

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-  
квалификационной работы (диссертации)

**Роль аутоиммунного нейровоспаления в патогенезе  
фармакорезистентной эпилепсии у человека**

Литовченко Анастасия Владимировна

06.06.01 Биологические науки  
03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология

Научный руководитель  
д.б.н. Бажанова Елена Давыдовна

Санкт-Петербург  
2022

Общая характеристика работы  
**Актуальность темы исследования**

Каждый год фиксируется более 2 млн. новых случаев эпилепсии различной локализации. Российская Противоэпилептическая Лига (РПЭЛ) совместно с Международной Противоэпилептической Лигой (International League Against Epilepsy-ILAE) заключили, что на протяжении последних десятилетий не наблюдалось снижения доли фармакорезистентных форм эпилепсии, несмотря на появление новых противосудорожных лекарственных средств, отличающихся по механизму действия от классических противоэпилептических препаратов (ПЭП). Диагноз по МКБ10 «G40.2 Височно-долевая фокальная эпилепсия структурной этиологии с частыми полиморфными приступами, фармакорезистентное течение» ставится в случае отсутствия ответа на адекватную противоэпилептическую терапию двумя ПЭП в виде монотерапии или в комбинации [1]. Треть пациентов от общего числа страдающих эпилепсией приобретают фармакорезистентную форму этого заболевания, требующую хирургического лечения. Данный метод лечения приводит к положительному результату только в 60% случаев, из которых количество приступов уменьшается еще в 20%, а повторная манифестация заболевания наблюдается в 20% [2,3]. Невысокая эффективность проводимой терапии пациентов с фармакорезистентной эпилепсией (ФРЭ) свидетельствует о необходимости выявления этиологии лекарственной устойчивости и патогенетических механизмов эпилепсии.

В рамках данной работы исследовалась роль нейровоспаления в развитии ФРЭ и выявление аутоиммунной природы данного заболевания. Определение возможной молекулярной мишени, исходя из полученных данных, может привести к созданию новых препаратов для консервативной терапии ФРЭ.

## **Цели и задачи**

Цель исследования – изучение роли и молекулярных механизмов нейровоспаления и аутоиммунных реакций в патогенезе фармакорезистентной эпилепсии у человека.

## **Задачи**

1. Исследовать роль сигнальных путей, опосредующих нейровоспаление при эпилептогенезе (TNF- $\alpha$ , FAS, NF- $\kappa$ B);
2. Определить уровень апоптоза в височной коре и прилежащем белом веществе мозга (экспрессия c-caspase-3) в нейронах и клетках глии;
3. Изучить нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера и её влияние на системное воспаление;
4. Определить концентрацию нейротропных аутоантител (АТ) в сыворотке крови больных с фармакорезистентной эпилепсией;
5. Предложить возможную этиологию возникновения резистентности к фармакотерапии.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. В тканях височной доли головного мозга пациентов с фармакорезистентным течением эпилепсии протекают процессы нейровоспаления, оказывающие повреждающее воздействие на структуры гематоэнцефалического барьера (ГЭБ).
2. Нервные клетки височной доли, преимущественно глиоциты, гибнут по пути апоптоза как в коре, так и в белом веществе.
3. Развитие фармакорезистентности у пациентов с височной формой эпилепсии связано с аутоиммунными процессами.

## **Новизна**

1) Впервые проведено сравнение степени протекания молекулярных процессов в тканях головного мозга прооперированных пациентов с ФРЭ по сравнению с тканями страдающих соматическими заболеваниями пациентов, полученных интраоперационно; изученные молекулярные каскады сопоставлены с данными о системном воспалении; проанализировано влияние нарушения структуры ГЭБ на отсутствие ответа на проводимую фармакотерапию.

2) Анализ содержания нейротропных аутоантител позволяет оценить вовлеченность системного иммунного ответа в механизмы возникновения резистентности эпилепсии к современным противоэпилептическим препаратам.

## **Теоретические и практическое значение работы**

На основе анализа данных литературы и результатов собственного исследования установлено, что при фокальной ФРЭ в тканях височной доли интенсивно протекает процесс нейровоспаления, который влияет на прогрессирование эпилепсии [4]. Воспалительные факторы негативно влияют на нервные и глиальные клетки, и приводят к апоптозу, более существенно протекающему непосредственно в эпилептическом очаге, со снижением интенсивности этих процессов в перифокальной зоне. Выявленное нарушение структуры и проницаемости ГЭБ может создавать условия для развития и поддержания патологического состояния эпилептогенной зоны.

Дальнейшее изучение роли патологических процессов не только непосредственно в эпилептогенном очаге, но и в перифокальной зоне может помочь объяснить неэффективность хирургического лечения у значительной доли изучаемой группы пациентов и создать терапию, помогающую снизить степень травматизации оперативного

вмешательства. Коррекция проницаемости ГЭБ может помочь достичь контроля над припадками консервативными методами и не допускать формирования фармакорезистентности.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационного исследования были представлены в виде устных докладов и/или доложены в виде стендовых докладов на Конгрессе Федерации европейских биохимиков (The 45th FEBS Congress. Ljubljana, Slovenia, 2021), Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвящённая 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2020), Конференции Российского Нейрохимического общества RUSNEUROCHEM (Санкт-Петербург, 2022), XVI Всероссийском совещании с международным участием и IX школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2020),.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-015-00127 А.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 1 печатная работа в журнале, индексируемом в SCOPUS, 1 печатная работа в журнале, индексируемом в Web Of Science, 2 печатные работы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

### **Глава 1. Объект исследования.**

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных и наиболее инвалидизирующих хронических неврологических расстройств. Для

эпилепсии характерны повторяющиеся неспровоцированные припадки, которые могут быть фокальными или генерализованными по своей природе [5]. Височная форма фокальной эпилепсия является самой распространенной в популяции. Непосредственно эпилептогенный очаг расположен в височной доле головного мозга [6]. Приступы, как с сохранением, так и с потерей сознания длятся в среднем 30-60 секунд. Ранние исследования связывали развитие височной эпилепсии с повреждением гиппокампа и миндалина изолированно, но более поздние исследования показали широкое распространение кортикальной атрофии [7, 8].

Течение эпилепсии признают фармакорезистентным в случае невозможности достичь стойкой ремиссии приступов при применении двух хорошо переносимых, правильно выбранных и в адекватных дозах назначенных противоэпилептических препаратов (ПЭП). Приступы не могут быть полностью купированы примерно у трети пациентов с височной эпилепсией, даже при применении нескольких правильно подобранных (ПЭП) по отдельности или в различных комбинациях в максимально переносимых дозах [9]. Опираясь на эти критерии течение эпилепсии признают фармакорезистентным. Долгосрочные исследования результатов медикаментозного лечения пациентов с височной эпилепсией показали, что после отказа от двух хорошо переносимых схем лечения эпилепсии, вероятность успеха при дальнейших попытках подбора эффективной комбинации ПЭП становится все менее вероятной [10]. Поэтому можно предположить, что лекарственная устойчивость присутствует *de novo* у многих пациентов.

Фармакорезистентность эпилепсии вынуждает в некоторых случаях прибегать к хирургическому лечению. Результаты отечественных исследований указывают, что у 60-70% пациентов был достигнут полный контроль над приступами, у 10-15% приступы возобновлялись в течение

12 месяцев, в 15-30% случаев контроля над приступами достичь не удавалось [11].

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.2 Информация о пациентах и методах хирургического вмешательства

Исследование было одобрено этическим Комитетом Российского научно-исследовательского нейрохирургического института им. проф. А.Л. Поленова, города Санкт-Петербург (протокол № 0305-2016 от 16.05.2016). Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией о правах человека и при наличии письменного информированного согласия пациента. Все протоколы обследования, диагностики и процедуры хирургического лечения пациентов с ФРЭ соответствовали критериям Клинических рекомендаций Ассоциации нейрохирургов России, 2015 г.

В исследование включались пациенты, поступавшие на хирургическое лечение с 05.08.2018 г. по 30.10.2021 г. с диагнозом по МКБ-10 «G40.2», их число составило 74 человека. Возможность проведения исследования оценивалась по критериям включения, невключения и исключения.

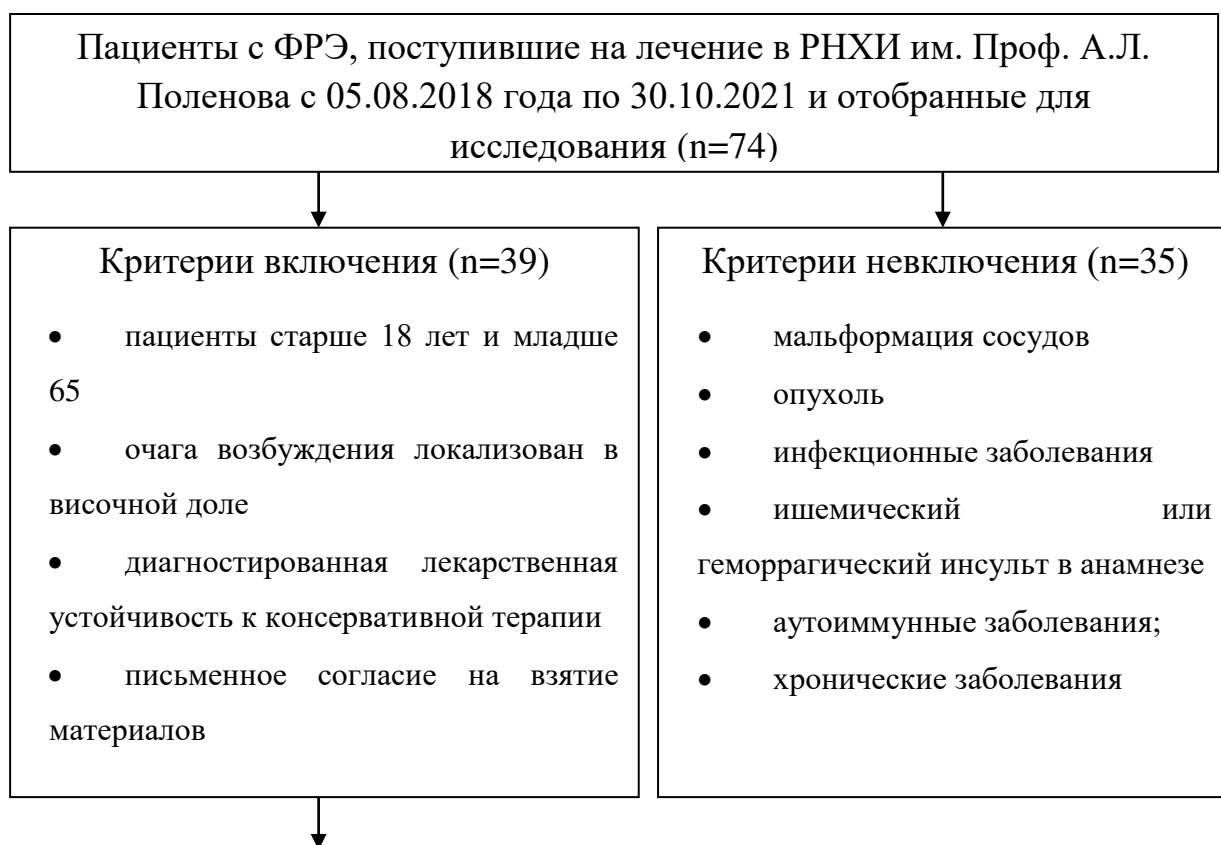




Рис. 1. Поточковая диаграмма включения пациентов в исследование.

Оценке на критерии включения/невключения подвергался материал от 74 пациентов. У 8 пациентов обнаружены опухолевые образования, у 5 - сосудистые мальформации, у 3 - инфекционные заболевания головного мозга, у 2 - ишемические нарушения, у 2 - аутоиммунные заболевания, у 17 локализация эпилептогенного очага распространялась на другие отделы головного мозга, в большинстве случаев на лобную (рис. 1).

Критериям включения соответствовали 39 пациентов ( $n > 30$ ). Всем этим пациентам проведена передняя темпоральная височная блок-резекция в соответствии с протоколом оперативного вмешательства. У 5 количество биоматериала оказалось недостаточным для этих исследований, в дальнейшем этот материал не изучался. В группу для исследования в итоге было включено 30 пациентов (Группа ФРЭ) схожих по половому и возрастному составу (средний возраст пациентов 27,1 год).

Из свежих полученных после операции биоптатов для проведения иммуноблота на холоде забирались образцы серого и подлежащего белого вещества из установленного эпилептического очага, а также из перифокальной зоны этого очага и замораживались при температуре  $-80^{\circ}$ . Для проведения иммуногистохимического исследования (ИГХ)



оставшийся материал фиксировали нейтральным забуференным формалином 10 % не менее суток, обезвоживали изопропиловым спиртом по стандартному протоколу, изготавливали парафиновые блоки. Толщина получаемых срезов из этих блоков составляла 5-7 мкм.

В качестве группы сравнения для метода иммуноблота было выбрано 12 сопоставимых с исследуемой группой по полу и возрасту (средний возраст  $28,75 \pm 3,73$ ) пациентов (Контроль 1). Материал получен после операций по поводу черепно-мозговой травмы. Включение в контрольную группу осуществлялось при условии отсутствия в анамнезе каких-либо неврологических заболеваний, злокачественных и доброкачественных новообразований, ишемического или геморрагического инсульта, нейроинфекций, а также аутоиммунных заболеваний или при подтвержденной ВИЧ-инфекции. Данные пациенты обращались в клинику для проведения реконструктивно-косметических операций для коррекции дефектов, полученных вследствие травмы. Все травмы были получены в отдалённом периоде, и пациенты поступали в стационар не ранее, чем через полгода после события. Полученные биоптаты коры и белого вещества хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Постановку контроля для ИГХ исследования осуществляли на аутопсийном материале от 10 пациентов, умерших от заболеваний, не связанных с психической деятельностью (Контроль 2). Из исследования исключались случаи, имевшие в анамнезе расстройства неврологического характера. Посмертная задержка до вскрытия составляла от 4 до 12 часов.

У 20 пациентов перед операцией были взяты образцы сыворотки крови. Взятие происходило натощак в утренние часы, в бессудорожный период. У 10 пациентов образцы не были взяты или не включались в исследование, так как у них регистрировались частые припадки и отсутствовал бессудорожный период. Сыворотку получали по

общепринятой методике, аликвотировали и замораживали и хранили при -20°C.

Сыворотка от 12 добровольцев использовалась в качестве группы сравнения для метода исследования крови, возраст варьировал от 23 до 35 лет, средний возраст составил 28,2 лет (Контроль 3). Все добровольцы подписывали добровольное информированное согласие. Для исследования не использовались образцы крови от клинически здоровых добровольцев, отрицавших в анамнезе неврологические или аутоиммунные заболевания, наличие острых воспалительных или респираторных заболеваний. Биологический материал собирался натошак в утренние часы.

Весь полученный материал был перевезен и исследован нижеперечисленными методами на базе Лаборатории сравнительной биохимии и клеточных функций Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

## 2.2. Методы

**2.2.1 Иммуноблоттинг.** Тестируемые образцы массой от 0,03 г до 0,05 г смешивались с лизатным клеточным буфером, ингибиторами протеаз (ProteaseInhibitorCocktail, Sigma-Aldrich) и фосфатаз (PhosSTOP, Sigma-Aldrich). Образцы механически гомогенизировали, отстаивали в холодильнике (4<sup>0</sup> С) около 30 минут. Полученную взвесь центрифугировали 15 минут также при температуре 4°C, отбирали полученный супернатант, премешивали с буферным раствором Лэммли и инкубировали в течение 5 минут при 95°C. Полученные образцы заливали в гель и подвергали электрофоретическому разделению в 10% неградиентном полиакриламидном геле при начальном напряжении 80W в концентрирующем геле, затем при напряжении 120W в разделяющем геле. Перенос на ПВДФ мембрану (Immun-Blot® PVDF, Biorad) осуществлялся в течение 1 часа в трансфер буфере при напряжении 100W. Мембрану для

определения тотального белка окрашивали проявляющим красителем Понсо S. Мембраны с закрепленными белками инкубировали при температуре 4°C в течение 8-12 часов при постоянном перемешивании. В исследовании использовались антитела к следующим белкам: Anti-NF- $\kappa$ B p65 (phospho S536) ab86299, Abcam; Anti-CD95 antibody (ab82419), Abcam; p53 Polyclonal antibody (10442-1-AP), Proteintech; Anti-TNF alpha antibody (ab9739), Abcam; Anti-Caspase-3 antibody (ab2171), Abcam; Recombinant Anti-Caspase-9 antibody [E23] (ab32539), Abcam; Recombinant Anti-NF $\kappa$ B p105 / p50 antibody [E381] (ab32360), Abcam; Anti-Fas Ligand antibody (ab186671), Abcam.

Инкубацию во вторичных антителах, проводили при комнатной температуре при постоянном перемешивании, реакцию хемилюминесценции оценивали с использованием гель–документирующей системы (ChemiDoc, BioRad).

Анализ полученных блотов проводился методом денситометрии с учетом нормализации относительно тубулина ( $\alpha/\beta$ -Tubulin antibody #2148 Polyclonal antibodies, Cell Signalling) в программе “ImageJ”. Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с помощью “GraphPad Prism 8.0.1”. Значимость различий для количественных переменных между несвязанными группами оценивалась по критерию Краскела-Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**2.2.2. Иммуногистохимия (ИГХ).** Парафиновые срезы депарафинировали, проводили демаскировку белков в цитратном буфере при 95° в течение 20 минут, блокировали 5% козьей сывороткой. Инкубция проводилась в течение 12 ч при комнатной температуре в первичных антителах. Для исследования использовались Anti-VEGFA antibody [VG-1] ab1316 Mouse monoclonal [VG-1] to VEGFA, Abcam; Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody #9661 Polyclonal antibodies, Cell Signalling.

Последующая инкубация срезов осуществлялась в течение 1 часа во вторичных антителах при комнатной температуре, затем 1 час срезы выдерживали в растворе стрептавидин пероксидазы хрена (Streptavidin–Peroxidase Ultrasensitive, Sigma-Aldrich). Визуализация протекающей реакции осуществляли с помощью хромогена DAB (Sigma-Aldrich). Для увеличения контрастности срезы докрашивали гематоксилином и заключали в синтетическую заливочную среду Bio Mount HM (BIO-OPTICA Milano). Оценка результата реакции проводилась путем подсчета количества окрашенных клеток (%) на 100 клеток в 10 полях зрения в каждом случае, а также оценивались денситометрически с использованием программы «PhotoM v. 1.31».

**2.2.3. Анализ крови.** Сыворотка крови изучалась на содержание провоспалительных цитокинов и подвергалась мультиплексному анализу, для анализа использовался стандартный набор MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine 35-Plex Panel. Процедура анализа осуществлялась на аппарате Luminex MagPlex в соответствии со стандартным протоколом, рекомендуемом производителем.

Часть имеющейся сыворотки использовалось для количественного определения аутоантител (АТ) к глутамату (AES122Ge 96 Tests Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Anti-Glutamic Acid (Anti-Glu) Organism Species: Pan-species (General), к ферменту GAD (AED245Hu ELISA Kit for Anti-Glutamic Acid1 набор 78 969.00 Decarboxylase Antibody (Anti-GAD),96T) к рецепторам глутамата (AEE806Hu 96 Tests Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Anti-Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate 2A (Anti-GRIN2A) Organism Species: Homo sapiens (Human)) и к рецепторам ГАМК (Human anti-gamma-aminobutyric acid A receptor antibody (anti-GABAA receptor) Elisa kit).

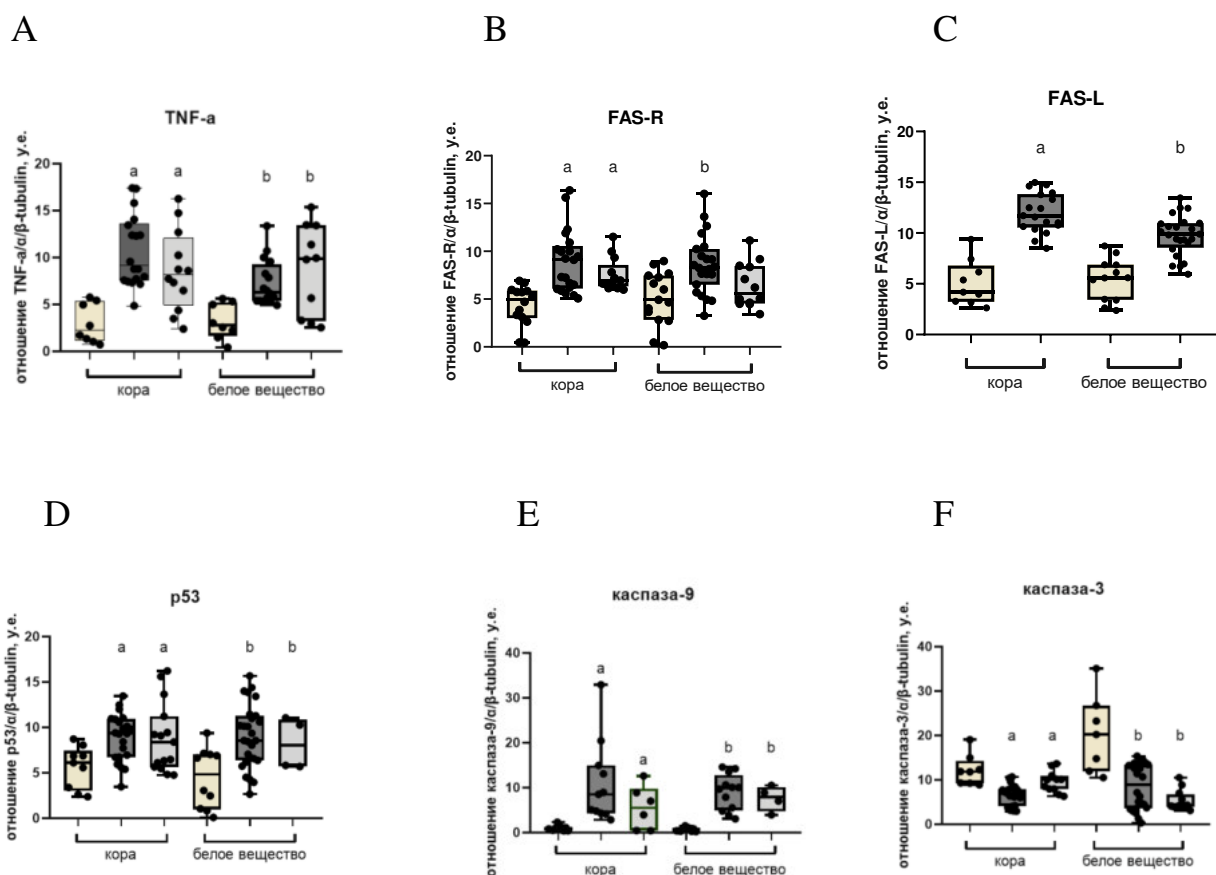
Исследование проводилось методом ИФА на иммунохемилюминесцентном анализаторе Immulite 1000 с помощью

наборов производителя CLOUD-CLONE CORP. (CCC, USA) по общепринятой методике исследований сыворотки в согласии с протоколом производителя. Статистическая обработка данных и построение графиков производилась в программе “GraphPad Prism 8.0.1”.

## Глава 3. Результаты

### 3.1 Иммуноблоттинг

**Эпилептический очаг.** В корковых биоптатах эпилептического очага наблюдалось повышенное содержание провоспалительного TNF- $\alpha$  (Рис. 2А), сверхэкспрессия FAS-R (Рис. 2В) на фоне высоких уровней его лиганда FAS-L (Рис. 2С). Содержание TNF- $\alpha$  и FAS-L в белом веществе височной доли также увеличилось по сравнению с показателями группы сравнения. Повышенная экспрессия FAS-R в белом веществе не обнаружена.



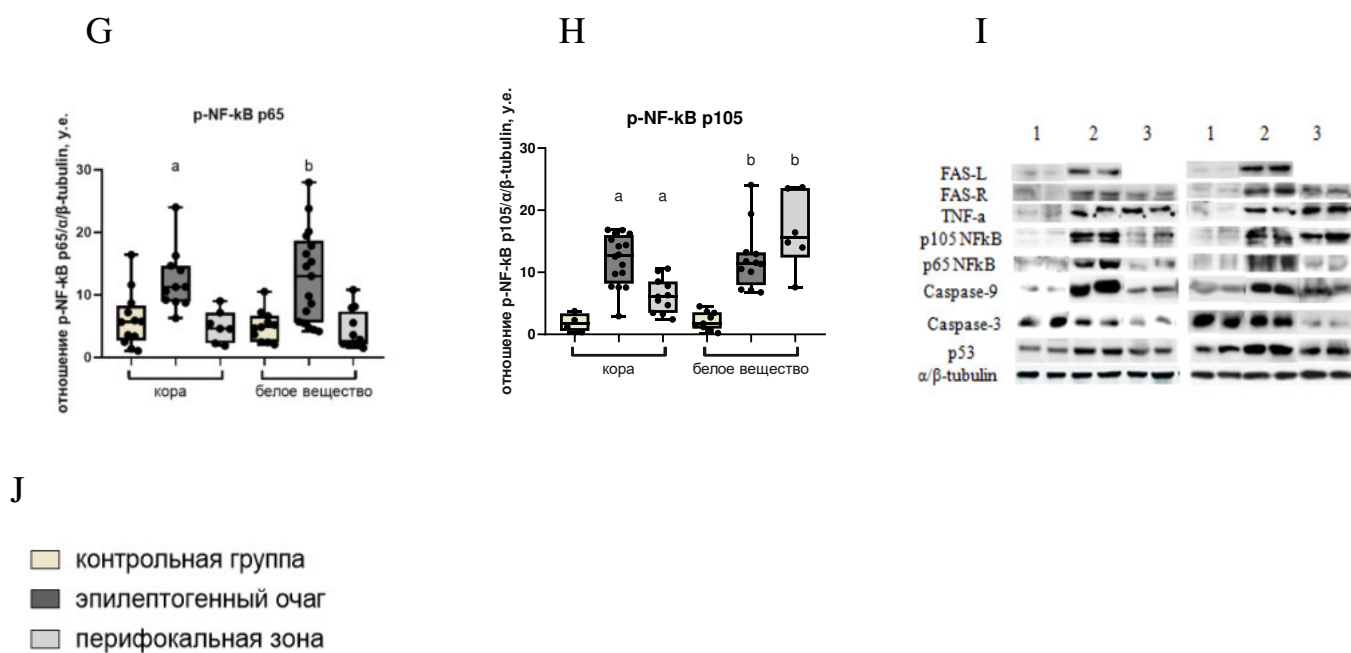


Рис. 2. Содержание TNF- $\alpha$  (A), FAS-R (B), FAS-L (C), p53 (D), caspase-9 (E), caspase-3 (F), p-NF-kB p65 (G), p-NF-kB p105(H) в коре и в белом веществе височной коры головного мозга. Примеры иммуноблота (I). Цветовое обозначение зон исследования (J). *Примечание: a – различия в содержании белка в коре по сравнению с контрольной группой, статистически значимы при  $p < 0.05$ ; b – различия в содержании белка в белом веществе по сравнению с контрольной группой, статистически значимы при  $p < 0.05$ ; 1-контрольная группа, 2-эпилептический очаг, 3-перифокальная зона.*

В сером веществе зоны эпилептического очага экспрессия инициаторной caspase-9 была выше (Рис. 2E), а полноразмерной caspase-3 (Рис. 2F) ниже, чем в биоптатах контрольной группы. Экспрессия caspase-3 (полноразмерная форма) и caspase-9 в подлежащем белом веществе изменялась аналогично значениям этих показателей в коре.

В биоптатах коры и белого вещества экспрессия проапоптотического белка p53 была выше, чем в биоптатах людей без эпилепсии (Рис. 2D).

Содержание S536 фосфорилированной субъединицы p65 NF-kB в эпилептическом очаге было повышено в коре. В белом веществе

содержание p65 NF-κB оставалось на неизменном уровне (Рис. 2J). Содержание фосфорилированной субъединицы p105 (предшественника p50) NF-κB в эпилептическом очаге было повышено в коре и белом веществе (Рис. 2H).

**Перифокальная зона.** Экспрессия TNF-α в перифокальной зоне, как в коре, так и в белом веществе височной доли, превышала его экспрессию в биоптатах людей без эпилепсии (Рис. 2A). В перифокальной зоне экспрессия FAS-R повышалась только в коре (Рис. 2B). В белом веществе наблюдалась только восходящая тенденция, однако достоверных различий по сравнению с людьми без эпилепсии не выявлено.

В коре в перифокальной зоне экспрессия caspase-9 (Рис. 2E) и полноразмерной caspase-3 (Рис. 2F) имела ту же тенденцию, что и в эпилептическом очаге, но менее выраженную. Экспрессия caspase-9 увеличивалась, а экспрессия полноразмерной caspase-3 снижалась в коре и белом веществе перифокальной зоны у пациентов с ФЭ.

Экспрессия проапоптотического белка p53 (Рис. 2D) в коре и белом веществе в перифокальной зоне была повышена по сравнению с показателями у людей без эпилепсии.

Содержание фосфорилированной субъединицы p65 NF-κB оставалось неизменным (Рис. 2G), а содержание фосфорилированной субъединицы p105 NF-κB увеличивалось в коре и белом веществе перифокальной зоны (Рис. 2H).

Сверхэкспрессия TNF-α и FAS-L в биоптатах коры головного мозга и белого вещества у пациентов с ФЭ может указывать на активацию иммунных клеток в нервной ткани [12]. Повышенная экспрессия провоспалительного TNF-α и FAS-L этими клетками также является фактором активации внешнего апоптотического пути в клетках коры головного мозга и белого вещества непосредственно эпилептического

очага [13]. В перифокальной зоне также протекает нейровоспаление, но в значительной степени менее интенсивно.

TNF- $\alpha$  связывается со своим рецептором TNFR1 на поверхности клетки и активирует TNFR-ассоциированный домен внутриклеточного белка TRADD [14]. TRADD помимо участия в апоптотическом каскаде активирует конкурентные пути выживания, запуск которых вызван фосфорилированием белка-ингибитора, с которым связан NF- $\kappa$ B [13]. Параллельная активация конкурентных путей выживания клетки объясняет различные последствия влияния TNF- $\alpha$  на апоптоз. FAS-L взаимодействует с FAS-ассоциированным доменом белка FADD, и система FAS/FAS-L инициирует только апоптотический путь [15].

Связывание TNF- $\alpha$  с рецептором TNFR1 активирует защитные пути NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B принадлежит к семейству транскрипционных факторов, которые играют определенную роль в патогенезе хронических воспалительных заболеваний [13]. NF- $\kappa$ B регулирует гены, участвующие в иммунных и воспалительных реакциях, в кодировании цитокинов (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ), хемокинов (IL-8, эотоксин), индуцируемых эффекторов ферментов (например, iNOS, COX-2), и т.д. NF- $\kappa$ B представляет собой гетеродимерный комплекс из 2 субъединиц. Гомодимеры p50 и p52 играют роль репрессоров экспрессии генов, в то время как p65, c-Rel и RelB в любых комбинациях, включая p50 и p52, играют роль активаторов транскрипции [13].

В эпилептическом очаге содержание фосфорилированных субъединиц p65 и p105 (предшественника p50) NF- $\kappa$ B увеличилось в биоптатах коры головного мозга и белого вещества. При этом в перифокальной зоне содержание фосфо-формы p65 NF- $\kappa$ B и в сером и белом веществе оставалось на сопоставимом уровне, как и у пациентов без эпилепсии. Но при этом содержание p105 NF- $\kappa$ B в коре головного мозга и белом веществе в перифокальной зоне увеличилось по отношению к группе сравнения.



Исходя из соотношения содержания этих регуляторных белков, можно предположить, что увеличенное содержание фосфо-p65 NF-κB в самом эпилептическом очаге говорит о влиянии белка TNF-α на транскрипцию провоспалительных и антиапоптотических генов. Активация этих генов зачастую приводит не к гибели клеток, а к их выживанию. В то же время повышенное содержание p105 NF-κB на фоне неизменного уровня p65 NF-κB указывает на подавление путей выживания клеток в перифокальной зоне. Таким образом, механизмы выживания клеток частично нивелируют апоптоз по внешнему пути, протекающий в эпилептогенном очаге, но в перифокальной зоне защитные механизмы активированы недостаточно, и клетки гибнут более интенсивно.

Увеличение количества рецептора FAS на поверхности клеток в коре и в белом веществе эпилептогенного очага и в перифокальной зоне коры может быть следствием транскрипции гена p53. Белок p53, запускающий транскрипцию, находится в неактивном состоянии в цитоплазме, его активация происходит в ответ на повреждение ДНК. При сохраненной целостности генома p53 может реагировать на появление патогенных или цитотоксических агентов, а также на окислительный стресс [16]. Активация p53 параллельно с запуском апоптоза индуцирует механизмы, ответственные за трансляцию мРНК FAS, что обеспечивает перемещение вновь синтезированного FAS-R на поверхность клетки [17]. При этом активный p53 путем взаимодействия с внешней мембраной митохондрий проникает внутрь органеллы, где, вступая в контакт с Bcl-2 или Bax, обеспечивает выброс цитохрома C и активации caspase-3 [18]. Увеличение числа FAS-R на мембране клеток может быть следствием повышенной концентрации в области эпилептического очага активного белка p53 и в перифокальной зоне в сером и в белом веществе. Таким путем может происходить усиление процессов, приводящих к апоптозу, под действием внешних повреждающих факторов. При этом параллельное воздействие

p53 на митохондриях играет дополнительную роль активации каспаз-зависимых путей гибели клеток.

Взаимодействие p53 как с поврежденной митохондриальной мембраной, так и с высвободившимся цитохромом C приводит к образованию апоптосомы, включающей белок АРАФ-1, собственно цитохром C и прокаспазу-9. Образование такого комплекса приводит к активации каспазы-9. Сама каспаза-9 является индуктором эффекторных каспаз, в том числе каспазы-3. Роль caspase-3 состоит в высвобождении связанной неактивной ДНКазы, разрушающей хроматин [19]. Сниженное содержание эффекторной caspase-3 при появлении высокого уровня инициаторной caspase-9 чаще всего является следствием появления расщепленной формы caspase-3 (cl-caspase-3), появление которой является одним из достоверных маркеров гибели клетки по митохондриальному пути апоптоза [16].

Таким образом, можно сделать вывод, что при фармакорезистентной височной эпилепсии апоптоз протекает преимущественно по внешнему рецепторному пути. Митохондриальная дисфункция является как фактором внутреннего пути развития апоптоза при височной эпилепсии, так и одним из ключевых механизмов патогенеза нейродегенерации [20].

## **3.2. Иммуногистохимия**

### **3.2.1. Количественная оценка caspase-3-экспрессирующих клеток.**

Для оценки выраженности апоптоза в коре головного мозга и в белом веществе в эпилептическом очаге, а также для подтверждения протекания митохондриального апоптоза была проведена ИГХ на наличие расщепленной формы апоптотического белка caspase-3 (cl-caspase-3) [19].

Во всех 30 исследованных клинических случаях у пациентов с ФРЭ интенсивная ядерная экспрессия одного из стандартных маркеров апоптоза cl-caspase-3 была обнаружена в одиночных глиальных клетках как в коре

височной доли, так и в белом веществе головного мозга. Расположение иммуноположительных клеток не было сосредоточено в определенном слое коры, распределение было диффузно между слоями, ядерное окрашивание было интенсивным (рис. 3А).

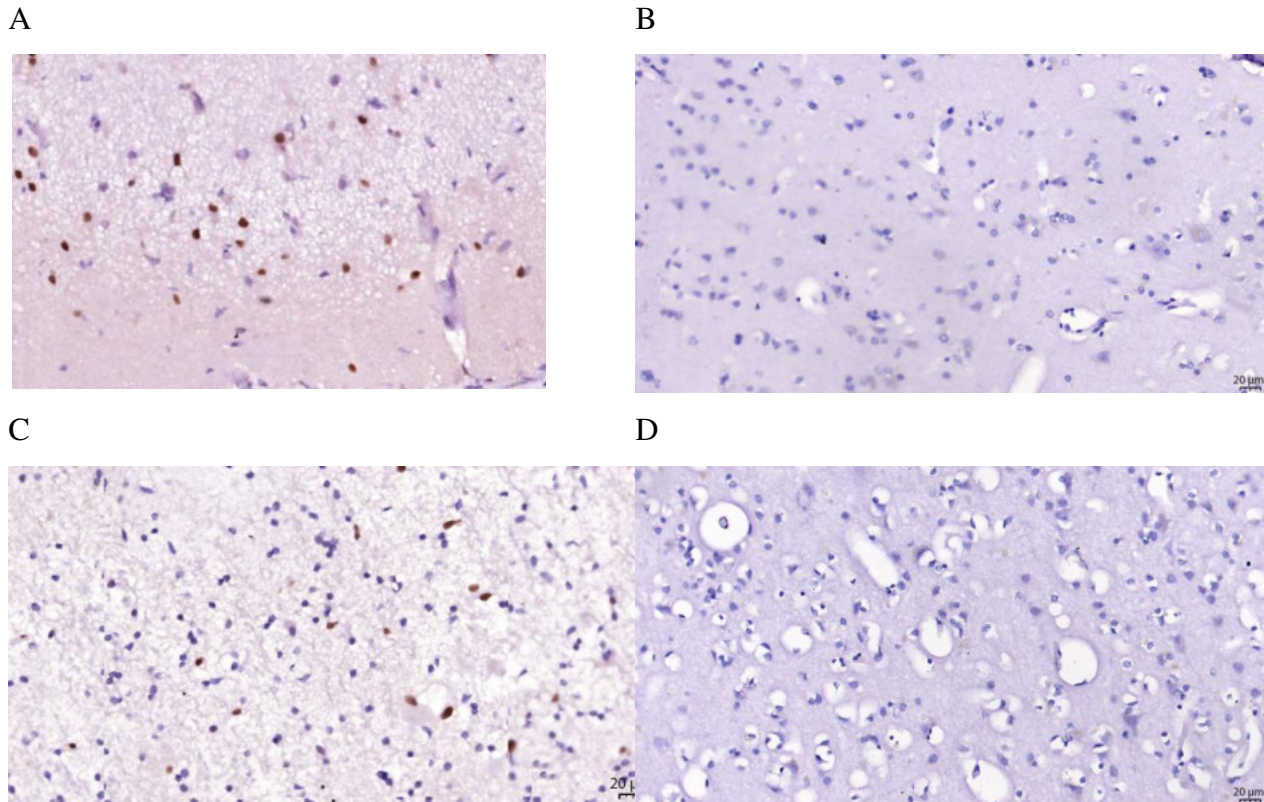


Рис. 3. cI-caspase-3-положительные клетки (коричневое окрашивание) в коре эпилептического очага височной доли пациента с ФРЭ (А) и в коре пациента группы сравнения (В); в прилежащем к эпилептогенному очагу белом веществе пациента с ФРЭ (С) и в образце контрольного белого вещества (D). Визуализация хромогеном DАВ, докрасивание гематоксилином. Увеличение  $\times 400$ .

Среднее относительное количество cI-caspase-3-положительных клеток (%) составило  $28,05 \pm 0,65$  в коре. У 7 пациентов (23,33% случаев) выявлено окрашивание на cI-caspase-3 также в единичных нейронах коры. В белом веществе положительное окрашивание было свойственно преимущественно глиоцитам, предположительно олигодендроцитам. Клетки глии, ответившие на реакцию, распределялись равномерно, как и коре (Рис. 3С). При этом в белом веществе положительная ИГХ-реакция

была несколько менее интенсивной, чем в глиоцитах серого вещества. Среднее относительное количество ИГХ-положительных ядер (%) составило  $6,26 \pm 0,32$ . В группе без эпилепсии окрашивание cI-caspase-3 не наблюдалось ни в одном из образцов белого вещества (рис. 3D). В сером веществе височной доли экспрессия cI-caspase-3 отсутствовала полностью в 7 представленных случаях (70%) (Рис. 3B). У 3 пациентов (30%) случаях наблюдались единичные ИГХ-позитивные ядра глиоцитов, интенсивность окрашивания была низкая. Среднее относительное число иммуноположительных клеток составило  $1,43 \pm 0,13$ . Различия между количеством ИГХ-позитивных клеток как в сером, так и белом веществе у пациентов с ФРЭ и в группе сравнения соответственно статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Таблица. 1. Среднее количество иммуноположительных глиальных клеток в коре и белом веществе в группе больных с эпилепсией и в группе сравнения (без эпилепсии),  $p < 0,05$ .

Среднее количество cI-caspase-3-позитивных глиальных клеток (M, %), $p < 0,05$ .	<b>Кора</b> Caspase-3 (M $\pm$ m)	<b>Белое вещество</b> Caspase-3 (M $\pm$ m)
<b>Группа больных с эпилепсией</b> (n = 30)	28,05 $\pm$ 0,65	6,26 $\pm$ 0,32
<b>Группа сравнения (без эпилепсии)</b> (n = 10)	1,43 $\pm$ 0,13	0

Таким образом, экспрессия cI-caspase-3 была выявлена преимущественно в глиальных клетках, экспрессия cI-caspase-3 в нейронах наблюдалась в единичных клетках только в 23,33% случаев. Во всех

клинических случаях преимущественная локализация расщепленной caspase-3 составляла кору височной доли пациентов с ФРЭ.

**3.2.2 Морфометрический анализ содержания VEGF-A в эндотелиоцитах капилляров мозга.** В группе пациентов, прооперированных по поводу ФРЭ выявлена резко выраженная экспрессия VEGF-A ( $p < 0,001$ ) на поверхности эндотелиоцитов. При этом во всех случаях наблюдается умеренный периваскулярный отек и утолщенная стенка капилляров. Оптическая плотность экспрессирующих VEGF-A клеток, измеренных денситометрически, в биоптатах пациентов с ФРЭ составила  $0,62 \pm 0,037$ , против  $0,21 \pm 0,019$  у пациентов без эпилепсии (Рис. 4).

В норме VEGF-A присутствует в тканях, особенно на поверхности эндотелиоцитов. Этот белок влияет на проницаемость сосудов, в повышенных количествах присутствует в местах активного ангиогенеза. Высокая экспрессия рецептора VEGF-A на поверхности эндотелиоцитов капилляров в головном мозге в зоне эпилептогенного очага может говорить о повышенной эндотелиальной проницаемости [21]. Подобный эффект может быть обусловлен прямым повреждением эндотелиоцитов. Экспрессированный VEGF-A также является индуктором мобилизации воспалительных клеток непосредственно в место повреждения, таким образом поддерживая местный воспалительный процесс [22].

Выявленная высокая экспрессия белка VEGF-A в клетках микроциркуляторного русла височной доли у пациентов с ФРЭ является показателем повреждения основных структурных элементов плотных контактов между клетками ГЭБ. Подобное повреждение структуры ГЭБ обуславливает его повышенную проницаемость [23].

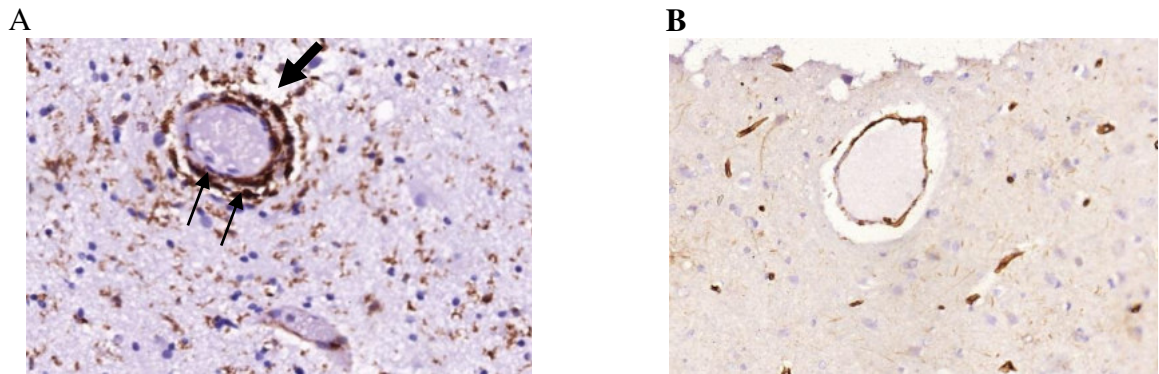


Рис. 4. Морфологические изменения в нервной ткани головного мозга. ИГХ реакция с антителами к VEGF-A, дополнительное окрашивание гематоксилином, увеличение  $\times 400$ . А - умеренно расширенное периваскулярное пространство (толстая стрелка), ярко выраженная ИГХ положительная реакция с антителами к VEGF-A (тонкие стрелки) в эндотелиоцитах; В – слабо выраженная положительной ИГХ реакции с антителами к VEGF-A в эндотелиоцитах.

### 3.3 Цитокиновый профиль пациентов

Известно, что цитокины вовлечены в активацию и поддержание нейровоспаления, а также в разрушение гематоэнцефалического барьера, а также. Участие воспаления установлено в развитии нейродегенеративных заболеваний, и оно может быть одним из факторов возникновения эпилепсии или формирования лекарственной устойчивости.

В исследуемых образцах сыворотки крови содержание провоспалительного  $IL-1\beta$  не отличалось существенно от содержания их у здоровых людей (Табл. 2). Растворимый рецептор  $IL-1RA$  -  $IL-1RA$  известен как антиконвульсант, его уровень также оставался неизменным. Важный иммунорегулятор  $IL-2$  находился на пониженном уровне. Известно, что  $IL-2$  синтезируется как клетками общего иммунитета, так и иммунными клетками головного мозга – микроглией. В тканях нервной системе  $IL-2$  принимает участие в процессах, запускающих регенерацию

нейронов, а в тканях общей иммунной системы отвечает за жизнеспособность и нормальное функционирование регуляторных супрессорных Т-лимфоцитов [24]. Недостаточная продукция IL-2 может приводить к спонтанному образованию аутоиммунных Т-лимфоцитов. Такие свободно образующиеся лимфоциты способны проникать через поврежденную систему ГЭБ в ЦНС, накапливаться в головном мозге и оказывать повреждающее действие на нервную ткань в целом, так и отдельно на нейроны, что клинически часто может проявляться симптомами аутоиммунного энцефалита [27].

Наблюдаемое повышение концентраций таких цитокинов как TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 может говорить о протекании острого ответа организма на воспаление, в регуляции которого задействованы как провоспалительный IFN- $\gamma$ , так и отрицательный регулятор, ингибитор воспаления IL-10 [28]. Во всех исследуемых клинических случаях ФРЭ выявлен нормальный уровень этих цитокинов, кроме повышенного уровня TNF- $\alpha$  и недостаточного IL-2. Наблюдался рост уровня IL-4, который часто принимает участие в ответе на нейровоспаление и его уравнивание. Рост IL-4 может говорить о замедлении синтеза цитокинов первичного ответа.

Исходя из показателей баланса про- и противовоспалительных показателей, можно предположить, что у пациентов с ФРЭ отсутствует системный воспалительный процесс.

Выявление высокого содержания в системном кровотоке пациентов с ФРЭ содержания провоспалительных TNF $\alpha$ , IL-7 параллельно с повышением концентрации противовоспалительного IL-4, выполняющего роль компенсатора, может отражать ответ клеток врожденного иммунитета на повреждение эндотелия капилляров головного мозга, а также может ассоциироваться с повреждением тканей головного мозга.

Таблица. 2. Уровень цитокинов и хемокинов в сыворотке крови пациентов с фармакорезистентной эпилепсией (группа ФРЭ) по сравнению с группой контроля.

Цитокины (пг/мл)	Группа ФРЭ	Контроль	Значение p
IL-1 $\beta$	1,42 $\pm$ 0,34	1,38 $\pm$ 0,37	n.s.
IL-1RA	31,18 $\pm$ 4,14	30,64 $\pm$ 5,85	n.s.
IL-2	0,82 $\pm$ 0,31	3,67 $\pm$ 0,24	p<0,001
IL-4	46,62 $\pm$ 2,72	31,86 $\pm$ 5,03	p<0,05
IL-7	18,65 $\pm$ 3,71	6,24 $\pm$ 1,72	p<0,05
IL-8	12,41 $\pm$ 1,62	27,24 $\pm$ 2,19	p<0,001
IL-10	5,61 $\pm$ 0,89	4,31 $\pm$ 1,15	ns
TNF- $\alpha$	38,11 $\pm$ 2,12	21,65 $\pm$ 1,62	p<0,05
VEGF	322,1 $\pm$ 52,17	91,33 $\pm$ 16,12	p<0,01
GRO	3062 $\pm$ 201,1	1292 $\pm$ 196,3	p<0,001
EGF	7,46 $\pm$ 1,82	14,17 $\pm$ 2,20	p<0,01
IFN $\gamma$	9,71 $\pm$ 0,32	1,32 $\pm$ 0,41	p<0,001
IFN $\alpha$ 2	32,99 $\pm$ 4,147	32,36 $\pm$ 6,49	p<0,05
Eotaxin	0,978 $\pm$ 0,28	2,80 $\pm$ 0,71	ns

Примечание. ns: not significant, не значимо

Хроническое нейровоспаление по сути является устойчивой активацией микроглии, поддерживаемым патофизиологическими циклами. Повышенное образование провоспалительных цитокинов способствует локальному повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [23]. Сниженный уровень IL-8 может быть одним из факторов, приводящим к усилению миграции и нейтрофилов к эндотелиальным клеткам. Адгезия нейтрофилов на поверхности поврежденных эндотелиоцитов, приводит к дополнительному



повреждению ГЭБ провоспалительными цитокинами, усугубляя повреждение.

Повреждение эндотелия стимулирует астроциты секретировать сосудистый эндотелиальный фактор роста (VGEF), который действует на эндотелиальные клетки, чтобы нормализовать проницаемость ГЭБ. Однако большое количество синтезированного VGEF индуцирует гиперпроницаемость эндотелиальных клеток прямым действием на них [29]. В результате в сыворотке крови также фиксируется высокий уровень VGEF. В случае снижения EGF приводит к нарушению стимуляции роста и дальнейшего деления эндотелиальных клеток. Значительно повышенный уровень VEGF и GRO и недостаточность EGF в плазме, гиперэкспрессия рецептора к VEGF эндотелиоцитами на фоне проникновения в кровотоки провоспалительных факторов при отсутствии системного воспалительного ответа свидетельствует о повреждении ГЭБ.

### **3.4 Уровень антител в сыворотке крови**

По результатам твердофазного ИФА у пациентов с ФРЭ было зафиксировано статистически незначимое снижение титра АТ к ГАМК-А-рецептору (Рис. 5В), но при этом выявлено значимое повышение содержания антител к ионотропному NMDA-2A рецептору (Рис. 5А) по сравнению с содержанием у здоровых людей. Различий не было выявлено в титре АТ к GAD 65/67 и к глутамату (Рис. 5С и 5D).

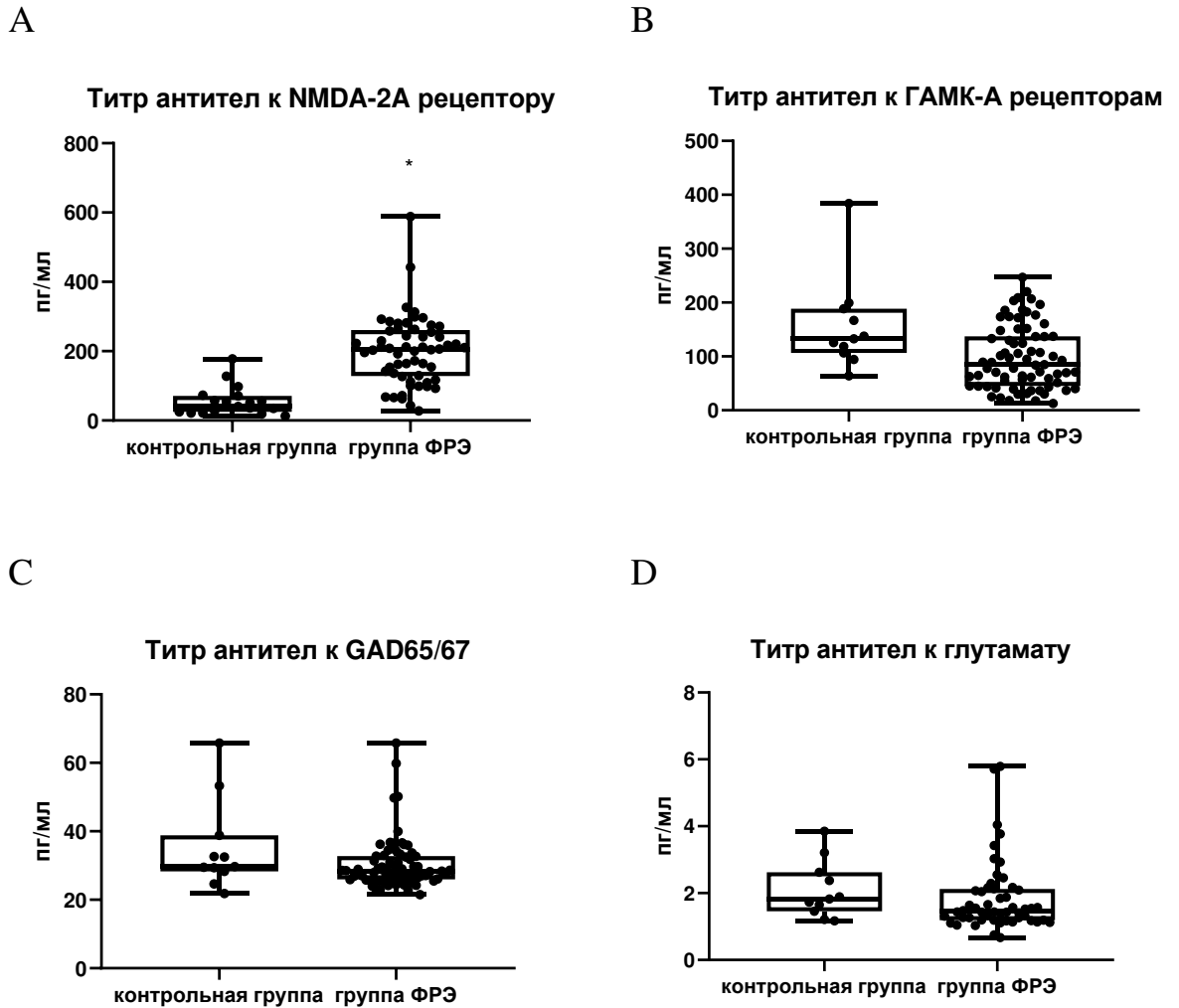


Рис.5. Титр антител к: А - ионотропному NMDA-2A рецептору (Anti-GRIN2A), В - ГАМК-А-рецептору, С - GAD 65/67, D - к глутамату.

Повышение титра АТ к NMDA рецепторам может быть одной из причин активно протекающего нейровоспаления и изменений в соответствующей тормозной системе нейронов. Повреждение NMDA рецепторов может вызывать реакцию местных иммунокомпетентных клеток, а также на фоне повышения проницаемости ГЭБ приводит к их рекрутингу из системного кровотока. В результате развивается нейровоспаление и апоптоз.

Наличие АТ к глутаматным рецепторам NMDA-типа встречаются при других неврологических заболеваниях в частности при аутоиммунном энцефалите. Симптомы аутоиммунного энцефалита частично схожи с

симптоматикой эпилепсии, в частности выраженная амнезия или периодические нарушения памяти, эпизоды спутанности, парциальные судороги [27]. Аутоагрессия к NMDA-рецепторам нейронов может быть первоосновой причиной снижения их количества и, как следствие, к недостаточному изменению мембранного потенциала, что может оказывать влияние на другие классы ионотропных глутаматных рецепторов и, таким образом, приводить к развитию фармакорезистентности.

### **Выводы**

1. В эпилептическом очаге наблюдалось высокое содержание проапоптотических белков TNF- $\alpha$ , FAS-L и его рецептора FAS-R, p53 и caspase-9 при низком содержании полновесной caspase-3. Эти показатели были аналогичными для коры и белого вещества, но в белом веществе изменения были менее интенсивными. В перифокальной зоне тенденция изменения этих белков сохранялась, содержание FAS-R изменялось не столь существенно. Увеличение содержания p53, caspase-9 и снижение экспрессии полноразмерной caspase-3, рост содержания TNF- $\alpha$ , FAS и FAS-L свидетельствует о протекании апоптоза по внешнему и митохондриальному пути в нейронах и глии в эпилептогенном очаге и в перифокальной зоне эпилептогенного очага височной доли. Детекция cI-caspase-3 в клетках коры и белого вещества показала, что апоптозу подвергаются преимущественно глиальные клетки.

2. Высокое содержание в эпилептогенном очаге протекторного NF- $\kappa$ B p65 и супрессора генов апоптоза NF- $\kappa$ B p105 наблюдается в коре и белом веществе примерно на одном уровне. В перифокальной зоне преобладает содержание NF- $\kappa$ B p105 в коре, в большей степени в белом веществе. Уровень протекторного NF- $\kappa$ B p65 не изменяется в перифокальной зоне. В коре и белом веществе эпилептогенного очага протекает процесс апоптоза и одновременно процесс нейровоспаления в результате активации путей

выживания. В перифокальной области более существенно выражен процесс апоптоза по сравнению с нейровоспалением, так как развитие путей выживания блокируется. Нейровоспаление в перифокальной зоне протекает менее интенсивно, чем в эпилептогенном очаге.

3. Более интенсивные процессы апоптоза и сниженный уровень нейровоспаления в перифокальной области могут служить маркерами в ходе хирургического лечения. Разработка средств медикаментозного воздействия на мишени этих каскадов могут позволить существенно уменьшить поле хирургического вмешательства.

4. Нейровоспалительные процессы являются одной из причин повреждения ГЭБ, о чем говорит повышенная экспрессия эндотелиоцитами белка VEGF. Выявление проникающих из ЦНС провоспалительных и ростовых маркеров в кровь может стать инструментом для ранней диагностики развития фармакорезистентности.

5. Высокое содержание аутоантител к NMDA-2A рецепторам может стать одним из маркеров для ранней диагностики фармакорезистентности. Формирование в организме антител к NMDA-2A рецепторам, проникающим через поврежденный ГЭБ в головной мозг, и их повреждающее действие на нейроны может быть одной из причин развития лекарственной устойчивости височной эпилепсии. Разработка терапевтических методов, подавляющих аутоагрессию, и раннее их применение может помочь преодолеть имеющуюся рефрактерность к стандартной терапии эпилепсии, повысить ответ на проводимую противосудорожную терапию или не допустить ее развития лекарственной устойчивости.

## Публикации по теме исследования

### Статьи

1. Elena D. Bazhanova, Alexander A. Kozlov and Anastasia V. Litovchenko. Mechanisms of Drug Resistance in the Pathogenesis of Epilepsy: Role of Neuroinflammation. *Brain Science*. 2021;11(5):663.  
[doi.org/10.3390/brainsci11050663](https://doi.org/10.3390/brainsci11050663)
2. Litovchenko, A.V., Zabrodskaya, Y.M., Sitovskaya, D.A. et al. Markers of Neuroinflammation and Apoptosis in the Temporal Lobe of Patients with Drug-Resistant Epilepsy. *J Evol Biochem Phys*. 2021;57,1040–1049.  
[doi.org/10.1134/S0022093021050069](https://doi.org/10.1134/S0022093021050069)
3. Литовченко А.В., Забродская Ю. М., Ситовская Д.А., Хужахметова Л.К., Нездоровина В.Г., Бажанова Е. Д. Экспрессия маркеров нейровоспаления и апоптоза в височной доле головного мозга у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2021. – Т. 57. – № 5. – С. 411-419. doi 10.31857/s004445292105003x.
4. Ситовская Д.А., Литовченко А.В., Бажанова Е.Д., Скитева Е.Н., Забродская Ю.М. Исследование цитокинового профиля в периферической крови и головном мозге у пациентов с фокальной фармакорезистентной эпилепсией. *Сеченовский вестник*. 2021; 12(4): 39–50.  
<https://doi.org/10.47093/2218-7332.2021.12.4.39-50>; IF= 0,203

### Тезисы

1. Бажанова Е.Д., Литовченко А.В., Чистякова О. В., Яковлева И.И., Третьяк М.В., Теплый Д.Л. Роль цитокинов в патогенезе фармакорезистентной эпилепсии. Актуальные исследования висцеральных систем в биологии и медицине // Сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. г. Астрахань, 29 ноября 2019 г.

2. Литовченко, А.В., Забродская Ю.М., Бажанова Е.Д. Маркеры нейровоспаления и апоптоза в эпилептических очагах височной доли головного мозга у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией // Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии: Тезисы докладов Молодежной конференции. Санкт-Петербург, 24–29 февраля 2020 г..
3. Литовченко, А.В., Бажанова Е.Д., Чистякова О. В. Динамика уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациентов с фармакорезистентной эпилепсией// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2020. – Т. 56. – № 7. – С. 630. doi 10.31857/s0044452920070827.
4. Sokolova T. V., Litovchenko A. V., Zabrodskaja Yu. M. Glio-Neuronal Apoptosis in Drug-Resistant Temporal Lobe Epilepsy // Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii. – 2020. – Vol. 56. – No 7. – P. 802. – doi 10.31857/s0044452920072711.
5. Литовченко, А. В. Поиск новых молекулярных мишеней в терапии фармакорезистентной эпилепсии / А. В. Литовченко, Е. Д. Бажанова // Современные достижения фармацевтической науки и практики: Материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования "Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет", Витебск, 31 октября 2019 г.
6. Bazhanova E.D., Litovchenko A.V., Zabrodskaja J.M., Sitovskaya D.A., Nezdorovina V.G., Skiteva E.N., Kuralbaev A.K. Effects of inflammation in neuronal tissue on the level of molecular markers in drug-resistant epilepsy // 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons. Ljubljana, Slovenia, July 3–8, 2021
7. Zabrodskaya Yu. M., Litovchenko A.V., Bazhanova E. D., Suhovaya A. I. Neuroinflammation in Temporal Lobe Pharmacoresistant Epilepsy // Zhurnal

Evolutsionnoi Biokhimii i Fiziologii. – 2020. – Vol. 56. – No 7. – P. 810. – doi: 10.31857/s0044452920072954.

### Литература

1. Fisher RS et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):522–530. doi: 10.1111/epi.13670
2. Chen Z, Brodie MJ, Liew D, Kwan P. Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs: A 30-year longitudinal cohort study. *JAMA Neurology*. 2018;75:279–286. doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3949
3. Shorvon S, Sen A. What is status epilepticus and what do we know about its epidemiology? *Seizure*. 2020;75:131–136. doi: 10.1016/j.seizure.2019.10.003
4. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Inflammation and epilepsy. *Handb Clin Neurol*. 2012;107:163-175. doi:10.1016/B978-0-444-52898-8.00010-0
5. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019;393(10172):689-701. doi:10.1016/S0140-6736(18)32596-0
6. Park BY, Larivière S, Rodríguez-Cruces R, et al. Topographic divergence of atypical cortical asymmetry and atrophy patterns in temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2022;145(4):1285-1298. doi:10.1093/brain/awab417
7. Cendes F, Theodore WH, Brinkmann BH, Sulc V, Cascino GD. Neuroimaging of epilepsy. *Handb Clin Neurol*. 2018;136:985-1014. doi:10.1016/B978-0-444-53486-6.00051-X
8. Tracy JI, Osipowicz K, Spechler P, et al. Functional connectivity evidence of cortico-cortico inhibition in temporal lobe epilepsy. *Hum Brain Mapp*. 2014;35(1):353-366. doi:10.1002/hbm.22181

9. Turner TJ, Zourray C, Schorge S, Lignani G. Recent advances in gene therapy for neurodevelopmental disorders with epilepsy. *J Neurochem.* 2021;157(2):229-262. doi:10.1111/jnc.15168
10. Klein P, Friedman A, Hameed MQ, et al. Repurposed molecules for antiepileptogenesis: Missing an opportunity to prevent epilepsy?. *Epilepsia.* 2020;61(3):359-386. doi:10.1111/epi.16450
11. West S, Nevitt SJ, Cotton J, et al. Surgery for epilepsy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;6(6):CD010541. Published 2019 Jun 25. doi:10.1002/14651858.CD010541.pub3
12. Kölliker-Frers R, Udovin L, Otero-Losada M, et al. Neuroinflammation: An Integrating Overview of Reactive-Neuroimmune Cell Interactions in Health and Disease. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:9999146. Published 2021 May 31. doi:10.1155/2021/9999146
13. Jayaraman A, Htike TT, James R, Picon C, Reynolds R. TNF-mediated neuroinflammation is linked to neuronal necroptosis in Alzheimer's disease hippocampus. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):159. Published 2021 Sep 28. doi:10.1186/s40478-021-01264-w
14. Balzano T, Arenas YM, Dadsetan S, et al. Sustained hyperammonemia induces TNF- $\alpha$  in Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF- $\kappa$ B pathway. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):70. Published 2020 Feb 22. doi:10.1186/s12974-020-01746-z
15. García-Santos G, Martín V, Rodríguez-Blanco J, et al. Fas/Fas ligand regulation mediates cell death in human Ewing's sarcoma cells treated with melatonin. *Br J Cancer.* 2012;106(7):1288-1296. doi:10.1038/bjc.2012.66
16. Fielder E, von Zglinicki T, Jurk D. The DNA Damage Response in Neurons: Die by Apoptosis or Survive in a Senescence-Like State?. *J Alzheimers Dis.* 2017;60(s1):S107-S131. doi:10.3233/JAD-161221



17. Pawar M, Busov B, Chandrasekhar A, Yao J, Zacks DN, Besirli CG. FAS apoptotic inhibitory molecule 2 is a stress-induced intrinsic neuroprotective factor in the retina. *Cell Death Differ.* 2017;24(10):1799-1810. doi:10.1038/cdd.2017.109
18. Qian B, Qi X, Bai Y, Wu Y. The p53 signaling pathway of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) responds to acute cold stress: evidence via spatiotemporal expression analysis of p53, p21, MDM2, IGF-1, Gadd45, Fas, and Akt. *PeerJ.* 2020;8:e10532. doi:10.7717/peerj.10532
19. Lees A, Sessler T, McDade S. Dying to Survive-The p53 Paradox. *Cancers (Basel).* 2021;13(13):3257. Published 2021 Jun 29. doi:10.3390/cancers13133257
20. Pires G, Leitner D, Drummond E, et al. Proteomic differences in the hippocampus and cortex of epilepsy brain tissue. *Brain Commun.* 2021;3(2):fcab021. doi:10.1093/braincomms/fcab021
21. Ureña-Guerrero E, Mónica, Castañeda-Cabral L, José, Rivera-Cervantes C, Martha et al. Neuroprotective and Neurorestorative Effects of Epo and VEGF: Perspectives for New Therapeutic Approaches to Neurological Diseases. *Current Pharmaceutical Design* 2020; 26(12).<https://dx.doi.org/10.2174/1381612826666200114104342>
22. Castañeda-Cabral JL, Beas-Zárate C, Rocha-Arrieta LL, et al. Increased protein expression of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C and their receptors in the temporal neocortex of pharmacoresistant temporal lobe epilepsy patients. *J Neuroimmunol.* 2019; 328: 68–72. doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.12.007.
23. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev.* 2019;99(1):21-78. doi:10.1152/physrev.00050.2017

24. Mendiola AS, Cardona AE. The IL-1 $\beta$  phenomena in neuroinflammatory diseases. *J Neural Transm (Vienna)*. 2018;125(5):781-795. doi:10.1007/s00702-017-1732-9
25. Whyte CE, Singh K, Burton OT, et al. Context-dependent effects of IL-2 rewire immunity into distinct cellular circuits. *J Exp Med*. 2022;219(7):e20212391. doi:10.1084/jem.20212391
26. Moritz M, Geszke-Moritz M. Mesoporous Materials as Elements of Modern Drug Delivery Systems for Anti-Inflammatory Agents: A Review of Recent Achievements. *Pharmaceutics*. 2022;14(8):1542. Published 2022 Jul 25. doi:10.3390/pharmaceutics14081542
27. Vasenina EE, Levin OS, Gan'kina OA, Chimagomedova ASh, Levikov DI. Autoimmune anti-NMDA-R encephalitis. *Zhurnal Nevrologii i Psikhatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(2):110-116. (In Russ.).doi.org/10.17116/jnevro201711721110-116
28. Münzel T, Daiber A, Steven S, et al. Effects of noise on vascular function, oxidative stress, and inflammation: mechanistic insight from studies in mice. *Eur Heart J*. 2017;38(37):2838-2849. doi:10.1093/eurheartj/ehx081
29. Yan Z, Gibson SA, Buckley JA, Qin H, Benveniste EN. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clin Immunol*. 2018;189:4-13. doi:10.1016/j.clim.2016.09.014