

ВЛИЯНИЕ ФЕНАНТРЕНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЖЕЛУДОЧКОВЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ ТРЕСКИ (*GADUS MORHUA*)

© 2024 г. Т. С. Филатова¹,*, А. В. Шамшура¹, Д. В. Абрамочкин¹

¹ Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет,
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* e-mail: filatova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 12.04.2024 г.

После доработки 29.05.2024 г.

Принята к публикации 31.05.2024 г.

Добыча нефти на арктическом шельфе и ее транспортировка по Северному морскому пути создают повышенные риски загрязнения экосистем морей Арктики нефтью и нефтепродуктами. На сегодняшний день известно, что наиболее токсичными компонентами нефти являются полиароматические углеводороды (ПАУ), и среди них преобладающим по концентрации в нефти и физиологическим эффектам является фенантрен. Фенантрен влияет на электрическую активность сердца рыб, однако его эффекты видоспецифичны. При этом влияние фенантрена на работу сердца рыб Арктики, в том числе экономически важных промысловых видов, исследовано недостаточно. В данной работе рассмотрено влияние фенантрена на электрическую активность и ионные токи в желудочковом миокарде трески (*Gadus morhua*). Основными ионными токами в рабочем миокарде трески были I_{Kr} , I_{K1} , I_{Na} и I_{Ca} . Фенантрен (1 мкМ) не вызывал изменений в длительности потенциалов действия, зарегистрированных в изолированных желудочковых кардиомиоцитах трески методом пэтч-кламп. При этом фенантрен подавлял быстрый ток задержанного выпрямления I_{Kr} на $61.33 \pm 3.94\%$, снижая реполяризационный резерв кардиомиоцитов. Фенантрен не влиял ни на уровень потенциала покоя, ни на фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} . Также в присутствии фенантрена в миоцитах трески снижалась скорость фазы быстрой деполяризации потенциалов действия, что было обусловлено подавлением быстрого натриевого тока I_{Na} . Наконец, фенантрен незначительно снижал амплитуду кальциевого тока I_{Ca} и ускорял его инактивацию, что суммарно приводило к снижению количества заряда, переносимого I_{Ca} . Таким образом, влияние фенантрена на миокард трески на клеточном уровне можно охарактеризовать как потенциально проаритмическое, что делает популяции трески в морях Арктики уязвимыми к загрязнению водной среды компонентами нефти при разливах последней в случае техногенных катастроф.

Ключевые слова: сердце, рыба, полиароматические углеводороды, Арктика, потенциал действия, ионные токи, кардиотоксичность

DOI: 10.31857/S0044452924040043, EDN: YQEDGI

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается интенсификация хозяйственной деятельности в Арктике, и в значительной степени она связана с такими стратегически важными отраслями как рыбная промышленность, а также добыча нефти на континентальном шельфе и ее транспортировка — в том числе по Северному морскому пути [1], что неизбежно влияет на окружающую среду и экосистемы Арктики. Наибольшую опасность для живых организмов при этом представляют утечки нефти и ее компонентов. Токсичность компонентов нефти для живых организмов привлекла внимание экологов и физиологов после нескольких крупных катастроф [2, 3], в том числе и на севере России [4–6]. Таким образом, для живых организмов Арктики создается вполне реальная угроза, и, ввиду интенсификации пере-

возок нефтепродуктов по Северному морскому пути [7], особой опасности подвергаются водные организмы арктических морей — в частности, рыбы.

Отправной точкой для изучения токсических эффектов нефти и ее компонентов послужили работы, показавшие, что воздействие нефти приводит к увеличению смертности молоди рыб, а также к учащению появления дефектов развития — отек желточного мешка, микрофтальмия, искривление позвоночника, мальформации челюсти и пр. [8]. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что токсическое действие нефти связано с ограниченным набором низкомолекулярных, относительно растворимых в воде соединений — а именно, с полиароматическими углеводородами (ПАУ). Среди этого класса веществ наиболее представлены в нефти ди- и трициклические соединения [9], а сре-

ди них наиболее высокой концентрацией и токсичностью обладает фенантрен — углеводород, содержащий в своей структуре 3 конденсированных бензольных кольца. Фенантрен способен вызывать не менее сильные тератогенные и токсические эффекты в организме рыб, чем чистая нефть — так, было показано, что токсичность различных смесей ПАУ (включая нефть) зависит от содержания в них трициклических соединений, в частности фенантрена [10, 11].

Важной вехой в изучении токсических эффектов ПАУ и нефти стало открытие кардиотоксичности ПАУ. У эмбрионов рыб воздействие трициклических ПАУ и фенантрена приводит к замедлению частоты сердечных сокращений, увеличению вариабельности диастолических интервалов, нарушению атриовентрикулярного проведения и аритмиям, в конечном итоге снижая сердечный выброс, что указывает на влияние на ионные каналы и транспортеры миокарда. При этом вызванные ПАУ нарушения в работе сердца предшествуют другим дисфункциям и мальформациям, по крайней мере, в организме рыб [12]. В более детальных исследованиях было показано, что фенантрен снижает силу сокращения желудочкового миокарда кумжи [13], а на клеточном уровне — снижает амплитуду кальциевых транзиентов и замедляет их спад [14], что в конечном итоге снижает сократимость сердца и, в перспективе, сердечный выброс. Сходное влияние на сократимость миокарда оказывает и сырая нефть [15]. Также для фенантрена было показано влияние на быстрый натриевый ток I_{Na} , определяющий возбудимость миокарда и скорость проведения возбуждения по нему: в кардиомиоцитах различных видов рыб, как морских, так и пресноводных, фенантрен подавлял I_{Na} [16–18]. Наконец, несколько исследовательских групп показали способность фенантрена и подобных ему ПАУ подавлять быстрый калиевый ток задержанного выпрямления I_{Kr} [13–18], являющийся основным реполяризирующим током в миокарде большинства рыб — и в человеческом миокарде [19]. Однако, сравнительный анализ показывает, что для ингибиторных эффектов фенантрена на те или иные ионные токи характерна определенная видоспецифичность. Так, например, в миокарде радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) с концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) тока I_{Kr} фенантреном составляет порядка 10 мкМ [17], в миокарде данио-рерио (*Danio rerio*) и наваги (*Eleginus nawaga*) IC_{50} фенантрена для подавления I_{Kr} составила 3.3 и около 2 мкМ, соответственно [18, 20], а в желудочковом миокарде европейского керчака (*Myoxocephalus scorpio*) IC_{50} составила всего 144 нМ [16]; аналогичные различия в чувствительности к ПАУ показаны и для других ионных токов в миокарде рыб. Соот-

ветственно, влияние фенантрена на конфигурацию электрической активности миокарда рыб тоже видоспецифично, в зависимости от чувствительности различных ионных токов к фенантрено и их относительного вклада в формирование потенциалов действия (ПД): так, в кардиомиоцитах данио-рерио и радужной форели фенантрен вызывает укорочение ПД [17, 20], тогда как в кардиомиоцитах наваги и европейского керчака — напротив, в присутствии фенантрена длительность ПД увеличивается [16, 18]. Таким образом, предугадать кардиотоксичность фенантрена (и, скорее всего, других ПАУ, содержащихся в нефти) для того или иного вида рыб практически невозможно.

Среди арктических видов рыб эффекты ПАУ были исследованы только в миокарде наваги (*Eleginus nawaga*) и европейского керчака (*Myoxocephalus scorpio*), что явно недостаточно для понимания возможных негативных эффектов от разливов нефти или нефтепродуктов в арктических морях. Еще одним экономически важным для рыбной промышленности арктическим видом рыб является треска (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758). Это всеядные пелагические рыбы средних размеров из семейства тресковых (*Gadidae*), являющиеся одним из самых давно известных промысловых видов рыб и обитающие в северной части Атлантического океана и морях Арктики, от прибрежных вод до континентального шельфа [21, 22]. Учитывая важность трески в рыбном промысле многих стран, представляется крайне важным иметь понимание о возможных рисках для ее популяций в связи с возможным загрязнением океанических вод, в особенности в области арктического шельфа, компонентами нефти. Данное исследование ставило своей целью изучить влияние одного из наиболее токсичных и хорошо изученных ПАУ в составе нефти, фенантрена, на электрическую активность желудочкового миокарда трески (*Gadus morhua*) на клеточном уровне.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Все эксперименты в рамках данного исследования были проведены на Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова (Россия). Взрослые половозрелые особи трески (*Gadus morhua*) обоих полов массой 100–200 г ($n = 7$) были пойманы в Кандалакшском заливе в окрестностях ББС МГУ (66°19'50" с.ш., 33°40'06" в.д.) в июне-августе, когда температура воды составляла 7–12°C. Перед экспериментами животных в течение 7–10 дней содержали в проточном морском аквариуме (объем 200 л) с тем же температурным режимом, что и в природных условиях, при световом режиме

12:12. Животных кормили пескожилами (*Arenicola marina*) каждые 3 дня.

Получение изолированных кардиомиоцитов трески

Для получения изолированных желудочковых кардиомиоцитов трески был использован разработанный и успешно примененный ранее в работах с использованием различных видов рыб Белого моря протокол энзиматической перфузии сердца [18, 23]. Животных оглушали ударом по голове, декапировали, после чего сердце быстро вырезали и канюлировали через аорту для ретроградной перфузии по Лангендорфу. Сердце перфузировали не содержащим Ca^{2+} раствором для выделения [(в мМ): NaCl 100, KCl 10, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4, таурин 50, глюкоза 10, HEPES 10, pH 6.9] в течение 5–7 мин. После этого сердце перфузировали раствором того же состава, содержащим протеолитические ферменты: коллагеназу типа IA (0.37 мг/мл), трипсин (0.15 мг/мл), а также бычий сывороточный альбумин (0.37 мг/мл). После 10–12 мин ферментативной обработки желудочек сердца отделяли от аортального конуса и предсердия, помещали в раствор для выделения, измельчали и пипетировали для высвобождения изолированных кардиомиоцитов в раствор. Изолированные кардиомиоциты хранили при температуре $+4^\circ\text{C}$ и использовали в течение 8 ч после выделения.

Регистрация потенциалов действия и ионных токов методом пэтч-кламп

Изолированные кардиомиоциты (300 мкл суспензии изолированных клеток) помещали в экспериментальную камеру объемом 300 мкл, монтированную на инвертированном микроскопе Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Кардиомиоциты суперфузировали внеклеточным раствором, состав которого различался в зависимости от типа эксперимента, со скоростью около 1.5 мл/мин. Температуру раствора в камере поддерживали на уровне 7°C с помощью терморегулятора CL-100 с элементом Пельтье (Wagner Instruments, США). Фенантрен в ходе экспериментов добавляли во внеклеточный раствор. Маточный раствор фенантрена (10 мМ) готовили на основе диметилсульфоксида (ДМСО) и использовали в течение 48 ч после приготовления. Концентрация ДМСО во внеклеточном растворе в каждом из экспериментов не превышала 1:1000. Пипетки вытягивали из боросиликатных стеклянных капилляров без филамента (World Precision Instruments, США) с помощью пуллера PC-100 (Narishige, Япония) и заполняли пипеточным раствором, состав которого также различался в зависимости от типа эксперимента. Сопrotивление пипеток, заполненных раствором, составляло 2–3 МΩ. Ионные то-

ки и потенциалы действия (ПД) регистрировали с использованием метода whole-cell пэтч-кламп с помощью усилителя Axopatch 200A (Molecular Devices, США). Сопrotивление доступа и емкость клетки компенсировали перед непосредственной регистрацией ионных токов или потенциалов действия. Протоколы изменения потенциала указаны на соответствующих рисунках. Регистрацию тока начинали спустя 1 мин после установления whole-cell контакта с клеткой. Ток регистрировали в контрольных условиях в течение не менее чем 3 мин, после достижения стационарной амплитуды тока. При проведении эксперимента ток регистрировали в течение всего времени подачи фенантрена в экспериментальную камеру, эффект оценивали после выхода амплитуды тока на стационарный уровень.

Экспериментальные растворы

Для регистрации калиевых токов и ПД в изолированных кардиомиоцитах трески использовали внеклеточный раствор, содержащий KCl [(в мМ): NaCl 150, KCl 3.5, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, глюкоза 10, HEPES 10, pH 7.6]. Раствор для регистрации калиевых токов дополнительно содержал нифедипин (10 мкМ) для подавления кальциевого тока и тетродотоксин (300 нМ) для подавления быстрого натриевого тока. При регистрации быстрого калиевого тока задержанного выпрямления I_{Kr} в конце каждого эксперимента также к внеклеточному раствору добавляли 1 мкМ блокатора I_{Kr} E-4031 для оценки полной амплитуды тока. Пипеточный раствор, используемый для регистрации калиевых токов, также содержал KCl [(в мМ): KCl 140, MgCl_2 1, ЭГТА 5, Mg-АТФ 4, Na_2 -ГТФ 0.03, HEPES 10, pH 7.2]. Для регистрации ПД использовали пипеточный раствор сходного состава, но со сниженной концентрацией ЭГТА (0.025 мМ) для более точной имитации буферной способности цитоплазмы [24].

Для регистрации кальциевого тока I_{Ca} использовали внеклеточный раствор с эквивалентной заменой KCl на CsCl для подавления калиевых токов [(в мМ): NaCl 150, CsCl 3.5, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, глюкоза 10, HEPES 10, pH 7.6]. Для подавления быстрого натриевого тока раствор дополнительно содержал 300 нМ тетродотоксина. В пипеточном растворе для регистрации кальциевого тока KCl также был заменен на CsCl, а также был добавлен тетраэтиламмоний для подавления калиевых токов [(в мМ): CsCl 130, MgCl_2 1, ЭГТА 5, Mg-АТФ 4, Na_2 -ГТФ 0.03, HEPES 10, тетраэтиламмоний 15, pH 7.2].

Для регистрации быстрого натриевого тока I_{Na} использовали внеклеточный раствор на основе CsCl и с частичной заменой NaCl на Трис-Cl [(в мМ): NaCl 20, Трис-Cl 120, CsCl 3.5, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, глюкоза 10, HEPES 10, pH 7.6]. Раствор дополнительно содержал 10 мкМ нифедипина для подавления кальциевого то-

ка. Пипеточный раствор на основе CsCl также содержал NaCl [(в mM): CsCl 130, NaCl 5, MgCl₂ 1, ЭГТА 5, Mg-АТФ 4, Na₂-ГТФ 0.03, HEPES 10, pH 7.2]; снижение концентрации NaCl во внеклеточном растворе и добавление его в пипеточный раствор позволило снизить движущую силу для входа ионов Na⁺. В совокупности с 70% компенсацией последовательного сопротивления это позволило обеспечить стабильную и адекватную регистрацию высокоамплитудного I_{Na} .

Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы и блокаторы: блокатора I_{Na} тетродотоксин, блокатор I_{Ca} нифедипин, коллагеназа типа IA, трипсин, фенантрен (Sigma, США), блокатор I_{Kr} E-4031 (Tocris Bioscience, Великобритания).

Анализ данных

Анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Clampfit 10.3 (Molecular Devices, США) с последующей статистической обработкой в среде GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). При анализе ПД учитывали такие параметры как максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД, амплитуду ПД и длительность ПД на уровнях реполяризации 50% и 90%. Амплитуду токов нормировали на электрическую емкость клеток и представляли в виде пА/пФ. Заряд, переносимый кальциевым током I_{Ca} , оценивали по площади под кривой интегрального тока, нормированного на емкость клетки, и представляли в виде пКл/пФ. Временную константу инактивации τ для тока I_{Ca} оценивали с помощью стандартной трансформации Чебышева в программном обеспечении Clampfit 10.3, используя экспоненциальную функцию. Данные представлены как среднее $\pm$ ст. ошибка среднего ($M \pm S.E.M.$). Нормальность распределения выборок оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку данные были распределены нормально, статистическую значимость эффектов фенантрена оценивали с помощью t -теста Стьюдента для связанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Действие фенантрена на конфигурацию ПД в миокарде трески

В первую очередь мы оценили интегральный эффект фенантрена на конфигурацию электрической активности — а именно, на форму потенциалов действия (ПД) в миокарде трески. ПД регистрировали в режиме поддержания тока (current-clamp) в

изолированных желудочковых кардиомиоцитах. Репрезентативные примеры ПД, зарегистрированных в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена во внеклеточном растворе, представлены на рис. 1а. Несмотря на отсутствие видимых глазу изменений, в присутствии 1 мкМ фенантрена фаза быстрой деполяризации ПД удлинялась, что отражено в снижении максимальной скорости нарастания переднего фронта ПД (рис. 1б, с). Прочие оцениваемые параметры, а именно мембранный потенциал покоя и длительность ПД на уровне 90% и 50% реполяризации в присутствии 1 мкМ фенантрена не изменялись (рис. 1д-ф, соответственно).

Действие фенантрена на ток I_{Kr} в желудочковых миоцитах трески

Поскольку ранее проведенные исследования показали чувствительность быстрого калиевого тока задержанного выпрямления I_{Kr} , являющегося основным реполяризующим током в миокарде рыб, к ПАУ и, в частности, к фенантрена [13, 14, 16, 17], то, несмотря на отсутствие заметных изменений в длительности ПД в присутствии 1 мкМ фенантрена, мы оценили влияние фенантрена на I_{Kr} в миокарде трески.

Деполяризация от -80 мВ до -20 мВ и более положительных потенциалов приводила к активации выходящего тока, чувствительного к селективному блокатору E-4031 (1 мкМ) и определенного как быстрый ток задержанного выпрямления I_{Kr} (рис. 2а). Поскольку для каналов, опосредующих ток I_{Kr} , характерна быстрая инактивация С-типа [25], ток регистрировали с помощью двухступенчатого протокола (показан на рис. 2) и измеряли на второй ступени пиковую амплитуду тока, подавляемого E-4031 (так называемый хвостовой ток или tail current). Вольт-амперная характеристика I_{Kr} в желудочковых миоцитах трески отражена на рис. 2б.

Фенантрен в концентрации 1 мкМ вызывал снижение амплитуды I_{Kr} , особенно заметное на второй ступени протокола (см. рис. 2б, с). Снижение амплитуды I_{Kr} под действием фенантрена было статистически значимым и составило более 50% от контрольных значений, эффект наблюдался начиная с 3-й минуты подачи раствора, содержащего фенантрен, в экспериментальную камеру.

Фенантрен не влияет на ток I_{K1} в желудочковом миокарде трески

Фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} в желудочковых миоцитах трески регистрировали с использованием пилообразного протокола (показан на рис. 3). Вольт-амперная характеристика I_{K1} в желудочковом миокарде трески отражена на рис. 3а.

В отличие от тока I_{Kr} , ток входящего выпрямления I_{K1} оказался нечувствителен к действию фенан-

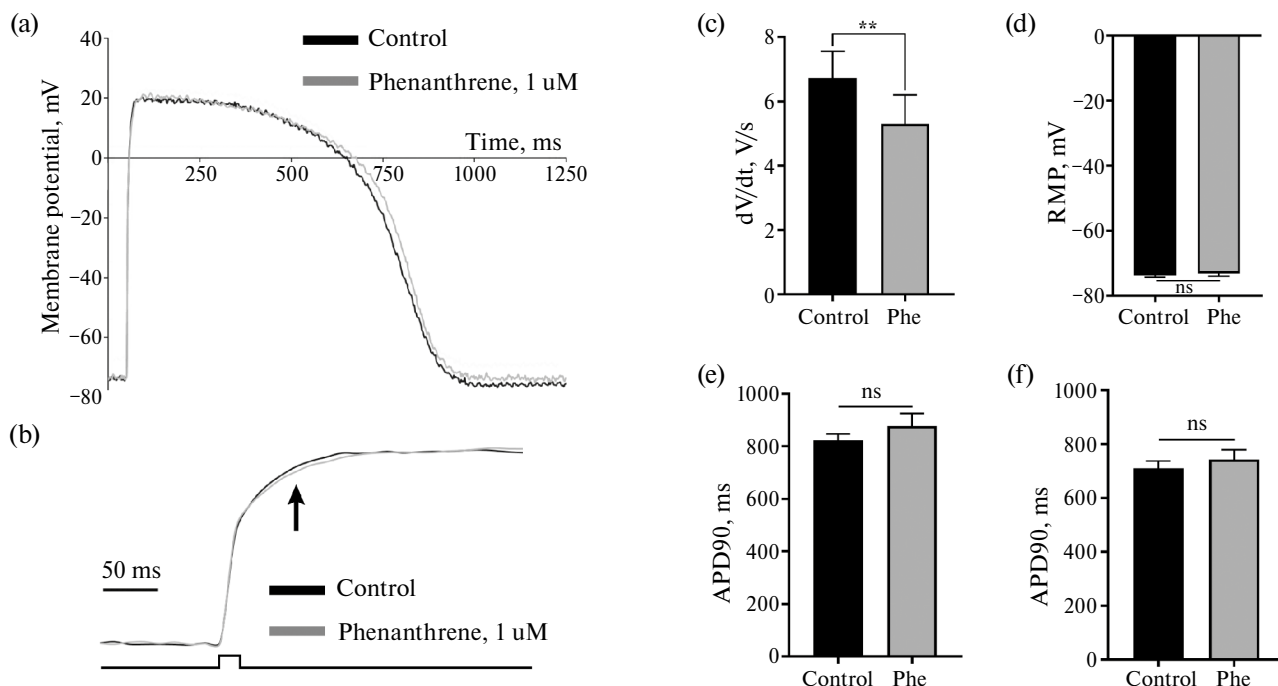


Рис. 1. Влияние фенантрена на конфигурацию ПД в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — репрезентативные записи ПД в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена; (b) — репрезентативная запись, отражающая замедление фазы быстрой деполяризации ПД в присутствии 1 мкМ фенантрена, черная линия снизу отображает электрический стимул, стрелка отмечает область интереса; (c) — влияние 1 мкМ фенантрена на максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД ($n = 6$; $p < 0.01$, парный t -тест Стьюдента); (d) — влияние 1 мкМ фенантрена на мембранный потенциал покоя ($n = 6$; $p = 0.11$, парный t -тест Стьюдента); (e) — влияние 1 мкМ фенантрена на длительность ПД на уровне 90% реполяризации ($n = 6$; $p = 0.20$, парный t -тест Стьюдента); (f) — влияние 1 мкМ фенантрена на длительность ПД на уровне 5% реполяризации ($n = 6$; $p = 0.07$, парный t -тест Стьюдента).

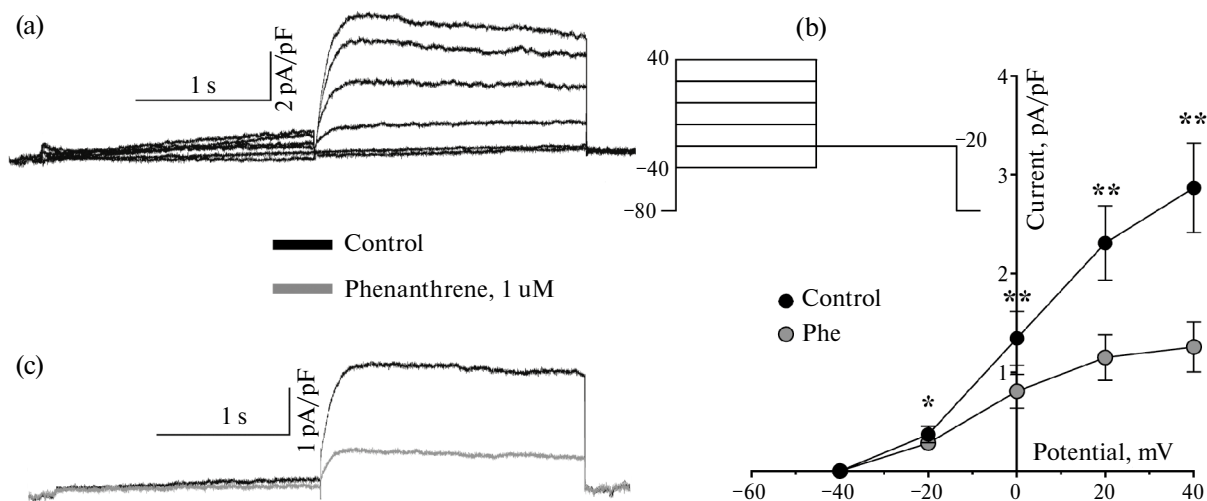


Рис. 2. Влияние фенантрена на быстрый калиевый ток задержанного выпрямления I_{Kr} в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — репрезентативные записи I_{Kr} ; (b) — вольт-амперная характеристика I_{Kr} в желудочковых кардиомиоцитах трески в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена ($n = 6$ для обеих групп; $**p < 0.01$, $*p < 0.05$, парный t -тест Стьюдента); (c) — репрезентативные записи I_{Kr} (при 40 мВ) в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена.

трена: не было замечено каких-либо изменений в амплитуде I_{K1} . Репрезентативные примеры записей I_{K1} в контрольных условиях и под действием 1 мкМ фенантрена представлены на рис. 3b.

Действие фенантрена на быстрый натриевый ток I_{Na} в желудочковых миоцитах трески

Быстрый натриевый ток I_{Na} , ответственный за фазу быстрой реполяризации ПД в миокарде по-

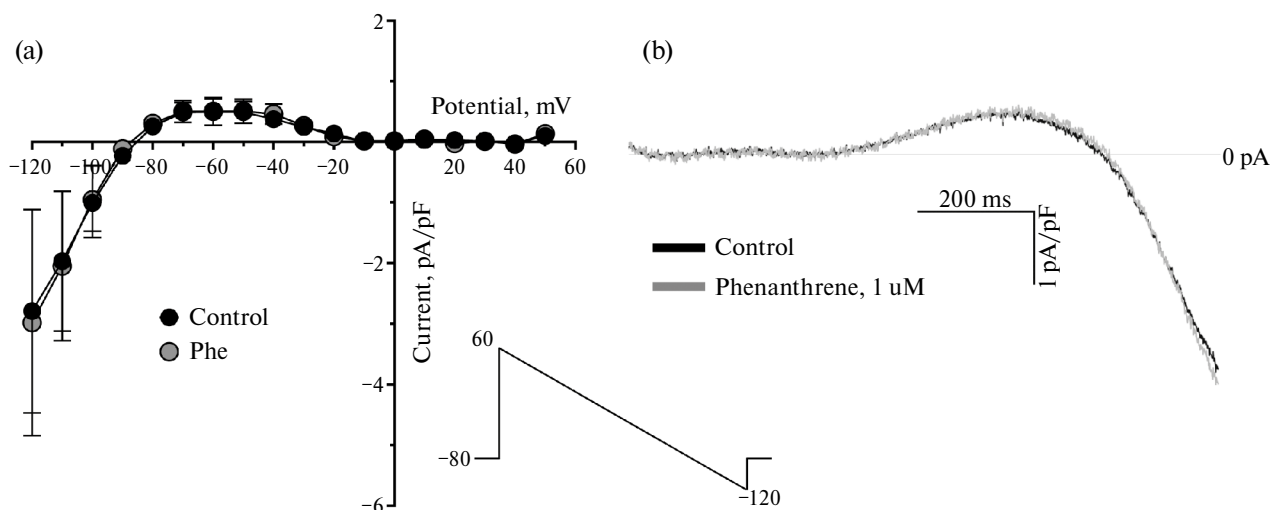


Рис. 3. Влияние фенантрена на фоновый калиевый ток входящего выпрямления I_{K1} в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — вольт-амперная характеристика тока I_{K1} в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена ($n = 6$ для обеих групп, $p > 0.05$ для всех потенциалов, парный t -тест Стьюдента); (b) — репрезентативные записи I_{K1} в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена.

звоночных, регистрировали с использованием протокола ступенчатой деполяризации от поддерживаемого потенциала -120 мВ (показан на рис. 4). Репрезентативный пример записи тока I_{Na} в рабочем миокарде трески представлен на рис. 4а. I_{Na} в миоцитах трески активировался при мембранных потенциалах положительнее -70 мВ; максимум амплитуды входящего тока наблюдался при -30 мВ. Вольт-амперная характеристика I_{Na} в кардиомиоцитах трески отражена на рис. 4б.

Фенантрен в концентрации 1 мкМ относительно слабо снижал амплитуду I_{Na} и не оказывал влияния на кинетику и инактивацию тока (см. рис. 4б, 4с). Снижение амплитуды I_{Na} под действием фенантрена составило $11.47 \pm 3.19\%$ относительно контрольных значений. Эффект наблюдался начиная с 6-й минуты подачи раствора, содержащего фенантрен, в экспериментальную камеру.

Действие фенантрена на вход кальция в желудочковых миоцитах трески

Кальциевый ток L-типа в изолированных кардиомиоцитах трески регистрировали при ступенчатой деполяризации от поддерживаемого потенциала -80 мВ (см. рис. 5) в присутствии 300 нМ тетродотоксина во внеклеточном растворе для подавления I_{Na} . Репрезентативный пример оригинальных записей I_{Ca} представлен на рис. 5а. Максимум амплитуды входящего I_{Ca} наблюдался при потенциале -10 мВ; вольт-амперная характеристика I_{Ca} в желудочковом миокарде трески отражена на рис. 5б.

Фенантрен (1 мкМ) во внеклеточном растворе крайне слабо влиял на амплитуду I_{Ca} : в присутствии фенантрена пиковая амплитуда I_{Ca}

снижалась на $15.54 \pm 7.64\%$; различия были статистически незначимыми. Кроме того, под действием фенантрена кинетика инактивации I_{Ca} имела тенденцию к ускорению, однако снижение временной константы инактивации τ под действием фенантрена также оказалось статистически незначимым (см. рис. 5д). Однако, несмотря на то что изменения этих параметров по отдельности были статистически незначимыми, анализ количества заряда, переносимого I_{Ca} , показал, что воздействие фенантрена приводит к статистически значимому снижению суммарного входа кальция — на $25.17 \pm 5.73\%$ (рис. 5е). Описываемый эффект наблюдался начиная с 5-й минуты подачи раствора, содержащего фенантрен, в экспериментальную камеру.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данная работа впервые рассматривает электрическую активность сердца трески (*Gadus morhua*), а также влияние на нее фенантрена — одного из наиболее известных токсичных компонентов нефти. Несмотря на многолетний опыт исследований нашей научной группы на арктических видах рыб, в том числе на рыбах семейства тресковых (*Gadidae*) [18, 26], электрическая активность сердца трески (*Gadus morhua*) практически не изучена. При этом треска является широко распространенным видом рыб и играет важную экономическую, экологическую и культурную роль для многих стран — и отчасти именно благодаря этому сталкивается со значительными изменениями среды обитания, в том числе антропогенными [27].

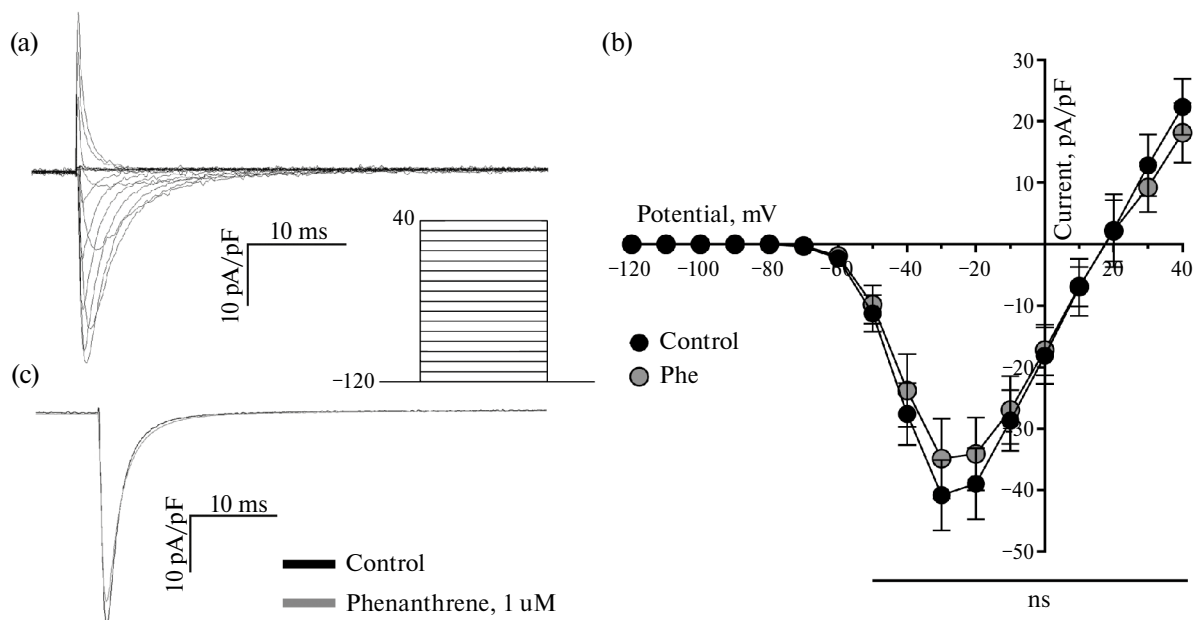


Рис. 4. Влияние фенантрена на быстрый натриевый ток I_{Na} в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — репрезентативные записи I_{Na} ; (b) — вольт-амперная характеристика I_{Na} в желудочковых кардиомиоцитах трески в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена ($n = 7$ для обеих групп, $p > 0.05$ для всех потенциалов, парный t -тест Стьюдента); (c) — репрезентативные записи I_{Na} (при -30 мВ) в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена.

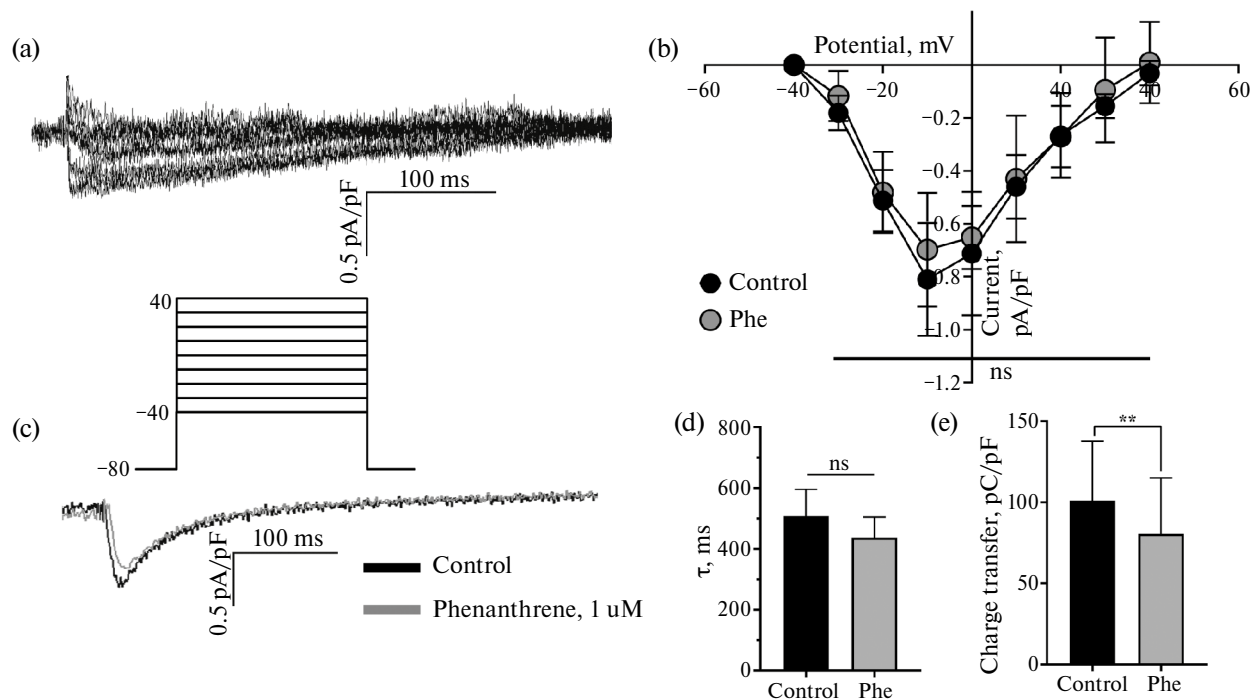


Рис. 5. Влияние фенантрена на кальциевый ток I_{Ca} в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — репрезентативные записи I_{Ca} ; (b) — вольт-амперная характеристика I_{Ca} в желудочковых кардиомиоцитах трески в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена ($n = 5$ для обеих групп, $p > 0.05$ для всех потенциалов, парный t -тест Стьюдента); (c) — репрезентативные записи I_{Ca} (при -10 мВ) в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена; (d) — влияние 1 мкМ фенантрена на временную константу инактивации I_{Ca} при -10 мВ ($n = 5$; $p = 0.22$, парный t -тест Стьюдента); (e) — влияние 1 мкМ фенантрена на суммарный заряд, переносимый I_{Ca} при -10 мВ ($n = 5$; $p < 0.01$, парный t -тест Стьюдента).

Электрическая активность желудочкового миокарда трески (форма ПД, уровень мембранного потенциала покоя) имела типичный для тресковых рыб вид; длительность ПД при 9°C , была близка к

таковой у наваги (*Eleginus nawaga*) и налима (*Lota lota*), но несколько выше, чем у полярной тресочки (*Boreogadus saida*), более stenothermного вида рыб [26]. Электрофизиологический фенотип, а именно,

набор ионных токов, формирующих электрическую активность миокарда, у трески был типичен для костистых рыб и включал четыре основных тока: I_{Kr} , I_{K1} , I_{Na} и I_{Ca} [19]. Литературные данные позволяют провести сравнение с другими тресковыми, но нужно отметить, что температурный режим в разных исследованиях не всегда совпадает, тогда как большинство ионных токов зависят от температуры. Основным реполяризирующим током в рабочем миокарде трески был быстрый ток задержанного выпрямления I_{Kr} ; его вольт-амперная зависимость и амплитуда были близки к таковым в желудочковых миоцитах других тресковых рыб — наваги и налима [18, 28]. Фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} в желудочковых миоцитах трески имел относительно небольшую амплитуду — приблизительно такую же, как в миокарде налима и наваги [29, 30] и заметно ниже, чем у радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) или карася (*Carassius carassius*) [31]. Вероятно, низкая амплитуда I_{K1} является характерной чертой тресковых рыб. Быстрый натриевый ток I_{Na} в миокарде трески не отличался от такового в миокарде наваги и налима [18, 32]. Кальциевый ток L-типа в миокарде трески имел крайне низкую амплитуду, не превышающую -1 пА/пФ; максимум амплитуды I_{Ca} соответствовал потенциалу -10 мВ. Имеющиеся литературные данные не позволяют оценить форму вольт-амперных характеристики I_{Ca} в миоцитах наваги — однако, амплитуда I_{Ca} в миокарде этих двух видов рыб, по всей видимости, сопоставима [33]. В желудочковом миокарде налима I_{Ca} также имеет относительно небольшую амплитуду — при 11°C максимальная амплитуда тока была немногим выше -1 пА/пФ; можно предположить, что при температуре 9°C она не будет отличаться от амплитуды I_{Ca} в миокарде наваги и трески [30]. Интересно, однако, что максимум амплитуды I_{Ca} в миоцитах трески и наваги смещен в сторону более отрицательных потенциалов по сравнению с налимом (-10 мВ и 10 мВ, соответственно) — вероятно, сарколеммальный кальциевый ток в миокарде тресковых рыб может опосредоваться разными изоформами кальциевых каналов [34]. Таким образом, полученные данные в совокупности с имеющейся в литературе информацией указывают на то, что электрофизиологические аспекты функционирования сердца рыб — по крайней мере, тресковых — определяются как филогенетическим родством, так и, по всей видимости, особенностями занимаемой конкретным видом экологической ниши. Навага и треска являются солоноводными эвритермами, в то время как налим обитает в пресных водоемах при температурах, не превышающих 13°C . Можно предположить, что вольт-амперная зависимость кальциевого тока с максимумом при более положительных потенциалах может ограничивать вход

кальция и препятствовать кальциевой перегрузке при генерации ПД в миокарде налима при низких температурах.

Также в рамках данной работы мы впервые оценили влияние фенантрена на электрическую активность желудочкового миокарда трески. Фенантрен, как показали многочисленные работы [12–14, 20], оказывает проаритмическое влияние на миокард рыб, нарушая тем самым насосную функцию сердца. Однако, конкретные изменения паттерна электрической активности сердца рыб в присутствии фенантрена видоспецифичны. Ранее электрофизиологические эффекты фенантрена были достаточно подробно исследованы в рабочем миокарде наваги [18], и сравнение этих данных с результатами настоящего исследования позволит ответить на вопрос о том, насколько видоспецифичны эффекты ПАУ (на примере фенантрена) в рамках одного семейства рыб.

Как у наваги, так и у трески фенантрен в концентрации 1 мкМ довольно слабо влиял на конфигурацию ПД: в желудочковых миоцитах наваги фенантрен вовсе не вызывал статистически значимых изменений какого-либо из анализируемых параметров. У трески, однако, под действием фенантрена происходило статистически значимое замедление нарастания переднего фронта ПД. Форма ПД и ее изменения под действием ПАУ зависят от воздействия ПАУ непосредственно на каналы, опосредующие деполяризирующие (I_{Na} и I_{Ca}) и реполяризирующие (I_{Kr} и I_{K1}) ионные токи. И, поскольку выше было показано, что электрофизиологический фенотип желудочкового миокарда трески и наваги весьма близки, наблюдаемые различия во влиянии фенантрена на форму ПД могут быть связаны с возможным различием в чувствительности определенных ионных каналов к ПАУ. В самом деле, в миокарде наваги 1 мкМ фенантрена не вызывал статистически значимых изменений в амплитуде I_{Na} [18] — тогда как в миокарде трески под действием 1 мкМ фенантрена происходило статистически значимое снижение амплитуды I_{Na} более чем на 10% .

Одним из основных эффектов фенантрена (и, видимо, других ПАУ) в миокарде рыб является подавление быстрого тока задержанного выпрямления I_{Kr} [14, 16, 20]. В миокарде трески I_{Kr} также оказался наиболее чувствителен к ПАУ: фенантрен в концентрации 1 мкМ подавлял ток на $61.33 \pm 3.94\%$. В проведенном ранее исследовании I_{Kr} в миокарде наваги был значительно менее чувствителен к фенантрону, и 1 мкМ подавлял ток менее, чем на 40% [18]. С одной стороны, можно предположить наличие определенных межвидовых различий в строении каналов ERG, опосредующих ток I_{Kr} , у трески и наваги, влекущее за собой различия в связывании молекул фенантрена порообразующей субъедини-

цей канала. С другой стороны, при проведении подобных экологических исследований, включающих поимку животных в естественной среде обитания, нужно принимать во внимание множество факторов, и, поскольку данные два исследования были разделены во времени значительным сроком, нельзя полностью исключать возможность ремоделирования и изменения чувствительности животных к фенантрону по не зависящим от исследователей причинам — поскольку проведенные в течение последнего года исследования демонстрируют достаточно высокую чувствительность $I_{кр}$ в миокарде различных видов арктических рыб к различным ПАУ [16, 33].

Нужно отметить, что, несмотря на достаточно высокую чувствительность $I_{кр}$ в миокарде трески к фенантрону, его подавление 1 мкМ фенантрона не приводило к значимым изменениям в длительности ПД. Для сравнения, аналогичная степень подавления $I_{кр}$ в миокарде европейского керчака (*Myoxocephalus scorpio*) в присутствии 1 мкМ фенантрона приводила к почти двукратному увеличению длительности ПД [16]. С одной стороны, это можно объяснить тем, что в миокарде трески фенантрон также в некоторой степени подавляет кальциевый ток L-типа, что противоположным образом влияет на длительность ПД. С другой стороны, абсолютная амплитуда $I_{кр}$ в миокарде тресковых рыб заметно выше, чем у керчака, поэтому можно предположить, что заметная доля $I_{кр}$ в миокарде тресковых рыб, ведущих более подвижный образ жизни и, предположительно, сталкивающихся с потребностью развивать более высокую частоту сердечных сокращений, составляет так называемый реполяризационный резерв [35]. Соответственно, можно предполагать, что при более высокой частоте сердечного ритма, сопряженной со значительным укорочением ПД — например, при повышении температуры окружающей среды — проаритмогенный эффект фенантрона будет выражен более явно.

Таким образом, данное исследование демонстрирует, что несмотря на некоторую общность эффектов фенантрона в рабочем миокарде тресковых рыб (а именно, трески и наваги), эффекты фенантрона в миокарде трески были выражены более явно, что может свидетельствовать о более высокой чувствительности популяции трески в арктических морях к загрязнению водной среды компонентами нефти и ПАУ.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов — Д.В.А., сбор данных — А.В.Ш., Т.С.Ф., Д.В.А., обработка данных — А.В.Ш., Т.С.Ф., Д.В.А., написание и редактирование рукописи статьи — Т.С.Ф., Д.В.А.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии МГУ по биоэтике. Протоколы содержания животных и экспериментов с использованием животных одобрены Комиссией МГУ по биоэтике.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №22-14-00075).

В работе было использовано оборудование, приобретенное МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках федерального проекта «Развитие инфраструктуры для научных исследований и подготовки кадров» национального проекта «Наука и университеты» от 29.12.2022г №15-пр/42 (Соглашение №355 от 15.03.2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dmitrieva D, Romasheva N (2020) Sustainable Development of Oil and Gas Potential of the Arctic and Its Shelf Zone: The Role of Innovations. J Mar Sci Eng 8:1003. <https://doi.org/10.3390/JMSE8121003>
2. Hose JE, McGurk MD, Marty GD, Hinton DE, Brown ED, Baker TT (1996) Sublethal effects of the (Exxon Valdez) oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989–1991. Can J Fish Aquat Sci 53:2355–2365. <https://doi.org/10.1139/F96-174>
3. McGurk MD, Brown ED (1996) Egg–larval mortality of Pacific herring in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Can J Fish Aquat Sci 53:2343–2354. <https://doi.org/10.1139/F96-172>
4. Gulas S, Downton M, D'Souza K, Hayden K, Walker TR (2017) Declining Arctic Ocean oil and gas developments: Opportunities to improve governance and environmental pollution control. Mar Policy 75:53–61. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOL.2016.10.014>
5. Walker TR, Crittenden PD, Young SD, Prystina T (2006) An assessment of pollution impacts due to the oil and gas industries in the Pechora basin, north-eastern European Russia. Ecol Indic 6:369–387. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2005.03.015>
6. Rajendran S, Sadooni FN, Al-Kuwari HAS, Oleg A, Govil H, Nasir S, Vethamony P (2021) Monitoring oil spill in Norilsk, Russia using satellite data. Sci Rep 11:1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83260-7>

7. *Bambulyak A, Ehlers S* (2020) Oil spill damage: a collision scenario and financial liability estimations for the Northern Sea Route area. *Sh Technol Res* 148–164. <https://doi.org/10.1080/09377255.2020.1786932>
8. *Carls MG, Rice SD, Hose JE* (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ Toxicol Chem* 18:481–493. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620180317>
9. *Lawal AT* (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environ Sci* 3:1339841
10. *Xu K, Zhang Y, Zheng J, Wang C, Chen R* (2023) Comparative Toxicity of 3–5 Ringed Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Skeletal Development in Zebrafish Embryos and the Possible Reason. *Bull Environ Contam Toxicol* 110:8. <https://doi.org/10.1007/S00128-022-03644-X/TABLES/2>
11. *Incardona JP, Collier TK, Scholz NL* (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 196:191–205. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2003.11.026>
12. *Incardona JP, Carls MG, Day HL, Sloan CA, Bolton JL, Collier TK, Schoiz NL* (2009) Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering. *Environ Sci Technol* 43:201–207. https://doi.org/10.1021/ES802270T/SUPPL_FILE/ES802270T_SI_004.PDF
13. *Ainerua MO, Tinwell J, Kompella SN, Sørhus E, White KN, van Dongen BE, Shiels HA* (2020) Understanding the cardiac toxicity of the anthropogenic pollutant phenanthrene on the freshwater indicator species, the brown trout (*Salmo trutta*): From whole heart to cardiomyocytes. *Chemosphere* 239:124608. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124608>
14. *Brette F, Shiels HA, Galli GLJ, Cros C, Incardona JP, Scholz NL, Block BA* (2017) A Novel Cardiotoxic Mechanism for a Pervasive Global Pollutant. *Sci Rep* 7:41476. <https://doi.org/10.1038/srep41476>
15. *Brette F, Machado B, Cros C, Incardona JP, Scholz NL, Block BA* (2014) Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. *Science* (80-) 343:772–776. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1242747>
16. *Filatova TS, Mikhailova VB, Guskova VO, Abramochkin DV* (2023) The Effects of Phenanthrene on the Electrical Activity in the Heart of Shorthorn Sculpin (*Myoxocephalus scorpio*). *J Evol Biochem Physiol* 2022 581 58:S44–S51. <https://doi.org/10.1134/S0022093022070055>
17. *Vehniäinen ER, Haverinen J, Vornanen M* (2019) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Phenanthrene and Retene Modify the Action Potential via Multiple Ion Currents in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Cardiac Myocytes. *Environ Toxicol Chem* 38:2145–2153. <https://doi.org/10.1002/ETC.4530>
18. *Abramochkin D V, Kompella SN, Shiels HA* (2021) Phenanthrene alters the electrical activity of atrial and ventricular myocytes of a polar fish, the Navaga cod. *Aquat Toxicol* 235:105823. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2021.105823>
19. *Abramochkin D V, Filatova TS, Pustovit KB, Voronina YA, Kuzmin VS, Vornanen M* (2022) Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 268:111204. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2022.111204>
20. *Kompella SN, Brette F, Hancox JC, Shiels HA* (2021) Phenanthrene impacts zebrafish cardiomyocyte excitability by inhibiting IKr and shortening action potential duration. *J Gen Physiol* 153:e202012733. <https://doi.org/10.1085/JGP.202012733/211701>
21. *Troell M, Eide A, Isaksen J, Hermansen Ø, Crépin AS* (2017) Seafood from a changing Arctic. *Ambio* 46:368–386. <https://doi.org/10.1007/S13280-017-0954-2/TABLES/5>
22. Gadus morhua, Atlantic cod: fisheries, aquaculture, gamefish. <https://fishbase.mnhn.fr/summary/69>. Accessed 15 Mar 2024
23. *Abramochkin DV, Vornanen M* (2017) Seasonal changes of cholinergic response in the atrium of Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*). *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 187:329–338. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1032-y>
24. *Hove-Madsen L, Tort L* (1998) L-type Ca²⁺ current and excitation-contraction coupling in single atrial myocytes from rainbow trout. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 275:R2061–R2069. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.6.R2061>
25. *Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC* (1996) Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J Gen Physiol* 107:611–619. <https://doi.org/10.1085/JGP.107.5.611>
26. *Abramochkin DV, Haverinen J, Mitenkov YAYA, Vornanen M* (2019) Temperature and external K⁺ dependence of electrical excitation in ventricular myocytes of cod-like fishes. *J Exp Biol* 222:jeb193607. <https://doi.org/10.1242/JEB.193607/259631/AM/TEMPERATURE-AND-EXTERNAL-K-DEPENDENCE-OF>
27. *Link JS, Bogstad B, Sparholt H, Lilly GR* (2009) Trophic role of Atlantic cod in the ecosystem. *Fish Fish* 10:58–87. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00295.x>
28. *Shiels HA, Paajanen V, Vornanen M* (2006) Sarcolemmal ion currents and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in ventricular myocytes from the cold stenothermic fish, the burbot (*Lota lota*). *J Exp Biol* 209:3091–3100. <https://doi.org/10.1242/jeb.02321>
29. *Abramochkin DV, Vornanen M* (2015) Seasonal acclimatization of the cardiac potassium currents (IK1 and IKr) in an arctic marine teleost, the navaga cod (*Eleginus navaga*). *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 185:883–890. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0925-5>
30. *Shiels HA, Paajanen V, Vornanen M* (2006) Sarcolemmal ion currents and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in ventricular myocytes from the cold stenothermic fish, the burbot (*Lota lota*). *J Exp Biol* 209:3091–3100. <https://doi.org/10.1242/jeb.02321>

31. *Haverinen J, Vornanen M* (2009) Responses of Action Potential and K^+ Currents to Temperature Acclimation in Fish Hearts: Phylogeny or Thermal Preferences? *Physiol Biochem Zool* 82:468–482.
<https://doi.org/10.1086/590223>
32. *Haverinen J, Vornanen M* (2004) Temperature acclimation modifies Na^+ current in fish cardiac myocytes. *J Exp Biol* 207:2823–2833.
<https://doi.org/10.1242/jeb.01103>
33. *Abramochkin D V, Filatova TS, Kuzmin VS, Voronkov YI, Kamkin A, Shiels HA* (2023) Tricyclic hydrocarbon fluorene attenuates ventricular ionic currents and pressure development in the navaga cod. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 273:109736.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109736>
34. *Mesirca P, Torrente AG, Mangoni ME* (2015) Functional role of voltage gated Ca^{2+} channels in heart automaticity. *Front Physiol* 6:19.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00019>
35. *Varró A, Baczkó I* (2011) Cardiac ventricular repolarization reserve: a principle for understanding drug-related proarrhythmic risk. *Br J Pharmacol* 164:14–36.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01367.x>

THE EFFECTS OF PHENANTHRENE ON ELECTRICAL ACTIVITY IN VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES OF ATLANTIC COD (*GADUS MORHUA*)

T. S. Filatova^{a, #}, A. V. Shamshura^a and D. V. Abramochkin^a

^a Department of Human and Animal Physiology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[#] e-mail: filatova@mail.bio.msu.ru

The production of oil on the Arctic shelf and its transport along the Northern Sea Route increase risks of pollution of the ecosystems in the Arctic seas with oil and oil products. Today, polyaromatic hydrocarbons are known as the most toxic oil components, and phenanthrene is predominant in terms of its concentration in oil and physiological effects. Phenanthrene affects the electrical activity of fish heart, but its effects are species-specific. At the same time, the effects of phenanthrene on cardiac function in Arctic fishes, including economically important commercial species, are studied not enough. This study examines the effects of phenanthrene on electrical activity and ionic currents in ventricular myocardium of Atlantic cod (*Gadus morhua*). The major ionic currents in cod myocardium were I_{Kr} , I_{K1} , I_{Na} and I_{Ca} . Phenanthrene (1 μ M) did not affect the duration of action potentials (APs) recorded in isolated cod ventricular cardiomyocytes using patch clamp method. Meanwhile, phenanthrene suppressed rapid delayed rectifier current I_{Kr} by $61.33 \pm 3.94\%$, decreasing the repolarization reserve of the myocardium. Phenanthrene did not affect nor the level of resting membrane potential, not background inward rectifier current I_{K1} . Also, application of phenanthrene decreased AP upstroke velocity in cod myocytes, which was due to the suppression of fast sodium current I_{Na} . Finally, phenanthrene slightly reduced the amplitude of calcium current I_{Ca} and accelerated its inactivation, which overall led to the decrease in I_{Ca} charge transfer. Thus, the effects of phenanthrene on cod myocardium at cellular level can be described as potentially proarrhythmic, which makes the populations of cod in Arctic seas vulnerable to pollution of the aquatic environment by oil components after oil spills due to technological disasters.

Keywords: heart, fish, polyaromatic hydrocarbons, Arctic, action potential, ionic currents, cardiotoxicity