

Изменения электрической активности переживающего среза неокортекса морской свинки как прогностический показатель эффективности лазерной терапии у больных, страдающих рассеянным склерозом

М.Н. Жадин¹, Н.М. Захарова¹, А.Н. Карнеев², И.И. Марушак²

¹ Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Московская обл.;

² Российский Медицинский государственный Университет, Москва

Описаны результаты клинического испытания новой разработанной нами диагностики рассеянного склероза на основе анализа влияния сыворотки крови на электрическую активность переживающих срезов неокортекса морской свинки на фоне лечения низкоинтенсивной внутривенной лазерной терапии. Для сравнения на тех же больных проводилась традиционная неврологическая диагностика по шкале Куртцке (EDSS). Обе диагностические методики дали сходные результаты, показывающие, что новая электрофизиологическая диагностика адекватно отражает стадию заболевания и функциональное состояние больного рассеянным склерозом. Данное исследование еще раз подтвердило успешность внутривенной низкоинтенсивной лазерной терапии.

Ключевые слова: рассеянный склероз, диагностика, переживающий срез, неокортекс, внутривенная лазерная терапия

Введение

Рассеянный склероз (РС) — одно из распространенных неизлечимых заболеваний нервной системы, поражающее лиц молодого и трудоспособного возраста. Вследствие того, что этиология заболевания остается неясной, большое внимание уделяется исследованию механизмов патогенеза РС, методов патогенетической терапии заболевания и разработке новых методов диагностики РС. Важным условием развития демиелинизации ЦНС при РС становится патологическая проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В норме ГЭБ непроницаем для многих элементов крови, включая иммунокомпетентные клетки [2]. Известно, что при РС повышается секреция провоспалительных цитокинов: интерлейкинов (IL) IL-1, IL-2, IL-6, TNF-альфа (фактора некроза опухолей) [1]. Они, в свою очередь, оказывают влияние на способность мозговых капилляров изменять про-

ницаемость ГЭБ. При этом нарушение проницаемости ГЭБ наблюдается не только в активной фазе процесса. Сохраняющаяся в стадии ремиссии повышенная ранимость ГЭБ создает условия для проникновения цитокинов в мозг при любой антигенной стимуляции клеточного иммунитета, поддержанию патологической активности астроцитов и микроглии мозга. В связи с повышением проницаемости ГЭБ, недавно была разработана [3] новая быстрая недорогая и сравнительно надежная методика диагностики РС, основанная на определении амплитуды электрической реакции вызванной активности переживающего среза неокортекса морской свинки на введение сыворотки крови больного РС [4]. В предлагаемой работе излагаются результаты испытания этой методики в клинических условиях на примере применения также новой внутривенной низкоинтенсивной лазерной терапии [6] и неврологической диагностики по шкале Куртцке.

Диагностика по влиянию сыворотки крови на переживающий срез неокортекса

Вследствие вышеизложенного представлялось интересным исследовать воздействие низкоэнергетического лазерного облучения крови больных РС в комплексном лечении РС, выполняя контроль за состоянием больного с помощью недавно разработанной диагностической методики [3] на основе влияния сыворотки крови больного РС на электрическую активность переживающих срезов неокортекса морской свинки. Методика заключалась в нижеследующем.

Опыты выполнялись на инкубируемых *in vitro* срезах неокортекса морских свинок. Животных массой 250-400 г декапитировали с помощью гильотины. Механическим слайсером приготавливали фронтальные срезы сенсомоторной коры толщиной около 500 мкм и помещали в экспериментальный отсек термостатируемой камеры. С помощью перистальтических насосов через камеру осуществлялся проток насыщенного карбогеном раствора (35°C) следующего состава (в ммоль/л): NaCl – 131,5, KCl – 5, KH_2PO_4 – 1,24, CaCl_2 – 2, MgSO_4 – 2, NaHCO_3 – 13,5, глюкоза – 10. Раздражающий вольфрамовый биполярный электрод помещался на границе белого и серого веществ, а отводящий стеклянный электрод с диаметром кончика около 10 мкм, наполненный 0,1 М раствором NaCl, в области IV-V слоев коры в одной проекции со стимулирующим. Регистрировали вызванные популяционные ответы нейронов среза с латентным периодом 2-4 мс, длительностью 19-15 мс и средней амплитудой 0,1-0,5 мВ. В инкубирующую среду вводилась сыворотка крови больного РС в объеме, составлявшем 20% от общего объема инкубирующей среды. После введения сыворотки больного РС в стадии обострения амплитуда популяционного

ответа сравнительно быстро (в течение 30 мин.) снижалась в несколько раз в зависимости от тяжести заболевания. Если же вводилась сыворотка больного РС в стадии ремиссии, то амплитуда ответа повышалась на 30-100%. Амплитуда ответа не менялась, если в инкубирующую среду вводилась сыворотка крови здоровых людей в том же объеме или пациентов, больных иными болезнями, но не РС. Таким образом, эта методика позволяла выявить заболевание РС у пациента, определить степень его тяжести, а также и стадию заболевания, и была специфичной к РС.

Введение сыворотки крови больного РС со всеми ее компонентами во внеклеточную среду среза через инкубирующую среду является экспериментальной моделью нарушения ГЭБ при РС. При этом вещества, содержащиеся в крови в результате развития аутоиммунной реакции на миелин и разрушения миелина, поступают прямо в ткань неокортекса, оказывая ингибирующее влияние на активность корковых нейронов.

Шкала Куртцке

Состояние больных наряду с вышеописанной методикой оценивалось по шкале Куртцке (EDSS). По этой шкале у больных отмечались нижеследующие симптомы:

- 1) симптомы поражения пирамидного тракта;
- 2) симптомы поражения мозжечка;
- 3) симптомы поражения черепных нервов, вызванные поражениями белого вещества ствола мозга;
- 4) симптомы поражения проводниковой чувствительности;
- 5) нарушения функционирования тазовых органов;
- 6) зрительные нарушения, обусловленные поражениями зрительного нерва;
- 7) нейропсихологические симптомы.

Внутривенная лазерная терапия

Клинические симптомы при РС развиваются в результате воспалительного поражения миелиновых оболочек аксонов, а на поздних стадиях и их самих. Локальный аутоиммунный процесс увеличивает активацию Т-хелперов против белковых фракций ЦНС [8]. Поэтому терапия на ранних стадиях заболевания обычно направляется на избирательное подавление аутоиммунного ответа. Для решения этой задачи необходима идентификация протеинов ЦНС, которые являются мишенью локального Т-лимфоцитарного ответа. Учитывая недостаточную эффективность и высокую стоимость комплексного лечения с добавлением иммуномодуляторов, ныне разрабатываются новые подходы к терапии РС. Большой проблемой остаются оценка эффективности той или иной проводимой терапии и обоснования ее патогенетической направленности. Лазерное излучение активирует многие процессы в организме, повышает энергетический и пластический обмен, усиливает микроциркуляцию, стимулирует окислительно-восстановительные процессы, обеспечивает увеличение синтеза нуклеиновых кислот, белков и ферментов [4].

Терапевтический эффект лазерного излучения связан с его фотоактивирующим и нормализующим действием на активность важнейших ферментов метаболизма, на биосинтез белков, ДНК, РНК, на пролиферацию клеток, регенерацию тканей и на активность иммунной системы и системы микроциркуляции [5]. Конечный фотобиологический эффект лазерного облучения проявляется ответной реакцией организма в целом, комплексным реагированием органов и систем. Это находит отражение в клинических эффектах лазерной терапии. Уменьшение длительности фаз воспаления и отека тканей оказывает противовоспалительный и противоотечный эффекты. По-

вышение скорости кровотока, увеличение количества новых сосудистых коллатералей улучшает регионарное кровообращение, что вместе с ускорением метаболических реакций и увеличением митотической активности клеток способствует процессу физиологической и репаративной регенерации. При лазерной терапии отмечается повышение активности общих и местных факторов иммунной защиты [4]. Ежедневное внутривенное лазерное облучение крови [6] проводилось у всех больных с помощью аппарата АЛОК-1 (мощность 1 мвт, время облучения в первом сеансе 15 мин. и в последующих — 10 мин., общее количество сеансов — 5).

Результаты

С целью изучения эффективности лечебного действия низкоэнергетического лазерного внутрисосудистого облучения при РС было проведено комплексное лечение 12 больных (9 женщин и 3 мужчин, средний возраст составлял 42 года) на базе ГКБ № 55 и в Московском научно-клиническом Центре рассеянного склероза. Продолжительность заболевания была от 4 до 30 лет; у всех наблюдавшихся больных была выявлена ремитирующая форма заболевания.

Неврологический статус оценивался в динамике до и после проведения лазерной терапии. Состояние всех больных до и после лазерной терапии обследовалось с помощью диагностических методов по влиянию сыворотки крови на переживающий срез неокортекса и одновременно по шкале Куртцке. Эти два параллельных обследования дали взаимосогласующиеся результаты. До лечения шесть человек (больные 1, 4, 6, 8, 9, 12, табл.) были в стадии ремиссии и шесть больных обнаружили стадию обострения (больные 2, 3, 5, 7, 10, 11). После проведения лазерной тера-

пии, согласно результатам анализов у трех больных (больные 5, 7, 11) стадия обострения перешла в стойкую стадию ремиссии, у двух человек (больные 2 и 10) в стадии обострения отмечено лишь некоторое улучшение, в четырех случаях у больных (больные 1, 4, 8, 9) в стадии ремиссии отмечено явное улучшение состояния, у 1-го больного (больной 6) стадия ремиссии перешла в стадию обострения, и в 1 случае состояние больного (больной 12) не изменилось (см. табл.).

Результаты электрофизиологической диагностики приведены в таблице. В первом столбце приведен номер больного, во втором и третьем столбцах приведены изменения амплитуды популяционных ответов, вызванных введением сыворотки крови больного РС соответственно до и после лечения, в процентах к амплитуде популяционного ответа до введения сы-

воротки. Показания, меньшие 100%, сигнализируют о стадии обострения болезни, причем уменьшение этого показателя означает глубину подавления электрической активности среза и усиление степени тяжести заболевания. Показания, большие 100%, указывают на стадию ремиссии [3]. При отсутствии заболевания РС эти показания были бы равны 100%. Чем ближе показания, указанные в третьем столбце, как и во втором, к 100%, тем лучшим считалось состояние больного, что соответствовало результатам неврологических исследований в настоящей работе при сравнении двух методов диагностики. В четвертом столбце даны отношения между показаниями третьего столбца к показаниям, приведенным во втором столбце, что соответствует глубине и качеству изменения состояния больного. Особенно существенными были качественные из-

Т а б л и ц а

Показатели электрофизиологического тестирования состояния больного

№ больного	До лечения	После лечения	Отношение показателей	Результат лечения
1.	171%	1116%	1,47	+
2.	53%	73%	21,38	+
3.	18%	36%	2,00	+
4.	200%	129%	1,57	+
5.	83%	142%	1,71	+
6.	111%	52%	2,13	-
7.	22%	129%	5,86	+
8.	133%	124%	1,07	+
9.	158%	139%	1,14	+
10.	35%	70%	2,00	+
11.	88%	105%	1,19	+
12.	122%	122%	1,00	Не опр.

менения состояния в результате лечения от обострения к ремиссии, и наоборот. Однако, если такого качественного перехода не было, улучшением состояния мы считали случаи, когда величина показателя в результате лечения приближалась к 100%, т.е. к показателю отсутствия заболевания РС. В пятом столбце указаны результаты лечения: знаком плюс (+) отмечено улучшение состояния больного, а знаком минус (-) маркировано ухудшение состояния.

Выявлена идентичность между результатами неврологической и электрофизиологической диагностик в процессе лечения, что и являлось главной целью предлагаемой работы. Надо отметить также, что данное исследование еще раз подтвердило успешность внутривенной низкоинтенсивной лазерной терапии.

Статистический анализ данных, приведенных в Таблице, был выполнен по критерию знака [7]. В соответствии с правилами анализа по этому критерию, результаты, полученные от больного 12, были исключены из анализа, как не отметившие никакого сдвига анализируемого показателя. Из 11 обследованных больных у 10 было отмечено улучшение состояния в результате лечения. Лишь у одного больного (6) тестирование показало ухудшение состояния. Это означает высокую статистическую значимость по критерию знака (вероятность ошибки менее 1%) [7] преимущественной позитивности результатов предпринятого лечения.

Заключение

Таким образом, нами было показано, что новая электрофизиологическая диагностика адекватно отражает стадию заболевания и функциональное состояние больного РС. Важными достоинствами ее являются объективная количественная

оценка состояния больного и возможность его оценки в процессе его лечения. Эти свойства описываемой методики открывают возможность первичной диагностики РС в больницах, где нет высококвалифицированных неврологов. Яркая выраженность изменений популяционного ответа в результате введения сыворотки позволяет надеяться на возможность быстрой оценки перспективности того или иного начатого курса лечения индивидуально для данного больного уже в начальной стадии лечения и оценки целесообразности его продолжения или смены формы лечения.

Работа поддержана грантом РГНФ № 06-06-00179а.

Литература

1. Гусев Е.И., Демина Т.Л., Бойко А.Н. Рассеянный Склероз. — М., 1997.
2. Гусев Е.И., Чехонин В.П., Демина Т.Д., Беляева И.А., Буглак А.В., Бойко А.Н., Смирнова Н.Ф., Гурина О.И. Проницаемость гематоэнцефалического барьера и синтез противовоспалительных цитокинов клетками периферической крови больных рассеянным склерозом. // В кн. *Нейроиммунология. Нейроинфекции. Демиелинизация*. СПб., с.37-39, 1997.
3. Жадин М.Н., Захарова Н.М., Андреев А.А., Балакин В.Е., Пархоменко Р.И., Слабоспитская Е.В. Исследование влияния сыворотки крови больных рассеянным склерозом на электрическую активность переживающих срезов неокортекса морской свинки. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 7, с.52-55, 2000.
4. Илларионов В.Е. Основы лазерной терапии. — М. 1992.
5. Козлов В.И., Буилин В.А. Лазеротерапия. — М. 1992
6. Марушак И.И., Карнеев А.Н., Демина Т.Л., Соловьева Э.Ю. Комплексное лечение

больных рассеянным склерозом с применением внутривенной лазерной терапии. // В кн. *Новые Технологии в Неврологии и Нейрохирургии на Рубеже Тысячелетий. Мат Росс. Конгресса. Ступино; 128-129, 1999.*

7. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. — М.: Изд АН СССР; 1963.
8. Van Noort J.M. Multiple sclerosis: an altered immune response or an altered stress response? // *Mol Med*; 74: 285-96, 1996.

CHANGE OF ELECTRICAL ACTIVITY OF NEOCORTICAL SURVIVING SLICES OF GUINEA-PIG AS A PROGNOSTICAL INDEX OF LASER THERAPY EFFICACY IN THE PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS
M.N. Zhadin¹, N.M. Zakharova¹, A.N. Karneev², I.I. Marushak²

¹ *Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino, Moscow Region;*

² *Russian Medical State University, Moscow*

Key words: multiple sclerosis, diagnostics, surviving slice, neocortex, intravenous laser therapy.

The results of clinical trial of new elaborated by us diagnostics of multiple sclerosis on the basis of analysis of the influence of blood serum on electrical activity of neocortical surviving slices on the background of treatment with low intensive intravenous laser therapy. For comparison, the same patient was subjected to traditional neurological diagnostics on Kurtzke scale (EDSS). Both the diagnostic methods gave similar results showing that the new electrophysiological diagnostics adequately reflects the disease phase and functional state of a multiple sclerosis patient. The present investigation supported successfulness of the low intensive intravenous laser therapy again.