

Глионейрональный апоптоз и нейровоспаление при фармакорезистентной височной эпилепсии

Соколова Т.В.¹, Литовченко А.В.², Парамонова Н.М.², Касумов В.Р.³, Кравцова С.В.¹

Нездоровина В.Г.¹, Ситовская Д.А.¹, Скитева Е.Н.¹, Бажанова Е.Д.^{2,4}, Забродская Ю.М.^{1,4}

¹Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург;

²ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург;

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»

Минздрава России, Санкт-Петербург; ⁴ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии

им. акад. С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург;

¹Россия, 191014, Санкт-Петербург, ул. Маяковского, 12; ²Россия, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореца, 44;

³Россия, 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2; ⁴Россия, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

Изучение глионейронального апоптоза и нейровоспаления крайне важно для понимания причин развития эпилепсии. В настоящее время основное внимание уделяется нейрональному апоптозу и отдельным аспектам нейровоспаления, в то время как апоптоз глии остается малоизученным.

Цель исследования — оценить нейрональный и глиальный апоптоз в сопряжении с нейровоспалением в области эпилептического очага у пациентов с фокальной фармакорезистентной эпилепсией (ФРЭ).

Материал и методы. Изучены биоптаты коры и белого вещества височной доли головного мозга от 30 пациентов с фокальной ФРЭ, обусловленной фокальной кортикальной дисплазией. Оценены патологические изменения и структурные признаки апоптоза, уровни апоптотических и провоспалительных факторов, таких как каспаза-3, каспаза-9, FAS, FAS-лиганд (FAS-L), фактор некроза опухоли α (ФНО α), р53, ядерный фактор κ B (NF- κ B). Использованы гистологические методы, трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), иммуногистохимическое исследование (ИГХ) и вестерн-блот (ВБ). Группу сравнения составил 21 человек без эпилепсии и поражения головного мозга.

Результаты. ИГХ выявила экспрессию активной каспазы-3 в единичных нейронах (20% случаев) и в глиоцитах коры головного мозга и белого вещества (100% случаев) у пациентов с ФРЭ. При ТЭМ ультраструктурные признаки апоптоза обнаружены во всех случаях в нейронах и олигодендроцитах. ВБ эпилептического очага показал повышенную экспрессию факторов апоптоза каспазы-9, FAS, р53 и провоспалительных факторов ФНО α , NF- κ B.

Заключение. Полученные результаты указывают на наличие сопряженных процессов апоптоза и нейровоспаления при ФРЭ. Показано активное участие апоптоза глии в эпилептогенезе. Основную часть апоптотической глии составляют олигодендроциты, что объясняет известный феномен повреждения миелина при эпилепсии. Наряду с апоптозом нейронов, олигодендроцитарный апоптоз совместно с нейровоспалением формирует самоподдерживающийся патологический очаг, что способствует прогрессированию заболевания и возникновению рецидивов.

Ключевые слова: фармакорезистентная эпилепсия; апоптоз; нейроны; олигодендроглия; глиа; каспаза-3; ультраструктура; нейровоспаление.

Контакты: Татьяна Владиславовна Соколова; igh-lab@rambler.ru

Для ссылки: Соколова ТВ, Литовченко АВ, Парамонова НМ, Касумов ВР, Кравцова СВ, Нездоровина ВГ, Ситовская ДА, Скитева ЕН, Бажанова ЕД, Забродская ЮМ. Глионейрональный апоптоз и нейровоспаление при фармакорезистентной височной эпилепсии. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2023;15(1):36–42. DOI: 10.14412/2074-2711-2023-1-36-42

Glioneuronal apoptosis and neuroinflammation in drug resistant temporal lobe epilepsy

Sokolova T.V.¹, Litovchenko A.V.², Paramonova N.M.², Kasumov V.R.³, Kravtsova S.V.¹,

Nezdorovina V.G.¹, Sitovskaya D.A.¹, Skiteva E.N.¹, Bazhanova E.D.^{2,4}, Zabrodskaya Yu.M.^{1,4}

¹Polenov Neurosurgical Institute, Almazov National Medical Centre, St. Petersburg; ²Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Science, St. Petersburg; ³Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia, St. Petersburg; ⁴Golikhov Research Center of Toxicology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg

¹12, Mayakovsky St., St. Petersburg 191014, Russia; ²44, Toreza Prosp., St. Petersburg 194223, Russia;

³2, Litovskaya St., St. Petersburg 194100, Russia; ⁴1, Bekhtereva St., St. Petersburg 192019, Russia

The study of glioneuronal apoptosis and neuroinflammation is extremely important for understanding the causes of epilepsy. Currently, the focus is on neuronal apoptosis and certain aspects of neuroinflammation, while glial apoptosis remains poorly understood.

Objective: to evaluate neuronal and glial apoptosis in conjunction with neuroinflammation in the area of the epileptic focus in patients with focal drug-resistant epilepsy (DRE).

Material and methods. Biopsy specimens of the cortex and white matter of the temporal lobe of the brain from 30 patients with focal DRE due to focal cortical dysplasia were studied. We evaluated pathological changes and structural signs of apoptosis, levels of apoptotic and pro-inflam-

matory factors such as caspase-3, caspase-9, FAS, FAS ligand (FAS-L), tumor necrosis factor α (TNF α), p53, nuclear factor κ B (NF- κ B). Histological methods, transmission electron microscopy (TEM), immunohistochemical study (IHC), and Western blot (WB) were used. The comparison group consisted of 21 people without epilepsy and brain involvement.

Results. In DRE patients IHC revealed the expression of active caspase-3 in single neurons (20% of cases) and in gliocytes of the cerebral cortex and white matter (100% of cases). TEM revealed ultrastructural signs of apoptosis in all cases in neurons and oligodendrocytes. The WB of the epileptic focus showed an increased expression of the apoptotic factors caspase-9, FAS, p53 and pro-inflammatory factors TNF α , NF- κ B.

Conclusion. The results obtained indicate the presence of associated apoptosis and neuroinflammation processes of in DRE. Glial apoptosis is actively involved in epileptogenesis. The main part of apoptotic glia is oligodendrocytes, which explains the well-known phenomenon of myelin damage in epilepsy. Along with neuronal apoptosis, oligodendrocyte apoptosis together with neuroinflammation forms a self-sustaining pathological focus, which contributes to the progression of the disease and the occurrence of relapses.

Keywords: drug resistant epilepsy; apoptosis; neurons; oligodendroglia; glia; caspase-3; ultrastructure; neuroinflammation.

Contact: Tatyana Vladislavovna Sokolova; igh-lab@rambler.ru

For reference: Sokolova TV, Litovchenko AV, Paramonova NM, Kasumov VR, Kravtsova SV, Nezdorovina VG, Sitovskaya DA, Skiteva EN, Bazhanova ED, Zabrodskaya YuM. Glioneuronal apoptosis and neuroinflammation in drug resistant temporal lobe epilepsy. *Nevrologiya, neiro-psikhiatriya, psikhosomatika* = *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2023;15(1):36–42. DOI: 10.14412/2074-2711-2023-1-36-42

Фармакорезистентная эпилепсия (ФРЭ) — прогрессирующее заболевание, характеризующееся спонтанно повторяющимися припадками, несмотря на проведение противоэpileптической терапии, нарастанием когнитивного дефицита и структурными перестройками лимбической системы. На сегодняшний день доступно более 30 лицензированных противоэpileптических препаратов для лечения эпилепсии [1], однако их длительный регулярный прием позволяет достичь ремиссии только у 40–60% пациентов. Высокой остается и частота побочных эффектов и осложнений противоэpileптической терапии: по данным разных авторов, она составляет 30–50% [2, 3]. Положительные результаты хирургического лечения ФРЭ отмечаются в 55–74% случаев [4]. Таким образом, крайне важны поиск новых патогенетических механизмов эпилептогенеза и внедрение в практику эффективных методов коррекции эпилепсии.

Значительную роль в прогрессировании ФРЭ играют апоптоз, оксидативный стресс, потеря тормозных или возбуждающих нейронов и воспаление [5, 6]. Многочисленные исследования подтверждают процесс гибели нейронов головного мозга при ФРЭ. Однако именно взаимодействие нейронов и глии лежит в основе многих неврологических заболеваний, что указывает на важность комплексного изучения этих клеток при ФРЭ [7]. В последние годы глиальный компонент рассматривается как перспективная новая мишень для альтернативных противосудорожных препаратов [8]. Отдельные исследователи отмечают важность изучения апоптоза глиальных клеток при ФРЭ [9, 10], однако на сегодняшний день основное внимание приковано к механизмам гибели нейронов [11, 12].

Цель работы — оценить проявления нейронального и глиального апоптоза в сочетании с нейровоспалением в зоне эпилептического очага у больных с ФРЭ.

Материал и методы. Изучены биоптаты 30 пациентов с фокальной ФРЭ (возраст — 24–55 лет), находившихся на лечении в РНХИ им. проф. А.Л. Поленова в период 2013–2020 гг. Преобладали больные со сложными парциальными припадками со вторичной генерализацией. Биоптаты коры и белого вещества височной доли, полученные интраоперационно, послужили материалом для электронно-микроскопического, гистологического, иммуногистохимического (ИГХ) исследований и вестерн-блота (ВБ). Материал группы сравнения для гистологического и ИГХ-исследования

(кора и белое вещество височной доли) был получен при вскрытии в первые 6 ч после смерти от шести больных без эпилепсии и повреждения головного мозга, умерших от соматических заболеваний без длительного терминального периода; для ВБ — от 15 больных, оперированных после черепно-мозговой травмы и не имевших эпилептического анамнеза.

Гистологическое исследование. Биоптаты височной доли фиксировали 10% параформальдегидом в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, обезвоживали стандартным способом и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Шпильмейру и Нисслию. Срезы анализировали с помощью светового микроскопа (Zeiss Axiolab, Carl Zeiss Inc., Германия).

ИГХ. Проведены ИГХ-исследования 20 пациентам с ФРЭ для определения апоптоза по наличию или отсутствию в ткани активной каспазы-3 (caspase-3). Реакции ИГХ выполнялись на парафиновых срезах (5–7 мкм) биоптатов височной доли головного мозга по стандартному протоколу. Для выявления апоптотических клеток использовали кроличьи поликлональные антитела к активной каспазе-3 (1:100, Merckmillipore, Германия) и систему полимерной детекции EnVision (Dako, США). Оценка результатов проводилась путем подсчета в срезах окрашенных ядер (%) на 100 клеток ($\times 200$) в 10 полях зрения (световой микроскоп Zeiss Axiolab, Carl Zeiss Inc., Германия).

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).

Биоптаты височной доли фиксировали в смеси 0,5% глутарового альдегида и 4% параформальдегида, приготовленной на 0,1 М каодилятном буфере (pH 7,2–7,4) и охлажденной до 4 °C. Ультратонкие срезы (50–60 нм) изготавливали на ультратоме (ЛКВ-III, Швеция). Изменения ультраструктуры наблюдали и регистрировали с помощью электронного просвечивающего микроскопа (FEITecna G2Spirit BioTWIN, Нидерланды), предоставленного Центром коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (ЦКП ИЭФБ РАН).

ВБ. В исследование были включены парные биоптаты коры и белого вещества из эпилептического очага и перифокальной зоны височной доли от 30 пациентов с ФРЭ. Использовали антитела к ядерному фактору κ B (NF- κ B) p65, FAS-лиганду (FAS-L, или CD178; 1:500), FAS, фактору некроза опухоли α (ФНО α), NF- κ B p105 (1:1000), p53 (1:250),

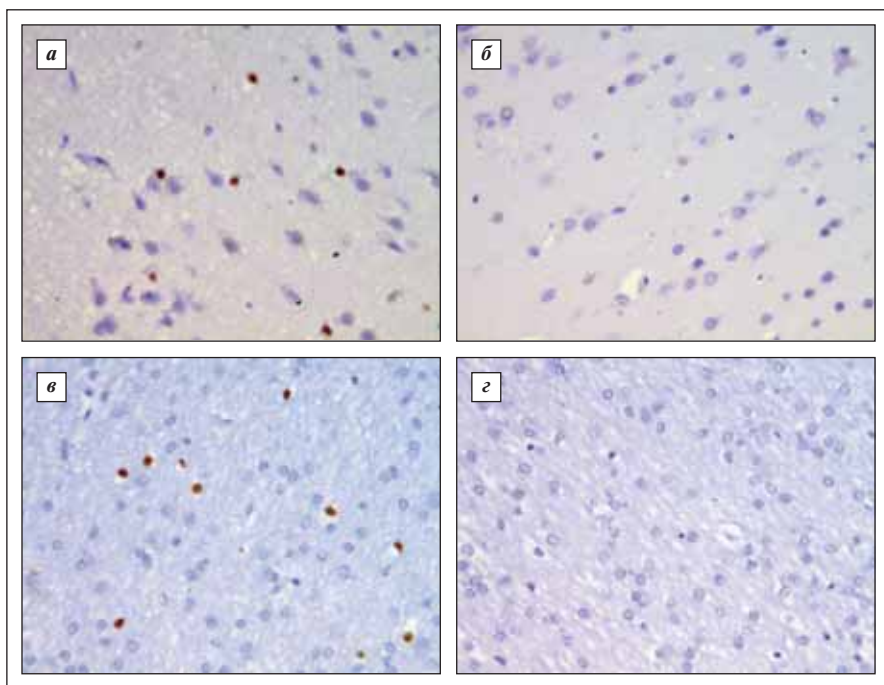


Рис. 1. ИГХ-исследование активной каспазы-3 в клетках головного мозга у пациентов с ФРЭ и в группе сравнения. Наличие активной каспазы-3 в глиальных клетках у пациентов с ФРЭ: а – в коре, в – в белом веществе (коричневое ядерное окрашивание); отсутствие активной каспазы-3 в клетках головного мозга в группе сравнения: б – в коре, г – в белом веществе. Ув. 400

Fig. 1. IHC study of active caspase 3 in brain cells in patients with DRE and in the comparison group. The presence of active caspase 3 in glial cells in patients with DRE: а – in the cortex, в – in the white matter (brown nuclear staining); absence of the active caspase-3 in brain cells in the comparison group: б – in the cortex, г – in the white matter, magnification $\times 400$

каспаза-9 (1:1000; Abcam, США), каспаза-3 (полноразмерная форма; 1:1000; Cell Signalling, США). Анализ полученных блотов проводился методом денситометрии с учетом нормализации относительно тубулина (1:1000; Cell Signalling, США) с помощью гель-документирующей системы (ChemiDoc, BioRad, США).

Таблица 1. Среднее количество каспаза-3-позитивных глиальных клеток ($M \pm m$, %) в коре и белом веществе в группе пациентов с ФРЭ и в группе сравнения (без эпилепсии)

Table 1. Mean number of caspase-3-positive glial cells ($M \pm m$, %) in the cortex and white matter in the group of patients with DRE and in the comparison group (without epilepsy)

Группы	Кора	Белое вещество
Группа больных с эпилепсией (n=20)	25,05 \pm 0,70*	5,94 \pm 0,47
Группа сравнения (n=6)	0,33 \pm 0,23*	0

Примечание. n – количество случаев; M – среднее; m – стандартная ошибка среднего; * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ им. В.А. Алмазова (протокол № 0305-2016 от 16.05.2016) и проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией о правах человека. Предоперационное обследование и хирургическое лечение пациентов осуществлялось в соответствии с Клиническими рекомендациями Ассоциации нейрохирургов России 2015 г.

Результаты. Гистологическое исследование. В ткани головного мозга в зоне эпилептического очага височной доли у всех пациентов с ФРЭ наряду с фокальным нарушением развития коры были обнаружены очаги гибели и реактивно-деструктивные изменения нейронов. При окрашивании по Нисслю наблюдалось чередование нейронов с гидропической дистрофией, хроматоллизом и вакуолизацией цитоплазмы и очагов ишемизированных нейронов с гиперхроматозом и гомогенизацией вещества Ниссля. Эти изменения сопровождались умеренным сателлитозом, нейронофагией и легким глиозом. В белом веществе потеря миелина (демиелинизация), а также повреждение миелиновых оболочек (окраска по Шпильмейру) сопровождались клеточным глиозом.

ИГХ. У всех пациентов с ФРЭ мы увидели наличие активной формы каспазы-3 в ядрах глиальных клеток коры (рис. 1, а) и белого вещества головного мозга (рис. 1, в). В 20% случаев каспаза-3 была обнаружена в отдельных ядрах нейронов.

Кора. В коре наблюдалось диффузное распределение каспаза-3-позитивных ядер глиальных клеток, преимущественно равномерное во всех слоях, ядерное окрашивание было интенсивным. В группе сравнения в 66,7% случаев ИГХ-реакция с активной каспазой-3 была отрицательной (рис. 1, б), в 33,3% случаях выявлялись единичные окрашенные ядра глиоцитов (см. таблицу).

Белое вещество. В белом веществе каспаза-3-позитивные ядра глиальных клеток также были распределены диффузно, преимущественно равномерно, интенсивность ИГХ-реакции была несколько ниже, чем в коре. В группе сравнения наличие активной формы каспазы-3 в белом веществе не наблюдалось (рис. 1, г; см. таблицу).

ТЭМ. В коре пациентов с ФРЭ значительное количество нейронов имело морфологические признаки апоптоза на разных стадиях. Среди ранних признаков – случаи фрагментации ДНК, морфологически основанные на наличии глыбок гетерохроматина, распространенных по всей кариоплазме. На более поздних стадиях апоптоза мы наблюдали распад ядра на фоне необратимых дегенеративных изменений цитоплазмы: выраженных перинуклеарных карманов,

резко расширенных канальцев эндоплазматического ретикулаума и цистерн аппарата Гольджи, которые нередко объединялись в гигантские вакуоли. Цитоплазма многих нейронов была гипертрофирована, с уплотненным матриксом за счет обилия свободных рибосом и глиофиламентов, с резко вакуолизированными органеллами и гомогенным сгущением кариоплазмы, что характерно для некротической гибели клеток (рис. 2, б).

Большинство кортикальных олигодендроцитов и почти все олигодендроциты в белом веществе больных ФРЭ обнаруживали признаки апоптотической деструкции (рис. 2, б, в). Ядра были неправильной, угловатой формы вместо овальной, как у обычных олигодендроцитов, кариоплазма их ядер была заполнена множеством плотных гетерохроматинных глыбок разного размера. Также в epileptическом очаге наблюдали единичные апоптотические астроциты (рис. 2, а).

Кроме того, с помощью ТЭМ было обнаружено большое разнообразие патологических признаков разрушений в структуре миелиновой оболочки аксонов (рис. 2, г).

ВВ. Эпилептический фокус. В корковых биоптатах эпилептического очага наблюдались повышенное содержание провоспалительного ФНО α , сверхэкспрессия FAS на фоне высоких уровней FAS-L. Содержание ФНО α в белом веществе височной доли также увеличилось по сравнению с показателями группы сравнения. Повышения FAS в белом веществе не обнаружено, тогда как содержание FAS-L было значимо выше, чем в группе сравнения (рис. 3).

В коре эпилептического очага и в подлежащем белом веществе содержание проапоптотического белка p53 и инициаторной каспазы-9 было выше, а полноразмерной каспазы-3 — ниже, чем в биоптатах группы сравнения (см. рис. 3).

Содержание фосфорилированной субъединицы p65 NF- κ B и фосфорилированной субъединицы p105 NF- κ B в эпилептическом очаге было повышено в коре и белом веществе относительно группы сравнения (см. рис. 3).

Перифокальная зона эпилептического очага. Содержание ФНО α в перифокальной зоне эпилептического очага как в коре, так и в белом веществе превышало показатели группы сравнения, содержание FAS повышалось только в коре. В белом веществе наблюдалась только восходящая тенденция, однако значимых различий с группой сравнения не выявлено.

В коре и в белом веществе перифокальной зоны уровни каспазы-9

и полноразмерной каспазы-3 имели ту же тенденцию, что и в эпилептическом очаге, но менее выраженную: содержание каспазы-9 увеличивалось, а полноразмерной каспазы-3 — снижалось относительно показателей группы сравнения. Уровень проапоптотического белка p53 в коре и белом веществе в перифокальной зоне также был повышен по сравнению с группой без эпилепсии.

Показатель фосфорилированной субъединицы p65 NF- κ B оставался неизменным, а фосфорилированной субъединицы p105 NF- κ B — увеличивался в коре и белом веществе относительно группы сравнения (см. рис. 3).

Обсуждение. Ранее в наших исследованиях мы продемонстрировали наличие процессов апоптоза и нейровоспаления в височной доле у пациентов со структурной ФРЭ в зоне эпилептического очага [5, 7, 13].

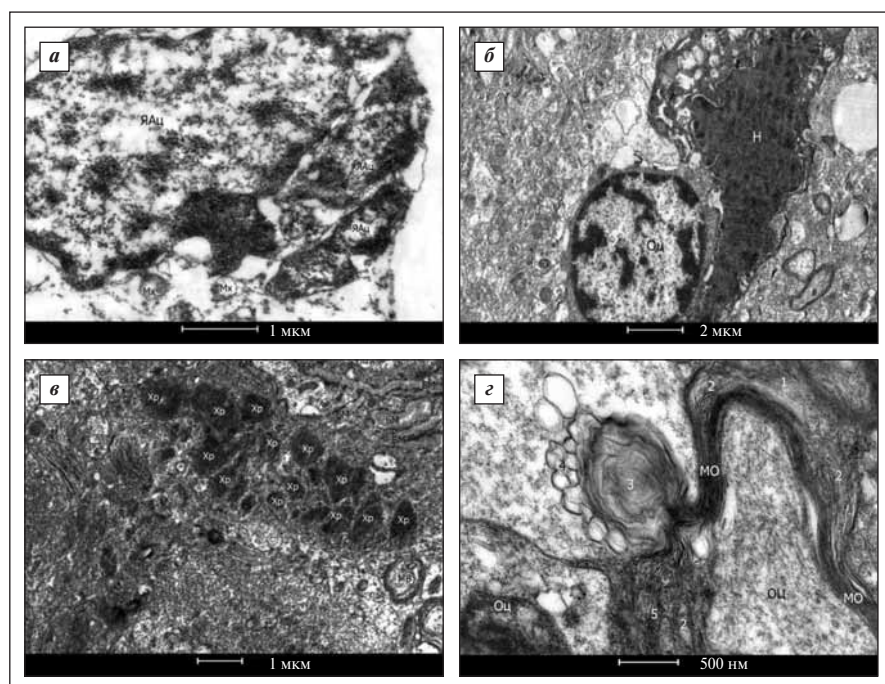


Рис. 2. Апоптоз глии и деструкция миелиновой оболочки при ФРЭ. Электронограмма (ТЭМ): а, б — апоптоз начинается с фрагментации хроматина, глыбки которого локализованы по всей кариоплазме астроцита (ЯАи) и олигодендроцита (Ои), контактирующего с некротизированным нейроном (Н); в — глыбки хроматина (Хр) на месте разрушенного ядра (продвинутая стадия апоптоза олигодендроцита); г — деструкция миелиновой оболочки (МО) при ФРЭ: 1 — участок разрыва ламелл, 2 — расслоение МО, 3 — разволокнение, 4 — везикулярный распад миелина, 5 — фрагмент гипермиелинизации в сочетании с расслоением МО.

Мх — митохондрии; ОЦ — осевой цилиндр, аксон; Ои — олигодендроцит, формирующий МО; МВ — миелиновое волокно; БМ — базальная мембрана.

Ув.: а — 16 500; б — 6000; в — 9900; г — 26 500

Fig. 2. Glia apoptosis and myelin sheath destruction in DRE. Electronogram (TEM): а, б — apoptosis begins with fragmentation of chromatin, clumps of which are localized throughout the karyoplasm of an astrocyte (JAu) and oligodendrocyte (Ou) which are in contact with a necrotic neuron (H); в — clumps of chromatin (Xp) at the site of the destroyed nucleus (an advanced stage of oligodendrocyte apoptosis); д — destruction of the myelin sheath (MS) in DPE: 1 — area of lamella rupture, 2 — dissection of the MS, 3 — defibrillation, 4 — vesicular breakdown of myelin, 5 — fragment of hypermyelination in combination with dissection of the MS. Mx — mitochondria; OЦ — axial cylinder, axon; Ои — oligodendrocyte that forms MS; MB — myelin fiber; BM — basement membrane.

Magnification: а — $\times 16,500$, б — $\times 6000$, в — $\times 9900$, г — $\times 26,500$

Апоптоз глии. При изучении апоптоза большое внимание уделяется астроцитам, которые, как считается, играют важную роль в эпилептогенезе [8, 9, 12]. Предполагают, что апоптоз астроцитов активируется во время и после судорожного приступа и может способствовать гибели нейронов и развитию эпилепсии [14]. В нашем же исследовании в височной доле у пациентов с ФРЭ наряду с апоптозом нейронов мы наблюдали апоптоз преимущественно олигодендроцитов как в коре, так и в белом веществе. И только единичные астроциты находились в состоянии апоптоза.

Есть данные, что НК-клетки могут индуцировать апоптоз как в нейронах, так и в зрелых олигодендроцитах посредством пути FAS–FAS-L [15]. Исследование на культуре олигодендроглиальных клеток крысы показало, что апоптоз олигодендроцитов в модели эпилепсии выше, чем в контроле [10]. Установлено, что при эпилепсии снижается количество зрелых олигодендроцитов и миелина [16]. Апоптоз может играть существенную роль в развитии клеточной потери и связанного с ней нарушения формирования миелиновых оболочек аксонов, в котором участвует олигодендроглия. Массовая демиелинизация волокон в эпилептическом очаге вызывает поперечную нейротрансмиссию и генерализацию нервных импульсов с одновременным вовлечением в эпилептогенез различных отделов головного мозга [17, 18]. В гиппокампе крыс потеря олигодендроцитов и миелина начинается в острой фазе и прогрессирует в латентной и хронической фазах эпилептогенеза [19]. В экспе-

рименте на мышах повреждение миелина приводило к судорогам через 9–12 нед [17], инициация зеркального эпилептического очага совпадала со структурными изменениями миелиновых оболочек и развитием демиелинизации [20].

Устойчивость и восполнение олигодендроглии зависит от многих причин, включая состояние астроцитов, которые секретируют факторы роста, необходимые для выживания нейронов, глии и глиальной пролиферации [21]. Потеря олигодендроцитов приводит к дисбалансу возбуждения и торможения в головном мозге и провоцирует формирование эпилептического очага или усугубляет тяжесть эпилепсии [16].

Сигнальные пути апоптоза. При височной эпилепсии описаны внешний и внутренний пути апоптоза, отмечают преобладание внешнего пути, поскольку активация каспазы-8 предшествует митохондриальной дисфункции и активации каспазы-9 [22]. Ингибирование каспазы-8 снижает гибель нейронов *in vitro* [23] и *in vivo* [14]. Активацию внутреннего пути подтверждает формирование кластеров Вах в наружной митохондриальной мембране в течение 1–4 ч после начала приступа, что совпадает с выбросом цитохрома С [11].

В нашей работе увеличенное содержание p53, а также повышенная экспрессия каспазы-9 и сниженная — полноразмерной каспазы-3 в биоптатах коры и белого вещества эпилептического очага указывают на апоптоз, опосредованный внутренним митохондриальным путем. Повышенная

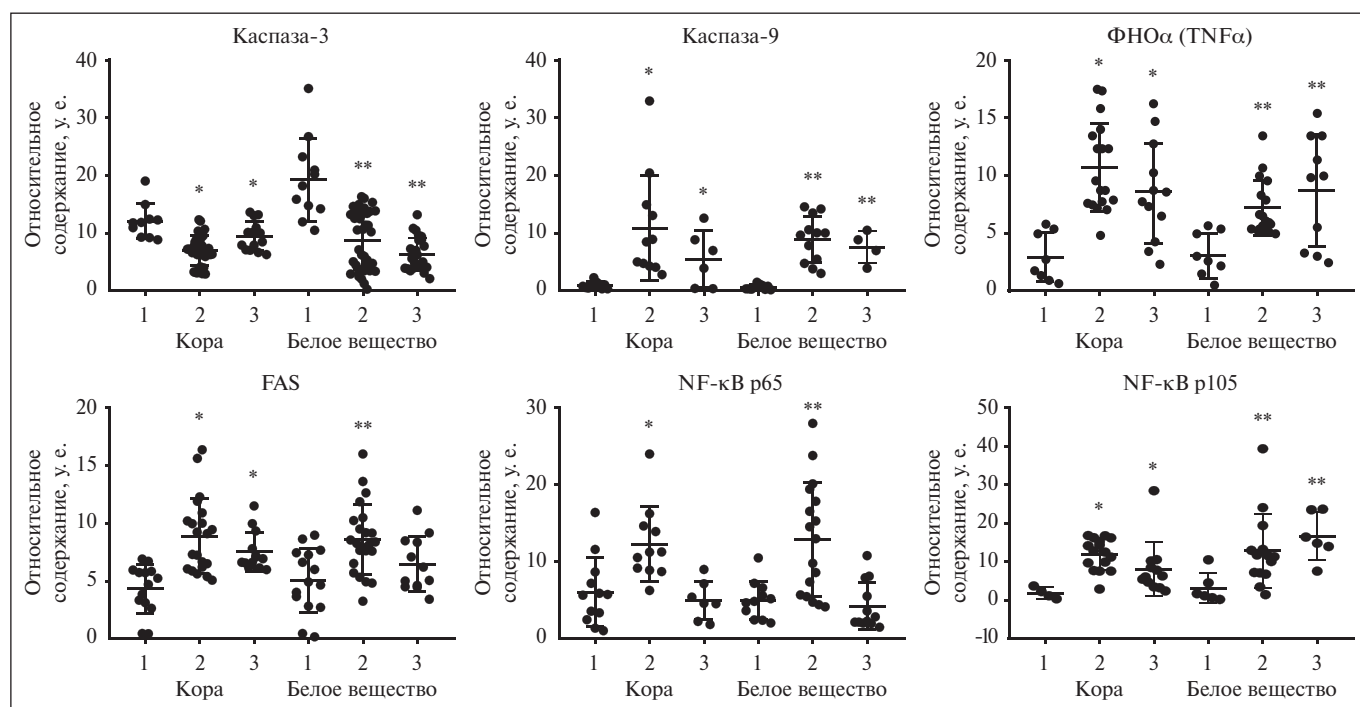


Рис. 3. Содержание каспазы-3, каспазы-9, ФНОα, FAS, NF-κB p65, NF-κB p105 в биоптатах коры и белого вещества пациентов с ФРЭ и пациентов группы сравнения (ВБ). 1 — группа сравнения, 2 — эпилептический очаг, 3 — перифокальная зона;

* — значимость различий в коре между группой сравнения и основной группой в очаге и в перифокальной зоне ($p < 0,05$);

** — значимость различий в белом веществе между группой сравнения и основной группой в очаге и в перифокальной зоне ($p < 0,05$)

Fig. 3. Content of caspase-3, caspase-9, TNF-α, FAS, NF-κB p65, NF-κB p105 in cortical and white matter biopsies of patients with DRE compared with patients in the comparison group (WB). 1 — comparison group, 2 — epileptic focus, 3 — perifocal zone; * — significance of differences in the cortex between the comparison group and the main group in the focus and in the perifocal zone ($p < 0.05$); ** — significance of differences in white matter between the comparison group and the main group in the focus and in the perifocal zone ($p < 0.05$)

экспрессия FAS-L свидетельствует также о наличии внешнего пути апоптоза. Кроме того, FAS-L-опосредованная активация иммунных клеток в белом веществе височной доли пациентов с ФРЭ может приводить к демиелинизации [15].

Известно, что FasL, как апоптоз-индуцирующий фактор, инициирует внешний путь апоптоза [24]; помимо этого, он способен активировать пути сигнальной трансдукции, индуцирующие воспалительный ответ [25]. Воспаление головного мозга может способствовать возникновению и сохранению эпилептических приступов. Известно, что во время приступов повышается количество провоспалительных цитокинов, что увеличивает возбудимость нейронов, и, как следствие, вновь развиваются судороги, гибель клеток и воспаление [26]. Таким образом, эпилептические приступы и сопутствующие им нейровоспаление и апоптоз оказывают друг на друга взаимное провоцирующее действие и способствуют поддержанию патологического процесса.

ФНО α также может оказывать влияние на апоптоз. ФНО α активирует TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain), который может инициировать NF- κ B-пути выживания [27]. ФНО-рецептор-опосредованный внешний путь может быть инактивирован NF- κ B каскадом, приводящим к синтезу c-FLIP и в дальнейшем к супрессии апоптоза, в то время как FAS-опосредованный путь практически всегда приводит к гибели клетки.

Защитные пути NF- κ B. Фактор транскрипции NF- κ B играет важную роль при хронических воспалительных заболеваниях [23]. Гомодимеры NF- κ B p50 и p52 являются репрессорами генов; p65, c-Rel, p50, p52 в любых сочетаниях — активаторами [28].

В нашем исследовании в коре и белом веществе эпилептического очага повышено содержание фосфорилированных субъединиц p65 и p105 (предшественник p50) NF-

κ B. Можно предположить, что повышенное содержание фосфорилированной формы p65 в эпилептическом очаге связано с активацией транскрипции провоспалительных и антиапоптотических генов под влиянием ФНО α . Это часто приводит не к гибели клеток, а к их выживанию. В перифокальной зоне повышенное содержание фосфо-p105 на фоне неизменного уровня фосфо-p65 свидетельствует о подавлении путей выживания. Таким образом, в перифокальной зоне создаются условия для поддержания апоптоза, опосредованного внешним путем, в результате подавления механизмов выживания.

Заключение. Комплексное патоморфологическое исследование и ВБ ткани височной доли при структурной ФРЭ в зоне эпилептической активности показало активное участие апоптоза глии в эпилептогенезе. С помощью ТЭМ установлено, что основную часть апоптотической глии составляют олигодендроциты, что, в частности, объясняет известный феномен повреждения миелина при эпилепсии. Подтверждены внешние и внутренние каспазозависимые пути апоптоза клеток головного мозга в эпилептическом очаге. Интенсивная экспрессия проапоптотических и провоспалительных факторов в головном мозге свидетельствует о наличии сопряженных процессов апоптоза и нейровоспаления при ФРЭ. Апоптоз и факторы нейровоспаления высоки в эпилептическом очаге и снижаются к периферии, что демонстрирует очаговый структурно-функциональный характер процесса.

Таким образом, глионейрональный апоптоз в совокупности с нейровоспалением формирует самоподдерживающийся патологический очаг, способствуя прогрессированию заболевания и возникновению рецидивов. Дальнейшее изучение этого вопроса открывает перспективы для новой терапевтической стратегии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gidal BE, Ferry J, Reyderman L, et al. Use of extended-release and immediate-release anti-seizure medications with a long half-life to improve adherence in epilepsy: A guide for clinicians. *Epilepsy Behav.* 2021 Jul;120:107993. doi: 10.1016/j.yebeh.2021.107993
- Junhong W, Jiyan L, Wei J, et al. Valproic acid-induced encephalopathy: A review of clinical features, risk factors, diagnosis, and treatment. *Epilepsy Behav.* 2021 May;120:107967. doi: 10.1016/j.yebeh.2021.107967
- Одинцова ГВ, Курабаев АК, Нездоровина ВГ. Хирургическое лечение височной эпилепсии: проблемы и эффективность (на примере клинического случая). *Эпилепсия и пароксизмальные состояния.* 2017;9(2):41-9. doi: 10.17749/2077-8333.2017.9.2.041-049 [Odintsova GV, Kuralbaev AK, Nezdorovina VG, et al. Surgical treatment of temporal epilepsy: problems and effectiveness (a clinical case). *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya = Epilepsy and paroxysmal conditions.* 2017;9(2):41-9. doi: 10.17749/2077-8333.2017.9.2.041-049 (In Russ)].
- Schmeiser B, Wagner K, Schulze-Bonhage A, et al. Treatment of Mesiotemporal Lobe Epilepsy: Which Approach is Favorable? *Neurosurgery.* 2017 Dec;81(6):992-1004. doi: 10.1093/neuros/nyx138
- Sazhina TA, Sitovskaya DA, Zabrodskaya YM, et al. Functional Imbalance of Glutamate- and GABAergic Neuronal Systems in the Pathogenesis of Focal Drug-Resistant Epilepsy in Humans. *Bull Exp Biol Med.* 2020 Feb;168(4):529-32. doi: 10.1007/s10517-020-04747-3
- Sloviter RS. Progress on the issue of excitotoxic injury modification vs. real neuroprotection; implications for post-traumatic epilepsy. *Neuropharmacology.* 2011 Oct-Nov;61(5-6):1048-50. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.038
- Соколова ТВ, Забродская ЮМ, Парамонова НМ и др. Апоптоз клеток головного мозга в эпилептических очагах при фармакорезистентной височной эпилепсии. *Трансляционная медицина.* 2017;4(6):22-33. doi: 10.18705/2311-4495-2017-4-6-22-33 [Sokolova TV, Zabrodskaya YuM, Paramonova NM, et al. Apoptosis of brain cells in epileptic focus at drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine.* 2017;4(6):22-33. doi: 10.18705/2311-4495-2017-4-6-22-33 (In Russ)].
- Bedner P, Dupper A, Huttman K, et al. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2015 May;138(5):1208-22. doi: 10.1093/brain/awv067
- Narkilahti S, Pirttilä TJ, Lukasiuk K, et al. Expression and activation of caspase 3 following status epilepticus in the rat. *Eur J Neurosci.* 2003 Sep;18(6):1486-96. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02874.x
- Luo X, Li Z, Zhao J, et al. Fyn gene silencing reduces oligodendrocytes apoptosis through inhibiting ERK1/2 phosphorylation in epilepsy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2020 Dec;48(1):298-304. doi: 10.1080/21691401.2019.1671428
- Henshall DC, Engel T. Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts. *Front Cell Neurosci.* 2013 Jul;7:110. doi: 10.3389/fncel.2013.00110
- Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Dec;25(12):1557-72. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600149

13. Litovchenko AV, Zabrodskaya YuM, Sitovskaya DA, et al. Markers of neuroinflammation and apoptosis in the temporal lobe of patients with drug-resistant epilepsy. *J Evol Biochem Phys.* 2021 Sep;57(5):1040-49. doi: 10.1134/S0022093021050069
14. Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2009 Mar;1(2):97-115.
15. Xu D, Robinson AP, Ishii T, et al. Peripherally derived T regulatory and $\gamma\delta$ T cells have opposing roles in the pathogenesis of intractable pediatric epilepsy. *J Exp Med.* 2018 Apr;215(4):1169-86. doi: 10.1084/jem.20171285
16. Hu X, Wang JY, Gu R, et al. The relationship between the occurrence of intractable epilepsy with glial cells and myelin sheath — an experimental study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 Nov;20(21):4516-24.
17. Lapato AS, Szu JI, Hasselmann JPC, et al. Chronic demyelination-induced seizures. *Neuroscience.* 2017 Mar;27:409-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.035
18. Ситовская ДА, Забродская ЮМ, Соколова ТВ и др. Структурная гетерогенность эпилептических очагов при локальной фармакорезистентной эпилепсии. *Архив патологии.* 2020;82(6):5-15. doi: 10.17116/patol2020820615
- [Sitovskaya DA, Zabrodskaya YuM, Sokolova TV, et al. Structural heterogeneity of epileptic foci in local drug-resistant epilepsy. *Архив патологии.* 2020;82(6):5-15. doi: 10.17116/patol2020820615 (In Russ.)].
19. Luo Y, Hu O, Zhang Q, et al. Alterations in hippocampal myelin and oligodendrocyte precursor cells during epileptogenesis. *Brain Res.* 2015 Nov;1627:154-64. doi: 10.1016/j.brainres.2015.09.027
20. Гайкова ОН, Суворов АВ, Парамонова НМ. Значение повреждения белого вещества головного мозга в патогенезе локально обусловленной эпилепсии. *Российский нейрохирургический журнал им. проф. А.Л. Поленова.* 2011;3(1):19-24.
- [Gaikova ON, Suvorov AV, Paramonova NM. Significance of cerebral white matter damage in pathogenesis of localisation-related epilepsy. *Rossiiskii neurokhirurgicheskii zhurnal im. prof. A.L. Polenova = Russian Neurosurgical Journal named after professor A.L. Polenov.* 2011;3(1):19-24 (In Russ.)].
21. Kiray H, Lindsay SL, Hosseinzadeh S, et al. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Exp Neurol.* 2016 Sep;283:541-9. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.03.009
22. Greene LA, Liu DX, Troy CM, et al. Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007 Apr;1772(4):392-401. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.12.003
23. Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, et al. Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Front Immunol.* 2019 Feb;10:85. doi: 10.3389/fimmu.2019.00085
24. Perez-Figueroa E, Alvarez-Carrasco P, Ortega E, et al. Neutrophils: many ways to die. *Front Immunol.* 2021 Mar;12:631821. doi: 10.3389/fimmu.2021.631821
25. Сергеева СП, Савин АА, Литвицкий ПФ. Роль системы Fas в патогенезе ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2016;116(3):3-8. doi: 10.17116/jnevro2016116323-8
- [Sergeeva SP, Savin AA, Litvitskiy PF. A role of the Fas system in the pathogenesis of ischemic stroke. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 2016;116(3):3-8. doi: 10.17116/jnevro2016116323-8 (In Russ.)].
26. Rana A, Musto AE. The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflamm.* 2018 May;15(1):144. doi: 10.1186/s12974-018-1192-7
27. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19(1):36-41. doi: 10.1038/cdd.2011.155
28. Prescott JA, Mitchell JP, Cook SJ. Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease. *Biochem J.* 2021 Jul;478(13):2619-64. doi: 10.1042/BCJ20210139

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

02.09.2022/12.11.2022/14.11.2022

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Работа выполнена по государственному заданию Минздрава России НМИЦ им. В.А. Алмазова №122041500057-1 и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №20-015-00127), государственного задания ИЭФБ РАН, на оборудовании ЦКП ИЭФБ РАН. Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The work was carried out according to the government program of the Ministry of Health of Russia by Almazov National Medical Centre No. 122041500057-1 and with the support of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 20-015-00127), the government program IEPH RAS, using the equipment of the Center for Collective Use of the IEPH RAS. The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Соколова Т.В. <https://orcid.org/0000-0003-3573-0874>

Литовченко А.В. <https://orcid.org/0000-0002-7810-0832>

Парамонова Н.М. <https://orcid.org/0000-0001-5451-3555>

Касумов В.Р. <https://orcid.org/0000-0002-1586-216X>

Кравцова С.В. <https://orcid.org/0000-0003-1469-5926>

Ситовская Д.А. <https://orcid.org/0000-0001-9721-3827>

Скитева Е.Н. <https://orcid.org/0000-0001-7008-6389>

Бажанова Е.Д. <https://orcid.org/0000-0002-9763-504X>

Забродская Ю.М. <https://orcid.org/0000-0001-6206-2133>