

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 591.112.1

# Механизмы воздействия полиароматических углеводородов нефти на электрическую активность сердца северной наваги (*Eleginus nawaga*)

Т.С. Филатова<sup>1,2,\*</sup> , А.С. Бородков<sup>3</sup> , А.М. Кархов<sup>1,2</sup> , И.Х. Джуманиязова<sup>1</sup> ,  
О.Б. Пустовит<sup>1</sup> , Д.В. Абрамочкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а;

<sup>3</sup>Институт геохимии и аналитической химии имени В.И. Вернадского, Российская академия наук, Россия, 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 19, стр. 1

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

Интенсивное развитие нефте- и газодобывающей отраслей в Арктике ставит под угрозу арктические водные экосистемы. Считается, что токсическое и, прежде всего, летальное кардиотоксическое действие нефти на живые организмы связано с полиароматическими углеводородами (ПАУ), и в предыдущих работах были рассмотрены электрофизиологические механизмы действия отдельных ПАУ в составе нефти. Однако физиологические эффекты сложной смеси ПАУ в составе водорастворимой фракции (ВРФ) нефти ранее не изучались. Данное исследование сфокусировано на анализе действия ВРФ нефти на электрическую активность и основные ионные токи в рабочем миокарде наваги (*Eleginus nawaga*), одного из наиболее важных промысловых видов рыб Арктики. Было обнаружено, что 1%-ные и 10%-ные растворы ВРФ нефти вызывают выраженное увеличение длительности потенциалов действия в кардиомиоцитах наваги. Этот эффект, по всей видимости, связан с подавлением быстрого тока задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  ( $IC_{50}$  около 3% в желудочковом и предсердном миокарде). В более высоких концентрациях ВРФ нефти подавляла и кальциевый ток  $I_{CaL}$  ( $IC_{50} = 10,6\%$ ), что приводило к снижению сократительной активности изолированных препаратов миокарда. В отличие от отдельных трициклических ПАУ, ВРФ нефти не действовала на быстрый натриевый ток  $I_{Na}$  и не влияла на скорость фазы быстрой деполяризации потенциала действия. Оценка содержания трициклических ПАУ в 10%-ной ВРФ нефти показала, что их совокупная концентрация относительно низка и не превышает 100 нМ. Таким образом, ВРФ нефти также оказывает мощное кардиотоксическое действие в миокарде рыб, однако ее эффект отличается от исследованных ранее эффектов трициклических ПАУ и позволяет предполагать присутствие в составе нефти еще не исследованных соединений, обладающих более выраженной способностью блокировать калиевые каналы ERG.

**Ключевые слова:** кардиомиоцит, потенциал действия, пэтч-кламп, полиароматические углеводороды, ионные токи, нефть

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-9

## Введение

Одной из ключевых задач, стоящих перед нашей страной в текущем столетии, является успешное хозяйственное освоение обширных пространств Русской Арктики. Минеральные ресурсы Арктики, в первую очередь, запасы нефти и газа велики, и их неизбежное освоение представляется делом грядущих десятилетий. Вместе с тем, при реализации проектов экономического развития

Арктики важно детальное понимание имеющихся рисков для хрупких арктических экосистем с целью минимизации возможных негативных экологических последствий. В частности, с губительным воздействием утечек нефтепродуктов на морские экосистемы уже столкнулись как другие страны, в первую очередь, США, так и, в определенной степени, Россия. Например, в 1989 г. авария американского танкера Exxon Valdez у берегов

Аляски привела к утечке в океан более 40 тыс. т. сырой нефти. В 2010 г. взрыв и пожар нефтяной платформы Deepwater Horizon в Мексиканском заливе привели к самому масштабному в истории выбросу нефти в море — ежедневная утечка нефти составляла несколько тысяч тонн. До сих пор масштабного загрязнения вод Северного ледовитого океана нефтепродуктами удавалось не допускать, однако увеличение рисков подобного загрязнения в будущем представляется весьма вероятным. Более того, существуют опасения, что загрязнители, накопившиеся за прошедшие годы в вечной мерзлоте, смогут попасть в океан вследствие потепления климата [1]. Наконец, общая интенсификация деятельности человека в Арктике увеличивает уровень постоянных небольших утечек нефтепродуктов, которые в совокупности могут приводить к последствиям, сравнимым с разовыми крупными выбросами.

Известно, что рыбы характеризуются высокой чувствительностью к загрязнителям, содержащимся в нефтепродуктах, причем наиболее уязвимой в отношении острых эффектов загрязнителей в организме рыбы считается сердечно-сосудистая система [2]. Основными компонентами нефти, оказывающими токсическое воздействие, являются полиароматические углеводороды (ПАУ), обладающие относительно высокой растворимостью в воде [3]. В настоящее время известно, что загрязнение среды обитания рыб сырой нефтью приводит к нарушению как электрической, так и сократительной активности в мышечных клетках сердца, кардиомиоцитах, а значит, и в целом сердце. В частности, было показано, что экстракты сырой нефти с платформы Deepwater Horizon вызывали нарушение кальциевого обмена и удлинение потенциала действия (ПД) в кардиомиоцитах тунца, сопряженное с подавлением быстрого калиевого тока задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  [4]. Дальнейшие исследования были в основном сосредоточены на кардиотоксическом действии одного из содержащихся в нефти ПАУ — фенантрена [5–7]. В отличие от перечисленных исследований, работы нашей группы проводятся на рыбах Арктики. В частности, мы показали, что действие как фенантрена [8], так и другого трициклического ПАУ, флюорена [9], на электрическую активность сердца северной наваги обусловлено подавлением  $I_{Kr}$  и — в меньшей степени — быстрого натриевого тока  $I_{Na}$  и кальциевого тока L-типа  $I_{CaL}$ .

В то же время, действие всей совокупности ПАУ, содержащихся в российских сортах нефти, на ионные токи и электрическую активность кардиомиоцитов арктических видов рыб ранее не было исследовано. В данной работе впервые описаны изменения электрической активности желудочковых миоцитов северной наваги под действием водорастворимой фракции (ВРФ) нефти и раскрыты их ионные механизмы.

## Материалы и методы

**Животные.** Эксперименты проводили на базе Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова МГУ имени М.В. Ломоносова. Взрослых особей наваги (*Eleginus nawaga*) вылавливали в Кандалакшском заливе в окрестностях биостанции (66°19'50" с.ш., 33°40'06" в.д.); в работе использовали животных обоих полов массой 50–150 г. Перед экспериментами животных содержали в течение минимум 7 сут в аквариуме, оборудованном проточной системой (водообмен ~3 л/мин). Температуру воды в аквариуме для передержки контролировали, средняя температура — 10°C. Проведение экспериментов было одобрено комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (разрешение №164-ж).

**Получение изолированных кардиомиоцитов.** Изолированные кардиомиоциты наваги получали стандартным, ранее описанным способом, посредством энзиматической обработки изолированного сердца [10, 11]. Рыбу оглушали ударом по голове, после чего разрушали головной мозг, вскрывали с брюшной стороны и вырезали сердце. В желудочек сердца через бульбус аорты вставляли канюлю и ретроградно перфузировали сердце раствором для выделения миоцитов со сниженным содержанием  $Na^+$  и не содержащим ионов  $Ca^{2+}$  [12]. Состав раствора (мМ): 100 — NaCl; 10 — KCl; 1,2 —  $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ; 4 —  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 50 — таурин; 10 — глюкоза; 10 — HEPES; pH — 6,9 при комнатной температуре (22°C). Через 5 мин перфузии подавали раствор такого же состава с добавлением протеолитических ферментов — коллагеназы IA (Sigma, США) и трипсина (Sigma, США) в концентрациях 0,5 и 0,33 мг/мл соответственно, а также 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Через 8–10 мин энзиматической перфузии желудочек отделяли от предсердия, измельчали ножницами и пипетировали полученную массу для механического разделения кардиомиоцитов. Суспензию миоцитов хранили в растворе для выделения при температуре 5°C в течение 8–9 ч после выделения.

**Получение водорастворимой фракции нефти.** Водорастворимую фракцию нефти (ВРФ), содержащую токсичные полициклические углеводороды, получали ранее описанным способом [13]. В работе использовали западносибирскую нефть марки Urals. Нефть добавляли к используемому в эксперименте физиологическому раствору в соотношении 1 г нефти на 1 л раствора. Затем нефть эмульгировали в растворе с помощью блендера, а полученную эмульсию помещали в делительную воронку на 1 ч. По прошествии 1 ч нижние 50% объема делительной воронки сливали и использовали в качестве ВРФ нефти. В экспериментах тестировали 0,1%, а также 1% и 10% разведения ВРФ нефти.

**Регистрация ионных токов и потенциалов действия.** Ионные токи и потенциалы действия (ПД)

регистрировали в изолированных кардиомиоцитах наваги методом пэтч-кламп в конфигурации whole cell с помощью усилителя Axopatch 200A (Molecular Devices, США). При записи ионных токов и потенциалов действия использовали, соответственно, режим фиксации потенциала (voltage clamp) или фиксации тока (current clamp). Клетки помещали в экспериментальную камеру RC-26 объемом 150 мкл (Warner Instrument Corporation, США) и постоянно перфузировали модифицированным физиологическим раствором следующего состава (в мМ): 150 – NaCl; 5,4 – KCl; 1,8 – CaCl<sub>2</sub>; 1,2 – MgCl<sub>2</sub>; 10 – глюкоза; 10 – Hepes; pH – 7,6, при температуре 12°C. Пэтч-пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров (Sutter Instruments, США). Для регистрации калиевых токов пипетки заполняли раствором (pH 7,2) следующего состава (мМ): 140 – KCl; 1 – MgCl<sub>2</sub>; 5 – EGTA; 4 – MgATP; 0,03 – Na<sub>2</sub>GTP<sub>3</sub>; 10 – Hepes. Сопротивление заполненных пэтч-пипеток составляло в среднем  $2,36 \pm 0,24$  МΩ.

При регистрации тока  $I_{Kr}$  в физиологический раствор добавляли нифедипин (20 мкМ; Sigma-Aldrich, США) и тетродотоксин (300 нМ; Sigma-Aldrich, США) для подавления токов  $I_{CaL}$  и  $I_{Na}$  соответственно.  $I_{Kr}$  индуцировали двухступенчатой деполяризацией от поддерживаемого потенциала –80 мВ. На первой ступени (длительность – 2 с) клетку деполяризовали до –40 – +60 мВ с шагом 20 мВ (всего 6 шагов) для того, чтобы вызвать активацию калиевых каналов ERG. Вторую ступень –20 мВ использовали для регистрации хвостового тока. При регистрации калиевого тока входящего выпрямления  $I_{K1}$  помимо указанных блокаторов добавляли E-4031 (5 мкМ; Sigma-Aldrich, США), блокатор  $I_{Kr}$ . Ток индуцировали линейным сдвигом потенциала от +60 до –120 мВ (длительность сдвига – 1 с), поддерживаемый потенциал составлял –80 мВ.

Для регистрации ПД использовали модифицированный физиологический раствор того же состава, что и выше, а также пипеточный раствор для регистрации калиевых токов без добавления EGTA (этиленгликоль-бис (β-аминоэтиловый эфир) -N,N,N',N'-тетрауксусная кислота) [14]. ПД индуцировали в режиме фиксации тока импульсами деполяризующего тока длительностью 2 мс, с частотой 0,5 Гц, амплитуду импульсов устанавливали на уровне на 30% превышающем пороговую, достаточную для инициации ПД [15]. Оценивали влияние ВРФ нефти на длительность ПД на уровне 50% (ДПД50) и 90% (ДПД90) реполяризации, уровень мембранного потенциала покоя и максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД.

Кальциевый ток  $I_{Ca}$  регистрировали с использованием модифицированного физиологического раствора, в котором KCl был заменен эквивалентным количеством CsCl. Пипеточный раствор для

регистрации кальциевого тока содержал (в мМ): 130 – CsCl; 1 – MgCl<sub>2</sub>; 5 – EGTA; 10 – тетраэтиламмония; 4 – MgATP; 0,03 – Na<sub>2</sub>GTP и 10 – Hepes, pH – 7,2 доведенный с помощью CsOH. Ток индуцировали ступенчатой деполяризацией с шагом 10 мВ от поддерживаемого потенциала –40 мВ, позволяющего инактивировать натриевые каналы. При регистрации быстрого натриевого тока ( $I_{Na}$ ) использовали физиологический раствор с пониженным содержанием натрия (мМ): 20 – NaCl; 120 – CsCl; 1 – MgCl<sub>2</sub>; 0,5 – CaCl<sub>2</sub>; 10 – глюкоза; 10 – Hepes; pH – 7,6. Для подавления  $I_{Ca}$  в раствор добавляли 20 мкМ нифедипина. Пипеточный раствор для регистрации  $I_{Na}$  содержал (мМ): 5 – NaCl; 130 – CsCl; 1 – MgCl<sub>2</sub>; 5 – EGTA; 5 – Mg<sub>2</sub>ATP; 5 – Hepes, pH – 7,2. Регистрацию  $I_{Na}$  начинали не ранее, чем через 3 мин после установления конфигурации whole-cell. Ток индуцировали ступенчатой деполяризацией с шагом 10 мВ от поддерживаемого потенциала –120 мВ.

**Регистрация сократительной активности предсердного миокарда.** Для изучения влияния ВРФ нефти на сократительную активность предсердного миокарда использовали механочувствительный датчик (Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, Германия), регистрирующий сокращения в изометрическом режиме. Сердце наваги промывали от крови физиологическим раствором, а затем выделяли препарат изолированного предсердия с интактным пейсмейкером (синоатриальный клапан). Препарат закрепляли в экспериментальной термостатируемой камере, заполненной физиологическим раствором Кребса, содержащим (мМ): 150,1 – NaCl, 7 – NaHCO<sub>3</sub>, 5,2 – KCl, 1,9 – NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,8 – MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,9 – CaCl<sub>2</sub>, 5,6 – D-глюкоза. В ходе эксперимента раствор в камере постоянно аэрировали карбогеном (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) для оксигенации и поддержания pH. Препарат закрепляли на дне камеры и подсоединяли к механодатчику. Силу сокращений, развиваемую препаратом, нормировали на массу препарата. Оценивали частоту сокращений препаратов, амплитуду сокращений, а также максимальную скорость развития сокращений и скорость расслабления препаратов.

**Определение содержания полиароматических углеводородов в ВРФ нефти.** Концентрация фенантрена и его производных была измерена методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии на масс-спектрометре с электронной ионизацией Маэстро-αМС (Интерлаб, Россия). Ароматические углеводороды выделяли из водного раствора методом капельной микроэкстракции. В качестве внешнего стандарта использовался 3-метилфенантрен.

**Анализ данных.** Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего от *n* клеток. Статистическую обработку данных производили с использованием программного обеспече-

ния GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для оценки нормальности распределения данных использовали тест Шапиро-Уилка. В зависимости от эксперимента, для оценки статистической значимости различий использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для связанных или несвязанных выборок с апостериорным тестом Даннетта. Для оценки значимости воздействия ВРФ нефти на  $I_{CaL}$  использовали однофакторный ANOVA (смешанная модель). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

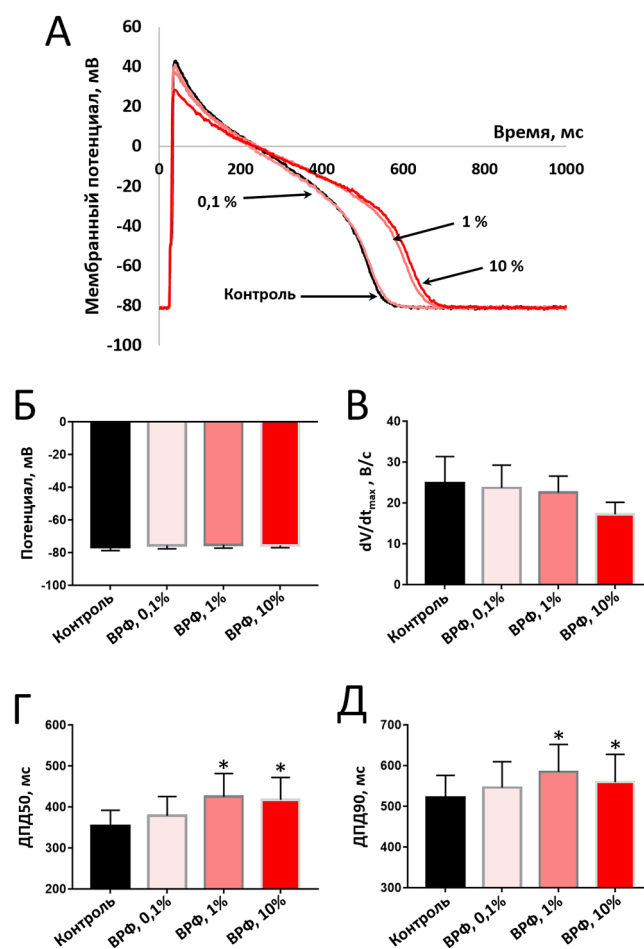
### Результаты и обсуждение

В первую очередь были исследованы изменения в конфигурации электрической активности (ПД) желудочкового миокарда наваги под действием ВРФ нефти (рис. 1А). ВРФ в концентрации 0,1% не вызвала статистически значимых изменений каких-либо из измеряемых параметров электрической активности (рис. 1Б–Д). Как 1%, так и 10% ВРФ нефти вызвали замедление реполяризации, выражавшееся в статистически значимом увеличении ДПД50 (рис. 1Г) и ДПД90 (рис. 1Д). Данный эффект полностью развивался за 4 мин воздействия ВРФ нефти. Ни одна из протестированных концентраций ВРФ нефти не влияла на уровень мембранного потенциала покоя (рис. 1Б). Максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД имела тенденцию к снижению под действием 10% ВРФ нефти, однако эти изменения не достигали уровня статистической значимости (рис. 1В). Таким образом, основным эффектом ВРФ нефти в отношении электрической активности желудочковых миоцитов являлось замедление реполяризации. На следующем этапе исследования мы изучили воздействие ВРФ нефти на основные ионные токи в кардиомиоцитах наваги, особое внимание уделив быстрому калиевому току задержанного выпрямления  $I_{Kr}$ , фоновому току входящего выпрямления  $I_{K1}$  и кальциевому току  $I_{Ca}$ , соотношение вклада которых определяет скорость реполяризации и длительность ПД в кардиомиоцитах рыб. Еще один реполяризующий ток — медленный калиевый ток задержанного выпрямления  $I_{Ks}$ , характерный для кардиомиоцитов млекопитающих, птиц [16] и некоторых других позвоночных [17], — отсутствует у наваги [18].

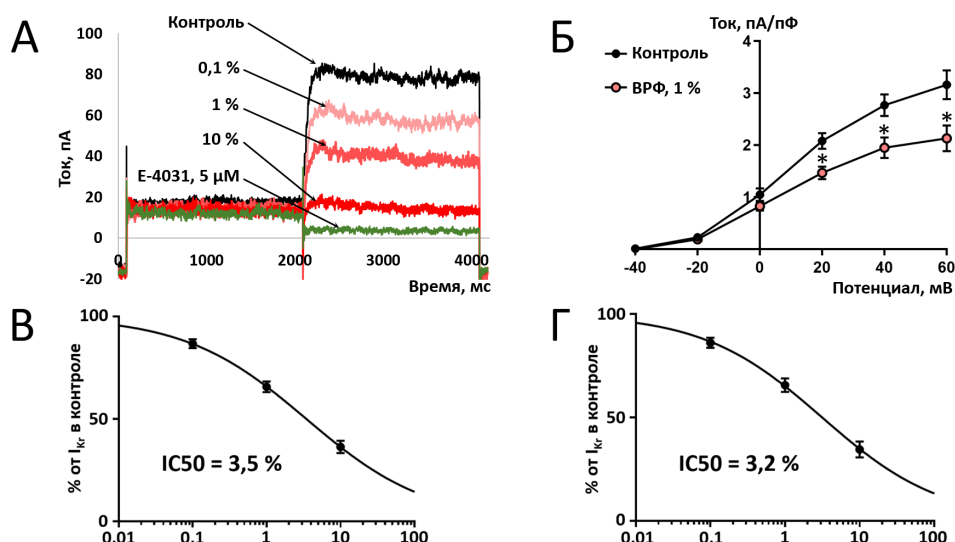
Поскольку  $I_{Kr}$  является основным реполяризующим током в кардиомиоцитах рыб [17], его чувствительность к ВРФ нефти оценивали не только в желудочковых, но и в предсердных миоцитах. ВРФ нефти во всех трех протестированных концентрациях вызвала статистически значимое снижение амплитуды  $I_{Kr}$  (рис. 2). Эффект наблюдался при всех позитивных значениях поддерживаемого потенциала (рис. 2Б). Чувствительность  $I_{Kr}$  к действию ВРФ нефти практически не различалась в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах (рис. 2В, Г). Расчетная концентрация полу-

максимального ингибирования  $IC_{50}$  составила 3,5% ВРФ нефти для предсердных и 3,2% для желудочковых миоцитов. Таким образом, ВРФ нефти оказывает мощное блокирующее воздействие на каналы ERG в рабочих кардиомиоцитах наваги. Другой реполяризующий ток,  $I_{K1}$ , напротив оказался совершенно нечувствителен к действию ВРФ нефти. Даже 10% ВРФ нефти не вызвала изменений в амплитуде как выходящей, так и входящей компоненты  $I_{K1}$ , что вполне согласуется с данными, полученными ранее на миоцитах наваги для отдельных ПАУ в составе нефти, фенантрена и флюорена [8, 9].

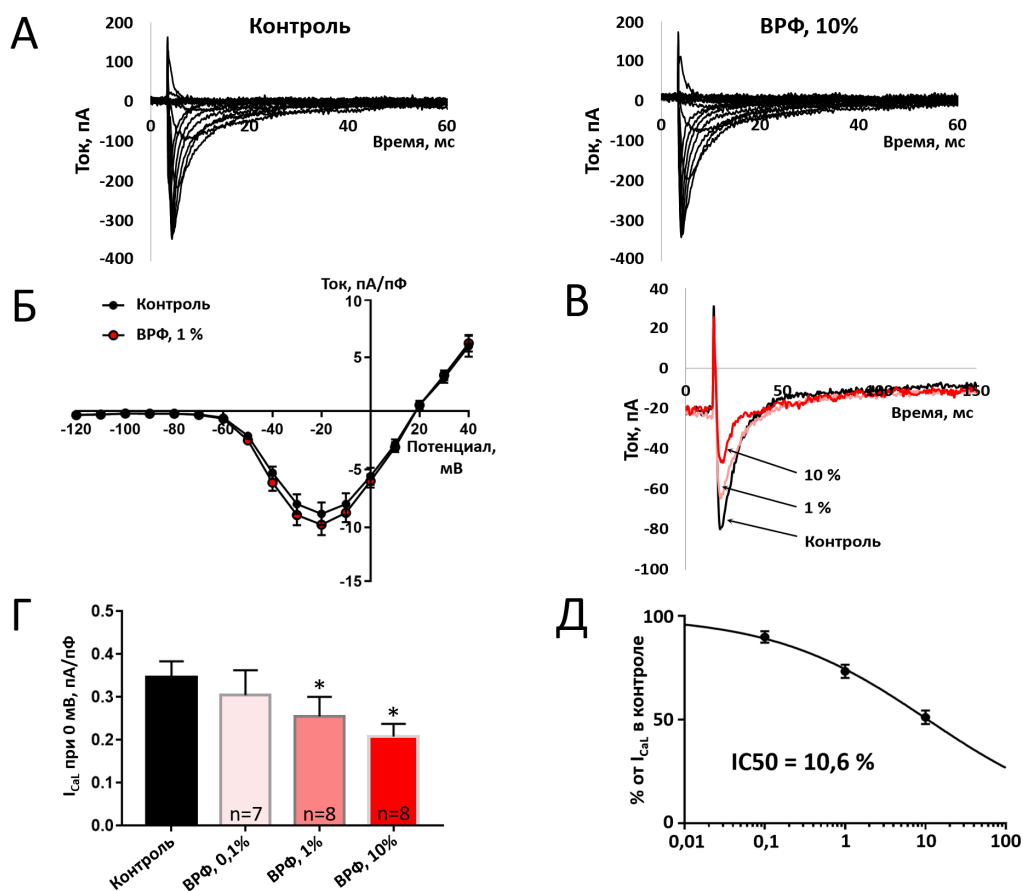
Деполаризующие токи, в целом, оказались менее чувствительны к воздействию ВРФ нефти по сравнению с  $I_{Kr}$ . Даже в концентрации 10% ВРФ нефти не вызвала достоверных изменений величины быстрого натриевого тока  $I_{Na}$  в желудочковых миоцитах наваги (рис. 3А, Б).



**Рис. 1.** Влияние ВРФ нефти на конфигурацию потенциала действия (ПД) в изолированных желудочковых миоцитах наваги. А — репрезентативные записи ПД в контрольных условиях, и под действием 0,1%, 1 и 10% ВРФ нефти. Б–Д — влияние ВРФ нефти на основные параметры конфигурации ПД ( $n = 8$ ): уровень мембранного потенциала покоя (Б), максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД (В), длительность ПД на уровне 50% (Г) и 90% (Д) реполяризации. \* — значимое отличие от контрольного значения, однофакторный RM-ANOVA с апостериорным тестом Даннетта,  $p < 0,05$ .



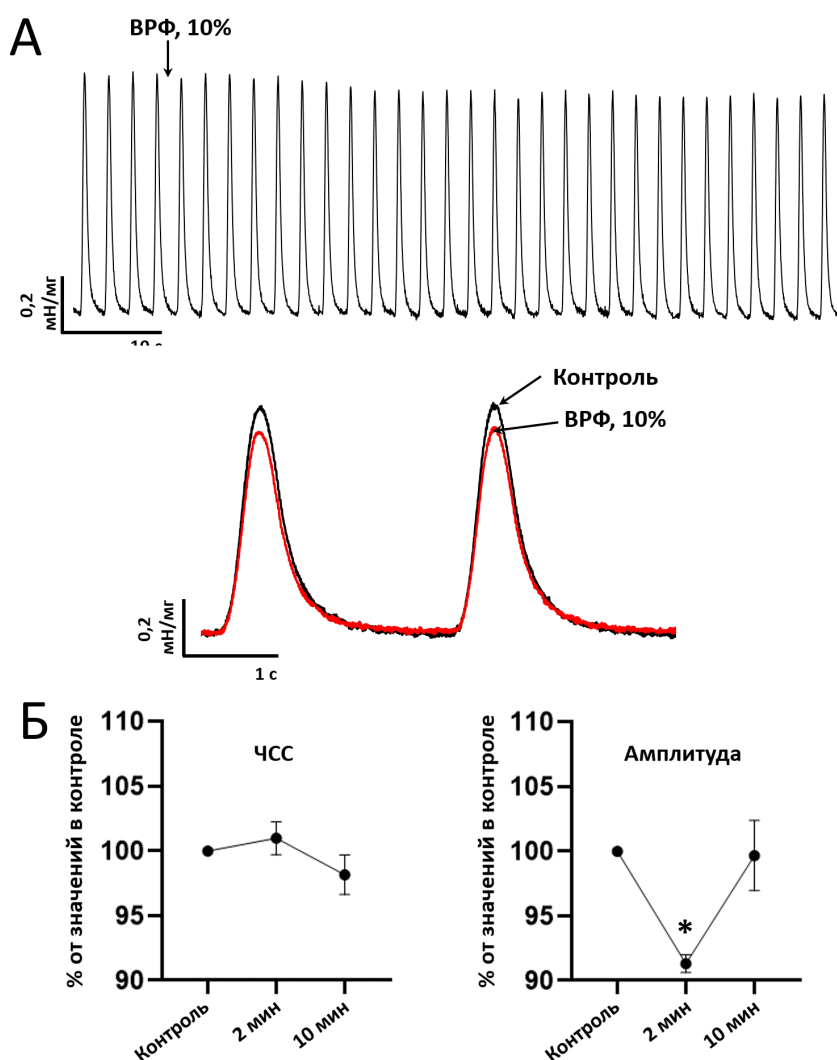
**Рис. 2.** Влияние ВРФ нефти на быстрый калиевый ток задержанного выпрямления  $I_{Kr}$ . А – репрезентативные записи  $I_{Kr}$  в предсердном миоците наваги в контрольных условиях и в присутствии 0,1%, 1% и 10% ВРФ. Ток индуцировали с помощью двухступенчатой деполяризации (до +40 и –20 мВ) от поддерживаемого потенциала –80 мВ. Также показана запись в присутствии блокатора тока  $I_{Kr}$  E-4031 (5 μM). Б – вольт-амперные характеристики  $I_{Kr}$  в контроле и на фоне действия 1% ВРФ в желудочковых миоцитах наваги (n = 9). \* – значимые различия, парный t-тест,  $p < 0,05$ . В, Г – кривые концентрация-эффект для подавления ВРФ нефти  $I_{Kr}$  в предсердных (В, n = 10) и желудочковых (Г, n = 9) миоцитах наваги. Эффект всех трех концентраций статистически значим; для сравнения абсолютных значений  $I_{Kr}$  использовали однофакторный ANOVA (смешанная модель) с апостериорным тестом Даннетта,  $p < 0,05$ .



**Рис. 3.** Влияние 10% ВРФ нефти на токи  $I_{Na}$  и  $I_{Ca}$  в желудочковых миоцитах наваги. А –  $I_{Na}$  в желудочковом миоците наваги в контрольных условиях (слева) и на фоне действия 10% ВРФ нефти (справа). Ток индуцировали деполяризацией от поддерживаемого потенциала –120 мВ с шагом 10 мВ. Б – вольт-амперные характеристики  $I_{Na}$  в контроле и на фоне действия 10% ВРФ (n = 8). Достоверных различий нет, парный t-тест,  $p > 0,05$ . В –  $I_{Ca}$  в желудочковом миоците наваги в контроле и на фоне действия 1% и 10% ВРФ нефти. Ток индуцировали деполяризацией от поддерживаемого потенциала –40 мВ до 0 мВ. Г – амплитуда  $I_{Ca}$  в контрольных условиях и в присутствии ВРФ нефти. \* – достоверное отличие от контрольных значений; для сравнения абсолютных значений  $I_{Ca}$  использовали однофакторный ANOVA (смешанная модель),  $p < 0,05$ . Д – кривая концентрация-эффект подавления тока  $I_{Ca}$ , индуцированного деполяризацией до 0 мВ, в желудочковых миоцитах наваги под действием ВРФ нефти (n указано в пункте Г).

В экспериментах с регистрацией  $I_{Ca}$  подачу ВРФ нефти начинали не ранее, чем через 4 мин после установления конфигурации whole-cell, в течение которых амплитуда тока постепенно снижается и выходит на постоянный стабильный уровень (run-down) из-за постепенного вымывания цАМФ из клетки в ходе эксперимента [19]. ВРФ нефти в концентрации 0,1% не вызвала статистически значимых изменений амплитуды  $I_{Ca}$ . В концентрациях 1% и 10% ВРФ значимо снижала амплитуду  $I_{Ca}$  при поддерживаемом потенциале 0 мВ (рис. 3В, Г). Расчетная концентрация  $IC_{50}$  для подавления тока  $I_{Ca}$  под действием ВРФ нефти составила 10,6%. Таким образом, полученные данные указывают на практически полную нечувствительность  $I_{Na}$  и умеренную чувствительность  $I_{Ca}$  к использованным в эксперименте концентрациям ВРФ нефти.

Поскольку снижение амплитуды  $I_{Ca}$  и, соответственно, входа кальция в кардиомиоциты наваги под действием ВРФ нефти потенциально может приводить к подавлению сократительной активности миокарда и насосной функции сердца, на заключительном этапе работы мы изучили действие ВРФ нефти в концентрации 10% на сократительную активность изолированных препаратов предсердного миокарда наваги. ВРФ нефти вызвала значимое снижение амплитуды сокращений (рис. 4) почти на 10% от силы сокращений препаратов в контрольных условиях. Эффект развивался быстро, в течение 20–30 с после аппликации ВРФ (рис. 4А), однако затем происходило постепенное ослабление наблюдаемого эффекта и к 10 мин после аппликации параметры сократительной активности препаратов возвращались к исходным значениям (рис. 4Б). Достоверных



**Рис. 4.** Влияние 10% ВРФ нефти на сократительную активность препаратов изолированного предсердия наваги, работающих в собственном ритме. А — оригинальная запись сократительной активности во время добавления ВРФ нефти в экспериментальную камеру, момент добавления ВРФ обозначен стрелкой. Внизу — сопоставление двух начальных и двух конечных сокращений из этого фрагмента записи при более быстрой развертке. Б — относительные частота сердечных сокращений и амплитуда сокращений препаратов во время максимального развития эффекта ВРФ нефти (2 мин после добавления в камеру) и через 10 мин после добавления ВРФ нефти ( $n = 6$ ). \* — значимые отличия соответствующих абсолютных значений параметров от контрольных абсолютных значений, однофакторный RM-ANOVA с апостериорным тестом Даннетта,  $p < 0,05$ .



изменений других параметров, в т.ч. частоты сокращений препаратов, обнаружено не было. 1% ВРФ нефти в нескольких тестовых экспериментах не вызвала статистически значимых изменений в сократительной активности препаратов. Таким образом, 10% ВРФ нефти оказывает в миокарде наваги негативный инотропный эффект, имеющий транзиторный характер. Относительно слабый и кратковременный эффект, по всей видимости, может быть объяснен наличием дополнительного диффузионного барьера в тканевом препарате миокарда по сравнению с изолированными кардиомиоцитами.

Итак, среди исследованных 4 основных ионных токов в желудочковых кардиомиоцитах наваги наибольшую чувствительность к действию ВРФ нефти показал быстрый ток задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  ( $IC_{50} = 3,2\%$ ). Существенно менее чувствителен оказался кальциевый ток  $I_{Ca}$  ( $IC_{50} = 10,6\%$ ), а  $I_{Na}$  и  $I_{K1}$  оказались нечувствительны к действию ВРФ нефти. Эти результаты хорошо согласуются с выявленным влиянием ВРФ нефти на конфигурацию ПД в желудочковых миоцитах. 0,1% ВРФ нефти вызывает небольшое снижение амплитуды  $I_{Kr}$ , по всей видимости, недостаточное для значимого удлинения ПД. 1% ВРФ нефти вызывает почти двукратное снижение амплитуды  $I_{Kr}$  (рис. 2), что ведет к выраженному замедлению реполяризации и увеличению длительности ПД (рис. 1). Однако длительность ПД определяется не только амплитудой  $I_{Kr}$ , она зависит от соотношения реполяризующих и деполяризующих токов. Подавляющий эффект ВРФ нефти на кальциевый ток  $I_{Ca}$  также может сказываться на результирующей длительности ПД. По всей видимости, выраженное снижение  $I_{Ca}$  под действием 10% ВРФ нефти ограничивает вызванное блокированием каналов ERG увеличение длительности ПД при высоких концентрациях ПАУ.

В целом, показанное подавление токов  $I_{Kr}$  и  $I_{Ca}$  под действием ВРФ нефти и замедление реполяризации в желудочковых миоцитах согласуется с данными, полученными ранее в экспериментах с фенантроном [8] и флюореном [9] — трициклическими ПАУ, встречающимися в нефти в наиболее высоких концентрациях. Основное отличие эффектов ВРФ нефти (0,1–10%) от эффектов фенантрена и флюорена (1–10 мкМ) заключается в отсутствии выраженного ингибиторного воздействия на  $I_{Na}$  и, соответственно, угнетения деполяризации кардиомиоцитов, что выражается в отсутствии изменений в скорости нарастания переднего фронта ПД. Как ВРФ нефти, так и отдельные трициклические ПАУ [8, 9] совершенно не влияют на амплитуду и форму вольт-амперной характеристики тока  $I_{K1}$ , что согласуется с отсутствием изменений потенциала покоя (рис. 1Б). Относительное увеличение длительности ПД под действием 1–10% ВРФ нефти сравнимо по вели-

чине с аналогичным эффектом 3 мкМ флюорена или фенантрена. Для  $I_{Kr}$   $IC_{50}$  составила 3,2% в экспериментах с ВРФ нефти и 0,54 мкМ при использовании чистого флюорена [9].

Чтобы прояснить возможную природу таких различий в эффектах отдельных ПАУ и ВРФ нефти, в рамках данного исследования мы также провели оценку концентраций трициклических ПАУ в 10%-ном растворе ВРФ нефти методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии. Было показано наличие 16 трициклических соединений (из них — 2 незамещенных) с совокупной концентрацией 3,2 мкг/л (в экспериментах [13] — от 2,8 мкг/л для всех ПАУ). Молярная концентрация незамещенных трициклических ПАУ составила лишь 4 нМ, однако их совокупная масса составила лишь 22,3% от общей массы трициклических ПАУ. Учитывая, что количество би- и тетрациклических ПАУ в 10%-ной ВРФ нефти не определяли, можно предположить, что общая концентрация всех растворенных ПАУ, способных воздействовать на ионные каналы, измеряется десятками нМ. Можно заключить, что концентрации ПАУ в 10%-ной ВРФ на несколько порядков ниже, чем необходимые для выраженного воздействия на  $I_{Na}$  и скорость деполяризации. В то же время действие ВРФ нефти как на  $I_{Kr}$ , так и на конфигурацию ПД оказалось явно сильнее, чем можно было бы предположить, опираясь на данные, полученные в экспериментах с фенантроном и флюореном. Таким образом, вся совокупность растворимых ПАУ, компонентов нефти, способна вызывать более существенные изменения электрической активности, чем отдельные исследованные в настоящее время соединения.

### Заключение

В данной работе впервые удалось показать, что ВРФ нефти, содержащая разнообразные ПАУ, в 10 и 100-кратном разведении оказывает ингибирующее воздействие на основной реполяризующий ток миокарда рыб  $I_{Kr}$ , вызывая замедление реполяризации и увеличение длительности ПД в желудочковых миоцитах наваги, а также на ток  $I_{CaL}$ , что в тканевых препаратах предсердного миокарда приводит к кратковременному подавлению сократительной активности. При этом, в отличие от трициклических ПАУ, ВРФ нефти не оказывает существенного воздействия на фазу быстрой деполяризации ПД и быстрый натриевый ток  $I_{Na}$ . Таким образом, эффекты ВРФ нефти, представляющей собой сложную смесь ПАУ различной структуры, не представляют собой простую сумму исследованных на данный момент эффектов, входящих в состав нефти ПАУ. Принимая во внимание относительно низкую концентрацию ПАУ в ВРФ нефти и, в то же время, ее выраженное влияние на ток  $I_{Kr}$ , можно

предположить, что в составе нефти присутствуют еще не исследованные соединения, обладающие значительно более выраженными кардиотоксическими свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00075). В работе было использовано оборудование, приобретенное МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках федерального проекта «Развитие инфра-

структуры для научных исследований и подготовки кадров» национального проекта «Наука и университеты» от 29.12.2022г №15-пр/42 (соглашение №355 от 15.03.2024). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены локальным этическим комитетом МГУ имени М.В. Ломоносова (заявка №164-ж, заседание комиссии по биоэтике №156-д-з, дата заседания – 16.11.2023 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krupenio N.N., Parmuzin P.I., Zamoiskii V.L. Mapping of segments polluted by petroleum products in the Usinsk region of the Komi republic from remote-measurement data. *Hydrotechnical Construction*. 1995;29(11):648–652.
2. Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В. Физиологические эффекты полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в организме рыб. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16: Биол.* 2023;78(3):127–138.
3. Marris C.R., Kompella S.N., Miller M.R., Incardona J.P., Brette F., Hancox J.C., Sorhus E., Shiels H.A. Polyaromatic hydrocarbons in pollution: a heart-breaking matter. *J. Physiol.* 2020;598(2):227–247.
4. Brette F., Machado B., Cros C., Incardona J.P., Scholz N.L., Block B.A. Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. *Biophys. J.* 2014;106(2):732a.
5. Vehniäinen E.R., Haverinen J., Vornanen M. Polycyclic aromatic hydrocarbons phenanthrene and retene modify the action potential via multiple ion currents in rainbow trout *oncorhynchus mykiss* cardiac myocytes. *Env. Toxicol. Chem.* 2019;38(10):2145–2153.
6. Ainerua M.O., Tinwell J., Kompella S.N., Sorhus E., White K.N., van Dongen B.E., Shiels H.A. 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*. 2020;239:124608.
7. Abramochkin D.V., Kompella S.N., Shiels H.A. Phenanthrene alters the electrical activity of atrial and ventricular myocytes of a polar fish, the Navaga cod. *Aquat. Toxicol.* 2021;235:105823.
8. Abramochkin D.V., Haverinen J., Mitenkov Y.A., Vornanen M. Temperature and external  $K^+$  dependence of electrical excitation in ventricular myocytes of cod-like fishes. *J. Exp. Biol.* 2019;222(5):193607.
9. Kompella S.N., Brette F., Hancox J.C., Shiels H.A. Phenanthrene impacts zebrafish cardiomyocyte excitability by inhibiting IKr and shortening action potential duration. *J. Gen. Physiol.* 2021;153(2):e202012733.
10. Abramochkin D.V., Filatova T.S., Kuzmin V.S., Voronkov Y.I., Kamkin A., Shiels H.A. Tricyclic hydrocarbon fluorene attenuates ventricular ionic currents and pressure development in the navaga cod. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2023;273:109736.
11. Abramochkin D.V., Vornanen M. Inhibition of the cardiac ATP-dependent potassium current by KB-R7943. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2014;175:38–45.
12. Filatova T.S., Abramochkin D.V., Shiels H.A. Thermal acclimation and seasonal acclimatization: a comparative study of cardiac response to prolonged temperature change in shorthorn sculpin. *J. Exp. Biol.* 2019;222(Pt. 16):jeb202242.
13. Abramochkin D.V., Borodinova A.A., Rosenshtaukh L.V. Effects of acetylcholinesterase inhibitor paraoxon denote the possibility of non-quantal acetylcholine release in myocardium of different vertebrates. *J. Comp. Physiol. B.* 2012;182(1):101–108.
14. Heuer R.M., Galli G.L.J., Shiels H.A., Fieber L.A., Cox G.K., Mager E.M., Stieglitz J.D., Benetti D.D., Grosell M., Crossley Ii. D.A. Impacts of Deepwater Horizon crude oil on Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) heart cell function. *Environ. Sci. Technol.* 2019;53(16):9895–9904.
15. Haverinen J., Abramochkin D.V., Kamkin A., Vornanen M. Maximum heart rate in brown trout (*Salmo trutta fario*) is not limited by firing rate of pacemaker cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2017;312(2):R165–R171.
16. Abramochkin D.V., Filatova T.S., Pustovit K.B., Voronina Y.A., Kuzmin V.S., Vornanen M. Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2022;268:111204.
17. Filatova T.S., Abramochkin D.V., Pavlova N.S., Pustovit K.B., Konovalova O.P., Kuzmin V.S., Dobrzynski H. Repolarizing potassium currents in working myocardium of Japanese quail: a novel translational model for cardiac electrophysiology. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2021;255:110919.
18. Abramochkin D.V., Vornanen M. Seasonal changes of cholinergic response in the atrium of Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*). *J. Comp. Physiol. B* 2017;187(2):329–338.
19. Belles B., Malécot C.O., Hescheler J., Trautwein W. “Run-down” of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium. *Pflugers. Arch.* 1988;411(4):353–360.

Поступила в редакцию 08.04.2024

После доработки 21.05.2024

Принята в печать 10.06.2024



## RESEARCH ARTICLE

# The mechanisms of effects of oil-derived polyaromatic hydrocarbons on cardiac electrical activity in navaga cod (*Eleginus nawaga*)

T.S. Filatova<sup>1,2,\*</sup> , A.S. Borodkov<sup>3</sup> , A.M. Karkhov<sup>1,2</sup> , I.H. Dzhumaniiazova<sup>1</sup> ,  
O.B. Pustovit<sup>1</sup> , D.V. Abramochkin<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Human and Animal Physiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Academician Smirnov Institute of Experimental Cardiology, Academician Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, st. Academician Chazova, 15a, Moscow, 121552, Russia;

<sup>3</sup>Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Kosygina st. 19–1, Moscow, 119991, Russia

\*e-mail: [filatova@mail.bio.msu.ru](mailto:filatova@mail.bio.msu.ru)

The intensive development of oil and gas industries in the Arctic threatens Arctic aquatic ecosystems. The toxic and primarily lethal cardiotoxic effects of oil in living organisms are believed to be associated with polyaromatic hydrocarbons (PAHs), and previous works revealed the electrophysiological mechanisms of action of individual oil-derived PAHs. However, the physiological effects of a complex PAHs mixture in oil water-soluble fraction (WSF) have not been previously studied. This study is focused on the effects of oil WSF on electrical activity and major ionic currents in the working myocardium of navaga (*Eleginus nawaga*), which is one of the most important commercial fish species in the Arctic. We found that 1% and 10% solutions of oil WSF cause a marked increase in the duration of action potentials (APs) in navaga cardiomyocytes. This effect appears to be due to the suppression of rapid delayed rectifying current  $I_{Kr}$  ( $IC_{50}$  about 3% in ventricular and atrial myocardium). At higher concentrations, oil WSF also suppressed calcium current  $I_{CaL}$  ( $IC_{50} = 10.6\%$ ), which led to a decrease in the contractile activity in isolated myocardial preparations. Unlike individual tricyclic PAHs, oil WSF did not affect fast sodium current  $I_{Na}$  and AP upstroke velocity. An assessment of the content of tricyclic PAHs in 10% solution of oil WSF showed that their total concentration is relatively low and does not exceed 100 nM. Thus, oil WSF also has a powerful cardiotoxic effect in fish myocardium, but its effects differ from the previously studied effects of tricyclic PAHs and suggest the presence of yet unexplored oil compounds that have a more powerful toxic potential against ERG channels.

**Keywords:** cardiomyocyte, action potential, patch-clamp, polyaromatic hydrocarbons, ionic currents, oil

**Funding:** The research was funded by Russian Science Foundation, project № 22-14-00075.

## Сведения об авторах

Филатова Татьяна Сергеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: [filatova@mail.bio.msu.ru](mailto:filatova@mail.bio.msu.ru); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0131-1911>

Бородков Алексей Сергеевич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории инструментальных методов и органических реагентов ГЕОХИ РАН. Тел.: 8-495-939-70-91; e-mail: [abors@mail.ru](mailto:abors@mail.ru); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7372-9324>

Кархов Андрей Михайлович — студент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: [akarchoff@gmail.com](mailto:akarchoff@gmail.com); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0919-0712>

Джуманиязова Ирина Хамрабековна — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: [dzhumaniiazova.irina.2019@post.bio.msu.ru](mailto:dzhumaniiazova.irina.2019@post.bio.msu.ru); ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5167-2112>

Пустовит Оксана Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: [k\\_pustovit@mail.ru](mailto:k_pustovit@mail.ru); ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5137-2187>

Абрамочкин Денис Валерьевич — докт. биол. наук, зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: [abram340@mail.ru](mailto:abram340@mail.ru); ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5751-8853>