

*От редакции*

Представленная работа классифицируется как фундаментальное исследование. Авторы на основе собственного эксперимента описали патоморфологическую модель развития мигренозного приступа и определили его информативный морфологический маркер, лабораторное мониторирование которого позволяет проводить превентивную терапию.

## Гистохимический и морфометрический анализ гранул серотонина в тромбоцитах периферической крови при мигрени

К. Ф. Иззати-заде, А. А. Шутов

Кафедра неврологии лечебного факультета,  
ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика А. А. Вагнера Росздрава» г. Пермь

### Резюме

По методу Фонтана-Массона у 63 больных мигренью окрашивали тромбоциты периферической крови и регистрировали в них количество гранул серотонина (С) в межприступный период и во время мигренозного приступа. Выявлено высокое количественное содержание гранул С в 100 тромбоцитах крови в межприступный период —  $469,3 \pm 22,4$ , что достоверно не отличается от показателя здоровых лиц (группа контроля) —  $447,9 \pm 19,6$ . На высоте приступа содержание С снижается до  $47,7 \pm 7,4$ . Предпринята также морфометрия гранул С в тромбоцитах периферической крови больных мигренью, в межприступном периоде и во время приступа. Исследуемая группа включала 20 больных с мигренью (17 — без ауры, 3 — с аурой), из которых было 14 женщин и 6 мужчин в возрасте 23–47 лет (средний возраст  $34,6 \pm 8,0$  года). В контрольную группу вошли 10 практически здоровых лиц. Во время мигренозного приступа морфометрические показатели немногочисленных оставшихся в тромбоцитах гранул С еще претерпевают значительные изменения: они увеличиваются в общих размерах. Гранулы набухают от избытка 5-окситриптамина. Полученные данные свидетельствуют не только о выбросе депонированного гранулярного С из тромбоцитов в плазму крови во время приступа мигрени, но и об изменениях качественных морфометрических показателей гранулярного серотонина, что может служить лабораторным методом мониторинга развития приступа.

**Ключевые слова:** мигрень, серотонин, тромбоциты, диагностика, морфометрический анализ.

Известно, что мигрень является болезнью тромбоцитов, так как почти весь серотонин (С), находящийся в крови, содержится именно в тромбоцитах. Высвобождающийся из них С вызывает сужение крупных артерий, вен, расширяя в то же время мелкие сосуды мозга [7].

Тромбоциты крови человека являются адекватной экстрацеребральной моделью серотонинергических нейронов в отношении процессов обратного захвата С в серотонинергических синапсах [3, 5]. Тромбоциты крови по фармакологическим, биохимическим и морфоцитологическим свойствам идентичны серотонинергическим нейронам [8, 9, 12, 14]. Поэтому дисфункция тромбоцитарной серотониновой системы обычно сопряжена с соответствующей дисфункцией серотонинергических нейронов

мозга [1], что позволяет экстраполировать биохимические процессы, равно как и морфоструктурные изменения, происходящие с С тромбоцитов, на аналогичные явления в серотонинергических нейронах.

Показано [9, 11], что тромбоцитарный и нейрональный 5-НТТ-белок кодируется одним и тем же геном. Нарушения функционирования белка-переносчика 5-НТ смогут быть результатом изменений его первичной структуры.

Таким образом, существует возможность использования тромбоцитов в качестве периферической модели 5-НТ-серотонинергического нейрона, а также его синапса для изучения морфофункциональной организации пресинаптических и постсинаптических структур этого синапса, и, следовательно, состояния серотонинергической системы.

**Целью** исследования является уточнение некоторых вопросов роли С в патогенезе приступа мигрени. Исследовано количество и принят морфометрический анализ С в его глав-

К. Ф. Иззати-заде — к. м. н.;

А. А. Шутов — д. м. н., проф., зав. кафедры неврологии  
лечебного факультета.

ном депо — тромбоцитах периферической венозной крови в межприступном периоде заболевания, во время приступа, в послеприступном периоде и количественное содержание С в сыворотке крови на высоте приступа.

### Материалы и методы

Обследовано 63 больных мигренью в возрасте 18–42 лет (средний  $30,07 \pm 7,49$  лет), из них 44 (69%) женщин и 19 (31%) мужчин. У 21 (33%) больного диагностирована мигрень с аурой, у 42 (67%) — мигрень без ауры. В качестве группы контроля обследовано 20 практически здоровых лиц (12 женщин и 8 мужчин) в возрасте от 18 до 50 лет (средний  $34,3 \pm 8,1$  года).

У всех в межприступный период заболевания исследован связанный С тромбоцитов: содержание гранул С в 100 тромбоцитах периферической крови, окрашенных серебрением по гистохимическому методу Фонтана-Массона [4, 6].

Методика исследования: утром натошак из пальца обследуемого 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 и влажный мазок подвергали воздействию паров формалина, затем его фиксировали, проводя над пламенем спиртовки 3–4 раза. Зафиксированный таким образом мазок, окрашивали методом серебрения: выдерживали в растворе нитрате серебра при температуре  $+56-58^{\circ}\text{C}$  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.

У 33 больных (20 женщин, 13 мужчин) гранулярный С изучен во время мигренозного приступа, а также через 24, 48 и 72 часа после него. Исследуемая группа морфометрического анализа включала 20 больных с мигренью (17 — без ауры, 3 — с аурой), из которых было 14 женщин и 6 мужчин в возрасте 23–47 лет (средний  $34,6 \pm 8,0$  года). В контрольную группу вошли 10 практически здоровых лиц аналогичного возрастного-полового состава. У 19 (8 женщин и 11 мужчин) больных во время мигренозного приступа исследована концентрация растворенного С (нг/мл) сыворотки крови методом иммуноферментного твердофазного анализа с помощью тест-системы *ELISA (Serotonin ELISA, IBL, Hamburg)* [10, 13].

Гистохимическое исследование гранул С проводилось на кафедре патологической анатомии академии (зав. — проф. Г. Г. Фрейнд). Морфометрическое исследование гранул С предпринято в отделе учебно-методического и научного обеспечения академии (зав. — Н. В. Чимурзиева). Мазки крови, окрашенные серебрением, исследовались на установке «OLIMPUS». Обсчет гранул С проводился в автоматическом режиме обработки изображений с использованием программы «Морфология-мастер». Калибровочная шкала устанавливалась со стандартного микрометра, снятого при рабочем инструментальном увеличении (1350 $\times$ ) и занесенного в рабочую программу. Регистрировались площадь, диаметр, длина и ширина гранул С. Результаты фиксировались на цифровой аппарат и обрабатывались на компьютере «Pentium 550». Статистический анализ проводился в помощью непараметрического критерия Вилкоксона для двух независимых групп.

### Результаты исследования и обсуждение

В межприступном периоде у больных мигренью в 100 тромбоцитах крови определяется высокое —  $469,3 \pm 22,4$  — количественное содержание гранул С. Их количество в группе больных в целом достоверно не отличается от этого показателя здоровых лиц (группы контроля) —  $447,9 \pm 19,6$

В качестве примера приводим цифровую микрофотографию гранул С в межприступном периоде у больной мигренью, выполненную при электронном увеличении в 1350 раз, на которой определяются гранулы С в большом количестве (рис. 1) и цифровую микрофотографию гранул С в тромбоцитах здорового человека (рис. 2).

Достоверного различия показателей гранулярного С в тромбоцитах больных мигренью без ауры и мигренью с аурой не выявлено. Единственной особенностью является наличие большего количества конгломератов гранул С в тромбоцитах крови больных мигренью с аурой (рис. 3).

На высоте приступа мигрени содержание С в тромбоцитах катастрофически (почти в 10 раз!) падает: количество серотонинсодержащих гранул составляет всего  $47,7 \pm 7,4$ , ( $p < 0,001$ ).

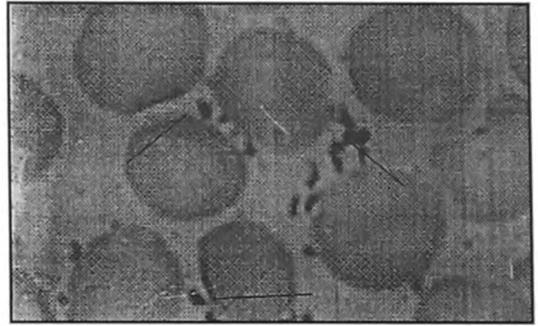
В качестве примера приводим цифровую микрофотографию гранул С больной К. во время приступа мигрени (рис. 4).

Во время мигренозного приступа концентрация растворенного С сыворотки крови, наоборот, достоверно ( $p < 0,001$ ) повышается до  $345,5 \pm 39,1$  нг/мл (относительно концентрации в сыворотке крови здоровых лиц —  $184,2 \pm 12,3$  нг/мл). Это свидетельствует о выходе, бук-

Рисунок 1. Гранулы серотонина в тромбоцитах крови больной мигренью К. в межприступном периоде (цифровая микрофотография, окрашено по Фонтан-Массону, увеличение 1350)



Рисунок 2. Гранулы серотонина в тромбоцитах крови здоровой В. (цифровая микрофотография, окрашено по Фонтан-Массону, увеличение 1350)



важно о выбросе гранулярного С из тромбоцитов в плазму крови, о срочном экстрагировании его из крови в мочевыделительную систему, что и обуславливает патофизиологический механизм и клинический каскад мигренозного приступа (кортикальную депрессию Лео, тригеминально-вазомоторную реакцию, отек мозга, асептическое воспаление оболочек и др.). Избыток его выводится с мочой, что проявляется его дефицитом непосредственно в послеприступной фазе мигрени.

В течение первых суток после приступа мигрени содержание С в тромбоцитах относительно быстро возрастает, достигая  $386,8 \pm 17,5$  гранул. Через 48 часов количество гранулярного С составило уже  $405,7 \pm 31,9$  гранул, через 72 часа —  $402 \pm 35,4$  гранулы. Таким образом, в течение последующих за приступом трех суток количество тромбоцитарного С еще не выходит на доприступный уровень.

Рисунок 3. Конгломераты гранул серотонина в тромбоцитах крови больной во время ауры мигрени К. (цифровая микрофотография, окрашено по Фонтан-Массону, увеличение 1350)

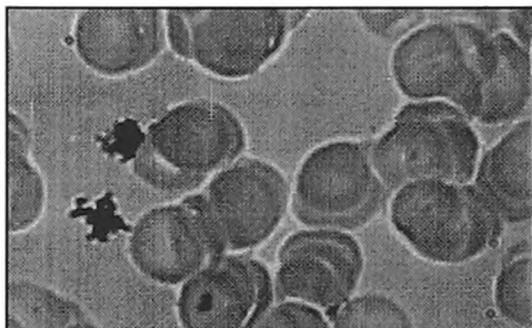
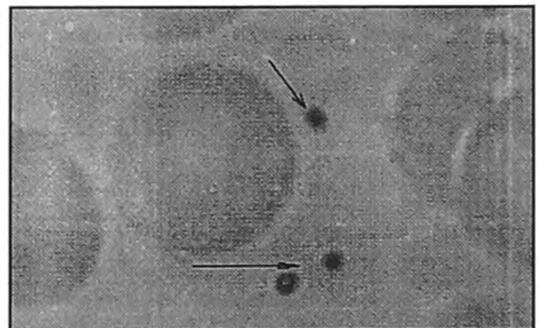


Рисунок 4. Гранулы серотонина в тромбоцитах крови больной мигренью К. во время приступа (цифровая микрофотография, окрашено по Фонтан-Массону, увеличение 1350)



Выявленная динамика содержания гранул серотонина в тромбоцитах крови представлена на рис. 5.

Полученные данные свидетельствуют о нарушении депонированного в тромбоцитах эндогенного С во время приступа мигрени и выходе связанного в них С в плазму крови, о чем свидетельствует низкое содержание гранул С в тромбоцитах и увеличение концентрации С сыворотки крови.

Нами предпринята морфометрия гранул С в тромбоцитах периферической крови больных мигренью, целью которой явилась оценка их морфометрических показателей во время приступа и в межприступном периоде заболевания. В литературе данных сведений не представлено.

Количественные показатели морфометрии (в мк) гранул С тромбоцитов больных мигренью представлены в таблице.

Рисунок 5. Содержание С в тромбоцитах крови больных мигренью во время приступа и в послеприступном периоде

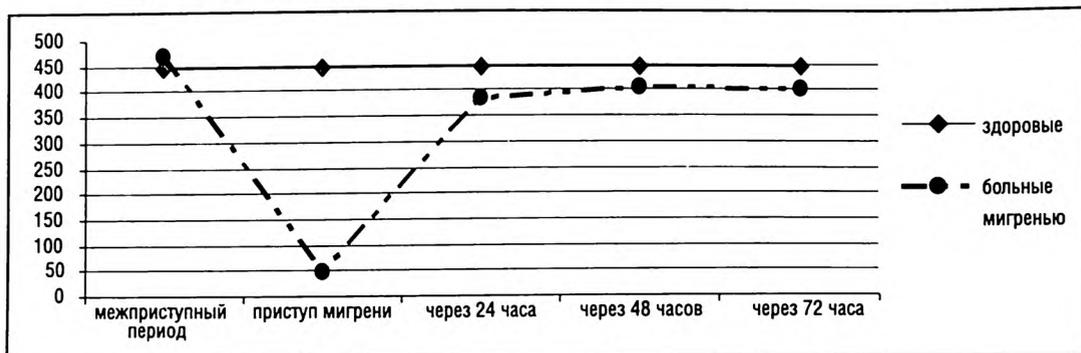


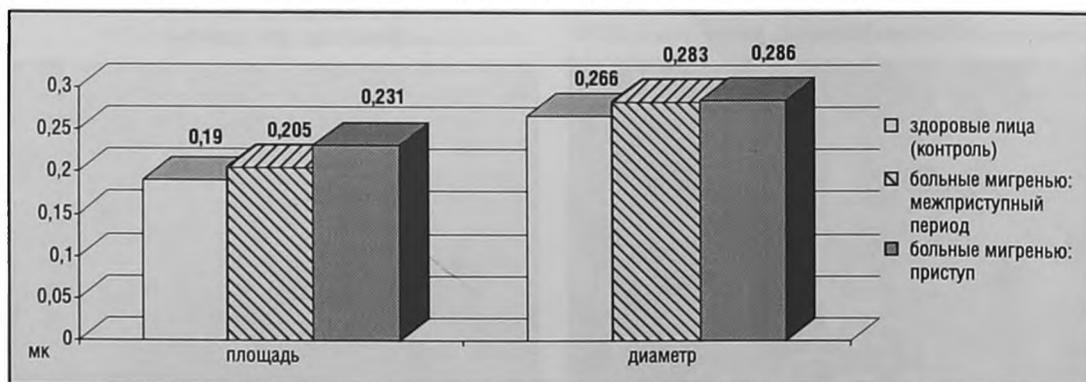
Таблица Морфометрические показатели гранул серотонина (в мк) в тромбоцитах крови больных мигренью

Больные мигренью (n = 20)	Показатели (мк)			
	площадь	диаметр	длина	ширина
<b>Межприступный период</b>				
Показатель минимальный	0,152	0,220	0,105	0,102
Максимальный	0,318	0,349	0,566	0,430
Средний	<b>0,205*</b>	<b>0,283*</b>	<b>0,320**</b>	<b>0,275**</b>
Среднее статическое отклонение	0,037	0,034	0,076	0,056
P	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05
Кол-во исследованных гранул	228	228	228	228
<b>Период приступа (n = 20)</b>				
Показатель минимальный	0,152	0,240	0,210	0,115
Максимальный	0,332	0,343	0,447	0,265
Средний	<b>0,231**</b>	<b>0,286*</b>	<b>0,325**</b>	<b>0,290*</b>
Среднее статическое отклонение	0,595	0,030	0,066	0,053
P	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
Кол-во исследованных гранул	245	245	245	245
<b>Здоровые лица (n = 10)</b>				
Показатель минимальный	0,152	0,220	0,408	0,168
Максимальный	0,263	0,320	0,944	0,447
Средний	<b>0,190</b>	<b>0,266</b>	<b>0,639</b>	<b>0,316</b>
Среднее статическое отклонение	0,028	0,026	0,144	0,067
Кол-во исследованных гранул	240	240	240	240

Примечание. P – достоверность различий средних показателей больных мигренью и контролем.

\* –  $P < 0,05$ . \*\* –  $P > 0,05$ .

Рисунок 6. Средняя площадь и диаметр (мк) гранул серотонина при мигрени



Из таблицы видно, что при этом заболевании, в отличие от здоровых лиц, имеется ряд морфометрических особенностей гранулярного С. В частности, в межприступном периоде больных мигренью наиболее информативные средние показатели, характеризующие площадь и диаметр (объем) гранул, несколько большего размера, чем в контроле. В то же время, величины, указывающие на длину и ширину гранул, существенно уступают аналогичным данным контроля. Создается впечатление, что в межприступном периоде мигрени гранулы С структурно более полнотелы, полновесны, концентрированы. Во время мигренозного приступа морфометрические показатели немногочисленных оставшихся в тромбоцитах гранул С еще претерпевают значительные изменения: они увеличиваются в общих размерах. Все их величины, особенно диаметр (объем), площадь, становятся еще больше, гранулы набухают от избытка 5-окситриптамина. Можно предположить, что и те гранулы С, которые были «вымыты» из тромбоцитов, предварительно также претерпели аналогичные изменения, достигли «критической массы» и разрешились каскадом выброса в плазму.

Это явление отчетливо прослеживается на параметрах, характеризующих прежде всего увеличение массы гранулы — диаметра (объема) и площади (рис. 6).

Мы полагаем, что ферментативные реакции, обеспечивающие в межприступном периоде мигрени процессы экстрагирования С из плазмы и формирования, накопления его в гранулах тромбоцитов (процесс депонирования), во время приступа осуществляют обратную трансформацию гранулярного С в плазменный, сопровождаясь морфоструктурными

изменениями изучаемых объектов. Полученные данные свидетельствуют о нарушении депонированного в тромбоцитах эндогенного С во время приступа мигрени и выходе связанного в них С в плазму крови, о чем свидетельствует низкое содержание гранул С в тромбоцитах и увеличение концентрации С сыворотки крови. Хотя количественные показатели гранулярного С больных в межприступном периоде мигрени и здоровых лиц практически идентичны, морфометрические их характеристики имеют различия. Средние показатели, характеризующие диаметр и площадь гранул у больных мигренью, значимо превышают таковые у здоровых лиц: образно говоря, тромбоциты «вынашивают» гранулы С. Во время приступа немногочисленные гранулы С, оставшиеся в тромбоцитах, еще больше увеличивают все свои морфометрические характеристики.

Таким образом, гистохимический и морфометрический метод определения связанного С в тромбоцитах крови и количественной констатации растворенного С в сыворотке крови могут служить лабораторными методами мониторинга развития приступа мигрени. Их можно использовать для дифференциальной диагностики приступа мигрени от пароксизмов других цефалгий, при которых, по данным литературы [2], нет такой динамики показателей С. Перспективен также возможный контроль эффективности купирования приступа мигрени агонистами серотониновых 5HT<sub>1D</sub> и 5HT<sub>1B</sub> — рецепторов (суматриптан, ризатриптан, наратриптан, золмитриптан и др. триптаны) и анализ терапевтической эффективности препаратов, действующих через 5HT<sub>2B/2C</sub> — рецепторы эндотелия церебральных сосудов (бета-адреноблокаторы, амитриптилин, метисергид, тропоксин).

## Литература

1. Ашмарин И. П. Биохимия мозга. СПбГУ. 1999; 328: 13.
2. Вейн А. М. Головная боль. Вейн А. М., Колосова О. А., Яковлев Н. А., Каримов Т. К. М., 1994; 14–55.
3. Громова Е. А. Серотонин и его роль в организме. М: Медицина, 1996; 182.
4. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия: пер. с англ. М.: Мир: 1969: 845 с.
5. Отеллин В. А. Структурные основы участия серотонинергической системы в интегративной деятельности мозга. Структурно-функциональные основы интегративной деятельности мозга: Сб. ст. В. А. Отеллин, Р. П. Курченко, Е. Г. Гилерович. М., 1988; 136–138.
6. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов. Саркисов Д. С., Перов Ю. Я. М.: Медицина: 1996; 389.
7. Dimitriadou V. Ultrastructural evidence for permeability and neuroinflammatory changes within the dura mater and tongue after trigeminal sensory fiber stimulation. Dimitriadou V., Buzzi M. G., Theoharides T., Moskowits M. A. Neurosci., 1992; 48: 187.
8. Langer S. Z., Studies on the serotonin transporters in platelets. Langer S. Z., Glazin A. M., Exp. 1988; 44: 127–131.
9. Lesch K. P., Primary structure of the human platelet serotonin uptake site identify with the brain serotonin transporter. Lesch K. P., Wolozin B. L., Murphy D.L. J. Neurochem. 1993; 60: 2319–2322.
10. Mayeux R. The relationships of serotonin to depression in Parkinson, s disease. Mayeux R., Y. Stern, MSano, J. Williams, L. Cote. Movement dis. 1988: 3: 3: 237–244.
11. Moret C. Platelet 3H-Paroxetine binding to the serotonin transporter is insensitive to changes in central serotonergic innervation in the rat. Moret C., Briley M. Psychiatry Res. 1991; 18: 447–456.
12. Muscettola G. Blood cells as biological trait markers in affective disorders. Muscettola G., Di Lauro A., Giannini C. P. J. Psychiatr. Res. 1984; 18: 447–45
13. Olanow C. W. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson, s disease (2001): treatment guidelines. Olanow C., Ray L., Watts M., Williams C. Neurology. 2001; 56: 11(5): 1–88.
14. 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.