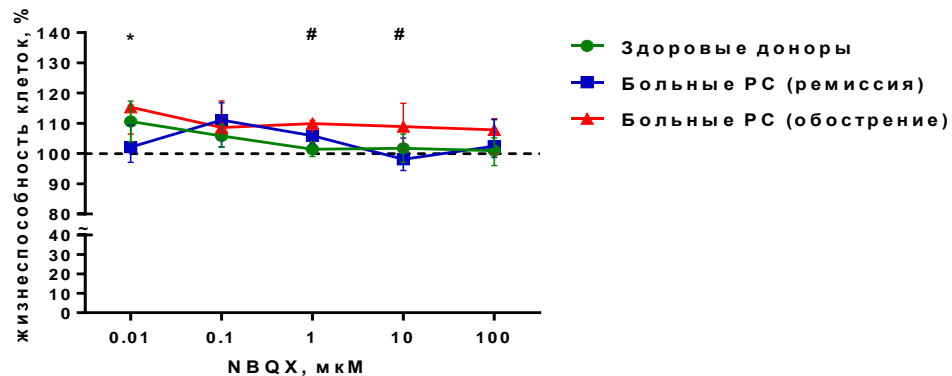


Рисунок 8. Влияние NBQX на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС в стадии ремиссии ($n=10$) и больных РС в стадии обострения ($n=10$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U –критерия Манна–Уитни (* – $p < 0.05$ между группами здоровых доноров и больных РС (ремиссия), # – $p < 0.05$ между группами больных РС (ремиссия) и больных РС (обострение)).

Таким образом, агонисты и антагонисты глутаматных рецепторов не оказывали цитотоксического действия на лимфоциты периферической крови. Выявлено повышение жизнеспособности иммунных клеток на фоне действия глутамата, глицина и их совместного действия. У больных РС по сравнению со здоровыми лицами установлены различия в ответе на действие глутамата и глицина. Лимфоциты больных РС оказались менее чувствительными к действию глутамата.

Повышение жизнеспособности клеток здоровых доноров на фоне стимуляции NMDA по сравнению с больными РС, и отсутствие изменений на фоне блокады МК–801 предполагают вовлеченность NMDAR в данные процессы. Кроме того, это также указывает на меньшую чувствительность рецепторов данного подтипа в лимфоцитах пациентов с РС.

Учитывая, что доля жизнеспособных клеток увеличивалась на фоне глутамата, а селективная стимуляция NMDAR и AMPAR не вызывала изменений жизнеспособности лимфоцитов (или же эффект был незначительный), можно предположить, что в регуляции жизнеспособности, помимо ионотропных рецепторов, принимают участие и метаботропные рецепторы.

В нашей работе мы не исследовали влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность антиген–стимулированных лимфоцитов, хотя это также представляет большой интерес. Основной целью данного этапа работы являлось изучение цитотоксического действия лигандов глутаматных рецепторов, а также подбор оптимальных концентраций для последующих экспериментов по адгезии и экспрессии молекул адгезии.

Полученные нами сведения согласуются с литературными данными. В недавнем исследовании 2018 года была изучена роль NMDA–рецепторов в регуляции функций CD4⁺ T–клеток человека посредством индукции эксайтотоксичности (Ogihara et al., 2018). Свежие первичные CD4⁺ T–лимфоциты здоровых доноров экспрессировали функциональные NMDAR на фоне активации T–клеточного рецептора. Синтетические и физиологические агонисты вызывали

увеличение притока ионов Ca^{2+} внутрь клетки, и приводили к заметному ингибированию пролиферации и выживаемости Т-хелперов 1 типа за счет индукции апоптоза, при этом Th2 клетки оставались интактными. Механизм, лежащий в основе этих дифференциальных ответов, был связан с выраженной чувствительностью Th1 лимфоцитов и относительной устойчивостью Th2 клеток к NMDAR-зависимой физиологической гибели клеток. Полученные данные свидетельствовали о том, что NMDAR-опосредованная цитотоксичность может способствовать дисбалансу CD4^+ Т-клеток, который характерен аутоиммунных заболеваний, включая РС. Следовательно, эксайтотоксичность, помимо ее роли в пластичности нейронов, может способствовать постоянной модуляции ответов Т-лимфоцитов.

Согласно исследованиям, проведенным в 2013 году, блокада NMDA-рецепторов с помощью МК-801 в концентрации 100 мкМ приводит к снижению жизнеспособности $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ -стимулированных Т-клеток как в присутствии агониста NMDA (100 мкМ), так и без него (Зайнуллина, 2013). Это открытие подчеркивает важность NMDA-рецепторов в процессе активации и пролиферации Т-лимфоцитов, что может иметь значительные последствия для понимания механизмов, связанных с иммунным ответом. Более того, в ходе исследований было также отмечено незначительное снижение пролиферации активированных Т-лимфоцитов (Зайнуллина, 2013).

В работе Кузьминой и соавт. (2019) было установлено, что блокада NMDA-рецепторов приводит к снижению экспрессии ряда антиапоптотических генов, таких как *BIRC3*, *NAIP* и *BCL2A1*, в периферических иммунocyтах пациентов с РС (Кузьмина и др., 2019). Это открытие может объяснять, почему клетки становятся более чувствительными к апоптозу при блокаде NMDA-рецепторов, что, в свою очередь, может способствовать прогрессированию заболевания. Как отмечается в исследованиях, нарушение регуляции апоптоза аутореактивных Т-лимфоцитов является ключевым аспектом в патогенезе аутоиммунных заболеваний (Macchi et al., 2015; Кузьмина и др., 2019). У пациентов с РС наблюдаются различные изменения в апоптозе клеток, включая снижение спонтанной гибели клеток,

толерантность периферических Т–лимфоцитов к апоптозу и повышенную экспрессию антиапоптотических белков, а также подавление экспрессии проапоптотических белков, таких как Вах и некоторые каспазы (Кузьмина и др., 2019). Гены *BIRC3* и *NAIP* кодируют белки, которые играют роль ингибиторов апоптоза. Например, *BIRC3* (сIAP–2, HIAP–1) и *NAIP* (белок, ингибирующий нейрональный апоптоз) способствуют предотвращению клеточной гибели. Антиапоптотическая активность белка *BIRC3* в лимфоцитах осуществляется за счет ингибирования каспаз 3, 7 и прокаспазы 9. Повышенная экспрессия этого белка в стимулированных Т–клетках у пациентов с ремиттирующим РС приводит к резистентности клеток к апоптозу, что коррелирует с манифестацией заболевания (Sharief et al., 2001). Дополнительно, согласно данным литературы, уровень мРНК гена *NAIP* в Т–лимфоцитах пациентов с РС значительно увеличивается, что может свидетельствовать о его роли в патогенезе заболевания (Hebb et al., 2008).

NMDA–рецепторы играют ключевую роль в регуляции жизнеспособности нейронов, особенно в условиях *in vitro*, где они способствуют увеличению экспрессии различных нейротрофических факторов, которые, в свою очередь, ингибируют процессы апоптоза (Jiang et al., 2005). При воздействии на NMDA–рецепторы нейронов активируются внутриклеточные сигнальные пути ERK и транскрипционного фактора NF–kB (Blondeau et al., 2001), которые способствуют защитному действию (Zhu et al., 2005). То есть, NMDA–рецепторы принимают участие также в регуляции жизнеспособности нейронов. Помимо активации ERK, активируется также путь PI3K, приводящий к антиапоптотическому эффекту. При стимуляции NMDA–рецепторов происходит также активация ядерных факторов CREB и NF–kB, которые способствуют экспрессии генов, кодирующих белки, важные для защиты клеток от апоптоза, такие как супероксиддисмутаза, белки–ингибиторы апоптоза, нейротрофические факторы и различные цитокины. Таким образом, можно сделать вывод, что активация NMDA–рецепторов в определенных условиях запускает Ca^{2+} –зависимые сигнальные пути, которые играют решающую роль в выживании клеток и предотвращении нейрональной

гибели. Вполне вероятно, что и в клетках иммунной системы глутамат и NMDA могут запускать аналогичные защитные процессы.

В другом исследовании было показано, что делеция гена, отвечающего за белок нейритин, являющийся вспомогательный компонент AMPA–рецепторов CD4⁺ T–клеток, приводит к значительному снижению количества лимфоцитов в воспалительных инфильтратах спинного мозга мышей, и их пролиферативного статуса (Mitchell–Flack et al., 2022). Кроме того, наблюдалось увеличение популяции регуляторных FOXP3⁺ T–клеток и их повышенное индуцированное развитие во время дифференцировки *in vitro*.

При опухолях сверхэкспрессия глутаматных рецепторов связана с активацией различных сигнальных путей, включая PI3K/АКТ/mTOR, Ras–MAPK–ERK и MAPK/ERK, которые участвуют в регуляции пролиферации клеток, выживании, приводящем к онкогенезу (Koda et al., 2023). Было показано, что использование рилузола (препарата, блокирующего высвобождение глутамата и усиливающего обратный захват глутамата) снижает гиперактивность путей MAPK/ERK и PI3K/АКТ при меланоме (Namkoong et al., 2007). Помимо своей роли в блокировании глутамата, рилузол связан с ингибированием кальциевой сигнализации, что особенно важно для регуляции ионотропных рецепторов глутамата.

Обобщая полученные результаты и данные литературы, можно сделать вывод о вовлеченности ионотропных рецепторов глутамата в регуляцию жизнеспособности лимфоцитов периферической крови. Обнаруженные эффекты опосредуются активацией сигнальных путей, экспрессией специфических генов, транскрипционных факторов, отвечающих за апоптоз, пролиферацию и выживаемость клеток. Среди больных РС по сравнению со здоровыми лицами установлены различия в ответе лимфоцитов на действие агонистов глутаматных рецепторов. В частности, меньшая чувствительность клеток пациентов с РС, особенно при обострении, вероятно, связано с их повышенным метаболическим профилем, и предполагает пониженную способность лимфоцитов к выполнению функций, росту и делению. Полученные результаты указывает на

патогенетическую значимость при РС не только эндогенных лигандов рецепторов глутамата, но и важность их взаимодействия.

3.3. Роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции жизнеспособности клеток HUVEC на фоне активации провоспалительным цитокином TNF α

Следующим этапом исследования было изучение роли ионотропных рецепторов глутамата в регуляции жизнеспособности клеток HUVEC. Хочется отметить, что в настоящее время используются различные клеточные линии и их комбинации для воспроизведения модели ГЭБ *in vitro* (Мосягина и др., 2021). Использование клеток HUVEC имеет несколько преимуществ, поскольку: 1) они имеют человеческое происхождение; 2) их легко получать, изолировать и поддерживать; 3) они образуют монослой в культуре; 4) могут пассироваться в течение нескольких дней без потери своего фенотипа; 5) могут приобретать свойства, подобные свойствам ГЭБ (Winger et al., 2014).

Для моделирования эндотелиальной дисфункции применяли провоспалительный цитокин TNF α , который обнаруживается в СМЖ, и секретируется астроцитами, микроглией и эндотелиальными клетками при РС, особенно в активных очагах. Было показано, что при ЭАЭ цитокин синтезируется микроглией и инфильтрирующими макрофагами, а также энцефалитогенными Т-клетками (Fresegna et al., 2020). Системное введение TNF α увеличивает тяжесть энцефалита, его продолжительность и вызывает обострение (Valentin-Torres et al., 2016). TNF α -зависимая активация Т-хелперов напрямую влияет на менингеальные тучные клетки, которые способствуют эндотелиальной дисфункции и дальнейшему притоку иммунных клеток, повреждению миелина и тяжести заболевания (Russi et al., 2016). Согласно данным литературы, для моделирования нейровоспаления используют концентрации TNF α в диапазоне ~ 1–100 нг/мл (Tukhvatullin et al., 2025; Seo et al., 2022).

В экспериментах клетки инкубировали 48 часов с глутаматом и синтетическими агонистами/антагонистами рецепторов AMPA и NMDA подтипа.

Как упоминалось выше, концентрация глутамата в плазме и цельной крови составляет 50–100 мкМ и 150–300 мкМ соответственно, поэтому в работе было исследовано влияние нейромедиатора в малых концентрациях (например, как в межклеточном пространстве), так и в высоких как при эксайтотоксичности.

Нами не обнаружено изменения жизнеспособности интактных клеток HUVEC на фоне действия глутамата, глицина в диапазоне концентраций от 0.1 мкМ до 1000 мкМ (рис. 9 А). Однако при одновременном добавлении глутамата в концентрации 100 мкМ и глицина в диапазоне концентраций от 0.1 до 1000 мкМ было выявлено повышение жизнеспособности покоящихся клеток HUVEC. Наибольший эффект отмечался при концентрации глицина 100 мкМ до 115.8 % [111.8; 118.2] ($p < 0.05$).

Обработка TNF α в концентрации 100 нг/мл в течение 24 часов приводила снижению жизнеспособности клеток HUVEC по сравнению с контрольной группой до 91.8 % [87.6; 95.9] ($p=0.000002$). Полученные результаты сопоставимы с литературными данными, согласно которым эндотелиальная дисфункция, вызванная воспалением, является ключевым триггером, например, атеросклеротических заболеваний сосудов (Madhur et al., 2011). Сообщалось, что TNF α усиливает взаимодействие между лимфоцитами и эндотелиальными клетками сосудов за счет увеличения экспрессии молекул адгезии VCAM–1, ICAM–1 и E–селектина, и может приводить к увеличению продукции АФК в эндотелиоцитах, в конечном итоге, индуцируя их апоптоз (Chen et al., 2016; Jia et al., 2015; Kim et al., 2010).

В модели эндотелиальной дисфункции стимуляция клеток глутаматом приводила к повышению жизнеспособности эндотелиоцитов. Наибольшая выраженность эффекта наблюдалась при концентрации нейромедиатора 1000 мкМ (114 % [106.5; 121.2], $p < 0.05$). Не выявлено изменений жизнеспособности TNF α –активированных эндотелиоцитов на фоне действия глицина, а также совместного действия глутамата и глицина.

Таким образом, было обнаружены изменения жизнеспособности клеток HUVEC на фоне действия глутамата и глицина. Если при отсутствии воспаления

глутамат и глицин повышают долю жизнеспособных эндотелиоцитов в среднефизиологических концентрациях, то в условиях эндотелиальной дисфункции клетки менее чувствительны к действию нейромедиатора, и для проявления своих эффектов требуются большие (эксайтотоксические) концентрации.

При селективной стимуляции NMDA– и AMPA–рецепторов глутамата не обнаружено изменения жизнеспособности интактных и активированных клеток HUVEC в диапазоне концентраций от 0.01 мкМ до 100 мкМ (рис. 9 Б).

Блокада NMDA–рецепторов глутамата селективным антагонистом МК–801 также не оказывала влияния на жизнеспособность покоящихся эндотелиоцитов (рис. 9 В). В модели нейровоспаления МК–801 в малых концентрациях вызывал повышение жизнеспособности эндотелиоцитов до 110.2 % [106.3; 114.2] ($p < 0.05$).

Было выявлено концентрационно–зависимое снижение жизнеспособности интактных и активированных эндотелиоцитов HUVEC на фоне действия антагониста глутаматных AMPA–рецепторов NBQX. При его концентрации 100 мкМ жизнеспособность покоящихся клеток снижалась до 82.1 % [78.2; 85.6], активированных – до 81.8 % [74.2; 88.7] ($p < 0.05$).

Исходя из этого, можно сделать заключение о вовлеченности AMPA–рецепторов в регуляцию жизнеспособности клеток HUVEC.

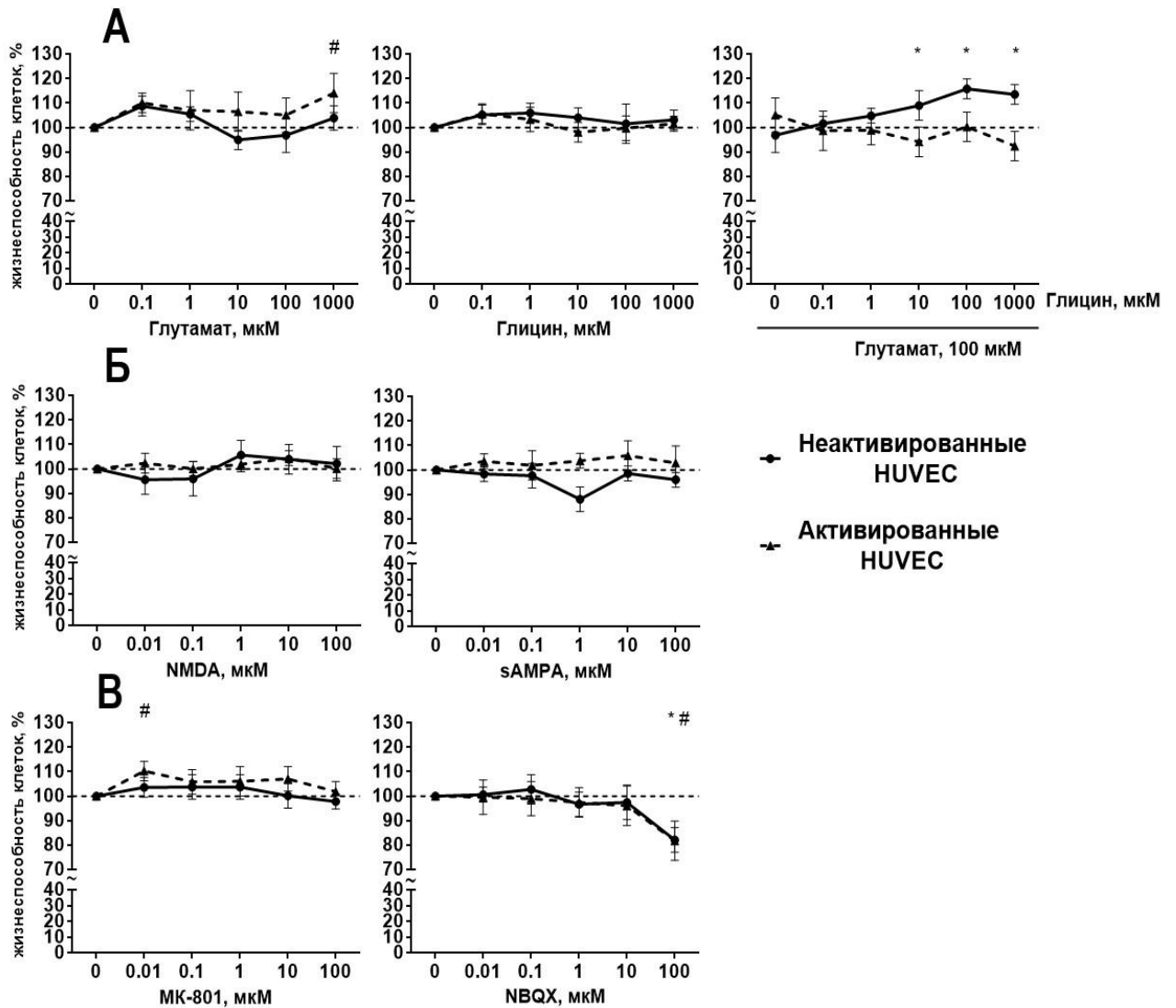


Рисунок 9. Влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность клеток HUVEC (n=9). А – влияние глутамата, глицина и их совместного действия; Б – влияние селективных агонистов NMDA– и AMPA–рецепторов глутамата; В – влияние селективных антагонистов NMDA– и AMPA–рецепторов глутамата. В качестве контроля использовали эндотелиоциты без добавления веществ. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (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).

Патогенез РС связан с дисфункцией ГЭБ и увеличением его проницаемости (Zhao et al., 2015; Yamazaki et al., 2017). Улучшение функционального состояния эндотелиального слоя микрососудов головного мозга является одним из ключевых моментов лечения заболевания. Исследования показали, что активация пути Rho/ROCK вызывает разрушение TJ, что приводит к увеличению проницаемости ГЭБ (Huang et al., 2011). Было показано, что NMDAR экспрессируются в первичных микрососудистых эндотелиальных клетках головного мозга человека (HBMES), и потенциальный механизм поддержания плотных контактов данным подтипом рецепторов, может быть связан с сигнальным путем Rho/ROCK (Yu et al., 2022). Ученые продемонстрировали, что NMDA увеличивает апоптоз, снижает жизнеспособность эндотелиоцитов и усиливает выработку АФК, что не согласуется с полученными нами результатами, согласно которым NMDA не оказывал влияния на жизнеспособность HUVEC. Но следует учитывать, что в экспериментах использовались разные модели ГЭБ и методы определения жизнеспособности клеток. Кроме того, Yu с коллегами обнаружили, что эффекты NMDA-индуцированной цитотоксичности уменьшались при предварительной обработке гидроксифасудилом, защитное действие которого может быть связано с его антиоксидантной активностью и способностью ингибировать сигнальный путь Rho/ROCK (Yu et al., 2022). Чрезмерная стимуляция NMDAR эндотелиоцитов усиливает внутриклеточный окислительный стресс. Продукция АФК может повредить функцию и структуру клеток и в конечном итоге привести к апоптозу и некрозу (Parfenova et al., 2006). Апоптоз HBMES способствует дисфункции ГЭБ (Basuroy et al., 2013).

ROCK является важнейшим эффектором Rho, который признан основным регулятором передачи сигналов фактора роста, выживания клеток и апоптоза. Исследования показали, что цитокины или лекарственные препараты могут повреждать эндотелиальные клетки путем активации Rho/ROCK, который индуцирует изменения актинового цитоскелета путем фосфорилирования MYPT-1 пути Rho (Chirino et al., 2017). Feng и др. продемонстрировали, что активация ROCK ускоряет воспаление/окислительный стресс и приводит к повреждению

эндотелия сосудов (Feng et al., 2018). Тем не менее, каскад передачи сигнала, запускаемый активацией ROCK, сильно зависит от типа клеток и/или вида их стимуляции. Исследования показали, что ингибирование пути Rho/ROCK фасудилом защищает эндотелий сосудов путем ингибирования адгезии нейтрофилов (Arita et al., 2009). Гидроксифасудил также может защищать эндотелиальные клетки мозга от Tat-индуцированного разрушения белков TJ (Chen et al., 2016).

Также известно, что NMDA-рецепторы участвуют в патогенетических механизмах при травмах головного мозга, нейродегенеративных расстройствах (Estrada-Rojo et al., 2018) и регуляции эндотелиального барьера головного мозга *in vitro*. Они могут играть ключевую роль в трансмиграции моноцитов через ГЭБ *in vivo*. Экспрессия субъединицы GluN1 NMDA-рецептора в НВМЕС подтверждена как вестерн-блоттингом, так и иммунофлуоресценцией (Reijerkerk et al., 2010). NMDAR широко представлены на плазматической мембране нейронов (Petit-Pedrol et al., 2021) и в цитоплазме (Mehra et al., 2020).

Sharp и др. обнаружили, что глутамат снижает целостность барьера эндотелиальных клеток путем активации NMDA-рецепторов *in vitro* (Sharp et al., 2003). Исследования показали, что воздействие NMDA увеличивает проницаемость ГЭБ и снижает электрическое сопротивление микрососудистых эндovasкулярных клеток головного мозга мышей (Chen et al., 2016). Ингибирование с помощью антагониста МК-801 может подавлять вызванное глутаматом снижение уровня окклюдина и уменьшать повреждение эндотелиальных клеток сосудов (András et al., 2007). Было показано, что активация NMDAR НВМЕС может опосредовать апоптоз эндотелиальных клеток посредством зависимого от сигнального пути Rho/ROCK фосфорилирования легкой цепи миозина, тем самым увеличивая проницаемость ГЭБ (Mehra et al., 2020).

Известно, что белки TJ обладают высоким электрическим импедансом, исследования показали, что чрезмерная активация NMDA-рецепторов изменяет барьерную функцию эндотелия. Окклюдин и клаудин 5 входят в число основных

трансмембранных белков, которые формируют TJ и играют решающую роль в поддержании проницаемости ГЭБ (Chen et al., 2016; Tian et al., 2019; Lochhead et al., 2020). Актин является важным компонентом цитоскелета, а многочисленные мономеры актина (F-актин) образуют пучки актиновых нитей. В исследовании 2022 года выявлено, что инкубация с NMDA снижает экспрессию окклюдина и клаудина 5, а также приводит к перераспределению F-актина (Yu et al., 2022).

Кроме того, глутамат способен изменять проницаемость ГЭБ за счет NO и супероксида (O_2^-), которые могут объединяться с образованием пероксинитрита ($ONOO^-$) (Scott et al., 2006). Действительно, известно, что глутамат стимулирует выработку данных вазоактивных молекул и обладает способностью генерировать $ONOO^-$ в ЦНС, что потенциально может опосредовать дисфункцию ГЭБ при рассеянном склерозе. Исследования *in vivo* модели РС демонстрируют, что фармакологическое ингибирование специфических рецепторов глутамата подавляет неврологические симптомы и предотвращает повреждение церебрального эндотелия (Scott et al., 2006). Было показано, что глутамат запускает выработку оксида азота и супероксида, что приводит к образованию пероксинитрита и нарушению сосудистой целостности при ЭАЭ. Образование $ONOO^-$ в линии эндотелиальных клеток головного мозга b.End3 подавлялось селективными и неселективными ингибиторами $ONOO^-$ -опосредованных реакций. Специфическая активация эндотелиальных NMDA-рецепторов также приводила к зависимому от концентрации увеличению продукции пероксинитрита. Кроме того, использование антагонистов МК-801 и мемантина снижало выработку $ONOO^-$ в клетках b.End3. Эти данные подтверждают важную роль глутаматных NMDA-рецепторами эндотелиоцитов, что может иметь особое значение для патогенеза РС.

Таким образом, механизмы регуляции ионотропными рецепторами глутамата жизнеспособности клеток HUVEC, вероятнее, связаны с влиянием на сигнальные пути, связанные с факторами роста, выживанием клеток и апоптоза. Нейромедиатор участвует в поддержании гомеостаза эндотелиоцитов. Аномальное увеличение уровня глутамата при РС может способствовать

нарушению жизнеспособности эндотелиальных клеток, что дополняет его значимость в патогенезе заболевания.

3.4. Влияние ионотропных рецепторов глутамата на адгезионную активность Т-клеток, полученных от здоровых лиц и больных рассеянным склерозом, к эндотелиальным клеткам *in vitro*

ГЭБ представляет собой основной физический барьер, который должны преодолеть циркулирующие лейкоциты, привлечённые к очагу нейровоспаления. Как известно, начальным этапом адаптивного иммунного ответа является презентация антигена АПК, однако этого недостаточно для активации лимфоцитов. Без дополнительной стимуляции представление антигена приводит к апоптозу, анергии или развитию регуляторных Т-клеток (Avery et al., 2018). Т-клеточный рецептор является тем самым рецептором, распознающим антиген и делающим каждый клон лимфоцитов уникальным. Он является частью рецепторного комплекса и только в сочетании с несколькими инвариантными компонентами обеспечивают сигнальную функцию. Инвариантные части рецептора: CD3 комплекс и ζ цепи – содержат ITAMs (immunoreceptortyrosine-based activation motifs), фосфорилирование тирозиновых остатков, в которых и инициирует весь сигнальный каскад после распознавания антигена.

TCR-опосредованный сигнал необходим, но недостаточен для активации Т-лимфоцитов. Его называют сигнал 1, а для активации необходимо сочетание сигнала 1 и сигнала 2. Рецепторы, в сочетании с TCR обеспечивающие активацию Т-клеток, называют ко-стимулирующими. Для активации лимфоцит должна связаться с антигеном и ко-стимулирующим лигандом (сигнал 1 и сигнал 2) на одной и той же АПК. Это необходимо для того, чтобы активация происходила, только когда она действительно нужна. Отсутствие ко-стимуляции говорит об отсутствии воспаления, о том, что произошло узнавание собственного антигена, и иммунный ответ не должен запускаться (Avery et al., 2018).

Необходимым компонентом являются также ко–рецепторы – CD4 или CD8, которые распознают ГКГС II и ГКГС I соответственно. Они стабилизируют взаимодействие антигенного рецептора и комплекса «пептид–ГКГС» (Rutkowski et al., 2017).

Главным ко–рецептором Т–лимфоцитов является CD28, его связывание с лигандами на АПК приводит к усилению большинства эффектов TCR–опосредованного сигнала. Возможно, продолжающаяся стимуляция может вносить вклад в истощение Т–клеток (Ozkazanc et al., 2016).

После aCD3/aCD28–активации и добавления агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата лимфоциты периферической крови помещали к первичным эндотелиоцитам пупочной вены человека. Далее проводился анализ количества клеток, которые прикрепились к эндотелиальному монослою методом непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания.

Первоначально, проанализировав данные, не было установлено различий во влиянии агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезию нестимулированных Т–лимфоцитов к клеткам HUVEC между группами здоровых доноров и больных РС, вне зависимости от стадии заболевания (рис. 10).

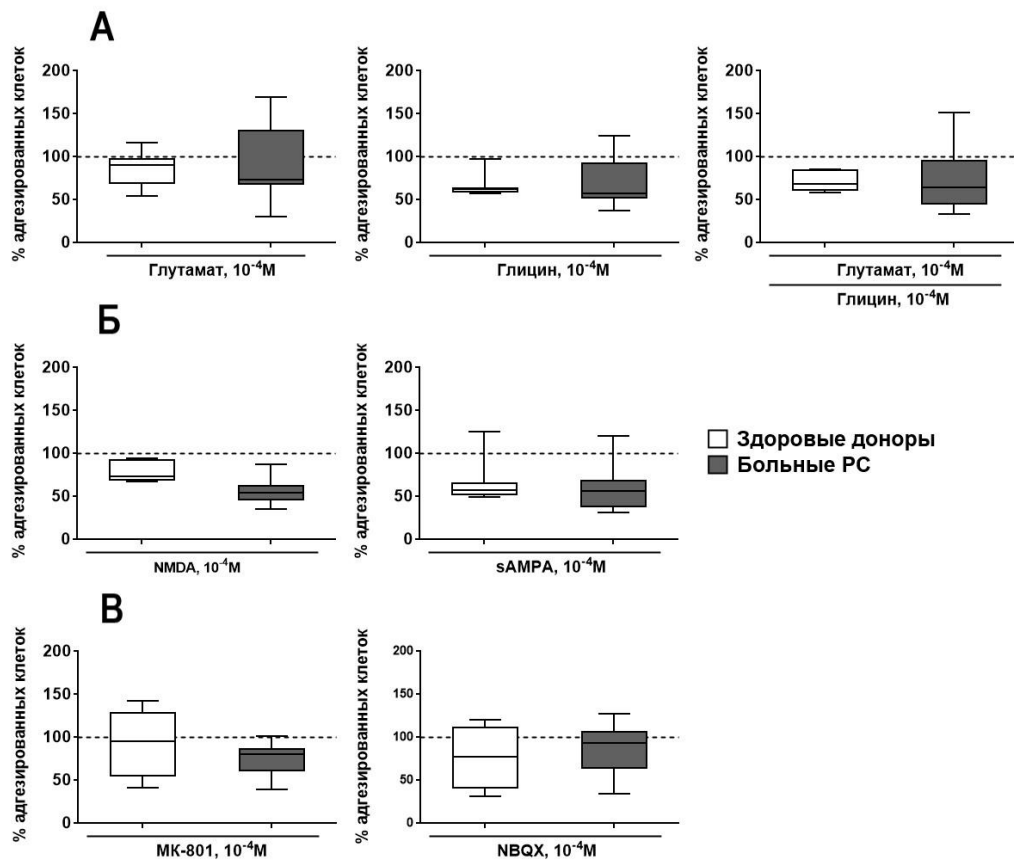


Рисунок 10. Сравнительный анализ влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезию нестимулированных периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров (n=10), больных РС (n=10) к эндотелиальным клеткам HUVEC. А – влияние глутамата, глицина и их совместного действия; Б – влияние селективных агонистов NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата; В – влияние селективных антагонистов NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни.

При сравнительном анализе адгезии антиген-стимулированных Т-лимфоцитов к клеткам HUVEC на фоне действия глутамата выявлено снижение уровня их адгезии Т-клеток среди пациентов с РС, независимо от стадии заболевания, по сравнению со здоровыми донорами (рис. 11 А).

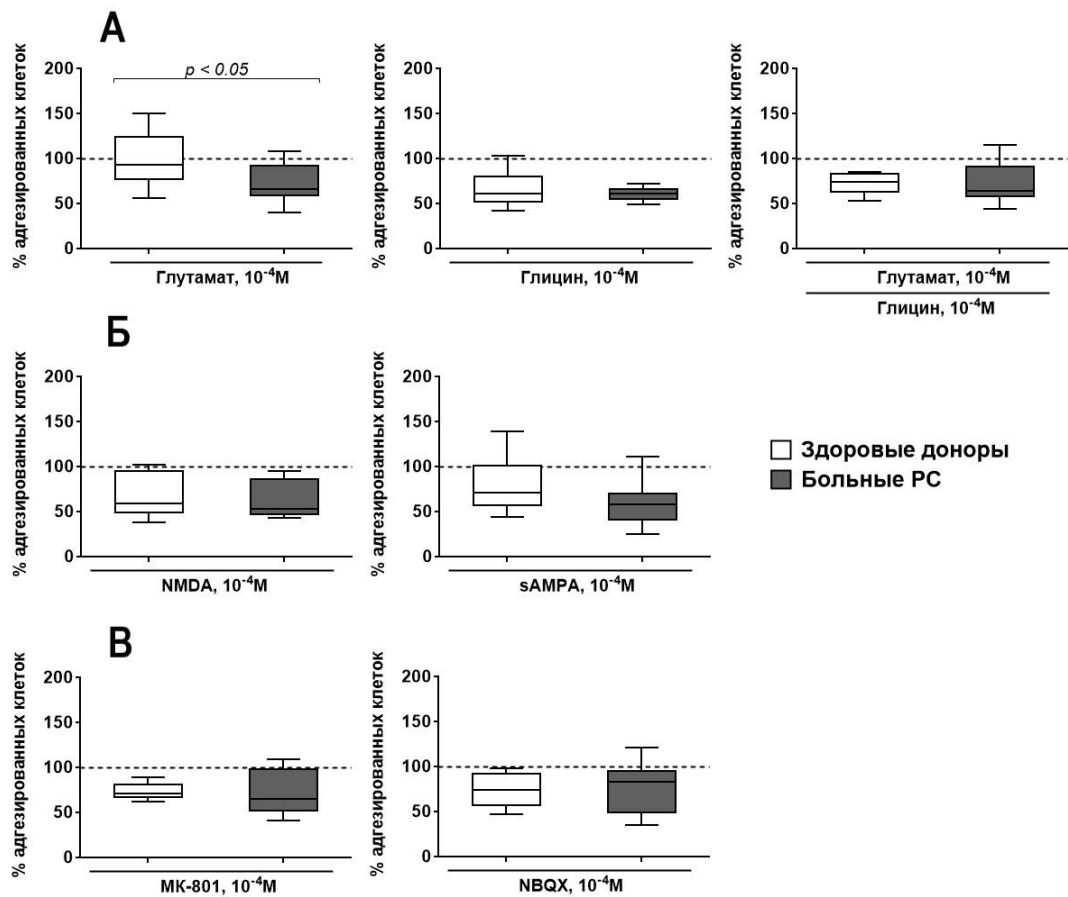


Рисунок 11. Сравнительный анализ влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезию aCD3/aCD28–стимулированных периферических Т–лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС ($n=10$) к эндотелиальным клеткам HUVEC. А – влияние глутамата, глицина и их совместного действия; Б – влияние селективных агонистов NMDA– и AMPA–рецепторов глутамата; В – влияние селективных антагонистов NMDA– и AMPA–рецепторов глутамата. Т–клетки активировали с помощью aCD3 МКА (2.5 мкг/мл) и aCD28 МКА (1.25 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U –критерия Манна–Уитни.

Однако, при разделении на группы с учетом стадии заболевания, были обнаружены значимые эффекты. Так, глутамат достоверно снижал адгезию нестимулированных Т–лимфоцитов к клеткам HUVEC среди здоровых доноров и больных РС в стадии ремиссии до 90.4 % [69.8; 96.6] и 71.1 % [54.7; 82.2]

соответственно ($p < 0.05$) (табл. 6). В группе больных РС в стадии обострения, наоборот, наблюдалась тенденция к усилению адгезии, но не достигающая статистической значимости.

При действии глицина, а также глицина и глутамата отмечалось достоверное снижение адгезии нестимулированных Т-лимфоцитов здоровых доноров до 63.3 % [59.2; 95.5] и 68.5 % [61.2; 84.2] соответственно ($p < 0.05$). В группе больных РС в стадии ремиссии на фоне глицина и совместного действия глицина и глутамата выявлено достоверное снижение адгезии нестимулированных Т-лимфоцитов до 55.3 % [41.2; 69.1] и 55.3 % [41.2; 69.1] соответственно ($p < 0.05$).

Селективная стимуляция NMDA-рецепторов глутамата неактивированных Т-лимфоцитов приводила к снижению их адгезии к клеткам HUVEC во всех исследуемых группах. Наибольшая выраженность действия наблюдалась в группе больных РС в стадии обострения (до 55.7 % [43.8; 55.7], $p < 0.05$).

При стимуляции AMPA-рецепторов глутамата неактивированных Т-лимфоцитов отмечалось снижение их адгезии к клеткам HUVEC во всех исследуемых группах, наиболее выраженное в группе здоровых доноров до 57.1 % [52.0; 65.8] ($p < 0.05$).

Блокада NMDA-рецепторов глутамата нестимулированных Т-лимфоцитов не оказывала влияния на их адгезионную активность в группе здоровых доноров. МК-801 достоверно снижал уровень адгезированных нестимулированных Т-клеток больных РС в стадии ремиссии и обострения до 84.8 % [72.1; 91.5] и 70.5 % [43.8; 75.3] соответственно ($p < 0.05$).

Блокада AMPA-рецепторов глутамата NBQX не оказывала влияния на адгезию нестимулированных Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных РС в стадии ремиссии. В группе больных РС в стадии обострения NBQX достоверно снижал адгезии до 78.9 % [38.8; 81.2] ($p < 0.05$). При последующем внесении глутамата значимых изменений не наблюдалось.

Таблица 6. Действие агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезию Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных РС в зависимости от стадии заболевания к клеткам HUVEC (% по отношению к контролю)

	Неактивированные Т-лимфоциты			αCD3/αCD28-активированные Т-лимфоциты		
	Здоровые доноры	Больные РС (ремиссия)	Больные РС (обострение)	Здоровые доноры	Больные РС (ремиссия)	Больные РС (обострение)
Глутамат, 100мкМ	90.4* [69.8; 96.6]	71.1* [54.7; 82.2]	106.3 [73.2; 134.6]	93.6 [77.8; 120.0]	67.8* [58.1; 108.9]	65.3* [60.8; 86.0]
Глутамат, 100 мкМ+ глицин, 100 мкМ	68.5* [61.2; 84.2]	55.3* [41.2; 69.1]	97.7 [55.5; 147.5]	74.1* [63.5; 83.1]	61.3* [55.8; 77.5]	76.3 [66.9; 112.2]
Глицин, 100мкМ	63.3* [59.2; 95.5]	55.6* [49.4; 74.3]	75.9 [62.9; 119.4]	61.2* [52.9; 80.4]	64.0* [55.7; 67.2]	58.4* [56.7; 61.4]
NMDA, 100 мкМ	73.1* [69.5; 92.5]	56.1* [50.4; 72.2]	55.7* [43.8; 55.7]	59.7* [49.3; 95.0]	53.7* [48.9; 73.6]	51.5* [46.2; 87.9]
sAMPA, 100 мкМ	57.1* [52.0; 65.8]	61.9* [47.5; 90.0]	59.2* [36.6; 59.2]	71.4 [57.8; 101.0]	61.3* [45.5; 66.7]	42.3* [32.0; 99.5]
МК-801, 100 мкМ	95.1 [55.6; 128.4]	84.8* [72.1; 91.5]	70.5* [43.8; 75.3]	71.5* [67.7; 80.0]	88.6 [61.5; 104.7]	59.4* [53.9; 64.6]
МК-801, 100 мкМ+ глутамат, 100 мкМ	91.4 [79.9; 135.6]	78.5* [59.8; 101.4]	89.2 [54.2; 152.1]	78.9* [62.0; 91.4]	67.6 [53.9; 105.7]	59.1* [53.1; 87.8]
NBQX, 100 мкМ	77.9 [48.2; 105.3]	102.6 [80.1; 120.7]	78.9* [38.8; 81.2]	74.8* [59.7; 87.8]	92.4 [87.5; 106.9]	46.4* [40.1; 53.8]
NBQX, 100 мкМ+ глутамат, 100 мкМ	110.4 [69.0; 141.9]	85.5* [74.0; 99.6]	73.0 [49.3; 120.0]	73.9* [66.6; 87.9]	84.0 [68.5; 105.1]	53.9* [49.6; 58.8]

Примечание: количественные переменные: медиана (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). * p < 0.05 – относительно контроля.

При сравнительном анализе между исследуемыми группами выявлено, что глутамат, глицин, и их совместное действие оказывали более негативное действие на адгезию нестимулированных Т-лимфоцитов в группе больных РС в стадии ремиссии по сравнению с остальными исследуемыми группами (рис. 12 А).

Обнаружено, что стимуляция NMDA–рецепторов глутамата оказывала угнетающее действие на адгезию неактивированных Т–лимфоцитов во всех исследуемых группах, но менее выраженное среди здоровых доноров (рис. 12 Б). Не обнаружено различий во влиянии sAMPA на адгезию неактивированных Т–лимфоцитов между указанными группами.

При сравнительном анализе выявлено, что МК–801 оказывал более негативное действие на адгезию нестимулированных Т–лимфоцитов среди больных РС в стадии обострения по сравнению с группой больных РС в стадии ремиссии (рис. 12 В). Обнаружено, что негативный эффект блокады AMPA–рецепторов глутамата Т–лимфоцитов на их адгезию к клеткам HUVEC более выражен в группе больных РС в стадии обострения (рис. 12 В).

Таким образом, с учетом стадии заболевания, были обнаружены различия в ответе на действие агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезию нестимулированных Т–лимфоцитов к клеткам HUVEC. В частности, адгезия снижалась в большей степени в группе больных РС в стадии ремиссии при стимуляции глутаматом, глицином и при их совместном действии. Однонаправленные изменения, обнаруженные при селективной стимуляции и блокаде NMDAR и AMPAR, могут говорить, о модулирующей роли данных рецепторов в процессе адгезии Т–лимфоцитов к клеткам HUVEC.

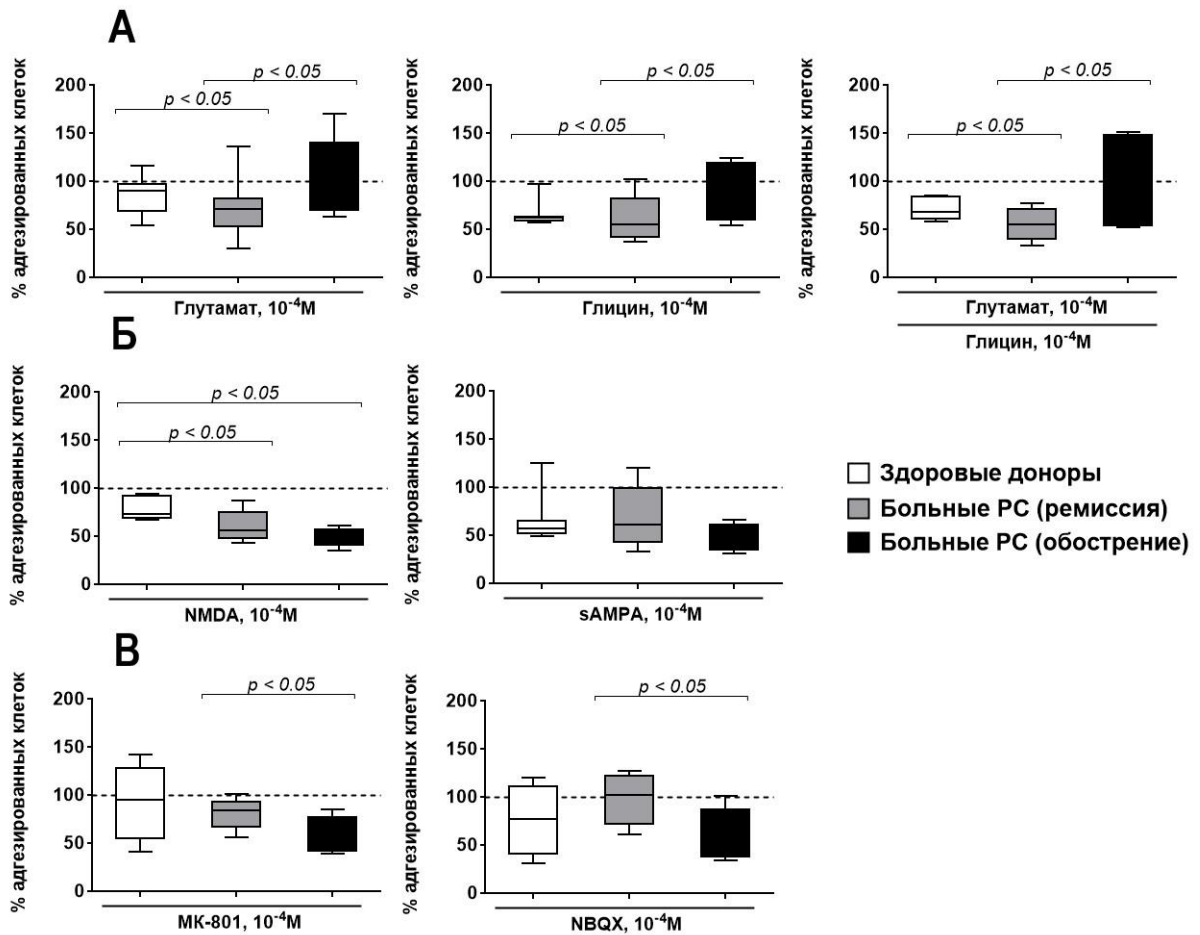


Рисунок 12. Сравнительный анализ влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезию нестимулированных периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС в стадии ремиссии ($n=10$), больных РС в стадии обострения ($n=10$) к эндотелиальным клеткам HUVEC. А – влияние глутамата, глицина и их совместного действия; Б – влияние селективных агонистов NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата; В – влияние селективных антагонистов NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни.

На фоне aCD3/aCD28-активации в группе здоровых доноров обнаружена тенденция к усилению адгезии, не достигающей статистической значимости, на фоне действия глутамата, а в группе больных РС достоверное снижение, как в

стадии ремиссии (до 67.8 % [58.1; 108.9], $p < 0.05$), так и при обострении (до 65.3 % [60.8; 86.0], $p < 0.05$).

В группе здоровых доноров на фоне стимуляции глицином, а также глутаматом и глицином наблюдалось снижение адгезии до 61.2 % [52.9; 80.4] и 74.1 % [63.5; 83.1] соответственно ($p < 0.05$). Среди больных РС в стадии ремиссии наблюдалась такая же картина – снижение адгезии до 64.0 % [55.7; 67.2] и 61.3 % [55.8; 77.5] соответственно ($p < 0.05$). В группе больных РС в стадии обострения на фоне действия глицина отмечалось достоверное снижение адгезии активированных Т-клеток до 58.4 % [56.7; 61.4] ($p < 0.05$).

Селективная стимуляция NMDA-рецепторов глутамата активированных Т-лимфоцитов приводила к снижению их адгезии к клеткам HUVEC во всех исследуемых группах. Наибольшая выраженность действия наблюдалась в группе больных РС в стадии обострения до 51.5 % [46.2; 87.9] ($p < 0.05$). Такая же картина обнаружена на фоне действия sAMPA – достоверное снижение адгезии при обострении до 42.3 % [32.0; 99.5].

При блокаде NMDA-рецепторов на фоне антигенной стимуляции Т-лимфоцитов здоровых доноров отмечалось достоверное снижение доли адгезированных клеток до 71.5 % [67.7; 80.0], что подтверждалось в группе с последующим внесением глутамата (снижение до 78.9 % [62.0; 91.4], $p < 0.05$). Среди больных РС в стадии ремиссии значимых изменений обнаружено не было. При обострении блокада NMDA-рецепторов приводила к уменьшению их адгезии до 59.4 % [53.9; 64.6] ($p < 0.05$). При последующем введении глутамата также наблюдалось снижение до 59.1 % [53.1; 87.8].

При блокаде AMPA-рецепторов глутамата на фоне антигенной активации Т-лимфоцитов в группе здоровых доноров отмечалось достоверное снижение уровня адгезии до 74.8 % [59.7; 87.8] ($p < 0.05$), что подтверждалось в группе с последующим внесением глутамата (снижение до 73.9 % [66.6; 87.9], $p < 0.05$). Среди больных РС в стадии ремиссии значимых изменений обнаружено не было. При обострении на фоне антигенной активации Т-лимфоцитов блокада AMPA-рецепторов приводила к уменьшению уровня адгезии до 46.4 % [40.1; 53.8] ($p <$

0.05). При последующем введении глутамата также отмечалось достоверное снижение до 53.9 % [49.6; 58.8] ($p < 0.05$).

При сравнительном анализе выявлено, что на фоне действия глутамата на aCD3/aCD28-активированные Т-клетки значимые различия наблюдались между группами больных РС в стадии обострения и здоровыми донорами (рис. 13 А). При селективной стимуляции ионотропных рецепторов глутамата значимых различий между исследуемыми группами обнаружено не было (рис. 13 Б).

На фоне блокады NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата выявлены различия в ответе между исследуемыми группами (рис. 13 В). Более выраженное снижение адгезии Т-лимфоцитов больных РС в стадии обострения говорит об их большей чувствительности к действию лигандов.

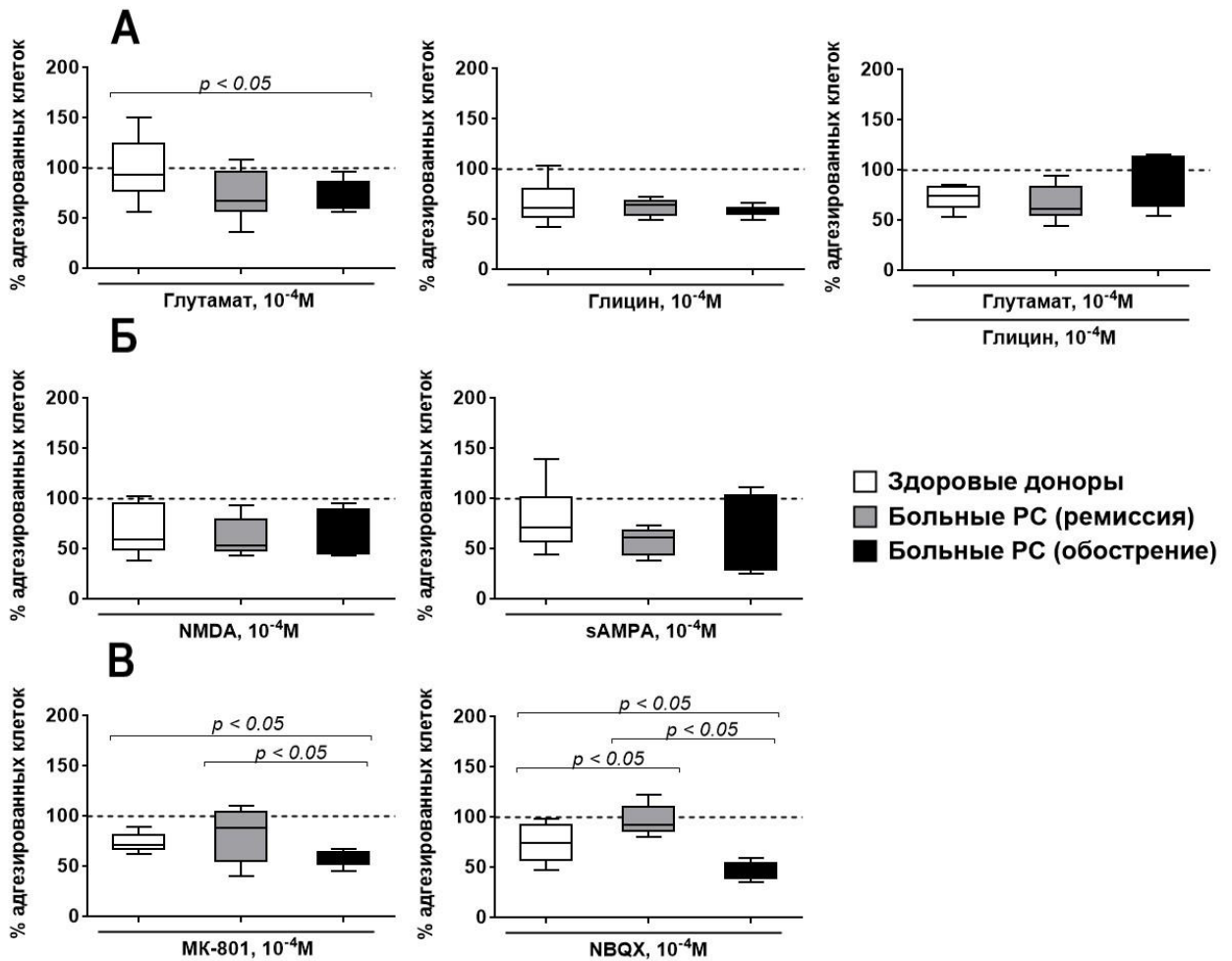


Рисунок 13. Сравнительный анализ влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезию aCD3/aCD28–стимулированных периферических Т–лимфоцитов, полученных от здоровых доноров (n=10), больных РС в стадии ремиссии (n=10), больных РС в стадии обострения (n=10) к эндотелиальным клеткам HUVEC. А – влияние глутамата, глицина и их совместного действия; Б – влияние селективных агонистов NMDA– и AMPA–рецепторов глутамата; В – влияние селективных антагонистов NMDA– и AMPA–рецепторов глутамата. Т–клетки активировали с помощью aCD3 МКА (2.5 мкг/мл) и aCD28 МКА (1.25 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U–критерия Манна–Уитни.

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что агонисты и антагонисты ионотропных рецепторов глутамата оказывали преимущественно

ингибирующее действие на адгезию иммунных клеток. При этом на фоне действия глутамата отмечались тенденции к усилению адгезионной активности антиген–стимулированных Т–лимфоцитов в группе здоровых доноров. Кроме того, были обнаружены различия в ответе Т–клеток больных РС с учетом стадии заболевания. Лимфоциты пациентов с 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 (Тухватуллин и др., 2026).

Активированные лейкоциты при РС могут способствовать увеличению проницаемости ГЭБ за счет секреции воспалительных цитокинов, АФК и ММП, которые прямо или косвенно (через глиальные клетки) приводят к нарушению архитектуры плотных контактов, увеличению экспрессии хемокинов и молекул адгезии. Это, в свою очередь, ведет к усиленной инфильтрации лейкоцитов в ЦНС и развитию аутоиммунного процесса (van Langelaar et al., 2018).

Т–клетки больных РС в стадии обострения демонстрировали повышенную адгезию при действии нейромедиатора. То есть, глутамат проявляет свои эффекты на активированных и, вероятно, на аутореактивных Т–лимфоцитах. При гиперактивации (антигенной стимуляции клеток больных РС в стадии обострения) наблюдалось снижение адгезионной активности, вероятно, за счет включения повреждающих внутриклеточных механизмов апоптоза и истощения клеток. Действительно, известно, что повторная стимуляция TCR ранее активированных или аутореактивных Т–лимфоцитов при отсутствии соответствующей костимуляции вызывает запрограммированную гибель клеток, вызванную активацией (AICD) (Cencioni et al., 2015). AICD включает стимуляцию через CD95 (Fas), TNFR1, TRAILR и другие механизмы, независимые от рецепторов гибели клеток. Индукция апоптоза после повторной стимуляции через TCR также важна для элиминации чрезмерно активированных Т–клеток, таких как аутореактивные Т–лимфоциты при аутоиммунных заболеваниях. Считается, что физиологической функцией AICD, опосредованной TCR–сигнализацией,

является супрессия аутоиммунных реакций в случае встречи Т-клеток с антигеном в высокой концентрации (Rajusto et al., 2004). Предположительно, в аутореактивных Т-лимфоцитах при обострении РС из-за чрезмерной и продолжительной стимуляции нарушается метаболический профиль, и запускаются внутриклеточные механизмы апоптоза.

Согласно данным литературы, глутамат и АМРА в физиологических концентрациях от 10 нМ до 10 мкМ способны усиливать пролиферацию Т-лимфоцитов, и их хемотаксическую миграцию, как у здоровых доноров, так и у пациентов с рассеянным склерозом (Hanada, 2020). При этом наибольшая пролиферативная активность была обнаружена у больных РС в стадии обострения с активными очагами, накапливающими контраст по данным МРТ. Концентрации глутамата выше 10 мкМ ингибировали пролиферацию Т-лимфоцитов, а также хемотаксический ответ, как у пациентов, так и у контрольной группы. Более высокий активирующий эффект глутамата на Т-клетки пациентов с РС во время обострения и при наличии признаков активности заболевания на МРТ позволяли предположить участие негативных глутамат-опосредованных механизмов в данных процессах.

Было показано, что глутамат усиливает адгезию и миграцию иммунных клеток к фибронектину при Т-клеточной лимфоме, что было связано повышенной секрецией ММП (Garcia-Gaytan et al., 2022). Глутамат при среднемикромольных концентрациях увеличивает уровень внутриклеточный кальция в активированных иммуноцитах за счет стимуляции его ионотропных рецепторов, что приводит к запуску сигнальных путей, влияющих на пролиферацию, дифференцировку и выживание Т-клеток (Mprah et al., 2021). Воздействуя на метаболитные рецепторы глутамат обладает также антиапоптотическим действием.

Также было показано, что клетки Jurkat обладают повышенной экспрессией NMDA-рецепторов. При добавлении глутамата усиливалась их адгезия к внеклеточному матриксу за счет взаимодействия с VLA-4. (Miglio et al., 2007).

Исследования нашей лаборатории также показали усиление адгезионной активности клеток Jurkat к фибронектину после стимуляции с глутаматом

(Зайнуллина и др., 2017). Последующая блокада NMDA–рецепторов МК-801 снижала данный эффект. Полученные результаты демонстрируют вовлеченность ионотропных рецепторов глутамата в процессы клеточной адгезии.

Кроме того, нами также были изучены хемотаксические свойства агонистов ионотропных рецепторов глутамата на миграцию Т–клеток здоровых доноров и больных РС в модели *in vitro* (Максимова и др., 2019). Было выявлено, что на фоне действия глутамата наблюдалась тенденция к снижению миграционной активности в обеих группах доноров. В градиенте концентраций NMDA обнаружено снижение хемотаксиса Т–клеток здоровых доноров. Активация лимфоцитов с ФМА приводило к снижению количества мигрировавших клеток. У больных РС наблюдались тенденции к повышению хемотаксиса активированных клеток в градиенте глутамата, а под действием AMPA – к снижению. Был сделан вывод, что глутамат и агонисты его рецепторов не обладают выраженными хемотаксическими свойствами, но, вероятно, усиливают миграцию Т–клеток посредством синтеза молекул адгезии на поверхности лимфоцитов и эндотелия.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в регуляции адгезионной активности Т–лимфоцитов принимают участие NMDA– и AMPA–рецепторы глутамата. Обнаруженные различия в ответе Т–клеток больных РС с учетом стадии заболевания предполагают разную чувствительность к действию лигандов, указывая на повышенную активность глутаматных рецепторов при обострении. Однонаправленные изменения, выявленные при селективной стимуляции и блокаде NMDAR и AMPAR, могут говорить о модулирующей роли данных рецепторов.

3.5. Анализ субпопуляционного состава CD4⁺ Т–лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных рассеянным склерозом

Т–лимфоциты отвечают за клеточный иммунный ответ, и играют критическую роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, особенно РС (Kuzmina et al., 2020). После активации на периферии CD4⁺ Т–клетки

дифференцируются в различные субпопуляции (Sallusto et al., 2016; Cosmi et al., 2014). Нами были изучены относительное содержание Th1, Th2, Th17 и Th17.1 лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных РС. Анализ проводили с применением проточной цитометрии, используя дифференциальную экспрессию хемокиновых рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 (Yu et al., 2020). Th1 клетки определяли, как CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻, Th2 лимфоциты обладали фенотипом CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺, тогда как фенотип Th17 и T17.1 описывали как CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ и CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ соответственно (рис. 14).

Использование CCR6 и CXCR3 в качестве дискриминационных маркеров для Th17 клеток не только отражает их провоспалительное состояние, но и их способность мигрировать к месту воспаления. Предыдущие исследования в области изучения ЭАЭ и РС в основном были сосредоточены на экспрессии CCR6 (Cao et al., 2015) или IL-17, уровень которого увеличивается в крови и в СМЖ во время обострения (Brucklacher-Waldert et al., 2009). Дополнительная экспрессия CXCR3 подразделяет человеческие CCR6⁺ Th17 лимфоциты на высоких (CXCR3⁻) и низких (CXCR3⁺) продуцентов IL-17A.

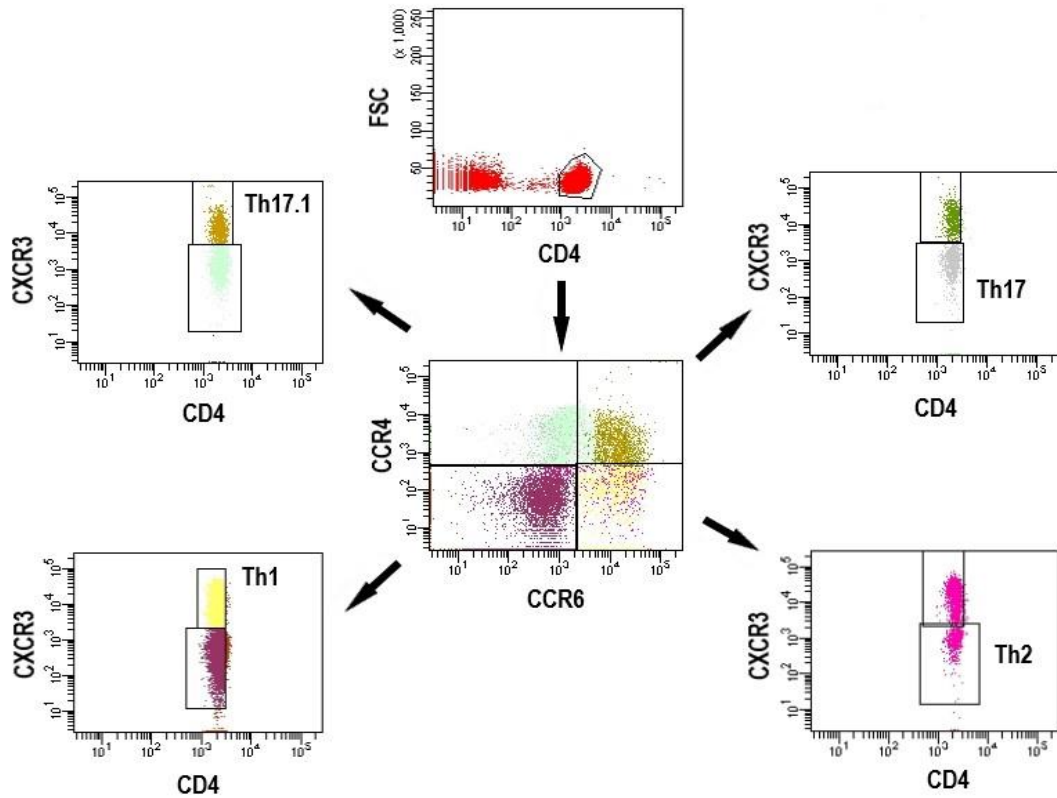


Рисунок 14. Стратегия гейтирования субпопуляций CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов. (Yu et al., 2020).

При анализе субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови обнаружено достоверно значимое повышенное относительное содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов в группе больных РС по сравнению с группой здоровых доноров (55.9 %[50.4; 59.6] и 45.3 % [38.9; 53.8] соответственно при $p=0.02$) (рис. 15). На фоне α CD3/ α CD28-активации Т-лимфоцитов наблюдалась схожая картина (54.9 % [49.1; 59.0] и 43.7 % [34.1; 49.1] соответственно при $p=0.004$).

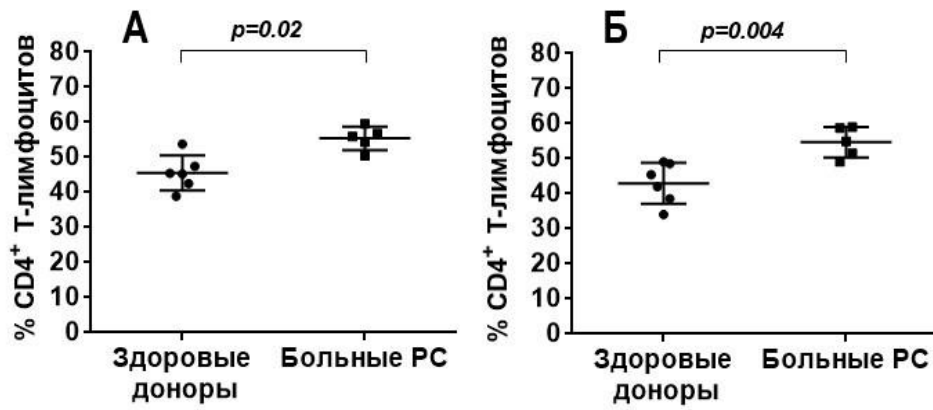


Рисунок 15. Относительное содержание нестимулированных (А) и антиген–стимулированных (Б) периферических CD4⁺ Т–лимфоцитов, полученных от здоровых доноров (n=10), больных РС (n=10). Т–клетки активировали с помощью аCD3 МКА (2.5 мкг/мл) и аCD28 МКА (1.25 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U–критерия Манна–Уитни.

В ходе комплексного анализа профиля субпопуляций Т–хелперов периферической крови обнаружено снижение относительного содержания неактивированных Th17 клеток в группе больных РС по сравнению со здоровыми донорами (6.2 % [4.0; 8.0] и 7.5 % [6.8; 13.0] соответственно при p=0.001) (рис. 16). Доля Th17.1 лимфоцитов также оказалась ниже среди пациентов с РС (3.1 % [2.5; 6.0] и 8.1 % [5.4; 14.5] соответственно при p < 0.0001). Не выявлено достоверной разницы между группой здоровых доноров и больными РС в относительном содержании нестимулированных Th1 (9.4 % [6.9; 12.8] и 9.0 % [5.5; 12.1]) и Th2 (8.6 % [3.5; 10.1] и 6.7 % [5.4; 10.8]) лимфоцитов.

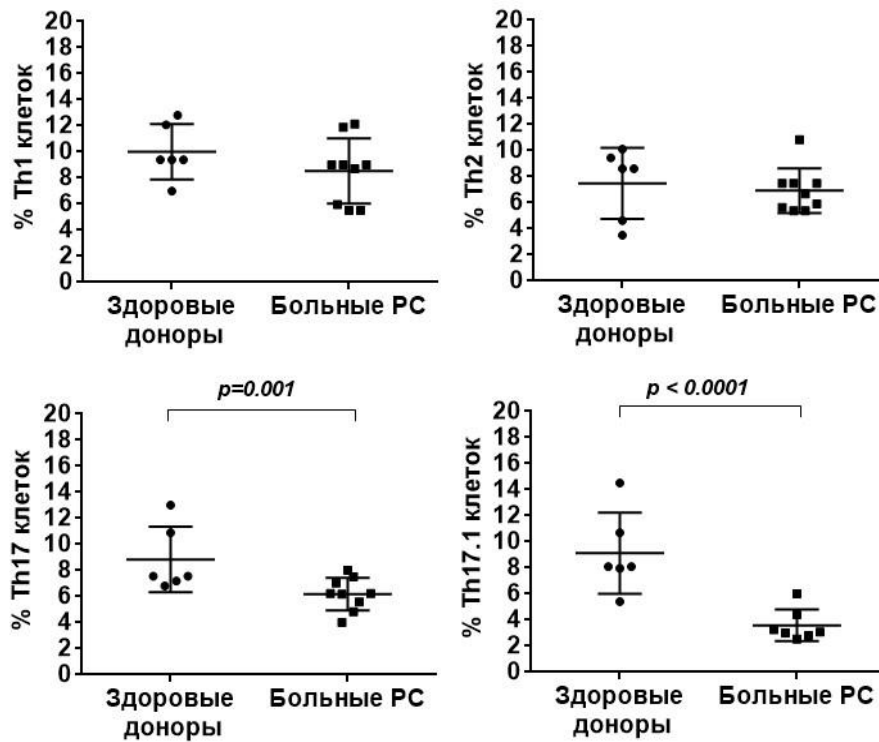


Рисунок 16. Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и Th17.1 клеток, полученных от здоровых доноров (n=10) и больных РС (n=10), до TCR-опосредованной активации. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни.

На фоне aCD3/aCD28-активации наблюдалась схожая картина – достоверное снижение доли Th17 и Th17.1 субпопуляций в группе больных РС (5.2% [3.0; 7.0] и 2.6 % [1.4; 4.0] соответственно) относительно условно здоровых доноров (6.3 % [5.9; 12.1] и 4.5 % [3.7; 7.3] при $p=0.001$ и $p < 0.0001$ соответственно) (рис. 17). Не выявлено достоверной разницы между здоровыми донорами и больными РС в относительном содержании антиген-стимулированных Th1 (9.9 % [8.9; 12.1] и 8.3 % [5.3; 13.5]) и Th2 (6.4 % [5.5; 11.8] и 8.1 % [6.2; 12.4]) лимфоцитов.

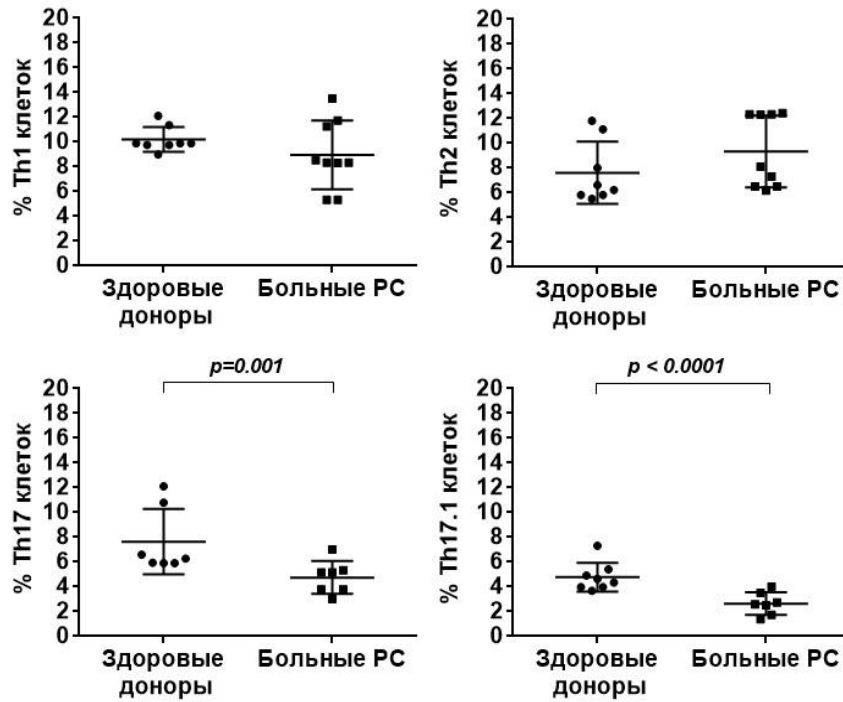


Рисунок 17. Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и Th17.1 клеток, полученных от здоровых доноров (n=10) и больных РС (n=10), после TCR–опосредованной активации. Т–клетки активировали с помощью aCD3 МКА (2.5 мкг/мл) и aCD28 МКА (1.25 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U–критерия Манна–Уитни.

При сравнительном анализе относительного содержания Th1 и Th2 субпопуляций среди здоровых доноров и больных РС в зависимости от стадии заболевания не обнаружено достоверных различий между исследуемыми группами (рис. 18). Выявлено снижение доли нестимулированных Th17 лимфоцитов 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]). Как видно из графиков, содержание Th17 лимфоцитов незначительно, но увеличивалось при обострении по сравнению с ремиссией заболевания ($p=0.03$). Доля нестимулированных Th17.1 лимфоцитов 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 $p=0.009$).

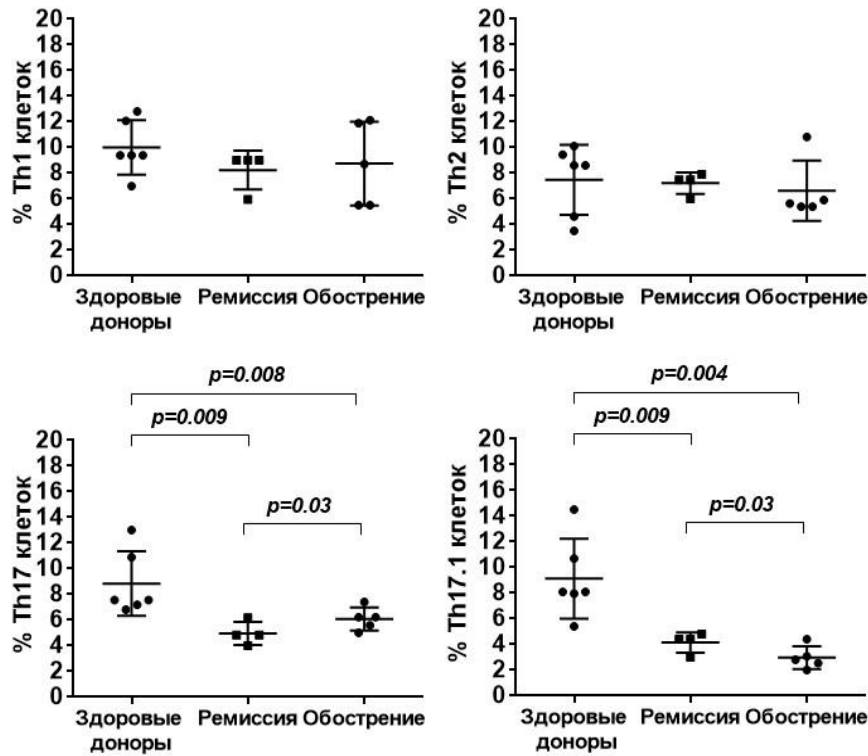


Рисунок 18. Сравнительный анализ относительного содержания Th1, Th2, Th17 и Th17.1 клеток нестимулированных периферических $CD4^+$ T-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС в стадии ремиссии ($n=10$), больных РС в стадии обострения ($n=10$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни.

На фоне активации наблюдалась схожая картина – не обнаружено различий в относительном содержании Th1 и Th2 лимфоцитов между исследуемыми группами. Выявлено достоверное снижение доли Th17 лимфоцитов в группе больных РС (при ремиссии снижение до 3.8 % [3.0; 4.9] при $p=0.004$, при обострении снижение до 5.3 % [4.4; 7.0] при $p=0.018$) (рис. 19). Доля $aCD3/aCD28$ -стимулированных Th17.1 лимфоцитов в периферической крови больных РС при обострении (2.0 % [1.4; 3.4]) была достоверно ниже 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 $p=0.015$).

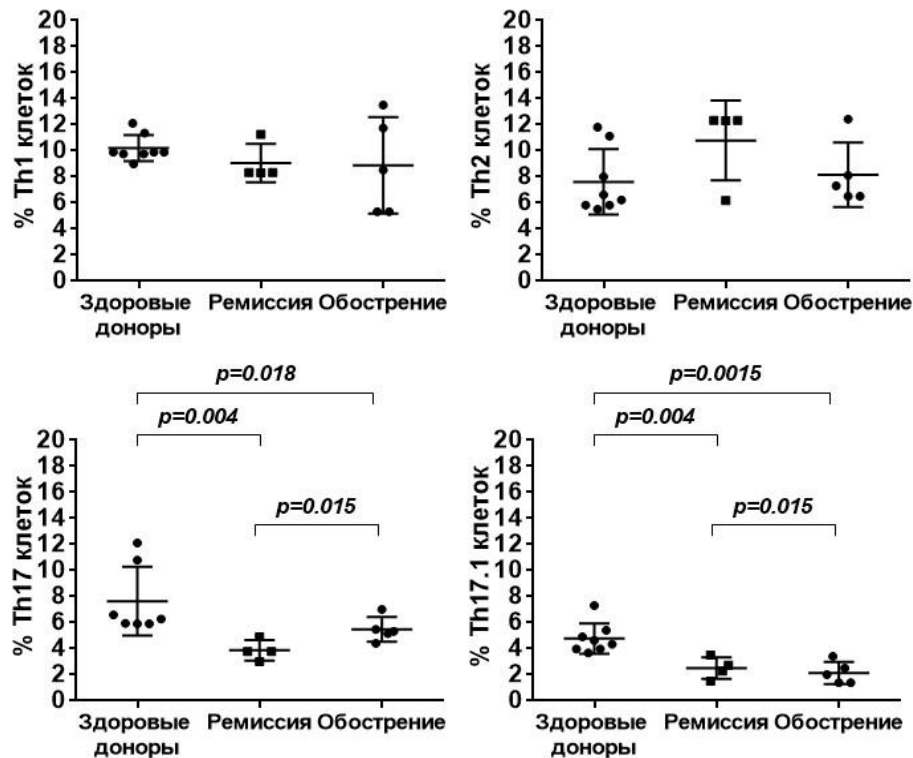


Рисунок 19. Сравнительный анализ относительного содержания Th1, Th2, Th17 и Th17.1 клеток α CD3/ α CD28–стимулированных периферических $CD4^+$ Т–лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=10$), больных РС в стадии ремиссии ($n=10$), больных РС в стадии обострения ($n=10$). Т–клетки активировали с помощью α CD3 МКА (2.5 мкг/мл) и α CD28 МКА (1.25 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U –критерия Манна–Уитни.

Таким образом, обнаружены особенности субпопуляционного состава периферических $CD4^+$ Т–лимфоцитов при РС, в частности, повышенное содержание их общего пула в крови, и снижение доли Th17 и Th17.1 клеток. Не обнаружено различий в относительном содержании Th1 и Th2 лимфоцитов между здоровыми донорами и больными РС.

Известно, что CD4⁺ Т-хелперы 17 типа, экспрессирующие IL-17, считаются критическими регуляторами активности РС. Однако в зависимости от вида и провоспалительной среды Th17 клетки проявляют функциональную гетерогенность и подразделяются на субпопуляции, которые по-разному продуцируют IL-17, IFN γ и GM-CSF.

В течение последних лет несколько исследований на модели ЭАЭ (Batoulis et al., 2010; Stromnes et al., 2008) доказали ключевую роль Th17 клеток в патогенезе заболевания (Harrington et al., 2005; Dos Passos et al., 2016; Brucklacher-Waldert et al., 2009). Высокие уровни CD4⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17, были обнаружены в периферической крови и СМЖ больных во время обострений (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Durelli et al., 2009), а также при наличии активности по данным нейровизуализации (Tzartos et al., 2008). Более того, преимущественное увеличение Th17 клеток коррелировало с количеством активных бляшек на МРТ (Hedegaard et al., 2008) и прогрессированием заболевания (Arellano et al., 2017). Также описано, что IL-17A в сочетании с IL-6 способствует разобщению ГЭБ у пациентов с РС (Kebir et al. 2007), изменяя экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках (Setiadi et al., 2019; Wanke et al., 2018) и способствуя деполимеризации актинового цитоскелета вблизи плотных контактов (Rahman et al., 2018). Th17 клетки обладают повышенной миграционной способностью у пациентов с высокоактивным РС (Colamatteo et al., 2019).

В недавнем исследовании были изучены различные эффекторные фенотипы Th17 клеток человека и их корреляция с активностью процесса (van Langelaar et al., 2018). Показано, что низкое содержание эффекторной популяции Th17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺), а не Th17 (CCR6⁺CXCR3⁻) в крови тесно связаны с переходом КИС в РС. После постановки диагноза рассеянного склероза в крови также снижалась эффекторная популяция Th1-подобных Th17 клеток, однако значительная их часть имела высокоактивированный фенотип. Эти данные позволяют предположить, что Th17.1 лимфоциты избирательно активируются на периферии и рекрутируются в ЦНС во время дебюта заболевания.

В СМЖ пациентов с КИС и РРС также наблюдалось повышенное содержание Th17.1 эффекторных клеток памяти с повышенной продукцией IFN γ и GM-CSF. Эти данные были подтверждены *ex vivo* с использованием ликвора и суспензий клеток головного мозга. Наблюдалось повышенное содержание Th1 и Th17.1 субпопуляций лимфоцитов, в то время как Th17 клетки практически не обнаруживались в тканях головного мозга и СМЖ при РС, в отличие от крови (van Langelaar et al., 2018).

Учитывая эти литературные данные и полученные результаты, можно сделать вывод, что снижение доли Th17 и Th17.1 клеток в периферической крови при РС, а особенно при обострении заболевания, вероятно, связано с повышенной инфильтрацией в ЦНС.

Проведенный нами корреляционный анализ субпопуляционного состава CD4⁺ Т-лимфоцитов выявил сильную достоверную положительную зависимость между содержанием Th17 клеток и тяжестью РС по шкале EDSS, а также скоростью прогрессирования заболевания (табл. 7). Arellano и др. в 2017 г. исследовали клеточный состав Th1 и Th17 лимфоцитов и их цитокиновый профиль при КИС и РС (Arellano et al., 2017). Они выявили, что соотношение Th1/Th17 клеток наряду с анализом соотношения цитокинов IFN γ /IL-17 предполагает прогрессирование от фенотипа Th1 к фенотипу Th17 по мере того, как заболевание развивается от КИС к РРС или ППРС. Учитывая полученные результаты и данные литературы можно сделать вывод, что субпопуляция Th17 клеток может служить предиктором тяжести и прогрессирования РС.

Таблица 7. Корреляционный анализ субпопуляционного состава CD4⁺ Т-лимфоцитов больных РС с клинико-лабораторными показателями

		Клетки Th1, %	Клетки Th2, %	Клетки Th17, %	Клетки Th17.1, %
Возраст, годы	r	0.43	0.01	-0.06	0.14
	p	0.33	0.98	0.89	0.76

Длительность заболевания, годы	r	0.07	-0.25	-0.47	0.31
	p	0.89	0.59	0.28	0.51
EDSS, баллы	r	0.22	0.02	0.76	-0.56
	p	0.63	0.97	0.05	0.20
Скорость прогрессирования, EDSS/год	r	-0.15	-0.11	0.76	-0.65
	p	0.75	0.82	0.05	0.11
Лейкоциты (WBC), 10^9 /л	r	-0.19	-0.32	-0.10	-0.05
	p	0.67	0.48	0.83	0.92
Лимфоциты (LYM), 10^9 /л	r	-0,29	0.25	-0.62	0.51
	p	0.52	0.58	0.14	0.24
Лимфоциты (LYM), %	r	-0.72	-0.31	-0.49	0.25
	p	0.10	0.55	0.33	0.63
Т-хелперы (CD4 ⁺), %	r	0.12	0.06	-0.41	0.35
	p	0.82	0.91	0.42	0.50
СОЭ, мм/ч	r	-0.03	-0.43	-0.38	0.14
	p	0,95	0,39	0,46	0,78

Примечание: r – коэффициент корреляции Спирмена, p – уровень значимости.

Таким образом, анализ субпопуляционного состава CD4⁺ Т-лимфоцитов предоставил возможность с новых позиций подойти к причинам и механизмам развития РС, и в перспективе позволит обнаружить новые клеточные маркеры для анализа прогрессирования заболевания, предсказания тяжести его развития и течения.

3.6. Влияние ионотропных рецепторов глутамата на регуляцию экспрессии молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4⁺ Т-лимфоцитах, полученных от здоровых лиц и больных рассеянным склерозом

Необходимым этапом адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам в процессе ТЭМ является взаимодействие пары белков VLA-4 и VCAM-1 (Puka-Gościak et al., 2022). VLA-4 (также известный как CD49d/CD29 или $\alpha_4\beta_1$), член суперсемейства интегринов, рецепторов клеточной поверхности, представляет собой трансмембранный нековалентный гетеродимер субъединиц α_4 (155 кДа) и

β_1 (150 кДа), который экспрессируется на всех лейкоцитах, кроме нейтрофилов (Chakraborty et al., 2015). Двумя основными природными лигандами VLA-4 являются фибронектин и VCAM-1; последний представляет собой цитокин-активируемый рецептор эндотелиальных клеток. Сродство VLA-4 к VCAM-1 обычно определяется наличием двухвалентных катионов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} и т.д.) в среде. Ig-подобный домен β -субъединицы образует головной домен в VLA-4 и содержит сайт MIDAS, который связывает двухвалентные катионы, необходимые для связывания с VCAM-1. VLA-4 связывается с областями внутри первого (D1) и четвертого (D4) доменов полноразмерной семидоменной формы VCAM-1. Однако интересно отметить, что связывание VCAM-1 с D4 требует активации VLA-4 двухвалентными катионами или хемокинами, тогда как связывание с D1 этого не требует (Chakraborty et al., 2015). Эти сведения также важны с точки зрения влияния на адгезионные свойства клеток экспрессии тех или иных хемокинов и активности ионотропных рецепторов, в частности, глутаматных NMDA- и AMPA-рецепторов.

Взаимодействие VCAM-1 с VLA-4 важно для поддержания иммунологического надзора, однако чрезмерная экспрессия любой из них или обеих может привести к развитию некоторых заболеваний, в частности, к рассеянному склерозу (Tanasescu et al., 2023). Количественная оценка представленности каждой из молекул адгезии и аффинности их взаимодействия имеет первостепенное значение для лучшего понимания его роли в заболеваниях, а также в разработке терапевтических препаратов и стратегий.

3.6.1. Анализ экспрессии молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4⁺ Т-лимфоцитах, полученных от здоровых лиц и больных рассеянным склерозом

В работе была исследована поверхностная экспрессия молекулы адгезии VLA-4 в отдельных субпопуляциях неактивированных и активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных РС.

Согласно полученным данным, наибольшая представленность молекулы адгезии VLA-4 наблюдалась в субпопуляции Th17.1 лимфоцитов, как у здоровых доноров (средняя интенсивность флюоресценции, MFI (Mean fluorescence intensity) составила 9736 [7545; 12624]), так и у больных РС вне зависимости от стадии заболевания (MFI при ремиссии – 8804 [7759; 12824], при обострении – 9629 [9023; 10261]) (табл. 8). Меньше всего VLA-4 экспрессировалась Th2 клетками (MFI в группе здоровых доноров 5837 [4935; 6585], при ремиссии 3955 [3871; 6530], при обострении 4819 [4376; 6233]). Учитывая известные сведения о патогенетической значимости субпопуляций T-клеток при РС, высокопатогенные Th17.1 лимфоциты обладают большей способностью к проникновению через ГЭБ. Полученные данные сопоставимы с нашими предыдущими результатами, согласно которым, относительное содержание Th17.1 популяции в периферической крови больных РС при обострении снижалась, что, вероятно, связано с их усиленной миграцией в ЦНС.

Не установлено достоверных различий в экспрессии VLA-4 отдельными субпопуляциями нестимулированных T-клеток между здоровыми донорами и больными РС.

На фоне aCD3/aCD28-активации наблюдалась такая же картина – повышенная экспрессия VLA-4 Th17.1 лимфоцитами во всех исследуемых группах. Среди здоровых доноров отмечалось достоверное снижение представленности VLA-4 Th2 клетками с 5837 [4935; 6585] до 4293 [3830; 5464] по сравнению с нестимулированными T-хелперами ($p < 0.05$). Среди больных РС при обострении отмечались тенденции к снижению представленности VLA-4 во всех субпопуляциях, достоверно выраженное среди Th17.1 клеток (с 9629 [9023; 10261] до 9034 [7873; 9246] при $p < 0.05$), что также согласуется с нашими результатами из подглавы 3.3. То есть, если в провоспалительных фенотипах T-лимфоцитов здоровых доноров при активации наблюдается усиление адгезионных свойств, то в стимулированных аутореактивных T-клетках при обострении заболевания, наоборот, угнетение во всех субпопуляциях, в том числе за счет снижения экспрессии молекулы адгезии VLA-4, вероятно, за счет

включения повреждающих внутриклеточных механизмов апоптоза и истощения клеток.

Не установлено достоверных различий в экспрессии VLA-4 отдельными субпопуляциями α CD3/ α CD28-стимулированных Т-клеток между здоровыми донорами и больными РС.

Таблица 8. Анализ экспрессии молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4⁺ Т-лимфоцитах, полученных от здоровых лиц и больных рассеянным склерозом (данные представлены в виде средней интенсивности флюоресценции, MFI (Mean fluorescence intensity))

Нестимулированные Т-лимфоциты	Th1 клетки	Th2 клетки	Th17 клетки	Th17.1 клетки
Здоровые доноры	7687 [6567; 9417]	5837 [4935; 6585]	7328 [6260; 8119]	9736 [7545; 12624]
Больные РС (ремиссия)	7245 [5807; 9622]	3955 [3871; 6530]	6130 [6125; 8628]	8804 [7759; 12824]
Больные РС (обострение)	6797 [6768; 7524]	4819 [4376; 6233]	6472 [6460; 9038]	9629 [9023; 10261]
αCD3/αCD28-стимулированные Т-лимфоциты	Th1 клетки	Th2 клетки	Th17 клетки	Th17.1 клетки
Здоровые доноры	8282 [5670; 8781]	4293* [3830; 5464]	7937 [7378; 9314]	11949 [8797; 13546]
Больные РС (ремиссия)	6028 [5610; 6726]	3542 [2898; 4730]	6541 [6111; 7074]	9000 [8099; 10457]
Больные РС (обострение)	6257 [5102; 6922]	4242 [4088; 5297]	6171 [5970; 8140]	9034* [7873; 9246]

Примечание: Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. * $p < 0.05$ между группами нестимулированных и α CD3/ α CD28-стимулированных Т-лимфоцитов).

В недавнем исследовании было показано, что в провоспалительных Т-хелперах, проанализированных в крови с РС, Th17.1 субпопуляция (Th17.1; CCR6⁺CXCR3⁺CCR4⁻) демонстрировала также самые высокие уровни экспрессии VLA-4 и выборочно накапливалась у пациентов без обострений, получавших натализумаб (van Langelaar et al., 2018). Этого не было обнаружено у больных РС, у которых наблюдались обострения во время лечения натализумабом. Увеличение содержания Th17.1 клеток в СМЖ у больных РС подтверждает их повышенную адгезионную активность по сравнению с другими субпопуляциями, что оказывает влияние на активность и течение РС, и обосновывает более дифференциальный подход к таргетной терапии (van Langelaar et al., 2018).

Таким образом, субпопуляции Th1, Th2, Th17 и Th17.1 обладают разной экспрессией молекулы адгезии VLA-4. При этом различий между группами здоровых доноров и больных РС не отмечается. VLA-4 экспрессируется больше всего высокопатогенными Th17.1 лимфоцитами, что указывает на их повышенную трансмиграционную способность через ГЭБ. Однако различия в ответе на антигенную стимуляцию Т-лимфоцитов между здоровыми донорами и больными РС в стадии обострения подтверждают глубокую степень нарушения функционального состояния иммунных клеток и Т-клеточного звена иммунитета при данной патологии.

3.6.2. Влияние ионотропных рецепторов глутамата на регуляцию экспрессии молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4⁺ Т-лимфоцитах, полученных от здоровых доноров

Согласно полученным данным стимуляция глутаматом не оказывала влияния на экспрессию VLA-4 нестимулированными и стимулированными Т-хелперами 1 типа условно здоровых доноров (табл. 9). Селективная блокада NMDA-рецепторов МК-801 приводила к достоверному снижению экспрессию VLA-4 неактивированными Th1 клетками до 90.1 % [86.0; 90.5] ($p < 0.05$), на фоне aCD3/aCD28-активации изменений обнаружено не было. Селективный

антагонист АМРА–рецепторов NBQX вызывал достоверное снижение экспрессии VLA–4 в неактивированных Th1 лимфоцитах до 90.0 % [86.3; 93.7], в активированных до 90.1 % [88.1; 99.7], $p < 0.05$).

Таблица 9. Анализ изменения экспрессии молекулы адгезии VLA–4 субпопуляциями Th1, Th2, Th17 и Th17.1 клеток, полученных от здоровых лиц на фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата (% по отношению к контролю)

Здоровые доноры					
Неактивированные Т–лимфоциты	Глутамат, 100 мкМ	МК–801, 100 мкМ+ глутамат, 100 мкМ	МК–801, 100 мкМ	NBQX, 100 мкМ+ глутамат, 100 мкМ	NBQX, 100 мкМ
Th1 клетки	98.8 [93.8; 104.3]	91.3* [87.9; 102.2]	90.1* [86.0; 90.5]	93.4 [84.2; 102.6]	90.0* [86.3; 93.7]
Th2 клетки	99.9 [96.4; 103.8]	95.6* [90.1; 96.1]	96.3* [92.4; 99.2]	100.0 [94.2; 105.8]	96.5 [92.8; 100.3]
Th17 клетки	100.5 [91.9; 101.8]	89.3* [89.1; 92.1]	89.8* [84.0; 95.0]	88.6* [84.0; 93.3]	86.3* [81.1; 95.6]
Th17.1 клетки	97.6 [88.2; 102.2]	92.1* [90.9; 93.4]	90.8* [85.5; 94.9]	94.3 [86.1; 102.7]	87.0* [82.9; 91.1]
aCD3/aCD28–активированные Т–лимфоциты					
Th1 клетки	98.1 [95.1; 117.3]	96.2 [91.8; 105.4]	97.0 [90.1; 104.9]	86.9 [86.0; 107.6]	90.1* [88.1; 99.7]
Th2 клетки	100.1 [94.9; 109.8]	91.4* [89.9; 93.6]	94.4 [90.4; 101.6]	101.8 [88.1; 109.2]	97.2 [93.5; 104.2]
Th17 клетки	97.0 [92.4; 107.0]	92.1* [90.6; 93.7]	92.0 [88.5; 102.6]	96.1* [92.8; 98.6]	93.1* [76.3; 95.9]
Th17.1 клетки	97.4 [89.8; 110.0]	94.4* [94.2; 96.5]	91.7 [82.5; 111.5]	93.7* [84.1; 93.7]	89.6* [85.9; 89.7]

Примечание: Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]); * $p < 0.05$ относительно контроля (окрашенные клетки без добавления веществ).

Не установлено изменений в экспрессии VLA–4 нестимулированными и стимулированными Т–хелперами 2 типа условно здоровых доноров на фоне стимуляции глутаматом и при блокаде АМРА–рецепторов. Селективный антагонист NMDA–рецепторов МК–801 вызывал достоверное снижение экспрессии VLA–4 неактивированными Th2 клетками до 96.3 % [92.4; 99.2], что подтверждалось и при последующем внесении глутамата – до 95.6 % [90.1; 96.1] ($p < 0.05$).

Изменений в экспрессии VLA-4 нестимулированными и стимулированными T-хелперами 17 типа условно здоровых доноров на фоне действия глутамата нами не было выявлено. Блокада NMDA-рецепторов МК-801 приводила к достоверному снижению экспрессии VLA-4 неактивированными Th17 клетками до 89.8 % [84.0; 95.0] ($p < 0.05$). В группе с последующим внесением глутамата также отмечалось угнетение экспрессии VLA-4 (в неактивированных лимфоцитах до 89.3 % [89.1; 92.1], в активированных – до 92.1 % [90.6; 93.7] ($p < 0.05$)). Блокада AMPA-рецепторов вызывала достоверное снижение экспрессии VLA-4 неактивированными и активированными Th17 клетками (до 86.3 % [81.1; 95.6] и 93.1 % [76.3; 95.9] соответственно ($p < 0.05$)). В группе с последующим внесением глутамата наблюдалась такая же картина (в нестимулированных T-лимфоцитах экспрессия ингибировалась до 88.6 % [84.0; 93.3], в стимулированных – до 96.1 % [92.8; 98.6] ($p < 0.05$)).

Согласно полученным данным, изменений в экспрессии VLA-4 нестимулированными и стимулированными T-хелперами 17.1 типа условно здоровых доноров на фоне действия глутамата не выявлено. Блокада NMDA-рецепторов приводила к достоверному снижению экспрессии VLA-4 неактивированными Th17.1 клетками до 90.8 % [85.5; 94.9] ($p < 0.05$). В группе с последующим внесением глутамата также отмечалось угнетение экспрессии в неактивированных лимфоцитах до 92.1 % [90.9; 93.4], в активированных – 94.4 % [94.2; 96.5] ($p < 0.05$). Блокада AMPA-рецепторов вызывает достоверное снижение экспрессии VLA-4 неактивированными и активированными Th17.1 клетками (до 87.0 % [82.9; 91.1] и 89.6 % [85.9; 89.7] соответственно ($p < 0.05$)).

Таким образом, обнаружены изменения в поверхностной экспрессии молекулы адгезии VLA-4 периферическими CD4⁺ T-лимфоцитами здоровых доноров на фоне блокады ионотропных рецепторов глутамата. Выраженность изменений была незначительной, однако неоднородный ответ отдельных субпопуляций предполагает разную чувствительность клеток к действию лигандов. Блокада NMDA-рецепторов сопровождалась снижением экспрессии VLA-4 по всем исследуемым группам, в то время как на фоне блокады AMPA-

рецепторов экспрессия уменьшалась, в основном, среди провоспалительных фенотипах Т-хелперов. Обнаруженные изменения могут служить основой для последующего дифференциального исследования субпопуляций Т-клеток изучения их роли в патогенезе РС, и поиска таргетной терапии.

3.6.3. Влияние ионотропных рецепторов глутамата на регуляцию экспрессии молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4⁺ Т-лимфоцитах, полученных от больных РС

В группе больных РС в стадии ремиссии не обнаружено изменений в экспрессии VLA-4 нестимулированными Т-хелперами 1 типа на фоне действия глутамата. Блокада NMDA-рецепторов приводила к снижению экспрессии VLA-4 до 90.4 % [84.1; 96.8], AMPA-рецепторов – до 83.0 % [82.0; 88.0] ($p < 0.05$) (табл. 10). Отмечалась тенденция к усилению экспрессии VLA-4 аCD3/аCD28-активированными Т-хелперами 1 типа при действии глутамата. На фоне блокады NMDA- и AMPA-рецепторов выявлено повышение экспрессии VLA-4 (до 108.6 % [102.0; 115.2] и 125.4 % [122.0; 127.1] соответственно при $p < 0.05$).

Таблица 10. Анализ изменения экспрессии молекулы адгезии VLA-4 субпопуляциями Th1, Th2, Th17 и Th17.1 клеток, полученных от больных РС в стадии ремиссии на фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата (% по отношению к контролю)

Больные РС (ремиссия)					
Неактивированные Т-лимфоциты	Глутамат, 100 мкМ	МК-801, 100 мкМ+ Глутамат, 100 мкМ	МК-801, 100 мкМ	NBQX, 100 мкМ+ Глутамат, 100 мкМ	NBQX, 100 мкМ
Th1 клетки	94.9 [89.4; 100.3]	92.8* [89.6; 96.0]	90.4* [84.1; 96.8]	95.4* [91.6; 99.2]	83.0* [82.0; 88.0]
Th2 клетки	88.6* [80.6; 96.6]	87.3* [80.5; 94.1]	92.7* [88.8; 96.6]	95.7* [93.2; 98.3]	90.3* [87.0; 93.1]
Th17 клетки	95.7 [87.0; 104.4]	90.3* [84.5; 96.0]	95.4 [87.8; 103.0]	103.9 [99.7; 108.1]	93.2* [90.0; 96.1]
Th17.1 клетки	99.5 [92.2; 106.9]	93.0* [89.2; 96.8]	96.1* [93.0; 99.3]	99.7 [92.8; 98.6]	83.7* [80.1; 86.0]
аCD3/аCD28-активированные					

Т–лимфоциты					
Th1 клетки	107.8 [97.4; 118.2]	103.1 [90.0; 116.1]	108.6* [102.0; 115.2]	110.0 [95.5; 124.5]	125.4* [122.0; 127.1]
Th2 клетки	101.8* [96.5; 104.3]	97.9 [95.6; 100.2]	104.1* [100.2; 108.3]	96.5 [89.6; 103.6]	107.1* [104.1; 110.0]
Th17 клетки	101.5 [95.3; 104.5]	98.4 [95.3; 101.5]	101.5 [97.2; 105.6]	102.3 [95.6; 108.9]	112.5* [109.0; 115.1]
Th17.1 клетки	102.1 [95.7; 108.6]	101.1 [91.4; 110.8]	102.6 [95.3; 105.3]	97.9 [84.5; 111.2]	116.2* [113.1; 119.2]

Примечание: Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]); * $p < 0.05$ относительно контроля (окрашенные клетки без добавления веществ).

Выявлено достоверное снижение экспрессии VLA–4 нестимулированными Т–хелперами 2 типа больных РС в стадии ремиссии (на фоне действия глутамата – до 88.6 % [80.6; 96.6], МК–801 – до 92.7 % [88.8; 96.6], NBQX – до 90.3 % [87.0; 93.1] ($p < 0.05$)). При aCD3/aCD28–активации отмечались тенденции к усилению экспрессии VLA–4 на фоне глутамата и МК–801, а при блокаде AMPA–рецепторов наблюдалось достоверное повышение до 107.1 % [104.1; 110.0] ($p < 0.05$).

Не обнаружено изменений в экспрессии VLA–4 нестимулированными и стимулированными Т–клетками 17 типа больных РС в стадии ремиссии на фоне действия глутамата и МК–801. Блокада AMPA–рецепторов приводила к достоверному снижению экспрессии неактивированных Т–клеток до 93.2 % [90.0; 96.1], а на фоне aCD3/aCD28–активации наблюдалось достоверное повышение до 112.5 % [109.0; 115.1] ($p < 0.05$).

Стимуляция глутаматом не оказывала влияния на экспрессию VLA–4 нестимулированными и стимулированными Т–клетками 17.1 типа больных РС в стадии ремиссии. Блокада NMDA–рецепторов МК–801 приводила к достоверному негативному действию на экспрессию VLA–4 неактивированными Т–клетками (снижение до 96.1 % [93.0; 99.3] при $p < 0.05$), что подтверждалось при последующем внесении глутамата (снижение до 93.0 % [89.2; 96.8] при $p < 0.05$). Антагонист NBQX достоверно снижал экспрессию VLA–4 неактивированными Т–клетками до 83.7 % [80.1; 86.0] ($p < 0.05$), на фоне активации наблюдалось достоверное повышение до 116.2 % [113.1; 119.2] ($p < 0.05$).

В группе больных РС в стадии обострения выявлена общая тенденция к снижению экспрессии VLA-4 нестимулированными и aCD3/aCD28-стимулированными Т-хелперами всех типов как при действии глутамата, так и на фоне блокады его NMDA- и AMPA-рецепторов (табл. 11), что можно объяснить повышенной чувствительностью Т-клеток при обострении к лигандам глутаматных рецепторов.

Таблица 11. Анализ изменения экспрессии молекулы адгезии VLA-4 субпопуляциями Th1, Th2, Th17 и Th17.1 клеток, полученных от больных РС в стадии обострения на фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата (% по отношению к контролю)

Больные РС (обострение)					
Неактивированные Т-лимфоциты	Глутамат, 100 мкМ	МК-801, 100 мкМ+ Глутамат, 100 мкМ	МК-801, 100 мкМ	NBQX, 100 мкМ+ Глутамат, 100 мкМ	NBQX, 100 мкМ
Th1 клетки	94.7* [92.3; 97.2]	89.0* [85.8; 92.3]	87.8* [85.9; 89.8]	89.7* [87.0; 90.0]	92.5* [89.1; 95.0]
Th2 клетки	93.3* [89.4; 97.3]	88.0* [87.6; 88.4]	84.7* [81.4; 87.5]	89.4* [85.5; 93.3]	91.2* [88.0; 95.1]
Th17 клетки	92.6* [87.7; 96.6]	89.7* [86.8; 92.7]	89.4* [85.0; 95.0]	91.0* [87.9; 94.2]	91.9* [88.1; 94.2]
Th17.1 клетки	88.7* [82.3; 95.1]	89.6* [85.3; 93.9]	81.2* [72.4; 88.2]	92.2* [90.2; 94.1]	93.4* [90.0; 96.1]
aCD3/aCD28-активированные Т-лимфоциты					
Th1 клетки	93.6* [92.3; 94.8]	94.5* [94.3; 94.6]	87.8* [82.4; 89.3]	101.0 [90.9; 111.1]	97.2* [92.0; 99.1]
Th2 клетки	90.8* [85.5; 96.0]	95.9 [88.7; 103.0]	88.8* [83.5; 94.0]	93.6* [91.6; 95.7]	91.0* [88.1; 95.2]
Th17 клетки	97.8 [94.2; 102.3]	96.1* [95.3; 96.9]	91.6* [86.1; 97.4]	98.0 [93.9; 102.2]	95.6* [92.1; 98.0]
Th17.1 клетки	95.3* [92.2; 98.4]	88.6* [86.9; 90.3]	88.6* [84.6; 92.3]	101.6 [87.3; 115.8]	89.2* [85.0; 94.1]

Примечание: Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]); * p < 0.05 относительно контроля (окрашенные клетки без добавления веществ).

При сравнительном анализе влияния глутамата на экспрессию VLA-4 нестимулированными Th1 лимфоцитами выявлена тенденция к снижению ее представленности во всех исследуемых группах (рис. 20), 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). 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.

Не обнаружено значимых различий влияния глутамата на экспрессию VLA-4 нестимулированными Th17 Th17.1 клетками между исследуемыми группами.

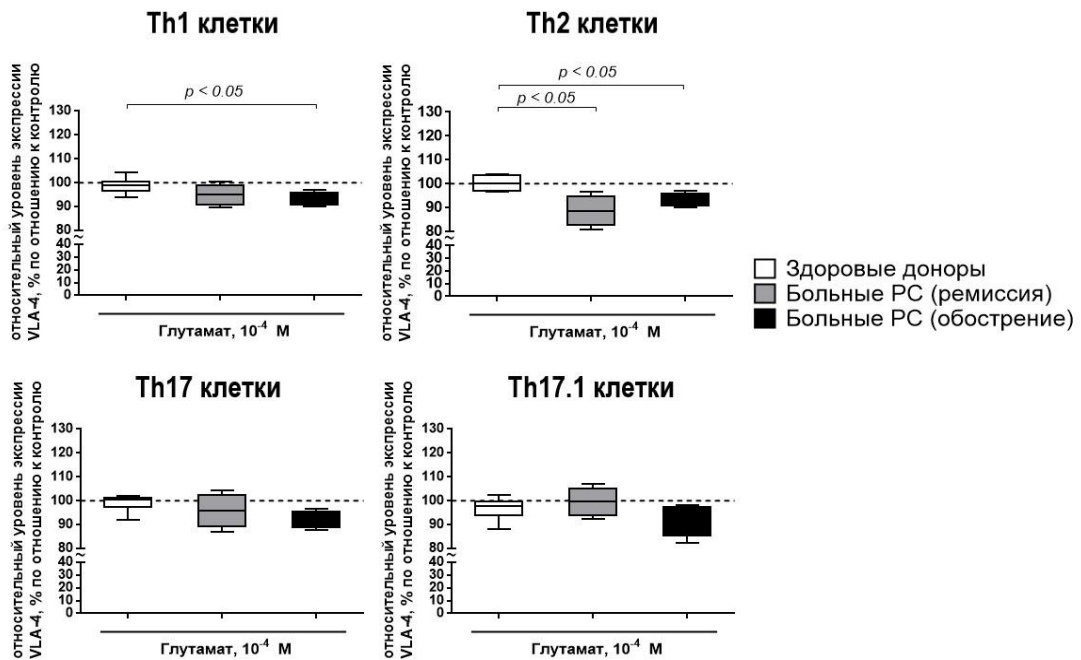


Рисунок 20. Сравнительный анализ влияния глутамата (10^{-4} М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями нестимулированных периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=20$) и больных РС в стадии ремиссии ($n=20$), больных РС в стадии обострения ($n=20$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна-Уитни.

На фоне α CD3/ α CD28-активации Th1 лимфоцитов при добавлении глутамата отмечалось повышение экспрессии VLA-4 в группах здоровых доноров и больных РС в стадии ремиссии, не достигающие статистической значимости (рис. 21). Глутамат оказывал более негативное действие на экспрессию VLA-4 Т-

хелперами 2 типа больных РС в стадии обострения ($p < 0.05$). Не обнаружено значимых различий влияния глутамата на экспрессию VLA-4 антиген-стимулированными Th17 и Th17.1 клетками между исследуемыми группами.

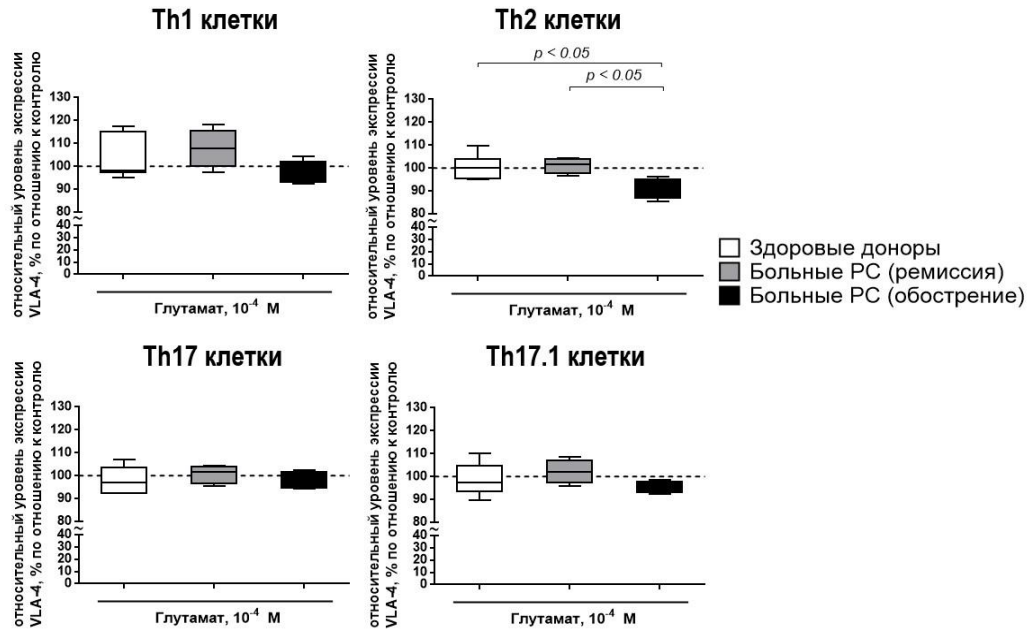


Рисунок 21. Сравнительный анализ влияния глутамата (10^{-4} М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями aCD3/aCD28-стимулированных периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=20$) и больных РС в стадии ремиссии ($n=20$), больных РС в стадии обострения ($n=20$). Т-клетки активировали с помощью aCD3 МКА (2.5 мкг/мл) и aCD28 МКА (1.25 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна-Уитни.

При сравнительном анализе влияния блокады NMDA-рецепторов на экспрессию молекулы адгезии VLA-4 нестимулированными Th1 лимфоцитами выявлено снижение ее представленности всех исследуемых группах, однако значимых различий обнаружено не было (рис. 22). Обнаружено снижение экспрессии VLA-4 нестимулированными Th2 клетками на фоне блокады NMDA-рецепторов во всех исследуемых группах, наибольшая выраженность наблюдалась среди больных РС в стадии обострения. Выявлена тенденция к

снижению экспрессии VLA-4 Th17.1 лимфоцитами во всех исследуемых группах на фоне действия МК-801, наибольшая выраженность наблюдалась среди больных РС в стадии обострения.

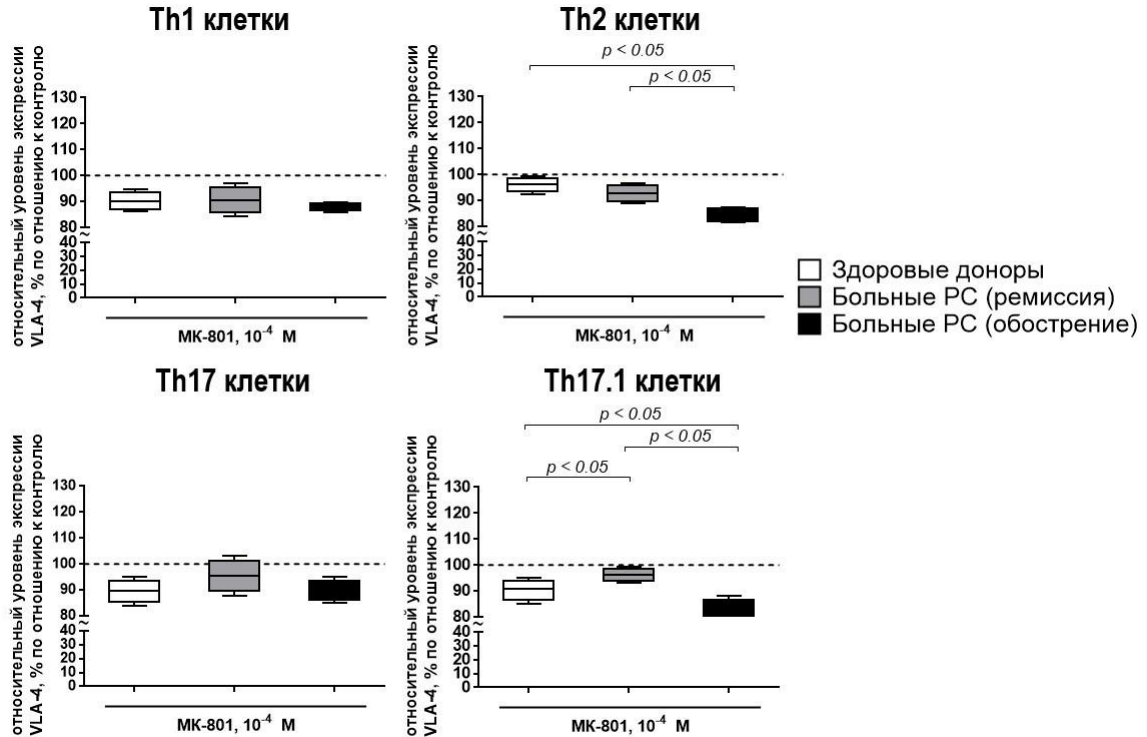


Рисунок 22. Сравнительный анализ влияния МК-801 (10^{-4} М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 субпопуляциями Th1, Th2, Th17 и Th17.1 нестимулированных периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=20$) и больных РС в стадии ремиссии ($n=20$), больных РС в стадии обострения ($n=20$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью *U*-критерия Манна-Уитни.

МК-801 оказывал более негативное действие на экспрессию VLA-4 aCD3/aCD28-активированными Т-хелперами 1 типа больных РС в стадии обострения ($p < 0.05$) (рис. 23). Выявлены достоверные различия в изменении экспрессии VLA-4 Th2 лимфоцитами между всеми исследуемыми группами на фоне блокады NMDA-рецепторов глутамата. Обнаружены достоверные различия между группами больных РС в стадии обострения и ремиссии при анализе

экспрессии VLA-4 антиген-стимулированными Th17 и Th17.1 клетками на фоне действия МК-801 ($p < 0.05$).

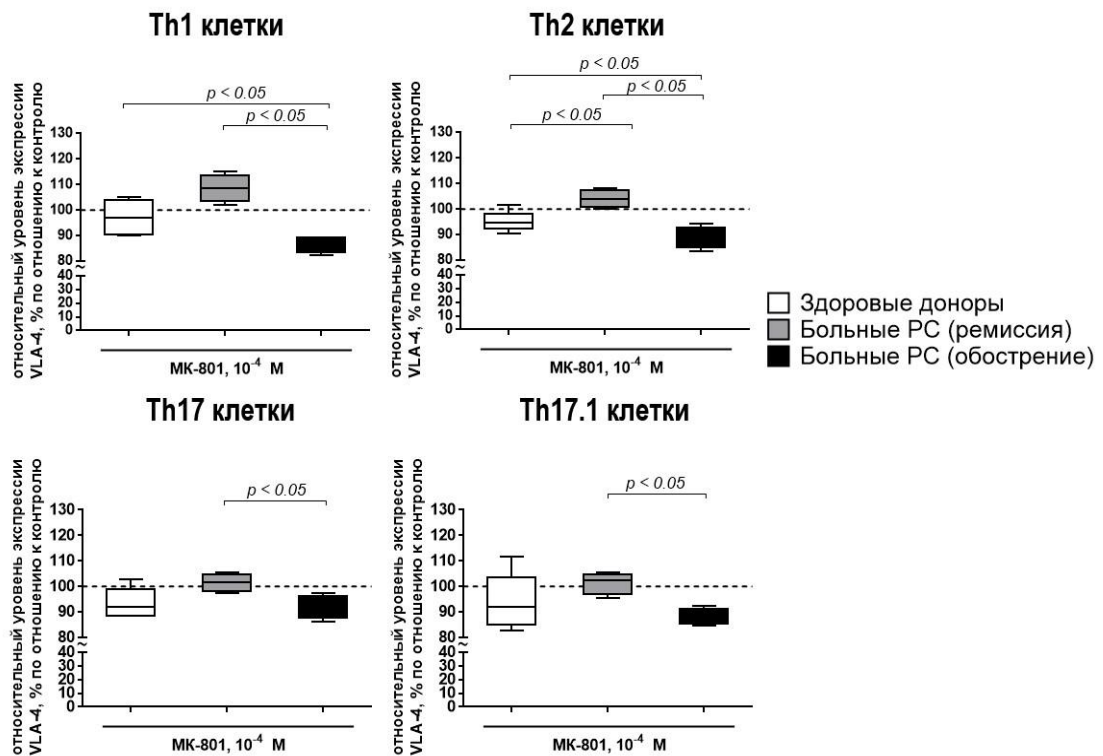


Рисунок 23. Сравнительный анализ влияния МК-801 (10^{-4} М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями aCD3/aCD28-стимулированных периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=20$) и больных РС в стадии ремиссии ($n=20$), больных РС в стадии обострения ($n=20$). Т-клетки активировали с помощью aCD3 МКА (2.5 мкг/мл) и aCD28 МКА (1.25 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна-Уитни.

При сравнительном анализе влияния блокады AMPA-рецепторов на экспрессию молекулы адгезии нестимулированными Th1 лимфоцитами выявлено снижение ее представленности всех исследуемых группах, наибольшая выраженность отмечалась среди больных РС в стадии ремиссии (рис. 24).

Обнаружено снижение экспрессии VLA-4 нестимулированными Th2, Th17, Th17.1 клетками в исследуемых группах на фоне действия NBQX.

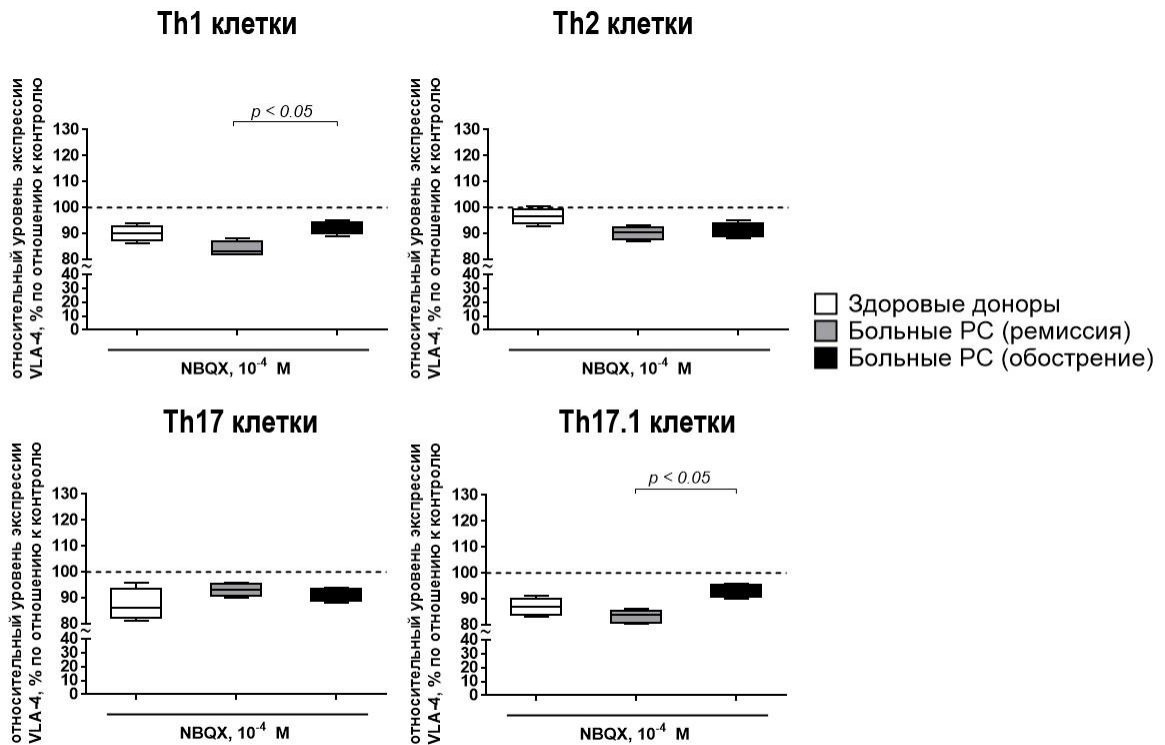


Рисунок 24. Сравнительный анализ влияния NBQX (10^{-4} М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 субпопуляциями Th1, Th2, Th17 и Th17.1 клеток нестимулированных периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=20$) и больных РС в стадии ремиссии ($n=20$), больных РС в стадии обострения ($n=20$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью U -критерия Манна-Уитни.

На фоне блокады AMPA-рецепторов наблюдалось достоверно значимое повышение экспрессии VLA-4 на клетках Th1, Th2, Th17, Th17.1 при aCD3/aCD28 активации в группе больных РС в стадии ремиссии ($p < 0.05$) (рис. 25).

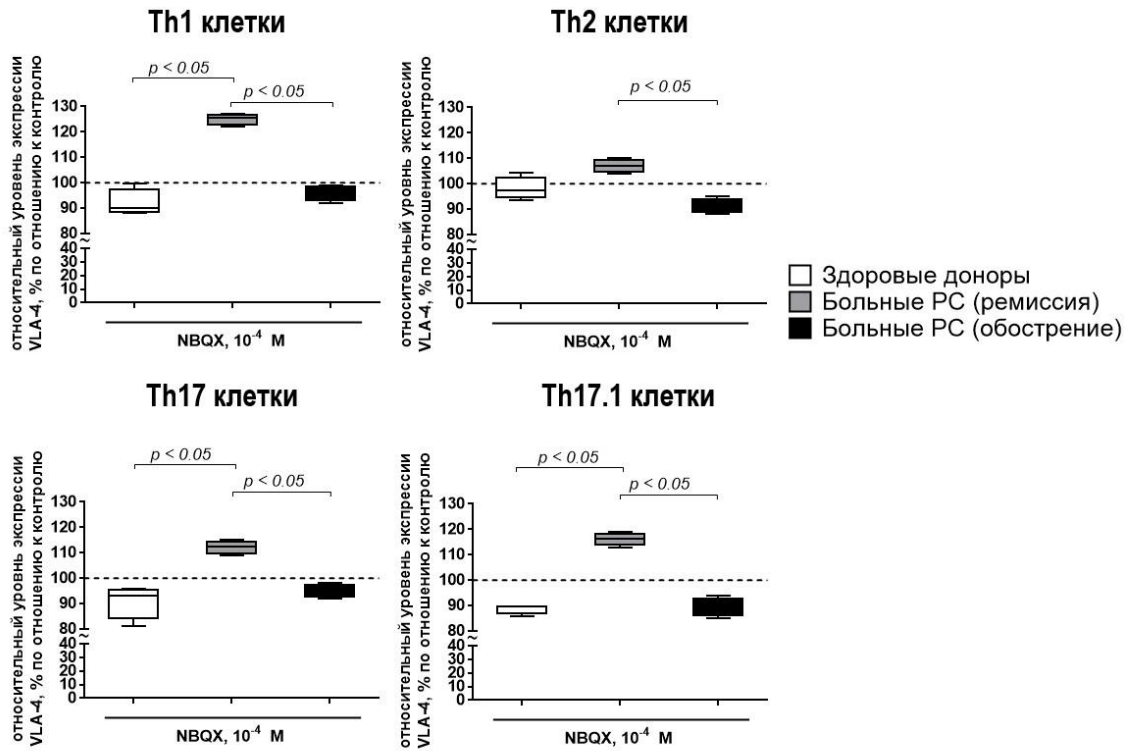


Рисунок 25. Сравнительный анализ влияния NBQX (10^{-4} M) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями aCD3/aCD28-стимулированных периферических T-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ($n=20$) и больных РС в стадии ремиссии ($n=20$), больных РС в стадии обострения ($n=20$). T-клетки активировали с помощью aCD3 МКА (2.5 мкг/мл) и aCD28 МКА (1.25 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью *U*-критерия Манна-Уитни.

Таким образом, антагонисты ионотропных рецепторов глутамата (МК-801, NBQX) оказывают преимущественно ингибирующее действие на экспрессию VLA-4 T-лимфоцитами, наибольшая выраженность наблюдалась среди больных РС в стадии обострения. Глутамат снижал экспрессию VLA-4 в группе больных РС в стадии обострения, при этом, не оказывая влияния на экспрессию VLA-4 T-клетками у здоровых доноров и больных РС в стадии ремиссии. T-лимфоциты больных РС в стадии обострения являются более чувствительными к действию лигандов глутаматных рецепторов.

Исследования предыдущих лет показали, что VLA-4 является ценной терапевтической мишенью, на основе изучения ее экспрессии во время инфильтрации лейкоцитов в ходе ЭАЭ. Блокирование молекул адгезии является эффективной стратегией предотвращения воспаления в ЦНС (Jurberg et al., 2021). Натализумаб, используемый при терапии рассеянного склероза, представляет собой моноклональное антитело против субъединицы $\alpha 4$ интегринов $\alpha 4\text{-}\beta 1$ (VLA-4) и $\alpha 4\text{-}\beta 7$. Основным механизмом его действия заключается в блокировании связывания интегринов $\alpha 4$ лимфоцитов с их эндотелиальными рецепторами – VCAM-1, предотвращая проникновение иммунных клеток через ГЭБ в ЦНС и разрушения миелиновых оболочек (Härzschel et al., 2020). Результаты исследований по влиянию терапии натализумабом (анти-VLA-4) на ЭАЭ противоречивы. Было обнаружено, что лечение моноклональными антителами против VLA-4 подавляет воспалительную инфильтрацию и клинические показатели во время прогрессирования ЭАЭ (Pyka-Fosciak et al., 2020). Предварительная инъекция моноклональных антител против VLA-4 до начала ЭАЭ отсрочила его наступление и снизила тяжесть заболевания, но лечение на пике или во время ремиссии усугубляло рецидивы (Pyka-Fosciak et al., 2020). Введение синтетического антагониста VLA-4 во время хронической фазы ЭАЭ практически не имело влияния; более того, ухудшение заболевания происходило после прекращения терапии. Отсутствие эффекта после позднего лечения анти-VLA-4 может быть связано с изменениями экспрессии молекул адгезии на разных стадиях развития заболевания (Jurberg et al., 2021).

В литературе мало данных о механизмах влияния лигандов глутаматных рецепторов на экспрессию интегринов лимфоцитами, поэтому, основываясь на полученных результатах, можно лишь предположить их возможные взаимосвязи.

Во-первых, из результатов наших предыдущих работ, известно, что NMDA-рецепторы глутамата на уровне транскриптома могут участвовать в модуляции некоторых ключевых функций мононуклеаров, а также в регуляции процессов хемотаксиса иммунных клеток у больных РС (Кузьмина и др., 2019). В частности, имеются данные о подавлении экспрессии генов, кодирующих

хемокины CCL20 и CXCL8 при действии МК–801, что может свидетельствовать в пользу предположения о возможном протективном эффекте антагонистов NMDA–рецепторов в отношении одного из звеньев патогенеза РС. Ген *CCL20* кодирует хемокин, являющийся лигандом хемокинового рецептора CCR6. Взаимодействие CCL20 со своим рецептором регулирует хемоаттракцию к эндотелию CCR6–экспрессирующих клеток, включая незрелые дендритные клетки, эффекторные Т–клетки, в том числе Th17, Т–клетки памяти и др. Использование антител против CCL20 при ЭАЭ значительно снижало выраженность клинических проявлений и нейровоспаления (Mony et al., 2014). Обнаружение повышенного уровня CCL20 в сыворотке пациентов с РС подчеркивает важную роль данного хемокина в патогенезе заболевания (Jafarzadeh et al., 2014). CXCL8 – один из основных медиаторов воспалительного ответа, индуцирует хемоаттракцию, миграцию и инфильтрацию нейтрофилов, моноцитов и Т–клеток к очагам воспаления, способствуя адгезии клеток крови к эндотелию сосудов. Исходя из этих данных, можно предположить, что ионотропные рецепторы глутамата также могут влиять на экспрессию генов, кодирующих молекулы адгезии, в том числе, и VLA–4.

Во–вторых, в иммунных клетках глутаматные рецепторы взаимодействуют с молекулами адгезии, в том числе интегринными, участвующих в регуляции функционального состояния этих клеток (Тхуватуллин и др., 2026). Показано, что разнообразие кальциевых сигналов несет большую информационную нагрузку, помогая лимфоцитам выбирать между различными путями ответа на антигенную стимуляцию (Давыдова и др., 2007). В связи с этим изменение проницаемости лимфоцитарной мембраны для ионов Ca^{2+} при активации ионотропных глутаматных рецепторов может играть всю регуляторную роль. Было показано, что обработка AMPA может модулировать экстравазацию посредством рециркуляции интегринов на нейтрофилах в ответ на сигнализацию, которая изменяет частоту потока ионов Ca^{2+} (Gudz et al., 2006). Миграция клеток моделировалась адгезией интегрин $\alpha_v\beta_3$ к фибронектину. Показано, что относительная адгезия переднего и заднего краев мембраны регулировалась

внутриклеточными потоками Ca^{2+} . Плотность $\alpha_v\beta_3$ интегринов на переднем крае клетки была значительно больше, чем в задней части клетки. Это дифференциальное распределение поддерживалось эндоцитозом молекул адгезии в задней части клетки и рециркуляцией к переднему краю, и зависело от ионов кальция. Таким образом, можно уменьшить миграцию и устранить дифференциальное распределение интегринов, изменив внутриклеточное содержание Ca^{2+} .

В-третьих, лиганды ионотропных рецепторов глутамата могут изменять конформационные изменения самой молекулы адгезии VLA-4, регулировать аффинность за счет активации различных клеточных рецепторов, например, хемокиновых или T-клеточного рецептора, что инициирует сигнальные пути, основными элементами которого являются PI3K и PLC γ . В конце каскада адаптерные белки в лейкоцитах талин-1 и киндлин-3 связываются с внутриклеточным доменом β -цепи интегрина. Эти события влекут за собой конформационные изменения в молекуле VLA-4, а также измененное пространственное распределение молекулы в клетке, которое регулирует авидность (Härzschel et al., 2020).

В совокупности результаты работы дополняют имеющиеся сведения о роли ионотропных рецепторов глутамата в регуляции адгезии T-лимфоцитов к эндотелиоцитам, в том числе за счет влияния на VLA-4/VCAM-1 опосредованное взаимодействие. Обнаруженное преимущественно ингибирующее действие на экспрессию VLA-4 T-клетками больных РС на фоне блокады NMDAR и AMPAR подтверждает данные об усиленной экспрессии данных рецепторов, особенно при обострении заболевания. Неоднородный ответ отдельных субпопуляций предполагает разную чувствительность клеток к действию лигандов. Хочется отметить селективность действия блокатора AMPA-рецепторов в отношении провоспалительных субпопуляций T-клеток, что может служить основой для последующего изучения их роли в патогенезе РС, и поиска таргетной терапии. Дальнейшие исследования внутриклеточных механизмов регуляции экспрессии молекул адгезии, связанных с функционированием рецепторов глутамата, имеют

фундаментальное значение для понимания многих процессов, как в норме, так и при РС.

3.7. Роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции экспрессии молекул адгезии, локализованных на клетках HUVEC (PECAM-1, VCAM-1) в условиях TNF α -активации

Следующим этапом исследования являлась оценка роли ионотропных рецепторов глутамата в регуляции экспрессии молекул адгезии, локализованных на клетках HUVEC. ГЭБ принимает участие в рекрутировании иммунных клеток в ЦНС в физиологически нормальных условиях. Увеличение инфильтрации иммунных клеток через ГЭБ, неконтролируемая активация и презентации антигенов при РС указывает на нарушение функций и структуры ГЭБ. Церебральный эндотелий обладает низкой базальной экспрессией молекул адгезии, таких как ICAM-1, VCAM-1 и P- и E-селектин, при этом PECAM-1 конституционально высоко экспрессируется. По данным литературы известно, что экспрессия молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1 усиливается при РС, в то время как экспрессия PECAM-1 снижается (Wimmer et al., 2019). Кроме того, в условиях нейровоспаления повышается экспрессия P- и E-селектина.

3.7.1. Роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции экспрессии молекулы адгезии PECAM-1 клетками HUVEC в условиях TNF α -активации

PECAM-1, также известный как CD31, представляет собой сложный трансмембранный гликопротеин типа I с молекулярной массой 130 кДа, играющий критически важную роль в различных процессах, связанных с сосудистой системой и иммунным ответом. Молекула состоит из шести внеклеточных иммуноглобулиноподобных доменов, каждый из которых имеет уникальную пространственную конфигурацию и функциональные свойства, а

также из цитоплазматического домена, подверженного посттрансляционным модификациям, таким как фосфорилирование сериновых и тирозиновых остатков (Zhang et al., 2023).

Внеклеточные домены PECAM-1, особенно два N-концевых иммуноглобулиноподобных домена, являются главными участниками процесса клеточной адгезии. Именно они обеспечивают гемофильное связывание, взаимодействие лейкоцитов с эндотелием. Более того, эти домены активно участвуют в миграции лейкоцитов через ГЭБ. Они также способствуют стабилизации эндотелиальных клеток и формированию межклеточных соединений, что обеспечивает целостность и функцию сосудистой стенки (Paddock et al., 2016; Lertkiatmongkol et al., 2016).

PECAM-1 экспрессируется эндотелиальными клетками, тромбоцитами, нейтрофилами, моноцитами и эозинофилами и др. То есть его роль не ограничивается барьерной и адгезионной функцией, он участвует в процессе тромбообразования, аллергических реакциях, регуляции иммунного ответа бактериальные агенты.

В структуре ГЭБ PECAM-1 локализуется в плотных контактах, регулируя их проницаемость. Цитоплазматический домен PECAM-1 взаимодействует с внутриклеточными белками β - и γ -катенинами, что обеспечивает структурную целостность и прочность цитоскелета. Более того, цитоплазматический домен может активировать внутриклеточные сигнальные каскады, влияющие на клеточную адгезию, миграцию и пролиферацию.

PECAM-1 конституционально экспрессируется эндотелиальными клетками, поэтому ее представленность изначально высока (Tsuneki et al., 2014). CD31 часто используют в качестве маркера эндотелия при иммуногистологическом анализе тканей (Zhang et al., 2023). В нашей работе не было выявлено влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на представленность молекулы адгезии PECAM-1 клетками HUVEC (рис. 26, 27).

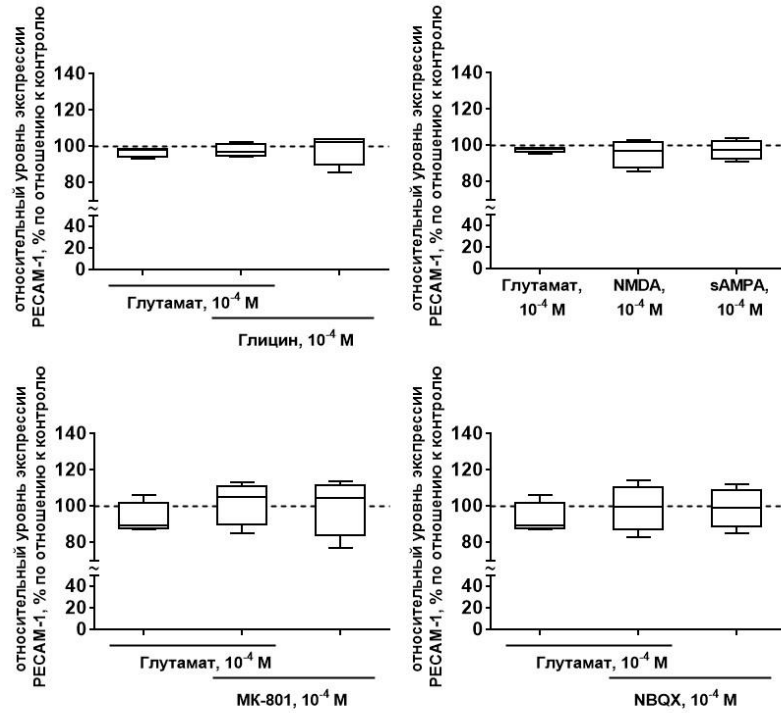


Рисунок 26. Влияние агонистов (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA) и антагонистов (МК–801, NBQX) ионотропных рецепторов глутамата на экспрессию молекулы адгезии PECAM–1 неактивированными клетками HUVEC ($n=3$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью t -критерия Вилкоксона. * $p < 0.05$ относительно контроля (клетки HUVEC без добавления веществ).

В модели воспаления (при добавлении $TNF\alpha$) экспрессия PECAM–1 уменьшалась до 83.3 % [80.4; 85.3], что согласуется с данными литературы о том, что в воспаленном эндотелии снижается экспрессия PECAM–1, что приводит к ухудшению барьерных свойств ГЭБ, увеличению проницаемости для различных молекул (Wimmer et al., 2019).

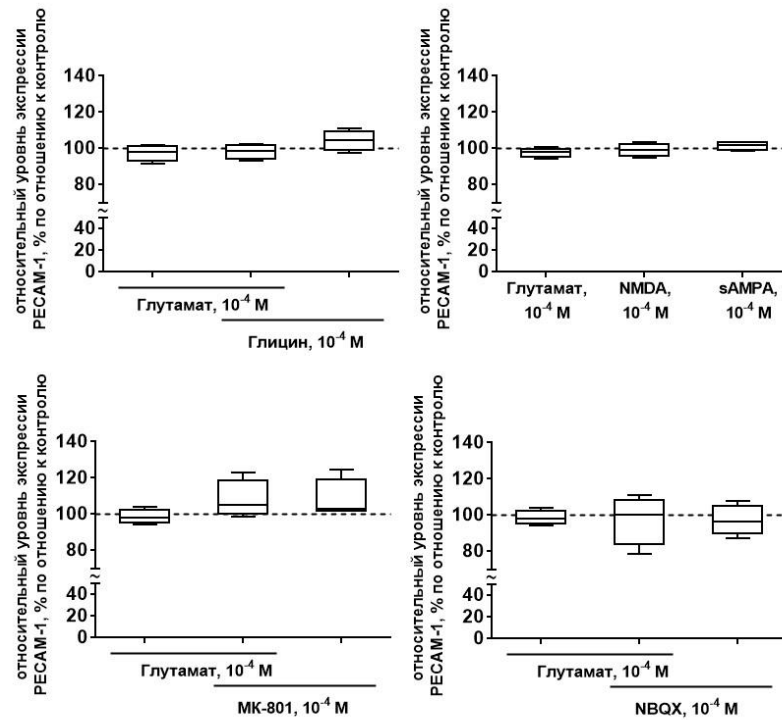


Рисунок 27. Влияние агонистов (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA) и антагонистов (МК–801, NBQX) ионотропных рецепторов глутамата на экспрессию молекулы адгезии PECAM–1 TNF α -активированными клетками HUVEC (n=9). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Вилкоксона. $p < 0.05$ относительно контроля (клетки HUVEC без добавления веществ).

По данным литературы известно, PECAM–1 не оказывает влияния на скорость проникновения Т–клеток, но способен регулировать путь диапедеза, его отсутствие смещало миграцию Т–лимфоцитов по трансцеллюлярному направлению (Huang et al., 2023). У пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом отмечались повышенные сывороточные уровни растворимого PECAM–1, увеличенное количество циркулирующих PECAM–1–позитивных микрочастиц, а также повышенная экспрессия PECAM–1 на циркулирующих лейкоцитах (Huang et al., 2023). При этом лечение β -интерферонами увеличивало экспрессию PECAM–1 в сосудах, предполагая, что это может способствовать улучшению состояния при РС (Mitsikostas et al., 2017).

Используя модель человеческого ГЭБ *in vitro*, основанную на первичных микрососудистых эндотелиальных клетках мозга мышей (pMBMECs), было обнаружено, что PECAM-1 не является необходимым для трансмиграции субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов через ГЭБ (Wimmer et al., 2019). При снижении экспрессии PECAM-1 увеличивается проницаемость для малых молекул и усиливается трансцеллюлярный диapedез иммунных клеток.

Таким образом, отсутствие изменений в экспрессии молекулы адгезии CD31 на фоне действия лигандов ионотропных рецепторов глутамата свидетельствуют о том, что NMDAR и AMPAR, вероятно, не принимают участия в PECAM-1-опосредованной регуляции проницаемости ГЭБ, и в смещении путей диapedеза Т-клеток.

3.7.2. Роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции экспрессии молекулы адгезии VCAM-1 клетками HUVEC в условиях TNF α -активации

VCAM-1 (CD106) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 90 кДа, который в основном экспрессируется в эндотелиальных клетках. На базальном уровне его экспрессия находится на низком уровне, однако она может значительно увеличиваться под воздействием провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , а также при наличии АФК, окисленных липопротеинов низкой плотности и при высокой концентрации глюкозы (Cook-Mills et al., 2011). Это делает VCAM-1 важным маркером воспалительных процессов в организме.

При различных заболеваниях, таких как атеросклероз, сахарный диабет, VCAM-1 может также экспрессироваться на поверхности других клеток, помимо эндотелиальных. К таким клеткам относятся тканевые макрофаги, дендритные клетки, фибробласты костного мозга, миобласты, ооциты, клетки Купфера, клетки Сертоли и даже раковые клетки. Это разнообразие экспрессии указывает на его многофункциональность и важность в патогенезе различных заболеваний.

VCAM-1 состоит из внеклеточного, трансмембранного и цитоплазматического доменов (Schlesinger et al., 2015). Интегрин $\alpha 4\beta 1$ соединяясь

с VCAM-1, обеспечивает прочную адгезию лейкоцитов к эндотелию для последующего диапедеза клеток в ЦНС (Singh et al., 2023). После VLA-4 / VCAM-1-опосредованного взаимодействия запускается каскад внутриклеточных реакций, приводящих к активации никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) оксидазы 2 (Marchese et al., 2012). НАДФН-оксидаза производит супероксид из кислорода с использованием кофактора НАДФН с последующей дисмутацией до перекиси водорода (H_2O_2). Внутриклеточная H_2O_2 заметно влияет на сигнальную трансдукцию и приводит к активации матриксных металлопротеиназ и протеинкиназы $C\alpha$ (PKC α) (Wittchen et al., 2009), которая увеличивает фосфорилирование протеинтирозинфосфатазы 1B (PTP1B) в эндоплазматическом ретикулуме, что необходимо для VCAM-1-зависимой трансэндотелиальной миграции лейкоцитов (Kong et al., 2018). VCAM-1 также стимулирует образование актиновых стресс волокон через сигнальный путь Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), что приводит к ослаблению межклеточного взаимодействия между эндотелиоцитами, и облегчает трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов в условиях воспаления (Kong et al., 2018).

При РС повышенная экспрессия ICAM-1 и VCAM-1 активированными эндотелиальными клетками коррелирует со степенью инфильтрации иммунных клеток. Лигандами для этих молекул адгезии являются интегрины LFA-1 и VLA-4 соответственно, на лимфоцитах. Именно эти две пары молекул обеспечивают прочную адгезию лейкоцитов к эндотелию сосудов ГЭБ.

Согласно полученным данным, VCAM-1 экспрессировалась эндотелиоцитами в состоянии покоя в незначительном количестве. В интактных клетках HUVEC на фоне глутамата и глицина выявлено достоверное снижение экспрессии VCAM-1 до 90.1 % [90.1; 93.3] и 87.6 % [71.5; 88.3] соответственно ($p < 0.05$) (рис. 28). Такая же картина наблюдалась в группе с одновременным добавлением глутамата и глицина (снижение экспрессии до 88.8 % [76.0; 90.3] при $p < 0.05$). При селективной стимуляции глутаматных NMDA- и AMPA-рецепторов представленность VCAM-1 достоверно уменьшалась до 73.9 % [64.4; 88.0] и 72.4 % [62.4; 88.0] соответственно при $p < 0.05$.

Блокада NMDA– и AMPA–рецепторов глутамата приводила к достоверному снижению экспрессии VCAM–1 интактными клетками HUVEC до 83.5 % [78.8; 93.9] и 70.2 % [68.7; 92.6] соответственно ($p < 0.05$). В качестве дополнительного контроля для исследования роли ионотропных рецепторов глутамата использовали предварительно обработанные антагонистами клетки HUVEC, которые затем стимулировали глутаматом. В этих группах также было продемонстрировано угнетающее действие блокаторов NMDA– и AMPA–рецепторов глутамата на экспрессию VCAM–1 (снижение до 85.2 % [48.7; 111.7] на фоне действия МК–801, и до 67.2 % [66.3; 79.6] на фоне NBQX).

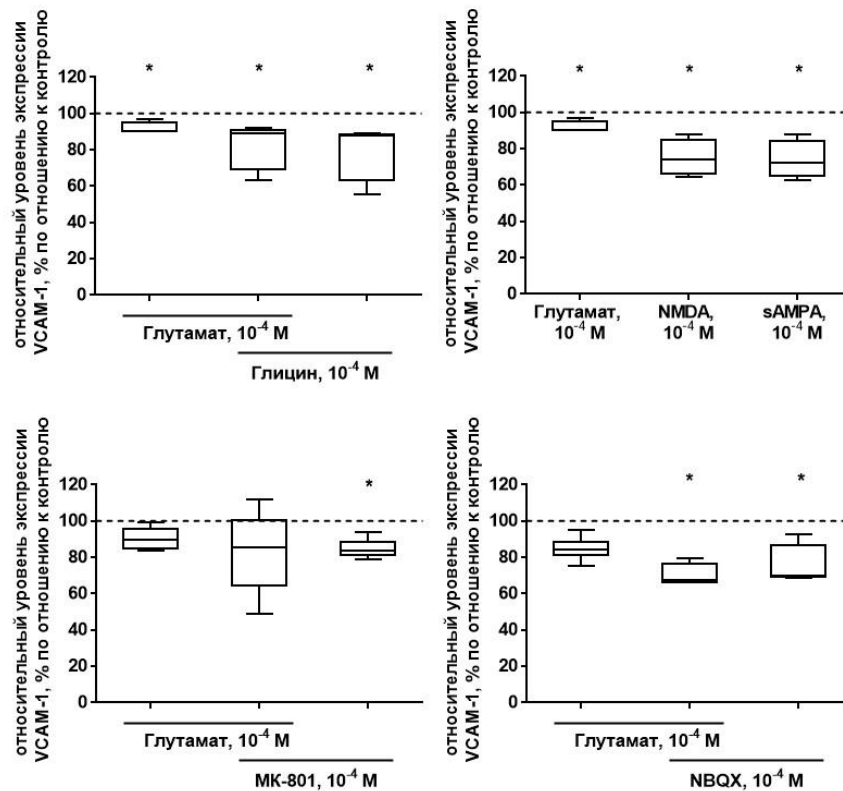


Рисунок 28. Влияние агонистов (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA) и антагонистов (МК–801, NBQX) ионотропных рецепторов глутамата на экспрессию молекулы адгезии VCAM–1 неактивированными клетками HUVEC ($n=9$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью t –критерия Вилкоксона. * $p < 0.05$ относительно контроля (клетки HUVEC без добавления веществ).

На фоне активации $\text{TNF}\alpha$ 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, но они были менее выраженными по сравнению с группами интактных клеток (рис. 29). 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 ($p < 0.05$).

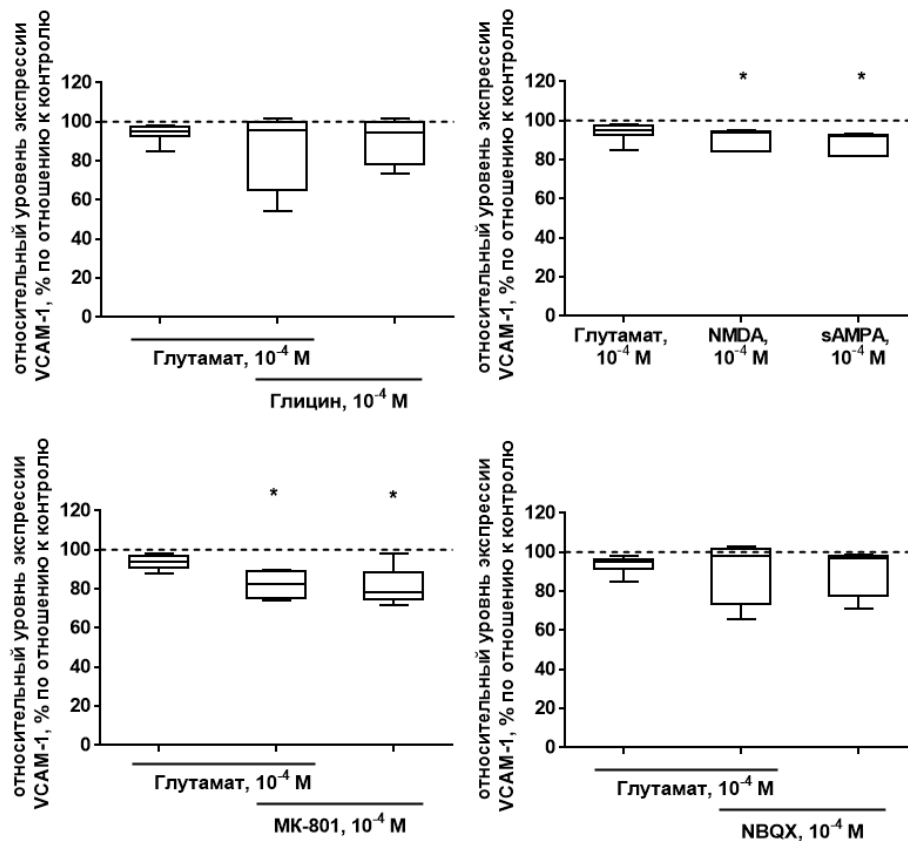


Рисунок 29. Влияние агонистов (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA) и антагонистов (МК-801, NBQX) ионотропных рецепторов глутамата на экспрессию молекулы адгезии VCAM-1 $\text{TNF}\alpha$ -активированными клетками HUVEC ($n=9$). Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью t -критерия Вилкоксона. * $p < 0.05$ относительно контроля (клетки HUVEC без добавления веществ).

На фоне активации $\text{TNF}\alpha$ блокада NMDA–рецепторов вызывала достоверное снижение представленности 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.

Таким образом, была обнаружена низкая базальная экспрессия VCAM–1 интактными клетками HUVEC. Учитывая этот факт, представляются интересными данные в модели эндотелиальной дисфункции, согласно которым, наблюдалось кратное увеличение ее экспрессии. Выявлено, что блокада NMDA–рецепторов достоверно снижала представленность молекулы адгезии VCAM–1, что было подтверждено при последующей стимуляции глутамата (экспрессия не увеличивалась).

Изучив литературные данные о взаимосвязи рецепторов глутамата и эндотелиальной дисфункции, были обнаружены схожие результаты. Мемантин, неконкурентный антагонист NMDA–рецепторов, является лицензированным препаратом, используемым для лечения болезни Альцгеймера. Фармакологическое ингибирование ионотропных рецепторов глутамата NMDA подтипа подавляет симптомы неврологического заболевания у экспериментальных крыс с ЭАЭ и снижает экспрессию провоспалительных цитокинов в головном мозге (Sulkowski et al. 2013; Wu et al. 2009). Мемантин за счет блокады NMDA-рецепторов снижает адгезию и миграционную активность моноцитов к ГЭБ *in vitro* на фоне активации $\text{TNF}\alpha$ (Wang et al., 2017). Механистически мемантин обращает активацию транскрипционного фактора NF– κB , предотвращая фосфорилирование и деградацию его ингибитора I $\kappa\text{B}\alpha$. Эти данные описывают противовоспалительный механизм, обусловленный нейропротекторным действием мемантина, опосредованным эндотелиальными клетками.

При применении NMDA как в моделях *in vitro*, так и *in vivo* наблюдалось увеличение транспорта биоактивных веществ, опосредованное модуляцией

молекул, участвующих в доставке, включая клатрин и кавеолин (Kim et al., 2022). Кроме того, активация NMDA–рецепторов эндотелиоцитов вызывала структурные изменения в ГЭБ и увеличивала трансклеточную проницаемость, что свидетельствовало о региональной гетерогенности его ответов. Более того, при этом увеличивался эндосомальный транспорт, и инактивировались лизосомальные пути, что усиливало молекулярную доставку, опосредованную активацией САМК II и RhoA/протеинкиназы C (PKC).

Как было упомянуто выше, глутамат увеличивает содержание оксида азота в эндотелиоцитах через активацию NMDA–рецепторов. Влияние NO на адгезию лейкоцитов связано с транскрипционной регуляцией экспрессии белков адгезии на эндотелиальных клетках, которая находится под контролем NF–κB, представляющим собой димерный белок, образованный любым из членов семейства Rel (p50, p65 или Rel–A, p52, c–Rel и RelB) (Aguilar et al., 2020). Классической формой NF–κB является гетеродимер p50–p65, который остается неактивным в цитозоле за счет взаимодействия с ингибирующим белком ИКВα (Sha et al., 2012). Активация цитокиновых рецепторов способствует фосфорилированию, убиквитинированию и протеасомной деградации ИКВα, что приводит к транслокации гетеродимера p50–p65 в ядро для связывания с сайтом ДНК и активации транскрипции генов (Aguilar et al., 2020). Активация пути NF–κB приводит к синтезу *de novo* высоких уровней информационной РНК для E–селектина, P–селектина, ICAM–1 и VCAM–1, что индуцирует увеличение экспрессии этих белков в активированных эндотелиальных клетках и усиливает адгезию лейкоцитов на поверхности клеток (Mussbacher et al., 2019).

Таким образом, на основе литературных источников и полученных экспериментальных данных показано, что NMDA–рецепторы глутамата принимают участие в регуляции экспрессии VCAM–1 эндотелиоцитами в *in vitro* модели ГЭБ в условиях воспаления, тем самым, способны влиять на адгезию лимфоцитов. В совокупности эти результаты подчеркивают важность передачи сигналов, опосредованной NMDA–рецепторами, в регуляции проницаемости ГЭБ.

Подводя итог результатов по всей 3 главе, можно сделать вывод, что ионотропные рецепторы глутамата оказывают влияние на лейкоцитарно-эндотелиальное взаимодействие при РС, в частности участвуют в регуляции процессов жизнеспособности лимфоцитов периферической крови, клеток HUVEC, также их адгезионной активности, в том числе, за счет изменения экспрессии молекул адгезии. Обнаруженные различия в ответе Т-клеток больных РС с учетом стадии заболевания предполагают разную чувствительность к действию лигандов глутаматных рецепторов. Если в регуляции жизнеспособности лимфоцитов периферической крови принимают участие оба подтипа рецепторов, то жизнеспособность клеток HUVEC регулируют, в основном, AMPAR. Обнаружен однонаправленный модулирующий характер влияния NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата на адгезию Т-лимфоцитов к эндотелиоцитам HUVEC. Однако при изучении экспрессии VLA-4 выявлен селективный эффект антагониста NBQX в отношении провоспалительных фенотипов Т-клеток. Установлена вовлеченность NMDA-рецепторов в регуляцию экспрессии молекулы адгезии VCAM-1 эндотелиоцитами HUVEC. Полученные данные доказали важную роль ионотропных рецепторов глутамата в патогенезе РС, и, в частности, в межклеточном взаимодействии, что позволяет рассматривать их как перспективную фармакомишень в терапии заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей научно–исследовательской работе проведено исследование опосредованных ионотропными рецепторами глутамата клеточных и молекулярных механизмов регуляции адгезии лейкоцитов у здоровых лиц и больных РС к эндотелиальным клеткам в системе *in vitro*.

Миграция иммунокомпетентных клеток в ЦНС и эндотелиальная дисфункция являются одними из ключевых звеньев в патогенезе РС, и многие препараты, используемые для его лечения, оказывают влияние на проницаемость ГЭБ и лейкоцитарно–эндотелиальное взаимодействие. Глутамат является одним из основных возбуждающих нейромедиаторов головного мозга. Он играет важную роль не только в проведении нервных импульсов, но и участвует в процессе миграции Т–лимфоцитов через ГЭБ посредством связывания со своими ионотропными и метаботропными рецепторами, экспрессируемые иммунными клетками и эндотелиоцитами. В связи с этим, с целью установления вовлеченности ионотропных рецепторов в данных процессах было изучено влияние агонистов и антагонистов NMDA– и AMPA–рецепторов на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови больных РС и здоровых доноров, жизнеспособность эндотелиоцитов HUVEC, и их адгезионные свойства и характеристики. Также был проведен анализ субпопуляционного состава CD4⁺ Т–лимфоцитов в исследуемых группах.

Согласно полученным данным выявлены изменения жизнеспособности лимфоцитов периферической крови на фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата. Среди больных РС по сравнению со здоровыми лицами установлены различия в ответе иммунных клеток на действие глутамата и глицина, в частности, у пациентов с обострением заболевания лимфоциты были менее чувствительны к действию лигандов. Следует отметить, что наиболее выраженный ответ наблюдался при среднемолярных концентрациях глутамата, соответствующих его нормальному содержанию в плазме крови.

Агонисты и антагонисты ионотропных рецепторов глутамата также оказывали влияние на жизнеспособности клеток HUVEC. Блокада AMPA–рецепторов глутамата сопровождалась концентрационно–зависимым снижением жизнеспособности эндотелиоцитов, как в состоянии покоя, так и в модели воспаления *in vitro*. Глутамат оказывал свое действие на интактные клетки HUVEC только при совместной стимуляции с глицином. В модели воспаления эндотелиоциты реагировали только при эксайтотоксических концентрациях иммуномедиатора. Учитывая, что селективная стимуляция NMDAR и AMPAR не вызывала изменений жизнеспособности лимфоцитов и эндотелиоцитов (или же эффект был незначительный), можно предположить, что в регуляции жизнеспособности, помимо ионотропных рецепторов, принимают участие и метаботропные рецепторы.

Анализ субпопуляционного состава CD4⁺ Т–лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных РС выявил различия – их относительное содержание повышено у пациентов, независимо от стадии болезни. Доля субпопуляций Th17 и Th17.1 клеток уменьшалась при обострении заболевания, что, вероятно, связано с их усиленной миграцией в ЦНС. Корреляционный анализ выявил взаимосвязь относительного содержания Th17 лимфоцитов периферической крови больных РС с тяжестью заболевания по шкале EDSS и со скоростью ее прогрессирования.

Установлено, что агонисты и антагонисты NMDAR и AMPAR демонстрировали преимущественно ингибирующий эффект на адгезию лимфоцитов периферической крови к клеткам HUVEC, причем в группе больных РС в стадии обострения ответ был более выражен. С помощью проточной цитометрии впервые был изучен эффект лигандов глутаматных рецепторов на экспрессию молекулы VLA–4 субпопуляциями CD4⁺ Т–лимфоцитов, являющуюся одной из основных молекул, обеспечивающих прочную адгезию иммунных клеток к воспаленному эндотелию ЦНС. Согласно полученным данным, высокопатогенные Th17.1 лимфоциты обладали повышенной экспрессией VLA–4, что позволяло им легко проникать через ГЭБ. Этот факт

дополнительно подтверждает наши результаты об уменьшении относительного содержания Th17.1 клеток в периферической крови при обострении РС.

Блокада NMDAR сопровождалась снижением экспрессии VLA-4 во всех исследованных субпопуляциях CD4⁺ Т-лимфоцитов, на фоне блокады AMPA-рецепторов экспрессия уменьшалась провоспалительными фенотипами Т-хелперов. Кроме того, были установлены отличия в ответе иммунных клеток среди больных РС и здоровыми лицами – Т-лимфоциты при обострении заболевания оказались более чувствительными к действию лигандов глутаматных рецепторов.

Ионотропные рецепторы глутамата также влияют на экспрессию молекул адгезии, локализованных на клетках HUVEC. Выявленная повышенная поверхностная экспрессия VCAM-1, являющимся основным лигандом для VLA-4, на фоне активации TNF α , снижалась на фоне блокады NMDA-рецепторов. Полученные данные также доказывают модулирующую роль глутаматных рецепторов в адгезионной активности эндотелиоцитов в модели *in vitro*.

Таким образом, ионотропные рецепторы глутамата участвуют в регуляции процессов жизнеспособности лимфоцитов периферической крови, клеток HUVEC, также адгезионной активности иммунных клеток и эндотелиоцитов, в том числе, за счет изменения экспрессии молекул адгезии.

Сопоставляя полученные результаты с литературными источниками, был выявлен широкий спектр влияния ионотропных рецепторов глутамата на активацию внутриклеточных сигнальных путей (Rho/ROCK, NF- κ B, PI3K/AKT), экспрессию специфических белков и генов, участвующих в процессах хемотаксиса, пролиферации, апоптоза, дифференцировки и миграции иммунных клеток, на синтез АФК и NO и др.

Кроме того, важными факторами являются функциональное состояние клеток, их фенотип, концентрация лигандов, костимуляция и содержание внутриклеточного кальция. Интактные и активированные клетки по-разному реагировали на глутамат. Отмечалась резистентность активированных эндотелиоцитов к действию лигандов глутаматных рецепторов при анализе их

жизнеспособности. Более того, лимфоциты больных РС при ремиссии и обострении обладали разной чувствительностью к действию лигандов. При РС в аутореактивных Т-лимфоцитах усиливаются метаболизм, энергетический обмен, повышается экспрессия специфических молекул, отвечающих за адгезию и миграцию. Как оказалось, рецепторы глутамата могут регулировать аффинность VLA-4 при активации TCR. Сигнальный путь Rho/ROCK, который задействуется при стимуляции агонистами глутаматных рецепторов, регулирует фундаментальные клеточные функции, включая реорганизацию актина, фокальную адгезию и образование стрессовых волокон, изменяя различные клеточные состояния. Усиление экспрессии молекулы адгезии VCAM-1 также наблюдалось только в активированных клетках HUVEC.

В данной работе было показано, что субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов больных РС по-разному реагировали на блокаду ионотропных рецепторов глутамата. Следует отметить, что в работе 2018 года было показано, что в активированных CD4⁺ Т-клетках стимуляция NMDAR приводило к разному эффекту на функции клеток Th1 и Th2, такие как пролиферация, выработка цитокинов и выживаемость клеток, что также указывало на разную чувствительность Th1 и Th2 клеток к NMDAR-зависимой физиологической гибели клеток (Orihara et al., 2018). Селективность действия блокады AMPA-рецепторов в отношении провоспалительных субпопуляций Т-клеток может служить основой для последующего изучения их роли в патогенезе РС.

Полученные результаты демонстрируют, что эффекты NMDA- и AMPA-рецепторов на функции клеток зависят от концентрации лигандов в культуральной среде и ко-стимуляции. Возможно, имеется косвенная связь увеличения содержания глутамата в крови и ЦНС при РС с функциональным состоянием иммунных клеток. Предположительно, для осуществления своей функции требуется большая концентрация нейромедиатора в среде из-за возможной десенсibilизации рецепторов.

Как известно, большинство процессов после активации клеток, являются Ca²⁺-зависимыми, а, следовательно, изменение содержания внутриклеточного

кальция может запускать различные транскрипционные программы, в том числе, оказывающие влияние на адгезию и миграцию. Активация NMDA–рецепторов приводит к поступлению внутрь клетки ионов натрия и кальция и оттоку калия. Хотя AMPA–рецепторы пропускают только ионы натрия, но мембранный потенциал при этом снижается до такой степени, что этого достаточно для высвобождения магния из NMDA–рецепторов и открытия их ионных каналов.

Кроме того, профиль кальциевого сигнала, его амплитуда и продолжительность, определяют специфичность иммунного ответа, приводя к активации определенных сигнальных каскадов, транскрипционных факторов, дифференциальной экспрессии групп генов (Кузьмина и др., 2019). Также имеются исследования, где показано, что при антигенной активации в провоспалительных Т–клетках внутриклеточное содержание кальция повышается в большей степени, чем в противовоспалительных фенотипах (Weber et al., 2008). Изменение кальциевой сигнализации на фоне действия агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата тесно взаимосвязано с регуляцией процессов жизнеспособности, адгезии и экспрессии молекул адгезии иммунных клеток и эндотелиоцитов.

Подводя итог, важно подчеркнуть, что полученные сведения о влиянии ионотропных рецепторов глутамата на лейкоцитарно–эндотелиальное взаимодействие при РС, в частности, на процессы жизнеспособности, адгезии, экспрессии молекул адгезии, способствуют углублению знаний о патогенетических механизмах и роли этих рецепторов при нейровоспалении. Выявленные особенности регуляции ионотропными рецепторами глутамата лейкоцитарно–эндотелиального взаимодействия при РС указывают на их важную роль в иммунопатогенезе заболевания, и в перспективе позволят рассматривать данные рецепторы в качестве потенциальной мишени для фармакотерапии.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено повышение жизнеспособности лимфоцитов периферической крови на фоне действия агонистов 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.

2. Показано, что блокада AMPA-рецепторов глутамата приводит к снижению жизнеспособности эндотелиоцитов HUVEC, как в состоянии покоя, так и в модели воспаления *in vitro*. На фоне стимуляции глутаматом и глицином неактивированных клеток HUVEC выявлено повышение их жизнеспособности.

3. Обнаружен ингибирующий эффект агонистов глутаматных рецепторов на адгезию лимфоцитов периферической крови к клеткам HUVEC. Показано, что блокада ионотропных рецепторов глутамата в группе больных РС в стадии обострения приводит к более выраженному угнетающему эффекту на адгезию T-лимфоцитов.

4. Выявлено увеличение относительного содержания CD4⁺ T-лимфоцитов периферической крови у больных РС, независимо от стадии заболевания. 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.

5. Показано, что высокопатогенные Th17.1 клетки обладают повышенной экспрессией VLA-4. Антагонисты ионотропных рецепторов глутамата оказывают преимущественно ингибирующее действие на экспрессию VLA-4 T-лимфоцитами, наибольшая выраженность наблюдается среди больных РС в стадии обострения.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова, А. А. Эктопические лимфоидные В–клеточные фолликулы при рассеянном склерозе: роль в патогенезе заболевания и прогностическая значимость / А. А. Абрамова, И. В. Закройщикова, И. А. Кротенкова, И. А. Кочергин, М. Н. Захарова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119(10). – С. 21–27.
2. Баранова, Н. С. Терапия препаратами, изменяющими течение рассеянного склероза, первой линии: влияние герпесвирусной инфекции / Н. С. Баранова, М. С. Грись, Н.Н. Спиринов, Е. Г. Шипова, Д. В. Киселев, А. А. Баранов // Нервные болезни. – 2024. – Т. 1. – С. 43– 52.
3. Бойко, А. Н. Новые методы нейровизуализации оценки активности нейровоспаления при рассеянном склерозе / А. Н. Бойко, М. Б. Долгушин, М. А. Каралкина // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2023. – Т. 123(7– 2). – С. 8–14.
4. Бойко, А. Н. Новые направления иммунокоррекции при рассеянном склерозе / А. Н. Бойко, Н. В. Хачанова, М. В. Мельников, С. А. Сиверцева, Е. П. Евдошенко, Н. Н. Спиринов, А. В. Васильев, О. Л. Розенсон // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2020. – Т. 120(2). – С. 103–109.
5. Волков, А. И. Механизмы защиты мозга от аутоиммунного воспаления / А. И. Волков, М. В. Мельников, А. Н. Бойко // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2021. – Т. 13(1S). – С. 4–9.
6. Галиуллин, Т. Р. Проспективное 20–летнее клинико–генетическое исследование рассеянного склероза в Республике Башкортостан / Т. Р. Галиуллин, К. З. Бахтиярова, О. В. Заплахова, Н. Ф. Утягулова, И. А. Туктарова, О. В. Лютов, Я. Р. Тимашева // Практическая медицина. – 2020. – Т. 18 (5). – С. 58–64.
7. Гусев, Е. И., Бойко А. Н., Столяров И. Д. Рассеянный склероз. Справочник. – М.: Реал Тайм, 2011, 296 с.

8. Давыдова, О. Н. Глутаматные рецепторы в клетках нервной и иммунной систем / Давыдова, О. Н., Болдырев А. А. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2007. – Т. 1(4). – С. 28–34.

9. Зайнуллина, Л. Ф. Глутамат и рецепторы глутамата участвуют в регуляции адгезии Т-клеток / Л. Ф. Зайнуллина, Д. В. Хасанова, Ю. В. Вахитова // *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: сборник статей Международной конференции, 22–25 мая 2017 года*. – Пушкино: Fix-Print, 2017. – С. 22–26.

10. Зайнуллина, Л. Ф. NMDA-рецепторы – возможные компоненты депозависимого входа Ca^{2+} в Т-лимфоциты человека / Л. Ф. Зайнуллина, Р. С. Ямиданов, Вахитов В. А., Вахитова Ю. В. // *Биохимия*. – 2011. – Т. 76. – № 11. – С. 1517–1524.

11. Зайнуллина, Л. Ф. Регуляция NMDA-рецепторами функций Т-лимфоцитов человека: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.04 / Зайнуллина Лиана Фанзилевна. – Уфа, 2013. – 24 с.

12. Киселев, И. С. Сравнение профилей метилирования ДНК мононуклеарных клеток крови больных рассеянным склерозом в стадиях ремиссии и обострения / И. С. Киселев, О. Г. Кулакова, О. А. Батурина, М. Р. Кабилов, А. Н. Бойко, О. О. Фаворова // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. – 2023. – Т. 123(7– 2). – С. 60–64.

13. Кузьмина, У. Ш. NMDA-рецепторы регулируют гены ключевых иммунных функций в лимфоцитах больных рассеянным склерозом / Кузьмина У. Ш., Зайнуллина Л. Ф., Садовников С. В., Вахитов В. А., Бахтиярова К. З., Вахитова Ю. В. // *Иммунология*. – 2019. – Т. 40 (1). – С. 27–34.

14. Кузьмина, У. Ш. Глутамат-опосредованные механизмы регуляции экспрессии VLA-4 при РС / У. Ш. Кузьмина, К. З. Бахтиярова, Ю. В. Вахитова // *Российский иммунологический журнал*. – 2019. – Т. 22(2–1). – С. 359–361.

15. 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. – Т. 124(4). – С. 159–163.

16. 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. – Т. 123(4). – С. 120–124.

17. Максимова, М. А. Влияние глутамата на миграцию Т-клеток здоровых доноров и больных рассеянным склерозом в модели *in vitro* / М. А. Максимова, У. Ш. Кузьмина, К. З. Бахтиярова, Ю. В. Вахитова // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19(1S). – С. 29–30.

18. Мельников, М. В. Блокада D1-дофаминовых рецепторов подавляет функции Th17-клеток при рассеянном склерозе / М. В. Мельников, А. А. Свиридова, Т. В. Солодова, А. В. Лопатина, М. В. Пащенко, А. Н. Бойко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2021. – Т. 121(7–2). – С. 82–89.

19. Мосягина, А. И. Модели ГЭБ *in vitro*: преимущества и недостатки, текущее положение и перспективы развития / А. И. Мосягина, А. В. Моргун, А. Б. Салмина // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2021. – Т. 10 (3). – С. 109–120.

20. Попова, Е. В. Поиск оптимальной патогенетической терапии рассеянного склероза: возможность повысить приверженность больных терапии, не снижая ее эффективности / Е. В. Попова, К. В. Новикова, Н. В. Хачанова, О. Е. Коновалова, М. Х. Кожиева, М. В. Давыдовская, А. Н. Бойко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2017. Т. 117(10–2). – С. 48–52.

21. Созаева, Д. И. Основные механизмы взаимодействия нервной и иммунной систем. Клинико-экспериментальные данные / Д. И. Созаева, С. Б. Бережанская // Кубанский научный медицинский вестник. – 2014. – Т. 3. – С. 145–150.

22. Спири́н, Н. Н. Новые возможности в терапии пациентов с рассеянным склерозом» (Резолюция совета экспертов 23 апреля 2022 года, Москва, АО «БИОКАД») / Н. Н. Спири́н, Я. В. Власов, М. Н. Захарова, Н. В. Хачанова, Е. В. Попова, Ф. А. Хабиров, Н. А. Тотолян, С. А. Сиверцева, З. А. Гончарова, Л. Л. Корсунская, Т. И. Якушина, О. В. Матвиевская, Т. О. Симанив, А. Н. Бойко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2022. – Т. 122(7–2). – С. 84–88.

23. Тимашева, Я. Р. Рассеянный склероз в Республике Башкортостан: популяционно–специфические генетические предикторы и результаты 20–летнего клинического наблюдения / Я. Р. Тимашева, Т. Р. Насибуллин, И. А. Туктарова, В. В. Эрдман, Т. Р. Галиуллин, О. В. Лютов, К. З. Бахтиярова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2023. – Т. 123(7–2). – С. 34–42.

24. 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. – Т. 13(1). – С. 15–20.

25. Тухватуллин, А. В. Трансэндотелиальная миграция Т–лимфоцитов при рассеянном склерозе: роль глутамата и его рецепторов / А. В. Тухватуллин, У. Ш. Кузьмина, К. З. Бахтиярова, Ю. В. Вахитова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2026. — Т. 29(3). — С. 48–55.

26. Тухватуллин, А. В. Участие AMPA–рецепторов глутамата в регуляции адгезии Т–лимфоцитов при рассеянном склерозе / А. В. Тухватуллин, У. Ш. Кузьмина, К. З. Бахтиярова, Ю. В. Вахитова // Молекулярная медицина. — 2026. — Т. 24(2) — С. 3–9.

27. Умрюхин, А. Е. Антитела в механизмах вегетативных и поведенческих функций организма / А. Е. Умрюхин // Фундаментальные исследования. – 2013. – Т. 3. – С. 425–430.

28. Фаткулина, У. Ш. Nmda–рецепторы Т–лимфоцитов регулируют синтез цитокинов у больных рассеянным склерозом / У. Ш. Фаткулина, Л. Ф.

Зайнуллина, К. З. Бахтиярова, Ю. В.Вахитова // Иммунология. – 2013. – Т. 34 (6). – С. 339–343.

29. Якушина, Т. И. Опыт использования кладрибина для лечения пациентов с высокоактивным течением рассеянного склероза в Московской области / Т. И. Якушина, Д. М. Якушин, В. Ю. Лиждвой, Ю. А. Белова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2024. – Т. 124(6). – С. 74–79.

30. Acosta–Rodriguez E. V. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17–producing T helper memory cells / E. V. Acosta–Rodriguez, L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, G.Napolitani // Nat. Immunol. – 2007. – V. 8. – P. 639–646.

31. Aguilar, G. Role of NO and S–nitrosylation in the Expression of Endothelial Adhesion Proteins That Regulate Leukocyte and Tumor Cell Adhesion / G. Aguilar, T. Koning, P. Ehrenfeld, F. A. S6nchez // Frontiers in physiology. – 2020. – V. 11. – P. 595526.

32. Aguzzi, A. Microglia: Scapegoat, saboteur, or something else? / A. Aguzzi, B. A. Barres, M. L. Bennett // Science. – 2013. –V.339–P.156–161.

33. Akyuz E. Exploring the Role of Neurotransmitters in Multiple Sclerosis: An Expanded Review / E. Akyuz, B. R. Celik, F. S. Aslan, H. Sahin, E. Angelopoulou // ACS Chem Neurosci. – 2023. – V. 14(4). – P. 527–553.

34. Al Gawwam, G. Serum Glutamate Is a Predictor for the Diagnosis of Multiple Sclerosis / G. Al Gawwam, I. K. Sharquie // TheScientificWorldJournal. – 2017. – V. 2017. – P. 9320802.

35. Alonso, F. Variations on the theme of podosomes: A matter of context / F. Alonso, P. Spuul, T. Daubon, I. Kramer, E. Génot // BiochimBiophys Acta Mol Cell Res. – 2019. – V. 1866(4). – P. 545–553.

36. Alvarez, J. I., Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis / J. I. Alvarez, R. Cayrol, A. Prat // Biochimica et biophysica acta. – 2011. – V. 1812(2). – P. 252–264.

37. András, I. E. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate–induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain

endothelial cells / I. E. András, M. A. Deli, S. Veszeka, K. Hayashi, B. Hennig, M. Toborek // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2007. – V. 27(8). – P. 1431–1443.

38. Annunziato, F. Defining the human T helper 17 cell phenotype / F. Annunziato, L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani // *Trends Immunol.* – 2012. – V. 33. – P. 505–512.

39. Annunziato, F. Human Th1 dichotomy: Origin, phenotype and biologic activities / F. Annunziato, L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani // *Immunology.* – 2014. – V. 144. – P. 343–351.

40. Antony, J. Pachymeningeal enhancement—a comprehensive review of literature / J. Antony, C. Hacking, R. L. Jeffree // *Neurosurg Rev.* – 2015. – V. 38. – P. 649–659.

41. Arellano, G. Th1 and Th17 cells and associated cytokines discriminate among clinically isolated syndrome and multiple sclerosis phenotypes / G. Arellano, E. Acuna, L.I. Reyes, P.A. Ottum, P. De Sarno, L. Villarroel, E. Ciampi, R. Uribe–San Martin, C. Carcamo, R. Naves // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 753.

42. Arif, N. PECAM–1 supports leukocyte diapedesis by tension–dependent dephosphorylation of VE–cadherin / N. Arif, M. Zinnhardt, A. Nyamay'Antu, D. Teber, R. Brückner, K. Schaefer, Y. T. Li, B. Trappmann, C. Grashoff, D. Vestweber // *EMBO J.* – 2021. – V. 40(9). – P. e106113.

43. Arita, R. Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes–induced microvascular damage / R. Arita, Y. Hata, S. Nakao, T. Kita, M. Miura, S. Kawahara, S. Zandi, L. Almulki, F. Tayyari, H. Shimokawa, A. Hafezi–Moghadam, T. Ishibashi // *Diabetes.* – 2009. – V. 58(1). – P. 215–226.

44. Avery L., Tim–3 co–stimulation promotes short–lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion / L. Avery, J. Filderman, A. L. Szymczak–Workman, L. P. Kane // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2018. – V. 115(10). – P. 2455–2460.

45. Bäärnhielm, M. Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis / M. Bäärnhielm, T. Olsson, L. Alfredsson // *MultScler.* – 2014. – V. 20(6). – P. 726–732.

46. Bäärnhielm, M. Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: no interaction with human leukocyte antigen–DRB1*15. /M. Bäärnhielm, A. K. Hedström, I. Kockum, E. Sundqvist, S. A. Gustafsson, J. Hillert, T. Olsson, L. Alfredsson // *European journal of neurology*. – 2012. – V. 19(7). – P. 955–962.
47. Balasa, R. Reviewing the Significance of Blood–Brain Barrier Disruption in Multiple Sclerosis Pathology and Treatment / R. Balasa, L. Barcutean, O. Mosora, D. Manu // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – V. 22(16). – P. 8370.
48. Banwell, B. Clinical, environmental, and genetic determinants of multiple sclerosis in children with acute demyelination: a prospective national cohort study / B. Banwell, A. Bar–Or, D. L. Arnold., D. Sadovnick, S. Narayanan, M. McGowan, J. O'Mahony, S. Magalhaes, H. Hanwell, R. Vieth, R. Tellier, T. Vincent, G. Disanto, G. Ebers, K. Wambara, M. B. Connolly, J. Yager, J. K. Mah, F. Booth, G. Sebire, et al. // *Lancet Neurol*. – 2011. – V. 10(5). – P. 436–445.
49. Barichello, T. Blood–Brain Barrier / T. Barichello, A. Collodel, R. Hasbun, R. Morales // *New York: Humana New York, NY*. – 2019. – 367 p.
50. Barkauskas, D. S. Focal transient CNS vessel leak provides a tissue niche for sequential immune cell accumulation during the asymptomatic phase of EAE induction / D. S. Barkauskas, R. D. Dorand, J. T. Myers, T. A. Evans, K. J. Barkauskas, D. Askew, R. Purgert, A. Y. Huang // *Exp. Neurol*. – 2015. – V. 266. – P. 74–85.
51. Barreiro, O., Molecular basis of leukocyte–endothelium interactions during the inflammatory response / O. Barreiro, F. Sánchez–Madrid // *Revista espanola de cardiologia*. – 2009. – V. 62(5). – P. 552–562.
52. Basavarajappa, D. Anti–inflammatory Effects of Siponimod in a Mouse Model of Excitotoxicity–Induced Retinal Injury / D. Basavarajappa, V. Gupta, N. Chitranshi, D. Viswanathan, V. Gupta, R. Vander Wall, V., M. Palanivel Mirzaei, Y. You, A. Klistorner, S. L. Graham // *Mol Neurobiol*. – 2023. – V. 60(12). – P. 7222–7237.
53. Baskys, A. Understanding regulation of nerve cell death by mGluRs as a method for development of successful neuroprotective strategies / A. Baskys, M. Blaabjerg // *J Neurol Sci*. – 2005. – V. 229–230. – P. 201–209.

54. Basuroy, S. CORM–A1 prevents blood–brain barrier dysfunction caused by ionotropic glutamate receptor–mediated endothelial oxidative stress and apoptosis / S. Basuroy, C. W. Leffler, H. Parfenova // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2013. – V. 304(11). – P. 1105–1015.
55. Batoulis, H. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(h)1 paradigm / H. Batoulis, K. Addicks, S. Kuerten // *Ann. Anat.* – 2010. – V. 192. – P. 179–193.
56. Becher, B. T(h)17 cytokines in autoimmune neuro–inflammation / B. Becher, B. M. Segal // *Curr. Opin. Immunol.* – 2011. – V. 23. – P. 707–712.
57. Benakis, C. The meningeal and choroidal infiltration routes for leukocytes in stroke / C. Benakis, G. Llovera, A. Liesz // *Ther. Adv. Neurol. Disord.* – 2018. – V. 11. – P. 1756286418783708.
58. Biernacki, K. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells / K. Biernacki, A. Prat, M. Blain, J. Antel // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2001. – V. 60. – P. 1127–1136.
59. Blondeau, N. Activation of the nuclear factor–kappa B is a key event in brain tolerance / N. Blondeau, C. Widmann, M. Lazdunski, C. Heurteaux // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21. – P. 4668–4677.
60. Bowie, D. The many faces of the AMPA - type ionotropic glutamate receptor / D. Bowie // *Neuropharmacology.* – 2022. – V. 208. – P. 108975.
61. Boyko, M. The Integrity of the Blood–Brain Barrier as a Critical Factor for Regulating Glutamate Levels in Traumatic Brain Injury / M. Boyko, B. F. Gruenbaum, D. Frank, D. Natanel, S. Negev, A. N. Azab, G. Barsky, B. Knyazer, O. Kofman, A. Zlotnik // *Int J Mol Sci.* – 2023. – V. 24(6). – P. 5897.
62. Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g / A. Böyum // *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* – 1968. – V. 97. – P. 77–89.

63. Brambilla, R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis / R. Brambilla // *Acta Neuropathol.* – 2019. – V. 137(5). – P. 757–783.

64. Brioschi, S. Heterogeneity of Meningeal B Cells Reveals a Lymphopoietic Niche at the CNS Borders/ S. Brioschi, W. L. Wang, V. Peng, M. Wang, I. Shchukina, Z. J. Greenberg, J. K. Bando, N. Jaeger, R. S. Czepielewski, A. Swain, D. A. Mogilenko, W. L. Beatty, P. Bayguinov, J. A. J. Fitzpatrick, L. G. Schuettpelez, C. C. Fronick, I. Smirnov, J. Kipnis, V. S. Shapiro, G. F. Wu, M. Colonna // *Science (New York NY)*. – 2021. – V. 373(6553). – P. eabf9277.

65. Brucklacher–Waldert, V. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis / V. Brucklacher–Waldert, K. Stuermer, M. Kolster, J. Wolthausen, E. Tolosa // *Brain.* – 2009. – V. 132(Pt 12). – P. 3329–3341.

66. Cao, Y. Functional inflammatory profiles distinguish myelin–reactive T cells from patients with multiple sclerosis / Y. Cao, B. A. Goods, K. Raddassi, G. T. Nepom, W. W. Kwok, J. C. Love, D. A. Hafler // *Science translational medicine.* – 2015. – V. 7(287). – P. 287ra74.

67. Capone, A. Distinct expression of inflammatory features in T helper 17 cells from multiple sclerosis patients / A. Capone, M. Bianco, G. Ruocco, M. De Bardi, L. Battistini, S. Ruggieri, C. Gasperini, D. Centonze, C. Sette, E. Volpe // *Cells.* – 2019. – V. 8. – P. 533.

68. Cencioni, M. T. FAS–ligand regulates differential activation–induced cell death of human T–helper 1 and 17 cells in healthy donors and multiple sclerosis patients / M. T. Cencioni, S. Santini, G. Ruocco, G. Borsellino, M. De Bardi, M. G. Grasso, S. Ruggieri, C. Gasperini, D. Centonze, D. Barilá, L. Battistini, E. Volpe // *Cell death & disease.* – 2015. – V. 6(5). – P. e1741.

69. Chakraborty, S. The interaction affinity between vascular cell adhesion molecule–1 (VCAM–1) and very late antigen–4 (VLA–4) analyzed by quantitative FRET / S. Chakraborty, S. Y. Hu, S. H. Wu, A. Karmenyan, A. Chiou // *PLoS One.* – 2015. – V. 10(3). – P. e0121399.

70. Chen, J. T. Ketamine alleviates bradykinin-induced disruption of the mouse cerebrovascular endothelial cell-constructed tight junction barrier via a calcium-mediated redistribution of occludin polymerization / J. T. Chen, Y. L. Lin, T. L. Chen, Y. T. Tai, C. Y. Chen, R. M. Chen // *Toxicology*. – 2016. – V. 368–369. – P. 142–151.

71. Chen, J. T. Roles of NMDARs in maintenance of the mouse cerebrovascular endothelial cell-constructed tight junction barrier / J. T. Chen, T. G. Chen, Y. C. Chang, C. Y. Chen, R. M. Chen // *Toxicology*. – 2016. – V. 339. – P. 40–50.

72. Chen, P. J. Honokiol suppresses TNF- α -induced neutrophil adhesion on cerebral endothelial cells by disrupting polyubiquitination and degradation of I κ B β / P. J. Chen, Y. L. Wang, L. M. Kuo, C. F. Lin, C. Y. Chen, Y. F. Tsai, J. J. Shen, T. L. Hwang // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 26554.

73. Chen, S. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B Cell differentiation / S. Chen, G. P. Sims, X. X. Chen, Y. Y. Gu, S. Chen, P. E. Lipsky // *J Immunol.* – 2007. – V. 179(3). – P. 1634–1647.

74. Chen, Y. HIV-1 Tat Regulates Occludin and A β Transfer Receptor Expression in Brain Endothelial Cells via Rho/ROCK Signaling Pathway / Y. Chen, W. Huang, W. Jiang, X. Wu, B. Ye, X. Zhou // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – V. 2016. – P. 4196572.

75. Chirino, Y. I. Airborne particulate matter in vitro exposure induces cytoskeleton remodeling through activation of the ROCK-MYPT1-MLC pathway in A549 epithelial lung cells / Y. I. Chirino, C. M. García-Cuellar, C. García-García, E. Soto-Reyes, Á. R. Osornio-Vargas, L. A. Herrera, A. López-Saavedra, J. Miranda, R. Quintana-Belmares, I. R. Pérez, Y. Sánchez-Pérez // *Toxicol Lett.* – 2017. – V. 272. – P. 29–37.

76. Chow, B. W. The molecular constituents of the blood-brain barrier / B. W. Chow, C. Gu // *Trends Neurosci.* – 2015. – V. 38. – P. 598–608.

77. Colamatteo, A. Reduced annexin A1 expression associates with disease severity and inflammation in multiple sclerosis patients / A. Colamatteo, E. Maggioli, R. Azevedo Loiola, M. Hamid Sheikh, G. Calì, D. Bruzzese, G. T. Maniscalco, D.

Centonze, F. Buttari, R. Lanzillo, F. Perna, B. Zuccarelli, M. Mottola, S. Cassano, M. Galgani, E. Solito, V. De Rosa // *J. Immunol.* – 2019. – V. 203(7). – P. 753–1765.

78. Collongues, N. A Narrative Review on Axonal Neuroprotection in Multiple Sclerosis / N. Collongues, G. Becker, V. Jolivel, E. Ayme–Dietrich, J. de Seze, F. Binamé, C. Patte–Mensah, L. Monassier, A. G.Mensah–Nyagan // *Neurology and therapy.* – 2022. – V. 11(3). – P. 981–1042.

79. Compston, A. Multiple sclerosis / A. Compston, A. Coles // *Lancet.* – 2008. – V. 372. – P. 1502–17.

80. Compston, A. Multiple sclerosis / A. Compston, A. Coles // *Lancet.* – 2002. – V. 359. – P. 1221–1231.

81. Cosmi, L. Th17 plasticity: Pathophysiology and treatment of chronic inflammatory disorders / L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, F. Annunziato // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2014. – V. 17. – P. 12–16.

82. Coultrap, S. J. CaMKII regulation in information processing and storage / S. J. Coultrap, K. U. Bayer // *Trends Neurosci.* – 2012. – V. 35(10). – P. 607–618.

83. Cunill, V. Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis Is Characterized by a T Follicular Cell Pro–Inflammatory Shift, Reverted by Dimethyl Fumarate Treatment / V. Cunill, M. Massot, A. Clemente, C. Calles, V. Andreu, V. Núñez, A. López–Gómez, R. M. Díaz, M. L. R. Jiménez, J. Pons, C. Vives–Bauzá, J. M. Ferrer // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 9. – P. 1097.

84. Dantzer, R. Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa / R. Dantzer // *Physiol Rev.* – 2018. – V. 98(1). – P. 477– 504.

85. De Rosa, V. Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants / V. De Rosa, M. Galgani, A. Porcellini, A. Colamatteo, M. Santopaolo, C. Zuchegna, A. Romano, S. De Simone, C. Procaccini, C. La Rocca, P. B. Carrieri, G. T. Maniscalco, M. Salvetti, M. C. Buscarinu, A. Franzese, E. Mozzillo, A. La Cava, G. Matarese // *Nat. Immunol.* – 2015. – V. 16(11). – P. 1174–1184.

86. Dean, Z. Pilot study of longterm low fat diet in relapsing–remitting multiple sclerosis / Z. Dean, A. Penesova, Z. Radikova, Z. Dean, B. Kollar // *Neuro Endocrinol Lett.* – 2022. – V. 43(3). – P. 135–139.
87. Defaux, A. Minocycline promotes remyelination in aggregating rat brain cell cultures after interferon–gamma plus lipopolysaccharide–induced demyelination / A. Defaux, M. G. Zurich, P. Honegger, F. Monnet–Tschudi // *Neuroscience.* – 2011. – V. 187. – P. 84–92.
88. Dhib–Jalbut, S. Interferon–beta mechanisms of action in multiple sclerosis / S. Dhib–Jalbut, S. Marks // *Neurology.* – 2010. – V. 74. – P. S17–24.
89. Di Filippo, M. Interferon–beta 1a modulates glutamate neurotransmission in the CNS through CaMKII and GluN2A–containing NMDA receptors / M. Di Filippo, A. Tozzi, S. Arcangeli, A. de Iure, V. Durante, M. Di Gregorio, F. Gardoni, P. Calabresi // *Neuropharmacology.* – 2016. – V. 100. – P. 98–105.
90. Disanto, G. Multiple sclerosis: risk factors and their interactions / G. Disanto, J. M. Morahan, S. V. Ramagopalan. // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* – 2012. – V. 11(5). – P. 545–555.
91. Dorrier, C. E. Emerging Roles for CNS Fibroblasts in Health, Injury and Disease / C. E. Dorrier, H. E. Jones, L. Pintarić, J. A. Siegenthaler, R. Daneman // *Nat Rev Neurosci.* – 2021. – V. 23. – P. 23–34.
92. Dos Passos, G. R. Th17 cells pathways in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders: Pathophysiological and therapeutic implications / G. R. Dos Passos, D. K. Sato, J. Becker, K. Fujihara // *Mediators Inflamm.* – 2016. – V. 2016. – P. 5314541.
93. Dragoni, S. Endothelial Protease Activated Receptor 1 (PAR1) Signalling Is Required for Lymphocyte Transmigration across Brain Microvascular Endothelial Cells / S. Dragoni, A. Papageorgiou, C. Araiz, J. Greenwood, P. Turowski // *Cells.* – 2020. – V. 9(12). – P. 2723.
94. Duhén, T. IL–1beta promotes the differentiation of polyfunctional human CCR6+CXCR3+ Th1/17 cells that are specific for pathogenic and commensal microbes / T. Duhén, D. J. Campbell // *J. Immunol.* – 2014. – V. 193. – P. 120–129.

95. Dulamea, A. O. Role of Oligodendrocyte Dysfunction in Demyelination, Remyelination and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis / A. O. Dulamea // *Advances in experimental medicine and biology* – 2017. – V. 958. – P. 91–127.
96. Durelli, L. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta / L. Durelli, L. Conti, M. Clerico, D. Boselli, G. Contessa, P. Ripellino, B. Ferrero, P. Eid, F. Novelli // *Annals of neurology* – 2009. – V. 65(5). – P. 499–509.
97. Edwards, L. J. Constantinescu C.S Th17/Th1 phenotype in demyelinating disease / L. J. Edwards, R. A. Robins C. S. Constantinescu // *Cytokine*. – 2010. – V. 50. – P. 19–23.
98. Elain, G., The selective anti-IL17A monoclonal antibody secukinumab (AIN457) attenuates IL17A-induced levels of IL6 in human astrocytes / G. Elain, K. Jeanneau, A. Rutkowska, A. K. Mir, K. K. Dev // *Glia*. – 2014. – V. 62(5). – P. 725–735.
99. Elsbernd, P. M. Using Monoclonal Antibody Therapies for Multiple Sclerosis: A Review / P. M. Elsbernd, J. L. Carter // *Biologics: targets therapy*. – 2021. – V. 15. – P. 255–263.
100. Engelhardt, B. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers / B. Engelhardt, R. M. Ransohoff // *Trends in immunology*. – 2012. – V. 33(12). – P. 579–589.
101. Engelhardt, B. The movers and shapers in immune privilege of the CNS / B. Engelhardt, P. Vajkoczy, R. O. Weller // *Nature immunology*. – 2017. – V. 18(2). – P. 123–131.
102. Estrada-Rojo, F. Diurnal variation of NMDA receptor expression in the rat cerebral cortex is associated with traumatic brain injury damage / F. Estrada-Rojo, J. Morales-Gomez, E. Coballase-Urrutia, M. Martinez-Vargas, L. Navarro // *BMC research notes*. – 2018. – V. 11(1). – P. 150.
103. Feng, S. RhoA/ROCK-2 Pathway Inhibition and Tight Junction Protein Upregulation by Catalpol Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Disruption of Blood-Brain Barrier Permeability / S. Feng, L. Zou, H. Wang, R. He, K. Liu, H. Zhu // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2018. – V. 23(9). – P. 2371.

104. Fernando, V. Regulation of an autoimmune model for multiple sclerosis in Th2-biased GATA3 transgenic mice / V. Fernando, S. Omura, F. Sato, E. Kawai, N. E. Martinez, S. F. Elliott, K. Yoh, S. Takahashi, I. Tsunoda // *International journal of molecular sciences*. – 2014. – V. 15(2). – P. 1700–1718.
105. Filippi, M. D. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route / M. D. Filippi // *Advances in immunology*. – 2016. – V. 129. – P. 25–53.
106. Filippi, M. D. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives / M. D. Filippi // *Blood*. – 2019. – V. 133(20). – P. 2149–2158.
107. Fitzpatrick, Z. Gut-educated IgA plasma cells defend the meningeal venous sinuses / Z. Fitzpatrick, G. Frazer, A. Ferro, S. Clare, N. Bouladoux, J. Ferdinand, Z. K. Tuong, M. L. Negro-Demontel, N. Kumar, O. Suchanek, T. Tajsic, K. Harcourt, K. Scott, R. Bashford-Rogers, A. Helmy, D. S. Reich, Y. Belkaid, T. D. Lawley, D. B. McGavern, M. R. Clatworthy // *Nature*. – 2020. – V. 587(7834). – P. 472–476.
108. Fontenot, J. D. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells / J. D. Fontenot, M. A. Gavin, A. Y. Rudensky // *Nature immunology*. – 2023. – V. 4(4). – P. 330–336.
109. Fort, M. M. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo / M. M. Fort, J. Cheung, D. Yen, J. Li, S. M. Zurawski, S. Lo, S. Menon, T. Clifford, B. Hunte, R. Lesley, T. Muchamuel, S. D. Hurst, G. Zurawski, M. W. Leach, D. M. Gorman, D. M. Rennick // *Immunity*. – 2001. – V. 15(6). – P. 985–995.
110. Fowell, D. J. The spatio-temporal control of effector T cell migration / D. J. Fowell, M. Kim // *Nature reviews. Immunology*. – 2021. – V. 21(9). – P. 582–596.
111. French, J. A. Adjunctive perampanel for refractory partial-onset seizures: randomized phase III study 304 / J. A. French, G. L. Krauss, V. Biton, D. Squillacote, H. Yang, A. Laurenza, D. Kumar, M. A. Rogawski // *Neurology*. – 2012. – V. 79(6). – P. 589–596.
112. Fresegna, D. Re-Examining the Role of TNF in MS Pathogenesis and Therapy / D. Fresegna, S. Bullitta, A. Musella, F. R. Rizzo, F. De Vito, L. Guadalupi, S. Caioli, S. Balletta, K. Sanna, E. Dolcetti, V. Vanni, A. Bruno, F. Buttari, M.

Stampanoni Bassi, G. Mandolesi, D. Centonze, A. Gentile // *Cells* – 2020. – V. 9(10). – P. 2290.

113. Fujinami, R. S. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease / R. S. Fujinami, M. G. von Herath, U. Christen, J. L. Whitton // *Clin Microbiol Rev.* – 2006. – V. 19(1). – P. 80–94.

114. Ganor, Y. Glutamate in the Immune System: Glutamate Receptors in Immune Cells, Potent Effects, Endogenous Production and Involvement in Disease / Y. Ganor, M. Levite // *Nerve–Driven Immunity*. Springer, Vienna. – 2012. – P. 121–161.

115. Ganor, Y. Human T cells express a functional ionotropic glutamate receptor GluR3, and glutamate by itself triggers integrin–mediated adhesion to laminin and fibronectin and chemotactic migration / Y. Ganor, M. Besser, N. Ben–Zakay, T. Unger and M. Levite // *J. Immunol.* – 2003. – V. 170. –P. 4362–4372.

116. Ganor, Y. The neurotransmitter glutamate and human T cells: glutamate receptors and glutamate–induced direct and potent effects on normal human T cells, cancerous human leukemia and lymphoma T cells, and autoimmune human T cells / Y. Ganor, M. Levite // *J Neural Transm (Vienna)*. – 2014. – V. 121(8). – P. 983–1006.

117. Garcia–Gaytan, A. C. Glutamatergic system components as potential biomarkers and therapeutic targets in cancer in non–neural organs / A. C. Garcia–Gaytan, A. Hernandez–Abrego, M. Diaz–Munoz, I. Mendez // *Frontiers in endocrinology*. –2022. – V. 13. – P. 1029210.

118. Gaublot, J. T. Single–Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity / J. T. Gaublot, N. Yosef, Y. Lee, R. S. Gertner, L. V. Yang, C. Wu, P. P. Pandolfi, T. Mak, R. Satija, A. K. Shalek, V. K. Kuchroo, H. Park, A. Regev // *Cell*. – 2015. – V. 163(6). – P. 1400–1412.

119. Gentile, A. Laquinimod ameliorates excitotoxic damage by regulating glutamate re–uptake / A. Gentile, A. Musella, F. De Vito, D. Fresegna, S. Bullitta, F. R. Rizzo, D. Centonze, G. Mandolesi // *Journal of neuroinflammation*,. – 2018. – V. 15(1). – P. 5.

120. Ghasemi, N. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy / N. Ghasemi, S. Razavi, E. Nikzad // Cell journal. – 2017. – V. 19(1). – P. 1–10.
121. Ghezzi, L. T cells producing GM-CSF and IL-13 are enriched in the cerebrospinal fluid of relapsing MS patients / L. Ghezzi, C. Cantoni, F. Cignarella, B. Bollman, A. H. Cross, A. Salter, D. Galimberti, M. Cella, L. Piccio // Mult. Scler. – 2020. – V. 26(10). – P. 1172–1186.
122. Glatigny, S. Cutting edge: loss of $\alpha 4$ integrin expression differentially affects the homing of Th1 and Th17 cells / S. Glatigny, R. Duhon, M. Oukka, E. Bettelli // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). – 2011. – V. 187(12). – P. 6176–6179.
123. Green, J. L. Role of glutamate excitotoxicity and glutamate transporter EAAT2 in epilepsy: Opportunities for novel therapeutics development / J. L. Green, W. F. Dos Santos, A. C. K. Fontana // Biochemical pharmacology. – 2021. – V. 193. – P. 114786.
124. Guan, Y. The role of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: from molecular pathophysiology to / Y. Guan, D. Jakimovski, M. Ramanathan, B. Weinstock-Guttman, R. Zivadinov // in vivo imaging. Neural regeneration research. – 2019. – V. 14(3). – P. 373–386.
125. Gudz, T. I. Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an $\alpha 4$ integrin/myelin proteolipid protein complex / T. I. Gudz, H. Komuro, W. B. Macklin // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2006. – V. 26(9). – P. 2458–2466.
126. Haghayegh Jahromi, N. Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 Differentially Contribute to Peripheral Activation and CNS Entry of Autoaggressive Th1 and Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / N. Haghayegh Jahromi, L. Marchetti, F. Moalli, D. Duc, C. Basso, H. Tardent, E. Kaba, U. Deutsch, C. Pot, F. Sallusto, J. V. Stein, B. Engelhardt // Frontiers in immunology. – 2020. – V. 10. – P. 3056.

127. Hanada, T. Iontropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors / T. Hanada // *Biomolecules*. – 2020. – V. 10(3). – P. 464.
128. Handel, A. E. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis / A. E. Handel, A. J. Williamson, G. Disanto, L. Handunnetthi, G. Giovannoni, S. V. Ramagopalan // *PloS one*. – 2010. – V. 5(9). – P. e12496.
129. Hansen, K. B. Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels / K. B. Hansen, L. P. Wollmuth, D. Bowie, H. Furukawa, F. S. Menniti, A. I. Sobolevsky, G. T. Swanson, S. A. Swanger, I. H. Greger, T. Nakagawa, C. J. McBain, V. Jayaraman, C. M. Low, M. L. Dell'Acqua, J. S. Diamond, C. R. Camp, R. E. Perszyk, H. Yuan, S. F. Traynelis // *Pharmacological reviews*. – 2021. – V. 73(4). – P. 298–487.
130. Harrington, L. E. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages / L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, C. T. Weaver // *Nature immunology*. – 2005. – V. 6(11). – P. 1123–1132.
131. Hartung, H. P. Diagnosis of multiple sclerosis: revisions of the McDonald criteria 2017 – continuity and change / H. P. Hartung, J. Graf, O. Aktas, J. Mares, M. H. Barnett // *Current opinion in neurology*. – 2019. – V. 32(3). – P. 327–337.
132. Hdrzschel, A. VLA-4 Expression and Activation in B Cell Malignancies: Functional and Clinical Aspects / A. Hdrzschel, A. Zucchetto, V. Gattei, T. N. Hartmann // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – V. 21(6). – P. 2206.
133. Hawkins, R. A. The blood-brain barrier and glutamate / R. A. Hawkins // *The American journal of clinical nutrition*. – 2009. – V. 90(3). – P. 867–874.
134. Hebb, A. L. Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination / A. L. Hebb, C. S. Moore, V. Bhan, T. Campbell, J. D. Fisk, H. A. Robertson, M. Thorne, E. Lacasse, M. Holcik, J. Gillard, S. J. Crocker, G. S. Robertson // *Multiple sclerosis*. – 2008. – V. 14(5). – P. 577–594.

135. Hedegaard, C. J. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis / C. J. Hedegaard, M. Krakauer, K. Bendtzen, H. Lund, F. Sellebjerg, C. H. Nielsen // *Immunology*. – 2008. – V. 125. – P. 161–169.
136. Hernández–Pedro, N. Y. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response / N. Y. Hernández–Pedro, G. Espinosa–Ramirez, V. P. de la Cruz, B. Pineda, J. Sotel // *Clinical & developmental immunology*. – 2013. – P. 413465.
137. Heydarpour, P. Smoking and worsening disability in multiple sclerosis: A meta–analysis / P. Heydarpour, A. Manouchehrinia, O. Beiki, S. E. Mousavi, A. Abdolalizadeh, M. M. Lakeh, M. A. Sahraian // *Acta Neurol Scand*. – 2018. – V. 138(1). – P. 62–69.
138. Hollen, C. W. The Future of Progressive Multiple Sclerosis Therapies / C. W. Hollen, M. M. Paz Soldán, J. R. 2nd Rinker, R. I. Spain // *Fed Pract*. – 2020. – V. 37(Suppl 1). – P. 43–49.
139. Hu, D. Transcriptional signature of human pro–inflammatory TH17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis / D. Hu, S. Notarbartolo, T. Croonenborghs, B. Patel, R. Cialic, T. H. Yang, D. Aschenbrenner, K. M. Andersson, M. Gattorno, M. Pham // *Nat Commun*. – 2017. – V.8. – P. 1600.
140. Hu, Q. Cell Adhesion Molecules in Fibrotic Diseases / Q. Hu, K. Saleem, J. Pandey, A. N. Charania, Y. Zhou, C. He // *Biomedicines*. – 2023. – V. 11(7). – P. 1995.
141. Huang, C. Combined transcriptomics and proteomics forecast analysis for potential biomarker in the acute phase of temporal lobe epilepsy / C. Huang, Z. You, Y. He, J. Li, Y. Liu, C. Peng, Z. Liu, X. Liu, J. Sun // *Frontiers in neuroscience*. – 2023. – V. 17. – P. 1145805.
142. Huang, X. N. The effects of fasudil on the permeability of the rat blood–brain barrier and blood–spinal cord barrier following experimental autoimmune encephalomyelitis / X. N. Huang, J. Fu, W. Z. Wang // *J Neuroimmunol*. – 2011. – V. 239(1–2). – P. 61–67.
143. Hussain, R. Z. α 4–integrin deficiency in B cells does not affect disease in a T–cell–mediated EAE disease model / R. Z. Hussain, P. D. Cravens, W. A. Miller–

Little, R. Doelger, V. Granados, E. Herndon, D. T. Okuda, T. N. Eagar, O. Stüve // *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* – 2019. – V. 6(4). – P. e563.

144. Jafarzadeh, A. Higher circulating levels of chemokine CCL20 in patients with multiple sclerosis: evaluation of the influences of chemokine gene polymorphism, gender, treatment and disease pattern / A. Jafarzadeh, S. Bagherzadeh, H. A. Ebrahimi, H. Hajghani, M. R. Bazrafshani, A. Khosravimashizi, M. Nemati, F. Gadari, A. Sabahi, F. Iranmanesh, M. M. Mohammadi, H. Daneshvar // *J. Mol. Neurosci.* – 2014. – V. 53(3). – P. 500–505.

145. Jaffe, E. A. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria / E. A. Jaffe, R. L. Nachman, C. G. Becker, C. R. Minick // *The Journal of clinical investigation.* – 1973. – V. 52(11). – P. 2745–2756.

146. Jia, Z. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF- α -induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing I κ B α /NF- κ B signaling pathway / Z. Jia, P. Nallasamy, D. Liu, H. Shah, J. Z. Li, R. Chitrakar, H. Si, J. McCormick, H. Zhu, W. Zhen, Y. Li // *J. Nutr. Biochem.* – 2015. – V. 26(3). – P. 293–302.

147. Jiang, X. The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons / X. Jiang, F. Tian, K. Mearow, P. Okagaki, R. H. Lipsky, A. M. Marini // *Journal of neurochemistry.* – 2005. – V. 94(3). – P. 713–722.

148. Jurberg, A. D. VLA-4 as a Central Target for Modulating Neuroinflammatory Disorders / A. D. Jurberg, B. Chaves, L. G. Pinho, J. H. M. da Silva, W. Savino, V. Cotta-de-Almeida // *Neuroimmunomodulation.* – 2021. – V. 28(4). – P. 213–221.

149. Kang, Z. Act1 mediates IL-17-induced EAE pathogenesis selectively in NG2+ glial cells / Z. Kang, C. Wang, J. Zepp, L. Wu, K. Sun, J. Zhao, U. Chandrasekharan, P. E. DiCorleto, B. D. Trapp, R. M. Ransohoff, X. Li // *Nature neuroscience.* – 2013. – V. 16(10). – P. 1401–1408.

150. Kang, Z. Astrocyte–restricted ablation of interleukin–17–induced Act1–mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis / Z. Kang, C. Z. Altuntas, M. F. Gulen, C. Liu, N. Giltiyay, H. Qin, L. Liu, W. Qian, R. M. Ransohoff, C. Bergmann, S. Stohlman, V. K. Tuohy, X. Li // *Immunity*. – 2010. – V. 32(3). – P. 414–425.
151. Kant, R. Auto–Reactive Th17–Cells Trigger Obsessive–Compulsive–Disorder Like Behavior in Mice With Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / R. Kant, S. Pasi, A. Surolia // *Front Immunol*. – 2018. – V. 9. – P. 2508.
152. Kaplan–Arabaci, O. Glutamate Scavenging as a Neuroreparative Strategy in Ischemic Stroke / O. Kaplan–Arabaci, A. Acari, P. Ciftci, D. Gozuacik // *Frontiers in pharmacology*. – 2022. – V. 13. – P. 866738.
153. Kebir, H. Human Th17 lymphocytes promote blood–brain barrier disruption and central nervous system inflammation / H. Kebir, K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet–Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, A. Prat // *Nat. Med*. – 2007. – V. 13. – P. 1173–1175.
154. Kebir, H. Preferential recruitment of interferon–gamma–expressing Th17 cells in multiple sclerosis / H. Kebir, I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette, A. Prat // *Ann. Neurol*. – 2009. – V. 66. – P. 390–402.
155. Khire, T. S. Microvascular Mimetics for the Study of Leukocyte–Endothelial Interactions / T. S. Khire, A. T. Salminen, H. Swamy, K. S. Lucas, M. C. McCloskey, R. E. Ajalik, H. H. Chung, T. R. Gaborski, R. E. Waugh, A. J. Glading, J. L. McGrath // *Cell Mol Bioeng*. – 2020. – V. 13(2). – P. 125–139.
156. Kim, J. J. TNF–alpha–induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl–X(L) / J. J. Kim, S. B. Lee, J. K. Park, Y. D. Yoo // *Cell Death Differ*. – 2010. – V. 17. – P. 1420–1434.
157. Kim, K. S. Activation of NMDA receptors in brain endothelial cells increases transcellular permeability / K. S. Kim, M. T. Jeon, E. S. Kim, C. H. Lee, D. G. Kim // *Fluids Barriers CNS*. – 2022. – V. 19(1). – P. 70.

158. Koda, S. The role of glutamate receptors in the regulation of the tumor microenvironment / S. Koda, J. Hu, X. Ju, G. Sun, S. Shao, R. X. Tang, K. Y. Zheng, J. Yan // *Front Immunol.* – 2023. – V. 14. – P. 1123841.
159. Kong, D. H. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule–1 (VCAM–1) in Immunological Disorders and Cancer / D. H. Kong, Y. K. Kim, M. R. Kim, J. H. Jang, S. Lee // *International journal of molecular sciences.* – 2018. – V. 19(4). – P. 1057.
160. Kostic, M. Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity / M. Kostic, N. Zivkovic, I. Stojanovic // *Rev Neurosci.* – 2013. – V. 24(1). – P. 71–88.
161. Krammer, P. H. Life and death in peripheral T cells / P. H. Krammer, R. Arnold, I. N. Lavrik // *Nat Rev Immunol.* – 2007. – V. 7(7). – P. 532–542.
162. Kumaravel, S. The β 1–integrin plays a key role in LEC invasion in an optimized 3–D collagen matrix model / S. Kumaravel, C. A. Abbey, K. J. Bayless, S. Chakraborty // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2020. – V. 319(6). – P. 1045–1058.
163. Kuo, S. L. Biogenesis of podosome rosettes through fission / S. L. Kuo, C. L. Chen, Y. R. Pan, W. T. Chiu, H. C. Chen // *Scientific reports.* – 2018. – V. 8(1). – P. 524.
164. Kurtzke J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) / J. F. Kurtzke // *Neurology.* – 1983. – V. 33(11). – P. 1444–1452.
165. Kuzmina, U. S. The Role of Glutamate in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis / U. S. Kuzmina, L. F. Zainullina, V. A. Vakhitov, K. Z. Bakhtiyarova, Yu. V. Vakhitova // *NeurosciBehavPhysi.* – 2020. – V. 50. – P. 669–675.
166. Landi, D. Oral fingolimod reduces glutamate–mediated intracortical excitability in relapsing–remitting multiple sclerosis / D. Landi, S. Vollaro, G. Pellegrino, D. Mulas, A. Ghazaryan, E. Falato, P. Pasqualetti, P. M. Rossini, M. M. Filippi // *Clin. Neurophysiol.* – 2015. – V. 126. – P. 165–169.
167. Larsen, S. E. Differential cytokine withdrawal–induced death sensitivity of effector T cells derived from distinct human CD8+ memory subsets / S. E. Larsen, K. Voss, E. D. Laing, A. L. Snow // *Cell death discovery.* – 2017. – V. 3. – P. 17031.

168. Lazo–Gomez, R. Mechanisms of neurobehavioral abnormalities in multiple sclerosis: Contributions from neural and immune components / R. Lazo–Gomez, G. L. Velázquez, D. Mireles–Jacobó, M. A. Sotomayor–Sobrinó // *Clin Neurophysiol Pract.* – 2019. – V. 4. – P. 39–46.
169. Lee, Y. Induction and molecular signature of pathogenic Th17 cells / Y. Lee, A. Awasthi, N. Yosef, F. J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D. A. Hafler, R. A. Sobel, A. Regev, V. K. Kuchroo // *Nat. Immunol.* – 2012. – V. 13(10). – P. 991–999.
170. Lertkiatmongkol, P. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule–1 (CD31) / P. Lertkiatmongkol, D. Liao, H. Mei, Y. Hu, P. J. Newman // *Curr Opin Hematol.* – 2016. – V. 23(3). – P. 253–259.
171. Levite, M. Glutamate, T cells and multiple sclerosis / M. Levite // *Neural Transm (Vienna)*. – 2017. – V. 124(7). – P. 775–798.
172. Li, K. Neuroinflammation in neurodegenerative diseases: Focusing on the mediation of T lymphocytes / K. Li, R. Chen, R. Wang, W. Fan, N. Zhao, Z. Yang, J. Yan // *Neural regeneration research.* – 2026. – V. 21(5). – P. 1864–1889.
173. Li, Y. Scavenging of blood glutamate for enhancing brain–to–blood glutamate efflux / Y. Li, X. Hou, Q. Qi, L. Wang, L. Luo, S. Yang, Y. Zhang, Z. Miao, Y. Zhang, F. Wang, H. Wang, W. Huang, Z. Wang, Y. Shen, Y. Wang // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – V. 9. – P. 305–310.
174. Liu, Y. W. Neutrophils in traumatic brain injury (TBI): friend or foe? / Y. W. Liu, S. Li, S. S. Dai // *Journal of neuroinflammation.* – 2018. – V. 15(1). – P. 146.
175. Lochhead, J. J. Structure, Function, and Regulation of the Blood–Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders / J. J. Lochhead, J. Yang, P. T. Ronaldson, T. P. Davis // *Front Physiol.* – 2020. – V. 11. – P. 914.
176. Lombardi, G. Glutamate modulation of human lymphocyte growth: in vitro studies / G. Lombardi, G. Miglio, C. Dianzani, R. Mesturini, F. Varsaldi, A. Chiocchetti, U. Dianzani, and R. Fantozzi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V. 318. – P. 496–502.

177. Losy, J. Is MS an inflammatory or primary degenerative disease? / J. Losy // *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria. – 2013. – V. 120(10). – P. 1459–1462.
178. Luchtman, D. In vivo and in vitro effects of multiple sclerosis immunomodulatory therapeutics on glutamatergic excitotoxicity / D. Luchtman, R. Gollan, E. Ellwardt, J. Birkenstock, K. Robohm, V. Siffrin, F. Zipp // *Journal of neurochemistry*. – 2016. – V. 136(5). – P. 971–980.
179. Lutz, S. E. Caveolin1 is required for Th1 cell infiltration, but not tight junction remodeling, at the blood–brain barrier in autoimmune neuroinflammation / S. E. Lutz, J. R. Smith, D. H. Kim, C. V. L. Olson, K. Ellefsen, J. M. Bates, S. P. Gandhi, D. Agalliu // *Cell Reports*. – 2017. – V. 21(8). – P. 2104–2117.
180. Lyon, J. G. Engineering challenges for brain tumor immunotherapy / J. G. Lyon, N. Mokarram, T. Saxena, S. L. Carroll, R.V. Bellamkonda // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2017. – V. 114. – P. 19–32.
181. Macchi, B. Role of inflammation and apoptosis in multiple sclerosis: comparative analysis between the periphery and the central nervous system / B. Macchi, F. Marino–Merlo, U. Nocentini, V. Pisani, S. Cuzzocrea, S. Grelli, A. Mastino // *J. Neuroimmunol.* – 2015. – V. 287. – P. 80–87.
182. MacMillan, E. L. Progressive multiple sclerosis exhibits decreasing glutamate and glutamine over two years / E. L. MacMillan, R. Tam, Y. Zhao, I. M. Vavasour, D. K. Li, J. Oger, M. S. Freedman, S. H. Kolind, A. L. Traboulsee // *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). – 2016. – V. 22(1). – P. 112–116.
183. Macrez, R. Mechanisms of glutamate toxicity in multiple sclerosis: biomarker and therapeutic opportunities / R. Macrez, P. K. Stys, D. Vivien, S. A. Lipton, F. Docagne // *Lancet Neurol.* – 2016. – V. 15(10). – P. 1089–1102.
184. Macrez, R. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis / R. Macrez, M. C. Ortega, I. Bardou, A. Mehra, A. Fournier, S. M. Van der Pol, B. Haelewyn, E. Maubert, F. Lesept, A. Chevilly, F. de Castro, H. E. De Vries, D. Vivien, D. Clemente, F. Docagne // *Brain*. – 2016. – V. 139(9). – P. 2406–2419.

185. Madhur, M. S. Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice / M. S. Madhur, S. A. Funt, L. Li, A. Vinh, W. Chen, H. E. Lob, Y. Iwakura, Y. Blinder, A. Rahman, A. A. Quyyumi, D. G. Harrison // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2011. – V. 31(7). – P. 1565–1572.
186. Magdaleno Roman, J. Y. Glutamate and excitotoxicity in central nervous system disorders: ionotropic glutamate receptors as a target for neuroprotection / J. Y. Magdaleno Roman, C. Chapa González // *Neuroprotection*. – 2024. – V. 2(2). – P. 137–150.
187. Malekzadeh Shafaroudi, M. The Relationship between Glutamate and Multiple Sclerosis / M. Malekzadeh Shafaroudi, H. Zarei, A. Malekzadeh Shafaroudi, N. Karimi, M. Abedini // *Int. Biol. Biomed. J.* – 2018. – V. 4. – P. 1–13.
188. Marchese M. E. Distinct sites within the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) cytoplasmic domain regulate VCAM-1 activation of calcium fluxes versus Rac1 during leukocyte transendothelial migration / M. E. Marchese, S. Berdnikovs, J. M. Cook-Mills // *Biochemistry*. – 2012. – V. 51. – P. 8235–8246.
189. Marchetti, L. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation / L. Marchetti, B. Engelhardt // *Vasc Biol.* – 2020. – V. 2(1). – P. 1–18.
190. Mashkina, A. P. The excitotoxic effect of NMDA on human lymphocyte immune function / A. P. Mashkina, O. V. Tyulina, T. I. Solovyova, E. I. Kovalenko, L. M. Kanevski, P. Johnson, A. A. Boldyrev // *Neurochem Int.* – 2007. – V. 51(6–7). – P. 356–360.
191. Mastrogiovanni, M. Coordinating Cytoskeleton and Molecular Traffic in T Cell Migration, Activation, and Effector Functions / M. Mastrogiovanni, M. Juzans, A. Alcover, V. Di Bartolo // *Front Cell Dev Biol.* – 2020. – V. 8. – P. 591348.
192. Mehra, A. Nonionotropic Action of Endothelial NMDA Receptors on Blood-Brain Barrier Permeability via Rho/ROCK-Mediated Phosphorylation of Myosin / A. Mehra, S. Guñrit, R. Macrez, F. Gosselet, E. Sevin, H. Lebas, E. Maubert,

H.E. De Vries, I. Bardou, D. Vivien, F. Docagne // *J Neurosci.* – 2020. – V. 40(8). – P. 1778–1787.

193. Miao, Y. Activation of retinal glial cells contributes to the degeneration of ganglion cells in experimental glaucoma / Y. Miao, G. L. Zhao, S. Cheng, Z. Wang, X. L. Yang // *Prog Retin Eye Res.* – 2023. – V. 93. – P. 101169.

194. Miglio, G. Human T lymphocytes express N–methyl–D–aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation / G. Miglio, F. Varsaldi, G. Lombardi // *BiochemBiophys Res Commun.* – 2005. – V. 338. – P. 1875–1883.

195. Miglio, G., Stimulation of N–methyl–D–aspartate receptors modulates Jurkat T cell growth and adhesion to fibronectin / G. Miglio, C. Dianzani, S. Fallarini, R. Fantozzi, G. Lombardi // *Biochemical and biophysical research communications.* – 2007. – V. 361(2). – P. 404–409.

196. Mitchell–Flack, M. The role of ionotropic AMPA receptors in T cell tolerance / M. Mitchell–Flack, Y. Zheng, H. Goldschmidt, K. Rajkovich, M. Higgins, B. Liu, R. Huganir, H. Yu, D. Pardoll // *J Immunol.* – 2022. – V. 208(1). – P. 54.03.

197. Mitsikostas, D. D. Comparing the efficacy of disease–modifying therapies in multiple sclerosis / D. D. Mitsikostas, D. S. Goodin // *MultSclerRelatDisord.* – 2017. – V. 18. – P. 109–116.

198. Mony, J. T. Chemokine receptor expression by inflammatory T cells in EAE / J.T. Mony, R. Khorooshi, T. Owens // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – V. 8. – P. 187.

199. Muls, N. IL–22, GM–CSF and IL–17 In peripheral CD4+ T cell subpopulations during multiple sclerosis relapses and remission. Impact of corticosteroid therapy / N. Muls, Z. Nasr, H. A. Dang, C. Sindic, V. van Pesch // *PLoS ONE.* . – 2017. – V. 12(3). – P. e0173780.

200. Mussbacher, M. Cell type specific roles of nf–kb linking inflammation and thrombosis/ M. Mussbacher, M. Salzmann, C. Brostjan, B. Hoesel, C. Schoergenhofer, H. Datler, P. Hohensinner, J. Basílio, P. Petzelbauer, A. Assinger, J. A. Schmid // *Front. Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 85.

201. Namkoong, J. Metabotropic glutamate receptor 1 and glutamate signaling in human melanoma / J. Namkoong, S. S. Shin, H. J. Lee, Y. E. Marín, B. A. Wall, J. S. Goydos, S. Chen // *Cancer Res* . – 2007. – V. 67(5). – P. 2298–2305.

202. Nguyen, H. T. T. Potentiation of the glycine response by serotonin on the substantia gelatinosa neurons of the trigeminal subnucleuscaudalis in mice / H. T. T. Nguyen, D. H. Cho, S. H. Jang, S. K. Han, S. J. Park // *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. – 2019. – V. 23(4). – P. 271–279.

203. Nishihara, H. Human CD4+ T cell subsets differ in their abilities to cross endothelial and epithelial brain barriers in vitro / H. Nishihara, S. Soldati, A. Mossu, M. Rosito, H. Rudolph, W. A. Muller, D. Latorre, F. Sallusto, M. Sospedra, R. Martin, H. Ishikawa, T. Tenenbaum, H. Schrotten, F. Gosselet, B. Engelhardt // *Fluids Barriers CNS*. – 2020. – V. 17(1). – P. 3.

204. Nitzan, Z. Multiple Sclerosis–Associated Gut Microbiome in the Israeli Diverse Populations: Associations with Ethnicity, Gender, Disability Status, Vitamin D Levels, and Mediterranean Diet / Z. Nitzan, E. Staun–Ram, A. Volkowich, A. Miller // *Int J Mol Sci*. – 2023. – V. 24(19). – P. 15024.

205. O'Gorman, C. Smoking increases the risk of multiple sclerosis in Queensland, Australia / C. O'Gorman, W. Bukhari, A. Todd, S. Freeman, S. A. Broadley // *J Clin Neurosci*. – 2014. – V. 21(10). – P. 1730–1733.

206. Oksenberg, J. R. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis / J. R. Oksenberg, S. E. Baranzini, S. Sawcer, S. L. Hauser // *Nat Rev Genet*. – 2008. – V. 9(7). – P. 516–526.

207. Orihara, K. Neurotransmitter signalling via NMDA receptors leads to decreased T helper type 1–like and enhanced T helper type 2–like immune balance in humans / K. Orihara, S. O. Odemuyiwa, W. P. Stefura, R. Ilarraza, K. T. HayGlass, R. Moqbel // *Immunology*. – 2018. – V. 153(3). – P. 368–379.

208. Ortiz, G. G. Role of the Blood–Brain Barrier in Multiple Sclerosis / G. G. Ortiz, F. P. Pacheco–Moisés, M. A. Macías–Islas, L. J. Flores–Alvarado, M. A. Mireles–Ramírez, E. D. González–Renovato, V. E. Hernández–Navarro, A. L.

Sánchez-López, M. A. Alatorre-Jiménez // *Arch. Med. Res.* – 2014. – V. 45. – P. 687–697.

209. Ostkamp, P. A single-cell analysis framework allows for characterization of CSF leukocytes and their tissue of origin in multiple sclerosis / P. Ostkamp, M. Deffner, A. Schulte-Mecklenbeck, C. Wünsch, I. N. Lu, G. F. Wu, S. Goelz, P. L. De Jager, T. Kuhlmann, C. C. Gross, L. Klotz, G. Meyer Zu Hörste, H. Wiendl, T. Schneider-Hohendorf, N. Schwab // *Sci Transl Med.* – 2022. – V. 14. – P. eadc9778.

210. Ozkazanc, D. Functional exhaustion of CD4⁺ T cells induced by co-stimulatory signals from myeloid leukaemia cells / D. Ozkazanc, D. Yoyen-Ermis, E. Tavukcuoglu, Y. Buyukasik, G. Esendagli // *Immunology.* – 2016. – V. 149(4). – P. 460–471.

211. Paddock, C. Structural basis for PECAM-1 homophilic binding / C. Paddock, D. Zhou, P. Lertkiatmongkol, P. J. Newman, J. Zhu // *Blood.* – 2016. – V. 127(8). – P. 1052–1061.

212. Pajusto M., Human in vivo-activated CD45R0(+) CD4(+) T cells are susceptible to spontaneous apoptosis that can be inhibited by the chemokine CXCL12 and IL-2, -6, -7, and -15 / M. Pajusto, N. Ihalainen, J. Pelkonen, J. Tarkkanen, P. S. Mattila // *Eur. J. Immunol.* – 2004. – V. 34(10). – P. 2771.

213. Pal, M. M. Glutamate: the master neurotransmitter and its implications in chronic stress and mood disorders / M. M. Pal // *Front Hum Neurosci.* – 2021. – V. 15. – P. 722323.

214. Parfenova, H. Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection / H. Parfenova, S. Basuroy, S. Bhattacharya, D. Tcheranova, Y. Qu, R. F. Regan, C. W. Leffler // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2006. – V. 290(5). – P. 1399–1410.

215. Paroni, M. Recognition of viral and self-antigens by Th1 and Th1/Th17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses / M. Paroni, V. Maltese, M. De Simone, V. Ranzani, P. Larghi, C. Fenoglio, A. M. Pietroboni, M. A. De Riz, M. C. Crosti, S. Maglie, M. Moro,

F. Caprioli, R. Rossi, G. Rossetti, D. Galimberti, M. Pagani, E. Scarpini, S. Abrignani, J. Geginat // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2017. – V. 140(3). – P. 797–808.

216. Petit–Pedrol, M. Regulation of membrane NMDA receptors by dynamics and protein interactions / M. Petit–Pedrol, L. Groc // *J Cell Biol.* – 2021. – V. 220(1). – P. e202006101.

217. Peyro Saint Paul, L. Efficacy and safety profile of memantine in patients with cognitive impairment in multiple sclerosis: A randomized, placebo–controlled study / L. Peyro Saint Paul, C. Creveuil, O. Heinzlef, J. De Seze, P. Vermersch, G. Castelnovo, P. Cabre, M. Debouverie, B. Brochet, B. Dupuy, P. Lebiez, É. Sartori, P. Clavelou, D. Brassat, C. Lebrun–Frenay, D. Daplaud, J. Pelletier, I. Coman, P. Hautecoeur, A. Tourbah, G. Defer // *J Neurol Sci.* – 2016. – V. 363. – P. 69–76.

218. Piccio, L. Efficient recruitment of lymphocytes in inflamed brain venules requires expression of cutaneous lymphocyte antigen and fucosyltransferase–VII / L. Piccio, B. Rossi, L. Colantonio, R. Grenningloh, A. Gho, L. Ottoboni, J. W. Homeister, E. Scarpini, M. Martinello, C. Laudanna, D. D'Ambrosio, J. B. Lowe, G. Constantin // *J. Immunol.* – 2005. – V. 174. – P. 5805–5813.

219. Piechocka, I. K. Shear forces induce ICAM–1 nanoclustering on endothelial cells that impact on T–cell migration / I. K. Piechocka, S. Keary, A. Sosa–Costa, L. Lau, N. Mohan, J. Stanisavljevic, K. J. E. Borgman, M. Lakadamyali, C. Manzo, M. F. Garcia–Parajo // *Biophys J.* – 2021. – V. 120(13). – P. 2644–2656.

220. Pittaluga, A. Glutamate in Multiple Sclerosis: From Pathophysiology to Treatments / A. Pittaluga, G. Olivero // Springer, Cham. – 2022. – P. 435–465.

221. Planas, R. Central role of Th2/Tc2 lymphocytes in pattern II multiple sclerosis lesions / R. Planas, I. Metz, Y. Ortiz, N. Vilarrasa, I. Jelčić, G. Salinas–Riester, C. Heesen, W. Brück, R. Martin, M. Sospedra // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* – 2015. – V. 2(9). – P. 875–893.

222. Prajeeth, C. K. Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties / C. K. Prajeeth, J. Kronisch, R. Khoroshi, B. Knier, H. Toft–Hansen, V. Gudi, S. Floess, J. Huehn, T. Owens, T. Korn, M. Stangel // *J. Neuroinflammation.* – 2017. – V. 14(1). – P. 204.

223. Prajeeth, C. K. Ifn-gamma producing Th1 cells induce different transcriptional profiles in microglia and astrocytes / C. K. Prajeeth, O. Dittrich-Breiholz, S. R. Talbot, P. A. Robert, J. Huehn, M. Stangel // *Front. Cell Neurosci.* – 2018. – V. 12. – P. 352.

224. Profaci, C. P. The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions / C. P. Profaci, R. N. Munji, R. S. Pulido, R. Daneman // *J. Exp. Med.* – 2020. – V. 217. – P. e20190062.

225. Proulx, S. T. Cerebrospinal Fluid Outflow: A Review of the Historical and Contemporary Evidence for Arachnoid Villi, Perineural Routes, and Dural Lymphatics / S. T. Proulx // *Cell Mol Life Sci.* – 2021. – V. 78(6). – P. 2429–57.

226. Pyka-Fościak, G. Adhesion Molecule Profile and the Effect of Anti-VLA-4 mAb Treatment in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, a Mouse Model of Multiple Sclerosis / G. Pyka-Fościak, G. J. Lis, J. A. Litwin // *Int J Mol Sci.* – 2022. – V. 23(9). – P. 4637.

227. Pyka-Fosciak, G. Effect of natalizumab treatment on metalloproteinases and their inhibitors in a mouse model of multiple sclerosis / G. Pyka-Fosciak, G. J. Lis, J. A. Litwin // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2020. – № V. 71. – P. 265–273.

228. Rahman, M. T. IFN-gamma, IL-17A, or zonulin rapidly increase the permeability of the blood-brain and small intestinal epithelial barriers: Relevance for neuro-inflammatory diseases / M. T. Rahman, C. Ghosh, M. Hossain, D. Linfield, F. Rezaee, D. Janigro, N. Marchi, A. H. H. van Boxel-Dezaire // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2018. – V. 507. – P. 274–279.

229. Restorick, S. M. CCR6+ Th cells in the cerebrospinal fluid of persons with multiple sclerosis are dominated by pathogenic non-classic Th1 cells and GM-CSF-only-secreting Th cells / S. M. Restorick, L. Durant, S. Kalra, G. Hassan-Smith, E. Rathbone, M. R. Douglas, S. J. Curnow // *Brain, behavior, and immunity.* – 2017. – V. 64. – P. 71–79.

230. Ribeiro, F. M. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases / F. M. Ribeiro, L. B. Vieira, R. G. Pires, R. P. Olmo, S. S. Ferguson // *Pharmacological Research.* – 2017. – V. 115. – P. 179–191.

231. Rose, C. R. Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters / C. R. Rose, D. Ziemens, V. Untiet, C. Fahlke // *Brain Research Bulletin*. – 2018. – V. 136. – P. 3–16.

232. Rua, R. Advances in Meningeal Immunity / Rua R., McGavern D. B. // *Trends Mol. Med.* – 2018. – V. 24. – P. 542–559.

233. Rusakov, D. A. Synaptic environment and extrasynaptic glutamate signals: The quest continues / D. A. Rusakov, M. G. Stewart // *Neuropharmacology*. – 2021. – V. 195. – P. 108688.

234. Russi A. E. Meningeal mast cell–T cell crosstalk regulates T cell encephalitogenicity / A. E. Russi, M. E. Walker–Caulfield, Y. Guo, C. F. Lucchinetti, M. A. Brown // *J. Autoimmun.* – 2016. – V. 73. – P. 100–110.

235. Rustenhoven, J. Functional characterization of the dural sinuses as a neuroimmune interface / J. Rustenhoven, A. Drieu, T. Mamuladze, K. A. de Lima, T. Dykstra, M. Wall, Z. Papadopoulos, M. Kanamori, A. F. Salvador, W. Baker, M. Lemieux, S. Da Mesquita, A. Cugurra, J. Fitzpatrick, S. Sviben, R. Kossina, P. Bayguinov, R. R. Townsend, Q. Zhang, P. Erdmann–Gilmore, J. Kipnis // *Cell*. – 2021. – V. 184(4). – P. 1000–1016.

236. Rutkowski J., Evaluation of peripheral blood T lymphocyte surface activation markers and transcription factors in patients with early stage non–small cell lung cancer / J. Rutkowski, M. Cyman, T. Ślebioda, K. Bembien, A. Rutkowska, M. Gruchała, Z. Kmiec, A. Pliszka, R. Zaucha // *Cell Immunol.* – 2017. – V. 322. – P. 26–33.

237. Sallusto, F. Heterogeneity of human CD4 (+) T cells against microbes / F. Sallusto // *Annu. Rev. Immunol.* – 2016. – V. 34. – P. 317–334.

238. Sambucci, M. One, No One, and One Hundred Thousand: T Regulatory Cells' Multiple Identities in Neuroimmunity / M. Sambucci, F. Gargano, G. Guerrera, L. Battistini, G. Borsellino // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 2947.

239. Schafflick, D. Single–cell profiling of CNS border compartment leukocytes reveals that B cells and their progenitors reside in non–diseased meninges / D. Schafflick, J. Wolbert, M. Heming, C. Thomas, M. Hartlehnert, A. L. Börsch, A. Ricci,

S. Martín–Salamanca, X. Li, I. N. Lu, M. Pawlak, J. Minnerup, J. K. Strecker, T. Seidenbecher, S. G. Meuth, A. Hidalgo, A. Liesz, H. Wiendl, G. Meyer Zu Horste // *Nat Neurosci.* – 2021. – V. 24(9). – P. 1225–1234.

240. Schäringer, K. LSP1–myosin1e bimolecular complex regulates focal adhesion dynamics and cell migration / K. Schäringer, S. Maxeiner, C. Schalla, S. Rütten, M. Zenke, A. Sechi // *FASEB J.* – 2021. – V. 35(2). – P. e21268.

241. Schimmel, L. Endothelial RhoB and RhoC are dispensable for leukocyte diapedesis and for maintaining vascular integrity during diapedesis. Small GTPases / L. Schimmel, A. de Ligt, S. Tol, V. de Waard, J. D.vanBuul // *Small GTPases.* – 2020. – V. 11(3). – P. 225–232.

242. Schlesinger, M. Vascular cell adhesion molecule–1 (VCAM–1)–An increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis / M. Schlesinger, G. Bendas // *Int. J. Cancer.* – 2015. – V. 136. – P. 2504–2514.

243. Schulz, M. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis / M. Schulz, B. Engelhardt // *Cerebrospinal Fluid Res.* – 2005. – V. 2. – P. 8.

244. Scott, G. S. Glutamate–stimulated peroxynitrite production in a brain–derived endothelial cell line is dependent on N–methyl–D–aspartate (NMDA) receptor activation / G. S. Scott, S. R. Bowman, T. Smith, R. J. Flower, C. Bolton // *BiochemPharmacol.* – 2007. – V. 73(2). – P. 228–236.

245. Seo, S. Triculture Model of In Vitro BBB and its Application to Study BBB–Associated Chemosensitivity and Drug Delivery in Glioblastoma / S. Seo, S. Y. Nah, K. Lee, N. Choi, H. N. Kim // *Adv. Funct. Mater.* – 2022. – V. 32. – P. 2106860.

246. Setiadi, A. F. IL–17A is associated with the breakdown of the blood–brain barrier in relapsing–remitting multiple sclerosis / A. F. Setiadi, A. R. Abbas, S. Jeet, K. Wong, A. Bischof, I. Peng, J. Lee, M. Bremer, E. L. Eggers, J. DeVoss, T. Staton, A. Herman, H. C. von Büdingen, M. J. Townsend // *J. Neuroimmunol.* – 2019. – V. 332. – P. 147–154.

247. Sha, Y. S–nitrosylation in the regulation of gene transcription / Y. Sha, H. E. Marshall // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* – 2012. – V. 1820. – P. 701–711.

248. Sharief, M. K. Upregulation of the inhibitor of apoptosis proteins in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis / M. K. Sharief, Y. K. Semra // *J. Neuroimmunol.* – 2001. – V. 119. – P. 350–357.

249. Sharp, C. D. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor / C. D. Sharp, I. Hines, J. Houghton, A. Warren, T. H. Jackson, A. 4th, Jawahar, A. Nanda, J. W. Elrod, A. Long, A. Chi, A. Minagar, J. S. Alexander // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2003. – V. 285(6). – P. 2592–2598.

250. Sheikh, M. H. Immuno–metabolic impact of the multiple sclerosis patients' sera on endothelial cells of the blood–brain barrier / M. H. Sheikh, S. M. Henson, R. A. Loiola, S. Mercurio, A. Colamatteo, G. T. Maniscalco, V. De Rosa, S. McArthur, E. Solito // *J Neuroinflammation.* – 2020. – V. 17(1). – P. 153.

251. Shemirani, F. Association of serum homocysteine, folate, and vitamin B12 and mood following the Swank and Wahls elimination dietary interventions in relapsing–remitting multiple sclerosis: Secondary analysis of the WAVES trial / F. Shemirani, T. J. Titcomb, S. M. Saxby, P. T. Eyck, L. M. Rubenstein, K. F. Hoth, L. G. Snetselaar, T. L. Wahls // *MultSclerRelatDisord.* – 2023. – V. 75. – P. 104743.

252. Silva, B. D. Nitric oxide involvement in the disability and active disease of multiple sclerosis: Systematic review and meta–analysis / B. D. Silva, F. T. Viero, P. Rodrigues, G. Trevisan // *Nitric Oxide.* – 2024. – V. 145. – P. 8–20.

253. Singer, M. Regulatory T–cells: The Face–off of the Immune Balance / M. Singer, A. M. Elsayed, M. I. Husseiny // *Front Biosci (Landmark Ed).* – 2024. – V. 29. – P. 377.

254. Sintzel, M. B. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review / M. B. Sintzel, M. Rametta, A. T. Reder // *Neurology and therapy.* – 2018. – V. 7(1). – P. 59–85.

255. Sloka, S. A quantitative analysis of suspected environmental causes of MS / S. Sloka, C. Silva, W. Pryse–Phillips, S. Patten, L. Metz, V. W. Yong // *Can J Neurol Sci.* – 2011. – V. 38(1). – P. 98–105.

256. Sonar, S. IFN- γ promotes transendothelial migration of CD4⁺ T cells across the blood–brain barrier / S. Sonar, S. Shaikh, N. Joshi, A. Atre, G.Lal // *Immunol. Cell Biol.* – 2017. – V. 95. – P. 843–853.

257. Sonar, S. A. Differentiation and Transmigration of CD4 T Cells in Neuroinflammation and Autoimmunity / S. A. Sonar, G. Lal // *Front Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 1695.

258. Stadhouders, R. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity / R. Stadhouders, E. Lubberts, R.W.Hendriks // *J. Autoimmun.* – 2018. – V. 87. – P. 1–15.

259. Stromnes, I. M. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(h)1 and T(h)17 cells / I. M. Stromnes, L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris, J. M. Goverman // *Nat. Med.* – 2008. – V. 14. – P. 337–342.

260. Sulkowski, G. Effects of antagonists of glutamate receptors on pro-inflammatory cytokines in the brain cortex of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis / G. Sulkowski, B. Dąbrowska–Bouta, M. Chalimoniuk, L. Struijcska // *Journal of neuroimmunology.* – 2013. – V. 261(1–2). – P. 67–76.

261. Sweeney, M. D. Blood–brain barrier: From physiology to disease and back / M.D. Sweeney, Z. Zhao, A. Montagne, A.R. Nelson, B.V. Zlokovic // *Physiological reviews.* – 2019. – V. 99 (1). – P. 21–78.

262. Tahmasebinia, F. The role of Th17 cells in auto-inflammatory neurological disorders / F. Tahmasebinia, A. Pourgholaminejad // *Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry.* – 2017. – V. 79 (Pt B). – P. 408–416.

263. Tan, L.S.Y. Excitotoxicity and the Kynurenine Pathway in Multiple Sclerosis / L.S.Y. Tan, C. K. Lim, // Springer, Cham. – 2021. – P. 1–16.

264. Tanasescu, R. Natalizumab Treatment of Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Has No Long–Term Effects on the Proportion of Circulating Regulatory T Cells / R. Tanasescu, N. Frakich, I.J. Chou, P. Filippini, G. Podda, G. Xin, R. Muraleedharan, O. Jerca, D. Onion, C.S. Constantinescu // *Neurology and therapy.* – 2023. – V. 12(6). – P. 2041–2052.

265. Tangye, S. G. Inborn errors of human B cell development, differentiation, and function / S. G. Tangye, T. Nguyen, E. K. Deenick, V. L. Bryant, C. S. Ma // *J Exp Med.* – 2023. – V. 220. – P. e20221105.

266. Teichberg, V. I. Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies / V. I. Teichberg, K. Cohen-Kashi-Malina, I. Cooper, and A. Zlotnik // *Neuroscience* . – 2009. – V. 158(1). – P. 301–308.

267. Teleanu, R. I. Neurotransmitters–Key Factors in Neurological and Neurodegenerative Disorders of the Central Nervous System / R. I. Teleanu, A–G. Niculescu, E. Roza, O. Vladâcenco, A. M. Grumezescu, D. M. Teleanu // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2022. – V. 23(11). – P. 5954.

268. Thom, S. R. Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune-mediated / S. R. Thom, V. M. Bhopale, D. Fisher, J. Zhang, P. Gimotty // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – V. 101(37). – P. 13660–13665.

269. Thompson, A. J. A. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria / A. J. Thompson, B. L. Banwell, F. Barkhof, W. M. Carroll, T. Coetzee, G. Comi, J. Correale, F. Fazekas, M. Filippi, M. S. Freedman, K. Fujihara, S. L. Galetta, H. P. Hartung, L. Kappos, F. D. Lublin, R. A. Marrie, A. E. Miller, D. H. Miller, X. Montalban, E. M. Mowry, J. A. Cohen // *The Lancet. Neurology.* – 2017. – V. 17(2). – P. 162–173.

270. Tian, J. Brain Infection by Hepatitis E Virus Probably via Damage of the Blood–Brain Barrier Due to Alterations of Tight Junction Proteins / J. Tian, R. Shi, T. Liu, R. She, Q. Wu, J. An, W. Hao, M. H. Soomro // *Frontiers in cellular and infection microbiology.* – 2019. – V. 9. – P. 52.

271. Titcomb, T. J. Eating Pattern and Nutritional Risks among People with Multiple Sclerosis Following a Modified Paleolithic Diet / T. J. Titcomb, B. Bisht, D. D. Moore, 3rd, Y. S. Chhonker, D. J. Murry, L. G. Snetselaar, T. L. Wahls // *Nutrients.* – 2020. – V. 12(6). – P. 1844.

272. Tryfonos, C. Nutritional interventional studies in patients with multiple sclerosis: a scoping review of the current clinical evidence / C. Tryfonos, M. Chrysafi,

K. Vadikolias, L. Berberoglou, T. Vorvolakos, S. Dimoliani, G. Tsourouflis, C. Kontogiorgis, G. Antasouras, & C. Giaginis // *Journal of neurology*. – 2024. – V. 271(4). – P. 1536–1570.

273. Tsuneki, M. CD44 regulation of endothelial cell proliferation and apoptosis via modulation of CD31 and VE–cadherin expression / M. Tsuneki, J.A. Madri // *The Journal of biological chemistry*. – 2014. – V. 289(9). –P. 5357–5370.

274. Tsunoda, I. Inside–Out versus Outside–In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination / I. Tsunoda, R. S. Fujinami. // *Springer seminars in immunopathology*. – 2002. – V. 24(2). – P. 105–125.

275. Tukhvatullin, A. Participation of glutamate and its receptors in the regulation of endothelial cell adhesive properties / A. Tukhvatullin, U. Kuzmina, N. Khisamova, K. Bakhtiyarova, Yu. Vakhitova // *Bio. Comm.* – 2025. – V. 70(3). – P. 207–214.

276. Tzartos J.S., Friese M.A., Craner M.J., Palace J., Newcombe J., Esiri M.M., Fugger L. Interleukin –17 production in central nervous system–infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis / J. S. Tzartos, M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri, L. Fugger// *The American journal of pathology*. – 2008. – V. 172(1). – P. 146–155.

277. Vakhitov, V. A. Epigenetic Mechanisms of the Pathogenesis of Multiple Sclerosis / V. A. Vakhitov, U. S. Kuzmina, K. Z. Bakhtiyarova et al. // *Hum Physiol.* – 2020. – V. 46. – P. 104–112.

278. Valentin–Torres, A. Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis / A. Valentin–Torres, C. Savarin, D. R. Hinton, T. W. Phares, C. C. Bergmann, S. A. Stohlman // *Journal of neuroinflammation*. – 2016. – V. 13. – P. 46.

279. van Langelaar, J. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention / J. van Langelaar, R. M. van der Vuurst de Vries, M. Janssen, A. F. Wierenga–Wolf, I. M. Spilt, T. A. Siepman, W. Dankers, G. M. G. M. Verjans, H. E. de Vries, E. Lubberts, R. Q. Hintzen, , & M. M. van Luijn // *Brain : a journal of neurology*. – 2018. V. 141(5). – P. 1334–1349.

280. VanAmerongen, B.M. Multiple sclerosis and vitamin D: an update / B. M. VanAmerongen, C. D. Dijkstra, P. Lips, C. H. Polman // *European journal of clinical nutrition*. – 2004. – V. 58(8). – P. 1095–1109.

281. Vazana, U. Glutamate–Mediated Blood–Brain Barrier Opening: Implications for Neuroprotection and Drug Delivery / U. Vazana, R. Veksler, G. S. Pell, O. Prager, M. Fassler, Y. Chassidim, Y. Roth, H. Shahar, A. Zangen, R. Raccah, E. Onesti, M. Ceccanti, C. Colonnese, A. Santoro, M. Salvati, A. D'Elia, V. Nucciarelli, M. Inghilleri, and A. Friedman // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2016. – V. 36(29). – P. 7727–7739.

282. Volpe, E. Advances in T helper 17 cell biology: Pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis / E. Volpe, L. Battistini, G. Borsellino // *Mediators Inflamm*. – 2015. – V. 2015. – P. 475158.

283. Wade, D. T. A randomised placebo controlled exploratory study of vitamin B–12, lofepramine, and L–phenylalanine (the "CariLoder regime") in the treatment of multiple sclerosis / D.T. Wade, C.A. Young, K.R. Chaudhuri, D.L. Davidson // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 2002. – V. 73(3). – P. 246–249.

284. Wallström, E. Increased numbers of mononuclear cells from blood and CSF expressing interferon–gamma mRNA in multiple sclerosis are from both the CD4+ and the CD8+ subsets / E. Wallström, M. Khademi, M. Andersson, T. Olsson // *European journal of neurology*. – 2000. – V. 7(1). – P. 71–76.

285. Wang, F. Regulation of Human Brain Microvascular Endothelial Cell Adhesion and Barrier Functions by Memantine / F. Wang, Z. Zou, Y. Gong, D. Yuan, X. Chen, & T. Sun // *Journal of molecular neuroscience : MN*. – 2017. – V. 62(1). – P. 123–129.

286. Wanke, F. Expression of IL–17F is associated with non–pathogenic Th17 cells / F. Wanke, Y. Tang, K. Gronke, S. Klebow, S. Moos, J. Hauptmann, A. Shanmugavadivu, T. Regen, I. A. Mufazalov, L. A. Gabriel, S. Reißig, A. Diefenbach, F. C. Kurschus, & A. Waisman // *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. – 2018. – V. 96(8). – P. 819–829.

287. Weber, K.S. Th17 cells exhibit a distinct calcium profile from Th1 and Th2 Cells and have Th1-like motility and NF- κ B nuclear localization / K.S. Weber, M.J. Miller, P.M. Allen // *J. Immunol.* – 2008. – V. 180. – P. 1442–1450.

288. Wen, Y. Glutamate and GABA_A receptor crosstalk mediates homeostatic regulation of neuronal excitation in the mammalian brain / Y. Wen, Z. Dong, J. Liu, P. Axerio-Cilies, Y. Du, J. Li, L. Chen, L. Zhang, L. Liu, J. Lu, N. Zhou, D. Chuan Wu, Y. T. Wang // *Signal transduction and targeted therapy.* – 2022. – V. 7(1), – P. 340.

289. Wilson, E. H. Trafficking of immune cells in the central nervous system / E. H. Wilson, W. Weninger, & C. A. Hunter // *The Journal of clinical investigation.* – 2010. – V. 120(5). – P. 1368–1379.

290. Wimmer, I. PECAM-1 Stabilizes Blood-Brain Barrier Integrity and Favors Paracellular T-Cell Diapedesis Across the Blood-Brain Barrier During Neuroinflammation / I. Wimmer, S. Tietz, H. Nishihara, U. Deutsch, F. Sallusto, F. Gosselet, R. Lyck, W. A. Muller, H. Lassmann, B. Engelhardt // *Frontiers in immunology.* – 2019. – V. 10. – P. 711.

291. Winger, R. C. Rapid remodeling of tight junctions during paracellular diapedesis in a human model of the blood-brain barrier / R. C. Winger, J. E. Koblinski, T. Kanda, R. M. Ransohoff, W. A Muller // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950).* – 2014. – V. 193(5). – P. 2427–2437.

292. Wittchen, E. S. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration / E. S. Wittchen // *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* – 2009. – V. 14(7). – P. 2522–2545.

293. Wu, H. Caveolin-1 Is Critical for Lymphocyte Trafficking into Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / H. Wu, R. Deng, X. Chen, W. C. Wong, H. Chen, L. Gao, Y. Nie, W. Wu, J. Shen // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2016. – V. 36(19). – P. 5193–5199.

294. Xiao, M. Blood-Brain Barrier: More Contributor to Disruption of Central Nervous System Homeostasis Than Victim in Neurological Disorders / M. Xiao, Z. J. Xiao, B. Yang, Z. Lan, F. Fang // *Frontiers in neuroscience.* – 2020. – V. 14. – P. 764.

295. Yamazaki, Y. Blood–Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease / Y. Yamazaki, T. Kanekiyo // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – V. 18(9). – P. 1965.
296. Yu, X. Reduced CD4+T Cell CXCR3 Expression in Patients With Allergic Rhinitis / X. Yu, M. Wang, Z. Cao // *Frontiers in immunology*. – 2020. – V. 11. – P. 581180.
297. Yu, Y. NMDA mediates disruption of blood–brain barrier permeability via Rho/ROCK signaling pathway / Y. Yu, Y. Wu, J. Wei, F. Huang, F. Mao, W. Nong, X. Cao, W. Huang // *Neurochem Int* – 2022. – V. 154. – P. 105278.
298. Zaragoza R. Transport of Amino Acids Across the Blood–Brain Barrier / R. Zaragoza // *Frontiers in physiology*. – 2020. – V. 11. – P. 973.
299. Zhai, D. Disruption of the GluR2/GAPDH complex protects against ischemia–induced neuronal damage / D. Zhai, S. Li, M. Wang, K. Chin, F. Liu // *Neurobiology of disease*. – 2013. – V.54. – P. 392–403.
300. Zhang, Z. CD31 as a probable responding and gate–keeping protein of the blood–brain barrier and the risk of Alzheimer's disease / Z. Zhang, Q. Gan, J. Han, Q. Tao, W. Q. Qiu, J. A. Madri // *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2023. – V. 43(7). – P. 1027–1041.
301. Zhao, Z. Establishment and Dysfunction of the Blood–Brain Barrier. *Cell* / Z. Zhao, A. R. Nelson, C. Betsholtz, B. V. Zlokovic // *Cell*. – 2015. – V. 163(5). – P. 1064–1078.
302. Zhou, Y. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain / Y. Zhou, N. C. Danbolt // *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*. – 2014. – V. 121(8). – P. 799–817.
303. Zhu, D. N–methyl–D–aspartate and TrkB receptors protect neurons against glutamate excitotoxicity through an extracellular signal–regulated kinase pathway / D. Zhu, X. Wu, K. I. Strauss, R. H. Lipsky, Z. Qureshi, A. Terhakopian, A. Novelli, K. Banaudha, A. M. Marini // *Journal of neuroscience research*. – 2005. – V. 80(1). – P. 104–113.

304. Zierfuss, B. Blood–brain barrier dysfunction in multiple sclerosis: causes, consequences, and potential effects of therapies / B. Zierfuss, C. Larochelle, A. Prat // *The Lancet. Neurology*. – 2024. – V. 23(1). – P. 95–109.