# Морфометрический анализ гранул серотонина тромбоцитов при мигрени

К.м.н. К.Ф. ИЗЗАТИ-ЗАДЕ*, д.м.н., проф. В.А. ЧЕТВЕРТНЫХ, д.м.н., проф. А.А. ШУТОВ

## The morphometric analysis of serotonin granules of platelets in migraine

K.F. ISSATI-ZADE, V.A. CHETVERTNYKH, A.A. SHUTOV

Кафедра неврологии им. проф. В.П. Первушина, кафедра гистологии лечебного факультета Пермской государственной медицинской академии им. акад. Е.А. Вагнера

**Серотониновая гипотеза приступа мигрени основывается в том числе на факте быстрого и существенного снижения содержания гранул серотонина в тромбоцитах периферической крови больных при приступе головной боли. Методом морфометрического анализа исследовали площадь, диаметр, длину и ширину гранул серотонина в тромбоцитах крови у 20 больных с мигренью во время приступа головной боли и межприступный период. Выявлено, что во время приступа мигрени площадь поверхности гранулы тромбоцита, содержащей серотонин, равна 0,231—0,595 мк, что достоверно ($p$<0,05) больше площади гранулы у пациентов в межприступном периоде (0,205—0,037 мк) и у практически здоровых лиц (0,190—0,028 мк). Исследование показало, что гранулы серотонина во время приступа мигрени подвергаются также и структурным изменениям.**

***Ключевые слова:*** *мигрень, серотонин, тромбоциты.*

**The serotonin hypothesis of migraine attack is based on a phenomenon of fast and significant decreasing of serotonin granules in blood platelets. The morphometric analysis was used to study area, diameter, length and wideness of platelet serotonin granules in 20 migraine patients during a headache attack and in an interparoxysmal period. We found that the area of serotonin granule surface in platelets was 0.231±0.595 mcm during the migraine attack that was significantly higher than that during the interparoxysmal period (0.205±0.037 mcm) and in the platelets of healthy controls (0.190±0.028 mcm) ($n$=10). The study has shown that during migraine attack serotonin granules are undergone also structural changes.**

***Key words:*** *migraine, serotonin, platelets.*

Серотонин (5-гидрокситриптамин,5-НТ) — биогенный амин с выраженными вазоконстрикторными свойствами — впервые выделен из крови в 1944 г. M. Rapport и соавт. [26]. В 1946 г. M. Rapport [27] установил его химическое строение, а спустя два года E. Hamlin и E. Fisher [17] осуществили его синтез. Оказалось, что серотонин является производным индола, близким к триптофану. В 1964 г. A. Dahlstrom и K. Fuxe [15] выявили наличие в головном мозге серотонинергических нейронов. Наибольшая концентрация этих нейронов сосредоточена в ядрах шва ствола мозга, некоторых подкорковых образованиях (хвостатое ядро, скорлупа чечевичного ядра, переднее и медиальное ядра зрительного бугра), промежуточном и обонятельном мозге, амигдале, гипоталамусе, ряде структур, связанных с ретикулярной активирующей системой, и коре больших полушарий [2, 3, 8, 12, 22]. У человека 90% серотонина содержится в энтерохромаффинных клетках слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, 10% — в тромбоцитах [12, 15, 17].

Первые исследования серотонина при мигрени были связаны с упрощенной гипотезой патогенеза заболевания, согласно которой мигренозный приступ является следствием повышенной выработки этого биологически активного вещества [1, 4, 6, 9, 11]. Однако искусственно вызвать приступ мигрени путем внутримышечного введения серотонина не удалось. F. Sicuteri и соавт. [28] показали, что во время приступа мигрени возрастает выделение с мочой метаболитов серотонина, главным образом гидроксиндолуксусной и ванилинминдальной кислот. Австралийскими учеными было установлено, что во время приступа мигрени в крови больных значительно — от 9 до 80% (в среднем на 20%) — падает содержание серотонина [20]. Позже было обнаружено, что колебание концентрации серотонина в плазме крови ассоциировано с клинической динамикой мигренозного приступа, и сформулирована «серотониновая гипотеза» мигрени [1, 12—14, 16, 18, 19, 21].

Увеличение в приступе мигрени концентрации серотонина плазмы связывают с распадом тромбоцитов [25]. Неврологическая симптоматика, характерная для мигренозного приступа, возникает вследствие спазма церебральных сосудов и снижения мозгового кровотока в отдельных участках мозга (в фазе мигренозной ауры), снижения тонуса, избыточного растяжения экстрацеребральных сосудов и раздражения в них болевых рецепторов, периваскулярного отека в собственно алгической фазе.

© Коллектив авторов, 2011

*e-mail: neuromed@perm.ru

*Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova 2011;111:10:58*

Именно в фазе головной боли наблюдается увеличение экскреции серотонина и его метаболитов с мочой и снижение содержания серотонина в плазме и ликворе [25].

Известно, что тромбоциты крови человека являются адекватной экстрацеребральной моделью серотонинергических нейронов в отношении процессов в серотонинергических синапсах [5]. Тромбоциты крови по фармакологическим, биохимическим и морфоцитологическим свойствам идентичны серотонинергическим нейронам [29]. Поэтому дисфункция тромбоцитарной серотониновой системы обычно сопряжена с соответствующей дисфункцией серотонинергических нейронов мозга [2, 23, 24], что позволяет экстраполировать биохимические процессы, равно как и морфоструктурные изменения, происходящие в тромбоцитах, на аналогичные явления в серотонинергических нейронах.

Ранее гистохимическим методом Фонтана—Массона нами было исследовано количественное содержание гранул серотонина в тромбоцитах периферической крови у больных мигренью в межприступном периоде и во время приступа [12]. В межприступном периоде в 100 тромбоцитах крови выявлено высокое количественное содержание гранул серотонина (469,3±22,4), которое не отличается от этого показателя здоровых лиц из группы контроля (447,9±19,6). На высоте приступа мигрени содержание гранул серотонина в тромбоцитах катастрофически (почти в 10 раз) падает: их количество составляет всего 47,7±7,4 ($p$<0,001). В качестве иллюстрации приводим цифровые микрофотографии (электронное увеличение в 1350 раз) гранул серотонина в тромбоцитах здорового человека, окрашенных по методу Фонтана—Массона, (рис. 1, А) и больной с мигренью в межприступном периоде (рис. 1, Б), на которых определяются гранулы в большом количестве, и той же больной во время приступа мигрени (рис. 1, В), где визуализирован дефицит гранулярного серотонина.

Во время мигренозного приступа концентрация растворенного в сыворотке крови серотонина, установленная методом иммуноферментного твердофазного анализа с помощью тест-системы ELISA, наоборот, достоверно ($p$<0,001) повышается — до 345,5±39,1 нг/мл, относительно его концентрации как у здоровых лиц (184,2±12,3 нг/мл), так и больных с мигренью в межприступном периоде (221±28,3 нг/мл). Это свидетельствует о выходе, буквально «бегстве» гранулярного, физиологически малоактивного серотонина тромбоцитов из его гуморального депо в свободный серотонин плазмы крови с одновременным срочным экстрагированием в мочевыделительную систему. Это, очевидно, во многом обусловливает патофизиологический механизм мигрени (кортикальную депрессию Лео, тригеминально-вазомоторную реакцию, отек мозга, асептическое воспаление оболочек и др.) и клинический паттерн мигренозного приступа. Выведение серотонина с мочой проявляется его дефицитом в тромбоцитах, а также плазме крови непосредственно в постприступной фазе мигрени.

Таким образом, наши данные подтверждают феномен выброса во время приступа мигрени депонированного в тромбоцитах эндогенного серотонина в плазму, о чем свидетельствует низкое содержание гранул серотонина в тромбоцитах и увеличение его концентрации в сыворотке крови.

Каскад гранулярного серотонина тромбоцитов во время приступа мигрени не может, очевидно, не отразиться на их морфологических характеристиках, и если они изменяются, можно предположить развитие аналогичных цитоморфологических изменений и нейронального серотонина.

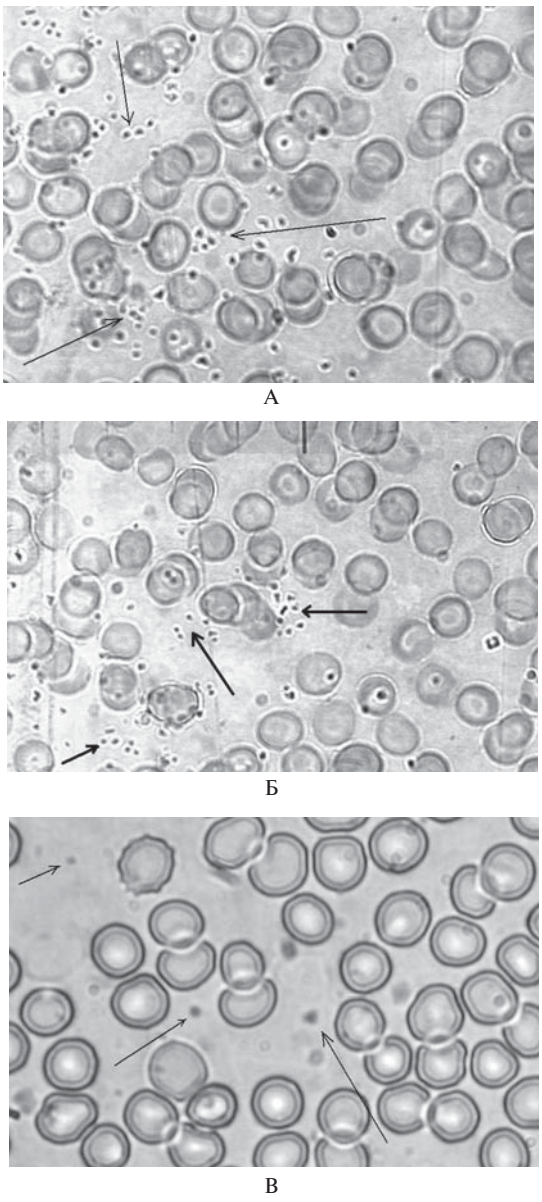


***Рис. 1.*** **Гранулы серотонина в тромбоцитах крови.**

А — практически здорового человека; Б — больной с мигренью в межприступном периоде; В — этой же больной во время приступа мигрени. Ув. 900.

Нами проведена морфометрия гранул серотонина в тромбоцитах периферической крови больных с мигренью во время приступа и межприступном периоде заболевания. В доступной литературе подобных исследований не обнаружено.

## Материал и методы

Исследуемая группа состояла из 20 больных с мигренью, 14 женщин и 6 мужчин в возрасте 23—47 лет (средний — 34,6±8,0 года), 17 пациентов — с мигренью без

**Морфометрические показатели гранул серотонина в тромбоцитах периферической крови больных с мигренью и здоровых лиц**

| Основные статистические параметры | Морфометрические показатели, мк | | | |
|---|---|---|---|---|
| | площадь | диаметр | длина | ширина |
| | *Межприступный период* | | | |
| Показатель минимальный, min | 0,152 | 0,220 | 0,105 | 0,102 |
| максимальный, max | 0,318 | 0,349 | 0,566 | 0,430 |
| средний, M | 0,205 | 0,283 | 0,320* | 0,275* |
| Среднее статическое отклонение, σ | 0,037 | 0,034 | 0,076 | 0,056 |
| Количество исследованных гранул | 228 | 228 | 228 | 228 |
| | *Период приступа мигрени* | | | |
| Min | 0,152 | 0,240 | 0,210 | 0,115 |
| Max | 0,332 | 0,343 | 0,447 | 0,265 |
| M | 0,231* | 0,286 | 0,325* | 0,290* |
| σ | 0,595 | 0,030 | 0,066 | 0,053 |
| Количество исследованных гранул | 245 | 245 | 245 | 245 |
| | *Здоровые лица* | | | |
| Min | 0,152 | 0,220 | 0,408 | 0,168 |
| Max | 0 ,263 | 0,320 | 0,944 | 0,447 |
| M | 0,190 | 0,266 | 0,639 | 0,316 |
| σ | 0,028 | 0,026 | 0,144 | 0,067 |
| Количество исследованных гранул | 240 | 240 | 240 | 240 |

*Примечание.* * — $p>0,05$ — достоверные различия средних показателей (*M*) у больных с мигренью и здоровых лиц из группы контроля; мк — микроны.

ауры, 3 — с аурой. В контрольную группу вошли 10 здоровых лиц аналогичного возраста и пола.

У обследуемых утром натощак из пальца забирали 1—2 капли крови на чистое предметное стекло, предварительно выдержанное в эксикаторе над парами 40% раствора формалина в течение 1—2 мин. Из свежей капли крови готовили мазок, который еще влажным подвергали воздействию паров формалина, а затем фиксировали, проводя над пламенем спиртовки 3—4 раза. Зафиксированный таким образом мазок окрашивали по методу Фонтана—Массона [7, 10]: выдерживали в растворе нитрата серебра при температуре 56—58°С в течение 50—60 мин, затем промывали дистиллированной водой и выдерживали в 5% растворе тиосульфата натрия (5 г щелочного тиосульфата натрия растворяли в 100 мл дистиллированной воды) 4—6 мин. Окрашенный мазок высушивали на воздухе и при 900-кратном увеличении микроскопа просматривали 100 тромбоцитов, подсчитывая в них количество гранул серотонина.

Мазки крови после серебрения исследовали на установке OLIMPUS. Подсчет гранул серотонина проводили в автоматическом режиме обработки изображений с использованием программы Морфология-мастер. Калибровочную шкалу устанавливали со стандартного микрометра, снятого при рабочем инструментальном увеличении (×1350) и занесенного в рабочую программу. Регистрировали площадь, диаметр, длину и ширину гранул серотонина. Результаты фиксировали на цифровой аппарат и обрабатывали на персональном компьютере.

Статистический анализ проводили в помощью непараметрического критерия Вилкоксона для двух зависимых групп.

## Результаты

Количественные показатели морфометрического исследования гранул серотонина тромбоцитов больных с мигренью представлены в таблице. Видно, что при этом заболевании имеется ряд морфометрических особенностей гранулярного серотонина. В частности, в межприступном периоде мигрени наиболее информативны средние показатели, характеризующие площадь и диаметр (объем) гранул, которые несколько большего размера, чем в контроле. В то же время величины, указывающие на длину и ширину гранул, существенно уступают аналогичным данным у здоровых. Создается впечатление, что в межприступном периоде мигрени гранулы серотонина структурно более выражены: полнотелы, полновесны, концентрированны. Во время мигренозного приступа морфометрические показатели немногочисленных оставшихся в тромбоцитах гранул серотонина продолжают претерпевать значительные изменения, увеличиваясь в размерах (особенно диаметр (объем) и площадь); гранулы набухают от избытка 5-НТ. Можно предположить, что и те гранулы серотонина, которые в приступе были «вымыты» из тромбоцитов, предварительно также претерпели аналогичные изменения и, достигнув критической массы, разрешились каскадом выброса в плазму крови. Это явление отчетливо прослеживается на параметрах, характеризующих прежде всего увеличение массы гранулы с нарастанием диаметра (объема) и площади (рис. 2).

Мы полагаем, что ферментативные реакции, обеспечивающие в межприступном периоде мигрени процесс экстрагирования серотонина из плазмы крови и накопления его в виде гранул в тромбоцитах (процесс депонирования), а также во время приступа осуществляющие обратную трансформацию серотонина гранулярного в плазменный, имеют однотипное морфологическое отображение.

Таким образом, хотя количественные показатели гранулярного серотонина у больных в межприступном периоде мигрени и здоровых лиц практически идентичны, их морфометрические характеристики имеют различия. Основные средние показатели, характеризующие диаметр

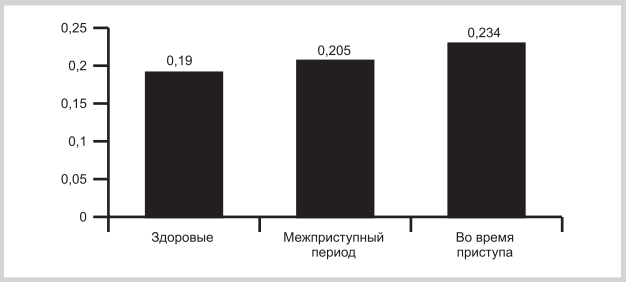



***Рис.2.*** **Средняя площадь гранул серотонина у больных мигренью.**
По оси абсцисс — обследованные, по оси ординат — площадь гранул (мк).

и площадь гранул при мигрени, превышают таковые у здоровых лиц: тромбоциты «вынашивают» гранулы серотонина. Во время приступа немногочисленные гранулы серотонина, оставшиеся в тромбоцитах, еще больше увеличивают практически все морфометрические параметры. Это явление отчетливо прослеживается на одном из интегративных морфометрических показателей — средней площади гранул серотонина (см. рис. 2). Следовательно, ферментативные реакции, обеспечивающие в приступе мигрени трансформацию инактивного, депонированного в гранулах серотонина в свободный серотонин плазмы, имеют структурное отображение.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Амелин А.В., Игнатов Ю.Д., Скоромец А.А.* Мигрень (патогенез, клиника и лечение). Ст-Петербург: Мед изд-во 2001; 199.
2. *Ашмарин И.П.* Биохимия мозга. Ст-Петербург 1999; 328: 13.
3. Болевые синдромы в неврологической практике. Под ред. чл.-корр. РАМН А.М. Вейна. М: МедПресс 1999; 365.
4. *Вейн А.М., Колосова О.А.* Головная боль. М 1994; 286.
5. *Громова Е.А.* Серотонин и его роль в организме. М: Медицина 1996; 182.
6. *Карлов В.А., Яхно Н.Н.* Мигрень, пучковая головная боль, головная боль напряжения. В кн.: Болезни нервной системы. М: Медицина 1995; 2: 325—337.
7. *Лили Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия. Пер. с англ. М: Мир 1969; 845.
8. *Отеллин В.А., Курченко Р.П., Гилерович Е.Г.* Структурные основы участия серотонинергической системы в интегративной деятельности мозга: Сб. ст. М 1988; 136—138.
9. *Прусинский А.* Мигрень. М 1979; 160.
10. *Саркисов Д.С., Перов Ю.Я.* Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов. М: Медицина 1996; 389.
11. *Хауликэ И.* Вегетативная нервная система. Бухарест: Медицинское издательство 1978; 121—132.
12. *Шутов А.А., Иззати-заде К.Ф.* Возможности метода определения связанного серотонина в тромбоцитах периферической крови для диагностики приступа мигрени. Клиническая лабораторная диагностика 2002; 9: 39.
13. *Antony M., Hinterberger H., Lance J.W.* Plasma serotonin in migraine and stress. Arch Neurol 1967; 16: 544.
14. *Antony M., Hinterberger H., Lance J.W.* The possible relationship of serotonin to the migrane syndrome. Res Clin Stad Headache 1969; 2: 295—307.
15. *Dahlstrom A., Fuxe K.* Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. Acta Physiol Scand 1965; 64: 1—85.
16. *Fozard J.R.* Serotonin, migrane and platelets. Progressive Pharmacol 1982; 414: 135—146.
17. *Hamlin E., Fisher E.J.* The synthesis of 5-HT. Amer Chem Soc 1951; 73: 10: 3007—5008.
18. *Kimball R.W., Friedman A.P., Vallegjo E.* Effect of serotonin in migraine patients. Neurology 1960; 10: 107—111.
19. *Lance J.W., Anthony M., Gonsci A.* Serotonin, the carotid body, and cranial vessels in migrane. Arch Neurol 1967; 16: 553.
20. *Lance J.W.* Fifty years of migraine research. Aust NZ J Med 1988; 18: 311—317.
21. *Lancer J.W.* Mechanism and management of headache. London 1982; 86.
22. *Martin G.R.* Vascular receptors for 5 Hydroxitriptamine: Distribution, function, and classification. Pharmacol Ther 1994; 62: 283.
23. *Mayeux R., Stern Y., Sano M. et al.* The relationships of serotonin to depression in Parkinson·s disease. Movement disorders 1988; 3: 3: 237—244.
24. *Olanow C., Ray L., Watts M., Williams C.* An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson·s disease (2001): treatment guidelines. Neurology 2001; 56: 11: Suppl 5: 1—88.
25. *Ostfeld A.M., Wolff H.G.* Studies on headache: arterenol (norepinepherine) and vascular headache of the migrane type. Arch Neurol Psychiat 1955; 74: 131.
26. *Rapport M., Green A., Page J.J.* Serum vasoconstrictor Serotonin. Biol Chem 1949; 176: 1243—1251.
27. *Rapport M.* Serum vasoconstrictor Serotonin presence of creatine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor principle. Biol Chem 1949; 180: 961—969.
28. *Sicurety F., Testi A., Anselmi B.* Biochemical investigation in headache. Int Arch Allergy Appl Immunol 1995; 55.
29. *Stahl S.M.* Platelets as pharmacological models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons the platelets. Physiology and Pharmacology. Eds G.L. Longenesker. Academic Press INC 1985; 308—334.