

## АПОПТОЗ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ОЧАГАХ ПРИ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Соколова Т.В.<sup>1</sup>, Забродская Ю.М.<sup>1,3</sup>, Парамонова Н.М.<sup>2,3</sup>,  
Доброгорская Л.Н.<sup>1</sup>, Куралбаев А.К.<sup>1</sup>, Касумов В.Р.<sup>1,4</sup>,  
Ситовская Д.А.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт имени профессора А. Л. Поленова, филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Федеральное Государственное Бюджетное Военное Образовательное Учреждение Высшего Образования «Военно-Медицинская Академия имени С.М.Кирова» Министерства Обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

### Контактная информация:

Соколова Татьяна Владиславовна  
«РНХИ им. проф. А.Л. Поленова» филиал  
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России  
ул. Маяковского, д. 12,  
Санкт-Петербург, Россия, 191014  
E-mail: igh-lab@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 17.10.2017  
и принята к печати 05.02.2018.

### Резюме

**Актуальность.** Поиск причин возникновения эпилепсии и разработка новых методов её коррекции — важнейшие задачи современной неврологии. Исследования последних лет посвящены изучению роли нейронального апоптоза при эпилепсии, вопрос гибели глиальных клеток остается малоизученным. Однако именно взаимодействие нейронов и глии модулирует физиологические функции мозга и лежит в основе многих неврологических заболеваний, что указывает на важность комплексного изучения морфофункционального состояния этих клеток при эпилепсии. **Цель работы.** Оценить значение апоптотической гибели нейронов и глии в патогенезе фармакорезистентной височной эпилепсии по наличию экспрессии caspase-3 в клетках головного мозга и ультраструктурным проявлениям. **Материалы и методы.** Объект исследования — биоптаты коры и белого вещества головного мозга в зоне эпилептических очагов от 20 пациентов с фармакорезистентной височной эпилепсией. Материал для группы сравнения получен при аутопсиях от 6 пациентов без эпилепсии. Выполнены иммуногистохимические реакции с антителами к caspase-3 и ультраструктурный анализ биоптатов. **Результаты.** Во всех случаях (100%) у больных с эпилепсией выявлена экспрессия caspase-3 в глиоцитах с преимущественной локализацией в коре височной доли. Экспрессия caspase-3 в нейронах обнаружена в 20% наблюдений в единичных клетках. В группе сравнения экспрессия caspase-3 отмечалась только в единичных глиоцитах коры. С помощью электронной микроскопии в коре обнаружено значительное число нейронов с признаками апоптоза на разных стадиях

развития этого процесса. В глиальных клетках апоптотические изменения наблюдались преимущественно в олигодендроцитах как в коре, так и в белом веществе мозга. **Заключение.** Обнаруженная экспрессия caspase-3 в глиоцитах коры и белого вещества эпилептических очагов свидетельствует об активном участии глии в патогенезе эпилепсии. С помощью электронной микроскопии нами установлено, что основную часть апоптотически гибнущих клеток глии составляют олигодендроглиоциты, что в частности объясняет известный феномен повреждения миелина в эпилептических очагах. Факт электронно-микроскопического обнаружения большого числа апоптотически измененных нейронов в биоптатах коры при незначительной экспрессии в них caspase-3 может свидетельствовать об иной природе возникновения нейронального апоптоза. Таким образом, глио-нейрональный апоптоз при фармакорезистентной эпилепсии имеет значительное проявление, что влияет на прогрессирование заболевания, создавая условия для развития эпилептического статуса и когнитивных расстройств. Дальнейшее изучение этого вопроса открывает перспективы новой терапевтической стратегии в лечении эпилепсии.

**Ключевые слова:** эпилепсия, caspase-3, апоптоз, нейроны, глия, иммуногистохимия, ультраструктура.

*Для цитирования:* Трансляционная медицина. 2017; 4 (6): 22–33.

## APOPTOSIS OF BRAIN CELLS IN EPILEPTIC FOCUS AT PHARMACORESISTANT TEMPORAL LOBE EPILEPSY

Sokolova T.V.<sup>1</sup>, Zabrodskaya Y.M.<sup>1,3</sup>, Paramonova N.M.<sup>2,3</sup>,  
Dobrogorskaya L.N.<sup>1</sup>, Kuralbaev A. K.<sup>1</sup>, Kasumov V.R.<sup>1,4</sup>,  
Sitovskaya D.A.<sup>1,4</sup>

**Corresponding author:**  
Tatyana V. Sokolova  
Polenov Neurosurgical Institute  
Mayakovskaya str. 12,  
Saint Petersburg, Russia, 191014  
E-mail: igh-lab@rambler.ru

<sup>1</sup> Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery,  
branch of Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg,  
Russia

<sup>2</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry  
of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Military Medical Academy named after S.M.Kirov of the Ministry  
of defence of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the ministry  
of healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

Received 17 October 2017;  
accepted 05 February 2018.

### Abstract

**Relevance.** Search of the causes of epilepsy and development of new methods of its correction is the most important problem of modern neurology. Studies in recent years focus on examining the role of neuronal apoptosis in epilepsy, the question of the death of glial cells remains poorly understood. However, it is the interaction of neurons with glia that modulates physiological brain function and underlies many neurological diseases, indicating the importance of comprehensive study of the morphological and functional status of these cells in epilepsy. **Purpose.** To assess the significance of apoptotic death of neurons and glia in the pathogenesis of pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy by the expression of caspase-3 in brain cells and ultrastructural manifestations. **Materials and methods.** The objects of the study are the samples of the cortex and white matter of the brain in the area of epileptic foci from 20 patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. The material for the comparison group obtained at autopsy from 6 patients without epilepsy. Performed studies were immunohistochemical reactions with antibodies to caspase-3 and ultrastructural biopsy analyses. **Results.** In every case (100%) patients with E revealed the expression of caspase-3 in gliocytes with predominant localization in the cortex of the temporal lobe. The expression of caspase-3 in neurons has been detected in 20% of observations in single cells. In the comparison group, the expression of caspase-3 was observed only sporadically in a cortical gliocytes. Using electron microscopy we identified a large number of neurons in the cortex with signs of apoptosis at different stages of this process' development. Apoptotic changes in glial cells were predominantly observed in oligodendrocytes both in the cortex and white matter of the brain. **Conclusion.** Detected expression of caspase-3 in gliocytes of the cortex and white matter of epileptic foci attests to the active participation of glia in the pathogenesis of epilepsy. By electron microscopy we found that the majority of apoptotically dying glial cells are oligodendrocytes, that in particular explains the known phenomenon of myelin damage in epileptic foci. As a fact, electron microscopic detection of a large number of apoptosis neurons in biopsies of the cortex with low-level expression of caspase-3 in them may indicate a different nature of neuronal apoptosis. Thus, glio-neuronal apoptosis in pharmaco-resistant epilepsy has a significant manifestation, and this affects the progression of the disease, creating conditions for the development of status epilepticus and cognitive disorders. Further study of this issue offers the prospect of new therapeutic strategies in the treatment of epilepsy.

**Key words:** Epilepsy, caspase-3, apoptosis, neurons, glia, immunohistochemistry, ultrastructure.

*For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2017; 4 (6): 22–33.*

Список сокращений:

ИГХ — иммуногистохимия

Э — эпилепсия

ЭЭГ — электроэнцефалограмма

Поиск причин возникновения эпилепсии и внедрение в практику новых эффективных методов её коррекции являются одними из важнейших задач современной неврологии [1, 2, 3]. На сегодняшний день существует большое количество противозепилептических средств, однако их длительный регулярный прием позволяет достичь ремиссии или уменьшения количества приступов только у 40–60% пациентов. Высокой остается и частота побочных эффектов и осложнений противозепилептической терапии — по данным разных авторов она составляет 30–50% [4]. Около 40% случаев составляют фармакорезистентные формы эпилепсии, которые отличаются быстрым прогрессированием заболевания, несмотря на проводимое консервативное противосудорожное лечение, что оказывает серьезное влияние на качество жизни больных [5]. Хирургическое вмешательство приводит к положительному результату только в 60% случаев [6], в 20% — приносит лишь незначительное улучшение состояния, а 20% больных демонстрируют отсутствие эффекта от операции [7]. Эти данные подтверждают важность поиска новых патогенетических механизмов эпилепсии [8]. В последние годы большое внимание уделяется изучению роли апоптоза нейронов в патогенезе эпилепсии и разработке нейропротекторных терапевтических препаратов. Многочисленные исследования подтверждают активный процесс гибели нейронов головного мозга при височной эпилепсии. Утрата тормозных или возбуждающих нейронов вызывает дисбаланс между системой возбуждения и торможения в головном мозге, что может оказывать прямой проэпилептогенный эффект [9]. Однако из-за тесного взаимодействия нейронального и глиального компонентов головного мозга, изучение механизмов функционирования нейронов при эпилепсии не может быть полным без изучения механизмов функционирования глии [10]. Считается, что реактивный глиоз и воспаление, сопровождающие повреждения нейронов, способствуют возникновению очагов гипервозбудимости [3]. Исследования последних лет подтверждают нарушения функций астроцитов при эпилепсии, и ученые склоняются к мнению, что именно астроциты могут играть центральную роль в патогенезе эпилепсии. По данным других исследователей, возникновение эпилептических припадков может быть связано с повреждением миелиновой оболочки аксона, что напрямую влияет на выживаемость нейронов [11].

В связи с этим глиальный компонент рассматривают в качестве перспективной новой мишени для альтернативных противозепилептических препаратов [12, 13]. Отдельные исследователи отмечают важность изучения апоптоза глиальных клеток при эпилепсии [14, 15], однако на сегодняшний день основное внимание приковано к механизмам гибели нейронов [3, 16].

Активация или ингибция апоптоза обусловлена взаимодействием регуляторных про- и антиапоптотических белков в клетке. Одними из наиболее важных проапоптотических факторов, регулирующих пути клеточной гибели, являются каспазы — ферменты семейства цистеиновых протеаз, расщепляющие пептидные связи по карбоксильному остатку аспарагиновой кислоты. Caspase-3 относится к эффекторным каспазам, она активирует эндонуклеазу CAD (Caspase-activated DNase), вызывающую разрывы ДНК в межнуклеосомных участках, что и приводит непосредственно к деструкции и гибели клетки [17].

### Цель работы

Оценить значение апоптотической гибели нейронов и глии в патогенезе фармакорезистентной височной эпилепсии по наличию экспрессии caspase-3 в клетках головного мозга и ультраструктурным проявлениям.

### Материалы и методы

Изучен клинический материал 20 пациентов с фармакорезистентной эпилепсией (средний возраст  $32,3 \pm 8,3$  лет), прооперированных в РНХИ им.проф.А.Л.Поленова в период с 2007 по 2016 г. Прехирургический этап диагностики проводился согласно алгоритму стандартного диагностического комплекса обследования пациентов с фармакорезистентной эпилепсией, включающего клиническое наблюдение, изучение неврологического, нейропсихологического и психического статуса, электрофизиологические (скальповая электроэнцефалограмма (ЭЭГ), видео ЭЭГ-мониторинг, инвазивный ЭЭГ-мониторинг; интраоперационно — электрокортикография, электросубкортикография) и нейровизуализационные (компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), ПЭТ/КТ с  $^{18}\text{F}$ ДФГ (фтордезоксиглюкоза)) методы диагностики. Тип эпилептических приступов устанавливался в соответствии с Международной классификацией Э и эпилептических синдромов (ILAE, 1989), преобладали пациенты с комплексными парциальными приступами с вторичной генерализацией, простые парциальные встречались намного реже. МРТ-исследование

проведено на высокопольном (1,5Т) и сверхвысокопольном томографе (3Т), диагностика выполнялась в соответствии со специальными протоколами исследования при эпилепсии у больных были выявлены диффузная атрофия полушарий головного мозга преимущественно в лобных и височных долях, рубцовые (глиозные) и кистозно-глиозные изменения головного мозга, склероз гиппокампа. Больным выполнены передневисочные резекции, резекции корковых эпилептических очагов под контролем электрокортикографии. Материал для группы сравнения (участки коры головного мозга и подлежащего белого вещества височной доли) был получен при аутопсиях в первые 6 часов после смерти от 6 пациентов с сердечной и сосудистой патологией, не имеющие в анамнезе эпилепсии. Участки коры и белого вещества височной доли, полученные интраоперационно, послужили материалом для иммуногистохимического исследования (ИГХ) экспрессии белка caspase-3 и электронно-микроскопического изучения.

**Гистологическое исследование.** Биоптаты фиксировали 10% забуференным нейтральным формалином, обезвоживали стандартным способом и заливали в парафин. Парафиновые срезы 5–7 мкм толщиной окрашивали гематоксилином и эозином, по Нисслию и по Шпильмейеру.

**Иммуногистохимическое исследование.** ИГХ реакции выполнялись на парафиновых срезах по стандартному протоколу, с демаскировкой антигена в водяной бане. Для выявления клеток, вступивших в апоптоз использовались первичные антитела к активной форме caspase-3 (Abcam) в разведении 1:700 и полимерная система детекции EnVision (Dako). Для визуализации антигена использовался раствор диаминобензидина (ДАБ) фирмы Dako. Положительная ИГХ-реакция проявлялась в виде коричневого ядерного окрашивания, оценка результата реакции проводилась путем подсчета количества окрашенных ядер (%) на 100 клеток в 10 полях зрения в каждом случае.

**Статистическая обработка** полученных результатов проводилась с помощью программы «Microsoft Office Excel 2010» с вычислением для количественных данных среднего арифметического (M) и ошибки среднего (m). Сравнимые со-

вокупности имели нормальное распределение, для оценки значимости различия показателей использовался t-критерий Стьюдента [18]. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Электронная микроскопия.** Биоптаты фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом, разведенным 0,1M какодилатным буфером (pH 7,2–7,4). Дофиксацию проводили 1%-ной четырехокисью осмия, затем дегидратировали растворами этилового спирта восходящей концентрации и ацетоном. Пропитывали кусочки в смеси эпоксидных смол — аралдитов, затем полимеризовали при температуре 37°C и 60°C. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-III, Швеция. Просмотр и фотосъемку проводили с помощью электронного микроскопа FEITecnaï G<sup>2</sup>Spirit BioTWIN (Нидерланды), предоставленного Центром коллективного пользования ИЭФБ им. И.М. Сеченова Санкт-Петербурга.

### Результаты исследования

При гистологическом исследовании у больных с фармакорезистентной височной эпилепсией во всех исследованных случаях в области эпилептических очагов в коре имели место очаги выпадения и реактивно-деструктивные изменения нейронов. Наблюдалась картина гидропической дистрофии с хроматолизом и вакуолизацией цитоплазмы нейронов, чередующиеся с гиперхромными сморщенными ишемически измененными клетками. Данные изменения сопровождалось умеренно выраженным сателлитозом и нейронофагией, слабо выраженным глиозом. В белом веществе имело место проявление эпилептической лейкоэнцефалопатии, сопровождающееся демиелинизацией, глиозом, дегенеративными микрокистами, ангиопатией микрососудистого русла (рис. 1).

При ИГХ во всех 20 клинических случаях у больных с эпилепсией была обнаружена положительная ядерная экспрессия caspase-3 в отдельных глиальных клетках коры и белого вещества головного мозга. В коре распределение глиоцитов с положительной ядерной экспрессией антигена носило диффузный, преимущественно равномерный характер во всех слоях коры, интенсивность ядерного окрашивания высокая (рис. 2а). Среднее относительное количество caspase-3-позитивных глиальных клеток (%) составило  $25,05 \pm 0,70$ .

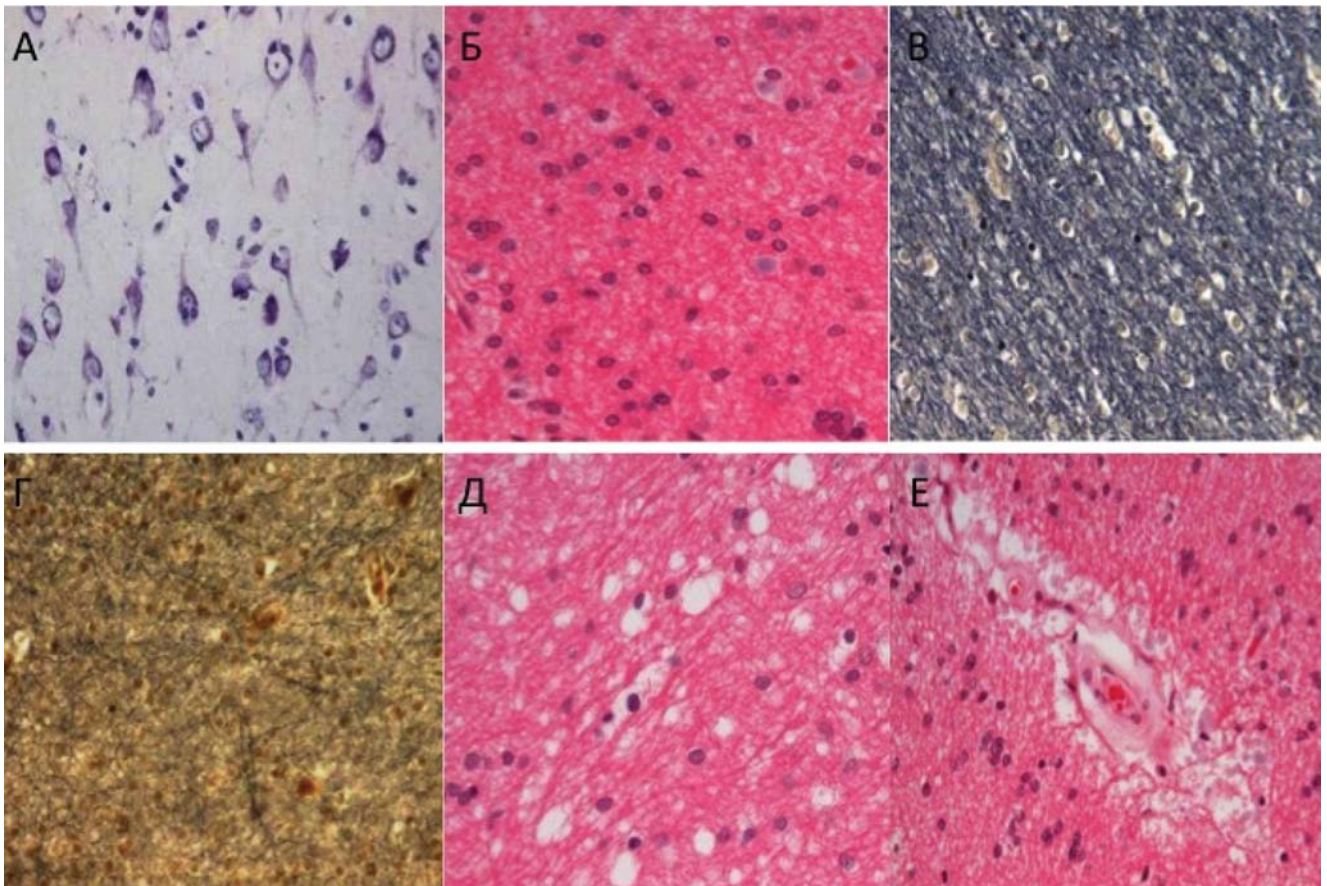
**Таблица 1.** Среднее количество caspase-3-позитивных глиальных клеток (M, %) в коре и белом веществе в группе больных с эпилепсией и в группе сравнения (без эпилепсии),  $p < 0,05$ .

	Группа больных с эпилепсией (n = 20)		Группа сравнения (n = 6)	
	Кора	Белое вещество	Кора	Белое вещество
Caspase-3 (M ± m)	25,05 ± 0,70	5,94 ± 0,47	0,33 ± 0,23	0

n — количество случаев, m — стандартная ошибка

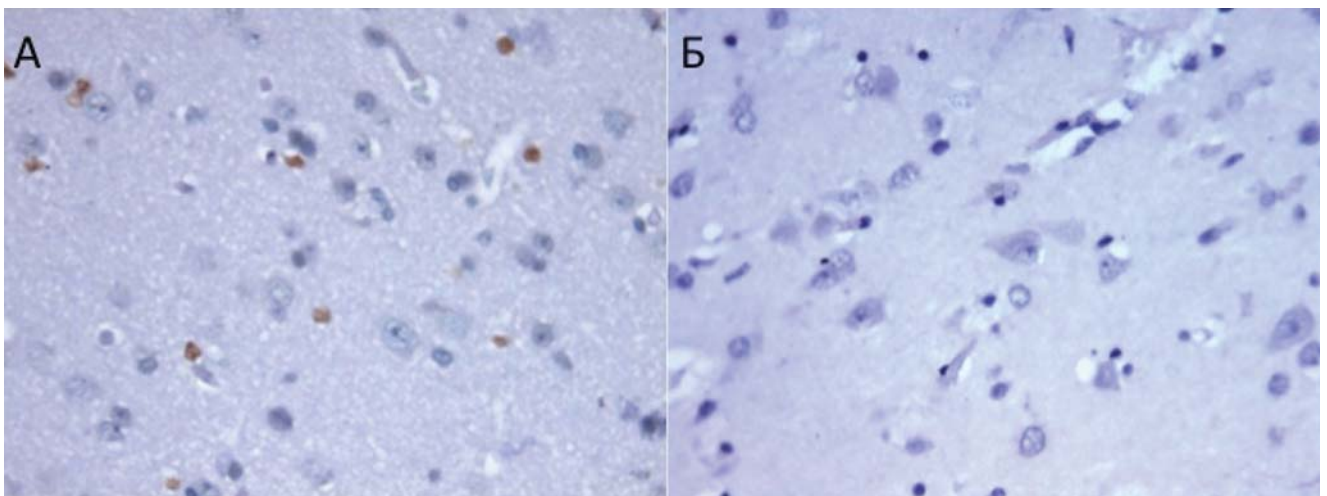


**Рисунок 1. Гистологические изменения височной доли головного мозга в проекции эпилептического очага**



а — в коре нейроны с набухшими отростками, очаговым «спеканием» субстанции Ниссля, хроматолизом; б — клеточный глиоз белого вещества; в — белое вещество богатое миелином в группе сравнения (интенсивная окраска на миелин); г — демиелинизация белого вещества у больного с Э; д — микрокистозная дегенерация; е — склерозированные сосуды, периваскулярное скопление амилоидных телец. а — окраска по Нисслю; б, д, е — окраска гематоксилином и эозином; в, г — окраска по Шпильмейеру. Увеличение 400.

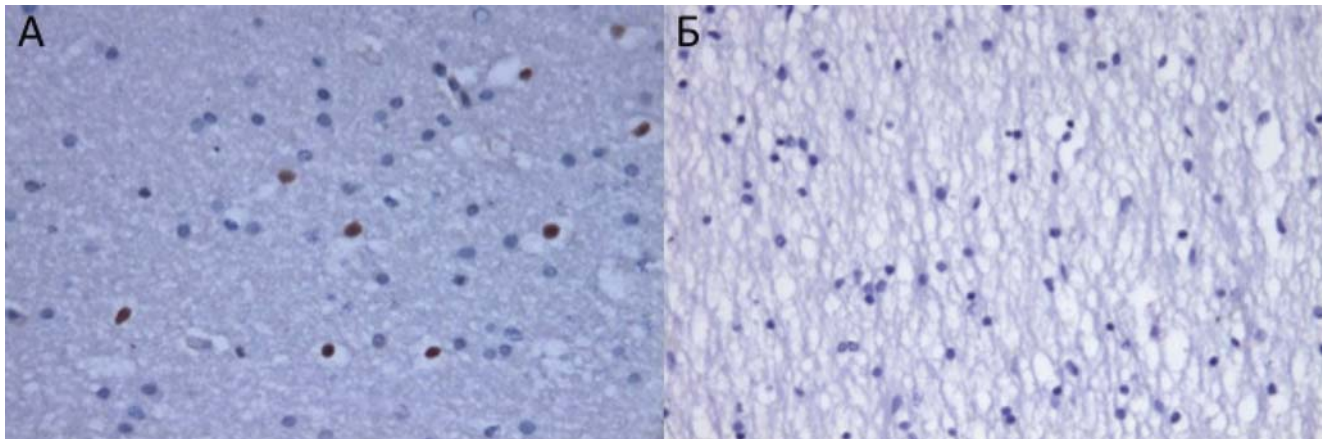
**Рисунок 2. Иммуногистохимическое выявление caspase-3 в клетках коры височной доли головного мозга**



а — положительная экспрессия белка caspase-3 в глиоцитах в проекции эпилептического очага (коричневое окрашивание ядер); б — отсутствие экспрессии caspase-3 в клетках головного мозга пациентов группы сравнения (без эпилепсии). Иммуногистохимическая реакция. Увеличение 400.



**Рисунок. 3. Иммуногистохимическое выявление caspase-3 в клетках белого вещества височной доли головного мозга**



а — положительная экспрессия белка caspase-3 в глиоцитах проекции эпилептического очага у больных с эпилепсией (коричневое окрашивание ядер); б — отсутствие экспрессии caspase-3 в клетках белого вещества пациентов в группе сравнения (без эпилепсии). Иммуногистохимическая реакция. Увеличение 400.

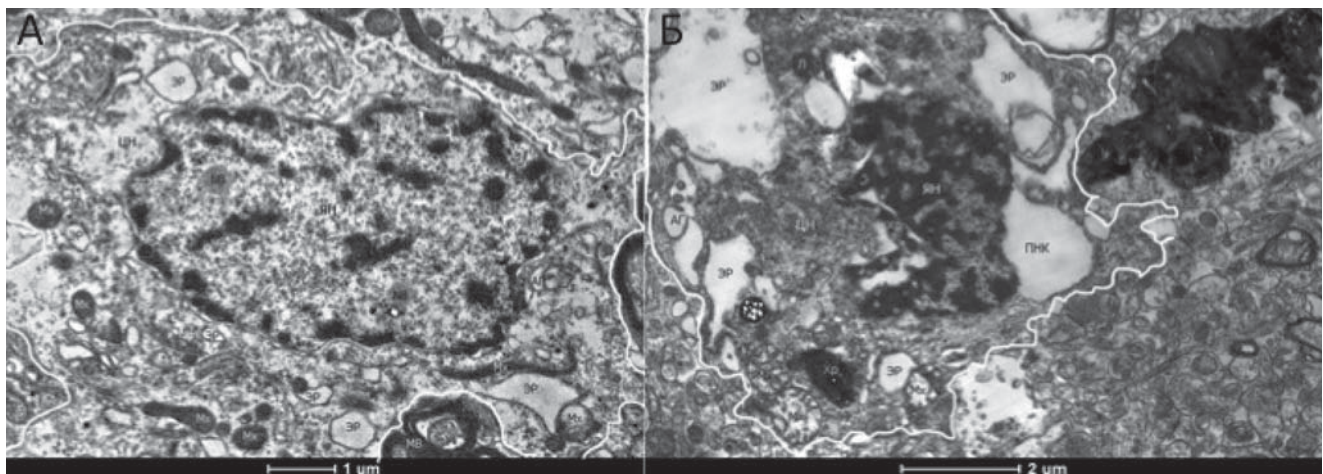
В 4 (20%) случаях наблюдали экспрессию caspase-3 в единичных ядрах корковых нейронов. В белом веществе глиоциты с положительной ядерной экспрессией антигена также распределялись диффузно, преимущественно равномерно (рис. 3а). Интенсивность окрашивания была несколько ниже, чем в глиальных клетках коры. Среднее относительное количество окрашенных ядер (%) составило  $5,96 \pm 0,47$  (рис. 6).

В группе сравнения экспрессия caspase-3 полностью отсутствовала во всех случаях в белом веществе (рис. 3б). В коре в 4 (66,7%) случаях экспрес-

сия caspase-3 отсутствовала (рис. 2б), в 2 (33,3%) случаях наблюдали единичные окрашенные ядра глиоцитов, их среднее относительное количество составило  $0,33 \pm 0,23$  (рис. 6). Использование t-критерия Стьюдента показало, что различия между количеством окрашенных ядер в коре и в белом веществе в группе больных с эпилепсией и в группе сравнения соответственно статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

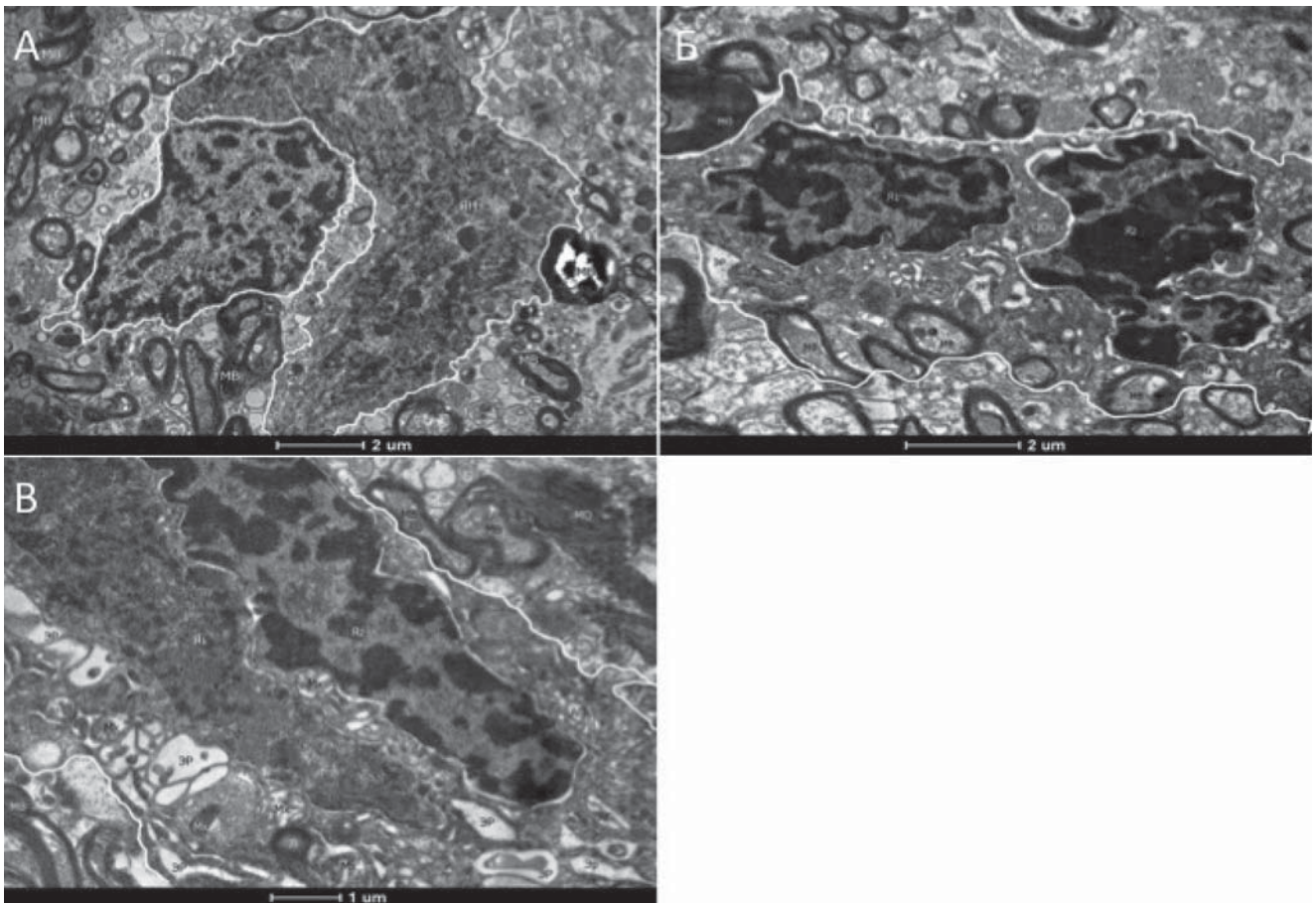
Таким образом, в биоптатах из эпилептических очагов больных с височной эпилепсией во всех слу-

**Рисунок. 4. Ультраструктурное исследование. Нейрон коры головного мозга в состоянии апоптоза на этапе фрагментации ДНК**



а — нормохромный нейрон с небольшим количеством глыбок гетерохроматина в ядре (ЯН). В цитоплазме нейрона (ЦН) каналцы эндоплазматического ретикулума (ЭР) умеренно отечны. Большинство митохондрий (Мх) мелкие, удлинённые, с темным матриксом. Электроннограмма. Увеличение 9900. б — гипервакюолизованный нейрон с ядром (ЯН) неправильной формы, имеющим множество гетерохроматиновых глыбок в кариоплазме. Фрагменты хроматина (Хр) и в цитоплазме в виде отдельных скоплений. Перинуклеарное пространство местами расширено в виде оптически пустых перинуклеарных «карманов» (ПНК). Канальцы эндоплазматического ретикулума (ЭР) и Аппарата Гольджи (АГ) резко растянуты. Митохондрии (Мх) локализируются вблизи цитоплазматической мембраны. Электроннограмма. Увеличение 8200.

**Рисунок 5. Ультраструктурное исследование. Апоптоз клеток белого вещества субкортикальной зоны с эктопическими нейронами в эпилептическом очаге височной доли головного мозга**



а — апоптотически измененные нейрон и олигодендроцит контактируют на большом протяжении своих цитоплазматических мембран. Ядро нейрона (ЯН), имеет одновременно черты апоптоза и некроза — дегенеративно измененное и утратившее кариолемму, не различимо на фоне такой же по плотности гиперхромной цитоплазмы. Гетерохроматин глиальной клетки равномерно распределен по кариоплазме и еще ограничен ядерной оболочкой (ЯОц). Очень тонкий слой цитоплазмы содержит единичные органеллы. Электроннограмма. Увеличение 6000. б — среди миелиновых волокон белого вещества гиперхромный олигодендроцит с двумя фрагментами ядра (Я1 и Я2), находящегося в процессе формирования апоптотических телец. Осмиофильная вакуолизованная цитоплазма (ЦОц) свидетельствует о необратимости деструктивных процессов, затрагивающих всю клетку. Электроннограмма. Увеличение 8200. в — фрагмент двуядерного нейрона из области эпилептического очага, у которого ядра (Я1 и Я2) различаются по степени выраженности деструктивных превращений, а цитоплазма пронизана растянутыми цистернами эндоплазматического ретикулума (ЭР) и гипертрофированных комплексов Гольджи (АГ), слившихся в многочисленные вакуоли. Электроннограмма. Увеличение 9900.

чаях (100%) выявлена ядерная экспрессия caspase-3 в глиальных клетках с преимущественной локализацией в коре височной доли; экспрессия caspase-3 в нейронах обнаружена в единичных клетках в 20% наблюдений.

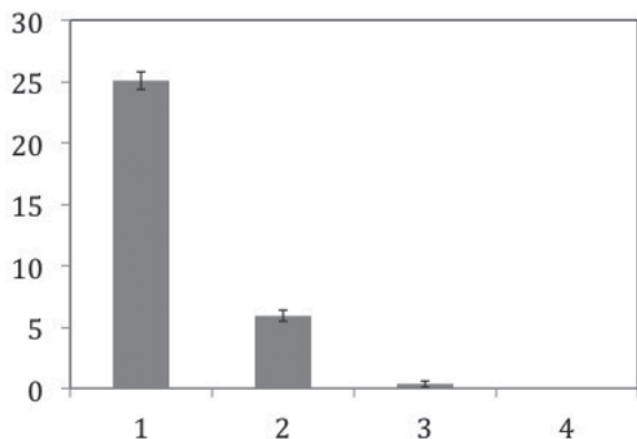
При электронно-микроскопическом исследовании биоптатов коры головного мозга больных с височной эпилепсией у значительного числа нейронов обнаруживали морфологические признаки апоптоза на разных этапах развития этого процесса. Наблюдали различные стадии апоптоза: от фрагментации ДНК с распространением гетерохро-

матинных глыбок по всей кариоплазме до распада ядра на фоне необратимых дегенеративных изменений в цитоплазме. Отмечали появление перинуклеарных карманов, резко расширенные каналы эндоплазматического ретикулума и цистерны аппарата Гольджи, нередко сливающихся в огромные вакуоли (рис. 4).

Среди глиальных клеток коры апоптотически измененными были большинство олигодендроцитов. В белом веществе мозга практически все олигодендроциты имели признаки апоптотической



**Рисунок 6. Средние относительные значения (М) количества caspase-3-положительных глиальных клеток в ткани головного мозга височной доли в группе больных с эпилепсией и в группе сравнения (без эпилепсии) с указанием ошибки среднего (m),  $p < 0,05$**



1 — в коре головного мозга в группе больных с эпилепсией, 2 — в белом веществе головного мозга в группе больных с эпилепсией, 3 — в коре головного мозга в группе сравнения, 4 — в белом веществе головного мозга в группе сравнения.

деструкции. Отмечали неправильную, угловатую форму ядер, кариоплазма которых была заполнена множеством плотных разновеликих глыбок гетерохроматина (рис. 5а). Нередко цитоплазма нейритов была гипертрофирована, с уплотненным матриксом, с резко вакуолизированными органеллами. Встречали двуядерные олигодендроциты, возможно, как результат апоптотического распада ядра (рис. 5б). На рисунке 5в представлен фрагмент двуядерного гиперхромного нейрона из области эпилептического очага с необратимыми дегенеративными изменениями обоих ядер, различающимися по степени выраженности деструктивных превращений. Одно из ядер (Я1) имеет вид гомогенной конденсации кариоплазмы, присущей скорее для некротической гибели клетки. Второе (Я2) ядро содержит глыбки гетерохроматина, что является морфологическим признаком фрагментации ДНК, характерного для начального этапа апоптоза. Цитоплазматический матрикс резко уплотнен, осмиофилен, в островках между слившимися вакуолями отечных канальцев эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи обнаруживаются деструктивно измененные митохондрии (рис. 5в). Наблюдали также отдельные апоптотически измененные астроциты, но такие находки были единичными.

### Обсуждение

Предполагают, что глия играет двойственную роль в развитии эпилепсии: с одной стороны она

вносит значительный вклад в патофизиологию эпилепсии [19], с другой, выполняет защитную функцию в эпилептических очагах при фармакорезистентных формах заболевания [20]. Глиоз является неотъемлемой частью патоморфологических изменений, которые обнаруживают в эпилептических очагах, традиционно считая, что пролиферация глии является патологическим субстратом эпилепсии [22]. В последнее время появились клинкоморфологические исследования, доказывающие, что астроцитарный глиоз при фармакорезистентной эпилепсии представляет собой не патологическую, а приспособительную (защитную) реакцию: чем интенсивнее пролиферация астроцитов, тем мягче протекает заболевание [20]. Эти данные подтверждают важное значение глии в патогенезе эпилепсии.

При изучении роли глии больше внимания уделяется функциональному состоянию астроцитов, роль олигодендроцитов при эпилепсии практически не изучена. Установлено, что астроциты способны модулировать активность нейронов и определять как нормальное функционирование нервных клеток, так и инициацию и прогрессию множества патологических процессов за счет способности выделять огромное количество биологически активных веществ от нейромедиаторов до факторов роста [21]. Мембрана астроцитов содержит практически весь спектр ионотропных глутаматных рецепторов, насыщение которых вызывает в клетках индукцию NO-синтазы и глиального кислого фибриллярного белка, что защищает нейроны от перевозбуждения и гибели [23]. Кроме того, нейропротективная роль глии связана с образованием глиальными элементами нейротрофических факторов [24]. Однако массивное образование NO в астроцитах при длительно предъявляемых эпилептогенных стимулах оказывает токсическое влияние на ближайшее микроокружение [25]. Существует точка зрения, что именно астроциты, а не нейроны играют центральную роль в патогенезе эпилепсии [12]. Астроциты соединены щелевыми контактами и содержат большое количество ионных каналов, что позволяет им перераспределять повышенную концентрацию калия при увеличении нейрональной активности. Исследования образцов ткани от больных с фармакорезистентной височной эпилепсией и в экспериментальных моделях выявили нарушения функции астроцитарных ионных каналов, транспортера глутамата и фермента глутаминсинтетазы [13]. При изучении гиппокампа больных с медиальной эпилепсией было обнаружено, что астроциты приобретают нетипичный фенотип и утрачивают сцепление друг с другом. Данные изменения предшествуют апоптотической гибели нейронов и развитию приступов, что по мнению Bedner P. et al. (2015) дает основания

предположить, что нарушение функции астроцитов играет ключевую роль в этиологии, и медиальную височную эпилепсию можно рассматривать как глиальное, а не нейрональное расстройство [12].

Исследования астроцитарной глии при эпилепсии показали также изменения экспрессии основных белков-модуляторов апоптоза: как антиапоптотических (Bcl-2 и др.), так и проапоптотических (caspase-3 и др.) [14, 15]. По данным некоторых исследователей и в астроцитах, и в микроглии в эксперименте были выявлены разные типы каспаз [14, 16]. Доказано, что эпилептические приступы вызывают синтез caspase-3 в нейронах и астроцитах головного мозга. В работе Narkilahti S., et al. (2003) было обнаружено, что экспрессия caspase-3 повышается после эпилептического приступа, достигая максимума через 16-24 часа. Активация caspase-3 с отщеплением прокаспазы-3 до активных фрагментов происходила через 2-7 дней после приступа в гиппокампе и экстрагиппокампальной височной доле [14]. Пик активности исполнительной caspase-3 приходится на 7-й день после индукции эпилептического припадка [26, 27]. Narkilahti S., et al. (2003) обнаружили, что активная форма caspase-3 выявлялась в астроцитах, а не в нейронах крыс после эпилептического приступа [14]. Однако большинство исследователей отмечают и в эксперименте [27], и в клинических случаях височной Э у человека [16, 29] экспрессию caspase-3 преимущественно в нейронах, а не в астроцитах.

Предполагают, что апоптотические изменения в астроцитах активируются во время и после приступ-индуцированного нейронального апоптоза, и могут вносить свой вклад в гибель нейронов и эпилептогенный процесс [16].

По данным некоторых исследователей, возникновение эпилепсии связано с повреждением миелиновой оболочки [11, 28, 30]. Доказано, что эпилептическое поражение ткани головного мозга сопровождается демиелинизацией аксонов белого вещества [11]. Массовая демиелинизация волокон очага эпилептиформной активности и прилегающих к нему проводящих путей вызывает поперечную нейротрансмиссию и генерализацию нервных импульсов с одновременным вовлечением в эпилептогенез различных областей головного мозга [25]. Основная функция олигодендроцитов заключается в формировании миелиновых оболочек аксонов. В экспериментальных исследованиях обнаружено, что при эпилепсии снижается количество зрелых олигодендроцитов, а также количество основного белка миелина по сравнению с контрольной группой [28]. Обнаружено, что в гиппокампе крыс утрата миелина и олигодендроцитов начинается во время острой фазы, и прогрессирует в латентной и

хронической фазах эпилептогенеза [31]. Повреждение миелина в эксперименте у мышей через 9-12 недель вызывало возникновение судорожных приступов [30]. Выживаемость олигодендроцитов зависит от множества факторов, в том числе и от состояния астроцитов, которые являются поставщиками секретируемых факторов роста, важных как для нейрональной, так и для глиальной пролиферации и выживания. Например, CNTF (ciliary neurotrophic factor) помимо важного значения для активации астроцитов, влияет на выживание и созревание клеток предшественников олигодендроцитов, защищает олигодендроциты от апоптоза и уменьшает разрушение миелина при демиелинизирующих патологических состояниях [32]. Это еще раз подтверждает тесное взаимодействие всех клеточных элементов головного мозга и необходимость их комплексного изучения при патологических процессах, в частности при эпилепсии.

### Заключение

Обнаруженная экспрессия caspase-3 в глиоцитах коры и белого вещества эпилептических очагов, свидетельствует об активном участии глии в патогенезе эпилепсии. При электронной микроскопии нами установлено, что основную часть апоптотически гибнущих клеток глии составляют олигодендроглиоциты, что в частности объясняет известный феномен повреждения миелина в эпилептических очагах. Факт электронно-микроскопического обнаружения большого числа апоптотически измененных нейронов в биоптатах коры при незначительной экспрессии в них caspase-3 может свидетельствовать об иной природе возникновения нейронального апоптоза. Таким образом, глио-нейрональный апоптоз при фармакорезистентной эпилепсии имеет значительное проявление, что влияет на прогрессирование заболевания, создавая условия для развития эпилептического статуса и когнитивных расстройств. Дальнейшее изучение этого вопроса открывает перспективы новой терапевтической стратегии в лечении эпилепсии.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Список литературы / References

1. Khachatryan VA, Bersnev VP, Shershever AS et al. Diagnostics and treatment of progredient forms of epilepsy. Desyatka, 2008. p. 264. In Russian [Хачатрян В.А., Берснев В. П., Шершевер А. С. и др. Диагностика и лечение прогрессирующих форм эпилепсии. СПб.: Десятка, 2008. с. 264].

2. Bergin P, Sadleir L, Legros B et. al. An International Pilot Study of an Internet-Based Platform to facilitate clinical research in epilepsy. *Epilepsia*. 2012; 53: 1829–1835.
3. Henshall DC, Engel T. Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013; 7: Article 110.
4. Sokolova TV, Zabrodskaya YuM, Bazhanova ED et al. The role of glionneuronal apoptosis in the pathogenesis of pharmacoresistant epilepsy. *Neurosurgery and neurology of childhood*. 2015; 4 (46): 71–84. In Russian [Соколова Т.В., Забродская Ю.М., Бажанова Е.Д. и др. Роль глионейронального апоптоза в патогенезе фармакорезистентной эпилепсии. *Нейрохирургия и неврология детского возраста*. 2015; 4 (46): 71–84].
5. Simon D Shorvon. *Handbook of Epilepsy Treatment*. Wiley-Blackwell. 2010. 300 p.
6. Ryabukha NP, Bersnev VP. Multifocal epilepsy (etiopathogenesis, clinic, diagnosis and surgical treatment). SPb.: RNHI, 2009. p. 216. In Russian [Рябуха Н.П., Берснев В.П. Многоочаговая эпилепсия (этиопатогенез, клиника, диагностика и хирургическое лечение). СПб.: РНХИ, 2009. с. 216].
7. Hader WJ, Tellez-Zenteno J, Metcalfe A et al. Complications of epilepsy surgery — asystematic review of focal surgical resections and invasive EEG monitoring. *Epilepsia*. 2013; 54: 840–847.
8. Kasumov VR, Bersnev VP, Stepanova TS. The method of extracerebral electrical stimulation in the system of surgical treatment of patients with pharmacoresistant epilepsy. *Neurological herb of Bechterev VM*. 2009; XLI (3): 41–44. In Russian [Касумов, В.Р., Берснев В.П., Степанова Т.С. и др. Метод внемозговой электростимуляции в системе хирургического лечения больных с фармакорезистентной эпилепсией. *Неврол. вестн. им. В.М. Бехтерева*. 2009, XLI(3): 41–44].
9. Sloviter RS. Progress on the issue of excitotoxic injury modification vs. real neuroprotection; implications for post-traumatic epilepsy. *Neuropharmacology*. 2011; 61: 1048–1050.
10. Crunelli V, Carmignoto G, Steinhдuser C. Novel astrocyte targets: new avenues for the therapeutic treatment of epilepsy. *Neuroscientist*. 2015; 21 (1): 62–83.
11. Gaykova ON, Paramonova NM, Suvorov AV. The value of white matter damage in the brain in the pathogenesis of locally caused epilepsy. *Russian Neurosurgical Journal*. 2011; 3 (1): 19–24. In Russian [Гайкова О.Н., Парамонова Н.М., Суворов А.В. Значение повреждения белого вещества головного мозга в патогенезе локально обусловленной эпилепсии. *Рос. Нейрохирург. журн.* 2011; 3 (1): 19–24].
12. Bedner P, Dupper A, Huttman K, et. al. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2015; 136: 1208–1222.
13. Coulter DA, Steinhauser C. Role of Astrocytes in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015; 5 (3): a022434
14. Narkilahti S, Pirttila TJ, Lukasiuk K et. al. Expression and activation of caspase 3 following status epilepticus in the rat. *Eur J Neurosci*. 2003; 18 (6): 1486–1496.
15. Noebels J, Avoli M, Rogawski M et. al. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. Oxford University Press. 2012. 1264 p.
16. Engel T, Henshall D.C. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2009; 1 (2): 97–115.
17. Veresov VG. *Structural biology of apoptosis*. Minsk: Belarus. Nauka, 2008; p.200. In Russian [Вересов В.Г. Структурная биология апоптоза. Минск: Белорус. Наука, 2008. с. 398].
18. Yunkerov VI, Grigoriev SG. *Mathematical-statistical processing of medical research data*. SPb: VMedA, 2005. p. 292. In Russian [Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. Санкт-Петербург: ВМедА, 2005. с. 292].
19. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S et al. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences*. 2013; 36 (3): 174–84.
20. Medvedev YuV, Bersnev VP, Kasumov VR, et al. Effect of the degree of severity of brain gliosis on the severity of the course of the disease in patients with medically-resistant forms of locally caused epilepsy. *Neurosurgery*. 2010; 4: 65–90. In Russian [Медведев Ю.А., Берснев В.П., Касумов В.Р. и др. Влияние степени выраженности глиоза мозга на тяжесть течения заболевания у больных с медикаментозно-резистентными формами локально обусловленной эпилепсии. *Нейрохирургия*. 2010; 4: 65–90].
21. Crunelli V, Carmignoto G, Steinhдuser C. Novel astrocyte targets: new avenues for the therapeutic treatment of epilepsy. *Neuroscientist*. 2015; 21 (1): 62–83.
22. Novozhilova AP, Gaikova ON. Cell gliosis of a white substance of the human brain and its significance in the pathogenesis of focal epilepsy. *Morphology*. 2001; 2: 20–24. In Russian [Новожилова А.П., Гайкова О.Н. Клеточный глиоз белого вещества большого мозга человека и его значение в патогенезе очаговой эпилепсии. *Морфология*. 2001; 2: 20–24].
23. Kalinichenko SG, Dudina YuV, Duzen IV et al. Induction of NO synthase and glial acidic fibrillar protein in astrocytes of the temporal cortex of rats with audiogenic epileptiform response. *Morphology*. 2004; 125 (3): 68–73. In Russian [Калиниченко С.Г., Дудина Ю.В., Дюжен И.В. и др. Индукция NO-синтазы и глиального кислого фибриллярного белка в астроцитах височной коры крыс с аудиогенной эпилептиформной реакцией. *Морфология*. 2004; 125 (3): 68–73].
24. Manto M, Oulad ben Taib N, Luft AR. Modulation of excitability as an early changes leading to structural adaptation in the motor cortex. *J. Neurosci. Res*. 2006; 83: 177–180.
25. Dudina JV. *Symptomatic temporal lobe epilepsy*. Vladivostok, Reya, 2008; p.300. In Russian [Дудина Ю.В. Симптоматическая височная эпилепсия. Владивосток: Рея, 2008. с. 300].
26. Liou AKF., Clark RS, Henshall DC. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog. Neurobiol*. 2003; 69: 103–142.



27. Henshall DC, Simon R. Epilepsy and apoptosis pathways. *J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005; 25: 1557–1572.

28. 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; 20 (21): 4516–4524.

29. Henshall DC, Clark RS, Adelson PD et al. Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2000; 55: 250–257.

30. Lapato AS, Szu JI, Hasselmann JPC et al. Chronic demyelination-induced seizures. *Neuroscience*. 2017; 27 (346): 409–422.

31. Luo Y, Hu O, Zhang Q et al. Alterations in hippocampal myelin and oligodendrocyte precursor cells during epileptogenesis. *Brain Res*. 2015; 19 (1627): 154–64.

32. Кэрай Н, Lindsay S, Hosseinzadeh S et al. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Experimental Neurology*. 2016, 283: 541–549.

#### **Информация об авторах:**

Соколова Татьяна Владиславовна, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории патологической анатомии, РНХИ им. проф. А.Л. Поленова;

Забродская Юлия Михайловна, д.м.н., заведующий научно-исследовательской лабораторией патологической анатомии, РНХИ им. проф. А.Л. Поленова;

Парамонова Наталья Михайловна, научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрехимии, ФГБУН ИЭФБ им. И. М. Сеченова РАН, и научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИЦ ФГБВОУ ВО ВМедА им. С. М. Кирова МО РФ;

Доброгорская Любовь Николаевна, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории патологической анатомии, РНХИ им. проф. А.Л. Поленова;

Куралбаев Алмаз Куатович, аспирант отделения функциональной и реконструктивной нейрохирургии, РНХИ им. проф. А.Л. Поленова;

Касумов Вугар Рауфович, д.м.н., старший научный сотрудник отделения функциональной и реконструктивной нейрохирургии, РНХИ им. проф. А.Л. Поленова;

Ситовская Дарья Александровна, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории патологической анатомии, РНХИ им. проф. А.Л. Поленова;

#### **Author information:**

Tatyana V. Sokolova, researcher at laboratory of pathology, Polenov Neurosurgical Institute;

Yulia M. Zabrodskaya, PhD, MD, head of the laboratory of pathology, Polenov Neurosurgical Institute;

Natalya M. Paramonova, researcher at laboratory of molecular endocrinology and neurochemistry I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, researcher at laboratory of cell technology, Research Center S. M. Kirov Military Medical Academy;

Lyubov N. Dobrogorskaya, researcher at laboratory of pathology, Polenov Neurosurgical Institute;

Almaz K. Kuralbayev, graduate student at functional and reconstructive neurosurgery department of Polenov Neurosurgical Institute;

Vugar R. Kasumov, PhD, MD, senior researcher, Department of functional and reconstructive neurosurgery at Polenov Neurosurgical Institute;

Darya A. Sitovskaya, researcher at laboratory of pathology, Polenov Neurosurgical Institute.