

*На правах рукописи*

ТУХВАТУЛЛИН АРТУР ВАДИМОВИЧ

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

1.5.4. Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Уфа – 2026

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

Научный руководитель: **Кузьмина Ульяна Шафкатовна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и физиологии Института природы и человека ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», Уфимский университет науки и технологий.

Официальные оппоненты: **Ломакин Яков Анатольевич** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биокатализа ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

**Гончарова Зоя Александровна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нервных болезней и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «30» сентября 2026 года в 13.00 на заседании диссертационного совета 24.1.218.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Уфимского федерального исследовательского центра (УФИЦ РАН) по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, аудитория 406.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Научной библиотеке УФИЦ РАН и на официальном сайте УФИЦ РАН [ufaras.ru](http://ufaras.ru). Сведения о защите, автореферат и диссертационная работа размещены на официальных сайтах ВАК при Министерстве науки высшего образования Российской Федерации ([vak.gisnauka.ru](http://vak.gisnauka.ru)) и УФИЦ РАН ([ufaras.ru](http://ufaras.ru)).

Автореферат разослан «\_\_» 2026 года.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01,  
доктор биологических наук, доцент

Корытина Гульназ Фаритовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования и степень разработанности темы исследования**

Рассеянный склероз (РС) – это хроническое, аутоиммунное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), характеризующееся множественными очагами демиелинизации в белом веществе головного и спинного мозга. 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. Соотношение женщин и мужчин среди больных РС составляет приблизительно 3:1 или даже 4:1. Средний возраст дебюта заболевания по стране составляет 28.3–31.2 года. На 2020 г. в России 53.6 тыс. человек имеют статус инвалидов с рассеянным склерозом, 179 из них – дети (по данным Минтруда РФ).

Этиология РС до сих пор остается предметом интенсивных исследований, однако установлено, что развитие заболевания обусловлено сложным взаимодействием генетических и экологических факторов. Патогенез РС характеризуется тремя основными процессами: нейровоспалением, демиелинизацией и нейродегенерацией. Нарушение иммунологической толерантности приводит к активации аутоиммунных Т-лимфоцитов, которые проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в ЦНС посредством молекулами клеточной адгезии. Активированные Т-лимфоциты, в основном Th1 и Th17 клетки, высвобождают провоспалительные цитокины (IFN $\gamma$ , IL-17, TNF $\alpha$ ), которые повреждают вызывают воспаление в ЦНС и миелиновую оболочку нейронов.

К настоящему времени установлена значимая роль глутаматэргической системы в патогенезе РС. Известно, что нарушение метаболизма глутамата приводит к повышению его внеклеточной концентрации, чрезмерной стимуляции рецепторов на клетках ЦНС, а затем к индукции глутаматной эксайтотоксичности и гибели нейронов. Помимо описанного механизма, нейромедиатор может выступать как иммуномодулятор, регулируя функции иммунных клеток, включая пролиферацию, активацию, апоптоз и дифференциацию Т-клеток в субпопуляции (Зайнуллина и др., 2011; Ganor et al., 2012). В единичных работах показано влияние лигандов глутаматных рецепторов на адгезивные и миграционные свойства Т-лимфоцитов, однако его механизмы не изучены лишь частично (García-Gaytán et al., 2022).

Важным патогенетическим звеном РС считается дисфункция ГЭБ. В литературе имеются сведения об экспрессии ионотропных рецепторов глутамата (ИРГ) эндотелиальными клетками, их участии в механизмах, связанных с

функционированием ГЭБ и состоянием мозга, в том числе и развитием эндотелиальной дисфункции. Установлено, что данные рецепторы регулируют проницаемость микрососудов, воспалительные реакции, посредством модуляции экспрессии молекул клеточной адгезии и белков плотных контактов (Zierfuss et al., 2024).

Таким образом, имеются все основания полагать, что глутамат и лиганды его ионотропных NMDA- и AMPA-рецепторов способны контролировать как функциональное состояние аутореактивных Т-клеток на периферии, так и регулировать свойства эндотелиальных клеток, что может влиять на лейкоцитарно–эндотелиальное взаимодействие в целом. Клеточные и молекулярные механизмы участия глутаматных рецепторов в процессах адгезии и трансэндотелиальной миграции иммунных клеток при РС практически не известны, однако критичны для понимания патогенеза заболевания и разработки эффективных подходов его таргетной терапии.

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

**Задачи исследования:**

1. Изучить влияние агонистов (глутамат, глицин, sAMPA, NMDA) и антагонистов (МК-801, NBQX) ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность лимфоцитов, полученных от здоровых лиц и больных РС;
2. Оценить эффекты агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность эндотелиальных клеток HUVEC на фоне активации провоспалительным цитокином TNF $\alpha$ ;
3. Изучить характер влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезионную активность Т-клеток, полученных от здоровых лиц и больных РС, к эндотелиальным клеткам *in vitro*;
4. Провести корреляционный анализ субпопуляционного состава CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных РС с клинико–лабораторными показателями;
5. Определить влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на экспрессию молекулы адгезии VLA-4, локализованной на CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, полученных от здоровых лиц и больных РС;
6. Провести анализ изменения экспрессии молекул адгезии, локализованных на клетках HUVEC (PECAM-1, VCAM-1), под действием агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата в условиях TNF $\alpha$ -активации.

**Научная новизна**

Исследование впервые демонстрирует прямое участие NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата в регуляции взаимодействия между лимфоцитами и эндотелиальными клетками в контексте РС, что подчеркивает межсистемную интеграцию в патогенезе заболевания (иммунная система – эндотелиальная система – нервная система).

Было обнаружено, что лимфоциты пациентов с РС в стадии обострения оказались более чувствительны к действию лигандов ИРГ, что может быть объяснено повышенной экспрессией NMDA- и AMPA-рецепторов на поверхности иммунных клеток. Полученные сведения подчеркивают сложность и неоднозначность влияния глутамата на различные популяции иммунных клеток.

Впервые показана прямая связь между активацией ИРГ на лимфоцитах и регуляцией адгезии к эндотелиальным клеткам через изменение экспрессии молекулы адгезии VLA-4, что имеет критическое значение, поскольку интегрин играет ключевую роль в миграции лейкоцитов через ГЭБ.

Исследование выявило снижение доли высокопатогенных субпопуляций Th17 и Th17.1 клеток именно в стадии обострения заболевания, что, вероятно, связано с их повышенной инфильтрацией в ЦНС или нарушениями процессов дифференцировки и созревания в условиях воспаления. Выявлена корреляция между относительным содержанием Th17 клеток в периферической крови и тяжестью заболевания по шкале EDSS (expanded disability status scale), а также со скоростью прогрессирования, что подтверждает важную роль этих клеток в патогенезе РС.

Впервые продемонстрировано снижение поверхностной экспрессии молекулы адгезии VCAM-1 на эндотелиоцитах *in vitro* при блокаде NMDA-рецепторов МК-801, что подтверждает протективные свойства блокаторов NMDA-рецепторов для предотвращения повреждения ГЭБ.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты исследования расширяют знания о роли ИРГ в иммуноопосредованных процессах в норме и при патологии, об интеграции нервной, иммунной систем и эндотелиального гомеостаза. Понимание механизмов взаимодействия лейкоцитов и эндотелия, опосредованных ИРГ, при РС создает фундамент для разработки новых подходов мультитаргетной терапии заболевания. Полученные данные подтверждают то, что блокаторы ИРГ могут считаться перспективными кандидатами для лечения РС и стабилизации его течения. Кроме того, результаты исследования могут быть использованы для разработки новых биологических маркеров тяжести и прогрессирования РС.

### **Методология и методы исследования**

Методология исследования основана на интеграции новейших биохимических

и иммунологических подходов, а также использовании методов клеточной биологии. Сбор данных включал в себя подробное анкетирование участников и анализ медицинской документации пациентов. Для проведения исследования в условиях *in vitro* были получены первичные клеточные культуры лимфоцитов периферической крови и клеток эндотелия сосудов человека HUVEC. Оценка жизнеспособности и адгезии клеток проводилась с использованием колориметрических методов. Фенотипирование Т-лимфоцитов и детекцию поверхностной экспрессии молекул адгезии проводились методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител.

### **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<sup>+</sup> 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.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность полученных результатов в ходе изучения роли ИРГ в регуляции лейкоцитарно–эндотелиального взаимодействия при РС подтверждается проведением исследования на репрезентативной выборке с использованием релевантных иммунологических, биохимических и статистических методов. Результаты научной работы были доложены на III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов ♦ VII съезде биохимиков России ♦ X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» ♦ VII съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2021); Всероссийской научной конференции с международным участием «Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства» (Уфа, 2022); VI Инновационном Петербургском медицинском форуме «Медицина 2023 – наука, инновации и практика» (Санкт–Петербург, 2023); Нейрофоруме–2023 (Москва, 2023); I Междисциплинарной всероссийской молодежной научной школе–конференции с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (Казань, 2023); Пятом Конгрессе Российского Комитета исследователей рассеянного склероза с международным участием «Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Вопросы патогенеза, диагностики и терапии» (Уфа, 2023); Всероссийской научно–практической конференции «Перспективные направления диагностики и терапии демиелинизирующих заболеваний» и «Конференция молодых ученых по итогам Конгресса РОКИРС 2023» (Ярославль, 2023); Всероссийской научно–практической конференции «Новые направления диагностики и терапии демиелинизирующих заболеваний» (Санкт–Петербург, 2024).

### **Личный вклад автора**

Личный вклад соискателя состоит в углубленном анализе отечественной и зарубежной научной литературы. 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.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 6 статей в журнале из перечня ВАК и индексируемых в международных базах Scopus и Web of Science.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа включает разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы. Список цитированной литературы содержит 304 наименования, в том числе 32 работы отечественных и 272 иностранных авторов. Работа изложена на 193 страницах, 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 уникальный опыт, переданный в процессе научных исследований, за помощь в проведении экспериментальной работы, за наставничество.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Клинико-эпидемиологическая характеристика доноров.** Для исследования выделяли лимфоциты периферической крови, взятые у 58 пациентов с подтверждённым диагнозом РС (30 (51.7 %) женщин и 28 (48.3 %) мужчин, средний возраст составил 21.5 [20.0; 22.5] лет) и 58 здоровых добровольцев, выступавших в качестве контрольной группы (29 женщины (50 %) и 29 мужчин (50 %), средний возраст 22.0 [20.0; 23.5] года). Распределение больных РС по национальности: 28 человек (48.3 %) – русские, 19 (32.8 %) – татары, 3 (5.2 %) – башкиры, 2 (3.4 %) – чуваша, 1 (1.7 %) – украинец, 1 (1.7 %) – дагестанец, 4 (6.9 %) – смешанной национальности. Городскими жителями были 48 (82.8 %) больных РС, сельскими – 10 (17.2 %). Семейный анамнез имелся у 8 пациентов. Средний возраст дебюта РС составил 18.0 [16.5; 20.0] лет. Средний показатель по шкале EDSS составил 2.2 [2.0; 4.0] балла.

**Определение жизнеспособности лимфоцитов периферической крови.** Жизнеспособность клеток оценивали через 72 часа после добавления к лимфоцитам лигандов глутаматных рецепторов фотокolorиметрическим методом с помощью коммерческого реагента PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen, США) на многофункциональном планшетном анализаторе «EnSpire® Multimode Plate Readers» (Perkin Elmer, США).

**Определение жизнеспособности клеток HUVEC.** Клетки HUVEC выделяли из пупочной вены согласно модифицированному протоколу Jaffe и др. (1973). Жизнеспособность интактных и TNF $\alpha$ -активированных эндотелиоцитов HUVEC оценивали через 48 часов на фоне действия лигандов глутаматных рецепторов с помощью реагента PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen, США) на планшетном анализаторе «EnSpire® Multimode Plate Readers» (Perkin Elmer, США).

**Анализ адгезии лимфоцитов к эндотелиоцитам HUVEC.** Анализ адгезии проводили путем добавления окрашенных флуоресцентным красителем CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) (Thermo Fisher Scientific, США) лимфоцитов периферической крови к монослою эндотелиоцитов HUVEC. Последующую детекцию адгезированных клеток осуществляли, используя мультипланшетный анализатор EnSpire® Multimode Plate Readers (Perkin Elmer, США).

**Имунофенотипирование лимфоцитов и определение уровня поверхностной экспрессии молекулы адгезии VLA-4.** Имунофенотипирование Т-лимфоцитов осуществляли путем окрашивания клеток первично мечеными моноклональными антителами к поверхностным CD-маркерам согласно протоколу фирмы–производителя. Уровень экспрессии молекулы адгезии VLA-4 определяли непрямым иммунофлуоресцентным методом на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США).

**Оценка уровня поверхностной экспрессии молекул адгезии, локализованных на эндотелиальных клетках HUVEC.** Анализ уровня экспрессии молекул адгезии PECAM-1 и VCAM-1 проводили после обработки клеток TNF $\alpha$  и/или агонистами и антагонистами ионотропных глутаматных рецепторов с помощью метода непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания. Использовали первичные моноклональные антитела PECAM-1 и VCAM-1, с последующей окраской вторичными антителами Anti-mouse IgG Fab2 Alexa Fluor® 488. Детекцию осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США).

**Статистический анализ.** Полученные данные обрабатывались с помощью статистических пакетов MS Excel, Statistica 6.0 и GraphPad Prism 5.0. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 перцентили (Me [Q1; Q2]). Для выявления значимости различий между двумя независимыми выборками применяли непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни, для сравнения зависимых выборок внутри экспериментальных групп – *t*-критерий Вилкоксона. Корреляционный анализ проведен с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена (*r*). Различие групп считали статистически достоверным при  $p < 0.05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Первый этап исследования показал, что глутамат в широком диапазоне концентраций достоверно повышал жизнеспособность лимфоцитов у всех групп участников (рис. 1). Более низкий уровень повышения жизнеспособности у пациентов с РС в стадии обострения указывает на возможную дисрегуляцию глутаматергических путей при активном воспалении.

Совместное воздействие глутамата (100 мкМ) и глицина (100 мкМ) еще больше усилило жизнеспособность лимфоцитов здоровых доноров до 128.1 % [101.8; 133.7] ( $p < 0.05$ ), подтверждая синергическое действие этих веществ на рецепторах. Этот результат подчеркивает важность взаимодействия различных лигандов глутамата в регуляции активности лимфоцитов.

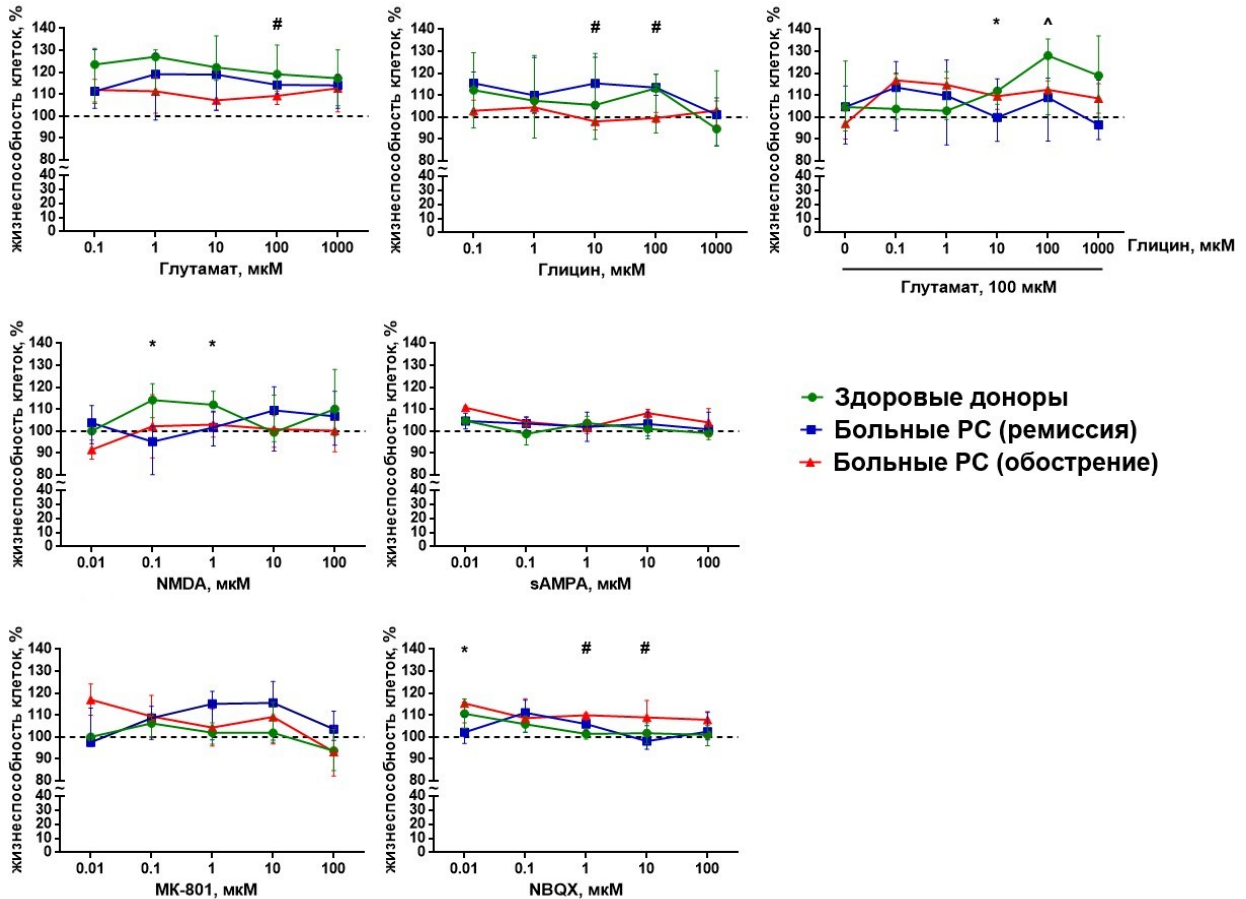


Рисунок 1 – Влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови, полученных от здоровых доноров ( $n = 10$ ), больных РС в стадии ремиссии ( $n = 10$ ) и больных РС в стадии обострения ( $n = 10$ ). Достоверность различий оценивали с помощью  $U$ -критерия Манна-Уитни. (\* –  $p < 0.05$  между группами здоровых доноров и больных РС (ремиссия), ^ –  $p < 0.05$  между группами здоровых доноров и больных РС (обострение), # –  $p < 0.05$  между группами больных РС (ремиссия) и больных РС (обострение)).

Селективная активация NMDA-рецепторов (NMDA, 0.1 мкМ) привела к повышению жизнеспособности лимфоцитов здоровых доноров до 114.2 % [106.3; 120.3], но не оказала значимого влияния на клетки пациентов с РС. Это может

свидетельствовать о нарушении функции или экспрессии NMDA-рецепторов на лимфоцитах у больных РС.

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

На следующем этапе исследования была изучена роль ионотропных рецепторов глутамата в регуляции жизнеспособности интактных клеток HUVEC и в условиях *in vitro* активации TNF $\alpha$ , которые использовали в качестве модели ГЭБ (рис. 2).

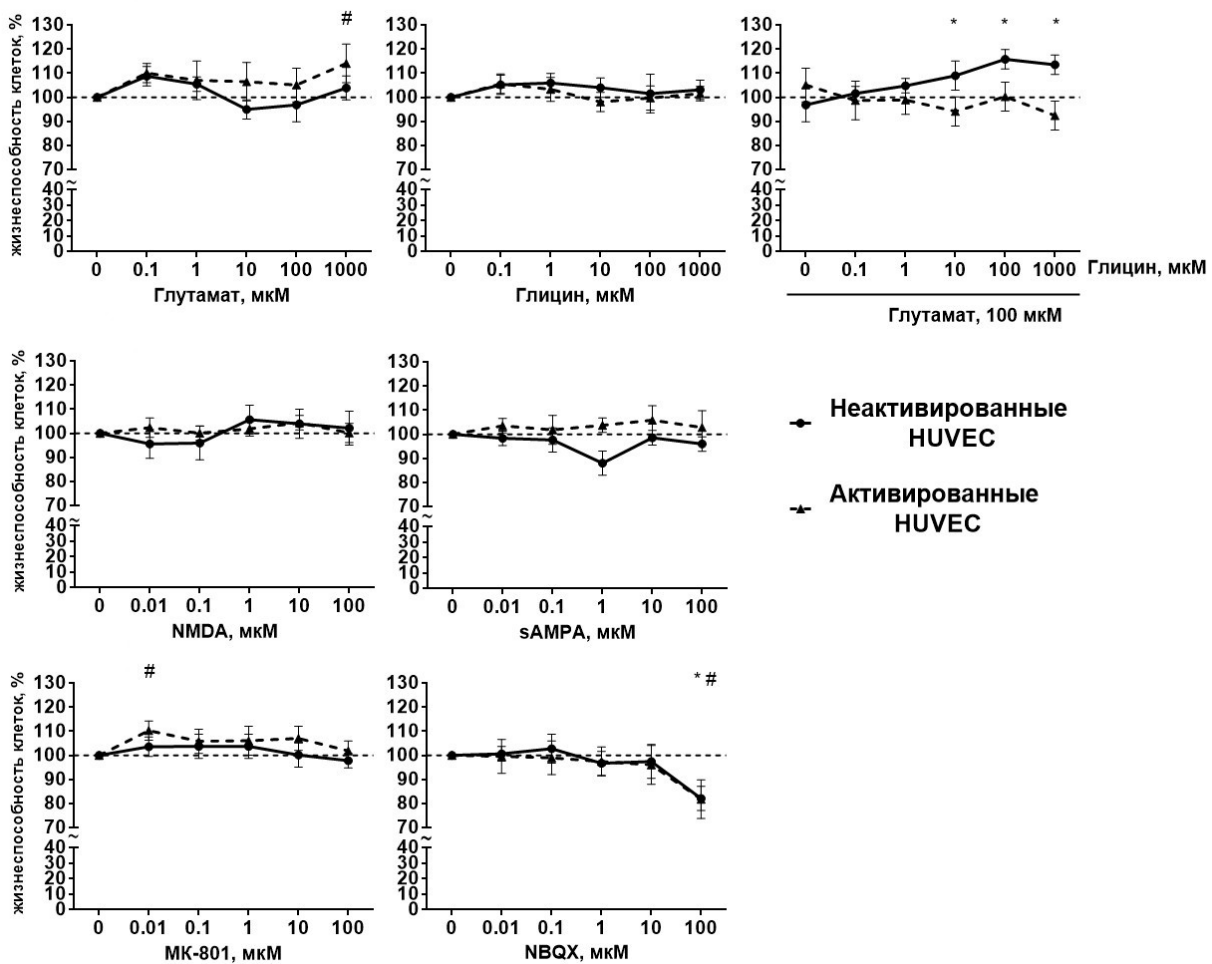


Рисунок 2 – Влияние агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на жизнеспособность клеток HUVEC ( $n = 9$ ). В качестве контроля использовали эндотелиоциты без добавления веществ. Достоверность различий оценивали с помощью  $t$ -критерия Вилкоксона. (\* –  $p < 0.05$  между группой интактных клеток HUVEC относительно контроля, # –  $p < 0.05$  между группой активированных клеток HUVEC относительно контроля). (Tukhvatullin et al., 2025).

При одновременном добавлении глутамата и глицина к неактивированным клеткам HUVEC их жизнеспособность увеличивалась до 115.8 % [111.8; 118.2],  $p < 0.05$ . Это говорит о том, что эти нейромедиаторы могут оказывать положительное влияние на клетки, способствуя их выживанию в условиях воспаления.

В то же время, в условиях воспаления МК-801 в малых концентрациях также способствовал повышению жизнеспособности эндотелиоцитов до 110.2 % [106.3; 114.2],  $p < 0.05$ . Однако блокада AMPA-рецепторов глутамата привела к заметному снижению жизнеспособности клеток как в состоянии покоя (до 82.1 % [78.2; 85.6]), так и в условиях воспаления (до 81.8 % [74.2; 88.7],  $p < 0.05$ ). Эти результаты подтверждают участие ИРГ в регуляции жизнеспособности эндотелиоцитов, что может быть связано с их ролью в клеточной сигнализации и поддержании гомеостаза эндотелия.

Результаты анализа адгезии лимфоцитов периферической крови к эндотелиальным клеткам на фоне действия лигандов ИРГ представлены на рисунке 3. Важно отметить, что в зависимости от стадии заболевания между исследуемыми группами обнаружено снижение адгезии нестимулированных Т-лимфоцитов на фоне действия глутамата и глицина (до 55.3 % [41.2; 69.1] при  $p < 0.05$ ). Это снижение было более выраженным у пациентов с РС в стадии ремиссии, что может свидетельствовать о потенциальной роли этих лигандов в модуляции иммунного ответа.

Кроме того, установлено, что стимуляция NMDA-рецепторов глутамата оказывала угнетающее воздействие на адгезию Т-клеток во всех исследуемых группах. МК-801 демонстрировал более выраженное ингибирующее действие на адгезию Т-лимфоцитов среди пациентов с РС в стадии обострения (до 70.5 % [43.8; 75.3] при  $p < 0.05$ ). Подобные эффекты были также зарегистрированы при блокаде AMPA-рецепторов глутамата (до 78.9 % [38.8; 81.2] при  $p < 0.05$ ). В совокупности, полученные данные указывают на то, что лиганды ионотропных рецепторов глутамата оказывают преимущественно ингибирующее действие на адгезию иммунных клеток, что может иметь важные клинические последствия для понимания механизмов воспаления и потенциальных терапевтических стратегий при рассеянном склерозе.

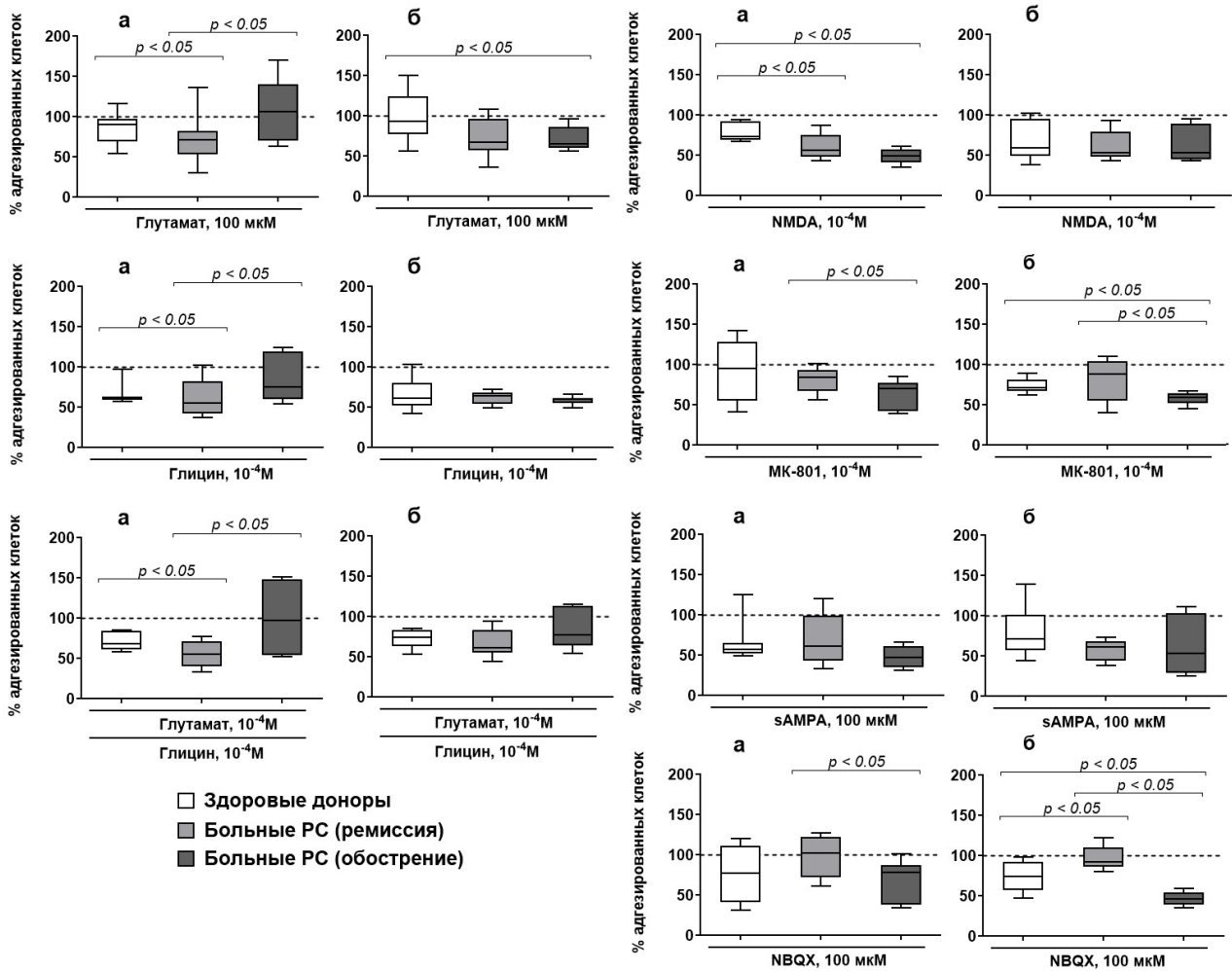


Рисунок 3 – Сравнительный анализ влияния агонистов и антагонистов ионотропных рецепторов глутамата на адгезию нестимулированных (а) и аCD3/aCD28-стимулированных (б) периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ( $n = 10$ ), больных РС в стадии ремиссии ( $n = 10$ ), больных РС в стадии обострения ( $n = 10$ ) к эндотелиальным клеткам HUVEC. Достоверность различий оценивали с помощью  $U$ -критерия Манна-Уитни.

Исследование субпопуляционного состава Т-лимфоцитов показало достоверно повышенное содержание  $CD4^+$  Т-клеток у больных РС (55.9 % [50.4; 59.6]) по сравнению со здоровыми донорами (45.3 % [38.9; 53.8],  $p = 0.02$ ) (рис. 4). Это повышение сохраняется и после аCD3/aCD28-активации Т-лимфоцитов, что указывает на фундаментальные изменения в иммунной системе пациентов.

Было обнаружено достоверно сниженное количество Th17 клеток у пациентов с РС как в стадии ремиссии (4.8 % [4.0; 6.2],  $p = 0.009$ ), так и в стадии обострения (6.2 % [5.0; 7.4],  $p = 0.008$ ) по сравнению со здоровыми донорами (7.6 % [6.9; 12.9]). Снижение наблюдается и после аCD3/aCD28-активации. Предположительно, в начале заболевания происходит активация и миграция Th17 клеток в ЦНС, где они

вызывают воспалительную реакцию, а в периферической крови их количество снижается.

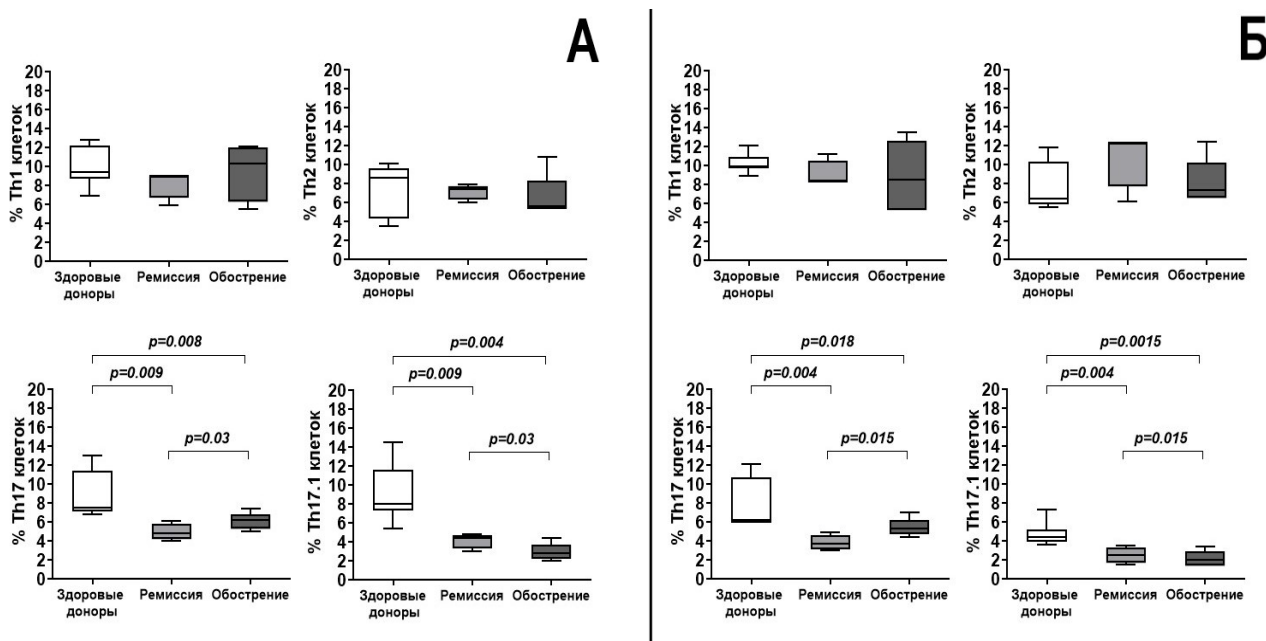


Рисунок 4 – Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляций нестимулированных (А) и aCD3/aCD28-стимулированных (Б) периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ( $n = 10$ ), больных РС в стадии ремиссии ( $n = 10$ ), больных РС в стадии обострения ( $n = 10$ ). Достоверность различий оценивали с помощью *U*-критерия Манна-Уитни.

Доля Th17.1 клеток была значительно ниже у пациентов с РС в стадии обострения (2.8 % [2.0; 4.4],  $p = 0.004$ ) по сравнению с группами здоровых доноров (8.1 % [5.4; 14.5]) и пациентов в ремиссии (4.4 % [3.0; 4.8],  $p = 0.009$ ). Схожая картина наблюдалась после aCD3/aCD28-стимуляции. Снижение Th17.1 лимфоцитов может быть связано с истощением этого пула клеток в результате их активного участия в воспалительном процессе в ЦНС или же с нарушением процессов их дифференцировки и созревания.

Проведенный корреляционный анализ показал сильную положительную корреляцию между долей Th17 лимфоцитов и тяжестью РС по шкале EDSS ( $r = 0.76$ ,  $p < 0.05$ ), а также скоростью прогрессирования заболевания ( $r = 0.76$ ,  $p < 0.05$ ). Это подтверждает важную роль Th17 клеток в патогенезе РС и возможность их использования в качестве прогностического маркера.

В исследовании было подробно изучено влияние агонистов и антагонистов ИРГ на уровень экспрессии молекулы адгезии VLA-4 у различных субпопуляций CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Наибольшая представленность молекулы адгезии VLA-4 наблюдалась в субпопуляции Th17.1 лимфоцитов, как у здоровых доноров, так и у больных РС вне

зависимости от стадии заболевания. Меньше всего VLA-4 экспрессировалась Th2 клетками. Снижение относительного содержания Th17.1 популяции в периферической крови больных РС при обострении, вероятно, связано с их усиленной миграцией в ЦНС.

При анализе воздействия глутамата на экспрессию VLA-4 у нестимулированных Th1 лимфоцитов было установлено, что в большинстве исследуемых групп наблюдается снижение уровня этой молекулы. Особенно выраженное снижение было зафиксировано у пациентов с РС в стадии обострения.

У нестимулированных Th2 лимфоцитов пациентов с РС, независимо от стадии заболевания, влияние глутамата на экспрессию VLA-4 было более выраженным по сравнению с таковыми у здоровых доноров. Это может указывать на то, что у пациентов с РС происходит не только количественное, но и качественное изменение в иммунном ответе, что может быть связано с патогенезом заболевания.

Кроме того, при сравнении влияния глутамата на экспрессию VLA-4 у нестимулированных Th17 и Th17.1 клеток не было выявлено значительных различий между группами, что может говорить о том, что механизмы, задействованные в регуляции этих клеток, могут отличаться от тех, которые наблюдаются у Th1 и Th2 клеток.

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 aCD3/aCD28-стимулированными Th17 и Th17.1 клетками между исследуемыми группами (рис. 5).

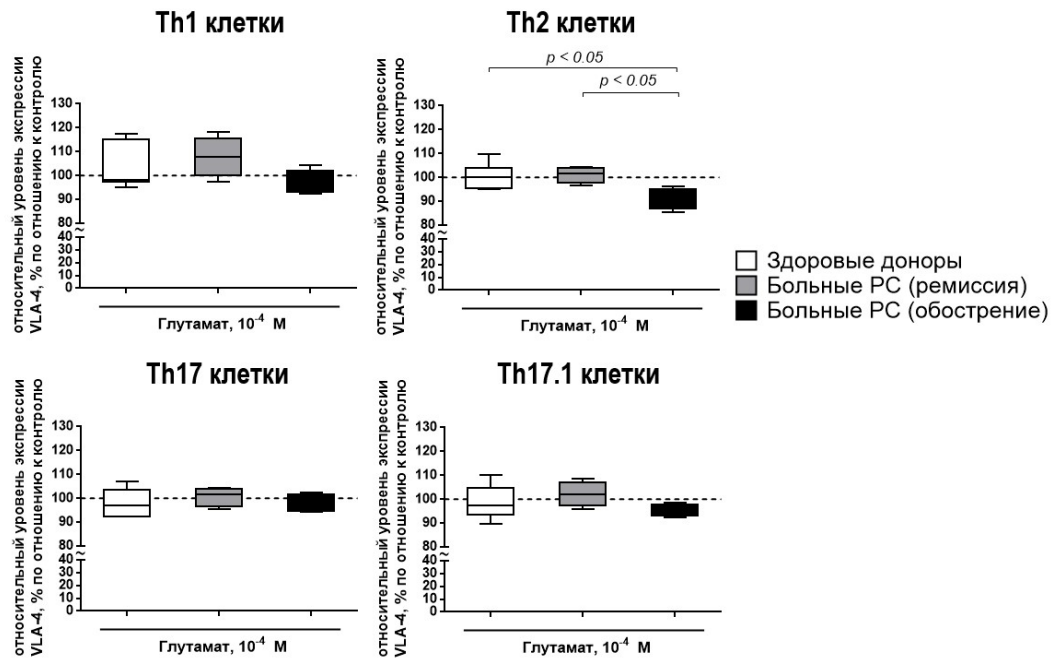


Рисунок 5 – Сравнительный анализ влияния глутамата ( $10^{-4}$  М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-стимулированных периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ( $n = 20$ ) и больных РС в стадии ремиссии ( $n = 20$ ), больных РС в стадии обострения ( $n = 20$ ). Т-клетки активировали с помощью  $\alpha$ CD3 МКА (2.5 мкг/мл) и  $\alpha$ CD28 МКА (1.25 мкг/мл) в течение 24 ч. Данные представлены в виде медианы (Me), 5 и 95 процентиля (Me [Q1; Q2]).

Блокада NMDA-рецепторов также оказала значительное влияние на экспрессию VLA-4. В частности, снижение экспрессии VLA-4 нестимулированными Th2 лимфоцитами на фоне блокады NMDA-рецепторов также было зафиксировано во всех исследуемых группах, и наибольшая выраженность наблюдалась у пациентов с РС в стадии обострения (до 84.7 % [81.4; 87.5] при  $p < 0.05$ ).

При  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-активации Т-клеток наблюдалось увеличение экспрессии VLA-4 у пациентов с РС в стадии ремиссии при применении антагониста МК-801 (рис. 6). На фоне действия МК-801 также была замечена тенденция к снижению экспрессии VLA-4 у клеток Th17 и Th17.1 во всех исследуемых группах. Наибольшее снижение наблюдалось среди пациентов с РС в стадии обострения, где уровни составили 89.4 % [85.0; 95.0] и 81.2 % [72.4; 88.2] соответственно. Это может говорить о том, что NMDA-рецепторы играют ключевую роль в регуляции этих субпопуляций Т-клеток и их способности к адгезии.

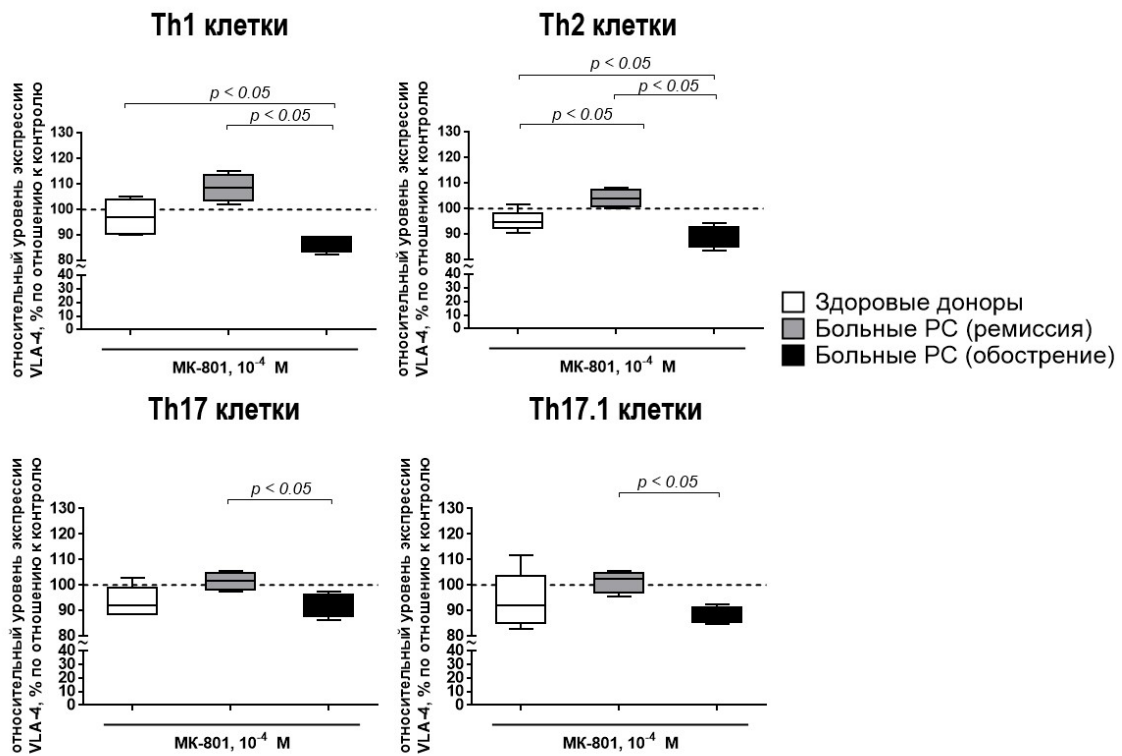


Рисунок 6 – Сравнительный анализ влияния МК–801 ( $10^{-4}$  М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA–4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями аCD3/аCD28–стимулированных периферических Т–лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ( $n = 20$ ) и больных РС в стадии ремиссии ( $n = 20$ ), больных РС в стадии обострения ( $n = 20$ ). Т–клетки активировали с помощью 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 перцентили (Me [Q1; Q2]). Достоверность различий оценивали с помощью  $U$ –критерия Манна–Уитни.

Блокада AMPA–рецепторов негативно влияла на экспрессию молекулы адгезии VLA–4 нестимулированными Th1 лимфоцитами во всех исследуемых группах, наибольшая выраженность отмечалась среди больных РС в стадии ремиссии (снижение до 83.0 % [82.0; 88.0] при  $p < 0.05$ ). Обнаружено снижение экспрессии VLA–4 нестимулированными Th2, Th17, Th17.1 клетками в исследуемых группах на фоне действия NBQX.

Блокада AMPA–рецепторов аCD3/аCD28–активированных Th2, Th17, Th17.1 лимфоцитов больных РС в стадии ремиссии приводила к повышению экспрессии VLA–4 (рис. 7). В группе больных РС в стадии обострения выявлена общая тенденция к снижению экспрессии VLA–4 аCD3/аCD28–стимулированными Т–хелперами всех типов на фоне блокады AMPA–рецепторов, что можно объяснить повышенной чувствительностью Т–клеток при обострении к лигандам глутаматных рецепторов.

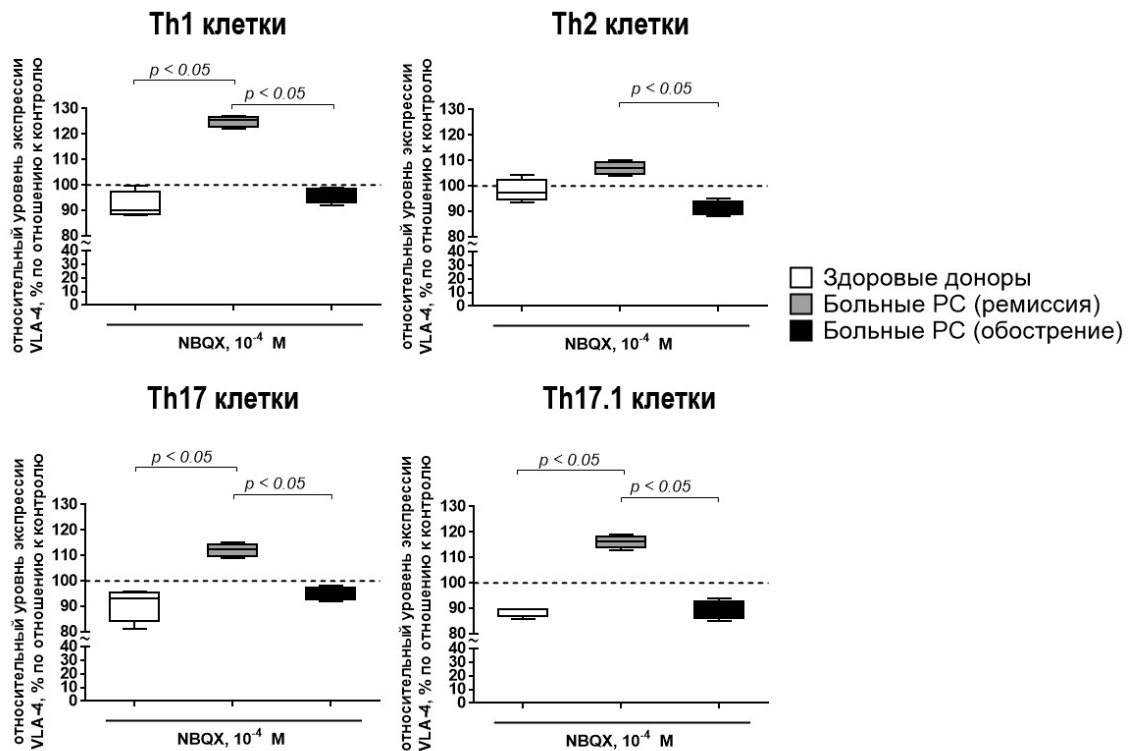


Рисунок 7 – Сравнительный анализ влияния NBQX ( $10^{-4}$  М) на поверхностную экспрессию молекулы адгезии VLA-4 Th1, Th2, Th17 и Th17.1 субпопуляциями aCD3/aCD28-стимулированных периферических Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров ( $n = 20$ ) и больных РС в стадии ремиссии ( $n = 20$ ), больных 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.

Следующим этапом исследования было изучение роли ионотропных рецепторов глутамата в регуляции экспрессии молекул адгезии (PECAM-1, VCAM-1) клетками HUVEC. Не установлено влияния ни агонистов, ни антагонистов ИРГ на экспрессию PECAM-1. Это может указывать на то, что PECAM-1 регулируется другими сигнальными путями, не связанными непосредственно с быстрыми ионными потоками, индуцируемыми глутаматом.

Однако результаты значительно отличались для VCAM-1. Стимуляция воспаления TNF $\alpha$  приводила к мощному увеличению экспрессии VCAM-1, примерно в 14–15 раз. Этот результат согласуется с общепринятым представлением о роли TNF $\alpha$  в развитии воспаления и активации эндотелия. При инкубации эндотелиоцитов с глутаматом, глицином и при их совместном действии наблюдались тенденции к снижению экспрессии VCAM-1 (рис. 8). Активация NMDA-рецепторов приводила к достоверному снижению экспрессии VCAM-1 примерно до 94.0 % [84.1; 95.2], а

активация AMPA-рецепторов – до 91.9 % [82.2; 93.4] ( $p < 0.05$ ). Эти результаты подтверждают, что активация ИРГ, может оказывать противовоспалительное действие на эндотелиальные клетки, подавляя индуцированную TNF $\alpha$  экспрессию VCAM-1.

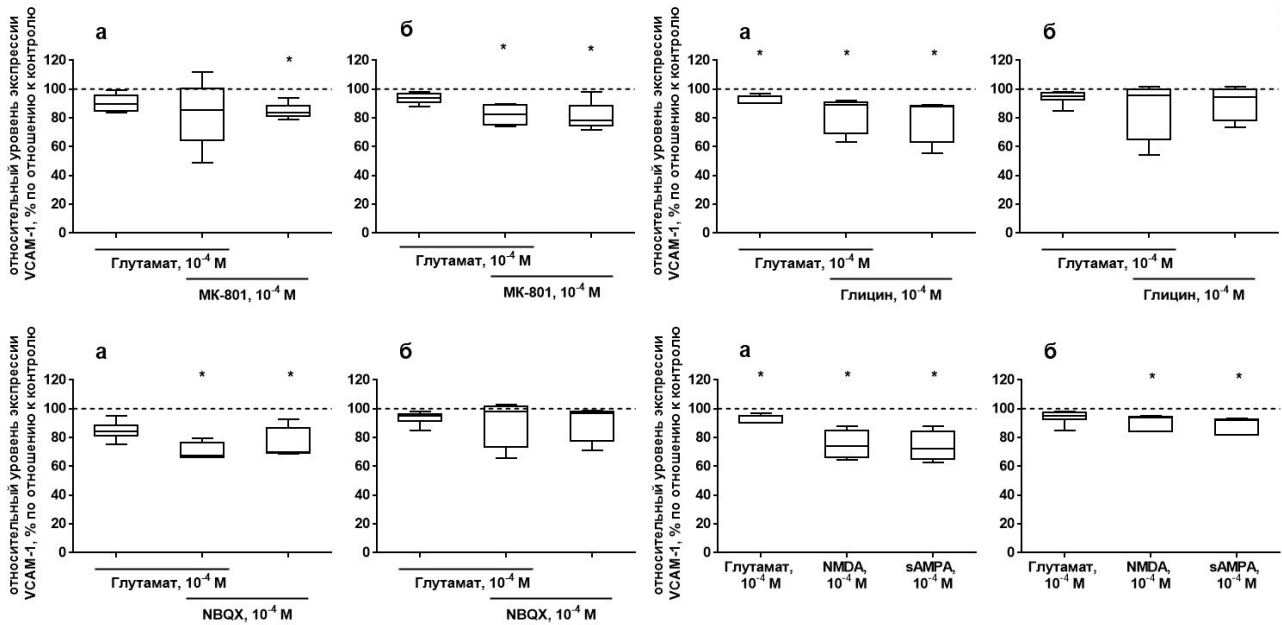


Рисунок 8 – Влияние агонистов (глутамат, глицин, NMDA, sAMPA) и антагонистов (МК-801, NBQX) ионотропных рецепторов глутамата на экспрессию молекулы адгезии VCAM-1 неактивированными (а) и TNF $\alpha$ -активированными (б) клетками HUVEC ( $n = 9$ ). Достоверность различий оценивали с помощью  $t$ -критерия Вилкоксона. \*  $p < 0.05$  относительно контроля (клетки HUVEC без добавления веществ). (Tukhvatullin et al., 2025).

Более того, блокада NMDA-рецепторов на фоне активации TNF $\alpha$  также приводило к значительному снижению экспрессии VCAM-1 до 78.3 % [71.5; 98.1] ( $p < 0.05$ ). Это указывает на то, что NMDA-рецепторы играют важную роль в воспалительной реакции, опосредованной TNF $\alpha$ , и их ингибирование может быть перспективной стратегией в борьбе с воспалением. Добавление глутамата к клеткам после блокады NMDA-рецепторов также приводило к достоверному снижению VCAM-1, подтверждая роль глутамата в этом процессе, хотя и косвенно. В противоположность NMDA-рецепторам, блокада AMPA-рецепторов не вызвала статистически значимых изменений уровня экспрессии VCAM-1.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение, важно подчеркнуть, что полученные сведения о влиянии ИРГ 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<sup>+</sup> 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 $\alpha$ .

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России:

1. **Тухватуллин, А.В.** Клинико–эпидемиологическая характеристика рассеянного склероза у студентов в Республике Башкортостан / А.В. Тухватуллин, У.Ш. Кузьмина, Н.Ф. Утягулова, Р.Ф. Талисов, В.А. Вахитов, К.З. Бахтиярова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2021. – Т. 13(1S). – С. 15–20. (ВАК, Scopus / Глава 3).
2. Кузьмина, У.Ш. Рассеянный склероз с эпизодом шизофреноподобного синдрома / У.Ш. Кузьмина, **А.В. Тухватуллин**, К.З. Бахтиярова, М.А. Кутлубаев, О.В. Лютов, Т.Р. Гизатуллин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2023. – Т. 123(4). – С. 120–124. (ВАК, Scopus / Глава 3).
3. Кузьмина, У.Ш. Клинический случай COVID-ассоциированной энцефалопатии у пациента с рассеянным склерозом / У.Ш. Кузьмина, **А.В. Тухватуллин**, О.В. Лютов, И.Д. Талипова, Э.Н. Закирова, А.Р. Рахматуллин, М.А. Кутлубаев, К.З. Бахтиярова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2024. – Т. 124(4). – С. 159–163. (ВАК, Scopus / Глава 3).
4. **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. (ВАК, Scopus / Глава 3).
5. **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. 50–56. (ВАК / Глава 1).
6. **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. (ВАК / Глава 3).

### Статьи в других журналах и материалах конференций:

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

2021. – С. 221.

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

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

10. **Тухватуллин А.В.**, Кузьмина У.Ш., Вахитов В.А. «Участие глутаматных рецепторов AMPA подтипа в регуляции адгезионной функции эндотелиоцитов». I Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа–конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты», посвященная 120-летию со дня рождения академика Б.А. Арбузова (Казань, 2023): тезисы докладов. – Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, 2023. – С. 114.

11. **Тухватуллин А.В.**, Кузьмина У.Ш., Бахтиярова К.З., Вахитов В.А. Участие глутаматных NMDA-рецепторов в регуляции экспрессии молекулы адгезии VCAM–1 эндотелиальными клетками в условиях модели воспаления *in vitro*. Тезисы 5-го Конгресса по рассеянному склерозу и другим демиелинизирующим заболеваниям (Уфа, 28–30 сентября 2023 г.). Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – Т. 123. – 2023. – С. 136–180.

12. Бахтиярова К.З., Лютов О.В., Талипова И.Д., **Тухватуллин А.В.**, Кутлубаев М.А. Быстро прогрессирующий рассеянный склероз. Тезисы 5-го Конгресса по рассеянному склерозу и другим демиелинизирующим заболеваниям (Уфа, 28–30 сентября 2023 г.). Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – Т. 123. – 2023. – С. 136–180.

13. Кузьмина У.Ш., **Тухватуллин А.В.**, Бахтиярова К.З., Вахитов В.А. Важные аспекты в изучении роли нейромедиаторов в функционировании Т-лимфоцитов при рассеянном склерозе. Тезисы 5-го Конгресса по рассеянному склерозу и другим демиелинизирующим заболеваниям (Уфа, 28–30 сентября 2023 г.). Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – Т. 123. – 2023. – С.

136–180.

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

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИРГ – ионотропные рецепторы глутамата

РС – рассеянный склероз

ЦНС – центральная нервная система

HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека

IL-17 – интерлейкин-17

INF $\gamma$  – интерферон гамма

TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа