

# КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ  
УДК 616.1-053.2-001.725

## СОПРЯЖЕННЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ВТОРИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ В ПРОЦЕССАХ ФОРМИРОВАНИЯ ЭКТОПИЧЕСКИХ АРИТМИЙ У ДЕТЕЙ

Т.В.БЕРШОВА, М.И.БАКАНОВ, В.И.СЕРБИН

НИИ педиатрии, г.Москва, 117963, ГСП 1, Ломоносовский просп., 2/62

У детей с различными видами эктопических аритмий (ЭА) изучали содержание ионизированного кальция ( $Ca^{2+}$ ), кальмодулина (КМ) и суммарного содержания продуктов гидролиза фосфатидилинозитола — инозитолфосфатов (ИФ) и диацилглицерола (ДАГ) в эритроцитах и ткани миокарда. Выявлены нарушения в содержании указанных биологически активных агентов по сравнению с данными здоровых детей. Установлена зависимость изменения исследуемых параметров от клинического течения аритмии. Результаты работы свидетельствуют о том, что в процессе генерации и проведения импульса возбуждения в миокардиальной ткани при ЭА широко вовлекаются КМ и ИФ, роль которых сводится к регуляции клеточного кальциевого обмена.

**Ключевые слова:** эктопические аритмии, вторичные посредники, ионизированный кальций, кальмодулин, фосфатидилинозитол.

**Введение.** Проблема функциональной активности кардиомиоцитов и ее роли в механизмах нарушения ритма сердца (НРС) в настоящее время остается одной из главных в кардиологии детского возраста. Расстройства сердечного ритма возникают в результате особенностей генерации и проведения импульса возбуждения, реализующихся на уровне клеточных мембран. Доказано, что в нарушении электрогенных механизмов при аритмиях доминируют изменения вне- и внутриклеточного обмена кальция ( $Ca^{2+}$ ) [1, 2, 3]. Гомеостаз  $Ca^{2+}$  в покоящемся кардиомиоците контролируется согласованной работой различных Са-транспортирующих и Са-связывающих систем, поддерживающих содержание иона на постоянном уровне [4]. При активации кардиомиоцита концентрация свободного  $Ca^{2+}$  в цитозоле возрастает в 20-50 раз, что включает фазу быстрого его увеличения, совпадающую с развитием трансмембранного потенциала действия (ПД), и медленную фазу уменьшения, сходную по характеру с диастолической релаксацией [5]. Регуляция кальциевого тока при этом осуществляется системами вторичных мессенджеров, к числу которых относят циклические нуклеотиды (ЦН), кальмодулин (КМ), продукты фосфоинозитидного обмена (ФИО) — инозитолфосфаты (ИФ) и диацилглицерол (ДАГ). На фоне сравнительно изученной роли  $Ca^{2+}$  в электрическом возбуждении кардиомиоцитов, мало что известно о роли КМ и ИФ в процессах формирования и передачи импульса возбуждения, их влияния на сократительную способность миокарда при аритмиях.

Для решения вопроса о возможном влиянии кальций-мессенджерной системы на регуляцию клеточного метаболизма при НРС у детей с эктопическими видами аритмий были проведены исследования содержания ионизированного  $Ca^{2+}$ , КМ и

суммарное определение ИФ и ДАГ в эритроцитах и ткани миокарда. На основании клинико-электрофизиологического обследования у детей в 40% случаев была выявлена экстрасистолия. У половины из них обнаружена устойчивая аллоритмия типа би- и тригеминии. Подавляющее число НРС у детей проявлялись в виде тахикардий: пароксизмальной тахикардии (ПТ) и хронической непароксизмальной тахикардии (ХНПТ). Преобладающей формой ПТ являлась наджелудочная тахикардия. У некоторых детей с ПТ холтеровское мониторирование позволило выявить нарушения ритма сердца и проводимости в виде синдрома предвозбуждения желудочков (ПВЖ), свидетельствующего о наличии дополнительных проводящих путей. При ЭхоКГ-исследовании у 15 детей с ПТ выявлено снижение сократительной способности миокарда. У 7 детей суправентрикулярная тахикардия была осложнена аритмогенной дисфункцией миокарда, ХНПТ наблюдалась в двух формах: возвратной и стойкой. На основании ЭКГ и суточного мониторирования выявлена преимущественно суправентрикулярная форма ХНПТ.

**Методика.** Эритроциты выделяли из венозной крови методом дифференциального центрифугирования при 3000 об/мин с использованием цитратного антикоагулянта. Эритроциты дважды промывали физиологическим раствором и повторно осаждали. Полученную взвесь эритроцитов гемолизировали повторным замораживанием-оттаиванием ( $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $+20^{\circ}\text{C}$  соответственно).

Ткань миокарда забирали во время операции (деструкция эктопического очага возбуждения) после торакотомии до проведения основного этапа операции. Условия премедикации, вводного и основного наркоза были, как правило, однотипными и выполнялись по общепринятому методу. Участки ушка левого предсердия подвергали обработке по методу Gooper R. et al (1973) [6], отделяли от жировых и соединительнотканых элементов и помещали в среду, соответствующую методу проводимых исследований.

Уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в гемолизате и тканевых гомогенатах определяли с использованием кальций-чувствительных электродов на приборе "Ciba-Corning" с автоматической коррекцией его содержания относительно концентрации водородных ионов. Содержание КМ исследовали радиоиммунологическим методом с помощью наборов фирмы "Amersham" (Англия). Пробы обсчитывали в  $\gamma$ -счетчике "Delta Medial" (США). Суммарный уровень полифосфоинозитидов определяли методом Brown E. et al в модификации J. Vetulani J. (1990) [7], инкубируя ткани с  $^3\text{H}$ -инозитолом (5 мк/мл) в присутствии LiCl. Счет радиоактивности образцов проводили на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Mark III (США). Для функциональной оценки фосфоинозитидного ответа использован норадреналин (NA) в концентрации 100 мМ. С этой целью в пробы, инкубированные с  $^3\text{H}$ -инозитолом и Li добавляли 10 мкл раствора NA. Определение общего белка проводили по методу Lowry O. et al (1951) [8].

**Результаты и обсуждение.** Данные таблицы отражают результаты определения  $\text{Ca}^{2+}$ , КМ и ИФ в эритроцитах и ткани миокарда обследованных детей. У больных с НРС отмечены изменения изучавшихся показателей, выражающиеся в достоверном увеличении уровня  $\text{Ca}^{2+}$  и КМ в эритроцитах по сравнению со здоровыми детьми. Указанные нарушения сочетались со значительным повышением в этих форменных элементах крови концентрации инозитолфосфатов. В ткани миокарда больных с эктопическими аритмиями (ЭА) обнаружены однонаправленные сдвиги в содержании этих биологически активных агентов, что указывает на общность биохимических механизмов в реализации патологического процесса как в отдельных клетках, так и в тканевых структурах органа-мишени.

Таблица

Содержание вторичных клеточных посредников в эритроцитах и ткани миокарда детей с НРС

Группы обследованных детей	ЭРИТРОЦИТЫ			ТКАНЬ МИОКАРДА		
	кальмодулин нг/мг белка	Ca <sup>2+</sup> нмоль/л	Суммарная фракция IP имп/мин/10 ЭР	кальмодулин нг/мг белка	Ca <sup>2+</sup> нмоль/л	Суммарная фракция IP имп/мин/10 бел
Экстрасистолия	161±9,6 n=11	3,47±0,02* n=11	15,11±0,75 n=11	87,20±1,5 n=5	123,1±2,1 n=5	187±2,01 n=5
Би-, тригеминии	189±7,32* n=9	4,21±0,03 n=16	21,17±0,51* n=9	107,1±1,9 n=4	238,2±2,4 n=4	---
Суправентрикулярная тахикардия	148±9,33 n=16	3,72±0,01 n=16*	23,85±0,92* n=15	99,10±2,1 n=5	215,9±2,3 n=5	203±1,98 n=5
НРС с синдромом ПВЖ	168±4,13 n=9	4,98±0,03 n=9	25,98±1,00* n=9	93,40±1,7 n=6	244,8±3,2 n=6	245±3,4 n=6
НРС с аритмогенной дисфункцией миокарда	132±5,91 n=8	2,41±0,02 n=8	8,92±0,14 n=8	---	---	---
Здоровые дети	128±5,14 n=15	2,45±0,04 n=17	10,54±0,51 n=15	---	---	---

Примечание: --- — исследования не проводились.

При анализе нарушений в системе вторичных мессенджеров у детей с ЭА установлена зависимость содержания Ca<sup>2+</sup>, КМ и ИФ от клинического течения аритмий. Так, увеличение внутриклеточного кальциевого пула и уровня КМ наиболее выражено у детей с частыми суправентрикулярными пароксизмами и аллоритмией. Обнаружена прямая зависимость повышения концентрации Ca<sup>2+</sup> и КМ от частоты приступов пароксизмальной тахикардии. Изучение этих показателей у детей с экстрасистолической формой аритмии свидетельствует о динамике их изменений в зависимости от длительности существования НРС. При увеличении времени заболевания до 1 года первоначально высокие уровни Ca<sup>2+</sup> и КМ в эритроцитах снижались, достигая значений, характерных для здоровых детей. Концентрация Ca<sup>2+</sup> и КМ в эритроцитах детей с ХНПТ была несколько выше таковой в контрольной группе. Однако не обнаружено достоверной разницы в их содержании у больных с возвратной и стойкой формами тахикардии.

Установлено, что суммарное содержание ИФ в эритроцитах у детей с ЭА значительно превышает их значения у здоровых детей, что свидетельствует об интенсификации у них ФИО. Максимальная степень гидролиза фосфатидилинозитола отмечена в эритроцитах и ткани миокарда детей с суправентрикулярными тахикардиями, сочетающимися с синдромом ПВЖ. Характер изменений в системе Са-КМ и содержании ИФ у детей с НРС, осложненными аритмогенной дисфункцией миокарда, свидетельствует о снижении концентрации Ca<sup>2+</sup> и ИФ и незначительном повышении КМ в эритроцитах (табл.).

Преинкубация эритроцитов с NA в концентрации 100 мМ приводила к повышению в них базального уровня ИФ и Ca<sup>2+</sup> у детей с аллоритмией, с суправентрикулярными тахикардиями и в группе детей с аритмиями с синдромом ПВЖ (рис.). Этот факт подтверждает высказанное W. Schmitz [9] предположение о том, что при аритмиях агонисты, действующие через α-адренорецепторы, стимулируют гидролиз полифосфоинозитидов, подъем уровня инозитолтрифосфата (ИФ-3) и увеличение сократимости. Не выявлено норадренергического эффекта на активность фосфоинозитидного цикла у детей, у которых эктопические тахикардии осложнялись снижением сократительной функции миокарда. По-видимому, у этих

больных в состоянии недостаточного снабжения клеток кислородом гормональная регуляция ФИО кардиомиоцитов отличается от таковой у детей с аритмиями.

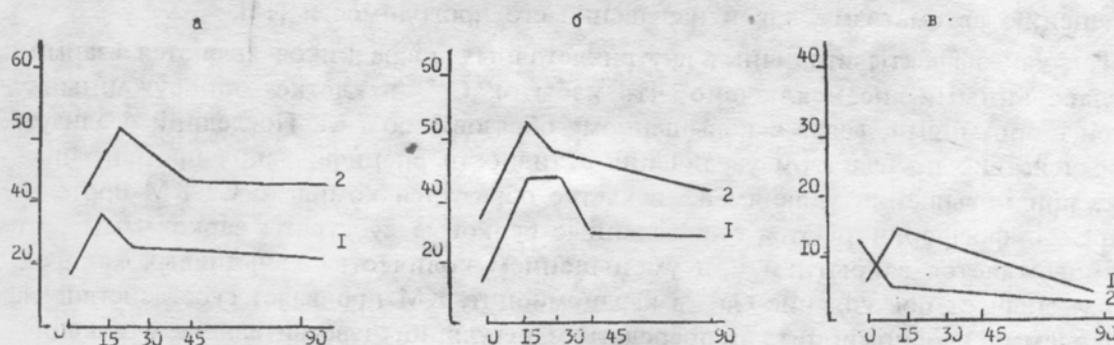


Рис. Интенсивность ИФ-обмена в эритроцитах детей с различными видами эктопических аритмий.

По оси абсцисс — время (в мин.) воздействия агониста (NA-100 мМ); по оси ординат — суммарная фракция меченных инозитолфосфатов (имп./мин.  $10^6$  клеток)

- 1 — базальный уровень ФИ-обмена  
 2 — состояние ФИ-обмена при инкубации с А  
 а — аллоритмии  
 б — тахиаритмии с синдромом ПВЖ  
 в — снижение сократительной функции миокарда

Таким образом, результаты работы свидетельствуют, что в процесс регуляции клеточного метаболизма при аритмиях вовлекаются продукты гидролиза фосфатидилинозитола фосфолипазой С, КМ и  $Ca^{2+}$ . При этом значительный интерес в понимании проблемы патогенеза аритмии представляют механизмы их взаимообусловленного влияния на электрофизиологические свойства миокарда. Причины избыточного содержания  $Ca^{2+}$  в клетке при данной патологии могут быть самыми разными. В регуляции клеточного кальциевого гомеостаза принимает участие большой спектр биологически активных соединений, реализующих свое действие посредством многочисленных механизмов вне- и внутриклеточного воздействия. Можно предположить, что накопление  $Ca^{2+}$  в клетке обусловлено активацией входа катиона из внеклеточной жидкости за счет увеличения числа и времени "открытия" потенциал- и рецептор-зависимых кальциевых каналов под воздействием высоких концентраций катехоламинов (КА), отмеченных рядом авторов у таких больных [10, 11, 12]. Повышение уровня  $Ca^{2+}$ , поступившего по медленным каналам, ускоряет развитие гиперполяризационного ответа и существенно увеличивает частоту сердечных сокращений. Механизм изменения сократительной функции миокарда у детей с ЭА может быть обусловлен также тем, что  $Ca^{2+}$ , не удаленный из цитоплазмы во время диастолы, остается связанным с тропонином миофибрилл, поддерживая функционирование так называемых остаточных актомиозиновых мостиков. При этом отмечается повышение скорости сокращения миокарда над скоростью его расслабления, что способствует увеличению частоты сердечных сокращений [15].

Увеличение содержания  $Ca^{2+}$  в клетке ведет к одновременному повышению в ней уровня натрия и снижению концентрации калия, что способствует изменению биоэлектрической активности кардиомиоцитов и выражается в падении потенциала покоя, уменьшения скорости и снижения вольтажа ПД [14]. Поскольку в

клетках синусового узла ионный ток является преимущественно кальциевым, можно предположить, что синоатриальные отделы сердца при ЭА повреждаются в большей степени. При этом указанные изменения трансмембранного потенциала могут вызвать как нарушения генерации импульса возбуждения, что приводит к изменению автоматизма, так и нарушения его проводимости [15].

Так как эффекты вторичных внутриклеточных посредников являются взаимно согласованными, не исключено, что избыток  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке, обнаруженный у детей с аритмиями, ведет к повышенному образованию КМ. Последний реализует свое действие посредством увеличения активности специфических протеинкиназ. Так, при повышении уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке образуется комплекс Са-КМ-протеинкиназа и фосфорилируются определенные белковые субстраты сарколеммы. Это сопровождается закрытием или уменьшением количества кальциевых каналов, что уменьшает поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоцит. КМ проявляет свое действие на сарколемму кардиомиоцита и посредством регуляции чувствительности кальциевого насоса к  $\text{Ca}^{2+}$ , увеличивая активность фермента по принципу отрицательной обратной связи. В основе этого механизма лежит высокая активность Са-КМ-комплекса, стимулирующего Са-насос и соответственно инициирующего выход  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки [14]. Таким образом, у детей с ЭА КМ, являясь регулятором адаптивного действия, направленного на активацию мембранных транспортных систем, в какой-то степени способствует выведению  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки. Кроме того, активируя цАМФ-зависимую фосфодиэстеразу, КМ ускоряет распад цАМФ и тем самым в определенной мере ограничивает адренергический эффект, который, как известно, является одним из звеньев патогенетической цепи в механизмах возникновения и формирования НРС.

Среди причин, обуславливающих сдвиги в процессах клеточного метаболизма у детей с аритмиями, следует отметить интенсификацию ФИО. Не исключено, что одной из причин повышенного образования полифосфоинозитидов является усиление  $\beta$ -адренергического воздействия. Как видно из полученных нами данных, максимальная скорость гидролиза фосфатидилинозитола отмечена у детей с суправентрикулярными тахикардиями, сочетающимися с синдромом ПВЖ. Вегетативный статус таких больных, по данным ряда исследователей [11, 12], имеет гиперсимпатикотоническую направленность, что свидетельствует об активации  $\beta$ -адренергических воздействий и стимулирует образование ИФ и ДАГ. Можно предположить, что увеличение трансмембранного входа  $\text{Ca}^{2+}$  у детей с НРС, инициированное образованием повышенных концентраций инозитол-1,3,4,5-тетрафосфата, вызывает аномальный автоматизм путем увеличения триггерной активности.

Повышение внутриклеточного содержания  $\text{Ca}^{2+}$  при ЭА происходит не только за счет внеклеточных источников, но и вследствие освобождения его из саркоплазматического ретикулума (СПР) при повышении уровня 3,4,5-трифосфата (ИФ-3). Эти данные свидетельствуют о возможном нарушении показателей электрохимического сопряжения у таких больных. Изменения механизма сопряжения возбуждения-сокращения могут быть вызваны также модифицирующим влиянием процессов фосфорилирования-дефосфорилирования полифосфоинозитидов на сдвиги в концентрации фосфоламбана, что, в свою очередь, играет ключевую роль во взаимодействии фосфоламбана с Са-АТФазой [16].

У детей с ЭА, осложненными снижением сократительной функции миокарда, угнетение фосфоинозитидного цикла может быть следствием длительной гипоксии. У таких детей, наблюдаемое при длительной гипоксии локальное увеличение

уровня эндогенных КА, является достаточным для того, чтобы вызвать снижение чувствительности  $\beta$ -адренергических рецепторов и десенситизацию аденилатциклазы. Эти изменения ФИ комплекса нарушают процессы фосфорилирования ионных каналов, что замедляет поступление  $Ca^{2+}$  в кардиомиоцит. Кроме того, в условиях выраженного снижения кислорода ингибируется влияние Са-мобилизующих гормонов на ФИО, что приводит к уменьшению его активности [12].

С учетом сказанного становится понятным, что в процессы генерации и проведения импульса возбуждения в миокардиальной ткани при ЭА широко вовлекаются кальмодулин и продукты гидролиза фосфотидилинозитола. При этом их роль сводится к регуляции кальциевого обмена посредством транспорта катиона в клетку и его внутриклеточного перераспределения.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Bridge J.H., Smolle I., Spitzer K.W. et al. // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1991. — V. 639. — P. 34-37.
- 2 Carafoli E. // Physiol. Res. — 1991. — V. 71. — P. 129-153.
- 3 Morad M., Cleman L., Callewarti G. // Science. — 1989. — V. 246. — P. 16-40.
- 4 Karmazyn M. // Am. J. Physiol. — 1986. — V. 251, N 1. — Pt. 2. — Ph. 141-147.
- 5 Cirbai E., Borea P.A., Masini I. et al. // Pharmacol. Res. Commun. — 1988. — V. 20. — Supp. 1. — P. 95-96.
- 6 Gooper R.H., Asheroft J.H. // Biochem. J. — 1973. — V. 134. — P. 599-605.
- 7 Nalera I., Vetulani J. // Acta Neurobiol. Exp. — 1990. — V. 50. — P. 635-656.
- 8 Lowry O., Rocobraugh H., Fort A., Rondell R. // J. Biolog. Chemistry. — 1951. — V. 193. — P. 255-275.
- 9 Schmitz W., Scholz H., Scholz J. et al. // Eur. J. Pharmacol. — 1987. — V. 134. — P. 377-386.
- 10 Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И. // Биол. мембраны. — 1992. — Т. 9, N 9. — С. 886-904.
- 11 Школьникова М.А. // Дисс. на соиск. докт. мед. наук в форме научн. докл., Москва, 1993. — С. 106.
- 12 Reitmann O., Werden K. // Arch. Pharmacol. — 1989. — V. 339. — P. 138-143.
- 13 Капелько В.И., Горина М.С. // Бюлл. ВНКЦ АМН СССР. — 1984. — Т. Y11, N 2. — С. 26-31.
- 14 Coetzl N.A., Opie L.H. // Circul. Res. — V. 61, N 2. — P. 157-165.
- 15 Кобрин В.И. // Физиолог. Ж. СССР. — 1986. — Т. 72, N 5. — С. 637-671.
- 16 Tomilson S., Maciel S., Brow B.L. // Clin. Endocrinol. — 1985. — V. 23, N 5. — P. 595-610.

## COUPLED METABOLISM OF SECOND MESSENDGERS DURING IN FORMING OF ECTOPIC ARRHYTHMIAS IN CHILDREN

T.V. Bershova, M.Y. Bakanov, V.Y. Serbin

The content of ionised calcium ( $Ca^{2+}$ ), calmoduelin and total maintenance of hydrolyzates of phosphatidilinositol (inositolphosphate (IP) and diacilglycerol (DG)) in erythrocytes and in miocardium were investigated in children with different forms of ectopic arrhythmias (EA).

Disturbances in maintenance of indicated biologically active substances were revealed in patients with EA as compared with healthy children. It was determined that regulation of cellular homeostasis was depended from clinical course of EA. Aur results indicate that IP and DG is of great importance in generation and conduction of electric impulses in miocardium by regulation of cellular calcium metabolism in children with EA.

**Key words:** ectopic arrytmias, second messengers, ionized calcium, calmodulin, phosphatidylinotol