

НЕКОТОРЫЕ КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ГОЛОВНОЙ БОЛИ НАПРЯЖЕНИЯ У ДЕТЕЙ

Зайцева О.И.^{1,2}, Колодяжная Т.А.¹, Эверт Л.С.¹

¹ ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», Красноярск, e-mail: imprn@imprn.ru;

² ФГБОУ ВО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, e-mail: office@krasnil.ru

С целью изучения эффекторных звеньев серотонинергической и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем на уровне клеточных мембран и их участия в формировании хронической головной боли напряжения у детей методом микрофлуориметрии с использованием флуоресцентного зонда хлортетрациклина и экзогенных биорегуляторов (серотонина и дексаметазона) исследованы эритроцитарные мембраны. Установлены величины показателей чувствительности клеточных мембран к серотонину и дексаметазону для детей со стабильным эмоциональным состоянием с эпизодической головной болью напряжения. Для детей с хронической головной болью напряжения характерным было снижение чувствительности мембран к серотонину, определяемое по пиковому и скоростному показателям флуоресценции с серотонином, а также повышение чувствительности мембран к дексаметазону, устанавливаемое по пиковому и скоростному показателям флуоресценции с этим гормоном. Следовательно, на клеточном уровне формируются начальные признаки трансформации (неблагоприятного течения) эпизодической головной боли напряжения в хроническую головную боль напряжения. Поэтому выявленные отклонения могут служить сильным и независимым предиктором трансформации эпизодической головной боли напряжения в хроническую головную боль напряжения, а также являться значимыми диагностическими факторами риска развития хронической головной боли напряжения у детей.

Ключевые слова: дети, головная боль напряжения, эритроцит, мембрана, биорегуляторы.

SOME CELLULAR AND MOLECULAR ASPECTS THE FORMATION OF CHRONIC TENSION HEADACHE IN CHILDREN

Zaitseva O.I.^{1,2}, Kolodyazhnaya T.A.¹, Evert L.S.¹

¹FRC KSC SB RAS, KSC SB RAS "Medical Scientific Research Institute of Northern Problems", Krasnoyarsk, e-mail: imprn@imprn.ru;

²FSBEE HE «Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenezkiy», Krasnoyarsk, e-mail: office@krasnil.ru

To study the effect or links of the serotonergic and hypothalamic-pituitary-adrenal systems at the level of the cell membranes and their participation in the formation of chronic tension headache in children with microfluorimetry using the chlorotetracycline fluorescent probe and exogenous bioregulators (serotonin and dexamethasone), the erythrocyte membranes. The values of sensitivity parameters of cell membranes to serotonin and dexamethasone for children with a stable emotional state with episodic tension headache were established. For children with chronic tension headaches, a decrease in the sensitivity of the membranes to serotonin, determined by the peak and speed indices of fluorescence with serotonin, was also characteristic, as well as an increase in membrane sensitivity to dexamethasone, determined by the peak and fluorescence rate with this hormone. Consequently, at the cellular level, the initial signs of the transformation (unfavorable course) of episodic tension headache in chronic tension headache are formed. Therefore, the revealed deviations can serve as a strong and independent predictor of the transformation of episodic tension headache into chronic tension headache and are significant diagnostic risk factors for the development of chronic tension headache in children.

Keywords: children, tension headache, erythrocyte, membrane, bioregulators.

Головная боль относится к частым жалобам в детском и подростковом возрасте. Первичная головная боль – это самостоятельная патология, не связанная с заболеваниями, которые могут служить причиной возникновения головной боли. Одной из наиболее

распространенных форм первичных головных болей является головная боль напряжения (ГБН). Распространенность ГБН среди школьников варьирует от 5,9 до 82 % в зависимости от используемых исследователями критериев диагностики [1-3].

В настоящее время доказана ведущая роль серотонинергической нейромедиаторной системы в контроле ноцицепции [4]. Для поддержания паттерна хронической боли необходимо наличие коморбидных тревожно-депрессивных расстройств и гиперсенсibilизации вследствие пониженного уровня серотонина и повышения уровня кортизола [5-7]. Некоторые авторы утверждают, что ХГБН у детей возникает в результате дисбаланса в общих нейромедиаторных (серотониновой, ноцицептивной, антиноцицептивной) и нейрогуморальных (гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой) структурах, представленных на различных уровнях целостного организма, включая мембранные системы клеток, содержащие рецепторы к многочисленным биологически активным веществам [8]. Ряд исследователей считают, что нарушение функции рецепторов есть причина патологии клеток [9, 10]. На мембранах эритроцитов содержатся рецепторы к различным биологически активным веществам, включая ацетилхолин (М-холинорецепторы), адреналин (альфа и бета-адренорецепторы), серотонин (5-НТ) и дексаметазон (участки связывания белковой природы нерцепторного характера) [11,12]. Для выявления дополнительных звеньев патогенеза ХГБН, возможности получения ранних маркеров диагностики ХГБН, а также возможности объективного контроля за эффективностью лечения ХГБН фармацевтическими препаратами из группы антидепрессантов с серотонинергической активностью, необходимо знать не только содержание ключевых гормонов, определяющих эмоции и влияющих на болевой порог восприятия в организме в целом (серотонина и дексаметазона в крови), но и состояние их эффекторных звеньев на уровне клеточных мембран, т.е. чувствительность клеток к серотонину и к дексаметазону.

В этой связи целью исследования являлось изучение состояния эффекторных звеньев клеточных мембран к биорегуляторам (ключевым гормонам ноцицепции и эмоций – серотонину и к дексаметазону) для оценки риска развития ХГБН у конкретного ребенка.

Материал и методы исследования

Обследовано 104 школьника в возрасте от 10 до 16 лет (45 мальчиков и 59 девочек). Из них 76 детей с хронической головной болью напряжения (ХГБН, частота приступов более 15 дней в месяц), 28 детей со стабильным эмоциональным состоянием с эпизодической головной болью напряжения (ЭГБН, нечастые приступы: менее 1 дня в месяц). Диагноз устанавливался на основании подробных анамнестических данных, совокупности клинических признаков, данных электроэнцефалографии, ультразвуковой доплерографии сосудов головного мозга. Диагноз верифицирован в соответствии с регламентирующими

документами, содержащими основные принципы и диагностические критерии всех известных типов цефалгий и тактику ведения пациентов с головной болью, по Международной классификации расстройств, сопровождающихся головной болью 3-го пересмотра (МКГБ-3, разработана Международным обществом головной боли, 2013).

Возможности ответной реакции детского организма на уровне клеточных мембран оценивали при помощи метода микрофлюориметрии с применением функциональных проб. Для функциональных проб использовались готовые фармакологические препараты (серотонин и дексаметазон), вводимые в физиологических дозах в суспензию мембран эритроцитов *in vitro*. Определяли чувствительность клеточных мембран по уровню хлортетрациклиновой зондовой спектроскопии мембран эритроцитов, основываясь на том, что хлортетрациклиновый флуоресцентный зонд обладает Са-аккумулирующей способностью в липидном бислое [12].

Способ осуществляют следующим образом.

Предварительно готовят суспензию мембран эритроцитов. Для этого отбирали пробу замороженных эритроцитов объемом 65 мкл, полученных из цельной венозной крови путем трехкратного отмывания физиологическим раствором. Затем по методу Доджа проводили выделение мембран эритроцитов, добавляя 2 мл 0,9 % физиологического раствора, получали суспензию мембран эритроцитов.

Предварительно готовили рабочие растворы.

Хлортетрациклин (ХТЦ): использовали фармакологический препарат хлортетрациклин гидрохлорид, содержащий в одной капсуле 0,1 г вещества. Растворяли 10 мг препарата в 1 мл физиологического раствора (основной раствор). К 10 мкл основного раствора добавляли 10 мл физиологического раствора и получали рабочий раствор, содержащий 10 мкг хлортетрациклина в 1 мл.

Дексаметазон (ДМЗ): использовали ампульный фармакологический препарат дексаметазон, содержащий 4 мг вещества в 1 мл (основной раствор). К основному раствору добавляли 4 мл 96 % спирта (рабочий раствор).

Серотонин (СРТ): использовали фармакологический препарат серотонин (Serotonin Biotin), ELISA (RE59121) V 2009_09 8/10 Гамбург, Германия. К 1 мл готового препарата добавляли 10 мл дистиллированной воды (рабочий раствор).

Для определения кинетики взаимодействия мембран эритроцитов с препаратами брали из пробы суспензии мембран эритроцитов по 100 мкл в каждую из 2-х лунок планшеты. Затем в каждую пробу вводили один из следующих препаратов в дозах, соответствующих их физиологическим концентрациям в крови ребенка школьного возраста: 20 мкл рабочего раствора дексаметазона и 20 мкл рабочего раствора серотонина. В каждой

пробе измеряли исходный уровень флуоресценции при длине волны флуоресценции 400 нм и длине волны возбуждения 360 нм. Затем в каждую пробу вводили зонд хлортетрациклина (20 мкл) и измеряли флуоресценцию в течение 30 минут с интервалом через 30 секунд. Замер производили на спектрофлуориметре CaryEclipse, серийный номер EL 99113601. Производство – США. В планшет с лунками: А – помещали суспензию эритроцитарных мембран + дексаметазон+хлортетрациклин, В – суспензию эритроцитарных мембран +серотонин + хлортетрациклин при комнатной температуре с обеспечением стабильной диффузии. Результаты выражали в условных единицах (усл. ед.).

Вычисляли скорость включения биорегуляторов по следующей формуле: $V \text{ включения} = (F \text{ пик} - F \text{ нач.}) / T \text{ пик. фл.}$, где: $V \text{ включения}$ – усл. ед./мин; $F \text{ пик}$ – показатель пика флуоресценции, усл. ед.; $F \text{ нач.}$ – показатель начальной флуоресценции, усл. ед., $T \text{ пик. флуоресценции}$ – показатель времени достижения пика флуоресценции, мин.

Цифровой материал обработан стандартным пакетом программ STATISTICA, ver. 6.0. Количественные признаки оценивались с помощью непараметрического критерия Манн – Уитни (M-W) при сравнении двух несвязанных выборок. Результаты исследования количественных показателей в группах сравнения представлены в виде медианы и 25 % – 75 % интервала Me (LQ-UQ), где Me – медиана, LQ – 25 % процентиль, UQ – 75 % процентиль. Для расчета риска был использован показатель отношения шансов с 95 % доверительным интервалом.

Результаты исследования и их обсуждение

Учитывая, что головная боль напряжения провоцируется хроническими психоэмоциональными перегрузками, стрессами, конфликтными ситуациями, а также выявляется семейная предрасположенность, особенно с материнской стороны, мы проанализировали данные анамнеза и выявили значимые факторы риска, способствующие развитию ГБН у детей.

При помощи показателя отношения шансов с 95 % доверительным интервалом были установлены критерии риска развития ХГБН у детей. Количественные данные проведенного анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1

Значимые анамнестические факторы риска развития ХГБН у детей

Фактор риска	Показатель отношения шансов	95 % Доверительный интервал
Психотравмирующие ситуации	3,03	1,137–8,076
Перинатальное поражение центральной нервной системы	3,28	1,864–5,795

Гипертоническая родителей	болезнь у	2,21	1,19–4,10
------------------------------	--------------	------	-----------

Как следует из представленных данных, выявляемые анамнестически психотравмирующие ситуации (конфликты в школе с одноклассниками, с учителем, конфликты с родителями, развод родителей) в 3 раза увеличивают риск развития ГБН у детей. Риск развития ГБН у детей значительно увеличивается (в 3 раза) в случае перинатального поражения центральной нервной системы ребенка, регистрируемый в период раннего детства. Кроме того, риск развития ГБН у детей существенно возрастает (2,21 раза) при наличии у одного из родителей ребенка гипертонической болезни. Характерно, что выявленные нами факторы риска напрямую связаны с функционированием нейромедиаторных систем головного мозга.

Следующим звеном наших исследований явился анализ показателей чувствительности эритроцитарных мембран к ключевым биорегуляторам (нейротрансмиттерам и гормонам) ноцицепции и эмоций: серотонину и дексаметазону у детей с ХГБН в сравнении с детьми с ЭГБН. Результаты представлены в таблице 2.

Величины показателей чувствительности клеточных мембран среди детей со стабильным эмоциональным состоянием с ЭГБН принимались за критериально значимые, с учетом диапазона значений от 25 % – 75 % распределения данных показателей и служили для сравнения при сопоставлении с аналогичными показателями у детей с ХГБН.

Таблица 2

Показатели чувствительности мембран эритроцитов при нагрузочных пробах с биорегуляторами у детей с хронической головной болью напряжения
(в условных единицах)

Показатели флуоресценции зонда ХТЦ с биорегуляторами		Анализируемые группы		Статистическая значимость (P)
		Дети с ХГБН n=76	Группа сравнения n=28	
		[1]	[2]	по M-W
ФЛ пик. СРТ (усл. ед.)	Me	26,05	30,00	P1-2=0,0408
	25 % – 75 %	22,58– 33,62	27,60– 33,20	
V включ. СРТ (усл. ед./ мин)	Me	0,33	0,74	P1-2=0,0039
	25 % – 75 %	0,17– 0,67	0,43– 0,94	
ФЛпик. ДМЗ (усл.ед.)	Me	45,16	36,30	P1-2=0,0001
	25% – 75%	38,68– 50,11	30,80– 38,90	

V включ. ДМЗ (усл. ед./ мин)	Me	0,59	0,41	P1-2=0,0035
	25 %о – 75 %о	0,42– 0,75	0,32– 0,54	

У детей с ХГБН регистрировалось в сопоставлении с группой сравнения статистически значимое снижение пикового ($P=0,0408$) и скоростного ($P=0,0039$) показателей флуоресценции с серотонином и статистически значимое повышение пикового ($P=0,0039$) и скоростного ($P=0,0039$) показателей флуоресценции с дексаметазоном. Эти данные свидетельствуют о модификациях дизрегуляторного характера в клеточных регуляторных системах на уровне мембран, сопровождающиеся угнетением серотонинергической системы и активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой структуры. Выявленные отклонения могут служить сильным и независимым предиктором трансформации НЭГБН в ХГБН.

Рассчитаны значимые факторы риска развития ХГБН у детей. Результаты представлены в таблице 3.

Критериями риска развития ХГБН у детей служат следующие показатели: низкий пиковый показатель флуоресценции с серотонином в 5 раз увеличивает риск развития ХГБН, а также высокий пиковый показатель флуоресценции с дексаметазоном почти в 8,5 раз увеличивает риск хронизации головной боли напряжения и высокий скоростной показатель флуоресценции с дексаметазоном почти в 4 раза повышают риск развития ХГБН у детей. Следовательно, при отклонении значения одного из этих показателей ниже или выше указанных величин регистрируется высокий риск развития ХГБН у детей.

Таблица 3

Значимые биофизические факторы риска развития ХГБН у детей

Фактор риска	Показатель отношения шансов	95 % Доверительный интервал
СТ пик $<N$ ($<27,8$ усл. ед.)	5,25	1,66 – 16,43
Пик ДМЗ $>N$ ($>38,9$ усл. ед.)	8,45	2,76 – 25,60
V вкл ДМЗ $>N$ ($>0,54$ усл. ед./мин)	3,90	1,32 – 11,47

Заключение

Таким образом, показатели чувствительности эритроцитарных мембран к серотонину и дексаметазону адекватно отражают состояние эффекторных звеньев на уровне клеточных мембран нейромедиаторной серотонинергической системы и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой структуры у детей. Определены параметры показателей чувствительности

клеточных мембран к серотонину и дексаметазону для детей со стабильным эмоциональным состоянием с ЭГБН. Установлены на уровне клеточных мембран первые признаки трансформации (неблагоприятного течения) ЭГБН в ХГБН. Значимыми факторами риска развития ХГБН у детей служат следующие показатели: низкая чувствительность мембран к серотонину, определяемая по пиковому показателю флюоресценции с серотонином, а также высокие параметры чувствительности мембран к дексаметазону, регистрируемые по пиковому и скоростному показателям флюоресценции с дексаметазоном. При отклонении значения одного из вышеперечисленных показателей ниже или выше указанных величин регистрируется высокий риск развития ХГБН у детей.

Список литературы

1. Головные боли у детей и подростков/О.Р. Есин, Р.Г. Есин, Д.Х. Хайбуллина [и др.] – Казань: ИИЦ УДП РТ, 2013. – 72 с.
2. Будчанова Н.Ю., Делягин В.М., Хондкряян Г.Ш. Распространенность и особенности клинических проявлений первичных головных болей у школьников / Н.Ю. Будчанова, В.М. Делягин, Г.Ш. Хондкряян // Педиатрия. – 2008. – Т. 87, № 5. – С.138–140.
3. Silberstein S.D. Chronic daily headache // JAOA. 2005. Vol.105. No. 4. P.23- 29.
4. Анализ содержания сывороточного серотонина у пациентов с хроническими формами головных болей/ Г.Н. Шевцова [и др.] // Росс. журн. боли. – 2014. – № 1. – С.22-23.
5. Каракулова Ю.В., Шутов А.А. Серотонин периферической крови как показатель интенсивности боли и степени депрессии при хронической головной боли напряжении / Ю.В. Каракулова, А.А. Шутов // Боль. – 2006. – № 2. – С.15-18.
6. Anda H., van Stegeren A., Wolf O., Kindt M. Salivary alpha amylase and cortisol responses to different stress tasks: impact of sex // International Journal of Psychophysiology. 2008. Vol. 69. No. 1. P. 33-40.
7. Ткачева Е.С., Медведева Л.А., Чурюканов М.В. Сравнительная оценка уровня серотонина и катехоламинов в сыворотке крови у пациентов с хронической головной болью напряжения и тревожно-депрессивным расстройством / Е.С. Ткачева, Л.А. Медведева, М.В. Чурюканов // Росс. журн. боли. – 2016. – № 3–4. – С.16-20.
8. Rossi P., Vollono C., Valeriani M., Sandrini G. The contribution of clinical neurophysiology to the comprehension of the tension-type headache mechanisms// Clin. Neurophysiol. 2011. Vol.122. No. 6. P.1075-1085.
9. Адаптивные вариации фосфолипидного состава мембран эритроцитов у детей различных регионов Сибири /О.И. Зайцева [и др.]// Сибирское медицинское обозрение. –

2008. – Т.51, № 3. – С.18-21.

10. Серотонин: биологические свойства и перспективы клинического применения / В.Ю. Шур [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7-3. – С.621-629.

11. Особенности состояния клеточного звена вегетативной регуляции у детей с синдромом вегетативной дисфункции/ О.И. Зайцева [и др.] // Бюл. Вост-Сибир. Научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (Иркутск). – 2007. – № 3. – С. 82-84.

12. Пат. 2231792 Российская Федерация, МПК G01N33/49, G01N33/50, G01N33/74. Способ определения типов клеточной реактивности у детей / О.И. Зайцева, В.П. Терещенко, Е.И. Прахин, заявитель и патентообладатель. Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера СО РАМН. – №2000127615/15; заявл. 02.11.00; опубл. 27.06.04, Бюл. №18. – 1 с.