

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Джуманиязова Ирина Хамрабековна

МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ТРИЦИКЛИЧЕСКИХ
ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
СЕРДЦА

Специальность: 1.5.5. Физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор, чл.-корр.РАН
Денис Валерьевич Абрамочкин

Москва, 2026

Содержание

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
1. ВВЕДЕНИЕ.....	7
1.1. Актуальность темы.....	7
1.2. Задачи исследования	8
1.3. Научная новизна исследования.....	9
1.4. Научно-практическая значимость	10
1.5. Методология.....	11
1.6. Степень достоверности данных.....	11
1.7. Публикации	11
1.8. Апробация результатов.....	11
1.9. Положения, выносимые на защиту	11
1.10. Личный вклад автора.....	12
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1. Полициклические ароматические углеводороды: структура, классификация, источники в окружающей среде.....	13
2.1.1. Структура и классификация.	13
2.1.2. Природные источники полициклических ароматических углеводородов	16
2.1.3. Антропогенные источники полициклических ароматических углеводородов.....	17
2.2. Распределение ПАУ в различных компонентах биосферы Земли	18
2.2.1. ПАУ в атмосфере.....	18
2.2.2. ПАУ в литосфере	21
2.2.3. ПАУ в гидросфере	23
2.2.4. Катастрофы, связанные с выбросом большого количества ПАУ в окружающую среду	24
2.2.5. Разложение полициклических ароматических углеводородов в окружающей среде	25
2.3. Особенности электрической активности рабочих желудочковых кардиомиоцитов некоторых позвоночных животных	26
2.3.1. Электрическая активность желудочковых кардиомиоцитов костистых рыб и ее зависимость от температуры окружающей среды	27
2.3.2. Электрическая активность желудочковых кардиомиоцитов человека	32
2.3.3. Электрическая активность желудочковых кардиомиоцитов мыши.....	34
NAv1.5 (SCN5A).....	37
2.4. Влияние полициклических ароматических углеводородов на физиологические процессы.....	38

2.4.1. Канцерогенность полициклических ароматических углеводородов	38
2.4.2. Влияние на эмбриогенез рыб.....	40
2.4.3. Влияние ПАУ на нормальную физиологию взрослых рыб.....	42
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
3.1. Модельные организмы и культуры клеток.....	47
3.2. Регистрация ионных токов в изолированных желудочковых кардиомиоцитах наваги (<i>Eleginus nawaga</i>).....	47
3.2.1. Получение изолированных желудочковых кардиомиоцитов рыб.....	47
3.2.2. Регистрация потенциалов действия и ионных токов желудочковых кардиомиоцитов рыб	48
3.3. Регистрация ионных токов в изолированных желудочковых кардиомиоцитах мыши (<i>Mus musculus</i>)	51
3.3.1. Получение изолированных желудочковых кардиомиоцитов мыши	51
3.3.2. Регистрация потенциалов действия и ионных токов желудочковых кардиомиоцитов мыши.....	52
3.4. Регистрация токов, переносимых α-субъединицами каналов Nav1.5 (I_{hSCN5A}) и Kv11.1 (I_{hERG}), в гетерологической экспрессионной системе СНО-K1	55
3.4.1. Ведение культуры клеток СНО-K1 и процедура трансфекции	55
3.4.2. Регистрация токов I_{hSCN5A} и I_{hERG}	56
3.5. Аппликация водорастворимой фракции нефти и полициклических ароматических углеводородов	58
3.5.1. Получение водорастворимой фракции нефти и стоковых растворов полициклических ароматических углеводородов	58
3.5.2. Исследование влияния острой аппликации водорастворимой фракции нефти или полициклических ароматических углеводородов	59
3.6. Используемые в работе вещества и растворы	59
3.7. Анализ ионных токов и потенциалов действия, зарегистрированных методом пэтч-кламп	62
3.8. Статистическая обработка данных	64
4. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	66
4.1. Влияние водорастворимой фракции нефти на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов наваги	66
4.2. Влияние фенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов наваги	70

4.3. Влияние 3-метилфенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов наваги.....	74
4.4. Влияние сезонной акклиматизации наваги на чувствительность желудочковых кардиомиоцитов к 3-метилфенантрону	79
4.4.1. Влияние акклиматизации на параметры электрической активности желудочковых кардиомиоцитов наваги	79
4.4.2. Чувствительность к 3-метилфенантрону желудочковых кардиомиоцитов наваги, акклиматизированной к летним и к зимним условиям.....	83
4.5. Влияние фенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов мыши	92
4.6. Влияние 3-метилфенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов мыши.....	96
4.7. Влияние 3-метилфенантрена на ионные токи, переносимые субъединицами hERG и hSCN5A гетерологической экспрессионной системы CHO-K1.....	105
5. ОБСУЖДЕНИЕ	109
5.1. Водорастворимая фракция нефти подавляет электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (Eleginus nawaga)	109
5.2. Влияние фенантрена и 3-метилфенантрена на ионные токи и конфигурацию потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов северной наваги	110
5.3. Акклиматизация к зимним условиям увеличивает чувствительность желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (Eleginus nawaga) к 3-метилфенантрону.....	114
5.3.1. Изменения электрической активности желудочковых кардиомиоцитов северной наваги при зимней акклиматизации.....	114
5.3.2. Чувствительность желудочковых кардиомиоцитов северной наваги к 3-метилфенантрону меняется при акклиматизации	116
5.4. Влияние фенантрена и 3-метилфенантрена на ионные токи и конфигурацию потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов мыши	117
5.5. В отличие от I_{hSCN5A}, I_{hERG} чувствителен к 3-метилфенантрону	121
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
7. ВЫВОДЫ.....	125
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3-МФ – 3-метилфенантрин

AHR – арилуглеводородный рецептор

$dV/dt_{\max}$ – максимальная скорость деполяризации

DMEM-F12 – среда Игла в модификации Дульбекко с добавлением питательных веществ (F-12) в соотношении 1:1

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

I_{BK} – кальций-зависимый калиевый ток большой проводимости

IC50 – константа полуингибирования

I_{Ca} – кальциевый ток

$I_{Ca, L}$ – кальциевый ток L-типа

$I_{Ca, T}$ – транзитный кальциевый ток, кальциевый ток T-типа

I_{K1} – фоновый ток входящего выпрямления

I_{Kr} – быстрый калиевый ток задержанного выпрямления

I_{Kur} – ультрабыстрый калиевый ток задержанного выпрямления

I_{Na} – быстрый натриевый ток

I_{hERG} – ток, переносимый порообразующей субъединицей hERG

I_{hSCN5A} – ток, переносимый продуктом гена *hSCN5A* ($Na_v1.5$)

I_{SK} – кальций-зависимый калиевый ток малой проводимости

I_o – транзитный калиевый ток

V50 – мембранный потенциал, при котором 50% каналов находятся в состоянии инактивации или активации

SERCA – Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматического ретикулума

АФК – активные формы кислорода

ВРФ – водорастворимая фракция нефти

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДПД50 – длительность потенциала действия на уровне 50% реполяризации

ДПД80 – длительность потенциала действия на уровне 80% реполяризации

ДПД90 – длительность потенциала действия на уровне 90% реполяризации

К – контроль

пА – пикоампер

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

ПД – потенциал действия

РВ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

мВ – милливольт

Ф – фенантрен

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность темы

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) представляют собой широко распространённый класс органических соединений, присутствующих в природных и антропогенных выбросах, а также являющихся компонентами сырой нефти. В водной среде, включая морские акватории, ПАУ обнаруживаются как вследствие хронического техногенного загрязнения, так и при аварийных разливах нефти; при этом в водной фазе преимущественно присутствуют «лёгкие» ПАУ, включая трициклические структуры и их производные. В физиологическом контексте ПАУ известны множественностью эффектов на различные органы и системы, включая сердечно-сосудистую систему у рыб на ранних этапах онтогенеза и у взрослых особей. Однако для понимания физиологических последствий такого воздействия принципиально важна идентификация непосредственных электрофизиологических мишеней, через которые компоненты нефти и отдельные ПАУ изменяют свойства возбудимых тканей, в частности миокарда.

Электрическая активность рабочих кардиомиоцитов определяет параметры потенциала действия (ПД) и, через механизмы электро-механического сопряжения, функциональное состояние сердца как насоса. В литературе обсуждаются кардиотоксические эффекты нефти и отдельных трициклических ПАУ, включая фенантрен, реализуемые в значительной степени через подавление I_{Kr} , а также через влияние на деполяризующие токи. Главным образом данные о кардиотоксических эффектах ПАУ были получены в экспериментах на тропических видах рыб, а также на радужной форели. Вплоть до начала выполнения настоящего исследования отсутствовали сведения о действии ПАУ на сердечно-сосудистую систему рыб Арктики, хотя для нашей страны именно решение данного вопроса представляется весьма актуальным. В связи с бурным развитием перевозок по Северному морскому пути, а также большими перспективами нефте- и газодобычи в Арктической зоне, увеличение уровня нефтяного загрязнения Арктики представляется неизбежным даже в отсутствие катастрофических утечек нефти и нефтепродуктов. Потепление климата, наиболее сильно выраженное именно в Арктике, представляет дополнительную угрозу для таких достаточно stenothermic видов рыб, как полярная тресочка (*Boreogadus saida*) и северная навага (*Eleginus nawaga*), являющихся незаменимыми звеньями пищевых цепей Арктики. Отдельно следует отметить опасения по поводу того, что загрязнители, накопившиеся за прошедшие годы освоения Арктики в вечной мерзлоте, могут попасть в океан в скором будущем вследствие потепления климата [155]. В связи с этим необходимо понять механизмы воздействия токсических компонентов нефти и нефтепродуктов как самих по себе, так и вкуче с другими антропогенными стрессорными факторами, на виды рыб, имеющих важное значение для экологии и рыбного промысла в морях

Русской Арктики. Данная задача была в значительной степени решена в первой части настоящего исследования на примере северной наваги, сравнительно легко доступной для лабораторных экспериментов.

Однако угроза, исходящая от ПАУ, не исчерпывается их негативным действием на состояние пищевых ресурсов и экологию Мирового океана. Опасность представляет и непосредственное их воздействие на организм человека как вследствие употребления в пищу водных организмов с накопленными ПАУ, так и в результате вдыхания пылевых частиц, содержащих ПАУ пирогенного происхождения. Для млекопитающих данные о влиянии ПАУ на электрическую активность кардиомиоцитов ограничивались исследованием действия фенантрена на желудочковые миоциты овец, в то время как для основных видов лабораторных животных, в т.ч. грызунов, подобные сведения до проведения нашей работы отсутствовали. Также остается неизученным влияние трициклических ПАУ на электрическую активность кардиомиоцитов человека. Поэтому во второй части нашей работы были раскрыты механизмы действия фенантрена и его наиболее распространенного производного 3-метилфенантрена на электрическую активность желудочковых миоцитов мыши. В связи с невозможностью работы в нашей лаборатории на человеческом материале, мы оценили действие 3-метилфенантрена на наиболее чувствительные к ПАУ ионные каналы сердца человека с использованием системы гетерологической экспрессии ионных каналов – линии клеток СНО-K1.

Также важно отметить, что степень выраженности и направленность изменений конфигурации ПД и параметров отдельных ионных токов под влиянием ПАУ в конкретном организме могут зависеть от нескольких обстоятельств: **(i) сложного состава нефтяных смесей**, при котором эффекты водорастворимой фракции нефти могут не сводиться к сумме эффектов отдельных компонентов; **(ii) видовой специфики паттерна экспрессии ионных каналов** и кинетики токов у разных позвоночных; **(iii) физиологического состояния организма**, включая сезонную температурную акклиматизацию у эктотермных животных, сопровождающуюся ремоделированием электрофизиологического фенотипа кардиомиоцитов.

В настоящей работе нами была поставлена следующая цель: изучить механизмы токсического воздействия трициклических ПАУ на примере фенантрена и 3-метилфенантрена, а также смеси ПАУ, содержащихся в сырой нефти, на электрическую активность сердца рыб и млекопитающих.

1.2. Задачи исследования

1. Изучить влияние водорастворимой фракции нефти марки Urals на конфигурацию электрической активности, а также параметры быстрого натриевого тока I_{Na} , кальциевого тока L-типа I_{CaL} , быстрого калиевого тока задержанного выпрямления I_{Kr} и калиевого тока входящего выпрямления I_{K1} в изолированных желудочковых миоцитах наваги.

2. Изучить влияние фенантрена и 3-метилфенантрена на конфигурацию электрической активности, а также параметры I_{Na} , I_{CaL} , I_{Kr} и I_{K1} в изолированных желудочковых миоцитах наваги.
3. Выявить изменения конфигурации электрической активности, а также параметров I_{Na} , I_{CaL} , I_{Kr} и I_{K1} в желудочковых миоцитах при развитии зимней акклиматизации наваги.
4. Сравнить чувствительность основных параметров электрической активности, а также токов I_{Na} , I_{CaL} , I_{Kr} и I_{K1} к 3-метилфенантрону, в желудочковых миоцитах наваги, акклиматизированной к летним и зимним условиям среды обитания.
5. Изучить влияние фенантрена и 3-метилфенантрена на конфигурацию электрической активности, а также параметры быстрого натриевого тока I_{Na} , кальциевого тока L-типа I_{CaL} , ультрабыстрого калиевого тока задержанного выпрямления I_{Kur} , транзиторного калиевого тока I_{to} и калиевого тока входящего выпрямления I_{K1} в изолированных желудочковых миоцитах мыши.
6. Изучить действие 3-метилфенантрена на наиболее чувствительные к ПАУ токи I_{Kr} и I_{Na} , переносимые человеческими изоформами порообразующих субъединиц каналов $K_{v11.1}$ и $Na_{v1.5}$, соответственно, в гетерологической экспрессионной системе – клетках линии CHO-K1.

1.3. Научная новизна исследования

Научная новизна работы определяется тем, что она объединяет сравнительный электрофизиологический анализ действия водорастворимой нефтяной фракции (ВРФ) и отдельных трициклических ПАУ на уровне нативных кардиомиоцитов двух групп позвоночных и на уровне отдельных порообразующих субъединиц ионных каналов сердца человека, позволяя разграничить эффекты смеси и индивидуальных соединений, а также выявить роль физиологического состояния (сезонной акклиматизации) в изменении чувствительности.

В рамках выполненного исследования, во-первых, раскрыт механизм негативного воздействия трициклических ПАУ фенантрена и 3-метилфенантрена, а также ВРФ нефти, на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*). Показано, что среди исследованных токов наиболее чувствительным как к отдельным ПАУ, так и к ВРФ нефти является I_{Kr} , что способствует замедлению реполяризации миоцитов при воздействии этих соединений.

Во-вторых, впервые получены данные о зависимости токсического действия ПАУ от сезонной акклиматизации на примере 3-метилфенантрена. Показано, что зимняя акклиматизация наваги сопровождается повышением чувствительности I_{Kr} к 3-метилфенантрону, а также отмечены сезонные различия в чувствительности I_{Na} . Данный результат принципиально расширяет физиологический контекст оценки токсического воздействия ПАУ, поскольку

связывает электрофизиологические эффекты загрязнителя с естественным ремоделированием миокарда у эктотермных животных.

В-третьих, выяснен механизм воздействия ПАУ на конфигурацию электрической активности сердца наиболее часто используемых лабораторных животных – мышей. Показано, что в желудочковых кардиомиоцитах мыши фенантрен и 3-метилфенантрен в микромолярных концентрациях подавляют ключевые реполярирующие токи (I_{to} и I_{Kur}) и изменяют параметры ПД (увеличивают длительность ПД, замедляют скорость деполяризации), при этом 3-метилфенантрен проявляет большую эффективность ингибирования исследованных токов.

Наконец, важным новым результатом является описание влияния 3-метилфенантрена на токи, переносимые человеческими изоформами порообразующих субъединиц каналов $K_v11.1$ и $Na_v1.5$. В гетерологической системе CHO-K1 показано, что I_{hERG} (ток, переносимый субъединицей канала $K_v11.1$) чувствителен к 3-метилфенантрону и под влиянием этого соединения изменяются параметры активации/инактивации и деактивации, тогда как I_{hSCN5A} (ток, переносимый субъединицей $Na_v1.5$) в этих условиях не чувствителен к 3-метилфенантрону, несмотря на подавление I_{Na} в нативных кардиомиоцитах других млекопитающих (мыши). Следовательно, свойства канала (в том числе его чувствительность к экотоксикантам) модифицируются вспомогательными белками и клеточным окружением.

1.4. Научно-практическая значимость

Полиароматические углеводороды являются одними из главнейших загрязнителей воздушной и, в особенности, водной среды, наиболее растворимыми в воде и токсичными компонентами нефти и нефтепродуктов. В ряде работ, большинство которых появились после катастрофы нефтедобывающей платформы Deepwater Horizon в Мексиканском заливе, было показано их токсическое действие на организм рыб, в первую очередь на сердце. Настоящее исследование позволило выяснить механизм такого токсического воздействия на сердце нескольких видов рыб, обитающих в российской части Арктики. Результаты работы могут непосредственно быть использованы в осуществлении деятельности компаний, специализирующихся в области экологического мониторинга, в первую очередь северных морей России, для оценки потенциального воздействия обнаруженного загрязнения полиароматическими углеводородами на состояние популяций различных видов рыб, в том числе промысловых, а также для оценки потенциальных рисков тех или иных промышленных проектов в арктической зоне.

В исследовании впервые проведён комплексный сравнительный электрофизиологический анализ действия водорастворимой фракции нефти и индивидуальных трициклических ПАУ на ионные токи кардиомиоцитов представителей двух групп позвоночных и на токи отдельных порообразующих субъединиц ионных каналов сердца человека, что позволило разграничить

эффекты нефтяной смеси и индивидуальных соединений, идентифицировать наиболее чувствительные электрофизиологические мишени кардиотоксического действия ПАУ, установить зависимость выраженности токсических эффектов от сезонной акклиматизации и видовой принадлежности, а также продемонстрировать роль вспомогательных субъединиц и клеточного окружения в формировании чувствительности ионных каналов к экотоксикантам. Полученные результаты существенно расширяют фундаментальные представления о механизмах взаимодействия полиароматических углеводородов с ионными каналами возбудимых тканей и вносят значимый вклад в сравнительную физиологию сердца позвоночных.

1.5. Методология

В данном исследовании электрическую активность одиночных клеток регистрировали с помощью метода пэтч-кламп конфигурации whole-cell в режиме фиксации тока. Ионные токи регистрировали тем же методом в режиме фиксации потенциала. Для разных видов токов энзиматически выделенных кардиомиоцитов использовали разнообразный репертуар протоколов изменения мембранного потенциала и набор селективных блокаторов, описанные в разделах 3.2-3.4. Для исследования токов, переносимых человеческими изоформами порообразующих субъединиц ионных каналов, использовали культуру клеток линии СНО-K1, трансфицированную плазмидами с соответствующими генами канальных белков.

1.6. Степень достоверности данных

Полученные в ходе работы данные достоверны, воспроизводимы и получены с использованием целесообразных современных экспериментальных методик. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальных научных источников.

1.7. Публикации

По материалам диссертационного исследования опубликованы 6 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus.

1.8. Апробация результатов

Результаты настоящей диссертационной работы в виде устных докладов были представлены на всероссийских и международных конференциях: «Ионные каналы сердечно-сосудистой системы в норме и патологии» (РНИМУ им. Н.И.Пирогова, Москва, 19-20 сентября, 2024), «VIII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ» (Сочи, 23-28 апреля, 2025), «II Самойловские чтения. Современные проблемы физиологии» к 150-летию кафедры физиологии человека и животных» (Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 30 января – 1 февраля, 2026).

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова 19 февраля 2026 года.

1.9. Положения, выносимые на защиту

1. В остром эксперименте на желудочковых миоцитах наваги фенантрин, 3-метилфенантрин и

ВРФ нефти оказывают ингибирующее действие на ток I_{Kr} уже в наномолярных концентрациях, в то время как I_{Na} и I_{CaL} чувствительны к фенантрону и его производному в микромолярных концентрациях, а I_{K1} нечувствителен к ПАУ. Следствием такого воздействия на ионные токи является изменение конфигурации ПД - замедление реполяризации и деполяризации, снижение амплитуды ПД без каких-либо изменений потенциала покоя.

2. Зимняя акклиматизация вызывает адаптивные изменения ионных токов, а именно увеличение I_{Kr} , I_{K1} и облегчение активации I_{Na} , направленные на обеспечение нормальной электрической активности при сниженных температурах. При этом чувствительность I_{Kr} , I_{Na} и электрической активности в целом к воздействию 3-метилфенантрена возрастает.
3. В изолированных желудочковых миоцитах мыши фенантрен и 3-метилфенантрен ингибируют калиевые токи (транзиторный I_{to} и ультрабыстрый I_{Kur}), а также I_{Na} в концентрациях от 10 мкМ, что приводит к замедлению реполяризации и деполяризации ПД без изменений потенциала покоя. Токи, переносимые человеческими изоформами порообразующих субъединиц каналов $K_{v11.1}$ и $Na_{v1.5}$, слабо чувствительны к воздействию 3-метилфенантрена. Таким образом, электрическая активность в кардиомиоцитах млекопитающих многократно устойчивее к воздействию трициклических ПАУ, чем у рыб.

1.10. Личный вклад автора

Личный вклад соискателя, Джуманиязовой Ирины Хамрабековны, присутствует на всех этапах работы. Она планировала и проводила электрофизиологические эксперименты, ухаживала за животными и вела клеточную культуру, трансфицировала клетки целевыми плазмидами, обрабатывала полученные результаты и проводила статистический анализ, выступала на конференциях, готовила тексты статей к публикации и участвовала в публикационном процессе, в т.ч. в ответах рецензентам и редакции текста статей в соответствии с замечаниями.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Полициклические ароматические углеводороды: структура, классификация, источники в окружающей среде.

2.1.1. Структура и классификация.

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) представляют из себя большую группу органических соединений, структура которых содержит два или более ароматических колец [190]. Эти соединения характеризуются своей гидрофобностью и стабильностью, высокими температурами кипения и плавления, а также (в большинстве своем) плоской структурой молекул. К соединениям, не обладающим плоской структурой, относятся, например, хелицены, коранулен и циркулен (см. рис. 1), а также некоторые ПАУ, обладающие метильной группой в своей структуре, например, 1-Метил-бензо[с]фенантрен. Основные химические характеристики некоторых ПАУ представлены в табл. 1.

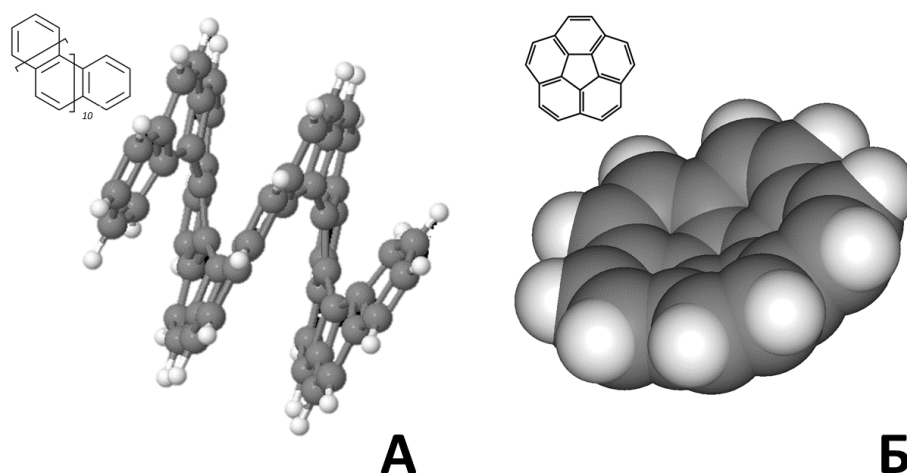
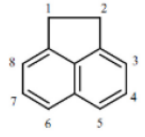
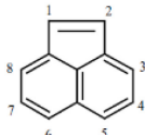
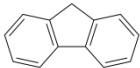
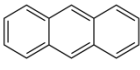
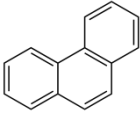
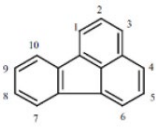
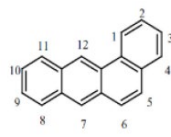
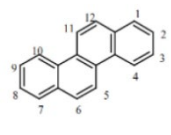
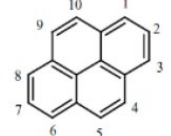
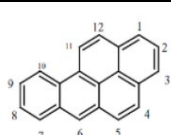
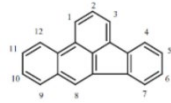
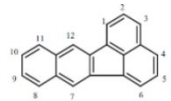
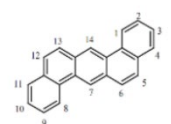
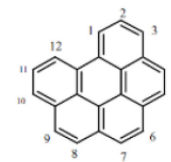
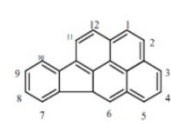


Рисунок 1. Трехмерная структура 12-хелицена, вид сбоку (А) и коранулена (Б).

Таблица 1. Химические характеристики ПАУ, за которыми установлен контроль согласно USEPA (The United States Environmental Protection Agency, см. ниже) [202].

Название (названия)	Структура	Химическая формула	Молярная масса, г/моль	Температура плавления, °C	Температура кипения, °C	Растворимость в воде (при 25°C), мг/л
Нафталин (антимит, гексален)		C ₁₀ H ₈	128,17	80,26	217,97	31,6

Название (названия)	Структура	Химическая формула	Молярная масса, г/моль	Температура плавления, °C	Температура кипения, °C	Растворимость в воде (при 25°C), мг/л
Аценафтен		$C_{12}H_{10}$	154,21	95	96	3,8
Аценафтилен		$C_{12}H_8$	152,20	92-93	265-267	16,1
Флуорен		$C_{13}H_{10}$	166,2	116	293	1,992
Антрацен		$C_{14}H_{10}$	178,23	218	340	0,044
Фенантрен		$C_{14}H_{10}$	178,23	101	340	1,6
Флуорантен		$C_{16}H_{10}$	202,26	110,8	375	0,26
Бенз[а]антра- цен		$C_{20}H_{12}$	228,29	158	438	0,011
Хризен		$C_{18}H_{12}$	228,29	254	448	0,0015
Пирен		$C_{16}H_{10}$	202,26	156	393-404	0,132
Бенз[а]пирен		$C_{20}H_{12}$	252,32	179-179,3	495	0,0038

Название (названия)	Структура	Химическая формула	Молярная масса, г/моль	Температура плавления, °C	Температура кипения, °C	Растворимость в воде (при 25°C), мг/л
Бенз[b]флуорантен		$C_{20}H_{12}$	252,32	168,3	Неизвестно	0,0015
Бенз[k]флуорантен		$C_{20}H_{12}$	252,32	215,7	480	0,0008
Дибенз[a,h]-антрацен		$C_{22}H_{14}$	278,35	262	Неизвестно	0,0005
Бенз[g,h,i]-пирилен		$C_{22}H_{12}$	276,34	273	550	0,00026
Индено-[1,2,3-cd]-пирен		$C_{22}H_{12}$	276,34	163,6	530	0,062

Существует несколько классификаций ПАУ, учитывающих их структуру, источник или оказываемое ими влияние на живые системы:

1. **По количеству ароматических колец, входящих в их состав.** ПАУ, содержащие до четырех ароматических колец, называются “легкими”. Если же ароматических колец более четырех - “тяжелыми” [161].
2. **По геометрии молекулы.** Соединения делятся на “линейные” (например, антрацен), “угловые” (например, бенз[а]антрацен, фенантрен) и “кластерные” (например, пирен) [6].
3. **По способности провоцировать образование злокачественных опухолей у человека.** ПАУ разделяются на “мутагенные”, “промутагенные” и “не мутагенные” соединения в зависимости от активируемого сигнального каскада в клетках эпителия легких [115].
4. **По преимущественным условиям своего природного происхождения.** ПАУ разделяются на “пирогенные”, “петролевые” и “диагенные”. Пирогенные ПАУ формируются в основном в результате сгорания органического материала в условиях недостатка кислорода и содержат от 2 до 7 ароматических колец, некоторые имеют метиловые или этиловые группы (см. ниже) [150, 201]. Петролевые ПАУ образуются при

умеренных температурах, отсутствии кислорода и высоком давлении (см. ниже). Диагенные ПАУ образуются в результате жизнедеятельности живых организмов. Данная классификация может считаться одной из самых неточных, поскольку в результате описанных процессов может формироваться широкий спектр ПАУ, и состав смеси ПАУ из различных источников может быть достаточно схожим.

USEPA (The U.S. Environmental Protection Agency) предлагает уделить особое внимание тем 16 ПАУ, которые наиболее часто встречаются в воде, воздухе или почве. Некоторые из них обладают ярко выраженным канцерогенным эффектом (см. ниже). К таким ПАУ относятся аценафтен, аценафтилен, антрацен, бенз[а]антрацен, бенз[б]флуорантен, бенз[к]флуорантен, бенз[g,h,i]перилен, бенз[а]пирен, хризен, дибенз[а,h]антрацен, флуорантен, флуорен, индено[1,2,3-с,d]пирен, нафталин, фенантрен, пирен.

2.1.2. Природные источники полициклических ароматических углеводородов

Существует несколько основных способов естественного образования ПАУ [37]. Одним из важнейших источников ПАУ в окружающей среде является **ископаемое топливо (нефть и уголь)**. Нефть и каменный уголь образуются из органических остатков при умеренных температурах до 300°C и высоком давлении [201]. Из этих природных источников могут происходить утечки ПАУ по естественным и антропогенным причинам. Среди ПАУ в нефти преобладают “легкие” нафталин, флуорен, фенантрен, пирен и их метильные производные. Относительное содержание отдельных ПАУ в сырой нефти разнообразное и колеблется в больших пределах в зависимости от места ее происхождения [201, 215], см. табл. 2.

Таблица 2. Содержание некоторых ПАУ в сырой нефти различных мест происхождения.

ПАУ	Место добычи			
	Калифорния (API 40.8), мг/кг сырья	Луизиана, мг/кг	Северное море, мг/кг сырья	Баренцево море, мг/кг сырья
Нафталин	1200	>800	1169	1030
Аценафтен	27	~100	18	12
Флуорен	170	~300	265	75
Антрацен	-	<50	1,5	-
Фенантрен	*	~600	238	175

Флуорантен	-	<50	10	6
Бензо[а]антрацен	-	<50	11	-
Пирен	15	<50	20	-
Хризен	29	~200	26	-
Ссылка на источник	[139]	[18]	[201]	

Примечания: - - не обнаружено, * - нет информации в источнике. ¹ - при переводе из исходных данных, указанных в нг/мл, приняли плотность сырья за 1000 кг/м³

Неполное сгорание органического материала в условиях недостатка кислорода и при температуре 650-900°C также является природным источником ПАУ [6, 29, 118, 121]. Выброс ПАУ в атмосферу и почву из-за лесных пожаров и вулканических извержений довольно значительный, в некоторых регионах даже превышающий выброс из-за человеческой деятельности [15]. Общая схема синтеза ароматического кольца из этана при нагревании в отсутствии кислорода показана на рис. 2.

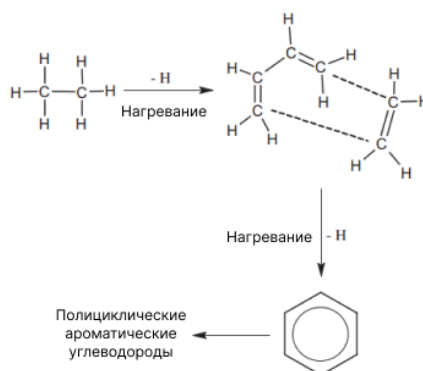


Рисунок 2. Принципиальная схема синтеза полициклических ароматических углеводородов из этана в условиях отсутствия кислорода и нагревания.

ПАУ также могут формироваться в результате жизнедеятельности организмов. Так, показано, что бактерии и/или грибы, проживающие совместно с термитами *Nasutitermes cf. minor*, способны продуцировать нафталин [187]. Известно также, что в формировании аромата *Rollinia insignis* (Роллиния слизистая) принимает участие нафталин, синтезируемый этим растением [133].

2.1.3. Антропогенные источники полициклических ароматических углеводородов

Наибольшей общественной огласке предаются катастрофы, связанные с транспортировкой и переработкой нефти (см. ниже, раздел 2.2.4). Сотни тысяч тонн сырой нефти, оказавшиеся в водных экосистемах, наносят им колоссальный урон. Пленка, образующаяся из нерастворимых компонентов на поверхности воды, препятствует нормальному растворению кислорода и удалению углекислого газа. Загрязнение береговых зон уничтожает места гнездования птиц и нереста рыб на годы. ПАУ, растворяющиеся в воде, нарушают эмбриогенез рыб, обитающих в пострадавших регионах (см. ниже, раздел 2.3.2.).

Тем не менее, основным антропогенным источником ПАУ в окружающей среде на данный момент является ежедневная деятельность человека, связанная с промышленностью (производство кокса и угля, нефтепереработка, спекание алюминия, производство красящих пигментов, резины, пластика, пестицидов и растворителей, пр.), отоплением жилых помещений (печи, камины, плиты, газовые горелки), производством электроэнергии и тепла, выбросами от работы транспорта (автомобили, самолеты, морской транспорт), сжиганием бытовых и промышленных отходов [29, 174, 202].

Из-за активного развития промышленности и объемов добычи нефти, газа и угля в атмосферу, почву и в водную среду выбрасывается значительное количество ПАУ. Общий выброс в атмосферу 16 ПАУ, за которыми установлен особый контроль в связи с их влиянием на здоровье человека (см. ниже) составил 520 мегатонн в 2004 году. При этом промышленная деятельность стран Азии привела к выбросу 290 мегатонн, что составляет 55% от общей массы ПАУ [210].

Рутинные аварии, сопровождающие транспортировку нефти и нефтепродуктов, также наносят значительный и зачастую недооценённый экологический ущерб. Утечки нефти из нефтепроводов составляют около 1–7% от её годовой добычи. Ежегодно до 1 млн тонн нефтепродуктов поступает в водные системы крупнейших рек Сибири – Оби, Енисея и Лены – и далее транспортируется в моря Арктического бассейна [5]. Согласно данным Европейского агентства по окружающей среде, рутинные утечки приводят к поступлению в Мировой океан порядка 1-3 мегатонн нефти в год [275]. Таким образом, совокупный вклад регулярных утечек, возникающих при небольших авариях на нефтепроводах, во время добычи или при транспортировке на танкерах, существенно превосходит объёмы нефти, попадающей в гидросферу вследствие редких, но крупных и общественно резонансных катастроф.

2.2. Распределение ПАУ в различных компонентах биосферы Земли

2.2.1. ПАУ в атмосфере

Среди всех компонентов биосферы Земли наибольшая эмиссия ПАУ наблюдается именно в атмосферу, поскольку в основном эти соединения образуются за счет неполного сгорания органического материала.

В зависимости от молекулярной массы, ПАУ могут находиться либо в газовой фазе атмосферы (как правило, это ПАУ с небольшой молекулярной массой), либо в фазе твердых частиц [164]. При этом концентрация ПАУ в газовой фазе намного выше таковой в фазе твердых частиц [17, 92, 158, 266].

Исследования, оценивающие уровень выброса ПАУ в атмосферу при различной деятельности человека, показывают, что сжигание природного газа приводит к образованию ПАУ в массе до 2000 пг/кг топлива (здесь и далее указывается суммарная концентрация нескольких ПАУ, уточнить список ПАУ можно по приведенным ссылкам); сжигание древесного топлива - от 0,95 до 140 мг/кг топлива; использование двигателя внутреннего сгорания - от 72,5 до 10000 мкг/кг топлива; отопление - от 77 до 13300 мкг/кг топлива; открытые пожары - от 5 до 683 мг/кг топлива [208]. В развивающихся странах основным источником ПАУ в атмосфере считаются выбросы от сгорания бензина и дизельного топлива, а наибольшая их концентрация в воздухе зарегистрирована в странах Азии, Африки и Латинской Америки [206].

Концентрация ПАУ в атмосфере зависит от нескольких параметров, в том числе от температуры, влажности и освещенности. При этом количество ПАУ в атмосфере увеличивается при похолодании и в дождливый период, а уменьшается при увеличенном уровне освещенности [114, 178, 239, 253]. Такие зависимости имеют несколько объяснений: (1) в холодное время года увеличивается эмиссия ПАУ из-за усиленного сжигания топлива для обеспечения надлежащего уровня отопления жилых помещений; (2) при уменьшенной температуре воздуха, вкупе с отсутствием солнечного света замедляются процессы фото-, термо- и хемоокисления ПАУ и их разложения; (3) при повышенной температуре облегчается переход ПАУ из твердой фазы в газовую с дальнейшей их дисперсией [59].

В 2010 году в атмосферу Великобритании по расчетам National Atmospheric Emissions Inventory была выброшена 621 тонна ПАУ из списка приоритета (наиболее канцерогенные), среди них – 3,23 тонны бенз[а]пирена [141]. Эта антропогенная эмиссия бенз[а]пирена сравнима с его количеством, выброшенным в атмосферу по естественным причинам в 2010 году, которое оценивается в 2,88 тонны. Таким образом, эмиссия ПАУ в атмосферу происходит как из природных, так и из антропогенных источников, а концентрация сильно зависит от времени года и экономического положения страны (см. табл. 3).

Таблица 3. Концентрация ПАУ в атмосфере разных стран, измеренная в разные года и сезоны.

Страна	Концентрация	Тип	Примечания	Год и/или сезон	Ссылка
Великобритания	0,029–0,13	Сельская местность	нг ВаР-ТЕQ м ⁻³	2008–2010	[45]
	0,12–2	Город			
	0,25–1,4	Пригород			
США	1,4–2,4 нг м ⁻³	—	4 ПАУ (ВаА, ВаР, I123Р, и BgР)	2013	[165]
Европа	0,033–1,5 нг м ⁻³	—			
Канада	10,2–83,7 нг м ⁻³	Город	Σ16 ПАУ (0,678–0,945 нг ВаР-ТЕQ м ⁻³)	Лето, 2009	[21]
	8,31–52,1 нг м ⁻³			Зима, 2009	
Европа и Атлантический океан	5,3–4,443 нг м ⁻³	Отдаленная от городов сельская местность	Σ16 ПАУ (0,005–0,112 нг ВаР-ТЕQ м ⁻³)	2001–2002	[239]
Европа	2,243 ± 1,772 нг м ⁻³	Пригород	Σ15 ПАУ	1994–2010	[83]
Испания	2,71–366,9 нг м ⁻³	Промышленная зона	Σ18 ПАУ	2008	[207]
Саудовская Аравия	0,13–515,76 нг м ⁻³	Город	Σ16 ПАУ (Твердая фаза)	2011–2012	[35]
	19,7–89,1 нг м ⁻³	Пригород			[254]

Страна	Концентрация	Тип	Примечания	Год и/или сезон	Ссылка
Северные провинции Китая	89,8–1616,5 нг м ⁻³	Сельская местность	$\Sigma 15$ ПАУ (0,061–35,02 нг ВаР-ТЕQ м ⁻³)	Октябрь 2007 - Август 2008	
	131–979,2 нг м ⁻³	Город			
Сеул, Корея	78.8 ± 38,2 нг м ⁻³	Город	$\Sigma 16$ ПАУ	Октябрь 2014	[142]
Турция	30–198 нг м ⁻³	Город	$\Sigma 12$ ПАУ	2008–2009	[36]
Германия	0,4–121,4 нг м ⁻³	Город	$\Sigma 21$ ПАУ (2,6 нг ВаР-ТЕQ м ⁻³ , только твердая фаза)	Зима (2005 и 2006)	[30]
Тайвань	69,3–325 нг м ⁻³	Промышленная зона	$\Sigma 16$ ПАУ (0,180–0,81 нг ВаР-ТЕQ м ⁻³)	Весна и лето (2012)	[158]

Примечания: ВаР-ТЕQ - общий токсичный эквивалент бенз[а]пирена. Список ПАУ, использованных в конкретных исследованиях, уточнено по ссылкам.

В 2007 году для России 32,9% от всех ПАУ, попавших в атмосферу, приходилось на ПАУ, выделившиеся в результате сгорания бензина и/или дизельного топлива; 21,7% - на ПАУ, выделившиеся в результате лесных пожаров и 12,9% - на ПАУ, выделившиеся в ходе производства алюминия. Тем не менее, при объединении всех доступных данных о выбросах ПАУ в атмосферу для всех стран основным их источником (44,7%) оказывалось сжигание древесного топлива для отопления [221].

Политика ведущих государств, направленная на контроль выбросов ПАУ, а также технологический прогресс привели к снижению концентрации канцерогенных ПАУ в атмосфере. Например, концентрация бенз[а]пирена в воздухе линейно уменьшается с 1950 года по данным мониторинговых станций Лондона [141]. Тем не менее, страны с активно развивающейся экономикой являются наиболее активными производителями ПАУ в связи с особенностями получения энергии в этих странах.

2.2.2. ПАУ в литосфере

Количество ПАУ в почве в несколько раз выше, чем их количество в воздухе [206]. Это увеличенное содержание ПАУ в почве может наблюдаться не из-за большей эмиссии, а из-за того, что ПАУ способны растворяться в компонентах почвы, аккумулироваться и храниться там (см. ниже) [164]. Это предположение подтверждается и результатами математического моделирования распределения ПАУ, учитывающего то, что наибольший выброс этих соединений происходит в атмосферу [159]. Стоит отметить, что процесс разрушения ПАУ в результате их взаимодействия с O_3 , SO_2 , SO_3 , NO_x или радикалами OH (находящимися преимущественно в атмосфере) сильно замедляется при попадании в почву, что способствует аккумуляции исходных соединений [180, 195]. Эмиссия ПАУ в почву зависит от сезона, при этом она увеличивается в зимний период в связи с увеличением концентрации этих соединений в воздухе из-за усиленного сжигания топлива в целях обеспечения отопления помещений [180].

Концентрация ПАУ, образованных естественным путем (лесные пожары и/или вулканическая активность), оценивалась на рубеже 1980 года в области 1-10 мкг/кг почвы [70]. Тем не менее, с развитием технического прогресса, ростом городов и плотности населения в них, концентрация ПАУ в почве городских и пригородных территорий растет [257, 271]. Так, на современном этапе концентрация ПАУ в городских почвах составляет около 10^3 - 10^4 мкг/кг почвы, в сельских - 10^3 мкг/кг [164, 258, 272]. При этом количество ПАУ в почве экспоненциально уменьшается по мере удаления от источника загрязнения [257].

В 2005 году в почвах Москвы концентрация 16 ПАУ, за которыми установлен дополнительный контроль в связи с их канцерогенностью, составила в среднем 1553,91 [минимум 208,84, максимум 9604,78] мкг/кг. Наибольшая концентрация наблюдалась в парковых, промышленных и жилых районах города [81]. Подобную работу повторили в 2015 году - при этом концентрация ПАУ в жилых зонах составила 814 мкг/кг, в промышленных зонах - 1318 мкг/кг, в парковых зонах - 1842 мкг/кг. Наблюдаемые значения были в пределах предыдущего исследования, а небольшие уменьшения авторы объяснили изменением типов двигателей внутреннего сгорания с карбюраторных на инжекторные, а также активной программой ремидации почв, проводимой в столице России [33].

Как уже было отмечено выше, эмиссия ПАУ в почву зависит от сезонности и удаленности от источника загрязнения. Кроме того, структура почвы также оказывает влияние на скорость аккумуляции ПАУ в ней. Например, в польском исследовании лесных почв было показано, что количество ПАУ положительно коррелирует с содержанием ила и отрицательно - с содержанием песка [168]. Дополнительно на способность ПАУ растворяться в почве влияет и их способность растворяться в воде, при этом зависимость прямо пропорциональная [6].

Стоит отметить, что ПАУ, попавшие в почву, затем могут транспортироваться в растения [46, 58]. Так ПАУ попадают в ткани растений, где могут аккумулироваться и в дальнейшем попадать в пищевые цепочки.

2.2.3. ПАУ в гидросфере

Кроме почвы, ПАУ способны аккумулироваться и в воде, несмотря на их небольшую растворимость. Это подтверждается результатами математического моделирования, а также измерениями содержания ПАУ в различных акваториях [186, 252].

Источники ПАУ в воде разнообразны - ими могут быть как воздух и осадки, так и промышленные сточные воды, разливы нефти в результате аварий при ее транспортировке, донные работы [135, 175, 238]. При этом атмосфера является основным источником - до 80% всех ПАУ в Мировом океане имеют атмосферное происхождение [184]. Например, количество ПАУ, попавших в Средиземное море из атмосферы, в среднем составляет около 45 тонн/год, а поступление этих химических соединений вместе с реками - 6 тонн/год [163]. Количество растворенных в акватории ПАУ зависит от сезона, направления и силы ветров, интенсивности осадков и антропогенного фактора [29].

ПАУ распределяются в воде неравномерно. Соединения, обладающие наименьшей молекулярной массой, в основном растворены в поверхностных водах и водной толще, где их суммарная концентрация может достигать сотен нанограмм на литр. Высокомолекулярные ПАУ в основном находятся в донных отложениях либо в толще воды непосредственно над дном, а суммарная концентрация может достигать 1 микрограмма на грамм седимента [238].

В поверхностных водах пресных водоемов содержание ПАУ может колебаться от 4 до 600 нг/л [205]. В морских акваториях концентрация ПАУ уменьшается с увеличением широты и колеблется в пределах 14-760 пг/л в северных широтах [169]. В другом исследовании Лохманн и др. [166] проанализировали образцы из 22 точек в Северном ледовитом океане, среди всех зарегистрированных ПАУ наибольшая концентрация в океанической воде наблюдалась для фенантрена (10-180 пг/л), флуорантена (10-130 пг/л) и флуорена (16-66 пг/л). В отложениях морского дна Баренцева моря содержится от 200 до 500 нг/г ПАУ - измерения были проведены в 2004 и 2006 годах соответственно [29]. Дополнительно концентрации некоторых ПАУ в акваториях Европы и Северной Америки приведены в таблице 4.

Таблица 4. Концентрация некоторых ПАУ в акваториях Европы и Северной Америки.

ПАУ	Балтийское море (нг/л) [259]		Термаикос, Греция (нг/л) [163]	Чесапикский залив, США (нг/л) [145]
	Глубина 10-25 метров	Глубина 70-415 м		
Нафтален	0,27–1,78	0,05–0,41	-	-
Аценафтен	1,63–4,86	0,13–1,04	10–64	-
Флуорен	0,26–0,86	0,026–0,18	10–150	0,32–2,12
Фенантрен	0,50–2,26	0,076–0,99	30–132	0,88–4,86
Антрацен	0,16–0,46	0,037–0,56	10–170	0,08–0,28
Флуорантен	0,41–0,93	0,098–0,85	10–65	0,35–2,12
Пирен	0,12–0,99	0,025–0,416	10–140	0,22–1,14
Бенз[а]антрацен	0,03–0,90	0,009–0,11	10–45	0,08–0,74
Хризен	0,04–0,46	0,0011–0,092	10–45	0,10–0,39
Бенз[б]флуорантен	0,03–0,13	0,015–0,085		0,07–1,58
Бенз[к]флуорантен	0,010–0,06	0,006–0,071	15–32	0,10–0,43
Бенз[а]пирен	0,011–0,12	0,005–0,071	10–44	0,16–0,48
Дибенз[а, h]антрацен	0,002–0,017	0,001–0,17		0,13–1,11
Бенз[ghi]перилен	0,019–0,47	0,002–0,35	10–30	0,12–2,87
Индено[1,2,3-cd]пирен	0,012–0,19	0,003–0,188		0,17–0,74

Таким образом, ПАУ могут растворяться в некоторых количествах в воде и накапливаться в донных отложениях, что оказывает эффекты на живые организмы, проживающие в водной среде.

2.2.4. Катастрофы, связанные с выбросом большого количества ПАУ в окружающую

среду

Большую обеспокоенность общества вызывают экологические катастрофы, связанные с выбросами больших масс сырой нефти в окружающую среду. Разлив нефти с танкера «Еххон Valdez» в заливе Принца Уильяма в 1989 г. вызвал большой социо-экономический резонанс. Разлив совпал с периодом нереста в этой области тихоокеанской сельди (*Clupea pallasii*) и горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*). Это привело к многочисленным нарушениям развития, повышенной смертности у эмбрионов и мальков рыб, что в значительной мере повлияло на рыбный промысел в регионе [117]. Один из наиболее современных примеров таких крупных катастроф - взрыв платформы Deepwater Horizon в 2010 году в Мексиканском заливе [269].

Другие крупные катастрофы последних 25 лет, которые привели к выбросу 5000 и более тонн сырой нефти - это выброс 28000 тонн в Аравийское море в 2003 году; выброс 12000 тонн нефти в штате Луизиана в 2005 году; выброс 6500 тонн в озеро Чарльз, штат Луизиана в 2006 году; выброс 20000 тонн в Ливане в 2006 году; выброс 10800 тонн в Желтое море в 2007 году; выброс 8800 тонн в Новом Орлеане, Луизиана, США в 2008 году; выброс 5500 тонн в Нигерии в 2011 году, выброс 17500 тонн в Норильске, Россия, 2022 [10, 49, 52, 129].

Такие экологические катастрофы приводят к сильному загрязнению окружающей среды - например, после катастрофы в Мексиканском заливе содержание алканов и ароматических соединений в толще воды увеличилось в 15-100 раз по сравнению со значениями до катастрофы [237]. Так как ПАУ являются компонентами сырой нефти, то организмы, проживающие на территории пострадавших регионов, подвергаются их усиленному воздействию, что может неблагоприятно сказываться на их благосостоянии.

2.2.5. Разложение полициклических ароматических углеводородов в окружающей среде

Как уже было сказано выше (см. раздел 1.3), ПАУ в большинстве своем накапливаются в почве. Накопление ПАУ происходит не только в виде исходных соединений - чаще всего они преобразуются в гидроксильированные, нитрифицированные или окисленные формы в результате биотических или абиотических процессов [93, 140, 242].

Один из процессов, способствующих разложению ПАУ – фотолиз. Он происходит в верхних слоях атмосферы: под действием ультрафиолетового излучения – при этом бензольные кольца, входящие в структуру ПАУ, разрываются. Кроме того, ПАУ способны окисляться под действием озона с образованием кетонов, дионов или хинонов [228, 262].

Среди микроорганизмов, способных к разложению ПАУ в Арктических районах, наиболее изученными оказываются представители групп *Cycloclasticus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Bacillus*, *Dietzia*, *Colwellia*, *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Salinisphaera*, *Shewanella*, *Dietzia* [65]. Кроме того, ПАУ в некоторой степени

разлагаются и в организме позвоночных животных в результате работы ферментов печени. В то же время ПАУ способны аккумулироваться в телах беспозвоночных животных, у которых, судя по всему, не имеется ферментов, участвующих в разложении этих веществ [14].

Таким образом, распределение ПАУ и их круговорот в географической оболочке Земли могут быть представлены в виде схемы, показанной на рис.3.



Рисунок 3. Схематическое отображение оборота полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в биосфере Земли. Толщина черных стрелок пропорциональна переносу суммарного количества ПАУ. ПАУ в большинстве своем появляются в атмосфере по антропогенным причинам – в результате сжигания угля и топлива. Кроме того, ПАУ попадают в воздух в результате естественных причин – во время масштабных лесных пожаров или извержений вулканов. В верхних слоях атмосферы малая часть ПАУ подвергается разложению. Большая часть выпадает на поверхность в составе осадков и таким образом попадает в почву или воду. В воде ПАУ также могут оказаться и в результате техногенных катастроф при добыче или транспортировке нефти. А в почве ПАУ в основном аккумулируются и подвергаются медленному разложению благодаря деятельности микроорганизмов. Зелеными стрелками показаны пути попадания ПАУ в живые организмы из зараженной среды обитания или по пищевой цепи.

2.3. Особенности электрической активности рабочих желудочковых

кардиомиоцитов некоторых позвоночных животных

Кардиомиоциты относятся к возбудимым клеткам, поскольку они способны генерировать потенциалы действия (ПД) [2]. ПД развивается в клетках благодаря работе потенциалзависимых каналов – мембранных белков, способных с одной стороны реагировать на изменение мембранного потенциала, а с другой – пропускать определенные ионы через пору, формируемую ими в мембране. Электрическая активность кардиомиоцитов неразрывно связана с их механической активностью посредством механизмов электро-механического сопряжения. Механическая активность отдельных кардиомиоцитов лежит в основе систолического сокращения миокарда и таким образом позволяет сердцу выполнять свою основную задачу – обеспечение органов адекватным количеством кислорода и питательных веществ. Поэтому исследование изменения электрической активности отдельных кардиомиоцитов при воздействии различных соединений является необходимым, хотя и не достаточным условием для оценки влияния этих веществ на сердце и на организм в целом.

2.3.1. Электрическая активность желудочковых кардиомиоцитов костистых рыб и ее зависимость от температуры окружающей среды

Конфигурация ПД желудочковых кардиомиоцитов рыб в целом сходна у всех исследованных видов. Для нее характерно наличие фазы быстрой деполяризации (фаза 0), плато (фаза 2) и фазы реполяризации (фаза 3). Потенциал покоя (фаза 4) остается стабильным на уровне около -80 мВ. Ключевое отличие от ПД желудочковых кардиомиоцитов человека состоит в отсутствии фазы быстрой реполяризации, формируемой калиевыми токами с быстрой кинетикой – I_{to} и I_{Kur} (см. рис.4) [247].

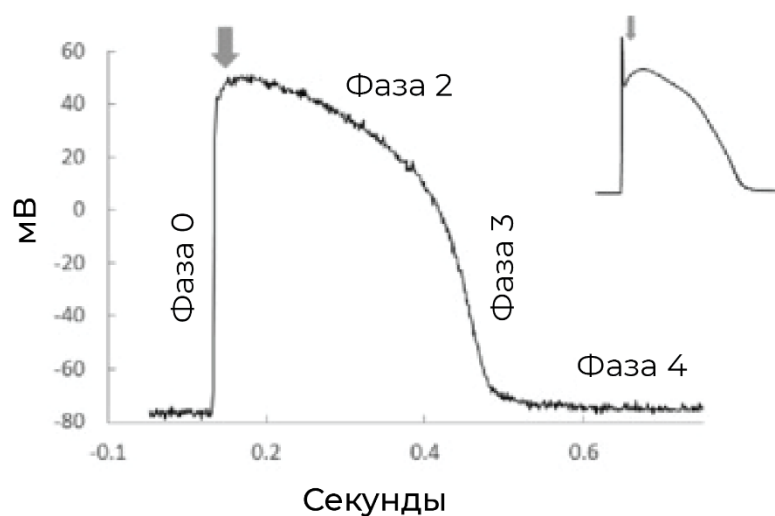


Рисунок 4. Типичная конфигурация потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов рыб. На врезке справа показана конфигурация потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов человека. Серой стрелкой отмечена отсутствующая у рыб фаза быстрой

реполяризации (фаза 1). Фаза 0 – фаза быстрой деполяризации, фаза 2 – фаза плато, фаза 3 – фаза реполяризации, фаза 4 – потенциал покоя. По [247].

Набор основных ионных токов, определяющих конфигурацию ПД костистых рыб, также сходен у всех исследованных к настоящему времени видов [1, 246]. Так, фаза быстрой деполяризации обеспечивается быстрым натриевым током, I_{Na} . Этот ток переносится белковыми комплексами, основной субъединицей которых является порообразующая α -субъединица. В рабочих кардиомиоцитах рыб экспрессируются в основном изоформы $Na_v1.5$ или $Na_v1.4$ α -субъединицы [103, 105, 106]. Натриевые токи, переносимые этими изоформами, имеют некоторые различия. Ток, переносимый $Na_v1.4$, обладает более быстрой кинетикой инактивации, смещенными влево кривыми стационарной инактивации и активации и меньшими значениями температуры перелома по сравнению с током через $Na_v1.5$ [103]. Характеристики интегрального натриевого тока будут определяться, в том числе, количественным и качественным составом порообразующих субъединиц натриевых каналов исследуемого кардиомиоцита.

Фаза плато ПД желудочковых кардиомиоцитов рыб формируется за счет баланса кальциевого тока L-типа, $I_{Ca,L}$, и реполяризующих калиевых токов. Кроме того, у некоторых видов рыб, например *Danio rerio*, *Squalus acanthias*, *Acipenser baerii*, был обнаружен кальциевый ток T-типа $I_{Ca,T}$ [104, 108, 111, 179]. У млекопитающих $I_{Ca,T}$ в рабочих кардиомиоцитах отсутствует, а его роль в нормальной физиологии кардиомиоцитов рыб пока остается не до конца ясной. Предполагается, что он способствует общему увеличению потока ионов кальция в клетку через сарколемму для увеличения силы сокращений, а также за счет более быстрой активации по сравнению с $I_{Ca,L}$ ускоряет фазу нарастания кальциевого транзientа в кардиомиоцитах рыб, в которых основным источником Ca^{2+} , формирующего транзient, является внеклеточная среда, а не саркоплазматический ретикулум [104, 216].

Реполяризующие токи желудочковых кардиомиоцитов рыб представлены калиевым током входящего выпрямления, I_{K1} , быстрым калиевым током задержанного выпрямления, I_{Kr} , и медленным калиевым током задержанного выпрямления, I_{Ks} . Причем, если I_{K1} и I_{Kr} были отмечены у всех исследованных видов, то I_{Ks} был зарегистрирован только у некоторых костистых рыб, например, у данио-рерио (*Danio rerio*) в желудочковых миоцитах и у карася (*Carassius carassius*) в предсердных, но не в желудочковых миоцитах [8, 99]. У крупных северных рыб (северная навага (*Eleginus nawaga*), керчак (*Myoxocephalus scorpio*), треска (*Gadus morhua*) I_{Ks} не был зарегистрирован [12, 75, 79]. У млекопитающих ток I_{Kr} переносится гомо- и гетеротетрамерными комплексами, образованными продуктами гена *KCNH2* [157]. Ток I_{Kr} рыб, в отличие от млекопитающих, переносится в основном продуктами гена *KCNH6* [85, 247].

Калиевый ток I_{K1} участвует в финальных этапах реполяризации и поддержании стабильных значений потенциала покоя. Тетрамерные комплексы, переносящие этот ток, сформированы продуктами гена *kcnj14* (канал $K_{ir2.4}$) и в меньшей степени *kcnj12* (канал $K_{ir2.2}$) [25, 95, 98], в отличие от человека, у которых комплекс состоит из продуктов гена *kcnj2* (канал $K_{ir2.1}$) [255].

Рыбы являются эктотермными животными, скорость метаболизма которых напрямую зависит от температуры окружающей среды. Поскольку сердце обеспечивает органы кровью в соответствии с их метаболическими требованиями, то и работа сердца рыб также будет зависеть от температуры окружающей среды. Температура среды может с одной стороны изменяться быстро (остро) – с такими изменениями животные могут столкнуться, например, при прохождении термоклина. С другой стороны, температура среды может изменяться плавно в течении года, что позволяет животному плавно акклиматизироваться к изменяющимся условиям.

Рассмотрим в первую очередь действие острого изменения температуры на параметры основных ионных токов желудочковых кардиомиоцитов.

Амплитуда основных реполяризующих токов, I_{K1} и I_{Kr} прямо зависит от температуры в диапазоне до 30°C [245]. Как следствие, при увеличении температуры в остром эксперименте происходит гиперполяризация потенциала покоя (за счет увеличения плотности I_{K1}) и уменьшение длительности ПД (за счет увеличения плотности I_{Kr}). При уменьшении температуры, напротив, происходит деполяризация потенциала покоя и увеличение длительности ПД. Такие изменения в конфигурации ПД при остром нагревании или охлаждении были отмечены для тунца обыкновенного [82], северной наваги [11], радужной форели [110], кумжи [249], горбуши [28], карася, налима, плотвы и щуки [109].

Амплитуда быстрого натриевого тока при понижении температуры уменьшается. С другой стороны, увеличение температуры от средних физиологических значений до определенной величины (температуры перелома) приводит к увеличению амплитуды I_{Na} . При дальнейшем увеличении температуры амплитуда тока начинает уменьшаться – I_{Na} имеет колоколообразную зависимость от температуры (см. рис.6) [24–26, 101].

Изменения фазы деполяризации ПД при нагревании или охлаждении определяются температурной зависимостью I_{Na} [245] (см. рис. 6). При низких температурах за счет малой амплитуды I_{Na} максимальная скорость деполяризации остается небольшой [9, 11]. Увеличение температуры сначала приводит к увеличению этого параметра, но при значениях выше температуры перелома для I_{Na} , скорость деполяризации уменьшается. Возбудимость кардиомиоцитов, определяющая их способность генерировать ПД, также зависит от баланса деполяризующего и стабилизирующего токов – I_{Na} и I_{K1} , соответственно. Форма вольт-амперной характеристики I_{K1} такова, что даже при небольшом отклонении мембранного потенциала от

потенциала покоя амплитуда этого тока значительно увеличивается. Потому, для развития ПД, амплитуда деполяризующего тока должна многократно превышать амплитуду тока стабилизирующего [245]. Начиная с определенного значения (температуры перелома), увеличение температуры приводит к уменьшению амплитуды I_{Na} . В то же время плотность I_{K1} непрерывно возрастает с увеличением температуры. Поэтому при высоких значениях этого параметра I_{K1} начинает превосходить I_{Na} , и миокард рыб теряет возбудимость (рис.5). При низких температурах за пределами физиологических значений возбудимость пропадает из-за критического снижения амплитуды I_{Na} и деполяризации мембраны, инактивирующей натриевые каналы [1].

Сократимость кардиомиоцитов определяется ионами кальция, попавшими в цитоплазму во время фазы плато ПД, а также чувствительностью сократительного аппарата к этим ионам. Ток $I_{Ca,L}$ кардиомиоцитов рыб имеет прямую зависимость от температур в пределах исследованного диапазона [156, 224]. Такая зависимость позволяет кардиомиоцитам сохранять способность к сокращению – при уменьшенной продолжительности ПД за счет увеличенной амплитуды кальциевого тока в клетку поступает достаточно ионов для индукции сокращения. При уменьшении температуры происходит также уменьшение скорости инактивации $I_{Ca,L}$ – такой компенсаторный механизм позволяет поддерживать уровень перенесенного через мембрану заряда относительно стабильным при охлаждении. Кроме того, показано, что тропонин С кардиомиоцитов рыб обладает исходно высоким уровнем сродства к Ca^{2+} - следовательно, даже небольшое увеличение концентрации ионов кальция способно стимулировать сокращение кардиомиоцитов рыб [87].

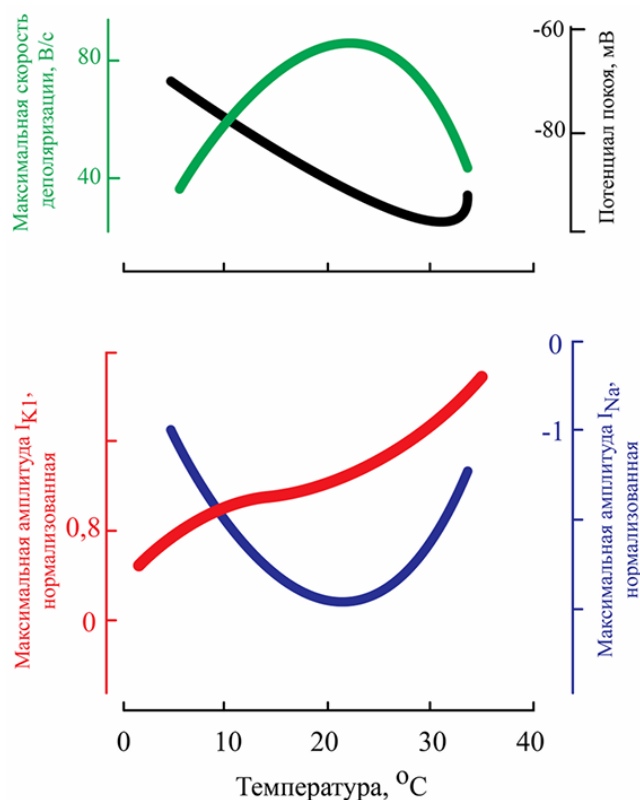


Рисунок 5. Зависимости параметров электрической активности (сверху) и токов, определяющих возбудимость кардиомиоцитов (снизу) от температуры окружающей среды Из [1].

Длительная сезонная акклиматизация к зимним условиям частично компенсирует перечисленные негативные эффекты острого снижения температуры и позволяет поддерживать электрическую стабильность миокарда в зимний период [1]. При акклимации к низким температурам в лабораторных условиях или акклиматизации к зимним условиям в естественной среде обитания значительно увеличивается плотность основного реполяризирующего тока, I_{Kr} , хотя сила изменений остается несопоставимой. Природная акклиматизация способствует гораздо более выраженному увеличению плотности I_{Kr} – напрямую это было показано для керчака, при этом только естественная акклиматизация привела к статистически значимому увеличению плотности I_{Kr} и сочетанному снижению длительности ПД на 40% [75]. Это связано с комплексным изменением сразу многих биотических и абиотических факторов окружающей среды, происходящим при похолодании. Действительно, не холод сам по себе, а только сочетание холода и гипоксии приводили к увеличению I_{Kr} в желудочковых кардиомиоцитах даллии (*Dallia pectoralis*) [230]. В любом случае, увеличение плотности реполяризирующего тока вследствие температурной акклимации или холодовой акклиматизации показано для всех исследованных видов рыб – радужной форели, карася, плотвы, налима [109], наваги [12], керчака [75], даллии

[230]. Такие изменения позволяют компенсировать значительное увеличение длительности ПД при остром воздействии низких температур.

Для поддержания возбудимости плотность I_{Na} и I_{K1} при холодовой акклимации изменяются противонаправленно. Если произошло снижение плотности I_{K1} , то плотность I_{Na} увеличится, как, например, у плотвы и форели [25, 26, 108]. И наоборот, при увеличении амплитуды I_{K1} будет уменьшаться амплитуда I_{Na} (как, например, у керчака [75]). Большой ток I_{K1} при низких температурах стабилизирует негативные величины потенциала покоя, поддерживая потенциалзависимые натриевые каналы в закрытом состоянии – это поддерживает возбудимость кардиомиоцитов на нормальном уровне.

У некоторых видов отмечается увеличение $I_{Ca,L}$, обеспечивающее поддержание достаточной силы сокращения при низкой частоте сердечных сокращений, хотя у многих рыб амплитуда этого тока не меняется или даже уменьшается при акклиматизации к зимним условиям. Вследствие недостатка экспериментальных данных выявить закономерности в изменении кальциевого тока вследствие холодовой акклимации представляется затруднительным [1].

2.3.2. Электрическая активность желудочковых кардиомиоцитов человека

Электрическая активность рабочих кардиомиоцитов человека и лежащие в ее основе ионные механизмы хорошо охарактеризованы. В желудочковых кардиомиоцитах человека ПД разделяется на несколько хорошо различимых фаз – фаза быстрой деполяризации (0), фаза ранней реполяризации (1), фаза плато (2), фаза окончательной реполяризации (3) и потенциал покоя (фаза 4), при этом длительность ПД составляет около 300-400 мс (см. рис.6).

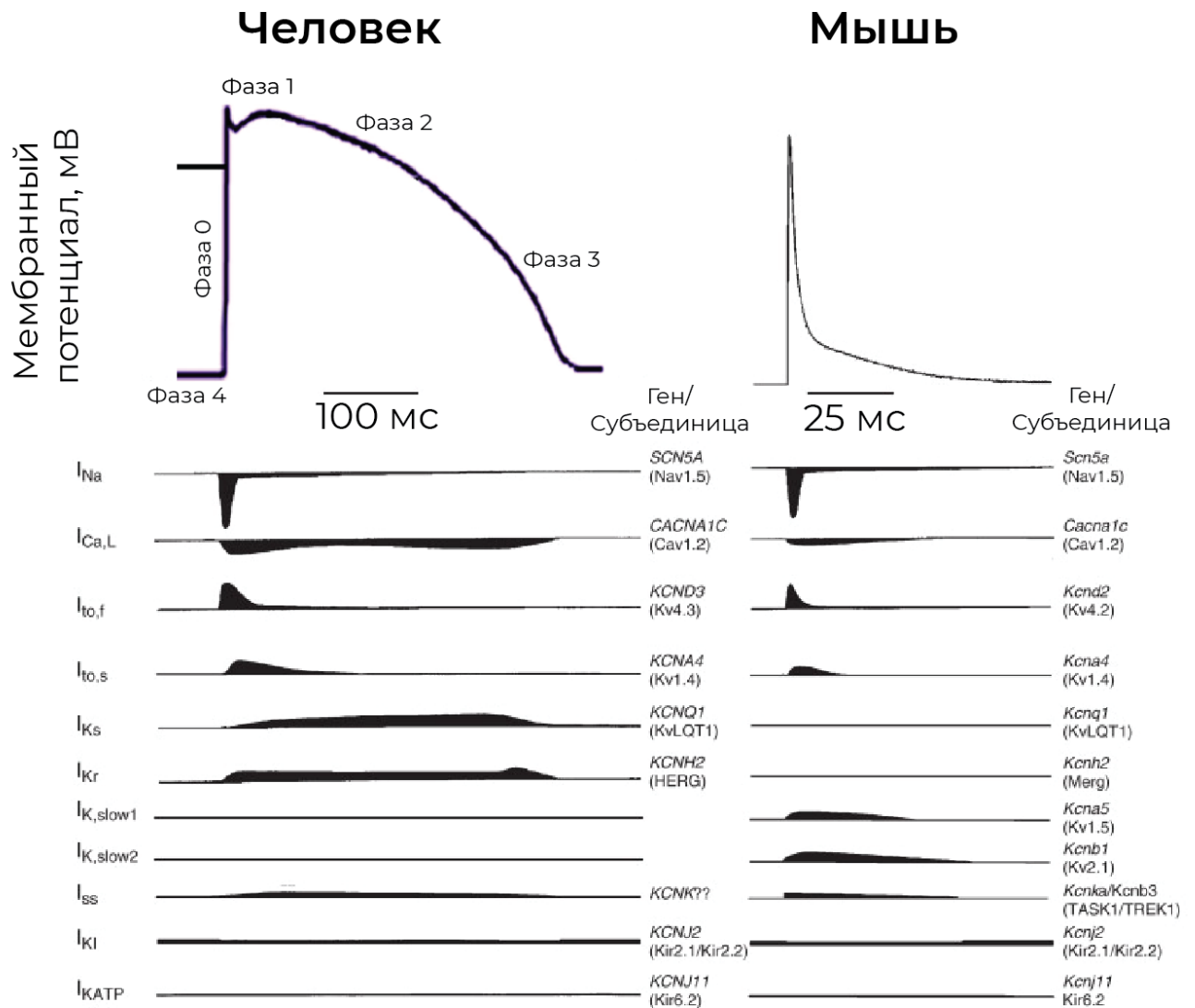


Рисунок 6. Форма потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов человека (слева) и мыши (справа). ПД сопоставлен по времени с формирующими его ионными токами. Справа указаны порообразующие субъединицы и гены, которые их кодируют для мыши и человека. По [131, 192].

Фаза 0 у человека обеспечивается, как и у рыб, быстрым натриевым током, который у человека переносит главным образом α -субъединица $Na_v1.5$, продукт гена *SCN5A*. Характеристики этого тока определяют как максимальную скорость деполяризации, так и амплитуду потенциала действия [50, 131].

Фаза 1 определяется плотностью тока I_{to} , а также скоростью инактивации потенциалзависимых натриевых каналов [120, 131, 218]. В результате быстрой активации тока I_{to} мембранный потенциал устремляется в сторону равновесного потенциала для ионов калия. Если плотность I_{to} большая, и мембранный потенциал успевает значительно снизиться, то затем,

вследствие активации потенциалзависимых кальциевых каналов и последующей деполяризации, возникает «выемка» (notch). Соответственно, выемка тем более выражена, чем большую плотность имеет I_{to} . В миокарде человека наибольшую плотность этого тока имеют рабочие кардиомиоциты субэпикардальных слоев [188], поэтому выемка ПД рабочего миокарда этой зоны оказывается наиболее выражена.

Во время длинной фазы плато мембранный потенциал изменяется сравнительно медленно. Для обеспечения таких относительно стабильных значений в желудочковых кардиомиоцитах устанавливается баланс между током входящих и выходящих из клетки катионов. С одной стороны, через потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа, $Ca_v1.2$ (переносят ток $I_{Ca,L}$) в клетку поступают ионы кальция, необходимые для индукции кальциевого транзистента, в свою очередь запускающего процесс сокращения миоцита. С другой стороны, через потенциалзависимые калиевые каналы $K_v11.1$ (переносят ток I_{Kr}) и $K_v7.1$ (переносят ток I_{Ks}) из клетки выходят ионы калия [120, 131]. В конце концов, вследствие кальций-зависимой инактивации кальциевых каналов [68] начинает преобладать ток ионов калия, направленный из клетки, в результате начинается фаза 3, фаза окончательной реполяризации. Таким образом, фаза 3 обеспечивается в основном токами I_{Kr} и I_{Ks} , переносимыми субъединицами $K_v11.1$ и $K_v7.1$ соответственно [131], и лишь на самом заключительном ее этапе (при потенциале негативнее -45 мВ) в реполяризацию вносит свой вклад и ток I_{K1} .

2.3.3. Электрическая активность желудочковых кардиомиоцитов мыши

ПД рабочих кардиомиоцитов мыши значительно отличается от ПД миоцитов как рыб, так и человека (см. рис.7). Дело в том, что частота сердечных сокращений (ЧСС) в покое у мелких грызунов находится в пределах 300-450 ударов в минуту, что требует небольшой длительности ПД во избежание пересечения переднего фронта волны возбуждения и зоны рефрактерности в миокарде. Длительность ПД в рабочем миокарде мыши на уровне 50% реполяризации составляет ~5-10 мс, а на уровне 80% реполяризации ~10-30 мс (при комнатной температуре в изолированных кардиомиоцитах [67, 170]), фаза плато ПД практически отсутствует (рис.7). Такая конфигурация ПД достигается за счет наличия как в желудочковых, так и в предсердных миоцитах быстро активирующихся и инактивирующихся калиевых токов I_{to} и I_{Kur} большой амплитуды, намного превосходящей таковую у млекопитающих с выраженной фазой плато сердечного ПД (человек, собака, свинья, кролик и т.п. за исключением морской свинки, не имеющей I_{to}) и обеспечивающей практически полную реполяризацию еще до инактивации $I_{Ca,L}$ [131].

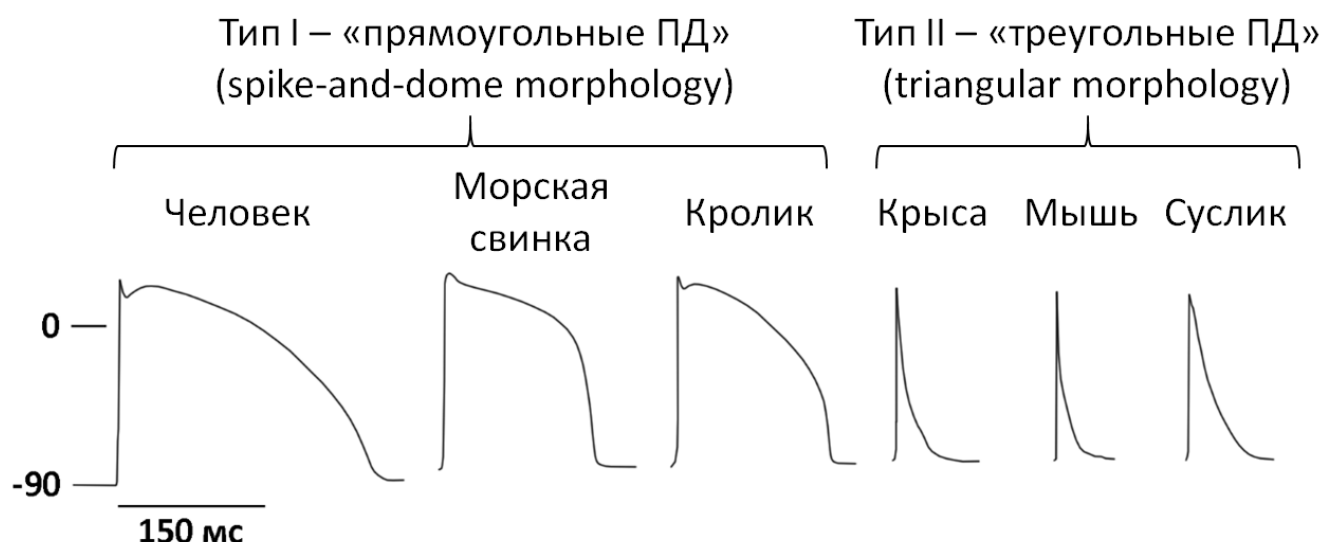


Рисунок 7. Конфигурация потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов человека и некоторых грызунов [131].

Фаза быстрой деполяризации (фаза 0) ПД желудочковых кардиомиоцитов мышей обеспечивается быстрым натриевым током, переносимым в основном субъединицей $Na_v1.5$ [55, 120, 192]. Для обеспечения быстрой передачи ПД каналы, образованные порообразующей субъединицей $Na_v1.5$, располагаются в основном в области щелевых контактов. Такая локализация каналов позволяет ПД распространяться по миокарду скачкообразно, аналогично распространению ПД по миелинизированному волокну [256]. Около 77% натриевых каналов в желудочковых кардиомиоцитах мыши представлены изоформой $Na_v1.5$. Кроме нее в миокарде мыши экспрессируются изоформы $Na_v1.1$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$ и $Na_v1.6$, а соответствующие функциональные белки в основном располагаются на мембране t-трубочек, обеспечивая проведение ПД «вглубь» крупных кардиомиоцитов [173, 256].

Сразу за фазой быстрой деполяризации начинается фаза 1, фаза ранней реполяризации, развитие которой поддерживается благодаря быстрым калиевым токам – транзиторным, I_{to} и ультрабыстрым калиевым током, I_{Kur} . Эти токи имеют большую плотность в желудочковых кардиомиоцитах мышей и переносятся белками $K_v1.5/K_v2.1$ (I_{Kur}) и $K_v4.2/K_v4.3$ (I_{to}). Эти белки формируют гомо- и гетеротетрамеры, переносящие соответствующий ток [55, 120, 167, 192, 212].

Фаза 2 (фаза плато) ПД кардиомиоцитов мышей слабо выражена. Плотность кальциевого тока, $I_{Ca,L}$, формирующего данную фазу у кардиомиоцитов, наоборот, достаточно большая. Это необходимо для того, чтобы нужное количество «пусковых» ионов кальция все же успевало попадать в клетки за короткое время, отведенное на реполяризацию, и стимулировало их сокращение. Этот ток у взрослых мышей в основном переносится порообразующей субъединицей $Ca_v1.2$ (переносит ток $I_{Ca,L}$) [192], а у новорожденных в течение первых 5 дней

электрофизиологическими методами и детектируется ток, переносимый Cav3.1/Cav3.2 (переносит ток $I_{Ca,T}$) [74].

Фаза 3 (фаза окончательной реполяризации) ПД кардиомиоцитов мыши обеспечивается токами I_{to} и I_{Kur} , в отличие от ПД кардиомиоцитов человека (см. рис. 8), в которых ключевую роль в развитии этой фазы играют токи задержанного выпрямления, I_{Kr} и I_{Ks} . Эти токи в рабочих кардиомиоцитах взрослых мышей не обнаруживаются электрофизиологическими методами [193]. Тем не менее, в рабочем миокарде мыши детектируются транскрипты генов *Kcnh2* (продукт этого гена переносит I_{Kr}), *Kcnq1* (продукт гена переносит I_{Ks}) и *Kcnel* (необходимая регуляторная субъединица для I_{Ks}) [144, 219]. Эти токи важны для нормальной реполяризации кардиомиоцитов эмбрионов и новорожденных мышат, при этом репертуар этих токов изменяется. В желудочковых кардиомиоцитах эмбрионов мышей основной вклад в реполяризацию вносит ток I_{Kr} , а в кардиомиоцитах новорожденных мышат (3 день) основным током становится I_{Ks} [251]. У взрослых животных эти токи обнаруживаются электрофизиологическими методами только в клетках сино-атриального узла, где они, а особенно I_{Kr} , вносят значимый вклад в реполяризацию [54, 119].

Наконец, в поддержании потенциала покоя и в финальных этапах реполяризации участвует ток входящего выпрямления, I_{K1} , переносимый тетрамерными комплексами белков $K_{ir2.1}/K_{ir2.2}$ [50, 192].

В целом электрическая активность кардиомиоцитов мыши и человека различается весьма сильно (см. рис.8). Тем не менее, мышь остается незаменимым объектом исследования электрофизиологии по нескольким причинам [55]. Во-первых, мыши представляют собой сравнительно доступный объект для различных генетических манипуляций; мышей легко содержать в больших количествах, что делает эксперименты с участием этого лабораторного грызуна относительно дешевыми. Во-вторых, свойства натриевых и кальциевых токов желудочковых кардиомиоцитов мыши и человека достаточно схожи. В-третьих, у человека также присутствуют токи I_{Kur} (в предсердиях) и I_{to} , обеспечивающие фазу ранней реполяризации, и большая амплитуда этих токов в миоцитах мыши делает это животное удобным объектом для их изучения.

Разница и сходство ионных токов, лежащих в основе ПД желудочковых кардиомиоцитов рыб, мышей и человека приведены в табл.5

Таблица 5. Основные ионные токи, лежащие в основе электрической активности рабочих кардиомиоцитов рыб, мыши и человека. По [25, 85, 95, 98, 104, 120, 247].

Фаза ПД	Рыбы*		Мышь		Человек	
	Название тока	Субъединица (ген)	Название тока	Субъединица (ген)	Название тока	Субъединица (ген)
Фаза 0	Быстрый натриевый ток, I_{Na}	$Na_v1.5$ (<i>Scn5a</i>) $Na_v1.4$ (<i>Scn4a</i>)	Быстрый натриевый ток, I_{Na}	$Na_v1.5$ (<i>Scn5a</i>) $Na_v1.1$ (<i>Scn1a</i>) $Na_v1.3$ (<i>Scn3a</i>) $Na_v1.4$ (<i>Scn4a</i>) $Na_v1.6$ (<i>Scn6a</i>)	Быстрый натриевый ток, I_{Na}	$Na_v1.5$ (<i>SCN5A</i>)
Фаза 1	-	-	Транзиторный калиевый ток, I_{to}	$K_v4.2$ (<i>Kcnd2</i>) $K_v4.3$ (<i>Kcnd3</i>)	Транзиторный калиевый ток, I_{to}	$K_v1.4$ (<i>KCNA4</i>) $K_v4.2$ (<i>KCND2</i>) $K_v4.3$ (<i>KCND3</i>)
			Ультрабыстрый калиевый ток, I_{Kur}	$K_v1.5$ (<i>Kcna5</i>)	-	-
Фаза 2	Кальциевый ток L-типа, $I_{Ca,L}$	$Ca_v1.2$ (<i>Cacnal1c</i>) $Ca_v1.1a$ (<i>Cacnals</i>)	Кальциевый ток L-типа, $I_{Ca,L}$	$Ca_v1.2$ (<i>Cacnal1c</i>)	Кальциевый ток L-типа, $I_{Ca,L}$	$Ca_v1.2$ (<i>CACNA1C</i>)
	Кальциевый ток T-типа, $I_{Ca,T}^{**}$	$Ca_v3.1$ (<i>Cacnal1g</i>) ^{**}	-	-	-	-
Фаза 3	Быстрый калиевый ток задержанного выпрямления, I_{Kr}	$K_v11.2$ (<i>Kcnh6</i>)	Транзиторный калиевый ток, I_{to}	$K_v4.2$ (<i>Kcnd2</i>) $K_v4.3$ (<i>Kcnd3</i>)	Быстрый калиевый ток задержанного выпрямления, I_{Kr}	$K_v11.1$ (<i>KCNH2</i>)
	Медленный калиевый ток задержанного выпрямления, I_{Ks}^{***}	$K_v7.1$ (<i>Kcnq1</i>) ^{***}	Ультрабыстрый калиевый ток, I_{Kur}	$K_v1.5$ (<i>Kcna5</i>)	Медленный калиевый ток задержанного выпрямления, I_{Ks}	$K_v7.1$ (<i>KCNQ1</i>)
Фаза 4	Калиевый ток входящего выпрямления, I_{K1}	$K_{ir}2.4$ (<i>Kcnj14</i>) $K_{ir}2.2$ (<i>Kcnj12</i>)	Калиевый ток входящего выпрямления, I_{K1}	$K_{ir}2.1$ (<i>Kcnj2</i>)	Калиевый ток входящего выпрямления, I_{K1}	$K_{ir}2.1$ (<i>KCNJ2</i>)

*- у рыб геном дублирован, поэтому для каждого приведенного гена существует несколько ортологичных вариантов;

** - Зарегистрирован только у некоторых видов рыб (например, *Danio rerio*, *Squalus acanthias*, *Acipenser baerii*) [104, 108, 111, 179]

*** - Зарегистрирован только у некоторых видов рыб (например, *Danio rerio*, *Carassius carassius*) [8, 99].

2.4. Влияние полициклических ароматических углеводородов на физиологические процессы

2.4.1. Канцерогенность полициклических ароматических углеводородов

Впервые о связи полициклических ароматических углеводородов с развитием раковых заболеваний было упомянуто в 1755 году - хирург больницы Святого Варфоломея в Лондоне сообщил, что “сажная бородавка” (плоскоклеточный рак кожи мошонки) чаще встречался у трубочистов. Врач связал этот факт с тем, что трубочисты подвергаются влиянию компонентов сажи, что и является причиной развития у них этого заболевания [64]. В настоящее время влияние некоторых ПАУ на увеличение шансов развития новообразований не подлежит сомнению. Поэтому Европейские и Американские органы по регуляции концентрации соединений в окружающей среде (The United States Environmental Protection Agency, USEPA, и European Food Safety Authority, EFSA) установили предельные нормы для некоторых соединений по их содержанию в воздухе и/или в продуктах, контактирующих с кожей и слизистыми оболочками человека [73, 122, 138]. Наиболее опасными для здоровья человека в связи с ассоциацией с раковыми заболеваниями считаются бенз[а]пирен, дибензо[а,h]антрацен, 3-метилхолантрен, 5-метилхризен, и 7,12-диметилбенз[а]антрацен [39, 185]. В настоящее время связь ПАУ с развитием новообразований привлекает внимание в контексте изучения рака легких, где около 90% случаев ассоциированы с активным курением табака, а 1-2% случаев - с общим загрязнением воздуха в помещениях проживания (в том числе с загрязнением табачным дымом - так называемым “пассивным курением”) [209]. Кроме того, ПАУ могут быть ассоциированы со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта [63] и молочной железы [211].

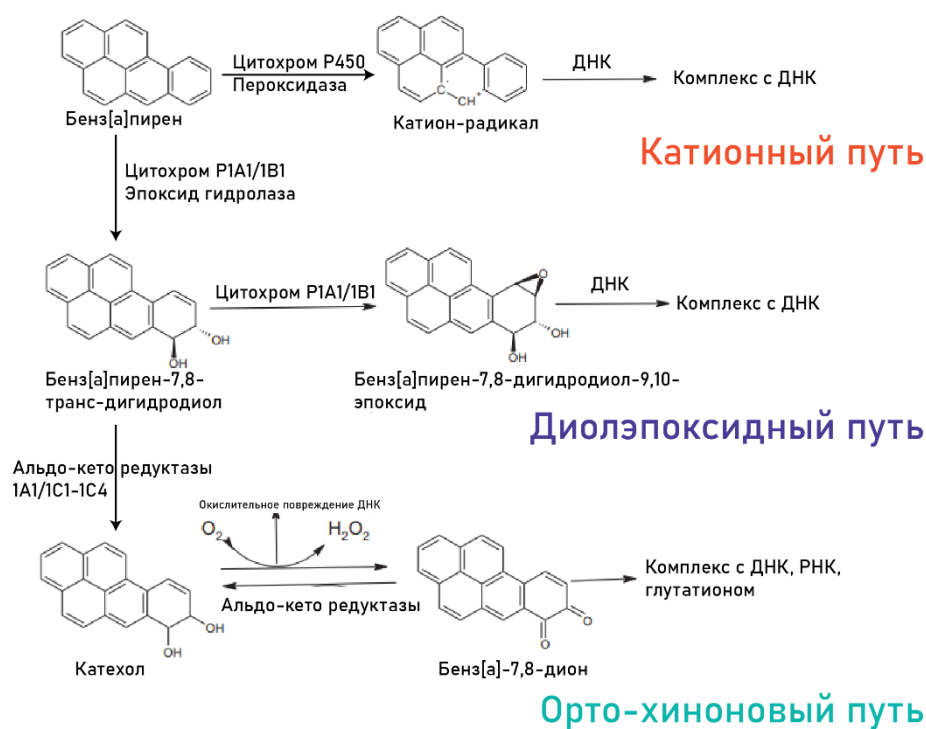
Попавшие в организм ПАУ напрямую взаимодействуют с арилуглеводородным рецептором (AhR). Арилуглеводородный рецептор представляет собой лиганд-зависимый транскрипционный фактор, участвующий в регуляции экспрессии генов метаболизма ксенобиотиков. Его активируют многочисленные природные и синтетические соединения, включая ПАУ и диоксины [61, 189]. В цитоплазме AhR существует в составе гетеротетрамерного белка, куда входят две субъединицы hsp90, белок XAP2 и ко-шаперон p23 [136, 181]. После связывания лиганда структура рецептора меняется, что открывает сигналы ядерной локализации и обеспечивает транслокацию комплекса в ядро. Здесь рецептор отделяется от шаперонов и образует димер с Arnt – его обязательным партнером в ДНК. Димер AhR–Arnt взаимодействует

со специфическими элементами ДНК, активируя транскрипцию генов, прежде всего цитохромов CYP1A1 и CYP1B1 [189]. Отсутствие AhR приводит к полной потере чувствительности к диоксину и родственным соединениям, что подтверждает ключевую роль рецептора в запускаемых ими токсических эффектах [91].

Цитохромы CYP1A1/1B1, экспрессия которых увеличивается после активации AhR, начинают активно метаболизировать попавшие в организм ПАУ, что должно было бы приводить к их быстрой инактивации и выведению. Однако образовавшиеся в ходе работы этих цитохромов метаболиты ПАУ обладают высоким канцерогенным потенциалом [214].

Среди всех ПАУ наибольший канцерогенный потенциал имеют «тяжелые» ПАУ, при этом канцерогенность имеет прямую зависимость от числа бензольных колец в составе молекулы [185]. Бенз[а]пирен, в состав которого входят 5 бензольных колец, является одним из наиболее изученных ПАУ в контексте его способности к индукции новообразований. Наиболее активным его метаболитом является бенз[а]пирен-7,8-дигидродиол-9,10-эпоксид, образующийся из исходного соединения под действием цитохрома 1A1 (CYP1A1). Это активное соединение сайт-специфично взаимодействует с ДНК, в том числе с гуанинами экзонов 157, 248 и 273 гена TP53 [62], кодирующего соответствующий белок репарации, что приводит к возникновению и закреплению соматических мутаций в нем. Мутации в гене TP53 в клетках приводят к увеличению риска развития новообразований в соответствующих органах. Так, в легких увеличивается вероятность возникновения мелкоклеточного и немелкоклеточного, в том числе метастатического, рака [183, 240].

ПАУ превращаются в свои активные метаболиты не только под действием цитохромов CYP1A1/1B1. Помимо такого способа образования, называемого диолэпоксидным, они могут синтезироваться в организме человека из исходных ПАУ двумя дополнительными способами: (1) посредством работы цитохромпероксидазы (катионный путь) и (2) посредством работы альдокеторедуктазы (ортохиноновый путь) [123, 185], см. рис. 8. В любом случае активные метаболиты могут взаимодействовать с ДНК, повреждая ее. Это способствует гибели клеток или их неопластическому преобразованию [153, 229].



А



Б

Рисунок 8. А. Метаболизм бенз[а]пирена тремя основными путями метаболизма ПАУ в организме человека [123]. Б. Взаимодействие бенз[а]пирен-7,8-дигидродиол-9,10-эпоксида с гуанином [185].

2.4.2. Влияние на эмбриогенез рыб

Дефекты развития при воздействии ПАУ были впервые отмечены в конце 20-го века у тихоокеанской сельди после разлива Exxon Valdez и включали сердечный отёк, отёк желточного мешка, аномалии формирования позвоночника и деформации головы [147, 148]. Дальнейшие многочисленные исследования установили, что эмбрионы костистых рыб особенно уязвимы к действию нефтяных углеводородов на двух стадиях развития.

Первое окно чувствительности приходится на ранние стадии дробления, когда ПАУ стабилизируют β -катенин. Чрезмерная активация сигнального каскада Wnt/ β -катенин приводит

к выраженным нарушениям развития осевых структур эмбрионов, гибнущих еще до вылупления. Второй чувствительный к действию ПАУ период – этап кардиогенеза. Во время этого этапа сырая нефть и отдельные ПАУ вызывают аномальное развитие сердца, сердечный отёк и аритмию.[51]. При этом токсичность определяется составом тестируемых смесей, причем трициклические ПАУ в значительно большей степени вызывают нарушения развития сердечно-сосудистой системы, чем вещества с би- или тетрациклической структурой молекулы [51]. Токсическое действие трициклических ПАУ на сердце в процессе эмбриогенеза было отмечено у всех исследованных видов костистых рыб, а именно атлантической серебрянки, лососей, тихоокеанской сельди, килифиш, тунцов, морского окуня, камбалы, махи-махи и данио-рерио [13, 42, 51, 66, 69, 124, 127, 132].

Наиболее подробно механизм кардиотоксичности трициклических ПАУ был исследован на данио-рерио. Инкардона и коллеги показали, что флуорен, дибензотиофен и фенантрен вызывают у эмбрионов и мальков зебрафиша тяжёлый перикардальный отёк. Предшествующая перикардальному отеку блокада атриовентрикулярной проводимости доказывают, что перикардальный отек – вторичное нарушение [126]. Кроме того, вторичность перикардального отека была подтверждена с использованием линии *sih* данио-рерио (*silent heart*). У этих генетически модифицированных рыб снижена экспрессия гена *tnnt2* [220], кодирующего сердечную изоформу тропонина Т. Фенотипические проявления включают в себя нарушения формирования саркомеров кардиомиоцитов и отсутствие сердцебиений [86]. Первые этапы кардиогенеза у мутантов проходят нормально (образуется сердечная трубка, зачатки предсердия и желудочка), но вскоре у рыб развивается сильнейший перикардальный отек, и формирование сердца останавливается. Такие же нарушения наблюдаются при использовании на ранних этапах эмбриогенеза данио-рерио морфолиновых олигомеров – они специфически подавляют синтез сердечной изоформы тропонина Т [126]. Таким образом, перикардальному отеку на этапе кардиогенеза в эмбриональном периоде предшествуют нарушения электрической и механической активности формирующегося сердца.

Сходным образом сырая нефть марки Alaska North Slope повлияла на эмбрионы сельди: атрио-вентрикулярная блокада предшествовала развитию фатального перикардального отека [124].

Дальнейшие исследования показали, что сырая нефть нарушает временную динамику экспрессии костных морфогенетических белков *bmp4* и *bmp10* [225], генов миозина (*cmlc2*, *amhc*, *vmhc*) и транскрипционных регуляторов *nkx2.5* и *tbx5* [69], а также генов порообразующих субъединиц каналов - *kcnh2* и *ncx1* [226], что дезорганизует процессы формирования миокарда и закладывает основу долгосрочных модификаций электрофизиологического фенотипа рыб [226]. Альтернативный механизм связан с дизрегуляцией кальциевого гомеостаза, индуцированной

ПАУ, провоцирующей аномалии развития сердца и других органов у личинок. Блокатор кальциевых каналов L-типа никардипин при действии на эмбрионы трески приводил к уменьшению размеров желудочка, полному прекращению желудочковых сокращений и снижению сократительной активности предсердия. Фенантрен вызывал такие же нарушения в работе сердца эмбрионов [227].

Сырая нефть в малых концентрациях может вызывать незначительные аномалии развития эмбрионов и мальков, проявляющиеся в последствии как нарушения толерантности к физическим нагрузкам у рыб во взрослом возрасте [51]. У развивающихся данио-рерио кратковременное воздействие водорастворимой фракции нефти (суммарная концентрация трициклических ПАУ составила $\sim 10-15$ $\mu\text{г/л}$) во время кардиогенеза не вызывает выраженных аномалий развития у взрослых рыб, однако они демонстрируют изменения в морфологии сердца в зрелом возрасте. Так, у взрослых животных наблюдалось истончение стенки желудочка, снижение трабекуляризации миокарда и снижение относительной массы сердца. Выносливость рыб и их аэробная производительность в тесте на критическую скорость плавания снижались [113]. Подобные эксперименты на горбуше, сельди и махи-махи показали, что достаточно кратковременного воздействия ПАУ в малых концентрациях (0,2–10 $\mu\text{г/л}$) на эмбрионы этих рыб для снижения их выносливости на ювенильных стадиях онтогенеза через недели или месяцы после воздействия [125]. В свою очередь, сниженная толерантность к двигательной активности может повлиять на приспособленность организма к окружающей среде через снижение способности к миграциям, добыче пищи или избеганию хищников [204].

2.4.3. Влияние ПАУ на нормальную физиологию взрослых рыб

При исследовании влияния трициклических ПАУ на эмбриогенез рыб было убедительно показано, что в первую очередь эти соединения влияют на электрическую и сократительную активность сердца эмбрионов. Нарушения электрической и сократительной активности, в свою очередь, стимулируют развитие летального перикардального отека. Это наблюдение дало начало новому направлению работ, посвященному влиянию ПАУ и их смесей на ионные токи и конфигурацию ПД рабочих кардиомиоцитов взрослых рыб.

Электрофизиологические исследования, проведенные на изолированных желудочковых кардиомиоцитах тунца обыкновенного (*Thunnus thynnus*) и желтоперого тунца (*Thunnus albacares*) впервые показали, что водорастворимая фракция нефти (ВРФ) подавляет амплитуду быстрого калиевого тока задержанного выпрямления I_{Kr} , обеспечивающего реполяризацию миокарда костистых рыб. Вследствие уменьшения амплитуды этого тока, увеличивалась длительность ПД кардиомиоцитов. Амплитуда кальциевого тока, критически важного для развития сокращения этих клеток, также дозозависимо уменьшалась в присутствии ВРФ [43]. Вслед за этой пионерской работой, опубликованной 14 февраля 2014 года, началось интенсивное

изучение кардиотоксических эффектов отдельных ПАУ на электрофизиологический фенотип сердца различных видов рыб.

О прямом влиянии дициклических ПАУ на электрическую активность сердца рыб известно мало. Так, нафталин в концентрации 5 μM не влияет на кальциевые транзиенты желудочковых кардиомиоцитов скумбрии (*Scomber japonicus*) [44]. В этом же исследовании было показано, что, в отличие от нафталина, фенантрен (трициклический ПАУ, 5 μM) значительно снижает амплитуду кальциевых транзиентов. Кроме того, фенантрен ингибировал кальциевый ток L-типа и быстрый калиевый ток задержанного выпрямления желудочковых кардиомиоцитов тунца обыкновенного (*Thunnus thynnus*), что приводило к значимому увеличению длительности ПД этих клеток [44]. Эта работа определила направление дальнейших исследований – в течение последних 12 лет внимание ученых сосредоточено на определении видоспецифичных токсических эффектов трициклических ПАУ.

В первую очередь исследовали эффекты соединений, наиболее представленного в водорастворимой фракции нефти, фенантрена, и его производного ретена. Параметры ПД желудочковых кардиомиоцитов радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) оказались более устойчивы к действию фенантрена. Так, ретен уже в концентрации 1 μM вызывал статистически значимое увеличение амплитуды ПД и уменьшение его длительности на уровне 50% реполяризации. В то же время фенантрен увеличивал скорость деполяризации и уменьшал длительность ПД, но только в концентрации 10 или 30 μM . Изменения в конфигурации ПД происходили вследствие изменений амплитуды основных ионных токов желудочковых кардиомиоцитов. 1 μM ретена и 10 μM фенантрена увеличивали пиковую амплитуду деполяризующего тока I_{Na} , но снижали амплитуду как кальциевого тока, I_{Ca} , так и быстрого калиевого тока задержанного выпрямления, I_{Kr} [241]. Результаты этого исследования демонстрируют видоспецифичность токсических эффектов отдельных ПАУ, поскольку в предшествующем исследовании на желудочковых кардиомиоцитах тунца обыкновенного [44] фенантрен способствовал увеличению длительности ПД [241].

В следующие годы были исследованы эффекты фенантрена на репертуар ионных токов кардиомиоцитов других видов рыб – кумжи (*Salmo trutta*) [16], данио-рерио (*Danio rerio*) [149], керчака (*Myoxocephalus scorpio*) [78], трески (*Gadus morhua*) [4].

Фенантрен увеличивал длительность ПД желудочковых кардиомиоцитов кумжи и керчака. Этому способствовала значительная чувствительность основного реполяризующего тока желудочковых кардиомиоцитов этих рыб, I_{Kr} , к фенантрено, причем константа полуингибирования этого тока для кумжи и керчака составила 7,2 μM и 1,4 μM соответственно. Деполяризующие токи кардиомиоцитов этих рыб также оказались чувствительны к фенантрено. Так, фенантрен в концентрации 10 μM подавлял более 50% пиковой амплитуды I_{Na}

желудочковых кардиомиоцитов керчака, а 30 μM этого ПАУ снижали I_{Ca} кумжи на 30%.

Однако, в желудочковых кардиомиоцитах данио-рерио фенантрен в концентрации 3 μM уменьшал длительность ПД. Изменение конфигурации ПД определяется относительной чувствительностью I_{Ca} и I_{Kr} к конкретному ПАУ, а также их относительным вкладом в процесс реполяризации до воздействия ПАУ, то есть факторами, зависящими от множества условий и, прежде всего, от видовой принадлежности. В кардиомиоцитах зебрафиша фенантрен укорачивает ПД вследствие преимущественного подавления кальциевого тока ($\text{IC}_{50}=4,6 \mu\text{M}$), несмотря на то, что ток I_{Kr} также был чувствителен к этому ПАУ [149].

Наконец, фенантрен в концентрации 1 μM не оказал влияния на длительность ПД желудочковых кардиомиоцитов трески, несмотря на значимое уменьшение амплитуды I_{Kr} в присутствии этого соединения. Деполяризующие токи, I_{Na} и I_{Ca} , оказались нечувствительны к фенантрено. Следует подчеркнуть, что использованная в данном исследовании концентрация фенантрена была существенно ниже тех, которые тестировали в аналогичных исследованиях на других видах рыб. Это частично может объяснить отсутствие выраженного влияния 1 μM фенантрена на большинство ионных токов кардиомиоцитов трески.

Флуорен – еще одно соединение, прямое влияние которого на ионные токи кардиомиоцитов было изучено. В исследовании с использованием северной наваги (*Eleginus nawaga*) в качестве модельного объекта показано, что флуорен подавляет I_{Na} и I_{Ca} желудочковых кардиомиоцитов, но наиболее чувствительным к нему оказался I_{Kr} . Вследствие этого флуорен в концентрации 3 μM увеличивал длительность ПД [7].

Как было указано в разделе 2.3.1, ионные токи кардиомиоцитов рыб изменяются под влиянием внешних условий, что модифицирует конфигурацию ПД. Влияние параметров внешней среды на чувствительность кардиомиоцитов к воздействию ПАУ было оценено в единственном исследовании. Оказалось, что сочетание повышенной температуры и гиперкалиемии значительно увеличивает чувствительность параметров возбудимости желудочковых кардиомиоцитов северной наваги к 3-метилфенантрено, распространенному метилированному производному фенантрена [11].

Таким образом, влияние отдельных ПАУ на параметры ПД и ионные токи желудочковых кардиомиоцитов рыб оказывается видоспецифичным, зависящим от условий внешней среды и до конца не исследованным.

Трициклические ПАУ нарушают кальциевый гомеостаз и электромеханическое сопряжение в миокарде рыб не только за счет подавления входа Ca^{2+} через потенциалзависимые каналы. Так, добавление рианодина (блокатор рианодиновых рецепторов) и тапсигаргина (блокатора SERCA) нивелирует влияние фенантрена на оборот ионов кальция в кардиомиоцитах активной рыбы, тунца обыкновенного (*Thunnus thynnus*) [44]. Следовательно, фенантрен

нарушает кальциевый гомеостаз в том числе за счет прямого влияния на рианодиновые рецепторы и Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула. Изменения в обороте ионов кальция снижают производительность сердца: даже однократная 24-часовая экспозиция сырой нефти вызывала уменьшение ударного и минутного объёмов у молоди махи-махи (*Coryphaena hippurus*) [191].

Однако, влияние фенантрена на кальциевый оборот может быть видоспецифично. Так, этот трициклический ПАУ дозозависимо стимулировал активность SERCA в желудочке радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), а в концентрации 1 μM не влиял на силу сокращения желудочковых полосок *in vitro* [102]. Флуорен только в наибольшей исследованной концентрации, 10 μM , вызывал небольшое снижение развиваемого внутрижелудочкового давления сердца северной наваги, *Eleginus nawaga* [7].

Кальциевое депо саркоплазматического ретикулула кардиомиоцитов радужной форели не играет значимой роли в электромеханическом сопряжении – для развития сокращения клеткам достаточно ионов кальция, поступающих из окружающей среды через потенциалзависимые каналы. Кажется, что такая особенность характерна для многих видов рыб, за исключением высокоактивных хищников – например, тунцов. Для развития сокращения этим животным необходимы запасы Ca^{2+} саркоплазматического ретикулула [250]. Скорее всего, влияние трициклических ПАУ на кальциевый гомеостаз отдельных кардиомиоцитов и сократительную активность целого сердца определяется преобладающим механизмом электромеханического сопряжения. Если основным источником ионов Ca^{2+} оказывается внешняя среда, то слабое влияние трициклических ПАУ на сократительную активность можно объяснить сопутствующим увеличением длительности ПД. В результате этого кальциевые каналы способны заново открыться, увеличивая количество ионов Ca^{2+} , поступающих в клетку. Это компенсирует ингибирование потенциалзависимых кальциевых каналов ПАУ.

Кроме сердечно-сосудистой системы, нефть и ПАУ способны оказывать прямое воздействие и на другие системы организма рыб. ПАУ индуцируют функциональные нарушения центральной нервной системы: трициклические ПАУ подавляют локомоторную активность у молоди дорады (*Sparus aurata*), а фенантрен нарушает социальное взаимодействие [90], что наряду с воздействием на периферическую нервную систему объясняет снижение эффективности охотничьего поведения [47]. ПАУ также модифицируют сложные формы поведения – способность к обучению, выбор укрытий и реакции избегания хищников [84, 130]. Анализ транскриптома выявил, что ПАУ подавляют экспрессию белков-транспортёров нейромедиаторов (серотонин, норадреналин) и нарушают кальциевую сигнализацию в нейронах, что может нарушать синаптическую пластичность и консолидацию памяти [263]. В периферической нервной системе ПАУ и сырая нефть провоцируют апоптоз клеток сетчатки и редукцию числа

синапсов, снижая экспрессию генов морфогенеза глаза и фототрансдукции [171], что проявляется в виде нарушения оптокинетического рефлекса и уменьшения частоты саккадных движений глаз [172]. ПАУ также нарушают функционирование обонятельного анализатора, ослабляя электрофизиологический ответ обонятельных рецепторов на специфические стимулы [48, 217] при сохранности структурной организации обонятельного эпителия [160].

Эндокринная регуляция также нарушается под воздействием ПАУ. В частности, давно известна способность гидроксилированных метаболитов бенз[а]пирена взаимодействовать с эстрогеновыми рецепторами [112] и модифицировать метаболизм андрогенов и эстрогенов у рыб [56]. Трициклические ПАУ также способны модулировать эндокринную регуляцию. Фенантрен снижает концентрации соматотропного гормона и инсулиноподобного фактора роста 1 у личинок данио-рерио, ингибируя рост организма [260], а также нарушает работу тиреоидной оси, хотя данные о его влиянии на секрецию трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4) противоречивы. Фенантрен также воздействует на гонадотропную ось: у различных видов рыб зарегистрировано снижение секреции эстрогена, тестостерона и вителлогенина у самок, снижение экспрессии генов гонадотропной оси, уменьшение количества формирующейся икры. Более того, эмбрионы, полученные от родительских особей, попавших под действие фенантрена, демонстрируют сниженную выживаемость и повышенную частоту аномалий развития [203, 231].

Таким образом, отдельные ПАУ и их смесь оказывают комплексное токсическое воздействие на организм взрослых рыб [3].

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Модельные организмы и культуры клеток

На первом этапе для оценки влияния водорастворимой фракции нефти и отдельных полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) на электрическую активность сердца позвоночных животных был использован важнейший промысловый вид русской Арктики – северная навага (*Eleginus nawaga*, N=32, масса $123,2 \pm 10,4$ г). Работы с участием рыб в качестве модельных организмов были проведены на территории Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова (Россия, Карельская республика, пос. Приморский) в зимних условиях (февраль-март) или в летних условиях (июль-август) и были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ (Заявка №164-ж, номер заседания Комиссии по биоэтике: 156-д-з). Работа с холоднокровными животными, в том числе эвтаназия (см. п.3.2.1), проводилась согласно Директиве 2010/63/EU, Европейской Конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS № 123) от 15.06.2006, ГОСТ 33215-2014, 33219-2014.

На втором этапе работы для оценки острых эффектов воздействия отдельных ПАУ на электрическую активность сердца млекопитающих использовали мышь домовую (*Mus musculus*, N=23, масса $27,6 \pm 1,3$ г) в качестве модельного организма. Работу с млекопитающими, в том числе эвтаназию (см. п.3.3.1), проводили согласно Директиве 2010/63/EU, Европейской Конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS № 123) от 15.06.2006, ГОСТ 33215-2014, 33216-2014.

Наконец, для оценки потенциального токсического влияния отдельных ПАУ на работу отдельных ионных каналов сердца человека использовали стабильную стандартизированную гетерологическую экспрессионную систему – клеточную культуру СНО-K1, представляющую из себя иммортализованную в 1957 году линию эпителиальных клеток яичника китайского хомячка (*Cricetulus griseus*).

3.2. Регистрация ионных токов в изолированных желудочковых кардиомиоцитах наваги (*Eleginus nawaga*)

3.2.1. Получение изолированных желудочковых кардиомиоцитов рыб

Для регистрации ионных токов и потенциалов действия методом пэтч-кламп предварительно получали суспензию желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*).

Рыбу эвтаназировали ударом тупым предметом по голове и быстрым отделением спинного и головного мозга путем перерезания хирургическими ножницами, согласно Директиве 2010/63/EU и Приложению А к Европейской Конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях. Факт смерти устанавливали по прекращению движений жаберных крышек.

Извлеченное сердце помещали в препаровальную ванночку, заполненную раствором для выделения с пониженным содержанием ионов натрия следующего состава (в ммоль/литр): 100 NaCl, 10 KCl, 1,2 KH_2PO_4 , 4 MgSO_4 , 50 таурин, 20 глюкоза, 10 HEPES, pH 6,9 скорректирован NaOH при комнатной температуре. Сердце канюлировали тупой иглой 22-24G (размер подбирали в соответствии с размером сердца) через луковичку аорты для проведения дальнейшей ретроградной перфузии. В первую очередь проводили перфузию раствором для выделения с пониженным содержанием ионов натрия (состав см. выше) для вымывания крови из камер сердца. Спустя 10-15 минут после закрепления сердца в установке для выделения и начала перфузии заменяли исходный раствор на раствор аналогичного состава, но с добавлением коллагеназы IA (Sigma Aldrich, США; 0,35 мг/мл), трипсина IX (Sigma Aldrich, США; 0,15 мг/мл) и бычьего сывороточного альбумина (Sigma Aldrich, США; 0,35 мг/мл). После 7-10 минут перфузии раствором с содержанием протеолитических ферментов предсердие и желудочек отделяли друг от друга, желудочек разрезали на мелкие фрагменты и пипетировали для высвобождения отдельных кардиомиоцитов в раствор. Полученную суспензию желудочковых кардиомиоцитов рыб хранили в холодильнике при +4°C. Клетки использовали для проведения электрофизиологических экспериментов в течение 8 часов.

3.2.2. Регистрация потенциалов действия и ионных токов желудочковых кардиомиоцитов рыб

Интегральные ионные токи или потенциалы действия регистрировали в отдельных желудочковых кардиомиоцитах методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell в режиме фиксации тока (в случае регистрации потенциалов действия) или фиксации потенциала (в случае регистрации ионных токов). Клетки помещали в экспериментальную камеру объемом 300 мкл, закрепленную на инвертированном микроскопе (Nikon Eclipse Ti-S, Nikon, Япония). Микропипетки подводили к клеткам под контролем микроскопа с помощью гидравлического микроманипулятора Narishige MHW-3 (Narishige, Япония). Пипетки изготавливали с помощью микрокузницы Narishige PC-100 (Narishige, Япония) из тонкостенных бесфиламентных боросиликатных капилляров WPI (США) и заполняли пипеточным раствором необходимого состава, в зависимости от регистрируемого тока или потенциала действия. Сопротивление пипеток составляло 2-3 МΩ. Пэтч-пипетка, подключённая через холдер и головку усилителя, соединялась с усилителем Axopatch 200A (Molecular Devices, CA, США) и медицинским шприцем объемом 1 мл для регулировки давления внутри холдера и пипетки. Контакт большого сопротивления между пэтч-пипеткой и плазматической мембраной клеткой создавался путём приложения отрицательного давления внутрь пипетки. Как только сопротивление контакта достигало 1 ГΩ, мембрану клетки перфорировали с помощью резкого перепада давления в пипетке или электрического импульса, переходя таким образом в конфигурацию whole-cell для

регистрации суммарных ионных токов. После установления режима whole-cell компенсировали ёмкость клетки, ёмкость пипетки и сопротивление контакта, чтобы устранить ёмкостные токи.

Температуру в экспериментальной камере с кардиомиоцитами поддерживали в зависимости от условий эксперимента с помощью термостата Pharmacia LKB MultiTemp II 2219 (Pharmacia, Швеция). При оценке влияния сезонной акклиматизации на чувствительность желудочковых кардиомиоцитов к 3-метилфенантрону температуру устанавливали в диапазоне $7 \pm 0,5^\circ\text{C}$. В прочих экспериментах температуру в камере поддерживали в диапазоне $12 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Для регистрации потенциалов действия и калиевых токов использовали внешний раствор следующего состава (в ммоль/л): 150 NaCl; 3 KCl; 1,2 MgCl₂; 5 HEPES; 1 CaCl₂ pH 7,4 доведенный NaOH при комнатной температуре (24°C) и пипеточный раствор состава (в ммоль/л): 140 KCl, 1 MgCl₂, 5 ЭДТА, 4 MgATP, 0,3 Na₂GTP, 10 HEPES, pH 7,2, доведенный KOH при комнатной температуре (24°C). При регистрации калиевых токов добавляли во внешний раствор дополнительно нифедипин (Sigma Aldrich, США; 20 μM) для подавления потенциалзависимых кальциевых токов.

Потенциалы действия регистрировали после перехода в режим фиксации тока пэтч-клампа. Для оценки изменений в параметрах потенциала действия использовали только клетки с потенциалом покоя более негативным, чем -70 мВ после пятиминутной стабилизации потенциала покоя и параметров потенциала действия. Для индукции потенциала действия кардиомиоциты стимулировали ступенчатым током длительностью 1 мс и амплитудой от 0,4 до 2 нА (амплитуду стимула подбирали эмпирически в зависимости от размеров кардиомиоцита). Частота стимуляции составляла 0,2 Гц.

Для регистрации вольт-амперных характеристик тока I_{K_T} использовали двухступенчатый протокол изменения мембранного потенциала при поддерживаемом потенциале -80 мВ (см. рис.9А). Первая ступень изменения потенциала имела длительность 2 с и варьировалась от -80 мВ до +60 мВ с шагом в 20 мВ. Вторая ступень изменения мембранного потенциала следовала непосредственно за первой и длилась 2 с при мембранном потенциале, поддерживаемом на уровне -20 мВ. Амплитуду тока I_{K_T} оценивали по амплитуде тока, чувствительного к селективному блокатору E-4031 (Toctis Bioscience, Великобритания; 2 μM). Для вычисления IC₅₀ использовали двухступенчатый протокол изменения мембранного потенциала: первая ступень сдвигала мембранный потенциал от -80 мВ до +40 мВ на 2 с, вторая ступень следовала непосредственно за первой и длилась 2 с. Во время второй ступени мембранный потенциал поддерживался на уровне -20 мВ.

Для регистрации тока I_{K1} использовали протокол непрерывного изменения мембранного потенциала при поддерживаемом потенциале -80 мВ от +60 мВ до -120 мВ в течение 1 с (см. рис.9Б). Амплитуду тока I_{K1} оценивали по амплитуде тока, чувствительного к Ba²⁺

(Sigma Aldrich, США; 2 mM).

Для регистрации натриевого тока (I_{Na}) использовали внешний раствор следующего состава (в ммоль/л): 20 NaCl, 120 CsCl, 1 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 10 HEPES, pH 7,7, доведенный CsOH при комнатной температуре (24°C) и пипеточный раствор состава (в ммоль/л): 5 NaCl, 130 CsCl, 1 MgCl₂, 5 ЭДТА, 5 Mg₂АТР, 5 HEPES, pH 7,2, доведенный CsOH при комнатной температуре (24°C). Во внешний раствор был добавлен блокатор потенциалзависимых кальциевых токов, нифедипин (20 μM). Растворы описанного состава позволяли снизить трансмембранный градиент для ионов натрия, что, в свою очередь, уменьшало амплитуду натриевого тока и позволяло убедиться в минимизации сдвига поддерживаемого потенциала, пропорционального произведению сопротивления контакта и изменения силы тока (согласно закона Ома). Также дополнительно компенсировали 60%-70% сопротивления контакта.

Для регистрации тока I_{Na} использовали двухступенчатый протокол изменения мембранного потенциала при поддерживаемом потенциале -120 мВ (см. рис.9В). Подобная величина поддерживаемого потенциала позволила перевести абсолютное большинство потенциалзависимых натриевых каналов в состояние покоя, что необходимо для корректного вычисления параметров потенциалзависимых стационарных активации и инактивации. Первая ступень изменения потенциала имела длительность 300 мс и варьировалась от -120 мВ до +60 мВ с шагом в 10 мВ. Ток первой ступени использовали для определения вольт-амперной характеристики и параметров стационарной активации (см. ниже, п. 3.6). Вторая ступень изменения мембранного потенциала следовала непосредственно за первой и длилась 300 мс при мембранном потенциале, поддерживаемом на уровне -20 мВ. Ток, возникающий на этой ступени изменения потенциала, использовали для вычисления параметров стационарной инактивации (см. ниже, п. 3.6). Для вычисления IC₅₀ использовали одноступенчатый протокол изменения мембранного потенциала от поддерживаемого потенциала (-120 мВ) до -20 мВ, длительность ступеньки составила 200 мс.

Для регистрации кальциевого тока (I_{Ca}) использовали внешний раствор следующего состава (в ммоль/л): 150 NaCl; 3 CsCl; 1,2 MgCl₂; 5 HEPES; 2 CaCl₂ pH 7,4 доведенный NaOH при комнатной температуре (24°C) и пипеточный раствор состава (в ммоль/л): 130 CsCl, 1 MgCl₂, 5 ЭДТА, 15 хлорид тетраэтиламмония, 4 MgАТР, 0.3 Na₂GTP, pH 7,2, доведенный CsOH при комнатной температуре (24°C).

Для регистрации кальциевого тока использовали одноступенчатый протокол изменения мембранного потенциала при поддерживаемом потенциале -40 мВ (см. рис.9Г). Такая величина поддерживаемого потенциала удерживала потенциалзависимые натриевые каналы в состоянии инактивации, что позволило нам устранить натриевый ток без использования тетродотоксина (фармакологического агента, селективного блокатора потенциалзависимых натриевых каналов).

Далее мембранный потенциал сдвигали до значений 0 мВ и поддерживали такую величину мембранного потенциала в течение 250 мс.

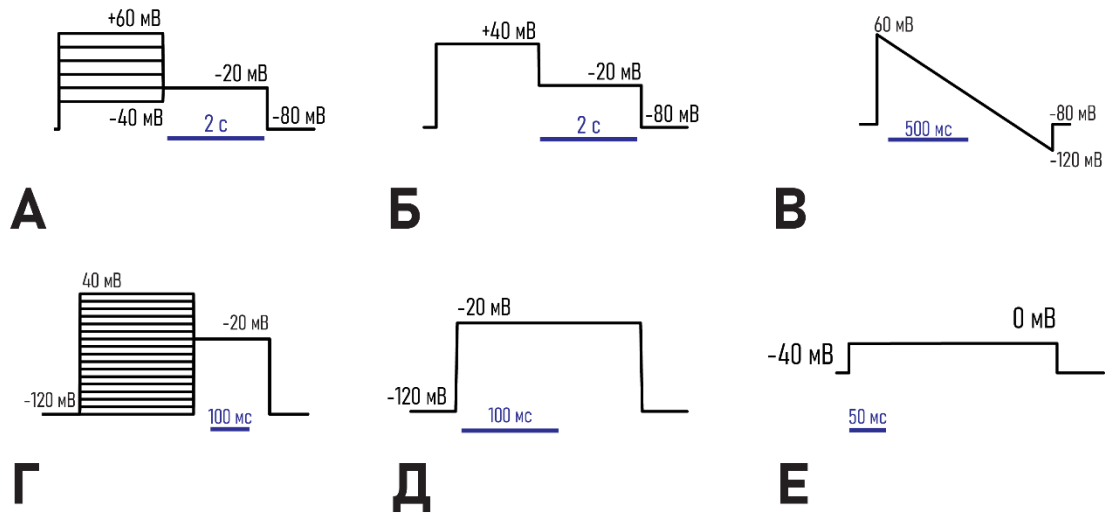


Рисунок 9. Протоколы изменения мембранного потенциала, использованные для регистрации вольт-амперной характеристики I_{K_r} (А) или определения константы полунгибирования (IC_{50}) тока I_{K_r} (Б), для регистрации вольт-амперной характеристики тока I_{K_1} (В), регистрации вольт-амперной характеристики I_{Na} (Г) или определения IC_{50} тока I_{Na} (Д), а также определения характеристик I_{Ca} (Е) в желудочковых кардиомиоцитах рыб методом пэтч-кламп конфигурации whole-cell в режиме фиксации потенциала.

3.3. Регистрация ионных токов в изолированных желудочковых кардиомиоцитах мыши (*Mus musculus*)

3.3.1. Получение изолированных желудочковых кардиомиоцитов мыши

Для регистрации ионных токов методом пэтч-кламп были получены желудочковые кардиомиоциты мыши (*Mus musculus*) посредством энзиматической обработки.

Животных эвтаназировали путем цервикальной дислокации согласно Директиве 2010/63/EU и Европейской Конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS № 123) от 15.06.2006. После эвтаназии вскрывали грудную клетку и извлекали сердце. Извлеченное сердце закрепляли за аорту на аппарате Лангендорфа, не проходя аортальный клапан, для ретроградной перфузии через систему коронарных сосудов. Сначала сердце перфузировали со скоростью 2 мл/мин бескальциевым раствором следующего состава (в ммоль/л): 125 NaCl; 4 KCl; 1,7 NaH_2PO_4 ; 25,2 $NaHCO_3$; 1,1 $MgCl_2$; 5 пируват натрия; 11 глюкоза; 30 таурин; 10 HEPES с добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА) в концентрации 1 мг/мл; pH 7,4 поддерживали с помощью карбогена (95% O_2 + 5 CO_2) при температуре 37°C. Спустя 10-15 минут раствор заменяли на

аналогичный, но с добавлением коллагеназы II (Worthington Biochemical, США; 0,5 мг/мл) и 8 μM CaCl_2 .

Через 35-40 минут перфузию останавливали, ткань желудочков измельчали ножницами и пипетировали, освобождая отдельные кардиомиоциты в раствор Крафтбрюхе состава (в ммоль/л): 3 MgSO_4 ; 30 KCl ; 30 KH_2PO_4 ; 0,5 ЭДТА; 50 глутамат калия; 20 HEPES; 20 таурин; 10 глюкоза; pH 7,2 калиброванный раствором КОН при комнатной температуре (24°C). Клетки хранили в этом растворе при комнатной температуре и использовали для эксперимента в течение 8 часов после окончания процедуры выделения.

3.3.2. Регистрация потенциалов действия и ионных токов желудочковых кардиомиоцитов мыши

Методика пэтч-клампа кардиомиоцитов, выделенных из сердца мыши в общих чертах повторяет методику пэтч-клампа кардиомиоцитов рыб (см. 3.2.2), основные изменения касаются использованных протоколов изменения мембранного потенциала и набора блокаторов потенциалзависимых каналов в связи с различным репертуаром ионных токов, определяющих электрическую активность клеток.

Регистрацию интегральных ионных токов и потенциалов действия проводили в изолированных желудочковых кардиомиоцитах методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell. В режиме фиксации потенциала регистрировали ионные токи, а в режиме фиксации тока – потенциалы действия. Клетки помещали в экспериментальную камеру объёмом 300 $\mu\text{л}$, установленную на столике инвертированного микроскопа (Nikon Eclipse Ti-S, Nikon, Япония; либо Nexscope NIM900, Ningbo Yongxin Optics Co., Китай). Регистрацию электрической активности проводили при комнатной температуре (24°C) поскольку большинство работ по изменению электрической активности кардиомиоцитов мышей при различных воздействиях проводилось при такой температуре, что позволяет нам сравнивать полученные результаты с литературными данными.

Микропипетки подводили к клеткам под визуальным контролем с использованием гидравлического микроманипулятора Narishige MHW-3 (Narishige, Япония) или полуавтоматического микроманипулятора RWD MM-500 (RWD, Китай). Пипетки изготавливали из тонкостенных бесфиламентных боросиликатных капилляров (WPI, США) при помощи микрокузницы Narishige PC-100 (Narishige, Япония). В зависимости от типа регистрируемого сигнала пипетки заполняли раствором соответствующего состава. Сопротивление электродов составляло 2–3 МОм.

Пэтч-пипетка подключалась к усилителю (Axopatch 200A/200B, Molecular Devices, CA, США; или EPC 800USB, HeKa Elektronik, Германия) через холдер и усилительную головку, а также к медицинскому шприцу объёмом 1 мл, использовавшемуся для контроля давления внутри

холдера и пипетки.

Контакт высокого сопротивления между пипеткой и мембраной клетки формировали путём приложения отрицательного давления с помощью медицинского шприца. При достижении сопротивления контакта ~ 1 ГОм осуществляли переход в конфигурацию whole-cell с использованием кратковременного перепада давления или электрического импульса, перфорирующего мембрану под пипеткой. После установления конфигурации whole-cell проводили компенсацию ёмкости клетки, ёмкости пипетки и сопротивления контакта, что позволяло минимизировать артефакты, связанные с ёмкостными токами.

Для регистрации потенциалов действия и калиевых токов использовали внешний раствор следующего состава (в ммоль/л): 150 NaCl; 3 KCl; 1,2 MgCl₂; 5 HEPES; 1 CaCl₂; pH 7,4 доведенный NaOH при комнатной температуре (24°C) и пипеточный раствор состава (в ммоль/л): 140 KCl, 1 MgCl₂, 5 ЭДТА, 4 MgATP, 0,3 Na₂GTP, 10 HEPES pH 7.2, доведенный KOH при комнатной температуре (24°C). При регистрации калиевых токов добавляли во внешний раствор дополнительно нифедипин (Sigma Aldrich, США; 20 μ M) для подавления потенциалзависимых кальциевых токов.

Потенциалы действия регистрировали после перехода в режим фиксации тока пэтч-клампа. Для оценки изменений в параметрах потенциала действия использовали только клетки с потенциалом покоя более негативным, чем -70 мВ после пятиминутной стабилизации потенциала покоя и параметров потенциала действия. Для возбуждения потенциала действия кардиомиоциты стимулировали ступенчатым током длительностью 1 мс и амплитудой от 0,5 до 3 нА (амплитуду стимула подбирали эмпирически в зависимости от размеров кардиомиоцита). Частота стимуляции составляла 0,5 Гц.

Для регистрации тока I_{Kur} использовали двухступенчатый протокол изменения мембранного потенциала при поддерживаемом потенциале -80 мВ (см. рис.10А). Первая ступень изменения потенциала имела длительность 200 мс при мембранном потенциале, равном -40 мВ. Эта ступенька позволяла инактивировать токи, обладающие быстрой кинетикой инактивации – I_{Na} и I_{to} . Вторая ступень изменения мембранного потенциала следовала непосредственно за первой и длилась 700 мс при мембранном потенциале, поддерживаемом на уровне +40 мВ. Максимальную амплитуду тока I_{Kur} оценивали как амплитуду тока, чувствительного к 100 μ M 4-аминопиридина (Santa Cruz Biotechnology, США), который добавляли в конце каждой экспериментальной записи.

Для регистрации тока I_{to} использовали одноступенчатый протокол изменения мембранного потенциала при поддерживаемом потенциале -80 мВ (см. рис.10А). Записи проводили на фоне 100 μ M 4-аминопиридина для блокады тока I_{Kur} . Ступенька изменения потенциала длилась 500 мс при поддерживаемом потенциале +40 мВ. Максимальную амплитуду

тока определяли как амплитуду тока, чувствительного к 3 мМ 4-аминопиридина (Santa Cruz Biotechnology, США) – его добавляли в конце каждого эксперимента.

Для регистрации тока I_{K1} использовали протокол непрерывного изменения мембранного потенциала при поддерживаемом потенциале -80 мВ от +60 мВ до -120 мВ в течение 1 с (см.рис.10Б). Амплитуду тока I_{K1} оценивали по амплитуде тока, чувствительного к Ba^{2+} (Sigma Aldrich, США; 2 мМ).

Для регистрации натриевого тока (I_{Na}) использовали внешний раствор следующего состава (в ммоль/л): 120 Трис-Cl; 20 NaCl, 5,4 CsCl, 1,2 $MgCl_2$, 1,8 $CaCl_2$, 5 HEPES, pH 7,4, доведенный NaOH при комнатной температуре (24°C) и пипеточный раствор состава (в ммоль/л): 10 NaCl, 130 CsCl, 1 $MgCl_2$, 5 ЭДТА, 5 Mg_2ATP , 5 HEPES, pH 7,2, доведенный CsOH при комнатной температуре (24°C). Во внешний раствор был добавлен блокатор потенциалзависимых кальциевых токов, нифедипин (20 μM).

Для регистрации тока I_{Na} использовали двухступенчатый протокол изменения мембранного потенциала при поддерживаемом потенциале -120 мВ (см. рис.10В). Первая ступень изменения потенциала имела длительность 500 мс и варьировалась от -120 мВ до +60 мВ с шагом в 10 мВ. Вторая ступень изменения мембранного потенциала следовала непосредственно за первой и длилась 50 мс при мембранном потенциале, поддерживаемом на уровне -30 мВ. Для вычисления IC_{50} использовали одноступенчатый протокол изменения мембранного потенциала от поддерживаемого потенциала (-120 мВ) до -30 мВ, длительность ступеньки составила 40 мс.

Для регистрации кальциевого тока (I_{Ca}) использовали внешний раствор следующего состава (в ммоль/л): 150 NaCl; 3 CsCl; 1,2 $MgCl_2$; 5 HEPES; pH 7,4 доведенный NaOH при комнатной температуре (24°C) и пипеточный раствор состава (в ммоль/л): 130 CsCl, 1 $MgCl_2$, 5 ЭДТА, 15 хлорид тетраэтиламмония, 4 $MgATP$, 0,3 Na_2GTP , pH 7,2, доведенный CsOH при комнатной температуре (24°C).

Для регистрации кальциевого тока использовали двухступенчатый протокол изменения мембранного потенциала при поддерживаемом потенциале -80 мВ (см. рис.10Г). Первая ступень изменения мембранного потенциала длилась 100 мс, а значение потенциала равнялось -40 мВ. Эта ступень необходима для инактивации I_{Na} . Далее мембранный потенциал сдвигали до значений 0 мВ и поддерживали такую величину мембранного потенциала в течение 300 мс.

Для регистрации бариевого тока через потенциалзависимые кальциевые каналы использовали такие же растворы, как и для кальциевого тока (см. выше), но заменяли $CaCl_2$ в составе на эквимольное количество $BaCl_2$. Протокол для регистрации бариевого тока оставался таким же, как и для кальциевого, но с увеличенной до 5 с длительностью второй ступени изменения мембранного потенциала от -40 мВ до 0 мВ, поскольку скорость инактивации бариевого тока оказывалась значительно меньше, чем скорость инактивации I_{Ca} .

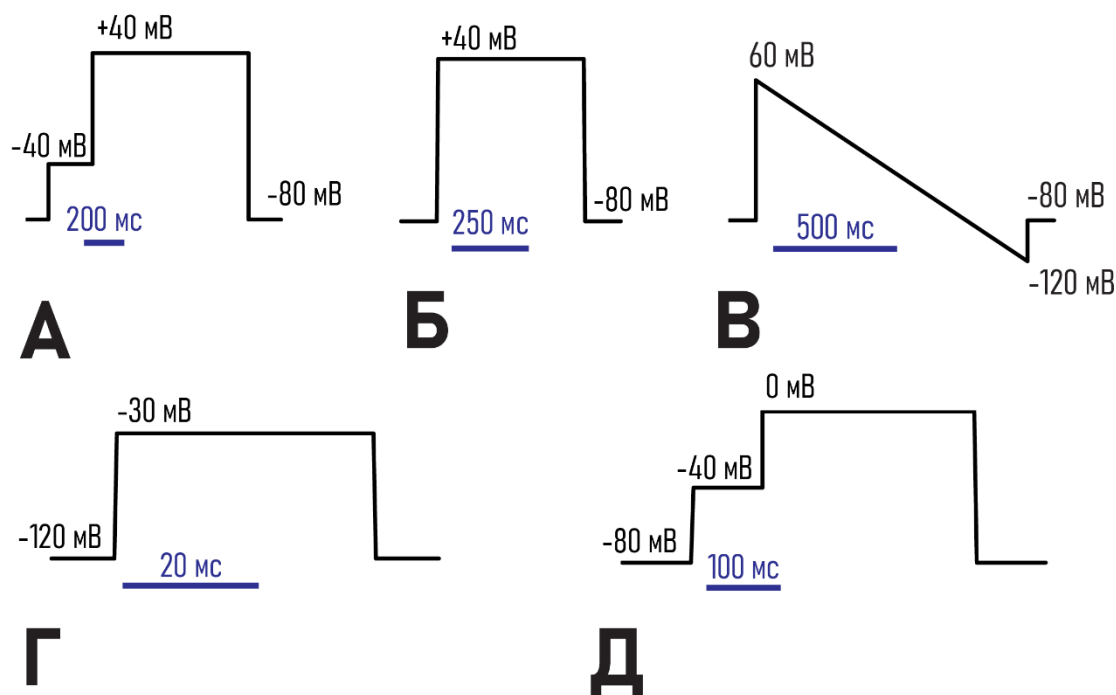


Рисунок 10. Протоколы изменения мембранного потенциала, использованные для определения константы полуингибирования I_{Kur} (А), определения константы полуингибирования тока I_{to} (Б), для регистрации вольт-амперной характеристики тока I_{K1} (В), определения константы полуингибирования тока I_{Na} (Г), а также определения характеристик I_{Ca} (Д) в желудочковых кардиомиоцитах мыши методом пэтч-кламп конфигурации whole-cell в режиме фиксации потенциала.

3.4. Регистрация токов, переносимых α -субъединицами каналов Nav1.5 (I_{hSCN5A}) и Kv11.1 (I_{hERG}), в гетерологической экспрессионной системе CHO-K1

3.4.1. Ведение культуры клеток CHO-K1 и процедура трансфекции

Гетерологическую экспрессионную систему клеток яичника китайского хомячка (CHO-K1) содержали в инкубаторе (37°C, 5% CO₂, Sanyo MCO-15AC, SANYO Electric Co, Япония) в среде DMEM-F12 (ThermoFisher Scientific, США) с добавлением стерильной бычьей сыворотки (FBS, ThermoFisher Scientific, США), глутамина (L-Glutamine, ThermoFisher Scientific, США; ПанЭко) и смеси пенициллина и стрептомицина вплоть до процедуры трансфекции. Рассадку клеток с целью поддержания их жизнеспособности проводили раз в 3-4 дня. Все манипуляции с клеточными культурами, исключая регистрацию токов методом пэтч-кламп, проводили в стерильных условиях ламинарной системы (БМБ-II «Ламинар-С», LAMSYSTEMS, Россия).

Клетки трансфицировали вектором pSI со встроенным геном *KCNH2*, кодирующим белок Kv11.1 (канал human ether-a-go-go, hERG), и вектором pcDNA3.1 со встроенным геном *SCN5A*,

кодирующим белок Nav1.5. Эти белки переносят у человека основной реполярирующий ток, I_{Kr} , и основной деполярирующий ток, I_{Na} , соответственно. Плазмиды были любезно предоставлены Алексеем Валерьевичем Карпушевым и Григорием Сергеевичем Глуховым. Кроме того, для определения успешно трансфицированных клеток был использован вектор pMAX со встроенным геном зеленого флуоресцентного белка, GFP (любезно предоставлена Григорием Сергеевичем Глуховым). Карты плазмид представлены на рис.11.

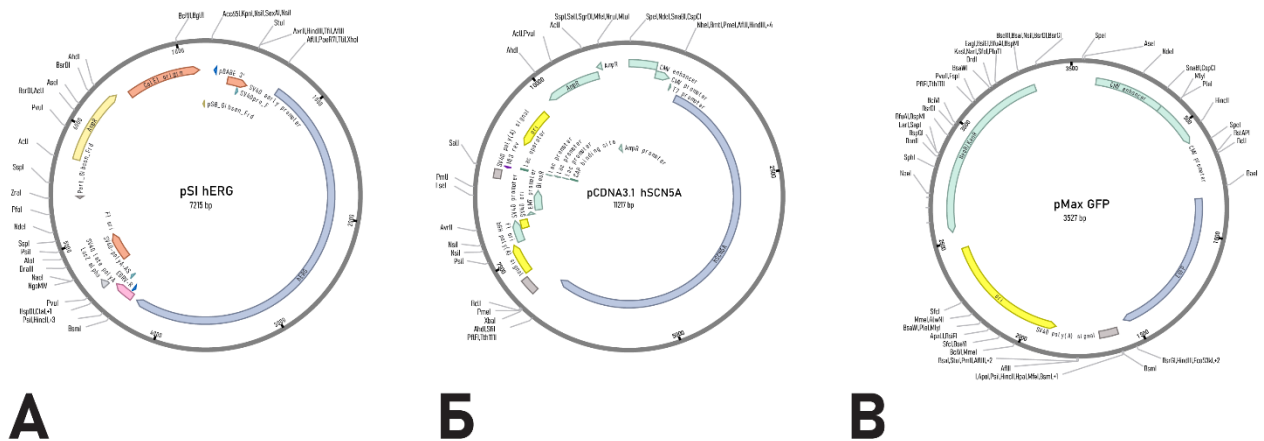


Рисунок 11. Карты векторов, которыми трансфицировали клетки гетерологической экспрессионной системы CHO-K1. (А) Карта вектора pSI со встроенным геном *KCNH2*, кодирующем белок канала hERG ($K_v11.1$); (Б) карта вектора pCDNA3.1 со встроенным геном *SCN5A*, кодирующем белок Nav1.5; (В) карта вектора pMAX со встроенным геном *egfp*, кодирующем зеленый флуоресцентный белок, GFP.

Процедуру трансфекции проводили с помощью реагента липофектамин 3000 (ThermoFisher Scientific, США) согласно заводской инструкции. В одной пробирке к 50 μ л бессывороточной среды DMEM-F12 добавляли 1,5 μ л липофектамина 3000; в другой пробирке к 50 μ л бессывороточной среды добавляли 1,5 μ л реагента 3000, а также 1000 нг одного из векторов, содержащего ген потенциалзависимого канала, и 100 нг вектора pMAX с геном GFP. После пятиминутной инкубации содержимое пробирок смешивали и спустя 1,5 часа добавляли к культуре клеток. На следующий день проводили замену среды для удаления токсичных продуктов.

3.4.2. Регистрация токов I_{hSCN5A} и I_{hERG}

Через 48 часов после проведения процедуры трансфекции регистрировали токи в гетерологической экспрессионной системе. Успешно трансфицированные клетки приобретали способность к флуоресценции зеленым цветом при освещении светом длиной волны 490 нм.

Интегральный ток через мембрану успешно трансфицированной клетки регистрировали

методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell в режиме фиксации потенциала. В общих чертах методика пэтч-клампа клеток гетерологической экспрессионной системы CHO-K1 повторяет методы проведения пэтч-клампа для кардиомиоцитов (см. п.3.2.2 и п.3.3.3), но отличается составом растворов для регистрации токов и использованными протоколами изменения мембранных потенциалов.

Для регистрации тока через каналы $K_{v11.1}$, (или $hERG$; I_{hERG}) использовали внешний раствор следующего состава (в ммоль/л): 150 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 $MgCl_2$; 5 HEPES, 1 $CaCl_2$ pH 7,3, доведенный NaOH при комнатной температуре (24°C) и пипеточный раствор состава (в ммоль/л): 140 KCl; 1 $MgCl_2$; 5 ЭДТА; 10 HEPES; 4 MgATP; 0.03 Na_2GTP ; pH 7,2, доведенный KOH при комнатной температуре (24°C).

Для определения вольт-амперных характеристик I_{hERG} и их изменения под влиянием ПАУ использовали двухступенчатый протокол с длительностью ступенек, равной 3 с, при поддерживаемом потенциале -80 мВ. Амплитуду первой ступени изменяли от -60 мВ до +60 мВ с шагом в 10 мВ. Амплитуда второй ступени при этом оставалась неизменной на уровне -40 мВ (см. рис.12А). Для определения константы полуингибирования также использовали двухступенчатый протокол с длительностью ступенек 3 с при поддерживаемом потенциале -80 мВ. При этом амплитуда первой и второй ступени была неизменной, 0 мВ и -40 мВ, соответственно (см. рис.12Б).

В данной серии экспериментов также исследовали изменения параметров активации, инактивации и деактивации каналов $K_{v11.1}$ под влиянием ПАУ. С помощью двухступенчатого протокола с изменяющейся длительностью первой, деполяризующей ступени, определяли количество каналов, способных перейти в состояние активации за заданное время. Для этого деполяризовали мембрану до +30 мВ при поддерживаемом потенциале -80 мВ, длительность этой ступени варьировалась от 5 до 1005 мс с шагом 50 мс. Далее значение мембранного потенциала изменяли до -100 мВ (см. рис.12В).

Для определения параметров потенциалзависимой инактивации использовали трехступенчатый протокол – при поддерживаемом потенциале -80 мВ деполяризовали мембрану до +40 мВ и поддерживали такое значение мембранного потенциала на протяжении 100 мс. Далее гиперполяризовали мембрану с помощью кратковременного изменения мембранного потенциала от +40 мВ до -130 мВ с шагом в 10 мВ. После этой кратковременной гиперполяризации возвращали значение мембранного потенциала до +40 мВ (см. рис.12Г).

Наконец, для определения постоянной времени деактивации I_{hERG} использовали двухступенчатый протокол, при длительности ступенек, равной 2 с и величиной поддерживаемого потенциала -80 мВ. С помощью первой ступени деполяризовали мембрану до +20 мВ, далее мембрану гиперполяризовали до -120 мВ (см. рис.12Д).

Для регистрации тока через каналы $\text{Na}_v1.5$ (I_{hSCN5A}) использовали внешний раствор следующего состава (в ммоль/л): 20 NaCl; 120 CsCl; 1 MgCl_2 ; 0,5 CaCl_2 ; 10 HEPES, pH 7,4, доведенный CsOH при комнатной температуре, и пипеточный раствор (в ммоль/л): 5 NaCl; 130 CsCl, 1 MgCl_2 ; 5 ЭДТА; 5 MgATP; 5 HEPES; pH 7,2 доведен CsOH при комнатной температуре (24°C).

Для определения вольт-амперных характеристик, а также параметров активации и инактивации I_{Na} использовали двухступенчатый протокол при поддерживаемом потенциале -120 мВ, длительность первой ступени составила 400 мс, длительность второй – 200 мс. Амплитуду первой ступени изменяли от -100 мВ до +60 мВ с шагом в 10 мВ (см. рис.12Е).

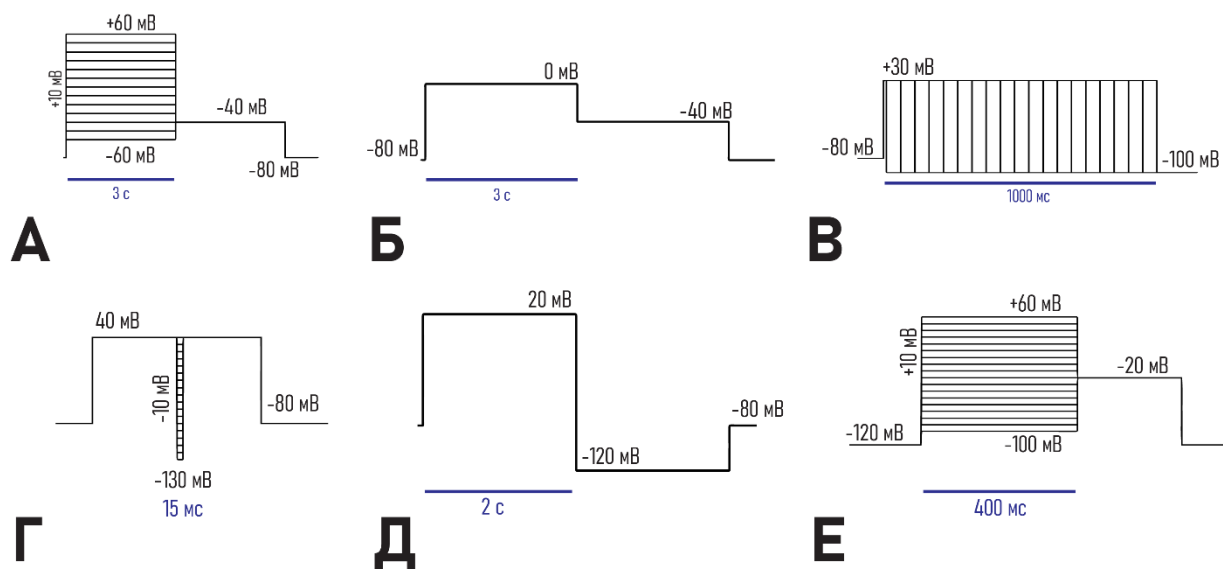


Рисунок 12. Протоколы изменения мембранного потенциала для определения вольт-амперной характеристики тока I_{hERG} (А), константы полуингибирования тока I_{hERG} (Б), времени активации 50% каналов, переносящих I_{hERG} , при деполяризации мембраны (В), потенциал-зависимой инактивации I_{hERG} (Г), временной константы деактивации тока I_{hERG} (Д) и вольт-амперной характеристики и потенциал-зависимых активации и инактивации тока I_{hSCN5A} (Е), использованные при работе с клеточными культурами CHO-K1.

3.5. Аппликация водорастворимой фракции нефти и полициклических ароматических углеводородов

3.5.1. Получение водорастворимой фракции нефти и стоковых растворов полициклических ароматических углеводородов

Водорастворимую фракцию нефти готовили ежедневно. Для этого добавляли сырую необработанную нефть марки Urals в раствор для записи токов в расчете 1 г нефти на 1 л раствора. В течение минуты раствор нефти тщательно перемешивали блендером для создания взвеси

мелких капель нефти. После этого раствор помещали в разделительную воронку на 1 час, далее сливали и использовали нижнюю фракцию, составляющую примерно 50% объема начального раствора.

Стоковые растворы фенантрена (Sigma Aldrich, США) и 3-метилфенантрена (Aladdin, Китай) готовили через день в концентрации 10^{-2} моль/л на основе ДМСО. Растворы хранили в недоступном для света месте.

3.5.2. Исследование влияния острой аппликации водорастворимой фракции нефти или полициклических ароматических углеводов

Для исследования влияния острой аппликации водорастворимой фракции нефти после контрольных записей потенциала действия или какого-либо тока добавляли соответствующий объем водорастворимой фракции нефти для получения растворов 0,1%, 1%, или 10% концентрации. Спустя 5-10 минут постоянной перфузии раствором с добавлением водорастворимой фракции нефти проводили повторные записи потенциалов действия или токов.

Для исследования влияния острой аппликации фенантрена или 3-метилфенантрена после проведения контрольных записей потенциала действия или какого-либо тока добавляли соответствующий объем стокового раствора концентрацией 10^{-2} М для получения растворов концентрацией 3 нМ, 10 нМ, 30 нМ, 100 нМ, 300 нМ, 1 мМ, 3 мМ, 10 мМ или 30 мМ. Спустя 5-10 минут постоянной перфузии раствором с ПАУ проводили повторные записи потенциалов действия или токов.

Наши предыдущие исследования влияния острого воздействия фенантрена [264] показали, что использование условий слабой освещенности и узких трубок из полиэфиркетона (инертного материала) позволяет поддерживать заданную экспозиционную концентрацию ПАУ в регистрационной камере. В работе применялись концентрации до 30 мМ, что обеспечивает оптимальный баланс между пределом растворимости ПАУ в физиологическом растворе и его потенциально повышенной концентрацией в тканях. Во всех экспериментах максимальное содержание ДМСО во внеклеточном растворе не превышало 1:1000.

3.6. Используемые в работе вещества и растворы

В ходе работы были использованы следующие реактивы (см. табл.6).

Таблица 6. Используемые для работы реактивы.

Реактив	Компания-производитель	Используемые концентрации	Описание действия
Реагенты для приготовления растворов для выделения и записи ионных токов			
NaCl	Helicon	5 мМ, 10 мМ, 20 мМ,	-

Реактив	Компания-производитель	Использованные концентрации	Описание действия
		100 мМ, 125 мМ, 150 мМ	
KCl	ЛабТех	3 мМ, 4 мМ, 5,4 мМ, 10 мМ, 30 мМ, 140 мМ	-
MgCl ₂	Acros Organics	1 мМ, 1,1 мМ, 1,2 мМ	-
CaCl ₂	Acros Organics	0,5 мМ, 1 мМ, 1,8 мМ, 2 мМ	-
KH ₂ PO ₄	ХимМед	1,2 мМ, 30 мМ	-
NaH ₂ PO ₄	ХимМед	1,7 мМ	-
MgSO ₄	Sigma Aldrich	3 мМ, 4 мМ	-
NaHCO ₃	ЛабТех	25,2 мМ	-
NaOH	ЛабТех	Доведение до нужного значения pH под контролем pH-метра	-
KOH	Ленреактив	Доведение до нужного значения pH под контролем pH-метра	-
CsOH	Sigma Aldrich	Доведение до нужного значения pH под контролем pH-метра	-
MgATP	Sigma Aldrich	4 мМ	-
Na ₂ GTP	Sigma Aldrich	0,3 мМ	-
Пируват натрия	Panreack AppliChem	5 мМ	-
Глутамат калия	Sigma Aldrich	50 мМ	-
Трис-Cl	ПанЭко	120 мМ	-
Таурин	Sigma Aldrich	20 мМ, 30 мМ, 50 мМ	-
Глюкоза	ХимМед	11 мМ, 20 мМ	-
4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтан-сульфоная кислота (HEPES)	Sigma Aldrich	5 мМ, 10 мМ, 20 мМ	-
Бычий сывороточный	Sigma Aldrich	0,35 мг/мл, 1 мг/мл	-

Реактив	Компания-производитель	Использованные концентрации	Описание действия
альбумин			
Этилендиамин-тетрауксусная кислота	Sigma Aldrich	0,5 мМ, 5 мМ	-
Коллагеназа IA	Sigma Aldrich	0,35 мг/мл	Фермент, разрушающий преимущественно коллагены
Коллагеназа II	Worthington Biochemical	0,5 мг/мл	Фермент, разрушающий преимущественно коллагены
Трипсин IX	Sigma Aldrich	0,15 мг/мл	Фермент, разрушающий преимущественно коллагены
Использованные блокаторы ионных токов			
Тетраэтил-аммония хлорид	Merck Millipore	15 мМ	Блокатор калиевых токов
Тетродотоксин	Sigma Aldrich	1 μ М при работе с кардиомиоцитами рыб	Блокатор быстрого натриевого тока
Нифедипин	Sigma Aldrich	20 μ М	Блокатор кальциевых токов
4-аминопиридин	Santa Cruz Biotechnology	100 μ М для блокады I_{Kur} 3 мМ для блокады I_{to}	Блокатор быстрых калиевых токов (I_{to} , I_{Kur})
E-4031	Tocris Bioscience	2 μ М	Блокатор I_{Kr}
BaCl ₂	Sigma Aldrich	2 мМ	Блокатор I_{K1}
CsCl	Sigma Aldrich	3 мМ, 5,4 мМ, 120 мМ, 130 мМ	Неселективный блокатор калиевых токов
Реагенты для работы с клеточными культурами			
DMEM-F12	ThermoFisher Scientific	-	-

Реактив	Компания-производитель	Использованные концентрации	Описание действия
FBS	ThermoFisher Scientific	-	-
Фосфатно-солевой буфер (PBS)	ThermoFisher Scientific	-	-
L-глутамин	ThermoFisher Scientific ПанЭко	200 мМ	-
Трипсин-ЭДТА	ThermoFisher Scientific	-	Раствор фермента, способствующего снижению адгезии клеток к пластику
Пенициллин-стрептомицин	ПанЭко	Пеницилина 5000 Ед/мл Стрептомицина 5000 µг/мл	Набор антибиотиков
Липофектамин 3000 и реагент 3000	ThermoFisher Scientific	Согласно протоколу производителя	Липофильный агент для проведения трансфекции
Исследуемые вещества			
Водорастворимая фракция нефти	Urals	0,1%, 1%, 10%	-
3-метилфенантрен	Aladdin	3 нМ, 10 нМ, 30 нМ, 100 нМ, 300 нМ, 1 µМ, 3 µМ, 10 µМ, 30 µМ	-
Фенантрен	Sigma Aldrich	1 µМ, 3 µМ, 10 µМ, 30 µМ	-

3.7. Анализ ионных токов и потенциалов действия, зарегистрированных методом пЭТЧ-кламп

Регистрацию ионных токов и потенциалов действия производили с помощью программы WinWCP v.5.7.7 (University of Strathclyde, Великобритания), дальнейший анализ проводили с использованием программы ClampFit v.11.3 (Molecular Devices, США).

Для потенциалов действия вычисляли следующие параметры в контрольных условиях и в

присутствии исследуемых веществ: амплитуду потенциала действия, максимальную скорость деполяризации, длительность потенциала действия на уровне 50% реполяризации, длительность потенциала действия на уровне 90% реполяризации (для кардиомиоцитов рыб), длительность потенциала действия на уровне 80% реполяризации (для кардиомиоцитов мыши), а также уровень потенциала покоя.

За амплитуду токов с выраженной инактивацией (быстрый натриевый ток, кальциевый ток, бариевый ток, транзиторный калиевый ток, ультрабыстрый калиевый ток) принимали разницу между максимальной амплитудой тока в начале ступени изменения мембранного потенциала и амплитудой тока в конце этой ступени, после полной инактивации каналов. Амплитуду токов с медленной или невыраженной инактивацией (быстрый калиевый ток, калиевый ток входящего выпрямления) оценивали после вычитания токов утечки в присутствии селективных блокаторов.

Для оценки влияния ВРФ нефти или отдельных ПАУ проводили в том числе и процедуру нормирования на величину тока в контрольных условиях. Тогда амплитуду тока, измеренную в присутствии исследуемого соединения или смеси, делили на амплитуду тока, измеренную в контрольных условиях. Полученные значения выражали в долях от единицы или процентном эквиваленте.

Константу полуингибирования получали из формулы

$$Y = \frac{1}{1 + \frac{X}{IC50}}$$

где Y – нормализованная на значения в контрольных условиях амплитуда тока; X – концентрация исследуемого вещества; IC50 – концентрация соединения, при которой 50% каналов оказываются заблокированы.

Поскольку у крупных клеток площадь мембраны больше, и, соответственно, больше функциональных каналов, способных переносить ток, то и абсолютная величина суммарного тока через мембрану таких клеток больше. Процедура нормировки позволяет объединять в одну выборку клетки различного размера. Поэтому для исследования изменений в вольт-амперных характеристиках токов под влиянием нефти и ее компонентов использовали процедуру нормировки амплитуды токов на емкость мембраны, компенсированной усилителем. В результате получали значения плотности тока (пА/пФ) при различных мембранных потенциалах.

Кинетику стационарной активации вычисляли путем вписывания в уравнение Больцмана отношения тока при заданном потенциале к максимальной амплитуде тока. Уравнение Больцмана имеет следующий вид:

$$Y = \frac{1}{1 + \frac{e^{V-V_{50}}}{S}}$$

где Y – нормированная на максимальные значения амплитуда тока ($I/I_{\max}$); V – значение мембранного потенциала; V_{50} – значение мембранного потенциала, при котором 50% каналов находятся в состоянии инактивации; S – наклон кривой.

Кинетику стационарной активации определяли также путем вписывания в уравнение Больцмана (см. выше). При этом в качестве величины « Y » выступала не нормированная на максимальные значения амплитуда тока, а нормированная на максимальные значения проводимость ($G/G_{\max}$). Проводимость определяли из уравнения

$$G_x = \frac{I_x}{V - V_{rev}}$$

Где I_x – значения амплитуды тока « x » при мембранном потенциале V , V_{rev} – значение мембранного потенциала, при котором изменяется направление тока.

Кинетику инактивации (кальциевые и бариевые токи) или деактивации (ток, переносимый субъединицей $K_v11.1$ в гетерологической экспрессионной системе СНО-K1) токов оценивали, выражая зависимость уменьшения амплитуды тока со временем в виде одно- или двухэкспоненциальной функции Чебышева, представленной в виде инструмента ПО ClampFit 11.3.

Для токов, переносимых субъединицей $K_v11.1$ в гетерологической экспрессионной системе СНО-K1, вычисляли время, за которое 50 % каналов на мембране клеток при их деполяризации способны перейти в состояние активации (T_{50}). Вычисление проводили с помощью уравнения: $I = 1 - e^{-K \cdot X}$, где I – ток I_{HERG} при изменении потенциала от +30 до -100 мВ (нормированный на максимальное значение), зависимый от времени длительности деполяризующей ступеньки (X , мс). T_{50} вычисляется как $1/K$.

3.8. Статистическая обработка данных

Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего для n клеток, если специально не указано иное. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software Inc., США).

Наличие выбросов определяли с помощью метода ROUT (Robust Outlier Test; FDR (False Discovery Rate)=1%). Нормальность распределения данных определяли с помощью теста Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок использовали t -тест Стьюдента или его непараметрический аналог для несвязанных или связанных выборок. Для сравнения трех и более выборок использовали тест Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна, а если выборки были связаны, использовали тест Фридмана для связанных выборок с апостериорным тестом Данна. При сравнении вольт-амперных характеристик использовали двухфакторный

дисперсионный анализ для повторных измерений (RM-ANOVA) с апостериорным тестом Сидака. При сравнении параметров стационарной активации или инактивации, IC50 и T50 использовали точный тест Фишера.

Использованные в каждом конкретном случае статистические тесты приведены в подписях к рисункам в разделе «Результаты».

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Влияние водорастворимой фракции нефти на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов наваги

В первую очередь мы исследовали влияние водорастворимой фракции нефти (ВРФ) различной концентрации на параметры потенциала действия (ПД), зарегистрированного методом фиксации тока в желудочковых кардиомиоцитах, полученных путем энзиматической обработки. Все измерения проводили при поддерживаемой температуре $12 \pm 0,5^\circ\text{C}$ у животных, акклиматизированных к летним условиям.

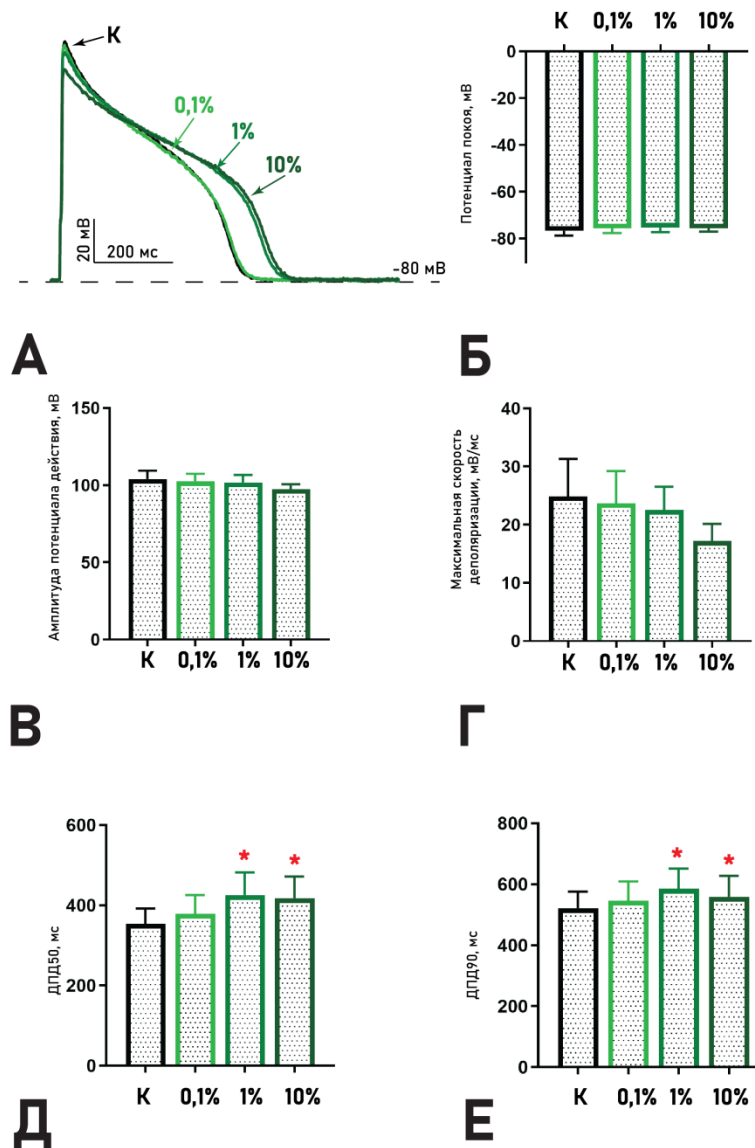


Рисунок 13. Влияние водорастворимой фракции нефти (ВРФ) на параметры потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи ПД в контрольных условиях (К) и в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ. (Б) Значения потенциала покоя в контрольных условиях и в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ. (В) Амплитуда

ПД в контрольных условиях и в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ. (Г) Максимальная скорость деполяризации ПД в контрольных условиях и в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ. (Д) Длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50) в контрольных условиях и в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ. (Е) Длительность ПД на уровне 90% реполяризации (ДПД90) в контрольных условиях и в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ. * - $p < 0,05$ при проведении однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=7$ желудочковых кардиомиоцитов, полученных путем энзиматической обработки из $N=3$ рыб.

ВРФ в концентрации 0,1% не вызвала статистически значимых изменений ни одного из исследуемых параметров ПД (см. рис.13). 1% ВРФ вызывал статистически значимое увеличение длительности ПД на уровне 50% (ДПД50) и 90% (ДПД90) реполяризации от $353,9 \pm 37,8$ мс до $425,2 \pm 56,4$ мс и от $521,7 \pm 54,1$ мс до $584,8 \pm 67,1$ мс соответственно ($n=7$, см. рис.13Д, Е). 10% ВРФ оказывал сходные эффекты – он вызывал статистически значимое увеличение ДПД50 и ДПД90 (от $353,9 \pm 37,8$ мс до $417,4 \pm 54,5$ мс и от $521,7 \pm 54,1$ мс до $559,2 \pm 68,2$ мс соответственно; $n=7$, см. рис.13Д, Е). Прочие параметры ПД (амплитуда, максимальная скорость деполяризации и потенциал покоя) не изменялись под действием всех исследуемых концентраций ВРФ (см. рис.13). Таким образом, основные эффекты ВРФ на ПД оказались связаны с изменением его длительности.

В соответствии с этими результатами наиболее чувствительным к воздействию ВРФ оказался основной реполяризирующий ток желудочковых кардиомиоцитов рыб, I_{Kr} . Константа полуингибирования (IC_{50}) для этого тока составила $3,15 \pm 0,48\%$ (см. рис.14). Стабилизирующий ток желудочковых кардиомиоцитов, I_{K1} , оказался нечувствительным к воздействию максимальных исследованных концентраций ВРФ – даже 10% ВРФ не оказала влияния на входящую и выходящую компоненты этого тока (см. рис.15).

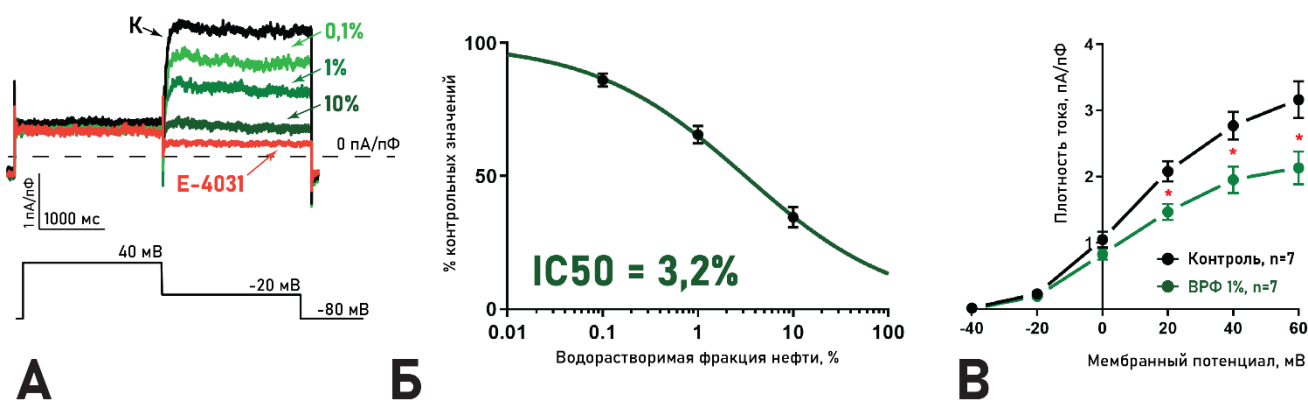


Рисунок 14. Влияние водорастворимой фракции нети (ВРФ) на параметры тока I_{Kr}

желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи тока I_{K_r} в контрольных условиях и в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ, а также при добавлении селективного блокатора, E-4031 (2 μ M). Врезка внизу показывает соответствующий протокол изменения мембранного потенциала. (Б) Величина хвостового тока I_{K_r} при деполяризации до +40 мВ в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифра на врезке слева показывает значение параметра IC50. (В) Вольт-амперные характеристики хвостового тока I_{K_r} в контрольных условиях и в присутствии 1% ВРФ. Данные представлены для n=5-8 желудочковых кардиомиоцитов (N=4). * - $p < 0,05$ при проведении двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Сидака. Все данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для n=5-9 желудочковых кардиомиоцитов (N=5).

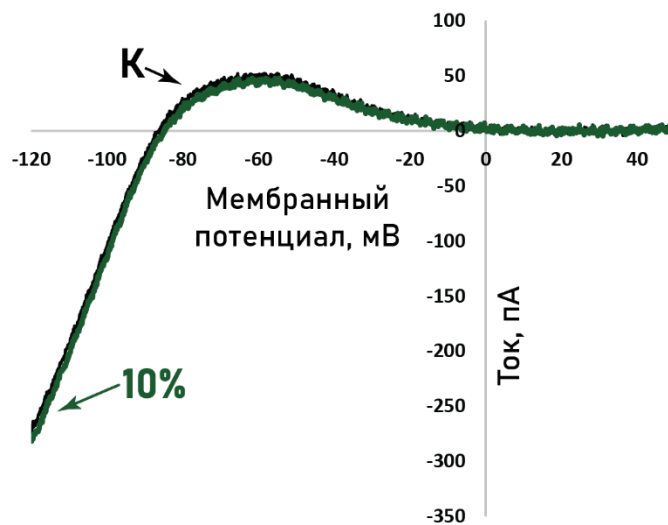


Рисунок 15. Репрезентативная запись тока I_{K1} желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*) в контрольных условиях и в присутствии 10% водорастворимой фракции нефти в растворе.

Деполяризующие токи - быстрый натриевый ток, I_{Na} , и кальциевый ток, I_{Ca} – оказались менее чувствительны к воздействию ВРФ. Даже 10% ВРФ не вызвали статистически значимых изменений в амплитуде быстрого натриевого тока (см. рис.16). В концентрациях 1% и 10% ВРФ статистически значимо снижала амплитуду I_{Ca} при мембранном потенциале 0 мВ (от $-0,35 \pm 0,04$ мВ до $-0,25 \pm 0,05$ мВ и до $-0,21 \pm 0,03$ мВ соответственно, см.рис.17).

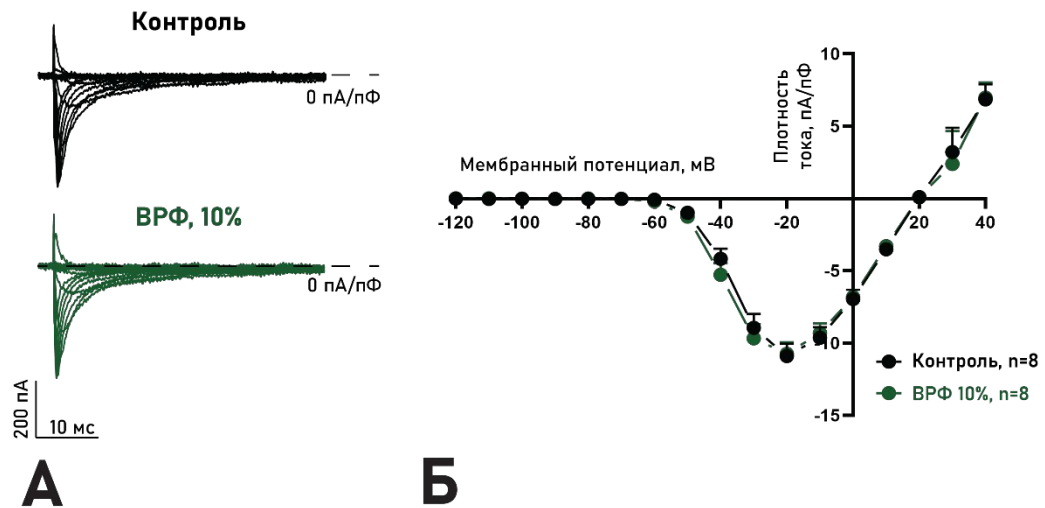


Рисунок 16. Влияние водорастворимой фракции нефти (ВРФ) на параметры быстрого натриевого тока, I_{Na} желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи I_{Na} в контрольных условиях и в присутствии 10% ВРФ при изменении мембранного потенциала от -120 мВ до +40 мВ. (Б) Вольт-амперная характеристика I_{Na} в контрольных условиях и в присутствии 10% ВРФ. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=8$ желудочковых кардиомиоцитов ($N=3$).

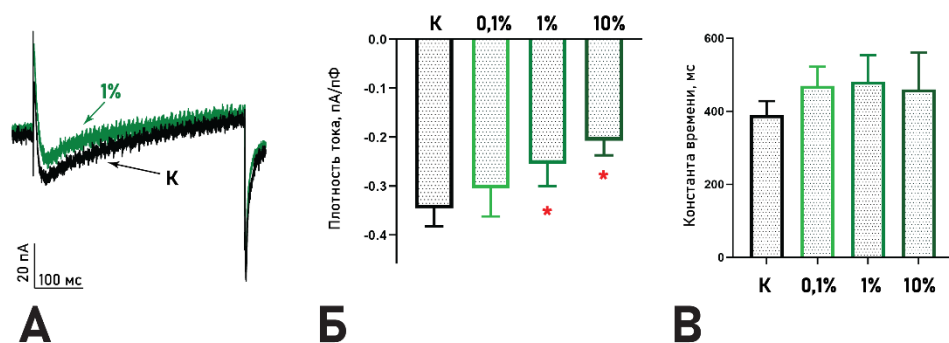


Рисунок 17. Влияние водорастворимой фракции нефти (ВРФ) на параметры кальциевого тока, I_{Ca} , желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи I_{Ca} при деполяризации мембраны от -40 мВ до 0 мВ в контрольных условиях и в присутствии 1% ВРФ. (Б) Плотность тока I_{Ca} при деполяризации от -40 мВ до 0 мВ в контрольных условиях и в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ. (В) Константа времени тока I_{Ca} в контрольных условиях и в присутствии 0,1%; 1% и 10% ВРФ. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=7-8$ желудочковых кардиомиоцитов ($N=3$). * - $p < 0,05$ при проведении однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

Таким образом, уменьшение длительности ПД при воздействии 10% ВРФ объясняется

преимущественным влиянием ВРФ на основной реполяризирующий ток желудочковых кардиомиоцитов, I_{Kr} , и слабым влиянием на деполяризирующие и стабилизирующие токи.

4.2. Влияние фенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов наваги

В первую очередь мы оценили влияние фенантрена на параметры потенциала действия (ПД), зарегистрированного в желудочковых кардиомиоцитах. Все измерения проводили при поддерживаемой температуре $12 \pm 0,5^\circ\text{C}$ у животных, акклиматизированных к летним условиям. Наиболее выраженное влияние фенантрен оказал на длительность ПД на разных уровнях реполяризации. Так, $10 \text{ }\mu\text{M}$ фенантрена вызвали статистически значимое увеличение длительности ПД на уровне 50% реполяризации от $522,9 \pm 10,0 \text{ мс}$ до $917,2 \pm 99,7 \text{ мс}$ ($p < 0,05$, см. рис.18Б). Также $10 \text{ }\mu\text{M}$ фенантрена вызвали статистически значимое увеличение длительности ПД на уровне 90% реполяризации от $599,7 \pm 3,69 \text{ мс}$ до $1034 \pm 59,9 \text{ мс}$ ($p < 0,05$, см. рис.18Б). Мы наблюдали тенденцию к дозозависимому увеличению максимальной скорости деполяризации, но эта тенденция осталась статистически незначимой даже при использовании максимальной исследуемой концентрации фенантрена. Амплитуда ПД, а также величина потенциала покоя оказались нечувствительны к фенантрону во всех исследуемых концентрациях (см. рис.18 Г, Д, Е).

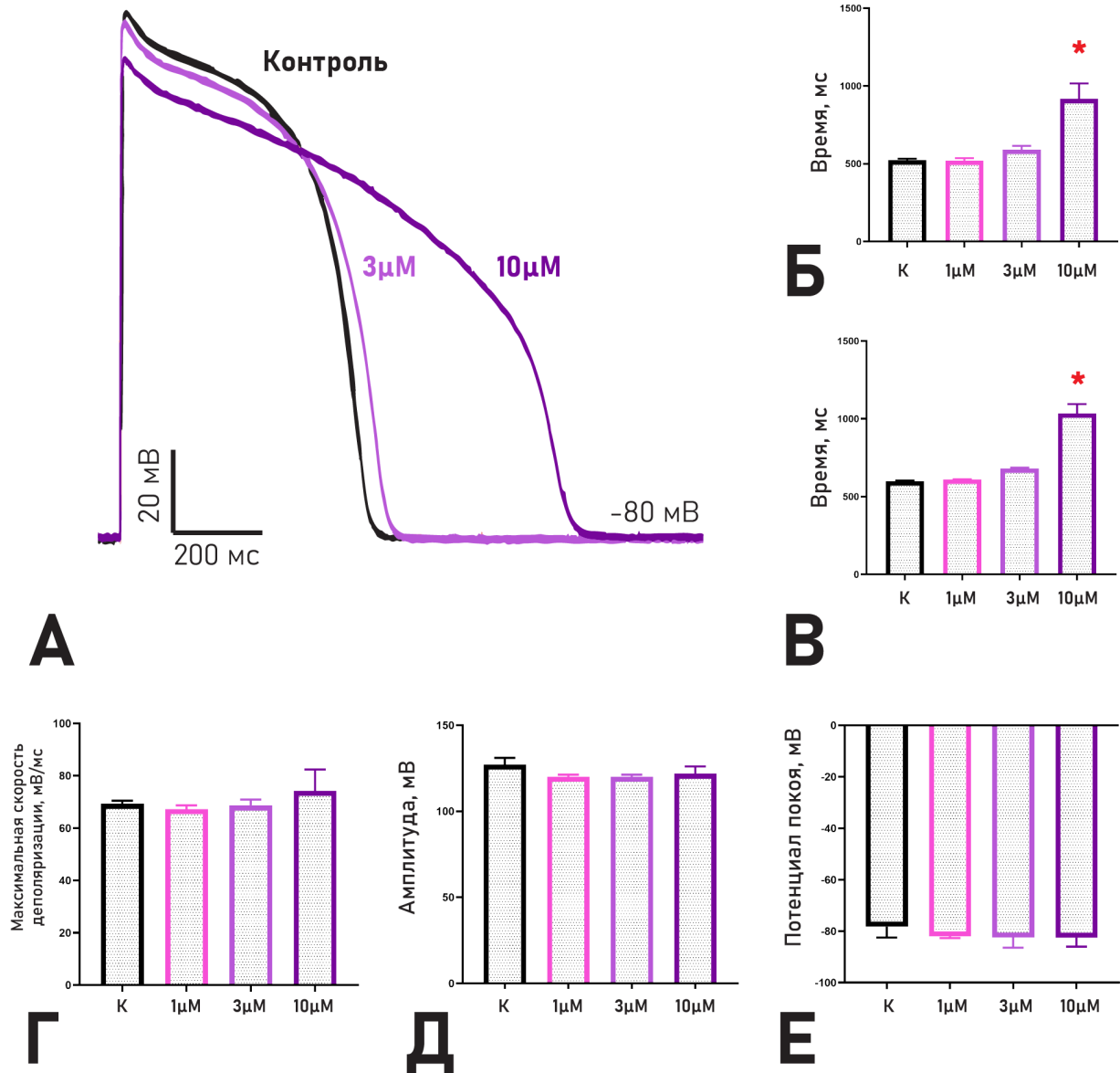


Рисунок 18. Влияние фенантрена на параметры потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи ПД в контрольных условиях и в присутствии различных концентраций фенантрена. (Б) Длительность ПД на уровне 50% реполяризации в контрольных условиях и в присутствии 1 μM, 3 μM и 10 μM фенантрена. (В) Длительность ПД на уровне 90% реполяризации в контрольных условиях и в присутствии 1 μM, 3 μM и 10 μM фенантрена. (Г) Максимальная скорость деполяризации ПД в контрольных условиях и в присутствии 1 μM, 3 μM и 10 μM фенантрена. (Д) Амплитуда ПД в контрольных условиях и в присутствии 1 μM, 3 μM и 10 μM фенантрена. (Е) Величина потенциала покоя в контрольных условиях и в присутствии 1 μM, 3 μM и 10 μM фенантрена. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=13$ желудочковых кардиомиоцитов ($N=5$). * - $p < 0,05$ при проведении однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

В соответствии с данными об изменении параметров ПД под действием фенантрена мы наблюдали дозозависимое уменьшение амплитуды основного реполяризирующего тока, быстрого калиевого тока задержанного выпрямления, I_{Kr} (см. рис.20, А, Б). Расчетная константа полуингибирования фенантrenom для этого тока составила $1,95 \pm 0,27 \mu\text{M}$.

Основной деполярирующий ток – быстрый натриевый ток, I_{Na} , оказался менее чувствительным к действию фенантрена. Только $10 \mu\text{M}$ фенантрена вызвали уменьшение плотности этого тока на $16,8 \pm 1,81\%$ ($p < 0,05$, см. рис.20 В,Г).

Кальциевый ток, определяющий длительность фазы плато ПД и сократительную активность кардиомиоцитов, оказался достаточно чувствительным к влиянию фенантрена. Так, $10 \mu\text{M}$ и $30 \mu\text{M}$ фенантрена вызвали снижение плотности этого тока на $14,5 \pm 2,95\%$ и $28,3 \pm 4,55\%$ соответственно ($p < 0,01$ в обоих случаях, см.рис.20Д, Е).

Основной стабилизирующий ток, I_{K1} , оказался нечувствительным к действию фенантрена – даже $30 \mu\text{M}$ этого соединения не вызывали изменений в амплитуде этого тока (см. рис.19).

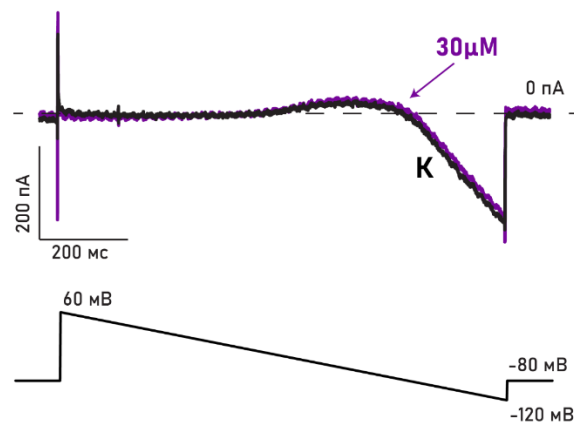


Рисунок 19. Влияние фенантрена на параметры I_{K1} желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*). На врезке внизу указан использованный протокол изменения мембранного потенциала.

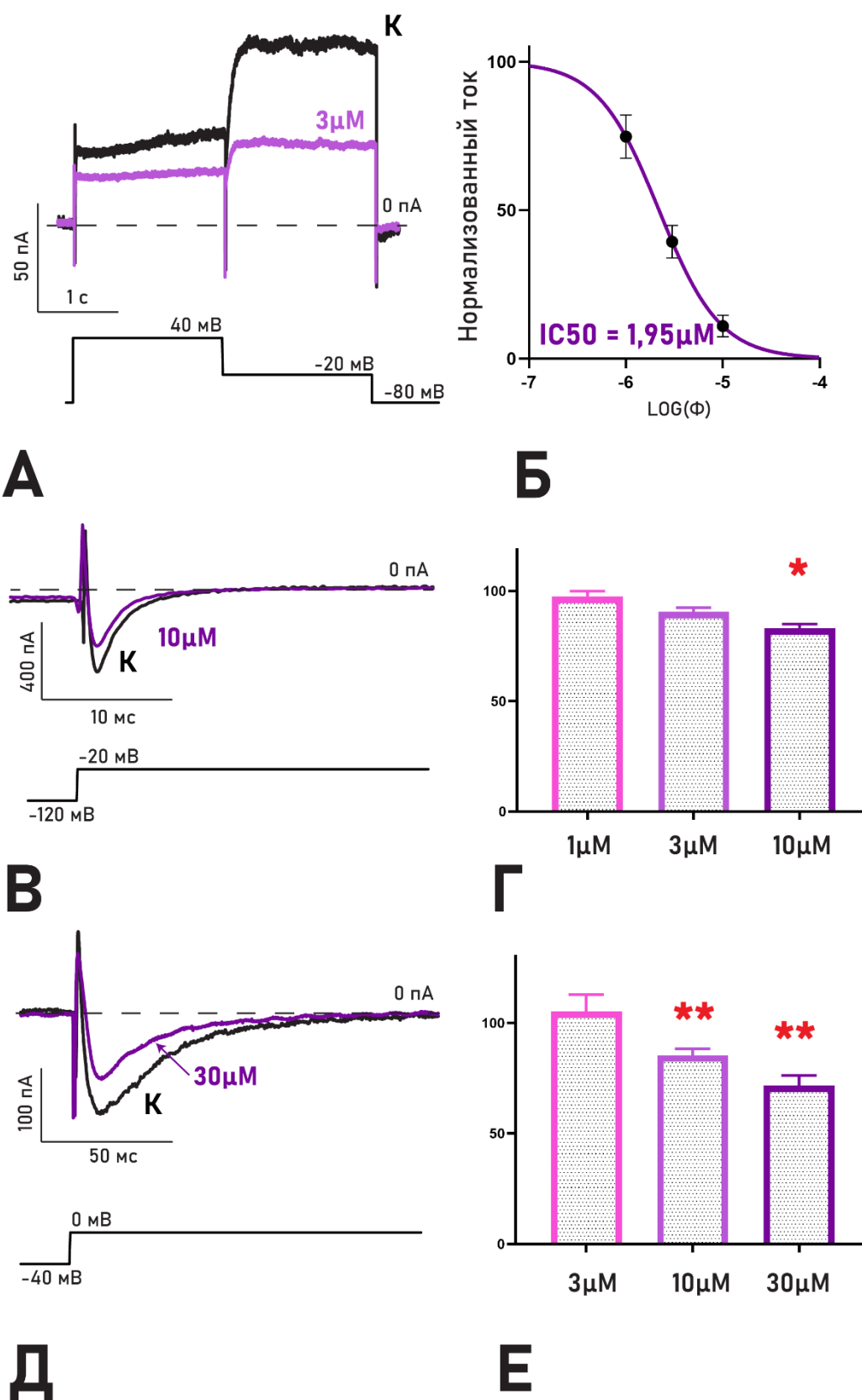


Рисунок 20. Влияние фенантрена на основные ионные токи желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативная запись быстрого калиевого тока задержанного выпрямления в контрольных условиях и в присутствии 3 μM фенантрена. (Б) Величина хвостового тока I_{Kt} при деполяризации до +40 мВ в присутствии 1 μM, 3 μM и 10 μM

фенантрена, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифра на врезке слева показывает значение параметра IC50. Данные представлены для n=6-8 желудочковых кардиомиоцитов (N=3). (В) Репрезентативные записи быстрого натриевого тока, I_{Na} , при деполяризации до -20 мВ в контрольных условиях и в присутствии 10 мМ фенантрена. (Г) Плотность I_{Na} при деполяризации до -20 мВ в присутствии 1 мМ, 3 мМ и 10 мМ фенантрена, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Данные представлены для n=7-12 желудочковых кардиомиоцитов (N=6). (Д) Репрезентативная запись кальциевого тока, I_{Ca} , при деполяризации до 0 мВ в контрольных условиях и в присутствии 30 мМ фенантрена. (Е) Плотность I_{Ca} при деполяризации до 0 мВ в присутствии 3 мМ, 10 мМ и 30 мМ фенантрена, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Данные представлены для n=6-7 желудочковых кардиомиоцитов (N=4). Все данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$. * - $p < 0,05$ при проведении однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

4.3. Влияние 3-метилфенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов наваги

3-метилфенантрен (3-МФ) оказал выраженное влияние на конфигурацию потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов наваги, измеренных при 12°C у животных, акклиматизированных к летним условиям. 3-метилфенантрен (3-МФ) в концентрации 1 мМ и 3 мМ вызвал статистически значимое увеличение длительности ПД на уровне 50% реполяризации от $541,6 \pm 34,4$ мс в контрольных условиях до $656,7 \pm 42,0$ мс и до $780,6 \pm 80,4$ мс соответственно ($p < 0,01$ в обоих случаях, см. рис.21Б). Длительность ПД на уровне 90% реполяризации также статистически значимо увеличивалась в присутствии 1 мМ и 3 мМ 3-МФ от $636,6 \pm 37,7$ мс в контрольных условиях до $736,4 \pm 42,1$ мс и до $873,9 \pm 86,5$ мс соответственно ($p < 0,01$ в обоих случаях, см. рис.21В). Максимальная скорость деполяризации и амплитуда ПД также изменялись в присутствии 3-МФ, что отличает эффекты этого соединения от эффектов водорастворимой фракции нефти и фенантрена, описанных выше. Максимальная скорость деполяризации уменьшалась в присутствии 1 мМ и 3 мМ 3-МФ от $18,4 \pm 2,67$ мВ/мс в контрольных условиях до $14,7 \pm 1,74$ мВ/мс и $12,9 \pm 2,01$ мВ/мс соответственно ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, см. рис.21Г). Амплитуда ПД уменьшилась под влиянием 1 мМ и 3 мМ 3-МФ от $100,7 \pm 2,89$ мВ в контрольных условиях до $91,9 \pm 3,91$ мВ и $88,9 \pm 4,78$ мВ соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях, см. рис.21Д). Потенциал покоя не изменился под влиянием 3-МФ во всех исследованных концентрациях (см.рис.21Е).

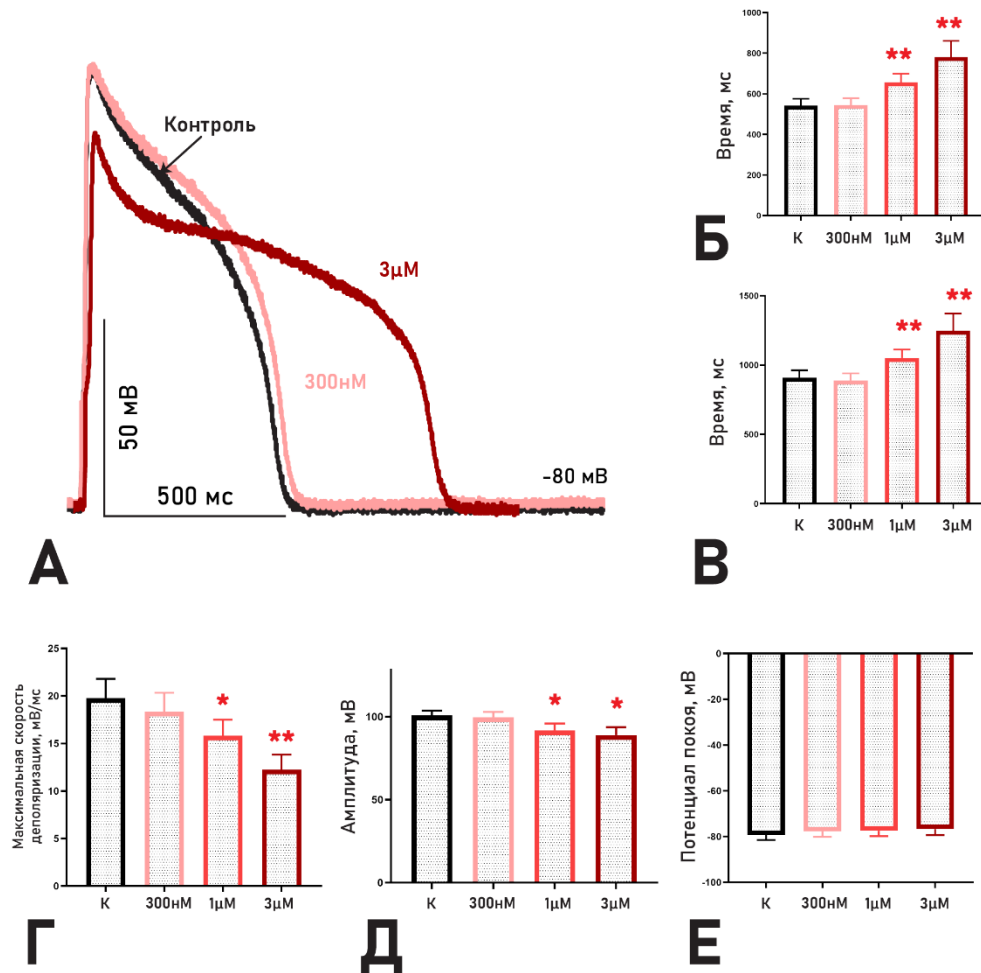


Рисунок 21. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи ПД в контрольных условиях и в присутствии различных концентраций 3-МФ. (Б) Длительность ПД на уровне 50% реполяризации в контрольных условиях и в присутствии 300 нМ, 1 μ М и 3 μ М 3-МФ. (В) Длительность ПД на уровне 90% реполяризации в контрольных условиях и в присутствии 300 нМ, 1 μ М и 3 μ М 3-МФ. (Г) Максимальная скорость деполяризации ПД в контрольных условиях и в присутствии 300 нМ, 1 μ М и 3 μ М 3-МФ. (Д) Амплитуда ПД в контрольных условиях и в присутствии 300 нМ, 1 μ М и 3 μ М 3-МФ. (Е) Потенциал покоя в контрольных условиях и в присутствии 300 нМ, 1 μ М и 3 μ М 3-МФ. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=13-16$ желудочковых кардиомиоцитов ($N=5$). *, ** - $p < 0,05$ или $p < 0,01$ при проведении однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

Увеличение длительности потенциала действия под влиянием 3-МФ позволило нам предположить, что основной реполяризирующий ток желудочковых кардиомиоцитов, I_{Kr} , может быть чувствительным к 3-МФ. Действительно, 3-МФ вызвал выраженное ингибирование I_{Kr} ,

расчётная константа полуингибирования составила $503,7 \pm 0,57$ нМ (см. рис.22Б,В). Поскольку потенциал покоя остался неизменным при воздействии 3-МФ, мы не ожидали увидеть изменений основного стабилизирующего тока, I_{K1} , в присутствии 3-МФ. Действительно, этот ток оказался устойчивым к воздействию 3-МФ (см.рис.22Г).

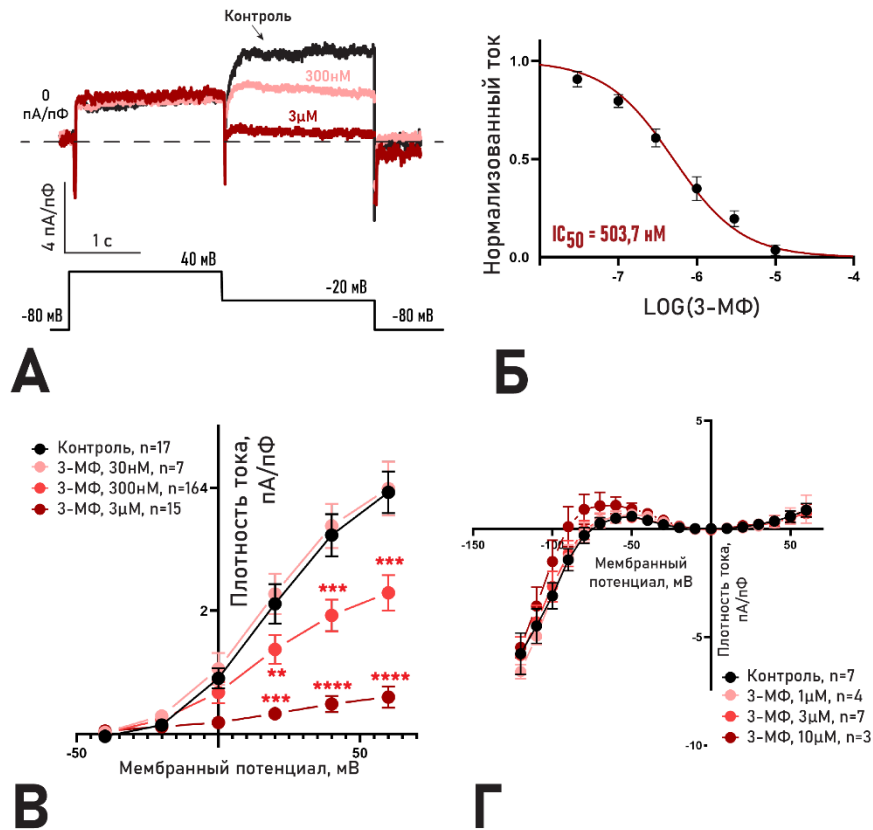


Рисунок 22. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на репертуар калиевых токов желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи быстрого калиевого тока задержанного выпрямления, I_{Kr} , в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Б) Величина хвостового тока I_{Kr} при деполяризации до +40 мВ в присутствии 3-МФ, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифра на врезке слева показывает значение параметра IC_{50} . Данные представлены для $n=7-17$ желудочковых кардиомиоцитов. (В) Вольт-амперная характеристика хвостового тока I_{Kr} в контрольных условиях и в присутствии 30 нМ, 300 нМ и 3 μМ 3-МФ. (Г) Вольт-амперная характеристики хвостового тока I_{K1} в контрольных условиях и в присутствии 1 μМ, 3 μМ и 10 μМ 3-МФ. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$, количество кардиомиоцитов указано в описании или на рисунке ($N=5$). **, ***, **** - $p < 0,01$; $p < 0,001$ или $p < 0,0001$ соответственно при проведении двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

Снижение амплитуды ПД, а также максимальной скорости деполяризации под влиянием 3-МФ убедило нас в том, что 3-МФ может подавлять быстрый натриевый ток, I_{Na} . Действительно, этот ток оказался чувствительным к действию 3-МФ – расчетная константа полунгибирования составила $7,86 \pm 0,98$ μM 3-МФ (см. рис.23Б, В). Неожиданным оказалось влияние 3-МФ на параметры стационарных активации и инактивации. 3-МФ вызвал дозозависимое смещение влево кривых стационарных активации и инактивации и статистически значимые изменения V_{50} при неизменном наклоне кривой (см. табл.7)

Таблица 7. Влияние 3-метилфенантрена на параметры стационарной активации и инактивации быстрого натриевого тока желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*).*, **** - $p < 0,05$; $p < 0,0001$ при проведении однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Уэлча.

Условие	Параметры стационарной активации		Параметры стационарной инактивации	
	V_{50} , мВ	Наклон кривой (Slope)	V_{50} , мВ	Наклон кривой (Slope)
К	$-30,1 \pm 0,38$	$6,57 \pm 0,36$	$-75,6 \pm 0,59$	$-6,36 \pm 0,52$
300 нМ 3-МФ	$-33,1 \pm 0,70^*$	$6,85 \pm 0,64$	$-76,6 \pm 0,70$	$-6,77 \pm 0,62$
3 μM 3-МФ	$-44,8 \pm 1,18^{****}$	$7,00 \pm 1,04$	$-81,4 \pm 0,93^{****}$	$-7,73 \pm 0,82$
10 μM 3-МФ	$-50,1 \pm 0,78^{****}$	$5,47 \pm 0,71$	$-84,4 \pm 0,32^{****}$	$-6,61 \pm 0,28$

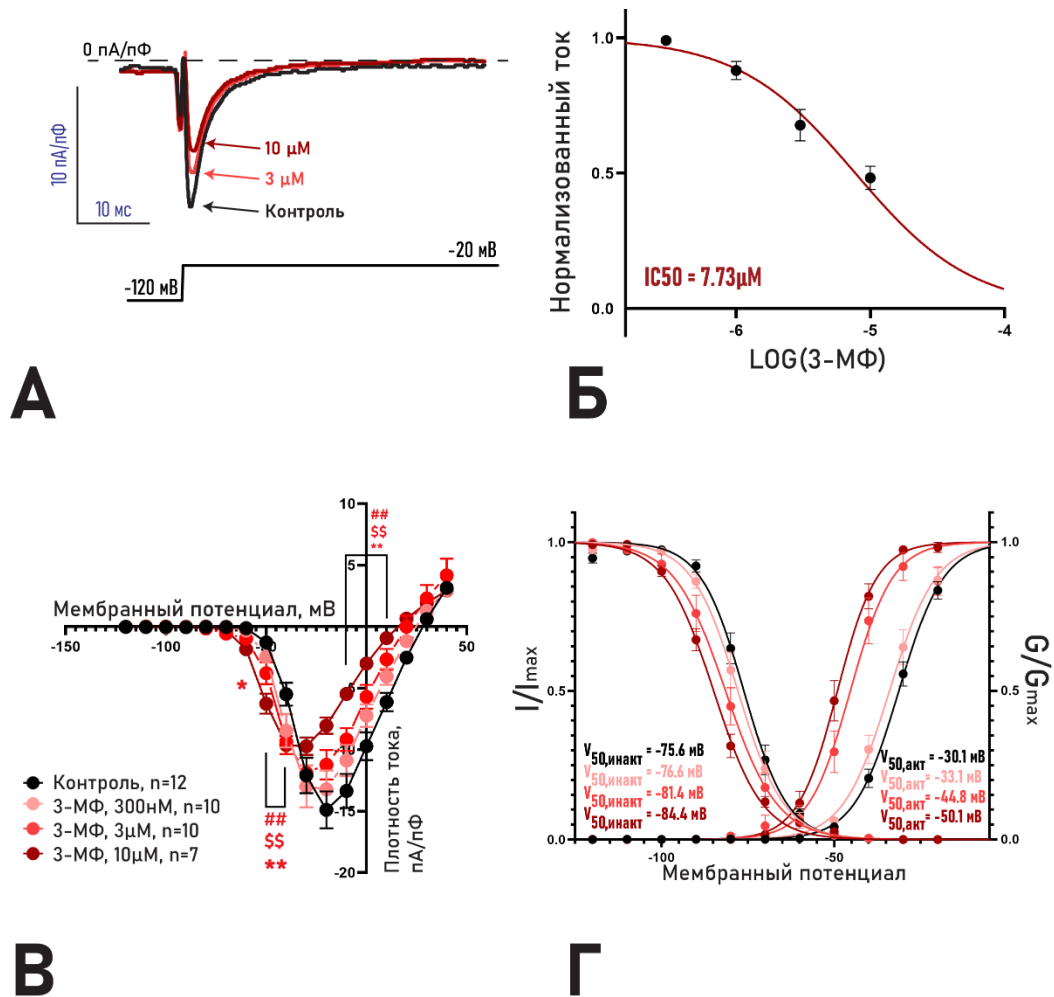


Рисунок 23. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры быстрого натриевого тока, I_{Na} , желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи I_{Na} в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Б) Величина натриевого тока при деполяризации до -20 мВ в присутствии 3-МФ, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифра на врезке слева показывает значение параметра IC_{50} . Данные представлены для $n=7-12$ желудочковых кардиомиоцитов. (В) Вольт-амперная характеристика натриевого тока, I_{Na} , в контрольных условиях и в присутствии 300 нМ, 3 μМ и 10 μМ 3-МФ. (Г) Параметры стационарной активации и инактивации быстрого натриевого тока в контрольных условиях и в присутствии 300 нМ, 3 μМ и 10 μМ 3-МФ. На врезках показаны значения V_{50} стационарной активации или стационарной инактивации. Данные представлены для $n=7-12$ желудочковых кардиомиоцитов. Данные представлены в виде $среднее \pm$ стандартная ошибка среднего, количество кардиомиоцитов указано в описании или на рисунке ($N=6$). ## - $p < 0,01$ при сравнении контрольных значений со значениями амплитуды тока в присутствии 300 нМ 3-МФ. \$\$ - $p < 0,01$ при сравнении контрольных значений со значениями амплитуды тока в присутствии 3 μМ 3-МФ. *, ** - $p < 0,05$;

$p < 0,01$ при сравнении контрольных значений со значениями амплитуды тока в присутствии $10 \mu\text{M}$ 3-МФ. Сравнения проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

Наконец, 3-МФ вызвал изменение кинетики кальциевого тока, определяющего сократимость кардиомиоцитов. Так, константа времени, τ , статистически значимо уменьшилась в присутствии $3 \mu\text{M}$ 3-МФ от $53,5 \pm 2,25$ мс в контрольных условиях до $46,5 \pm 3,23$ мс ($p < 0,05$, см. рис.24). Такое ускорение инактивации не сопровождалось уменьшением амплитуды кальциевого тока (см. рис.24).

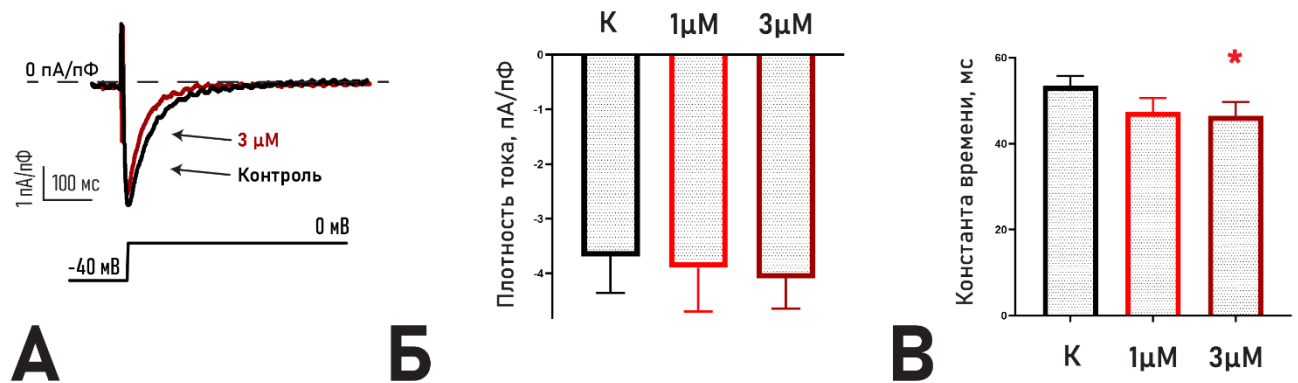


Рисунок 24. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на кальциевый ток желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи I_{Ca} при деполяризации мембраны от -40 мВ до 0 мВ в контрольных условиях и в присутствии $3 \mu\text{M}$ 3-МФ. (Б) Плотность тока I_{Ca} при деполяризации от -40 мВ до 0 мВ в контрольных условиях и в присутствии $1 \mu\text{M}$ и $3 \mu\text{M}$ 3-МФ. (В) Константа времени тока I_{Ca} в контрольных условиях и в присутствии $1 \mu\text{M}$ и $3 \mu\text{M}$ 3-МФ. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=15-8$ желудочковых кардиомиоцитов ($N=3$). * - $p < 0,05$ при проведении однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

4.4. Влияние сезонной акклиматизации наваги на чувствительность желудочковых кардиомиоцитов к 3-метилфенантрону

4.4.1. Влияние акклиматизации на параметры электрической активности желудочковых кардиомиоцитов наваги

Для оценки влияния акклиматизации на чувствительность к 3-метилфенантрону (3-МФ) в первую очередь мы оценили, как именно акклиматизация к зимним или летним условиям влияет на параметры электрической активности желудочковых кардиомиоцитов наваги. Все измерения электрической активности при исследовании сезонных изменений чувствительности к 3-МФ проводили при температуре $7 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

У животных, акклиматизированных к летним условиям, длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации ($773,8 \pm 49,2$ мс и $909,4 \pm 53,8$ мс) были статистически значимо больше, чем соответствующие параметры ПД особей, акклиматизированных к зимним условиям ($424,0 \pm 24,8$ мс и $507,9 \pm 28,6$ мс, см. рис.25А, Б). В то же время прочие параметры ПД (амплитуда, максимальная скорость деполяризации и потенциал покоя) не отличались (см. рис.25В, Г, Д).

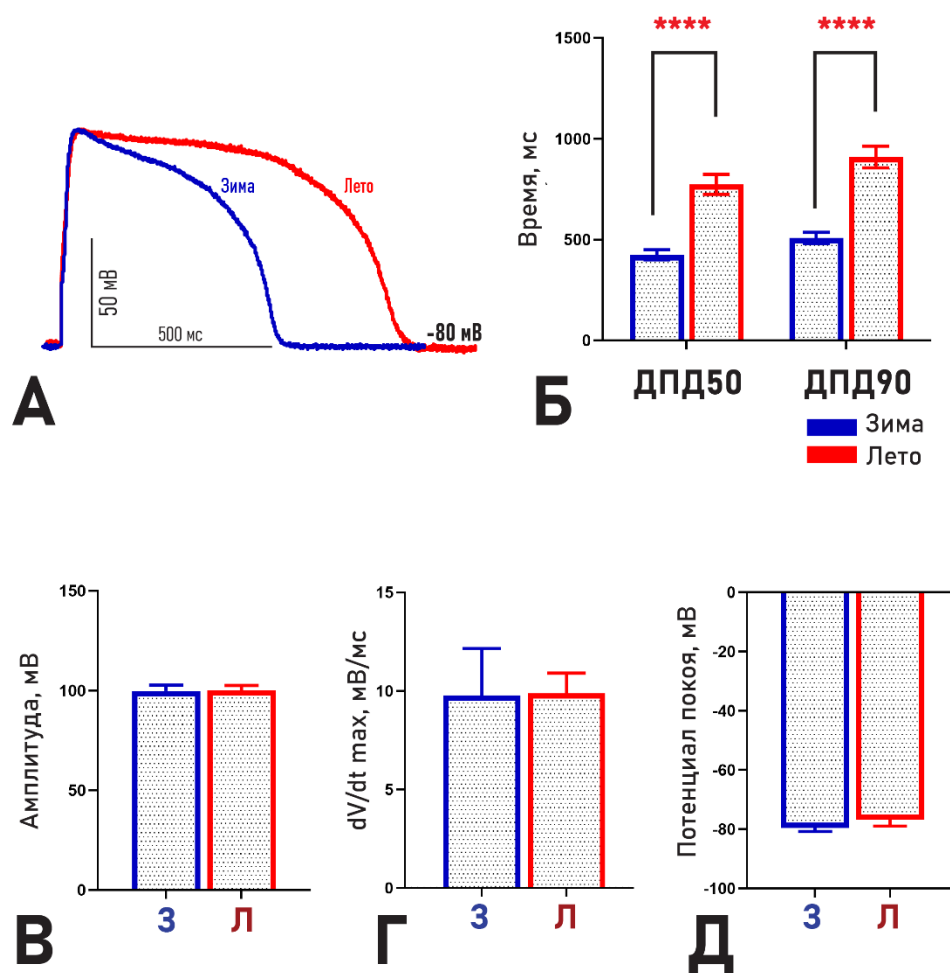


Рисунок 25. Сезонные изменения конфигурации потенциала действия (ПД) в желудочковых кардиомиоцитах северной наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Репрезентативные записи ПД из кардиомиоцитов желудочков рыб, акклиматизированных к зимним (синий цвет) и летним (красный цвет) условиям. (Б) Влияние сезонной акклиматизации на длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД50 и ДПД90). (В) Влияние сезонной акклиматизации на амплитуду ПД желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к зимним (синий цвет) и летним (красный цвет) условиям. (Г) Влияние сезонной акклиматизации на максимальную скорость деполяризации. (Д) Влияние сезонной акклиматизации на потенциал покоя. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего для $n=13$ ($N=6$) кардиомиоцитов, полученных от акклиматизированных к зимним условиям рыб, и $n=16$ ($N=5$) кардиомиоцитов, полученных от акклиматизированных к летним условиям рыб. Буква «З» обозначает данные для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к

зимним условиям, «Л» – данные для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к летним условиям. **** – $p < 0,001$, тест Манна-Уитни.

Основные ионные токи желудочковых кардиомиоцитов также различались у животных, акклиматизированных к летним или зимним условиям. Так, у животных, акклиматизированных к зимним условиям, мы наблюдали статистически значимое увеличение плотности основного реполяризирующего тока, I_{Kr} (см. рис.26А, Б). При этом основной стабилизирующий ток, I_{K1} , оставался неизменным в физиологически значимых пределах изменения мембранного потенциала (см. рис.27).

Амплитуда натриевого тока не отличалась в зависимости от условий акклиматизации (см. рис.26В). Тем не менее, мы отметили статистически значимый сдвиг кривых стационарной активации и инактивации натриевого тока влево при акклиматизации к зимним условиям (см. рис.26Г, табл.8).

Акклиматизация к зимним условиям привела к снижению амплитуды кальциевого тока от $-2,44 \pm 0,33$ пА/пФ в летних условиях до $-1,28 \pm 0,29$ пА/пФ ($p < 0,01$, см. рис.26Д) и увеличению константы времени, τ , от $52,0 \pm 2,22$ мс до $66,1 \pm 5,02$ мс ($p < 0,05$, см. рис.26Е). Тем не менее, переносимый этим током заряд при акклиматизации к зимним условиям остался статистически значимо меньше такового в летних условиях ($p < 0,0001$, см. рис.26Ж).

Таблица 8. Влияние сезонной акклиматизации на параметры стационарной активации и инактивации натриевого тока желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*). * - $p < 0,05$ при проведении теста Уэлча.

Условие	Параметры стационарной активации		Параметры стационарной инактивации	
	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)
Зима	$-37,8 \pm 0,44$	$7,54 \pm 0,38$	$-88,9 \pm 0,72$	$-7,69 \pm 0,64$
Лето	$-31,2 \pm 0,36^{****}$	$6,61 \pm 0,32$	$-76,1 \pm 0,43^{****}$	$-6,28 \pm 0,37$

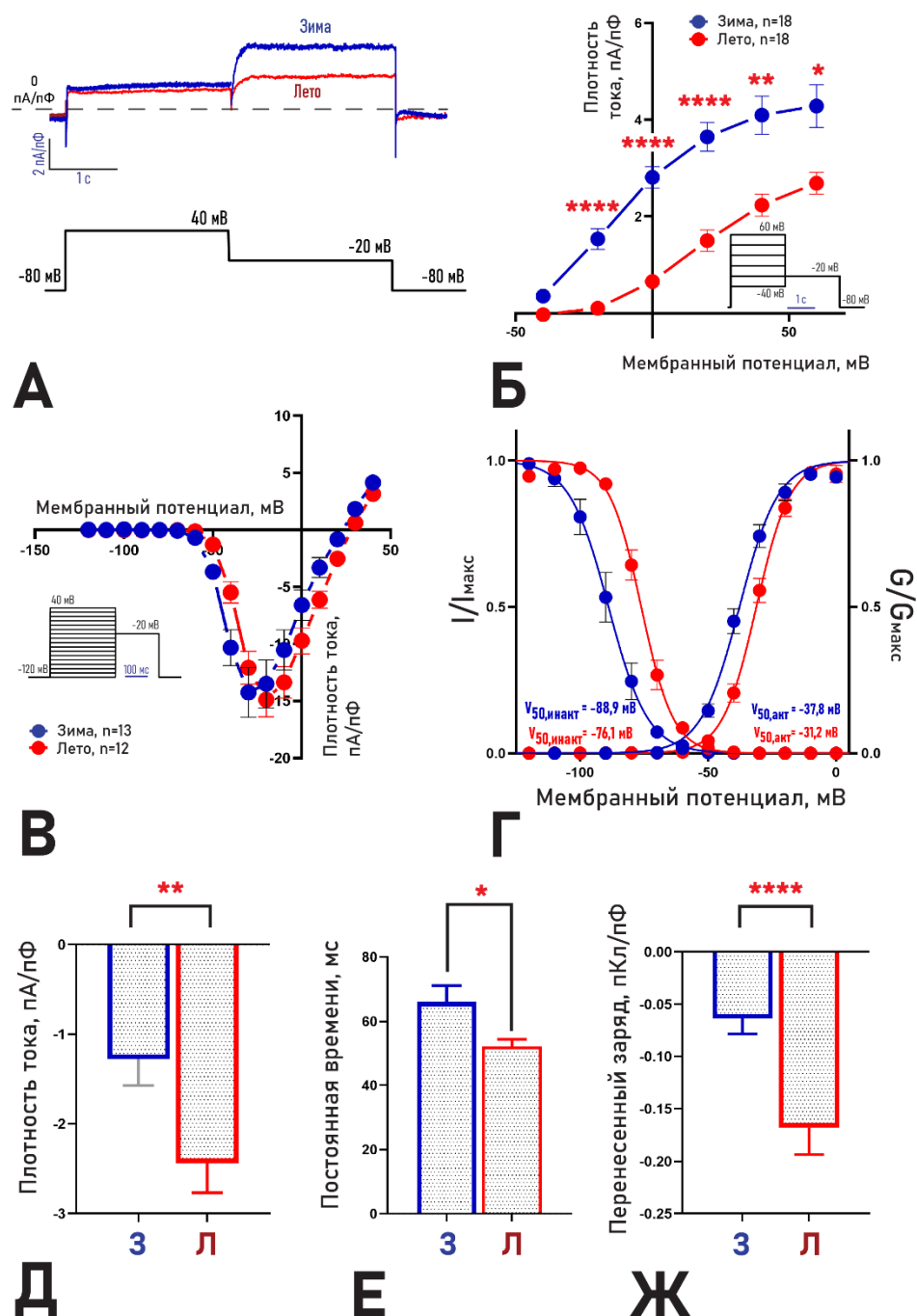


Рисунок 26. Сезонные изменения параметров основных ионных токов желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Оригинальные записи I_{Kr} из кардиомиоцитов желудочков рыб, акклиматизированных к зимним (синий цвет) и летним (красный цвет) условиям. (Б) Влияние сезонной акклиматизации на вольт-амперную характеристику тока I_{Kr} *, ** или **** - $p < 0,05$; $p < 0,01$ или $p < 0,0001$ соответственно при проведении двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Сидака. $n = 18$ для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к летним ($N = 10$) или зимним ($N = 8$) условиям. (В) Влияние сезонной акклиматизации на вольт-амперную характеристику I_{Na} $n = 13$

для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к зимним (N=12) условиям, и n=12 для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к летним (N=10) условиям. (Г) Влияние сезонной акклиматизации на параметры стационарной активации и инактивации I_{Na} . n=13 для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к зимним (N=12) условиям, и n=12 для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к летним (N=10) условиям. Цифры на врезках показывают значения параметра V50 стационарной инактивации или активации для особей, акклиматизированных к зимним (синий цвет) и летним (красный цвет) условиям. (Д-Ж) Влияние сезонной акклиматизации на параметры I_{Ca} желудочковых кардиомиоцитов особей. n=22 для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к зимним (N=8) условиям, и n=23 для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к летним (N=6) условиям. Буква «З» обозначает данные для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к зимним условиям, «Л» – данные для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к летним условиям. *, ** или **** - $p < 0,05$; $p < 0,01$ или $p < 0,0001$ в тесте Манна-Уитни. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего для (Б-Ж).

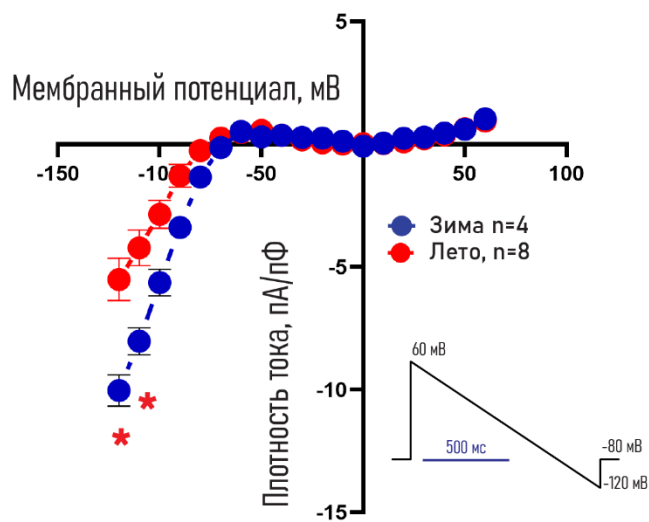


Рисунок 27. Вольт-амперные характеристики тока I_{K1} желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*), акклиматизированных к зимним (синий цвет) или летним (красный цвет) условиям. * означает наличие статистически значимой разницы между группами с $p < 0,05$ в тесте RM-ANOVA с апостериорным тестом Сидака. n=4-8 от N=8 особей.

4.4.2. Чувствительность к 3-метилфенантрину желудочковых кардиомиоцитов наваги, акклиматизированной к летним и к зимним условиям

3-метилфенантрин (3-МФ) в концентрациях 1 μ M и 3 μ M вызвал статистически значимое увеличение длительности ПД на уровне 50% (ДПД50) и 90% (ДПД90) реполяризации у животных, акклиматизированных как к летним, так и к зимним условиям. Тем не менее, 300 нМ

3-МФ вызвали статистически значимое увеличение длительности ПД только в кардиомиоцитах животных, акклиматизированных к зимним условиям (см. рис.28А, Б, В) от $424,0 \pm 49,2$ мс до $556,2 \pm 47,1$ мс для ДПД50 ($p < 0,05$) и от $507,9 \pm 53,8$ мс до $640,9 \pm 51,3$ мс для ДПД90 ($p < 0,05$). 3-МФ в концентрации $3 \mu\text{M}$ вызывал статистически значимое уменьшение как максимальной скорости деполяризации, так и амплитуды ПД в кардиомиоцитах во всех условиях ($p < 0,05$, см. рис.28Г, Д). Потенциал покоя остался нечувствительным к воздействию 3-МФ – даже $3 \mu\text{M}$ этого соединения не вызвало изменений этого параметра.

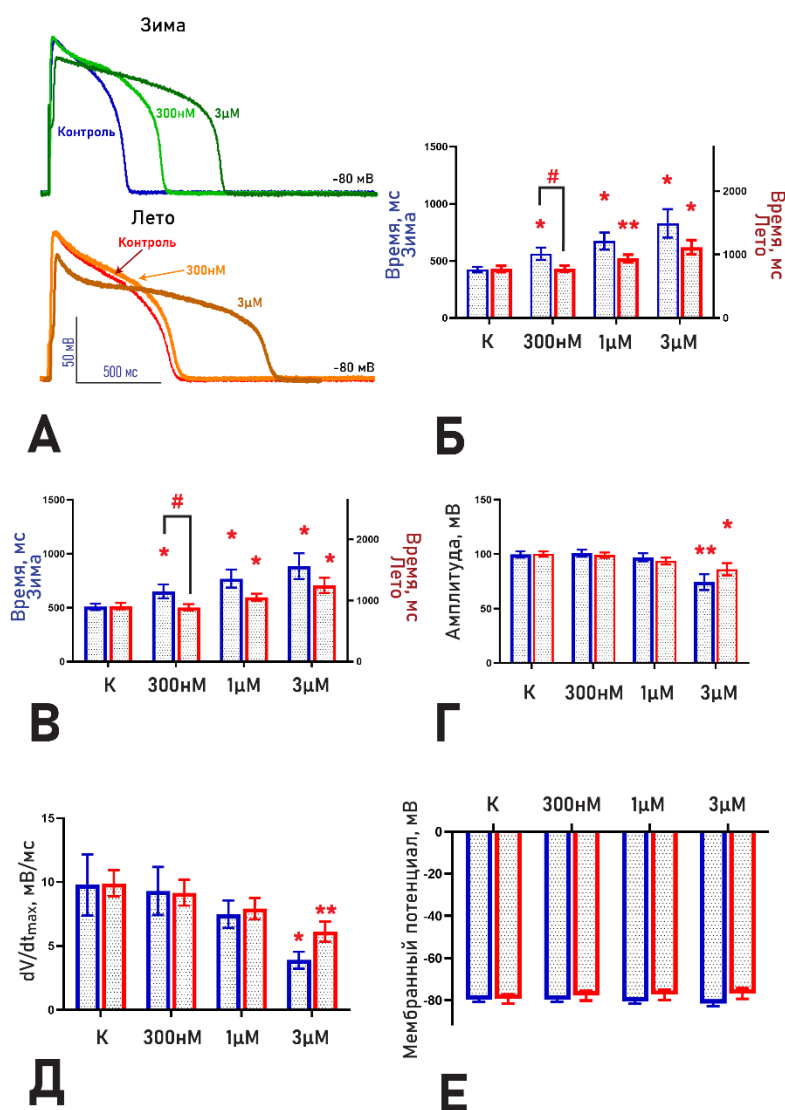


Рисунок 28. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*), акклиматизированной к зимним или летним условиям. (А) Репрезентативные записи ПД желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к зимним и летним условиям в контрольных условиях и в присутствии 3МФ различной концентрации. (Б-В) Влияние 3-МФ на длительность ПД на уровне 50% (ДПД50, Б) или 90% (ДПД90, В) реполяризации. (Г) Влияние 3-МФ на амплитуду ПД. (Д) Влияние 3-МФ на максимальную

скорость деполяризации ($dV/dt_{\max}$). (Е) Влияние 3-МФ на величину потенциала покоя. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего для $n=13$ ($N=7$) и $n=16$ ($N=8$) кардиомиоцитов, полученных из животных, акклиматизированных соответственно к зимним или летним условиям. *, ** или **** - $p<0,05$, $p<0,01$ или $p<0,0001$ при проведении двухфакторного дисперсионного анализа со смешанными эффектами с апостериорным тестом Данна при сравнении с соответствующими контрольными значениями. # - $p<0,05$ при проведении двухфакторного дисперсионного анализа со смешанными эффектами с апостериорным тестом Данна при сравнении эффектов 3-МФ для зимы и лета. Левая ось Y используется для отображения данных для желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к зимним условиям; правая ось Y используется для отображения данных для желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к летним условиям. Синим цветом обозначаются данные для наваги, акклиматизированной к зимним условиям, красным – к летним условиям.

Наиболее чувствительным к 3-МФ оказался основной реполярирующий ток, быстрый калиевый ток задержанного выпрямления, I_{Kr} (см. рис.29). Расчетные константы полуингибирования (IC_{50}) для этого тока равнялись $49,7 \pm 0,53$ нМ и $527,1 \pm 5,28$ нМ для наваги, акклиматизированной к зимним и летним условиям, соответственно ($p<0,0001$, см. рис.29Б).

Стабилизирующий калиевый ток, I_{K1} , оказался нечувствительным ко всем исследованным концентрациям 3-МФ (см. рис.30).

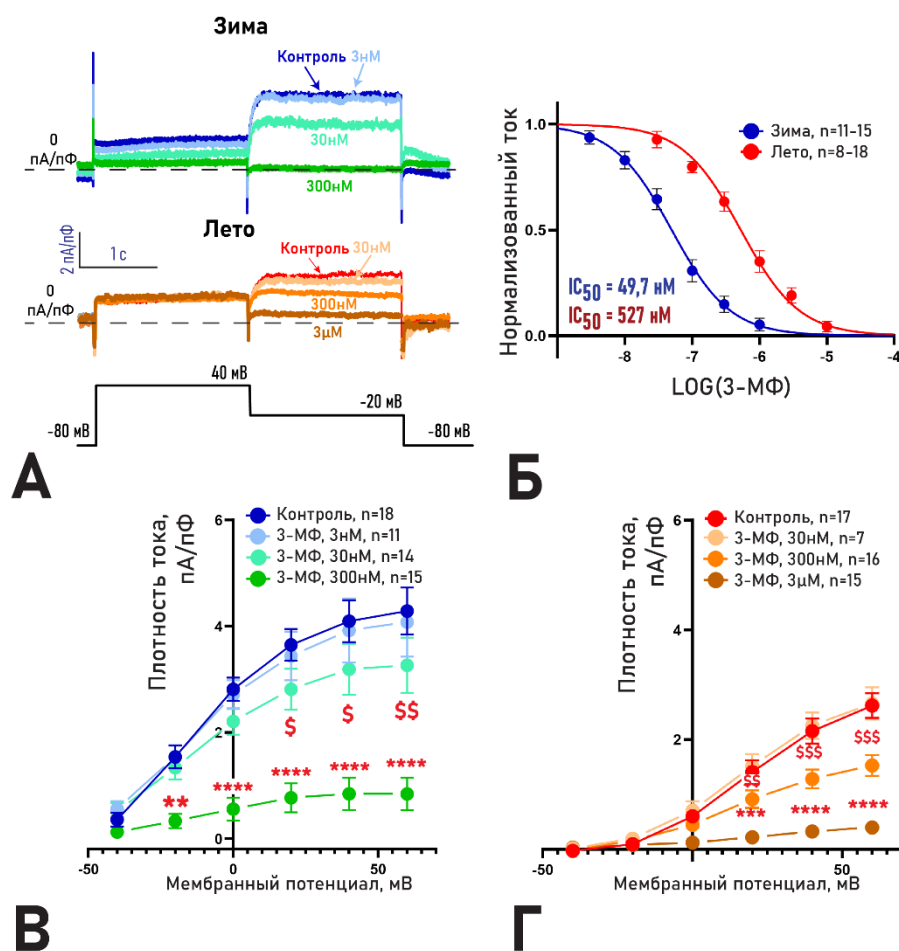


Рисунок 29. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры I_{Kr} желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*), акклиматизированной к зимним или летним условиям. (А) Оригинальные записи I_{Kr} в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. (Б) Величина хвостового тока при деполяризации до +40 мВ в присутствии 3-МФ различной концентрации, нормализованная на величину тока в контрольных условиях для желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к зимним (синий цвет) и летним (красный) условиям. Цифры на врезке слева показывают значение параметра IC_{50} для желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к зимним (синий цвет) и летним (красный цвет) условиям. (В) Вольт-амперная характеристика хвостового тока I_{Kr} желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к зимним условиям, в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. ** ($p < 0,01$) или **** ($p < 0,0001$) и \$ ($p < 0,05$) или \$\$ ($p < 0,01$) обозначают статистически значимую разницу для величин плотности тока в присутствии 300 нМ или 30 нМ 3МФ, соответственно, при сравнении с контрольными значениями. Двухфакторный дисперсионный анализ со смешанными эффектами с апостериорным тестом Данна. (Г) Вольт-амперная характеристика хвостового тока I_{Kr} желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к летним условиям, в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. ***

($p < 0,001$) или **** ($p < 0,0001$) и \$\$ ($p < 0,01$) или \$\$\$ ($p < 0,001$) обозначают статистически значимую разницу для величин плотности тока в присутствии 300 нМ или 30 нМ 3МФ, соответственно, при сравнении с контрольными значениями. Двухфакторный дисперсионный анализ со смешанными эффектами с апостериорным тестом Данна. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$.

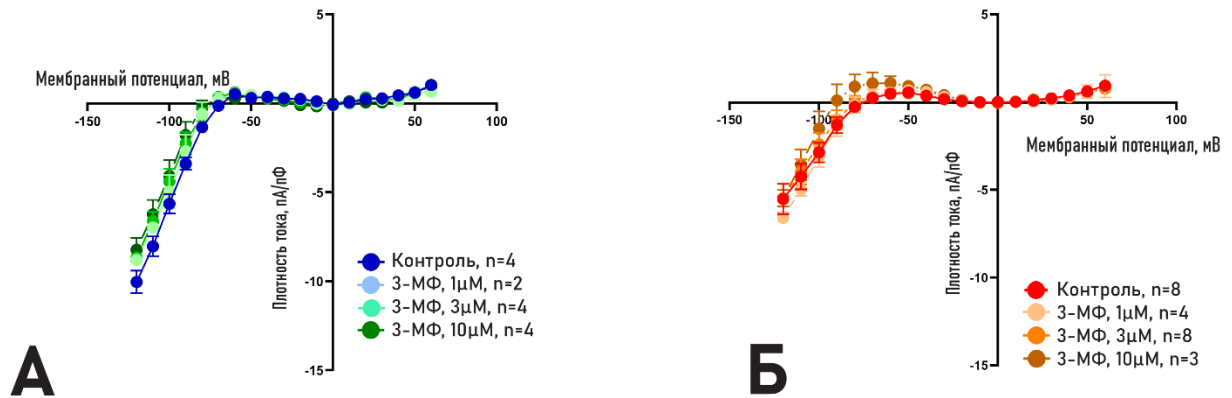


Рисунок 30. Сезонные изменения и влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры I_{K1} желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*). (А) Вольт-амперная характеристика I_{K1} желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к зимним условиям, в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. (Б) Вольт-амперная характеристика I_{K1} желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к летним условиям, в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ.

Быстрый натриевый ток, I_{Na} , является основным деполяризующим током желудочковых кардиомиоцитов наваги. Поскольку основные параметры ПД, определяемые этим током – амплитуда и максимальная скорость деполяризации, снижались под влиянием 3-МФ, мы ожидали, что этот ток будет чувствительным к 3-МФ. Действительно, 3-МФ приводил к подавлению этого тока (см. рис.31Б, В, Г). Кроме того, мы отметили сезонную изменчивость в чувствительности этого тока. Расчетная константа полуингибирования для наваги, акклиматизированной к зимним условиям, составила $2,39 \pm 0,30 \mu\text{M}$. В то же время для наваги, акклиматизированной к летним условиям, этот параметр принял значение $7,73 \pm 0,96 \mu\text{M}$ ($p < 0,0001$, F-тест).

Кроме подавления максимальной амплитуды I_{Na} 3-МФ приводил к статистически значимому сдвигу кривых стационарной активации и инактивации влево при акклиматизации как к зимним, так и к летним условиям (см. рис.31Д, Е, табл.9).

Таблица 9. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры стационарной активации и инактивации быстрого натриевого тока желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*), акклиматизированных к зимним или летним условиям. **, **** - $p < 0,01$; 0,0001 при сравнении с соответствующим сезонным контролем. ##### - $p < 0,001$ при сравнении с теми же условиями, но для животных, акклиматизированных к зимним условиям. Тест mixed-effects ANOVA с апостериорным тестом Данна.

Условие	Параметры стационарной активации		Параметры стационарной инактивации	
	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)
Акклиматизация к зимним условиям				
Контроль	-38,5±0,50	7,62±0,44	-89,8±0,75	-7,37±0,66
300 нМ 3-МФ	-43,5±0,55****	6,39±0,49	-88,6±0,91****	-7,38±0,80
3 мМ 3-МФ	-56,0±0,81****	6,47±0,71	-95,3±0,86****	-7,39±0,76
10 мМ 3-МФ	-61,3±1,17****	6,09±1,04	-100,9±1,14****	-7,12±1,02
Акклиматизация к летним условиям				
Контроль	-31,2±0,35#####	6,51±0,32	-76,1±0,46#####	-6,28±0,41
300 нМ 3-МФ	-34,0±0,51**,#####	6,75±0,46	-77,9±0,53****,#####	-6,70±0,46
3 мМ 3-МФ	-45,3±0,79****,#####	6,13±0,69	-81,5±0,66****,#####	-7,47±0,58
10 мМ 3-МФ	-49,0±0,48****,#####	5,73±0,43	-84,9±0,38****,#####	-7,12±0,33

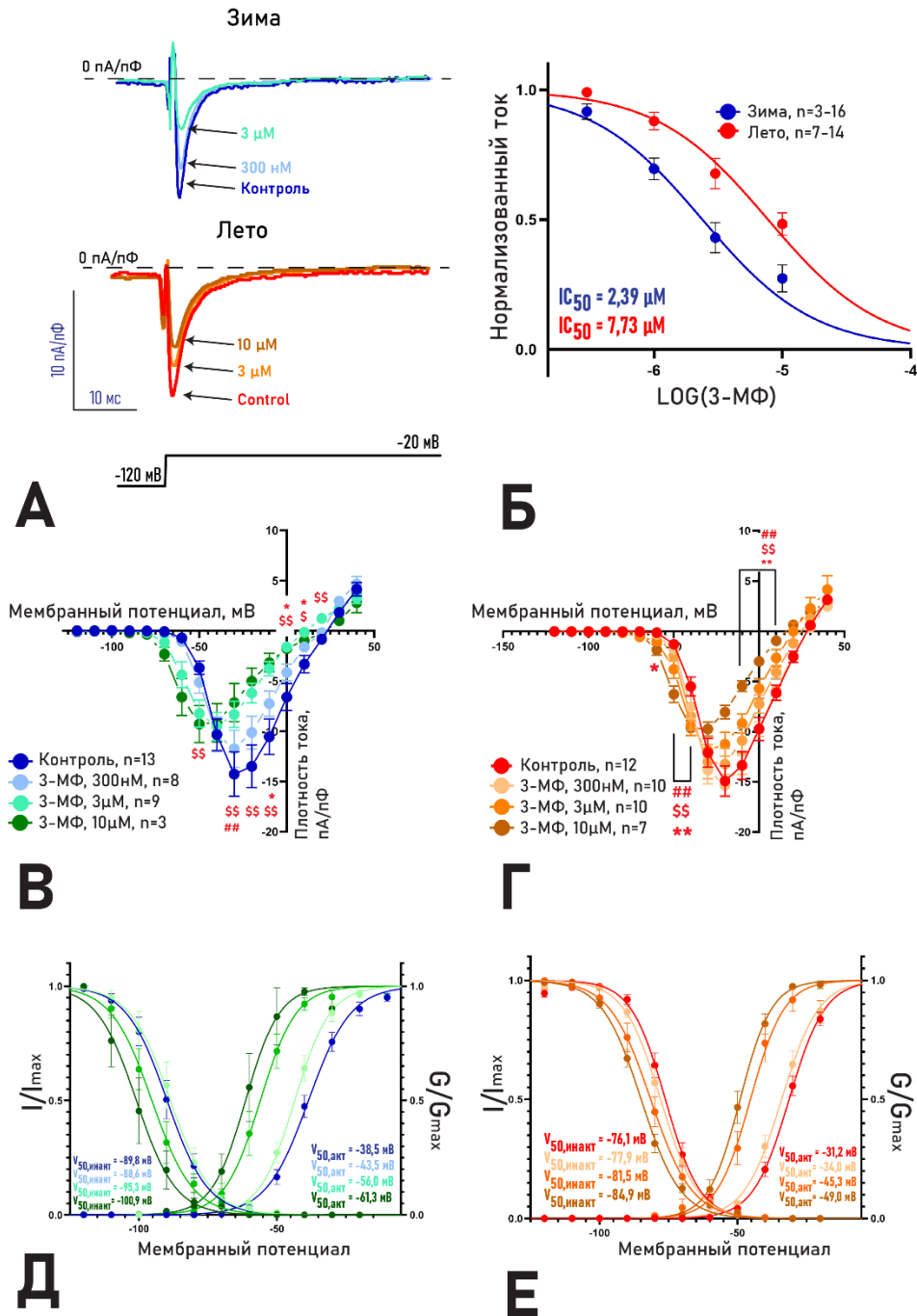


Рисунок 31. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры быстрого натриевого тока, I_{Na} , желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*), акклиматизированной к зимним или летним условиям. (А) Оригинальные записи I_{Na} желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к зимним и летним условиям в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Б) Величина I_{Na} при деполяризации до -20 мВ в присутствии 3-МФ различной концентрации, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифры на врезке слева показывают значение параметра IC_{50} для желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к зимним (синий цвет) и летним (красный

цвет) условиям. (В) Вольт-амперная характеристика I_{Na} желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к зимним условиям в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. * ($p<0,05$), и \$ ($p<0,05$) или \$\$ ($p<0,01$), и ## ($p<0,01$) обозначают статистически значимую разницу для величин плотности тока в присутствии 300 нМ, 1 μ М или 3 μ М 3-МФ, соответственно, при сравнении с контрольными значениями. Тест mixed-effects ANOVA с апостериорным тестом Данна. $n=3-13$ ($N=9$). (Г) Вольт-амперная характеристика I_{Na} желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к летним условиям. * ($p<0,05$) или ** ($p<0,01$), и \$\$ ($p<0,01$), и ## ($p<0,01$) обозначают статистически значимую разницу для величин плотности тока в присутствии 300 нМ, 3 μ М или 10 μ М 3МФ, соответственно, при сравнении с контрольными значениями. Тест mixed-effects ANOVA с апостериорным тестом Данна. $n=7-12$ ($N=10$). (Д) Параметры стационарной активации и инактивации I_{Na} желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к зимним условиям, в присутствии 3-МФ различной концентрации. (Д) Параметры стационарной активации и инактивации I_{Na} желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к летним условиям, в присутствии 3-МФ различной концентрации. Цифры на врезках картинок с параметрами стационарной активации и инактивации отображают значение параметра V_{50} в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. Данные указаны в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$. Количество кардиомиоцитов (n) указано на рисунках для $N=9$ животных, акклиматизированных к зимним условиям, и $N=10$ животных, акклиматизированных к летним условиям.

Кроме того, 3-МФ в концентрации 3 μ М привел к статистически значимому уменьшению постоянной времени, τ , кальциевого тока в желудочковых кардиомиоцитах наваги, акклиматизированной и к зимним, и к летним условиям (см. рис.32В). Увеличение скорости инактивации при неизменной амплитуде тока привело к уменьшению перенесенного I_{Ca} заряда через мембрану (см. рис.32Г)

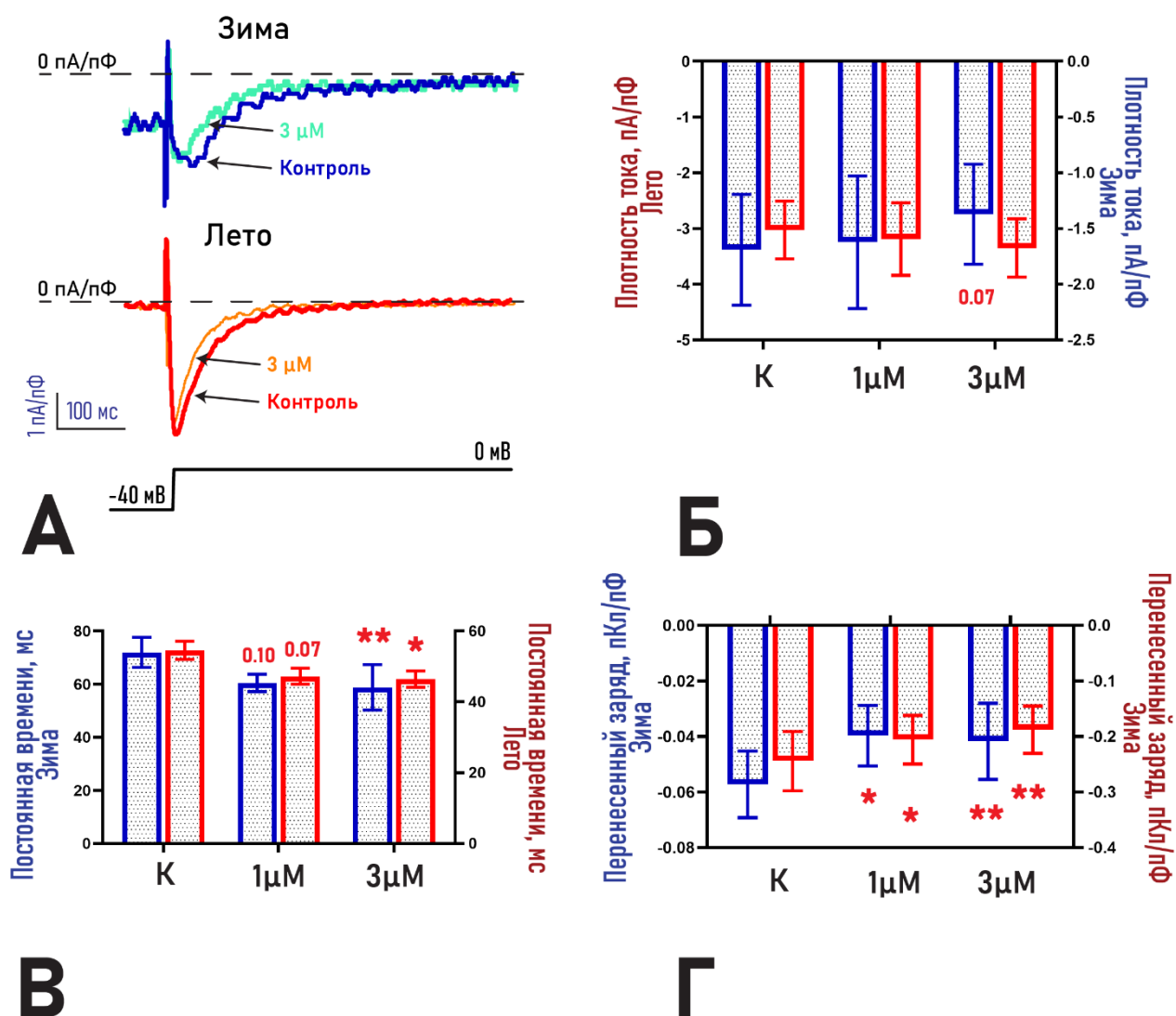


Рисунок 32. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры I_{Ca} желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*), акклиматизированной к зимним или летним условиям. (А) Оригинальные записи I_{Ca} желудочковых кардиомиоцитов рыб, акклиматизированных к зимним и летним условиям в контрольных условиях (синий и красный цвет соответственно) и в присутствии 3-МФ различной концентрации (зеленые и оранжевые оттенки соответственно). На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Б) Влияние 3-МФ различной концентрации на плотность I_{Ca} . (В) Влияние 3-МФ различной концентрации на константу времени I_{Ca} . (Г) Влияние 3-МФ различной концентрации на величину переносимого заряда I_{Ca} . Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * или ** означают наличие статистически значимой разницы между группами с $p < 0,05$ или $p < 0,01$ соответственно в тесте mixed-effects - ANOVA с апостериорным тестом Данна. Левая ось Y используется для отображения данных для желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к зимним условиям; правая ось Y используется для отображения данных для желудочковых кардиомиоцитов особей, акклиматизированных к летним условиям. $n=5-13$.

Кардиомиоциты были получены из N=8 и N=6 рыб, акклиматизированных к зимним и летним условиям соответственно.

4.5. Влияние фенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов мышцы

В целом фенантрен (Ф) оказал слабое влияние на параметры потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов мышцы (см. рис.38А). Только наибольшая используемая концентрация, 30 μM , привела к статистически значимому снижению амплитуды (от $125,2 \pm 3,05$ мВ до $120,3 \pm 4,07$ мВ, $p < 0,05$; см. рис.38Б) и максимальной скорости деполяризации (от $235,4 \pm 25,7$ мВ/мс до $218,1 \pm 25,9$ мВ/мс, $p < 0,05$; см. рис.38В). Кроме того, в присутствии 30 μM 3-МФ наблюдалось увеличение длительности ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50, от $4,2 \pm 0,45$ мс до $5,06 \pm 0,62$ мс, $p < 0,05$, см. рис.38) и 80% реполяризации (ДПД80, от $12,7 \pm 2,18$ мс до $17,2 \pm 2,54$ мс, $p < 0,05$, см. рис.38). Величина потенциала покоя при этом оставалась неизменной (данные не показаны).

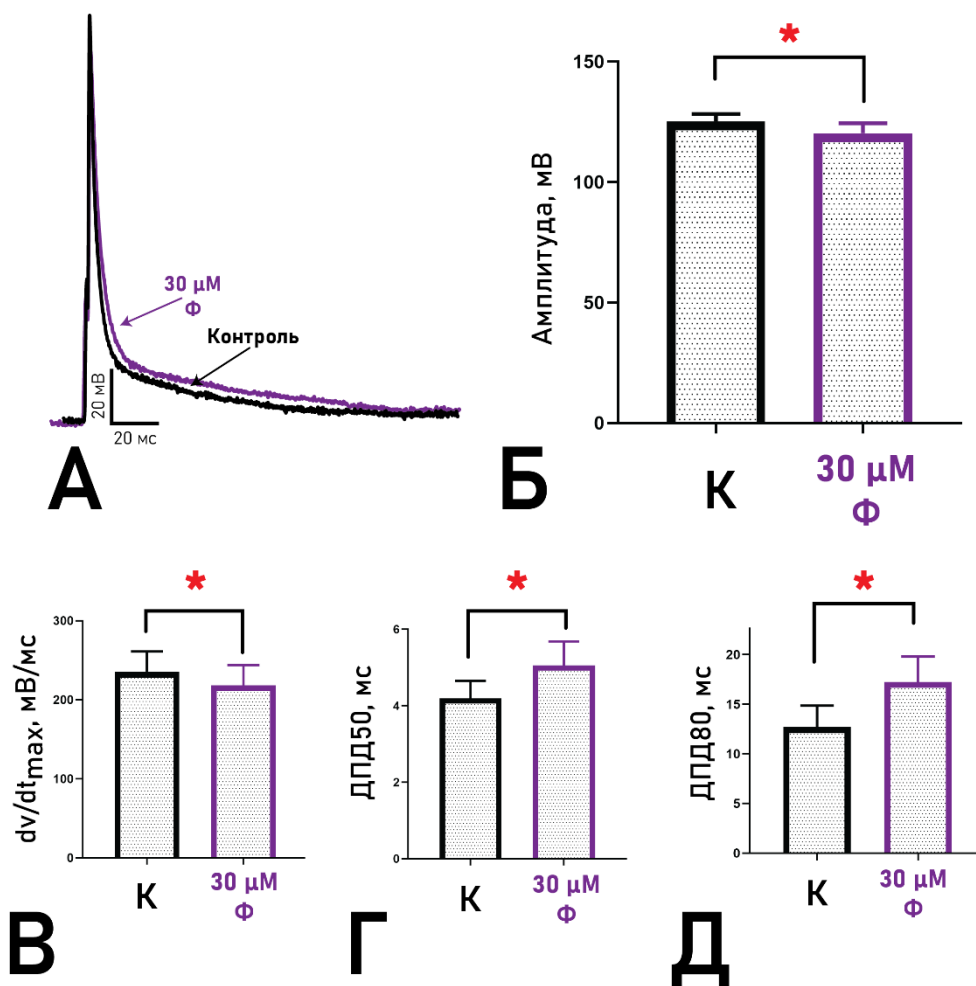
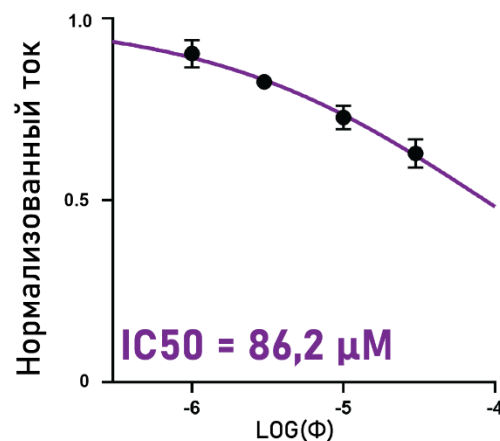
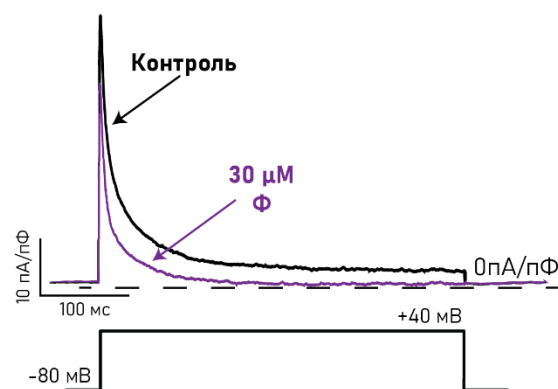


Рисунок 33. Влияние 30 μM фенантрена (Ф) на параметры потенциала действия (ПД)

желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). (А) Репрезентативные записи ПД в контрольных условиях и в присутствии 30 μM Ф. (Б) Влияние 30 μM Ф на амплитуду ПД. (В) Влияние 30 μM Ф на максимальную скорость деполяризации, dv/dt_{max} . (Г) Влияние 30 μM Ф на длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50). (Д) Влияние 30 μM Ф на длительность ПД на уровне 80% реполяризации (ДПД80). Все данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=9$ желудочковых кардиомиоцитов ($N=4$). * - $p < 0,05$ при проведении непараметрического аналога парного t-теста.

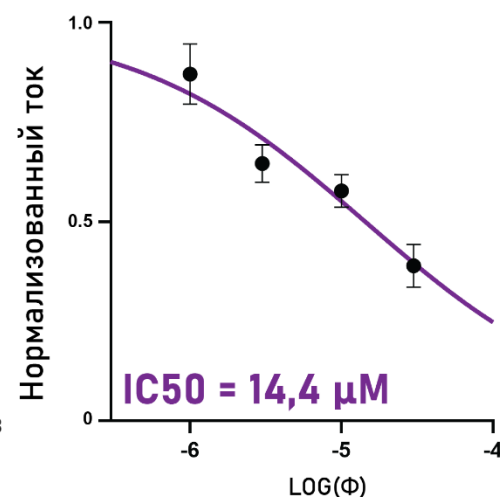
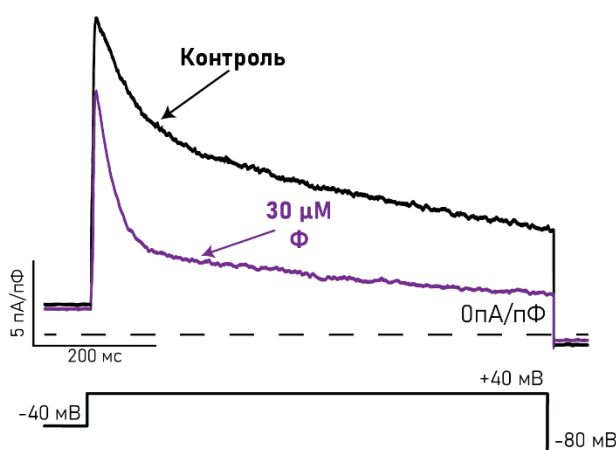
Увеличение длительности ПД под влиянием Ф указывает на то, что это соединение может ингибировать реполяризующие токи кардиомиоцита. Действительно, Ф оказал ингибирующее влияние на основные реполяризующие токи желудочковых кардиомиоцитов мыши – транзиторный калиевый ток, I_{to} , и ультрабыстрый калиевый ток, I_{Kur} (см. рис.39). При этом наиболее чувствительным к воздействию Ф оказался I_{Kur} – расчетная константа полуингибирования (IC_{50}) для него составила $14,4 \pm 3,00 \mu\text{M}$. I_{to} оказался более устойчив к влиянию Ф – IC_{50} для него составила $86,2 \pm 2,97 \mu\text{M}$, что значительно превышает пределы растворимости Ф в водных растворах.

Калиевый ток входящего выпрямления, I_{K1} , оказался нечувствительным к влиянию Ф. Даже 30 μM этого соединения не вызвало изменений параметров этого тока (см. рис.40).



А

Б



В

Г

Рисунок 34. Влияние фенантрена (Ф) на реполяризирующие калиевые токи желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). (А) Репрезентативные записи транзиторного калиевого тока – I_{to} – в контрольных условиях и в присутствии 30 μM Ф. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Б) Величина I_{to} при деполяризации до +40 мВ в присутствии Ф различной концентрации, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифра на врезке слева показывают расчетное значение константы полуингибирования. (IC_{50}). (В) Репрезентативные записи ультрабыстрого калиевого тока – I_{kur} – в контрольных условиях и в присутствии 30 μM Ф. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Г) Величина I_{to} при деполяризации до +40 мВ в присутствии Ф различной концентрации, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифра на врезке слева показывают расчетное значение константы полуингибирования. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=7-10$

кардиомиоцитов (N=6).

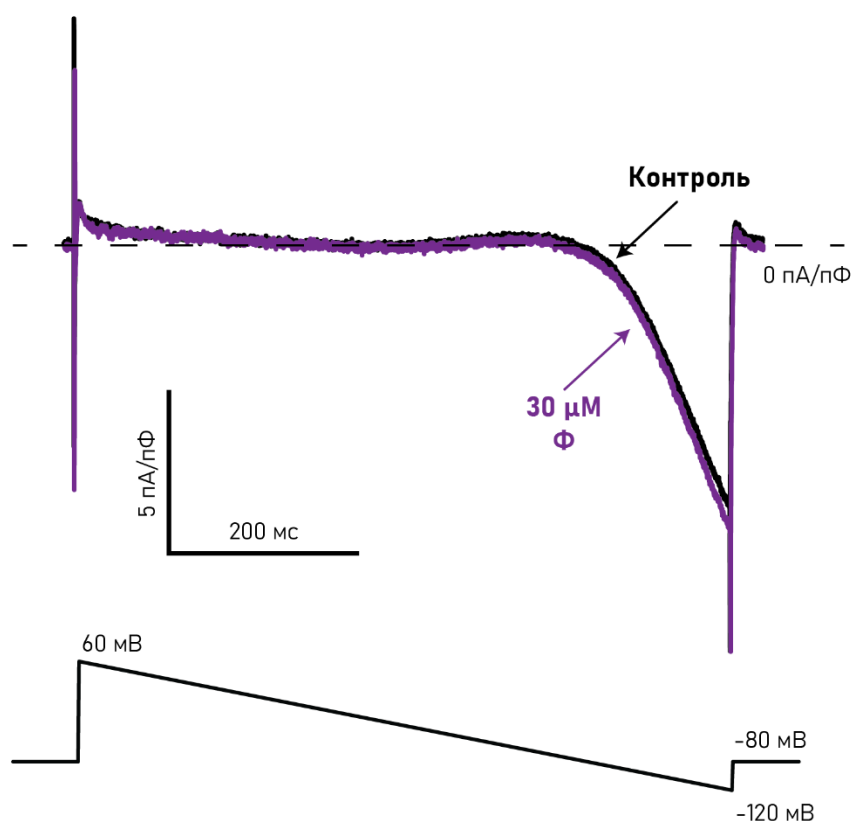


Рисунок 35. Репрезентативная запись стабилизирующего калиевого тока, I_{K1} , в контрольных условиях и в присутствии 30 μM фенантрена (Ф). На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала.

Фенантрен ингибировал основной деполяризующий ток желудочковых кардиомиоцитов – быстрый натриевый ток, I_{Na} (см. рис.41А, Б). Расчетная константа полуингибирования составила $64,3 \pm 19,3 \mu\text{M}$. Подавление этого тока объясняет снижение максимальной скорости деполяризации и амплитуды ПД под влиянием Ф.

Наконец, Ф подавлял кальциевый ток, I_{Ca} , благодаря которому поддерживается сократительная активность кардиомиоцитов (см. рис.41В, Г). Расчетная константа полуингибирования для этого тока составила $27,6 \pm 3,93 \mu\text{M}$.

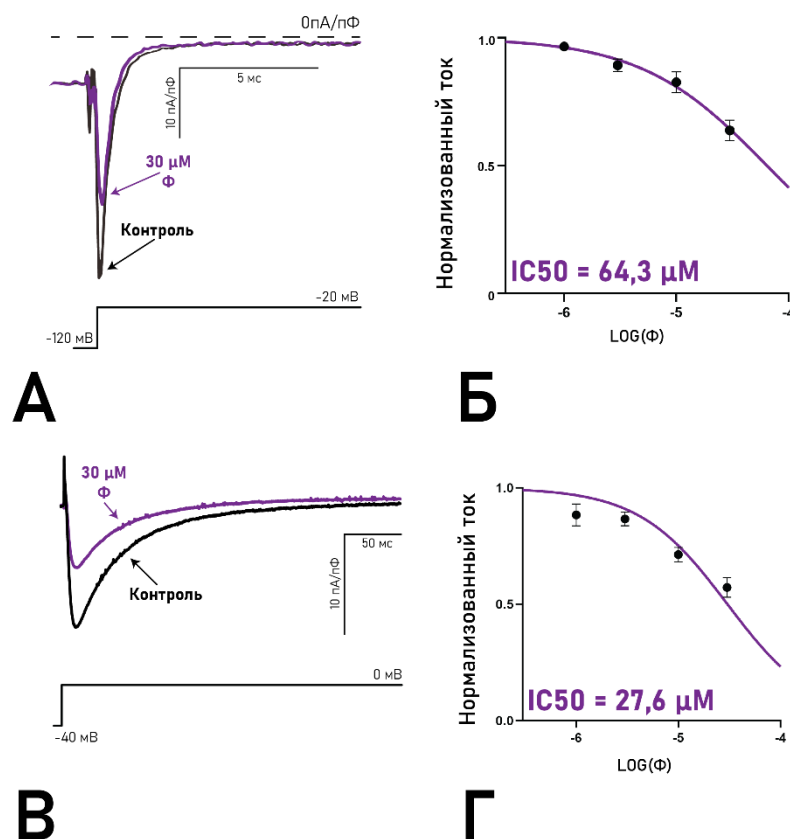


Рисунок 36. Влияние фенантрена на быстрый натриевый и кальциевый токи желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). (А) Репрезентативная запись быстрого натриевого тока, I_{Na} , при деполяризации до -20 мВ в контрольных условиях и в присутствии 30 μ M Ф. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Б) Величина I_{Na} при деполяризации до -20 мВ в присутствии Ф различной концентрации, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифры на врезке слева показывают расчетное значение константы полуингибирования (IC_{50}). (В) Репрезентативная запись кальциевого тока, I_{Ca} , в контрольных условиях и в присутствии 30 μ M Ф. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Г) Величина I_{Ca} при деполяризации до 0 мВ в присутствии Ф различной концентрации, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифры на врезке слева показывают расчетное значение IC_{50} . Данные представлены в виде среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего для $n=6-8$ кардиомиоцитов ($N=7$).

4.6. Влияние 3-метилфенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов мыши

3-метилфенантрэн (3-МФ) оказал слабое воздействие на параметры потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов мыши (см. рис.42). Так, длительность потенциала действия на уровне 50% реполяризации (ДПД50), амплитуда и потенциал покоя значительно не изменялись в присутствии всех исследуемых концентраций 3-МФ.

Тем не менее, 30 μ M 3-МФ вызвали статистически значимое увеличение длительности ПД

на уровне 80% реполяризации (ДПД80) от $7,42 \pm 1,60$ мс до $8,68 \pm 2,00$ мс ($p < 0,05$; см. рис.42В). Кроме того, 10 μM и 30 μM 3-МФ уменьшали максимальную скорость деполяризации от $237 \pm 11,1$ мВ/мс до $216 \pm 13,8$ мВ/мс и до $216 \pm 11,8$ мВ/мс соответственно ($p < 0,05$, см. рис.42Е).

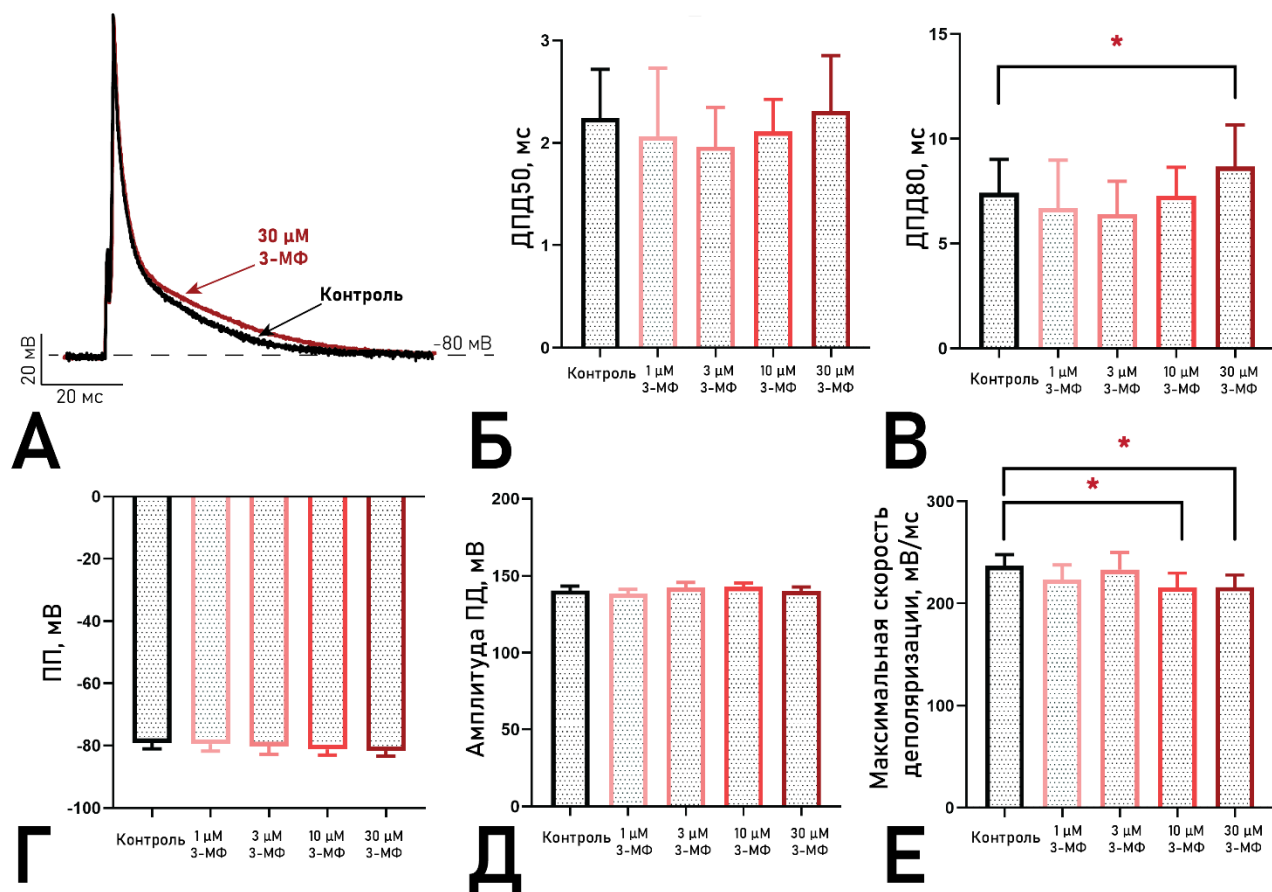


Рисунок 37. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). (А) Репрезентативные записи ПД в контрольных условиях и в присутствии 30 μM 3-МФ. (Б) Влияние 3-МФ на длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50). (В) Влияние 3-МФ на длительность ПД на уровне 80% реполяризации (ДПД80). (Г) Влияние 3-МФ на потенциал покоя (ПП). (Б) Влияние 3-МФ на амплитуду ПД. (Д) Влияние 3-МФ на максимальную скорость деполяризации. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=6-10$ желудочковых кардиомиоцитов ($N=6$). * - $p < 0,05$ при проведении однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

Плотность основных калиевых токов – транзиторного, I_{to} , и ультрабыстрого, I_{Kur} – в основном определяет длительность ПД. 3-МФ ингибировал I_{to} и I_{Kur} , а расчетные константы полуингибирования (IC_{50}) для этих токов составили $12,1 \pm 1,91$ μM и $6,50 \pm 0,90$ μM соответственно (см. рис.43).

Основной стабилизирующий ток желудочковых кардиомиоцитов, I_{K1} , оказался устойчивым к воздействию 3-МФ (см. рис.44).

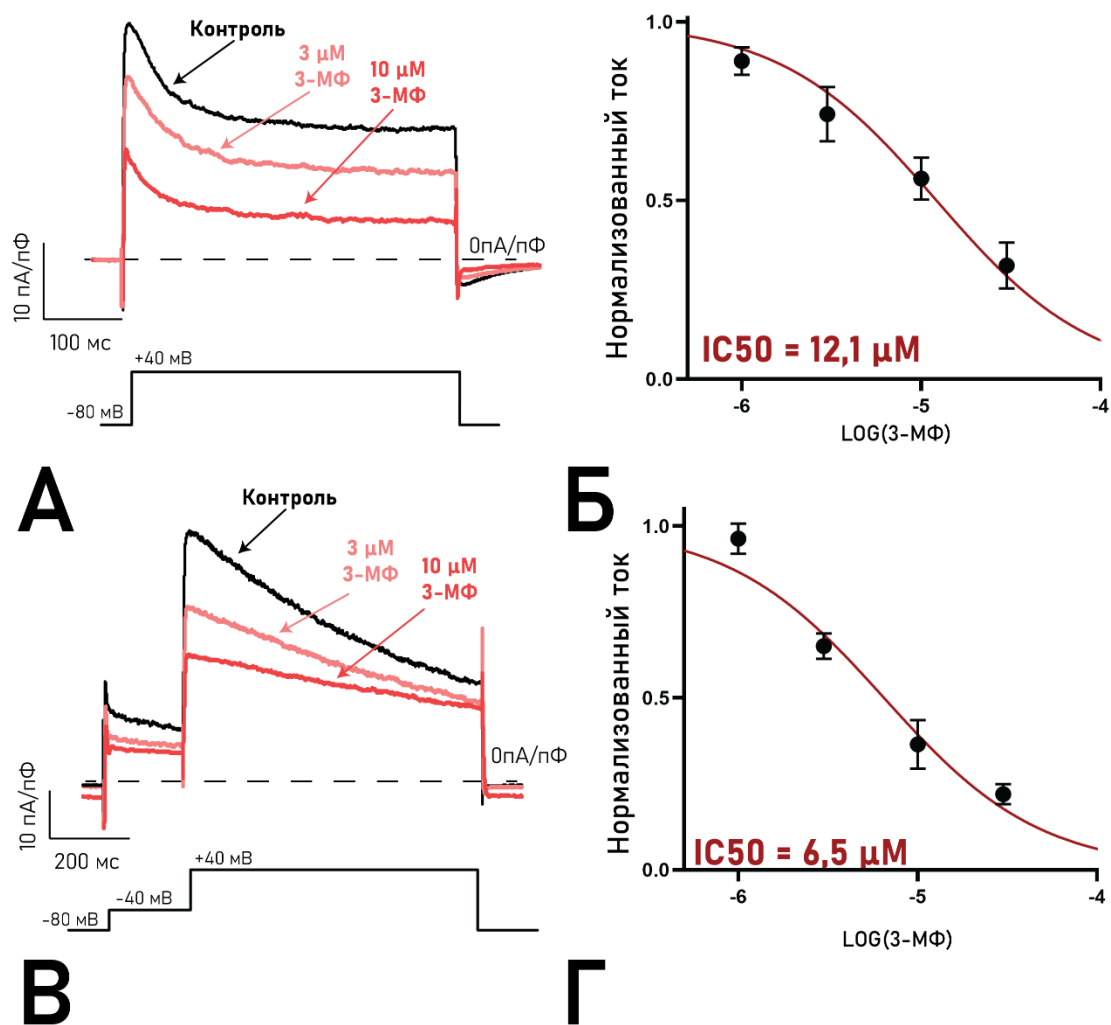


Рисунок 38. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на реполяризирующие калиевые токи желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). (А) Репрезентативные записи транзиторного калиевого тока – I_{to} – в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Б) Величина I_{to} при деполяризации до +40 мВ в присутствии 3-МФ различной концентрации, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифра на врезке слева показывают расчетное значение константы полуингибирования. (IC_{50}). (В) Репрезентативные записи ультрабыстрого калиевого тока – I_{Kur} – в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала. (Г) Величина I_{to} при деполяризации до +40 мВ в присутствии 3-МФ различной концентрации, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифра на врезке слева показывают расчетное значение константы полуингибирования. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=6-12$ кардиомиоцитов ($N=8$).

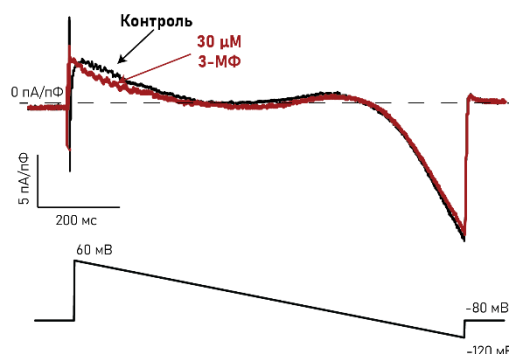


Рисунок 39. Репрезентативная запись стабилизирующего калиевого тока, I_{K1} , в контрольных условиях и в присутствии 30 μM 3-метилфенантрена. На врезке внизу указан протокол изменения мембранного потенциала.

3-МФ ингибировал быстрый натриевый ток, I_{Na} , IC_{50} составила $35,0 \pm 5,27 \mu\text{M}$ (см. рис.45А,Б,В). Кроме подавления амплитуды I_{Na} мы наблюдали дозозависимый сдвиг влево кривых активации и инактивации без изменения наклона кривых (см. рис.45Г, см. табл.11).

Таблица 10. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры стационарной активации и инактивации быстрого натриевого тока желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). Данные представлены в виде среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. ***, **** - $p < 0,001$; $p < 0,0001$ при сравнении с контрольными значениями, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Данна.

Условие	Параметры стационарной активации		Параметры стационарной инактивации	
	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)
Контроль	$-35,7 \pm 0,76$	$8,81 \pm 0,67$	$-70,7 \pm 0,75$	$-8,36 \pm 0,66$
1 μM 3-МФ	$-40,9 \pm 1,29^{**}$	$9,96 \pm 1,14$	$-79,3 \pm 1,00^{****}$	$-9,31 \pm 0,88$
3 μM 3-МФ	$-45,88 \pm 1,23^{****}$	$8,67 \pm 1,09$	$-81,9 \pm 1,29^{****}$	$-8,95 \pm 1,14$
10 μM 3-МФ	$-47,9 \pm 0,92^{****}$	$9,67 \pm 0,81$	$-85,1 \pm 0,79^{****}$	$-7,79 \pm 0,70$
30 μM 3-МФ	$-46,3 \pm 1,67^{****}$	$9,77 \pm 1,47$	$-85,7 \pm 1,25^{****}$	$-9,05 \pm 1,10$

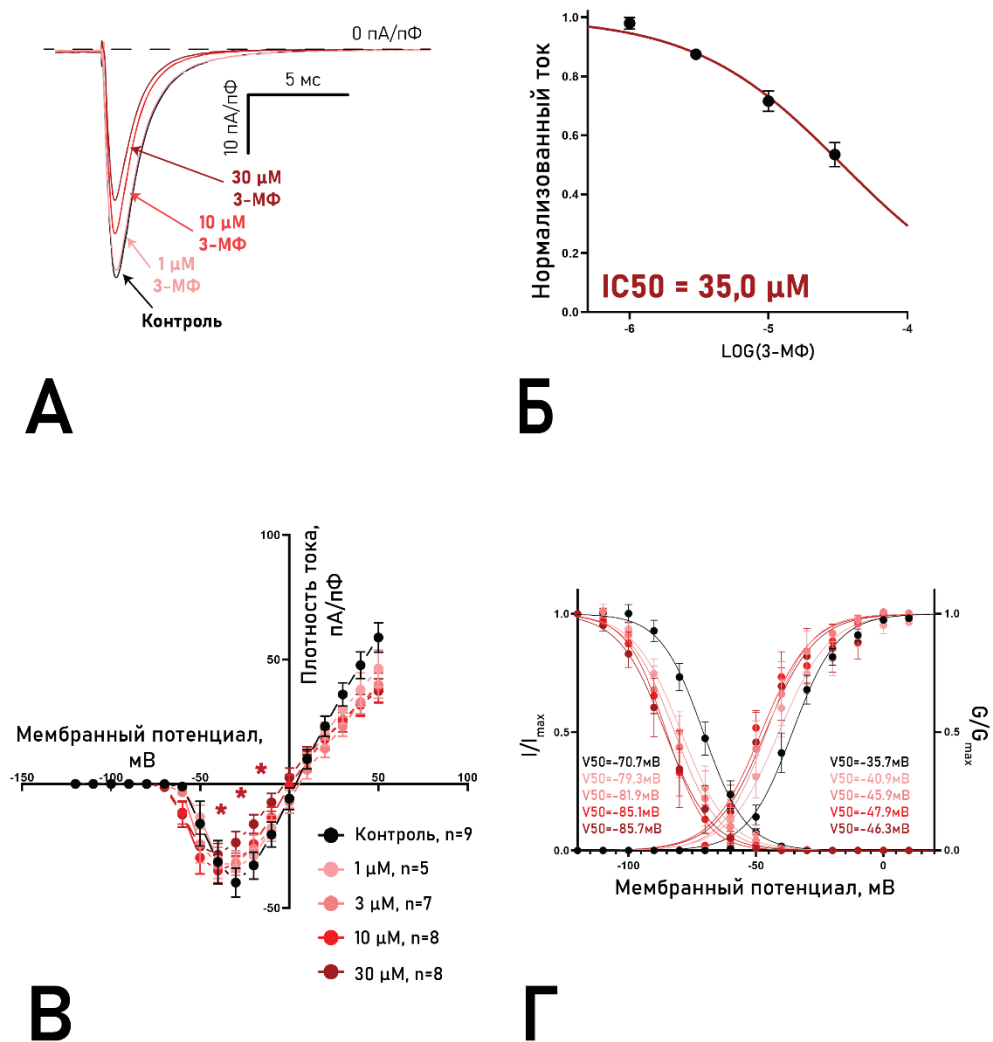


Рисунок 40. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры быстрого натриевого тока, I_{Na} , желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). (А) Репрезентативные записи I_{Na} при деполяризации до -20 мВ в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. (Б) Величина натриевого тока при деполяризации до -20 мВ в присутствии 3-МФ, нормализованная на величину тока в контрольных условиях. Цифра на врезке слева показывает значение параметра IC_{50} . Данные представлены для $n=4-7$ желудочковых кардиомиоцитов. (В) Вольт-амперная характеристика натриевого тока, I_{Na} , в контрольных условиях и в присутствии различных концентраций 3-МФ. (Г) Параметры стационарной активации и инактивации быстрого натриевого тока в контрольных условиях и в присутствии различных концентраций 3-МФ. На врезках показаны значения V_{50} стационарной активации или стационарной инактивации. Данные представлены для $n=5-8$ желудочковых кардиомиоцитов. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$, количество кардиомиоцитов указано в описании или на рисунке ($N=6$). * - $p < 0,05$ при сравнении контрольных значений со значениями амплитуды тока

в присутствии 30 μM 3-МФ. Сравнения проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

3-МФ во всех исследуемых концентрациях не изменил плотность кальциевого тока (см. рис.46А,Б,В). Тем не менее, 30 μM 3-МФ привели к статистически значимому сдвигу влево кривой стационарной активации (см. рис.46Г, табл.12) и уменьшению как медленной (соответствующая константа времени уменьшилась от $103 \pm 19,5$ мс до $52,3 \pm 3,11$ мс), так и быстрой (соответствующая константа времени уменьшилась от $21,2 \pm 2,53$ мс до $14,4 \pm 1,20$ мс) инактивации (см. рис.46Д,Е). Это означает, что скорость инактивации I_{Ca} значительно увеличивается в присутствии 3-МФ.

Для более детального исследования влияния 3-МФ на процессы инактивации кальциевого тока мы провели две дополнительные серии экспериментов – (1) с заменой ионов кальция во внешнем растворе на ионы бария и (2) с предварительной инкубацией желудочковых кардиомиоцитов с рианодином (10 μM).

3-МФ в обеих сериях экспериментов не оказывал влияния на плотность тока при деполяризации до 0 мВ (см. рис.47А,Б; рис.48А,Б), но при этом 30 μM 3-МФ приводили к уменьшению как медленной, так и быстрой инактивации в обеих сериях экспериментов (см. рис.47В,Г; рис.48В,Г).

Таблица 11. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры стационарной активации кальциевого тока, I_{Ca} , желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). ** - $p < 0,01$ при сравнении с контрольными значениями, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Данна.

Условие	Параметры стационарной активации	
	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)
Контроль	$-9,85 \pm 1,20$	$6,06 \pm 1,07$
1 μM 3-МФ	$-11,2 \pm 1,44$	$5,43 \pm 1,30$
3 μM 3-МФ	$-11,2 \pm 1,55$	$5,37 \pm 1,40$
10 μM 3-МФ	$-14,1 \pm 1,61$	$5,20 \pm 1,37$
30 μM 3-МФ	$-18,0 \pm 2,27^{**}$	$5,04 \pm 2,03$

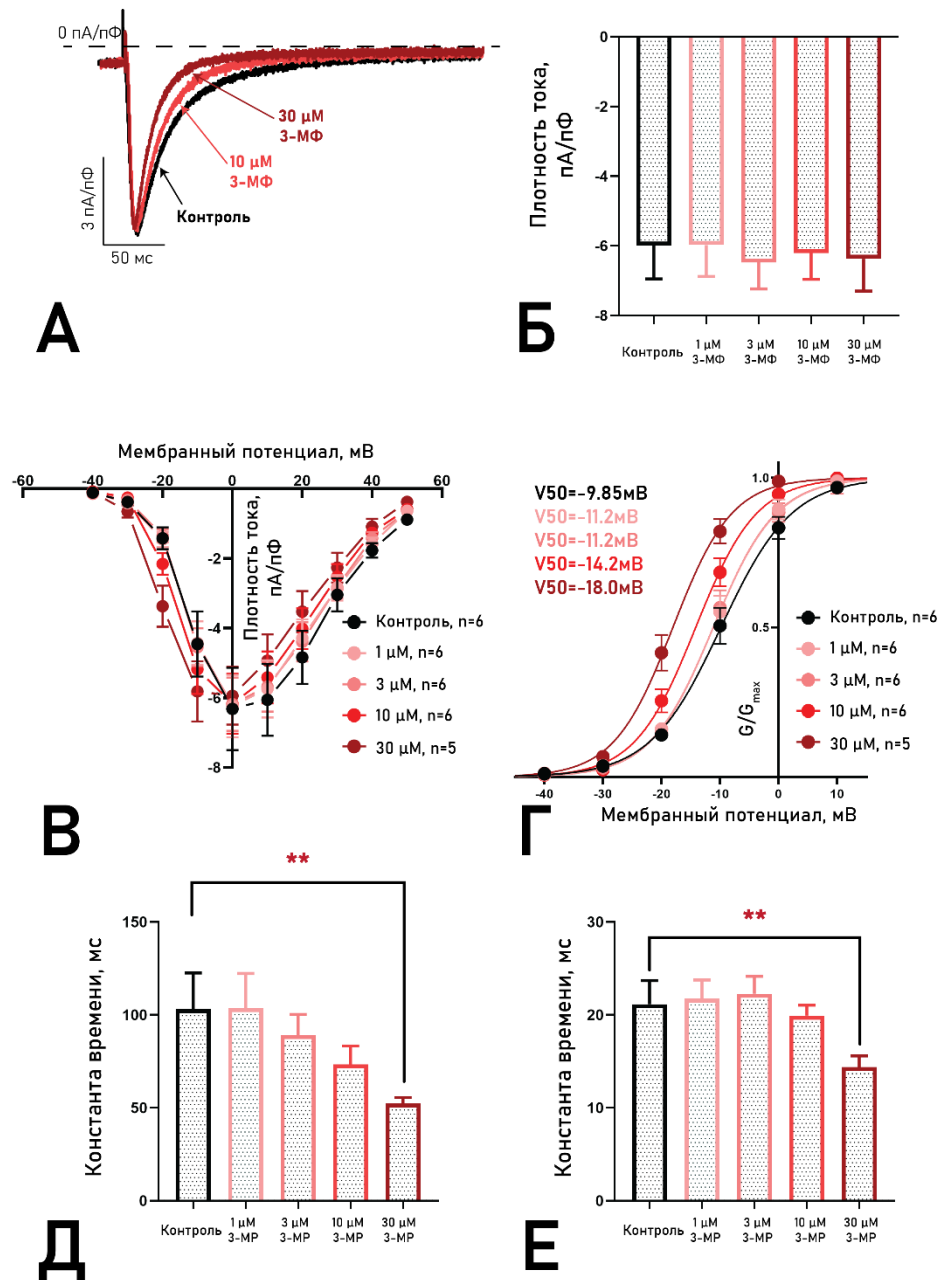


Рисунок 41. Влияние 3-МФ на кальциевый ток, I_{Ca} , желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). (А) Репрезентативные записи I_{Ca} в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. (Б) Влияние 3-МФ на плотность I_{Ca} при деполяризации до 0 мВ. (В) Влияние 3-МФ на вольт-амперные характеристики I_{Ca} . (Г) Влияние 3-МФ на параметры стационарной активации I_{Ca} . На врезке указаны средние значения параметра V50. (Д) Влияние 3-МФ на «медленную» константу времени инактивации I_{Ca} . (Е) Влияние 3-МФ на «медленную» константу времени инактивации I_{Ca} . Данные указаны в виде среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего для n=5-6 кардиомиоцитов (N=4). ** - $p<0,01$ при проведении связанного однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

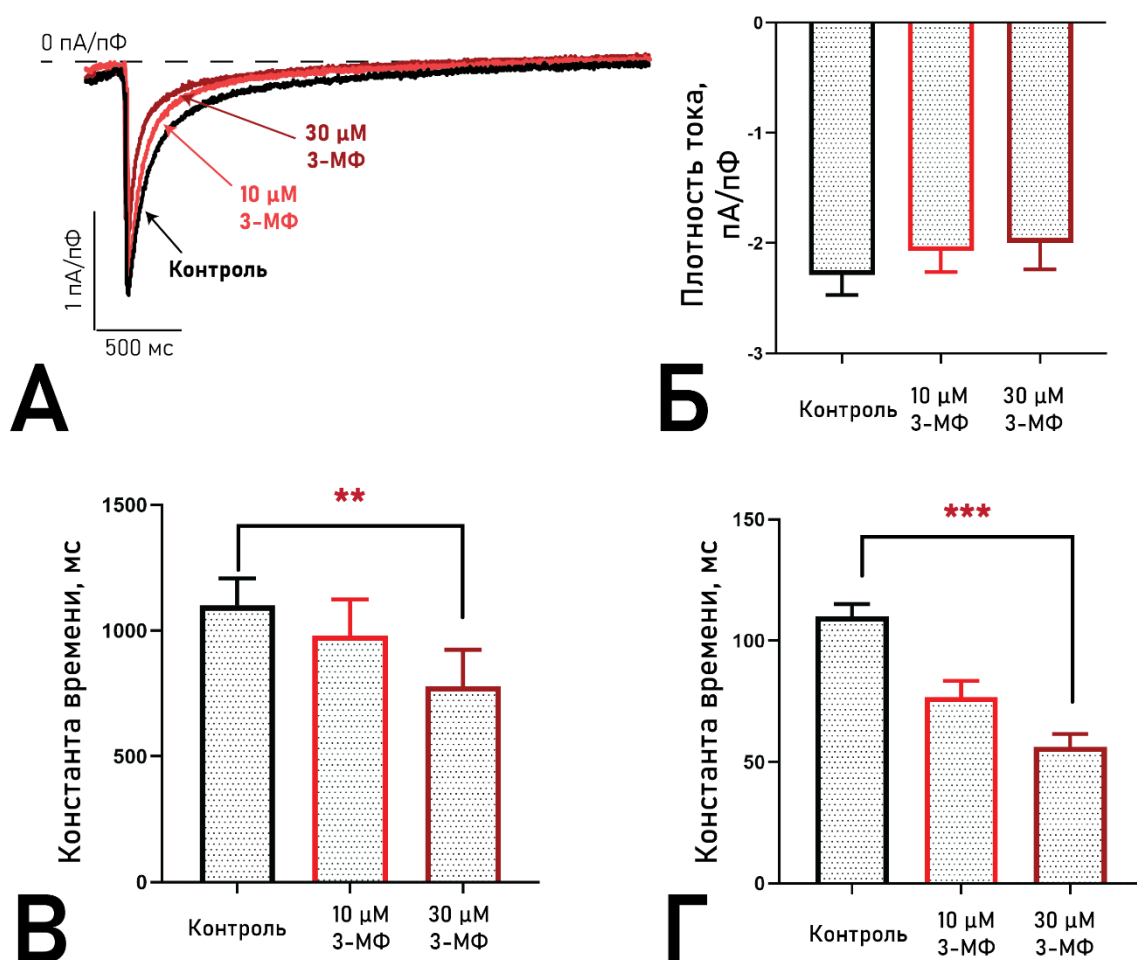


Рисунок 42. Влияние 3-МФ на бариевый ток, переносимый кальциевыми каналами, I_{Ba} , желудочковых кардиомиоцитов мыши (*Mus musculus*). (А) Репрезентативные записи I_{Ba} в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ при деполяризации до 0 мВ. (Б) Влияние 3-МФ на амплитуду I_{Ba} при деполяризации до 0 мВ. (В) Влияние 3-МФ на «медленную» константу времени инактивации I_{Ba} . (Г) Влияние 3-МФ на «медленную» константу времени инактивации I_{Ba} . Данные указаны в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=7$ кардиомиоцитов ($N=4$). ** - $p < 0,01$ при проведении связанного однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

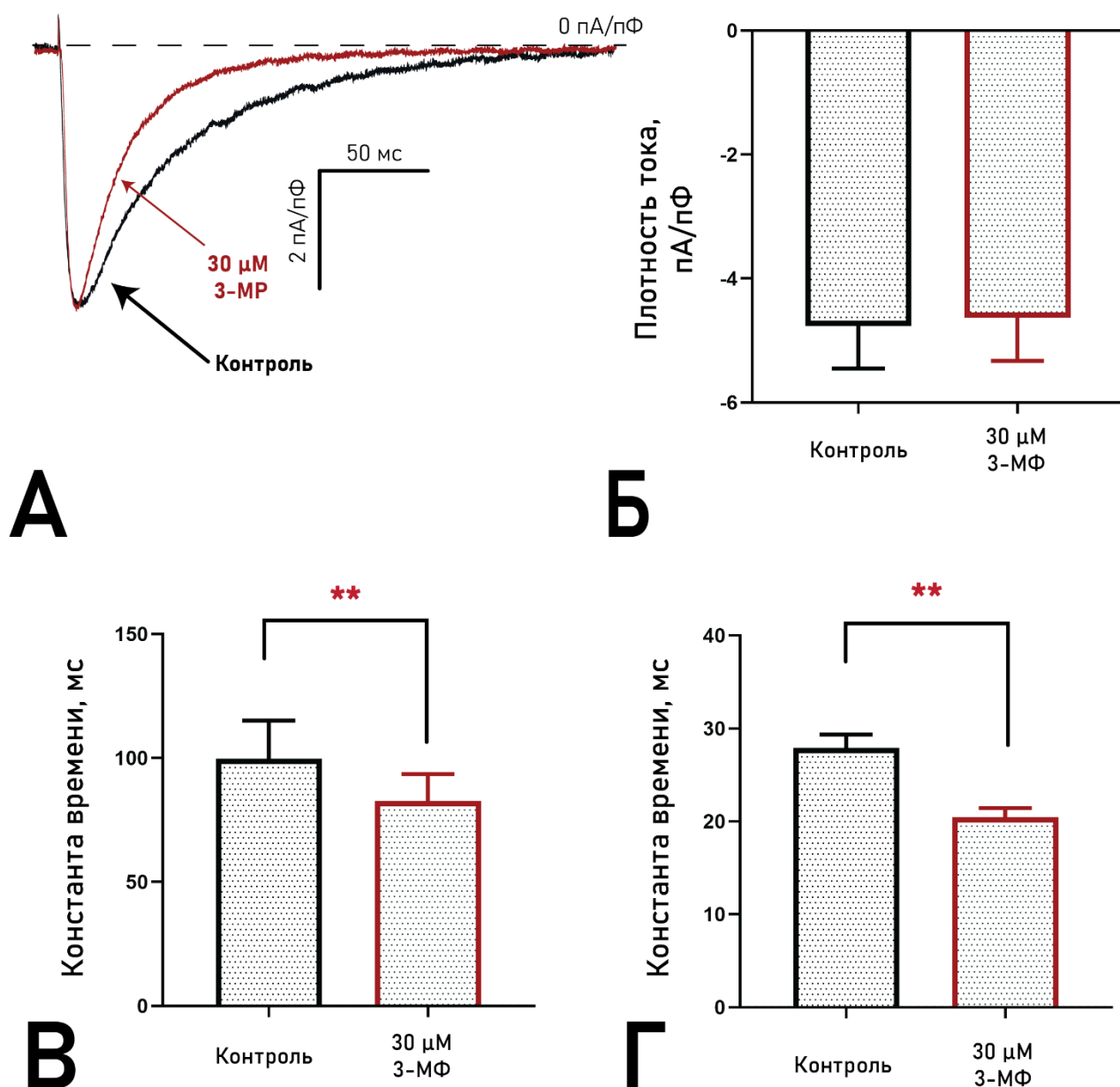


Рисунок 43. Влияние 30 μ M 3-метилфенантрена (3-МФ) на кальциевый ток, зарегистрированный после инкубации желудочковых кардиомиоцитов с 10 μ M рианоцина, $I_{Ca,Ry}$. (А) Репрезентативные записи $I_{Ca,Ry}$ в контрольных условиях и в присутствии 30 μ M 3-МФ. (Б) Влияние 3-МФ на амплитуду $I_{Ca,Ry}$ при деполяризации до 0 мВ. (В) Влияние 3-МФ на «медленную» константу времени инактивации $I_{Ca,Ry}$. (Г) Влияние 3-МФ на «медленную» константу времени инактивации $I_{Ca,Ry}$. Данные указаны в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=12$ кардиомиоцитов ($N=5$). ** - $p < 0,01$ при проведении связанного однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Данна.

4.7. Влияние 3-метилфенантрена на ионные токи, переносимые субъединицами **hERG** и **hSCN5A** гетерологической экспрессионной системы **CHO-K1**

Хвостовой ток, переносимый каналами $K_v11.1$, экспрессированными в экспрессионной системе CHO-K1, I_{hERG} , является чувствительным к действию 3-метилфенантрена (3-МФ), см. рис.49А,Б,В. Вычисленная константа полуингибирования (IC_{50}) составила $38,2 \mu M$ (см. рис. 49). $10 \mu M$ 3-МФ приводит к значимому уменьшению времени, за которое 50% каналов на мембране клеток при их деполяризации будет способно перейти в состояние активации (T_{50}) от $120,9 \pm 5,17$ мс в контрольных условиях до $99,6 \pm 1,31$ мс (см. рис.49Г).

3-МФ влиял на параметры стационарной активации и инактивации I_{hERG} – под влиянием $10 \mu M$ 3-МФ кривая стационарной активации сдвигалась вправо, а стационарной инактивации – влево (см. рис.49Д, табл.13).

Постоянную времени, описывающую процессы деактивации I_{hERG} , получали из функции Чебышева, описывающей зависимость тока I_{hERG} от времени при гиперполяризации от $+20$ мВ до -120 мВ (см. врезка, рис.49). Константа времени изменилась с $63,5 \pm 9,90$ мс в контрольных условиях до $46,3 \pm 11,1$ мс ($p < 0,01$) в присутствии $10 \mu M$ 3-МФ.

Таблица 12. Влияние $10 \mu M$ 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры стационарной активации и инактивации I_{hERG} . Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=10$ клеток (N трансфекций = 4).*, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$ в непараметрическом аналоге парного t -теста.

Условие	Параметры стационарной активации		Параметры стационарной инактивации	
	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)
Контроль	$-46,5 \pm 1,49$	$12,3 \pm 1,58$	$-79,9 \pm 1,15$	$-21,8 \pm 0,78$
$10 \mu M$ 3-МФ	$-51,3 \pm 1,53^*$	$13,1 \pm 1,75$	$-73,4 \pm 1,34^{**}$	$-22,3 \pm 1,03$

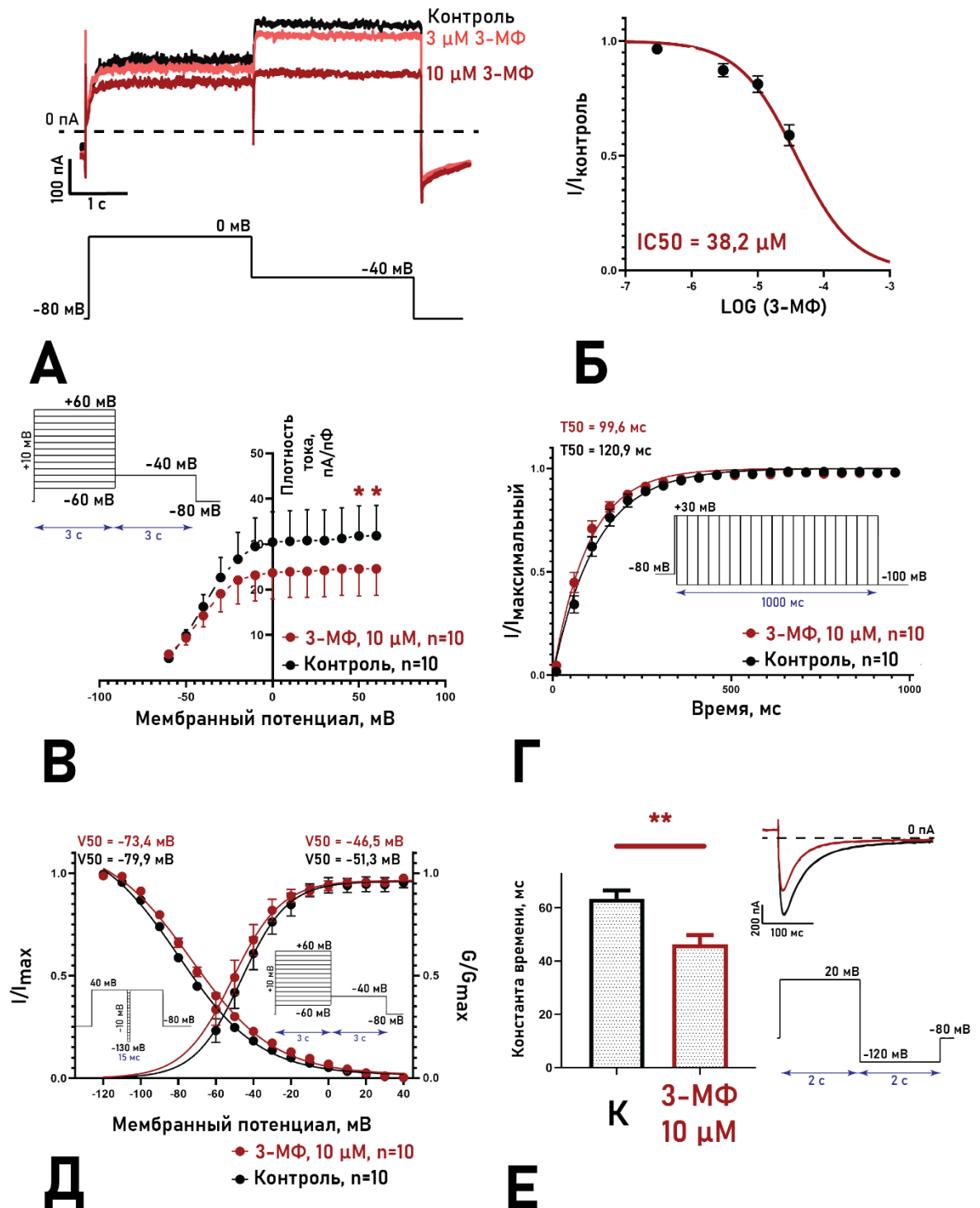


Рисунок 44. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры I_{hERG} . (А) Оригинальные записи тока I_{hERG} в контрольных условиях и в присутствии 3-МФ. Ниже указан протокол изменения потенциала. (Б) Дозозависимое влияние 3-метилфенантрена на хвостовой ток I_{hERG} , индуцированный деполяризацией до -40 мВ. Цифра над средним значением указывает на количество клеток в выборке. На врезке указано расчетное значение константы полуингибирования (IC_{50}). (В) Влияние 10 μM 3-МФ на вольт-амперную характеристику

хвостового тока I_{HERG} . * - $p < 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака. На врезке указан протокол изменения потенциала. (Г) Влияние $10 \mu\text{M}$ 3-МФ на кинетику активации I_{HERG} . Указаны T_{50} в контрольных условиях (черным) и в присутствии $10 \mu\text{M}$ 3-метилфенантрена (красным). Параметры моделей (линии соответствующих цветов) значительно отличаются, $p < 0,001$, F-тест суммы квадратов. (Д) Влияние $10 \mu\text{M}$ 3-МФ на параметры стационарных активации и инактивации I_{HERG} . На врезках казаны средние значения P_{50} и протоколы изменения потенциала. (Е) Влияние $10 \mu\text{M}$ 3-МФ на постоянную времени, описывающую процессы деактивации. ** - $p < 0,01$, парный тест Вилкоксона. На верхней врезке приведен пример оригинальной записи тока I_{HERG} при гиперполяризации до -120 мВ в контрольных условиях (черная линия) и в присутствии $10 \mu\text{M}$ 3-МФ (красная линия). На нижней врезке указан протокол изменения потенциала. Везде данные указаны в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартное отклонение}$ для $n=5-10$ клеток ($N_{\text{трансфекций}}=7$).

3-МФ не оказал влияния на ток, переносимый каналами $\text{Na}_v1.5$, экспрессированными в гетерологической экспрессионной системе CHO-K1, I_{hSCN5A} – даже самая большая исследованная в этой серии экспериментов концентрация, $10 \mu\text{M}$, не приводила к изменениям каких-либо параметров этого тока (см. рис.50, табл.14).

Таблица 13. Влияние $10 \mu\text{M}$ 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры стационарной активации и инактивации I_{hSCN5A} . Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=5$ клеток ($N_{\text{трансфекций}} = 3$).

Условие	Параметры стационарной активации		Параметры стационарной инактивации	
	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)	V50, мВ	Наклон кривой (Slope)
Контроль	$-42,8 \pm 7,10$	$9,74 \pm 1,58$	$-88,5 \pm 4,67$	$-8,33 \pm 2,68$
$10 \mu\text{M}$ 3-МФ	$-45,7 \pm 4,78$	$9,09 \pm 1,75$	$-90,1 \pm 4,80$	$-7,76 \pm 2,61$

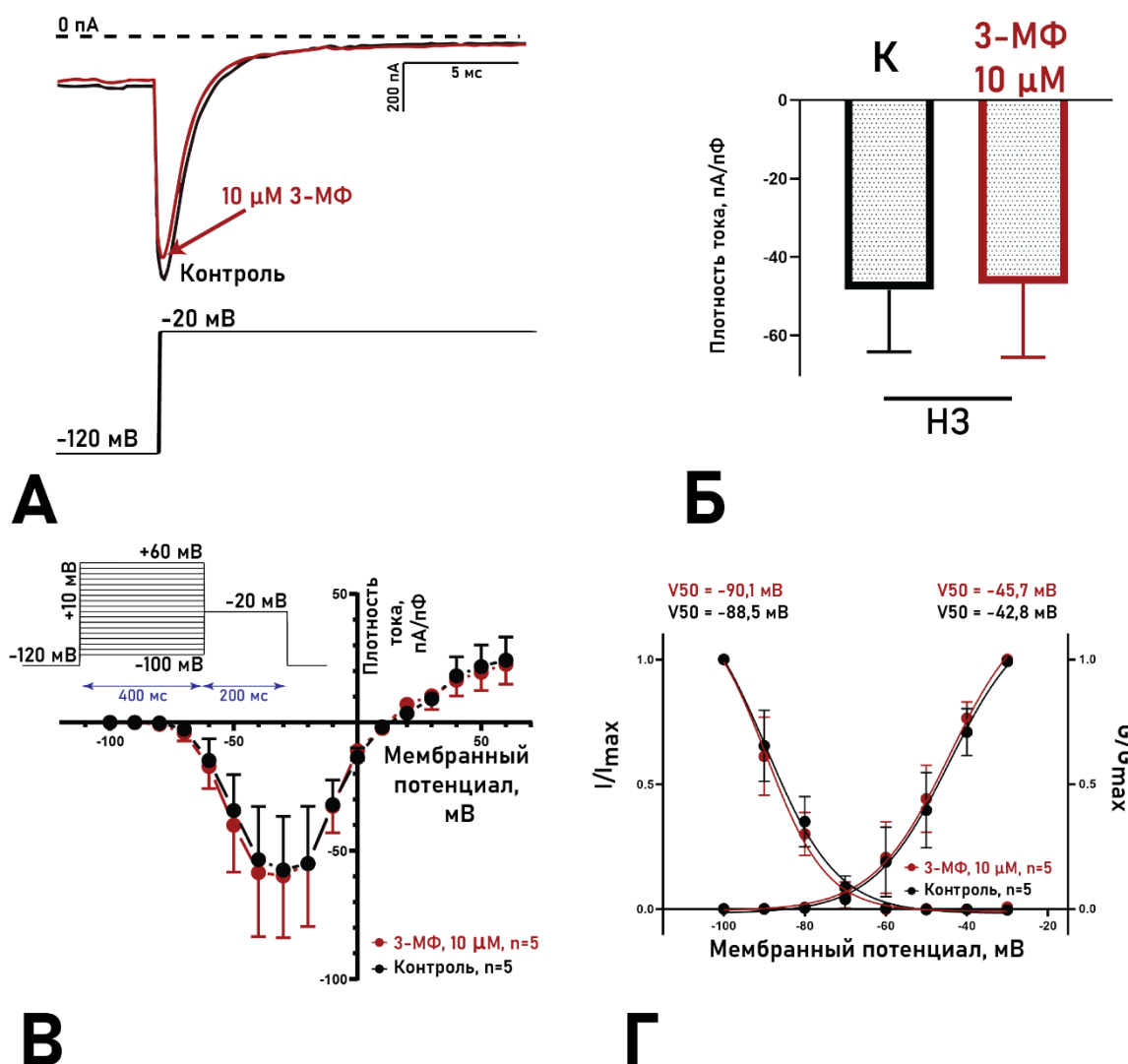


Рисунок 45. Влияние 3-метилфенантрена (3-МФ) на параметры I_{hSCN5A} . (А) Оригинальные записи тока I_{hSCN5A} в контрольных условиях и в присутствии 10 μМ 3-МФ. Ниже указан протокол изменения потенциала. (Б) Влияние 3-МФ на I_{hSCN5A} , индуцированный деполяризацией до -20 мВ. НЗ - отсутствие значимых различий согласно парному тесту Вилкоксона. (В) Влияние 3-МФ на вольт-амперную характеристику тока I_{hSCN5A} . На врезке указан протокол изменения потенциала. (Г) Влияние 3-МФ на параметры стационарной активации и инактивации. Все данные указаны в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$ для $n=5-7$ клеток ($N_{\text{трансфекций}}=5$).

5. ОБСУЖДЕНИЕ

5.1. Водорастворимая фракция нефти подавляет электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*)

Техногенные катастрофы и небольшие рутинные утечки нефти и ее производных при транспортировке являются одним из основных источников загрязнения Мирового Океана. При этом в водной фазе оказываются растворены преимущественно «легкие» полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – нафтаген, флуорен, фенантрен и их производные, суммарное содержание которых может колебаться от 170,7 мкг/л до 2176,4 мкг/л в зависимости от марки нефти [215]. Эти соединения способны накапливаться в тканях животных, обитающих в зараженных регионах. Так, после инкубации африканского сома (*Clarias gariepinus*) в 1% нефти в течение 20 дней, суммарное содержание ПАУ в тканях составила 10,8 мкг/кг [199]. В основном ПАУ накапливаются в печени, жировой и мышечной тканях [197, 198, 232, 270]. Для 10% раствора водорастворимой фракции нефти (ВРФ) в наших экспериментах было показано суммарное содержание ПАУ в пределах 3,2 мкг/л [76]. Таким образом, даже максимальная использованная концентрация ВРФ в нашем эксперименте соответствует тем концентрациям ПАУ, которые могут накапливаться в тканях животных.

Итак, среди всех исследованных токов желудочковых кардиомиоцитов наваги наиболее чувствительным к действию ВРФ оказался быстрый калиевый ток задержанного выпрямления, I_{Kr} ($IC_{50}=3,2\%$). Исследованные отдельные ПАУ обладали схожими эффектами – фенантрен [10, 78, 149], 3-метилфенантрен [77] и флуорен [7] блокировали I_{Kr} в достаточно низких концентрациях. Этот ток в основном определяет длительность потенциала действия (ПД) рабочих кардиомиоцитов рыб. В соответствии с этим, длительность ПД желудочковых кардиомиоцитов наваги в нашем эксперименте статистически значимо увеличивалась под влиянием 1% и 10% ВРФ.

Кальциевый ток, I_{Ca} , обладал меньшей чувствительностью к ВРФ ($IC_{50}=10,6\%$). Тем не менее, 10% раствор ВРФ уменьшал его амплитуду практически вдвое. Этот ток критически важен для выполнения рабочими кардиомиоцитами их основной задачи – сокращения. Снижение амплитуды I_{Ca} в отдельных кардиомиоцитах может приводить к снижению ударного объема целого сердца и, соответственно, нарушениям кровообращения. Такие изменения могут быть наиболее критическими при температурной акклиматизации или при адаптации к физическим нагрузкам [137, 222].

Устойчивым к действию ВРФ оказались быстрый натриевый ток, I_{Na} , и стабилизирующий ток, I_{K1} . В соответствии с этим, максимальная скорость деполяризации, амплитуда ПД и потенциал покоя остались неизменными даже в присутствии 10% ВРФ. Отсутствие влияния ВРФ на амплитуду натриевого тока оказалось для нас несколько неожиданным, поскольку

исследованные отдельные ПАУ оказывали ингибирующее влияние на I_{Na} – такой эффект описан для фенантрена [10] и 3-метилфенантрена [77], флуорена [7].

Почему же эффекты ВРФ нефти несколько отличаются от эффектов отдельных ПАУ, входящих в ее состав? Во-первых, если суммарная концентрация всех ПАУ в 10% ВРФ нефти марки Urals составляет 3,2 $\mu\text{г/л}$ [76], то концентрация отдельных элементов, например, 3-метилфенантрена, не может превышать ~ 17 нМ. Такая концентрация достаточна для частичной блокады I_{Kr} , поскольку IC_{50} для 3-метилфенантрена и этого тока составляет ~ 500 нМ (см. ниже). С другой стороны, IC_{50} для I_{Na} и 3-метилфенантрена составляет ~ 8 $\mu\text{М}$ (см. ниже), и 17 нМ этого соединения не смогут оказать значимого влияния на I_{Na} . Поэтому малая концентрация отдельных трициклических ПАУ все еще оказывает влияние на реполяризирующий ток, но не влияет на I_{Na} . Во-вторых, эффекты смеси ПАУ не обязательно аддитивны эффектам всех своих компонентов. Хотя в литературе не существует исследований, касающихся изучения такой аддитивности в кардиомиоцитах, имеются данные для гепатоцитов рыб. Так, добавление неканцерогенных ПАУ к канцерогенным усиливает генотоксический эффект последних в первичных культурах гепатоцитов морского леща (*Sparus aurata*) [41].

5.2. Влияние фенантрена и 3-метилфенантрена на ионные токи и конфигурацию потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов северной наваги

Трициклические ПАУ, особенно фенантрен (Ф) и его производные, являются наиболее представленными соединениями ВРФ [215], поэтому мы отдельно исследовали влияние этих компонентов на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов.

Фенантрен и 3-метилфенантрен (3-МФ) ингибировали основной реполяризирующий ток желудочковых кардиомиоцитов наваги, I_{Kr} . Подобный эффект показан для фенантрена у других видов рыб. Так, фенантрен блокирует I_{Kr} желудочковых кардиомиоцитов желтоперого тунца [44], данио-рерио [149], трески [79] и керчака [78]. Следует отметить, что, по нашим данным, ток I_{Kr} обладал разной чувствительностью к исследованным соединениям. Вычисленная константа полуингибирования (IC_{50}) для 3-МФ составила ~ 500 нМ, что существенно меньше IC_{50} , вычисленной для Ф (1,95 $\mu\text{М}$). Эти данные согласуются с влиянием Ф и 3-МФ на длительность ПД. Так, длительность ПД статистически значимо увеличивалась в присутствии уже 1 $\mu\text{М}$ 3-МФ. Для увеличения длительности ПД в присутствии Ф требовалась на порядок большая концентрация – 10 $\mu\text{М}$. Таким образом, 3-МФ оказался более эффективным ингибитором тока I_{Kr} .

Каким образом фенантрен и его производные взаимодействуют с каналами, переносящими ток I_{Kr} ? Исследований о взаимодействии ПАУ с потенциалзависимыми каналами рыб на уровне «лиганд-белок» не существует. Но структура поровых участков каналов, переносящих I_{Kr} , остается консервативной среди позвоночных животных [128], поэтому мы рассмотрим влияние Ф и 3-МФ на $K_{v1.1}$ человека.

В статье Al-Moubarak [19] было изучено взаимодействие Φ с каналами, переносящими ток I_{Kr} , в гетерологической экспрессионной системе НЕК-293Т. Исследование проводили в том числе с помощью сайт-направленного мутагенеза и компьютерного моделирования. Оказалось, что Φ не взаимодействует с «классическими» аминокислотами Y652, F656 поры канала, а связывается с аминокислотами F557 и M651 располагающимися сбоку от поры. Кажется, что Φ – одно из немногих соединений, для которых не описано взаимодействие с ароматическими аминокислотами центральной полости внутренней поры.

Почему же 3-МФ более эффективно блокирует I_{Kr} ? Метильная группа, появляющаяся у этого соединения, может облегчать его взаимодействие с «классическими» ароматическими аминокислотами центральной полости внутренней поры – Y652, F656, и с аминокислотами селективного фильтра канала - T623, S624, V625 [53, 72, 134].

И Φ , и 3-МФ, блокировали основной деполяризующий натриевый ток (I_{Na}) желудочковых кардиомиоцитов, но с разной эффективностью. 10 μ М Φ смогли подавить ~17% от максимальной амплитуды тока, в то время как 10 μ М 3-МФ уменьшили амплитуду этого тока вдвое. Для данио-рерио, радужной форели и трески не было показано уменьшения максимальной скорости деполяризации под влиянием Φ – соответственно, ток, определяющий эту фазу, I_{Na} , также являлся устойчивым к Φ [79, 149, 241]. С другой стороны, Φ подавлял I_{Na} в желудочковых кардиомиоцитах керчака и мыши [78, 264]. Поэтому мы можем сказать, что эффекты Φ в целом являются видоспецифичными. Согласно результатам этой диссертационной работы 3-МФ способен подавлять натриевый ток желудочковых кардиомиоцитов как наваги, так и мыши. В то же время 3-МФ не оказывает влияния на ток, переносимый порообразующими субъединицами $Na_v1.5$ человека.

Насколько мы знаем, в литературе не описаны молекулярные механизмы взаимодействия (на уровне «лиганд-белок») ПАУ с потенциалзависимыми натриевыми каналами рыб. Однако многое известно о наиболее распространенных механизмах связывания лекарственных средств с потенциалзависимыми натриевыми каналами млекопитающих. Во-первых, вещества с ароматическими кольцами могут связываться с аминокислотами центральной полости, которая формируется сегментами S6 каждого из четырех доменов канала. Во-вторых, гидрофобные соединения, после предварительного растворения в плазматической мембране, могут встраиваться в боковые промежутки между сегментами S5 и S6. Наконец, некоторые вещества связываются с частью центральной полости, наиболее приближенной к селективному фильтру [60, 194, 200, 234]. Большинство соединений, связывающихся с центральной полостью или с боковыми промежутками, уменьшают амплитуду тока и стабилизируют инактивированное состояние канала, вызывая сдвиг кривой стационарной активации или инактивации влево [152, 196]. Основные эффекты Φ и 3-МФ связаны со снижением амплитуды натриевого тока, а 3-МФ

также вызывает сдвиг кривых активации и инактивации влево. Поэтому, с учетом гидрофобности этих соединений, мы можем предположить, что эти вещества способны связываться с боковыми промежутками между сегментами S5 и S6 после предварительного растворения в плазматической мембране. Как и в случае с I_{Kr} наибольшую эффективность 3-МФ в роли блокатора I_{Na} можно объяснить наличием боковой группы, что увеличивает число возможных взаимодействий с аминокислотами потенциалзависимого натриевого канала.

Ф и 3-МФ по-разному влияли на кальциевый ток желудочковых кардиомиоцитов. Так, Ф оказался не очень эффективным ингибитором кальциевого тока – только в концентрации 30 μM он подавлял ток на ~30%. Кальциевый ток желудочковых кардиомиоцитов трески, радужной и коричневой форелей также оказывался слабо чувствительным к влиянию Ф [16, 79, 241], в то время как для данио-рерио и тихоокеанского голубого тунца отмечено существенное ингибирование этого тока даже небольшими исследованными концентрациями Ф [44, 149]. Поэтому влияние Ф на кальциевый ток можно считать видоспецифичным. 3-МФ менее изучен – так, согласно нашему знанию литературы, его влияние на электрическую активность кардиомиоцитов или сократимость миокарда изучали только на примере северной наваги. В нашем исследовании 3-МФ не изменил амплитуду кальциевого тока, но существенно ускорил его инактивацию. К сожалению, по результатам нашего исследования на кардиомиоцитах наваги невозможно точно сказать, произошло увеличение скорости потенциал-зависимой или кальций-зависимой инактивации кальциевого тока.

Среди наиболее изученных препаратов росковитин обладает схожим влиянием на I_{Ca} . Хотя это соединение является экспериментальным средством против некоторых видов онкологических заболеваний и относится к классу блокаторов циклин-зависимых киназ, оказалось, что он также способен блокировать некоторые ионные токи, в том числе $I_{Ca,L}$ [268]. Росковитин незначительно подавляет пиковый ток, но значительно увеличивает скорость потенциал-зависимой инактивации канала. Согласно нескольким исследованиям, это соединение связывается с нестандартным внеклеточным сайтом в области первого домена порообразующей α -субъединицы кальциевого канала [267, 268].

Влияние фенантрена и 3-метилфенантрена на электрическую активность рабочих кардиомиоцитов желудочков представлены на рис.51. Ввиду различной чувствительности отдельных токов к этим соединениям, они с разной эффективностью изменяли конфигурацию потенциала действия. Так, фенантрен в концентрации 3 μM вызывал лишь незначимые изменения длительности ПД. В то же время 3-метилфенантрен в той же концентрации с одной стороны увеличивал длительность ПД, с другой – уменьшал максимальную скорость деполяризации и амплитуду, вызывая значительные изменения конфигурации ПД.

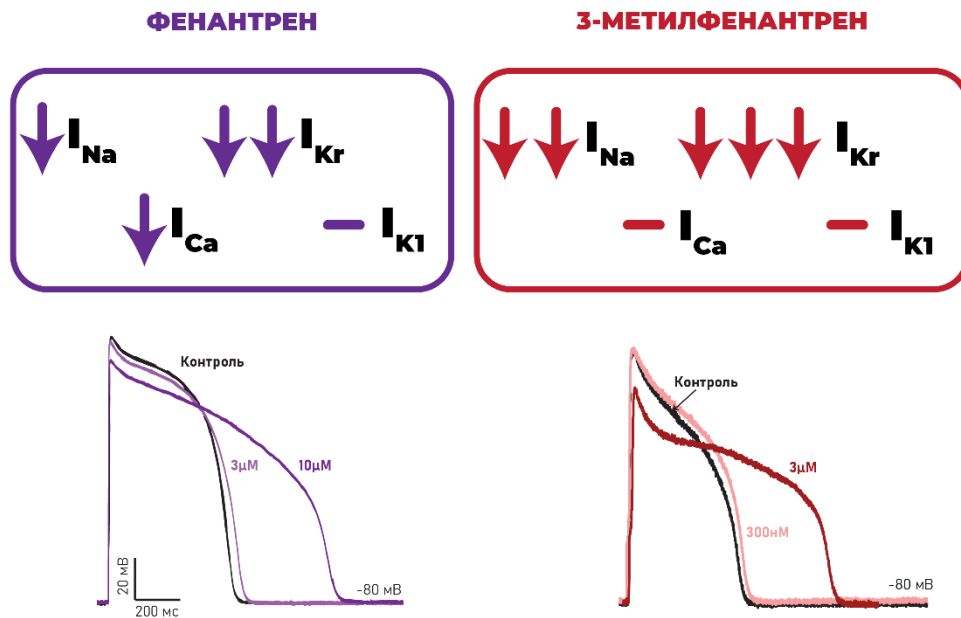


Рисунок 46. Сравнение чувствительности пиковой амплитуды основных ионных токов желудочковых кардиомиоцитов наваги к фенантрено или 3-метилфенантрено. Количество стрелок отражает относительную чувствительность данного тока к соответствующему соединению. Прочерк означает нечувствительность пиковой амплитуды к соответствующему веществу. Внизу приведены репрезентативные записи потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов наваги в присутствии фенантрена или 3-метилфенантрена разных концентраций.

Снижение амплитуды быстрого натриевого тока (I_{Na}) кардиомиоцитов, наблюдаемое под влиянием исследуемых ПАУ, имеет потенциально аритмогенное значение, поскольку I_{Na} является основным током, формирующим фазы 0 деполяризации потенциала действия, и определяет максимальную скорость деполяризации ($(dV/dt)_{max}$) и, следовательно, скорость проведения возбуждения (θ) по миокарду. Замедление θ является важным субстратом для развития реентри-возбуждений и других аритмических механизмов, поскольку нарушение синхронности проведения повышает вероятность возникновения патологических циркуляций волны возбуждения и функциональных блокад возбуждения в тканях сердца [143]. В клинических и экспериментальных моделях уменьшение I_{Na} вследствие нарушения функции натриевых каналов, включая мутации в гене *SCN5A*, ассоциируется с замедлением проведения, снижением возбудимости и повышенным риском желудочковых и предсердных аритмий [20]. Таким образом, снижение амплитуды I_{Na} под действием ПАУ может способствовать созданию электрофизиологического субстрата, благоприятного для аритмогенеза, особенно в сочетании с

другими воздействиями на проводящую ткань.

Увеличение длительности потенциала действия (ПД) является важнейшим, но не единственным условием развития желудочковых фибрилляций у млекопитающих – наиболее опасной формы аритмии [236]. Механизмы возникновения аритмий у эктотермных животных вообще и у рыб в частности остаются в основном неизученными. Однако известно, что увеличение длительности ПД при неизменной амплитуде кальциевого тока может приводить к развитию ранних постдеполяризаций, и такой эффект описан для ретена (одно из производных фенантрена) [246]. Такой паттерн изменения токов (подавление I_{Kr} при неизменном I_{Ca}) мы наблюдали при действии 3-МФ (см. рис.51). Таким образом, можно считать, что среди исследованных нами отдельных ПАУ наиболее ярким проаритмогенным эффектом на миокард наваги может обладать именно 3-МФ.

5.3. Акклиматизация к зимним условиям увеличивает чувствительность желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (*Eleginus nawaga*) к 3-метилфенантрону

5.3.1. Изменения электрической активности желудочковых кардиомиоцитов северной наваги при зимней акклиматизации

Полученные нами данные согласуются с ранее опубликованными данными для желудочковых кардиомиоцитов наваги (*Eleginus nawaga*) [12]. В частности, акклиматизация к зимним условиям приводила к уменьшению как ДПД50, так и ДПД90 потенциала действия, зарегистрированного при 7°C. Такое сокращение длительности потенциала действия обусловлено увеличением плотности основного реполяризирующего тока I_{Kr} .

Данный механизм уменьшения длительности ПД, по-видимому, является универсальным для различных видов рыб, включая карася (*Carassius carassius*), плотву (*Rutilus rutilus*), радужную форель (*Oncorhynchus mykiss*), щуку (*Esox lucius*), налима (*Lota lota*), окуня (*Perca fluviatilis*), тихоокеанского синего тунца (*Thunnus orientalis*) и керчака (*Myoxocephalus scorpio*) [12, 25, 75, 82, 94, 109].

У наваги при холодовой акклиматизации отмечено повышение экспрессии гена *ERG*. Вследствие увеличения числа функциональных каналов, проводящих I_{Kr} , может наблюдаться и увеличение амплитуды данного тока [94]. Кроме того, рыбы *ERG*-каналы характеризуются вариабельностью сайтов фосфорилирования на С-конце белка, что может влиять на их регуляцию протеинкиназами и играть важную роль в процессах акклиматизации [96].

Средняя плотность основного деполяризирующего, быстрого натриевого тока (I_{Na}) в кардиомиоцитах наваги, акклиматизированной к летним условиям (летняя навага) была сопоставима с ранее опубликованными значениями ($-14,9 \pm 1,50$ пА/пФ) [77]. Известно, что увеличение амплитуды I_{Na} повышает возбудимость клетки, тогда как ток I_{K1} оказывает на неё стабилизирующее влияние [245]. Мы не ожидали выявить различия в амплитуде I_{Na} между

зимней и летней навагой, поскольку максимальная скорость деполяризации и амплитуда потенциала действия оставались неизменными. Действительно, амплитуда I_{Na} при всех исследованных потенциалах практически не различалась между сезонами. Аналогично, сезонная акклиматизация не влияла на ток I_{K1} .

Следует отметить, что отсутствие сезонных изменений I_{Na} и I_{K1} , описанное для наваги, нельзя экстраполировать на все виды рыб. Так, у керчака при зимней акклиматизации наблюдалось значительное снижение амплитуды I_{Na} и увеличение тока I_{K1} [75].

Кроме того, в желудочковых кардиомиоцитах зимней наваги по сравнению с летней было выявлено статистически значимое смещение кривых стационарной активации и инактивации I_{Na} влево. Хотя подобные эффекты ранее не описывались для наваги, аналогичные наблюдения имеются для других видов. В частности, у радужной форели холодная акклиматизация вызывала смещение кривой стационарной активации на 6 мВ влево, что, вероятно, способствует сохранению порога возбуждения потенциала действия при более низких температурах [108].

Наблюдаемые различия могут быть связаны с экспрессией различных изоформ порообразующей субъединицы натриевого канала в сердце наваги в разные сезоны. Так, у данио-рерио в сердце преимущественно экспрессируется «медленная» изоформа $Na_v1.5$, более устойчивая к нагреванию [105], тогда как у радужной форели доминирует «быстрая» изоформа $Na_v1.4$, способная эффективно функционировать при низких температурах [106]. Токи, формируемые этими изоформами, отличаются вольт-амперными характеристиками, а также параметрами активации и инактивации [103]. Мы предполагаем, что сезонная акклиматизация у наваги сопровождается изменением набора экспрессируемых изоформ, однако данная гипотеза требует экспериментальной проверки.

В нашем исследовании было отмечено снижение плотности I_{Ca} у зимней наваги. Замедление инактивации тока не компенсировало снижение его амплитуды, в результате чего общий перенос заряда (Q_{Ca}) посредством I_{Ca} был ниже у зимних рыб. Данный результат является неожиданным, поскольку при низких температурах обычно снижается чувствительность миофиламентов к ионам кальция [89], поэтому мы ожидали увидеть увеличение плотности этого тока [88]. Тем не менее, не для всех видов рыб показано увеличение амплитуды I_{Ca} при акклиматизации к зимним условиям. Так, для карася и радужной форели было показано, что плотность I_{Ca} в желудочковых кардиомиоцитах не изменяется при термической акклиматизации, тогда как у керчака холодная акклиматизация сопровождается увеличением плотности I_{Ca} [75, 244].

Уровень Ca^{2+} в цитозоле кардиомиоцитов определяется не только потенциалзависимыми кальциевыми каналами. У ряда видов рыб зимняя акклиматизация сопровождается увеличением объема саркоплазматического ретикулула [40, 222, 223] и ускорением активности SERCA [151],

что обеспечивает поддержание запасов Ca^{2+} , необходимых для сокращения. Кроме того, нельзя исключать усиление поступления Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник при холодной акклиматизации. Мы предполагаем, что один или несколько из перечисленных компенсаторных механизмов реализуются в желудочковых кардиомиоцитах зимней наваги.

5.3.2. Чувствительность желудочковых кардиомиоцитов северной наваги к 3-метилфенантрину меняется при акклиматизации

Сезонные изменения в работе каналов, переносящих IKr , существенно влияют на их чувствительность к 3-метилфенантрину. В зимний период ток IKr был значительно более чувствителен к 3-МФ ($\text{IC}_{50} \approx 50 \text{ нМ}$), что примерно на порядок превышает чувствительность летней наваги ($\text{IC}_{50} \approx 500 \text{ нМ}$). Такая разница в чувствительности объясняет различия в влиянии 3-МФ на ПД наваги, акклиматизированной к зимним и летним условиям. Так, минимальная из протестированных концентраций 3-МФ (300 нМ) вызывала увеличение ДПД50 и ДПД90 примерно на 30% у зимней наваги и не влияла на соответствующие параметры ПД животных, акклиматизированных к летним условиям.

Объяснить такие изменения чувствительности IKr исключительно повышением уровня экспрессии гена, кодирующего порообразующую субъединицу канала, представляется затруднительным. Ток IKr формируется потенциалзависимыми продуктами генов *KCNH2* и *KCNH6* (белки называются ERG1 или ERG2 соответственно). Эти белки формируют тетрамерные комплексы, образующие пору, через которую могут проходить ионы калия. У человека основным изоформным продуктом, формирующим IKr в сердце, является $\text{K}_{v11.1}$ (продукт гена *KCNH2*, ERG1), однако для рыб ситуация не такая однозначная. Так, у карася [97] и данио-рерио [162] в сердце преобладает изоформа $\text{K}_{v11.2}$ (продукт гена *KCNH6*, ERG2). Кроме того, функциональный канал не всегда является гомотетрамером, а его свойства зависят от субъединичного состава. Показано, что чувствительность к ПАУ у гомо- и гетеротетрамерных комплексов может различаться, как это продемонстрировано для человеческих комплексов hERG1a и hERG1a/1b [19]. Можно лишь предположить, что сезонная акклиматизация приводит не только к количественным изменениям числа функциональных каналов в мембране, но и к качественным изменениям в соотношении субъединиц, формирующих поровый комплекс.

Чувствительность тока IK_1 к трициклическим ПАУ до настоящего времени не была выявлена ни у одного вида позвоночных [77, 78, 149, 264]. В соответствии с этим, ток IK_1 в желудочковых кардиомиоцитах наваги, акклиматизированной как к летним, так и к зимним условиям, оказался устойчивым к воздействию 3-МР.

Натриевый ток I_{Na} продемонстрировал более высокую устойчивость к действию 3-МФ по сравнению с IKr , однако сезонные различия сохранялись. Желудочковые кардиомиоциты зимней наваги были более чувствительны к 3-МФ, чем летней: значения IC_{50} для I_{Na} , измеренного при

–20 мВ, составили 2,39 и 7,73 μM соответственно. Мы можем лишь предполагать, что переключение преобладающих изоформ α -субъединицы потенциалзависимых натриевых каналов при сезонной акклиматизации приводит к изменению чувствительности I_{Na} к 3-МФ.

Интересно, что 3-МФ не только подавлял максимальную амплитуду I_{Na} , но и изменял параметры его активации и инактивации, вызывая дозозависимое смещение кривых стационарной активации и инактивации влево как у зимней, так и у летней наваги. По своей структуре 3-МФ сходен с низкомолекулярными анестетиками и антиаритмическими средствами (например, галофантрином и карбамазепином), которые влияют не только на амплитуду пикового тока, но и на параметры стационарной активации и инактивации, вызывая аналогичные смещения кривых [38, 71, 235]. Наличие боковой алкильной группы облегчает связывание с типичным сайтом взаимодействия с анестетиками [235], что может объяснять более выраженное влияние 3-МФ – алкилированного производного фенантрена – на I_{Na} по сравнению с родительским соединением.

Амплитуда I_{Ca} , измеренная при 0 мВ, оказалась устойчивой к воздействию 1 и 3 μM 3-МФ, что соответствует ранее полученным результатам [77]. Однако суммарный заряд, переносимый данным током, снижался вследствие ускорения инактивации. Этот эффект носил дозозависимый характер и не различался между зимней и летней навагой.

В совокупности все данные этой серии экспериментов демонстрируют сезонные изменения чувствительности I_{Kr} и в меньшей степени I_{Na} к 3-МФ и подчёркивают, что уязвимость рыб к загрязнению их среды обитания существенно варьирует в течение года вследствие сезонного ремоделирования сердца.

5.4. Влияние фенантрена и 3-метилфенантрена на ионные токи и конфигурацию потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов мыши

И фенантрен (Ф) и 3-метилфенантрен (3-МФ) подавляли основные реполярирующие токи желудочковых кардиомиоцитов мыши – транзитный калиевый ток, I_{to} , и ультрабыстрый калиевый ток, I_{Kur} . В соответствии с этим, и Ф и 3-МФ вызывали статистически значимое увеличение длительности потенциала действия (ПД). Однако реполярирующие токи проявляли различную чувствительность к Ф и 3-МФ: при концентрации 30 μM фенантрен блокировал I_{to} примерно на 40 %, а I_{Kur} – на 60 %, тогда как 30 μM 3-МФ ингибировали I_{to} на ~70% и I_{Kur} на ~80%. Таким образом, как I_{to} , так и I_{Kur} у мышинных кардиомиоцитов оказались более чувствительны к 3-МФ.

Насколько мы знаем, это единственное исследование, изучающее влияние разных ПАУ на реполярирующие токи желудочковых кардиомиоцитов грызунов. Известно, что небольшие молекулы-блокаторы этих токов преимущественно взаимодействуют с центральной полостью поры ионных каналов ($\text{Kv}4.3$, $\text{Kv}4.2$, $\text{Kv}1.4$, ответственные за I_{to} , и $\text{Kv}1.5$, переносящий I_{Kur}) [22,

100, 265]. Мы предполагаем, что и исследованные ПАУ взаимодействуют именно с этими участками канала. Скорее всего, дополнительная метильная группа 3-МФ позволяет ему формировать дополнительные связи с аминокислотами, выступающими пору канала, что стабилизирует его связь с порой – это делает 3-МФ более эффективным блокатором исследованных токов.

Как и у всех исследованных видов животных, ни Ф, ни 3-МФ не оказали влияния на стабилизирующий ток I_{K1} желудочковых кардиомиоцитов мыши.

Натриевый ток, определяющий максимальную скорость деполяризации и амплитуду ПД, оказался чувствителен и к Ф, и к 3-МФ. Тем не менее, 3-МФ оказался более эффективным блокатором этого тока – 30 μM этого соединения уменьшали амплитуду I_{Na} практически вдвое, в то время как 30 μM Ф снижали амплитуду I_{Na} только на ~40%. Подобную разницу в чувствительности I_{Na} к этим соединениям мы наблюдали в желудочковых кардиомиоцитах наваги (см. выше, раздел 5.2.). На основании этого мы можем предположить, что Ф и 3-МФ потенциально взаимодействуют с достаточно консервативным участком порообразующей субъединицы канала, поскольку разница в силе эффекта сохраняется у отдаленных групп позвоночных животных.

Как и в желудочковых кардиомиоцитах наваги (см. выше, раздел 5.2.), 3-МФ в желудочковых кардиомиоцитах мыши вызвал дозозависимый сдвиг кривых стационарной активации и инактивации влево. Это означает, что 3-МФ способен изменять величину оконного тока. Такой ток возникает в диапазоне мембранных потенциалов, где каналы с одной стороны еще не полностью закрыты, и с другой стороны не полностью инактивированы – такой диапазон мембранных потенциалов определяется перекрыванием кривых стационарной активации и инактивации каналов. Величина оконного натриевого тока напрямую связана с аритмогенностью – при этом увеличение оконного тока приводит к увеличенному риску возникновения ранних постдеполяризаций, спонтанных диастолических деполяризаций и прочих аритмогенных триггеров [31, 213].

Фенантрен и 3-МФ также по-разному воздействовали на кальциевый ток (I_{Ca}). Фенантрен вызывал дозозависимое уменьшение пиковой амплитуды I_{Ca} , что подтверждается данными исследований на наваге, данио-рерио и тихоокеанском голубом тунце [44, 149]. Интересно, что у других исследованных видов рыб – трески, радужной и коричневой форелей – Ф оказывался слабым блокатором I_{Ca} [16, 79, 241].

Влияние Ф на оборот ионов кальция в желудочковых кардиомиоцитах млекопитающих изучали на примере овец [177]. Максимальная амплитуда кальциевого тока желудочковых кардиомиоцитов овец оказалась по большей мере нечувствительна к влиянию Ф – так, 25 μM Ф подавляли ток на ~10% (в нашем исследовании 30 μM Ф ингибировали ток на ~40%). Однако Ф

оказал влияние на кинетику инактивации I_{Ca} желудочковых кардиомиоцитов овцы, вызывая уменьшение как «быстрой», так и «медленной» константы времени. Кроме того, Ф в концентрации 3 μM уменьшал амплитуду кальциевых транзиентов, измеренных флуоресцентными методами. Авторы объясняют такой эффект влиянием Ф на оборот ионов кальция в саркоплазматическом ретикулуле путем блокады белка SERCA.

Таким образом, влияние фенантрена на кальциевые токи оказывается видоспецифичным как для рыб, так и для млекопитающих. Возможными причинами такой специфичности могут быть аминокислотные замены в сайтах связывания, особенности регуляторных субъединиц каналов или различия в сигнальных каскадах [23, 107, 261, 273].

3-МФ не оказал влияния на пиковую амплитуду кальциевого тока, бариевого тока и кальциевого тока после инкубации с рианодином. Тем не менее, во всех экспериментальных условиях 3-МФ в концентрации 30 μM уменьшал «быструю» и «медленную» константы времени инактивации. Замена ионов кальция на ионы бария в наших экспериментальных условиях позволила нам оценить влияние 3-МФ на потенциалзависимую инактивацию кальциевого тока. Чтобы дополнительно изучить влияние 3-МФ на потенциал-зависимую инактивацию, мы провели серию экспериментов с предварительной инкубацией кардиомиоцитов с рианодином (10 μM) для необратимой блокады соответствующих рецепторов саркоплазматического ретикулума (СПР). Это необходимо для предотвращения кальций-зависимого выброса ионов кальция из СПР и кальций-зависимой инактивации кальциевых каналов. Как мы и ожидали, 3-МФ увеличивал скорость инактивации и в этом эксперименте. Соответственно, 3-МФ в желудочковых кардиомиоцитах мыши увеличивает скорость потенциал-зависимой инактивации кальциевого тока, I_{Ca} . Подобное увеличение скорости инактивации под влиянием 3-МФ было нами описано для наваги (см. выше, раздел 5.2.), хотя мы не исследовали подробно потенциал-зависимую и кальций-зависимую инактивацию у этих животных.

Увеличение скорости потенциал-зависимой инактивации I_{Ca} в присутствии 3-МФ может приводить к уменьшению количества кальция, поступающего в клетку, необходимого для сокращения рабочих кардиомиоцитов. В свою очередь, это может приводить к уменьшению силы сокращения этих клеток [34] и развитию сердечной недостаточности [243].

Итак, Ф и 3-МФ в наибольшей исследованной концентрации, 30 μM , вызывали изменения в конфигурации ПД. И Ф, и 3-МФ подавляли реполяризующие токи желудочковых кардиомиоцитов мыши (I_{to} и I_{Kur}), что приводило к увеличению длительности ПД. И Ф, и 3-МФ блокировали быстрый натриевый ток, что приводило к уменьшению максимальной скорости деполяризации и амплитуды ПД. 3-МФ ингибировал I_{to} , I_{Kur} и I_{Na} более эффективно по сравнению с Ф. Наконец, 3-МФ, в отличие от Ф, не ингибировал кальциевый ток, но увеличивал скорость его потенциал-зависимой инактивации. Влияние Ф и 3-МФ на отдельные токи и конфигурацию

ПД см. на рис.52.

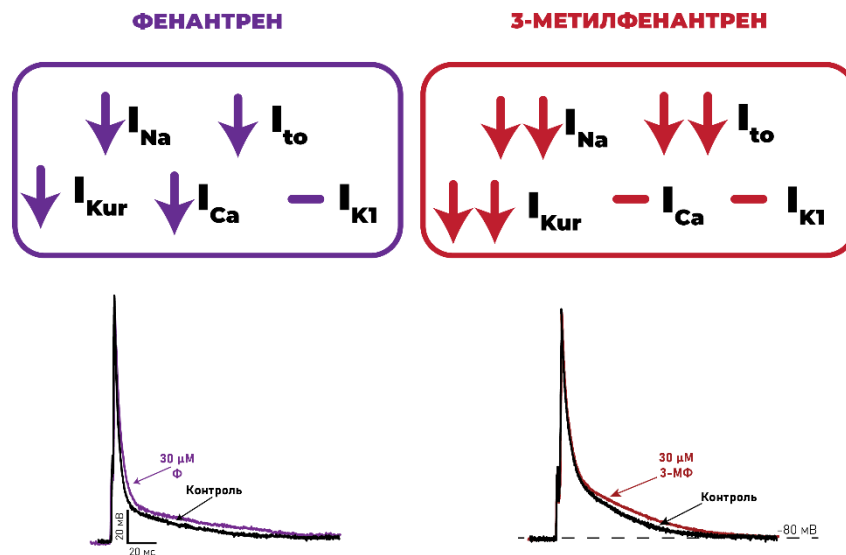


Рисунок 47. Сравнение чувствительности пиковой амплитуды основных ионных токов желудочковых кардиомиоцитов мыши к фенантрено или 3-метилфенантрено. Количество стрелок отражает относительную чувствительность данного тока к соответствующему соединению. Прочерк означает нечувствительность пиковой амплитуды к соответствующему веществу. Внизу приведены репрезентативные записи потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов наваги в присутствии фенантрена или 3-метилфенантрена разных концентраций.

В целом основные ионные токи желудочковых кардиомиоцитов мышей оказались более устойчивы к влиянию отдельных ПАУ, чем ионные токи желудочковых кардиомиоцитов северной наваги (см. выше, раздел 5.2). Стоит отметить, что и I_{Kr} млекопитающих (отсутствующий в кардиомиоцитах грызунов) оказался относительно устойчив к ПАУ - 25 μM Ф ингибировали ~50% тока I_{Kr} кардиомиоцитов овцы [177]; 30 μM 3-МФ ингибируют ~40% тока, переносимого белком hERG (см. ниже, раздел 5.6.).

Фенантрен и 3-метилфенантрен не первые соединения, для которых показана различная эффективность ингибирования одних и тех же токов в кардиомиоцитах рыб и млекопитающих. Например, известно, что тетродотоксин ингибирует быстрый натриевый ток кардиомиоцитов рыб с константой полуингибирования 1,4-6,6 нМ. Для кардиомиоцитов млекопитающих IC_{50} составляет ~1 μM [248]. В случае с потенциалзависимыми натриевыми каналами повышенная чувствительность к тетродотоксину определяется ароматической аминокислотой в 401 позиции порообразующей субъединицы $Na_v1.5$ [248]. Кроме аминокислотных замен в основных порообразующих субъединицах чувствительность тока к веществу может определяться регуляторными субъединицами, составом липидов плазматической мембраны, качественным и

количественным составом вторичных посредников и ферментов клеток и прочими многочисленными факторами, вклад которых еще предстоит оценить.

5.5. В отличие от I_{hSCN5A} , I_{hERG} чувствителен к 3-метилфенантрину

Хвостовой ток I_{hERG} , измеренный при переходе потенциала с 0 мВ на –40 мВ, оказался чувствителен к 3-метилфенантрину (3-МФ), причём вычисленная константа полуингибирования (IC_{50}) составила 38,2 μ М. Для структурно родственного фенантрена описаны сходные эффекты на ток, переносимый гомотетрамерами $hERG1a$. Мы ожидали, что ток, осуществляемый гомотетрамерами $hERG1a$, будет более чувствителен к 3-МФ, чем к фенантрину. Вопреки этим ожиданиям, константа полуингибирования тока I_{hERG1a} для фенантрена, рассчитанная нашими коллегами из Великобритании, составила 17,6 μ М [19]. Часть этой разницы в значениях IC_{50} может быть обусловлена применением различных гетерологических экспрессионных систем: в нашей работе использовалась линия CHO-K1, а в исследовании коллег – HEK293T. Эти клеточные линии различаются липидным составом мембраны, экспрессией сигнальных каскадов и другими факторами, способными влиять на чувствительность канала к ПАУ [154]. Тем не менее, фундаментальные принципы взаимодействия Ф и 3-МФ с $hERG$ не должны зависеть от окружения канала. Так, фенантрен, согласно результатам математического моделирования, не перекрывает пору канала - он связывается с гидрофобным карманом, который располагается в стороне от неё. Сходства в строении фенантрена и 3-метилфенантрена позволяет нам предположить, что 3-метилфенантрен взаимодействует с каналом, образованным гомотетрамерами $HERG1a$, похожим образом.

В присутствии 3-МФ кривая стационарной инактивации I_{hERG} сдвигалась вправо, а кривая стационарной активации – влево. Соединения, способные схожим образом увеличивать оконный ток, также связываются с поровыми участками канала $HERG$ [57, 274]. Следовательно, взаимодействие 3-МФ с поровым участком может изменять процессы активации и инактивации подобно тому, как это происходит при взаимодействии такого комплекса с описанными в литературе активаторами $hERG$. Интересно, что лекарственный препарат, антиаритмик III класса, нифекалант снижает амплитуду I_{Kr} , а также способствует значительному сдвигу стационарной активации влево [116] – эффект, сходный с влиянием 3-МФ на I_{hERG} . Такие изменения снижают вероятность возникновения ранних постдеполяризаций и развития аритмий по типу ре-ентри [80]. Однако для обоснования про- или антиаритмогенных эффектов 3-МФ на миокард человека необходимы дальнейшие исследования.

Постоянная времени, описывающая процессы деактивации I_{hERG} , значительно уменьшилась в присутствии 3-МФ. Ускорение деактивации может быть связано с изменением физических свойств плазматической мембраны в результате растворения 3-МФ, поскольку скорость медленной деактивации увеличивается с ростом текучести мембраны [27].

Вопреки нашим ожиданиям, 3-МФ не оказал влияния на параметры тока, переносимого субъединицей $Na_v1.5$, хотя это соединение оказывало ингибирующий эффект на быстрый натриевый ток желудочковых кардиомиоцитов и наваги (см. раздел 5.2.), и мыши (см. раздел 5.5.). Тем не менее, в нативных кардиомиоцитах присутствует множество вспомогательных белков, ассоциированных с порообразующей субъединицей натриевого канала, которые существенно модифицируют его свойства [32, 146, 176, 182]. В частности, дополнительные субъединицы могут изменять чувствительность интегрального тока к блокаторам [233]. Таким образом, мы можем предположить, что чувствительность быстрого натриевого тока кардиомиоцитов млекопитающих к 3-МФ обусловлена наличием таких регуляторных субъединиц.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе исследованы электрофизиологические механизмы токсического воздействия водорастворимой фракции нефти (ВРФ) и отдельных трициклических полиароматических углеводородов (фенантрена и 3-метилфенантрена) на электрическую активность сердца на уровне изолированных желудочковых кардиомиоцитов, а также на уровне токов, переносимых отдельными порообразующими субъединицами ионных каналов человека в гетерологической экспрессионной системе.

На модели северной наваги показано, что водорастворимая фракция нефти способна существенно модифицировать электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов. В рамках исследованного набора токов наиболее чувствительным к воздействию ВРФ оказался быстрый калиевый ток задержанного выпрямления I_{Kr} ; изменения этого тока согласуются с зарегистрированным удлинением потенциала действия при воздействии ВРФ. При этом быстрый натриевый ток I_{Na} и стабилизирующий ток I_{K1} были относительно устойчивы к острому воздействию ВРФ, что отражалось в отсутствии выраженных изменений параметров, связанных с деполяризацией и потенциалом покоя в зарегистрированных потенциалах действия (ПД).

Отдельное исследование фенантрена и 3-метилфенантрена на кардиомиоцитах наваги продемонстрировало, что оба соединения ингибируют I_{Kr} , однако выраженность эффекта различается, и 3-метилфенантрен проявляет более сильное воздействие на реполяризационный компонент по сравнению с фенантrenom, что согласуется с различиями их влияния на длительность ПД. Наряду с влиянием на I_{Kr} установлено воздействие этих соединений на деполяризующие токи: фенантрен и 3-метилфенантрен в различной степени подавляли I_{Na} , причём 3-метилфенантрен характеризовался более выраженным эффектом, сопровождавшимся также изменениями параметров стационарной активации и инактивации. По совокупности наблюдений 3-метилфенантрен в энзиматически выделенных желудочковых кардиомиоцитах рыбы демонстрирует сочетанное влияние на реполяризацию и деполяризацию, что приводит к более выраженному изменению конфигурации ПД по сравнению с родительским соединением, фенантrenom, или сложной смеси углеводородов (ВРФ).

Важным результатом является демонстрация зависимости чувствительности кардиомиоцитов к 3-метилфенантреному от сезонной температурной акклиматизации у северной наваги. Показано, что при зимней акклиматизации изменяются параметры электрической активности желудочковых кардиомиоцитов, и одновременно повышается чувствительность I_{Kr} к 3-метилфенантреному по сравнению с летним состоянием; сезонные различия затрагивают также I_{Na} , хотя в меньшей степени. Следовательно, уязвимость миокарда к действию трициклических ПАУ у данного эктотермного вида определяется физиологическим состоянием, связанным с акклиматизацией.

Для сопоставления с млекопитающими в работе исследовано влияние фенантрена и 3-метилфенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов мыши. Показано, что оба соединения подавляют основные реполяризующие токи, характерные для желудочковых кардиомиоцитов мыши (I_{to} и I_{Kur}), что сопровождается увеличением длительности потенциала действия; при этом 3-метилфенантрен демонстрирует более выраженное ингибирование исследованных токов. Также установлено подавление быстрого натриевого тока, включая сдвиги параметров стационарной активации и инактивации. 3-метилфенантрен показал себя более эффективным блокатором этого тока. Дополнительно показано, что 3-метилфенантрен не уменьшает пиковую амплитуду кальциевого тока, но ускоряет его потенциал-зависимую инактивацию, что было подтверждено в экспериментах с заменой Ca^{2+} на Ba^{2+} и при блокаде рианодиновых рецепторов саркоплазматического ретикулула.

Наконец, на уровне отдельных человеческих порообразующих субъединиц, переносящих основные деполяризующий и реполяризующий токи, в гетерологической экспрессионной системе установлено, что ток I_{hERG} (переносится субъединицами $K_v11.1$) чувствителен к 3-метилфенантрону и при его воздействии изменяются параметры стационарной активации и инактивации, а также кинетика деактивации. В то же время 3-метилфенантрен не изменял параметры тока I_{hSCN5A} (переносится субъединицей $Na_v1.5$) в этих условиях, несмотря на выраженное подавление I_{Na} в нативных кардиомиоцитах исследованного млекопитающего - мыши. Данное несоответствие подчёркивает, что свойства натриевого тока могут существенно модифицироваться клеточным окружением и ассоциированными белками.

Результаты диссертационной работы показывают, что трициклические ПАУ и водорастворимая фракция нефти способны изменять электрическую активность кардиомиоцитов, причём набор наиболее чувствительных токов и выраженность эффектов зависят от природы воздействующего агента (смесь или отдельное соединение), видовой принадлежности объекта и физиологического состояния, включая сезонную акклиматизацию у эктотермных животных.

7. ВЫВОДЫ

1. Водорастворимая фракция (ВРФ) нефти марки Urals увеличивает длительность потенциала действия (ПД) желудочковых кардиомиоцитов северной наваги. Среди исследованных ионных токов наиболее чувствительным к ВРФ оказался I_{Kr} . ВРФ нефти также подавляла $I_{Ca,L}$, тогда как I_{Na} и I_{K1} были нечувствительны к ее воздействию.
2. Компонент ВРФ, 3-метилфенантрен (3-МФ) проявляет более выраженную кардиотоксичность для желудочковых кардиомиоцитов наваги по сравнению с родительским соединением, фенантrenom (Ф): 3-МФ увеличивает длительность ПД, снижает его амплитуду и скорость деполяризации в концентрации 1 μ М, тогда как фенантрен влияет на ПД только в концентрации 10 μ М. 3-МФ эффективнее Ф ингибирует I_{Kr} и I_{Na} , Ф снижает амплитуду $I_{Ca,L}$, тогда как 3-МФ ускоряет его инактивацию без изменения амплитуды. I_{K1} нечувствителен к обоим соединениям.
3. При зимней акклиматизации у наваги происходит уменьшение длительности ПД желудочковых кардиомиоцитов вследствие возрастания амплитуды I_{Kr} . Также зимняя акклиматизация приводит к изменению параметров активации и инактивации деполяризующих токов (I_{Na} , $I_{Ca,L}$) и снижению амплитуды $I_{Ca,L}$.
4. Зимняя акклиматизация усиливает кардиотоксические эффекты 3-МФ – в наибольшей степени за счет подавления I_{Kr} .
5. В желудочковых кардиомиоцитах мыши Ф и 3-МФ проявляют свои кардиотоксические эффекты в меньшей степени. Как и у наваги, 3-МФ эффективнее ингибирует реполяризующие (I_{Kur} , I_{to}) и основной деполяризующий (I_{Na}) токи, а стабилизирующий ток (I_{K1}) нечувствителен к обоим соединениям. Ф снижает амплитуду $I_{Ca,L}$, тогда как 3-МФ ускоряет его потенциал-зависимую инактивацию без изменения амплитуды.
6. Влияние 3-МФ на ток, переносимый человеческой изоформой $K_v11.1$ (I_{hERG}) в экспрессионной системе CHO-K1, существенно отличается от влияния на ток I_{Kr} у рыб. 3-МФ слабо подавляет амплитуду тока I_{hERG} , но изменяет параметры активации и деактивации этих каналов. Ток I_{hSCN5A} , переносимый человеческой изоформой $Na_v1.5$, нечувствителен к 3-МФ.

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамочкин Д. В., Джуманиязова И. Х., Пустовит О. Б., Филатова Т. С. Адаптивные изменения электрической активности сердца эктотермных позвоночных при смене времен года 2025. № 2 (80). С. 53–64.
2. Абрамочкин Д. В., Кузьмин В. С., Камкина О. В. Ионные каналы и токи кардиомиоцитов и их роль в норме и патологии: учебное пособие / Д. В. Абрамочкин, В. С. Кузьмин, О. В. Камкина, РНИМУ им. Н. И. Пирогова, каф. физиологии МБФ, Москва: РАМН, 2019. 85 с.
3. Филатова Т. С., Абрамочкин Д. В. Физиологические эффекты полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в организме рыб // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2023. № 3 (78). С. 127–138.
4. Филатова Т. С., Шамшура А. В., Абрамочкин Д. В. Влияние фенантрена на электрическую активность желудочковых кардиомиоцитов трески (*Gadus Morhua*) // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2024. № 4 (60). С. 372–382.
5. Челомбитко С. И. Математическое моделирование аварийных разливов нефти в половодье // Известия высших учебных заведений. Нефть и газ. 2025. № 1. С. 83–88.
6. Abdel-Shafy H. I., Mansour M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation // Egypt. J. Pet. 2016. № 1 (25). С. 107–123.
7. 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 // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2023. (273). С. 109736.
8. Abramochkin D. V., Hassinen M., Vornanen M. Transcripts of Kv7.1 and MinK channels and slow delayed rectifier K⁺ current (IKs) are expressed in zebrafish (*Danio rerio*) heart // Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 2018. № 12 (470). С. 1753–1764.
9. 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 // Journal of Experimental Biology. 2019. С. jeb.193607.
10. 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 // Aquatic Toxicology. 2021. (235). С. 105823.
11. Abramochkin D. V., Shamshura A., Dzhumaniiazova I., Pustovit O. B., Mishchenko A. A. High temperature and hyperkalemia increase vulnerability of navaga cod (*Eleginus nawaga*) cardiomyocytes to the ecotoxinant 3-methyl-phenanthrene // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2025. (299). С. 111761.

12. Abramochkin D. V., Vornanen M. Seasonal acclimatization of the cardiac potassium currents (IK1 and IKr) in an arctic marine teleost, the navaga cod (*Eleginus navaga*) // *Journal of Comparative Physiology B*. 2015. № 8 (185). C. 883–890.
13. Adeyemo O. K., Kroll K. J., Denslow N. D. Developmental abnormalities and differential expression of genes induced in oil and dispersant exposed *Menidia beryllina* embryos // *Aquatic Toxicology*. 2015. (168). C. 60–71.
14. Agersted M. D., Møller E. F., Gustavson K. Bioaccumulation of oil compounds in the high-Arctic copepod *Calanus hyperboreus* // *Aquat. Toxicol.* 2018. (195). C. 8–14.
15. Ahad J. M. E., Jautzy J. J., Cumming B. F., Das B., Laird K. R., Sanei H. Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to northwestern Saskatchewan lakes east of the Athabasca oil sands // *Org. Geochem.* 2015. (80). C. 35–45.
16. Ainerua M. O., Tinwell J., Kompella S. N., Sørhus E., White K. N., Dongen B. E. van, 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). C. 124608.
17. Akyüz M., Cabuk H. Gas-particle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Zonguldak, Turkey // *Sci. Total Environ.* 2010. № 22 (408). C. 5550–5558.
18. Almeda R., Wambaugh Z., Wang Z., Hyatt C., Liu Z., Buskey E. J. Interactions between zooplankton and crude oil: toxic effects and bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons // *PLoS One*. 2013. № 6 (8). C. e67212.
19. Al-Moubarak E., Shiels H. A., Zhang Y., Du C., Hanington O., Harmer S. C., Dempsey C. E., Hancox J. C. Inhibition of the hERG potassium channel by phenanthrene: a polycyclic aromatic hydrocarbon pollutant // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021. № 23 (78). C. 7899–7914.
20. Amin A. S., Asghari-Roodsari A., Tan H. L. Cardiac sodium channelopathies // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2010. № 2 (460). C. 223–237.
21. Anastasopoulos A. T., Wheeler A. J., Karman D., Kulka R. H. Intraurban concentrations, spatial variability and correlation of ambient polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and PM2.5 // *Atmos. Environ.* 2012. (59). C. 272–283.
22. Andér M., Luzhkov V. B., Åqvist J. Ligand Binding to the Voltage-Gated Kv1.5 Potassium Channel in the Open State—Docking and Computer Simulations of a Homology Model // *Biophysical Journal*. 2008. № 3 (94). C. 820–831.
23. Arullampalam P., Preti B., Ross-Kaschitzka D., Lochner M., Rougier J.-S., Abriel H. Species-specific effects of cation channel TRPM4 small-molecule inhibitors // 2021.

24. Badr A., El-Sayed M. F., Vornanen M. Effects of seasonal acclimatization on temperature-dependence of cardiac excitability in the roach, *Rutilus rutilus* // Journal of Experimental Biology. 2016. C. jeb.138347.
25. Badr A., Hassinen M., El-Sayed M. F., Vornanen M. Effects of seasonal acclimatization on action potentials and sarcolemmal K⁺ currents in roach (*Rutilus rutilus*) cardiac myocytes // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2017. (205). C. 15–27.
26. Badr A., Korajoki H., Abu-Amra E.-S., El-Sayed M. F., Vornanen M. Effects of seasonal acclimatization on thermal tolerance of inward currents in roach (*Rutilus rutilus*) cardiac myocytes // Journal of Comparative Physiology B. 2018. № 2 (188). C. 255–269.
27. Balijepalli R., Delisle B., Balijepalli S. Y., Foell J. D., Slind J. K., Kamp T. J., January C. T. Kv11.1 (ERG1) K⁺ Channels Localize in Cholesterol and Sphingolipid Enriched Membranes and Are Modulated by Membrane Cholesterol // Channels. 2007. № 4 (1). C. 263–272.
28. Ballesta S., Hanson L. M., Farrell A. P. The effect of adrenaline on the temperature dependency of cardiac action potentials in pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* // Journal of Fish Biology. 2012. № 4 (80). C. 876–885.
29. Balmer J. E., Hung H., Yu Y., Letcher R. J., Muir D. C. G. Sources and environmental fate of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Arctic // Emerging Contaminants. 2019. (5). C. 128–142.
30. Bari M. A., Baumbach G., Kuch B., Scheffknecht G. Particle-phase concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air of rural residential areas in southern Germany // Air Qual. Atmos. Health. 2010. № 2 (3). C. 103–116.
31. Belardinelli L., Giles W. R., Rajamani S., Karagueuzian H. S., Shryock J. C. Cardiac late Na⁺ current: Proarrhythmic effects, roles in long QT syndromes, and pathological relationship to CaMKII and oxidative stress // Heart Rhythm. 2015. № 2 (12). C. 440–448.
32. Belau F., Metzner K., Christ T., Ravens U., Schaefer M., Künzel S., Li W., Wettwer E., Dobrev D., El-Armouche A., Kämmerer S. DPP10 is a new regulator of Nav1.5 channels in human heart // International Journal of Cardiology. 2019. (284). C. 68–73.
33. Belinskaya E. A., Zykova G. V., Semenov S. Y., Finakov G. G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the soils of Moscow // Eurasian Soil Sci. 2015. № 6 (48). C. 578–583.
34. Bers D. M. Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction // Circulation Research. 2000. № 4 (87). C. 275–281.
35. Bian Q., Alharbi B., Collett J. Jr, Kreidenweis S., Pasha M. J. Measurements and source apportionment of particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air in Riyadh, Saudi Arabia // Atmos. Environ. 2016. (137). C. 186–198.

36. Birgul A., Tasdemir Y. Concentrations, gas-particle partitioning, and seasonal variations of polycyclic aromatic hydrocarbons at four sites in Turkey // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2015. № 1 (68). C. 46–63.
37. Boehm P. D. 15 - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) под ред. R. D. Morrison, B. L. Murphy, Burlington: Academic Press, 1964. C. 313–337.
38. Bok C.-S., Kim R.-E., Cho Y.-Y., Choi J.-S. Tramadol as a Voltage-Gated Sodium Channel Blocker of Peripheral Sodium Channels Nav 1.7 and Nav 1.5 // Biomolecules & Therapeutics. 2023. № 2 (31). C. 168–175.
39. Boström C.-E., Gerde P., Hanberg A., Jernström B., Johansson C., Kyrklund T., Rannug A., Törnqvist M., Victorin K., Westerholm R. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air // Environ. Health Perspect. 2002. № Suppl 3 (110 Suppl 3). C. 451–488.
40. Bowler K., Tirri R. Temperature dependence of the heart isolated from the cold or warm acclimated perch (*Perca fluviatilis*) // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 1990. № 1 (96). C. 177–180.
41. Bramatti I., Matos B., Figueiredo N., Pousão-Ferreira P., Branco V., Martins M. Interaction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon compounds in fish primary hepatocytes: From molecular mechanisms to genotoxic effects // Science of The Total Environment. 2023. (855). C. 158783.
42. Brannon E. L., Collins K. M., Brown J. S., Neff J. M., Parker K. R., Stubblefield W. A. Toxicity of weathered *Exxon Valdez* crude oil to pink salmon embryos // Environmental Toxicology and Chemistry. 2006. № 4 (25). C. 962–972.
43. Brette F., Machado B., Cros C., Incardona J. P., Scholz N. L., Block B. A. Crude Oil Impairs Cardiac Excitation-Contraction Coupling in Fish // Science. 2014. № 6172 (343). C. 772–776.
44. Brette F., Shiels H. A., Galli G. L. J., Cros C., Incardona J. P., Scholz N. L., Block B. A. A Novel Cardiotoxic Mechanism for a Pervasive Global Pollutant // Scientific Reports. 2017. № 1 (7). C. 41476.
45. Brown A. S., Brown R. J. C. Correlations in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) concentrations in UK ambient air and implications for source apportionment // J. Environ. Monit. 2012. № 8 (14). C. 2072–2082.
46. Cao L., Wang D., Zhu C., Wang B., Cen X., Chen A., Zhou H., Ye Z., Tan Q., Nie X., Feng X., Xie Y., Yuan J., Chen W. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and atherosclerotic cardiovascular disease risk in urban adults: The mediating role of oxidatively damaged DNA // Environ. Pollut. 2020. № Pt A (265). C. 114860.
47. Carvalho P. S. M., Kalil D. D. C. B., Novelli G. A. A., Bainy A. C. D., Fraga A. P. M. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis* // Marine Environmental Research. 2008. № 1 (66). C. 205–207.

48. Cave E. J., Kajiura S. M. Effect of Deepwater Horizon Crude Oil Water Accommodated Fraction on Olfactory Function in the Atlantic Stingray, *Hypanus sabinus* // *Scientific Reports*. 2018. № 1 (8). C. 15786.
49. Chen J., Zhang W., Wan Z., Li S., Huang T., Fei Y. Oil spills from global tankers: Status review and future governance // *J. Clean. Prod.* 2019. (227). C. 20–32.
50. Chen L., He Y., Wang X., Ge J., Li H. Ventricular voltage-gated ion channels: Detection, characteristics, mechanisms, and drug safety evaluation // *Clinical and Translational Medicine*. 2021. № 10 (11). C. e530.
51. Cherr G. N., Fairbairn E., Whitehead A. Impacts of Petroleum-Derived Pollutants on Fish Development // *Annual Review of Animal Biosciences*. 2017. № 1 (5). C. 185–203.
52. Chilvers B. L., Morgan K. J., White B. J. Sources and reporting of oil spills and impacts on wildlife 1970-2018 // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2021. № 1 (28). C. 754–762.
53. Chou K.-C. Insights from Modeling Three-Dimensional Structures of the Human Potassium and Sodium Channels // *Journal of Proteome Research*. 2004. № 4 (3). C. 856–861.
54. Clark R. B., Mangoni M. E., Lueger A., Couette B., Nargeot J., Giles W. R. A rapidly activating delayed rectifier K⁺ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004. № 5 (286). C. H1757–H1766.
55. Clauss S., Bleyer C., Schüttler D., Tomsits P., Renner S., Klymiuk N., Wakili R., Massberg S., Wolf E., Käb S. Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals // *Nature Reviews Cardiology*. 2019. № 8 (16). C. 457–475.
56. Colli-Dula R. C., Fang X., Moraga-Amador D., Alborno-Abud N., Zamora-Bustillos R., Conesa A., Zapata-Perez O., Moreno D., Hernandez-Nuñez E. Transcriptome analysis reveals novel insights into the response of low-dose benzo(a)pyrene exposure in male tilapia // *Aquatic Toxicology*. 2018. (201). C. 162–173.
57. Costa F., Ocello R., Guardiani C., Giacomello A., Masetti M. Integrated Approach Including Docking, MD Simulations, and Network Analysis Highlights the Action Mechanism of the Cardiac hERG Activator RPR260243 // *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2023. № 15 (63). C. 4888–4899.
58. Cui Z., Wang Y., Du L., Yu Y. Contamination level, sources, and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in suburban vegetable field soils of Changchun, Northeast China // *Sci. Rep.* 2022. № 1 (12). C. 11301.
59. Dat N.-D., Chang M. B. Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies // *Sci. Total Environ.* 2017. (609). C. 682–693.
60. De Lera Ruiz M., Kraus R. L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. № 18 (58). C. 7093–7118.

61. Denison M. S., Nagy S. R. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003. № 1 (43). C. 309–334.
62. Denissenko M. F., Pao A., Tang M., Pfeifer G. P. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53 // *Science*. 1996. № 5286 (274). C. 430–432.
63. Diggs D. L., Huderson A. C., Harris K. L., Myers J. N., Banks L. D., Rekhadevi P. V., Niaz M. S., Ramesh A. Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a perspective // *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2011. № 4 (29). C. 324–357.
64. Dipple A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis ACS symposium series. American Chemical Society / Washington, D.C.: American Chemical Society, 1985. C. 1–17.
65. Dong C., Bai X., Sheng H., Jiao L., Zhou H., Shao Z. Distribution of PAHs and the PAH-degrading bacteria in the deep-sea sediments of the high-latitude Arctic Ocean // *Biogeosciences*. 2015. № 7 (12). C. 2163–2177.
66. Dubansky B., Whitehead A., Miller J. T., Rice C. D., Galvez F. Multitissue Molecular, Genomic, and Developmental Effects of the Deepwater Horizon Oil Spill on Resident Gulf Killifish (*Fundulus grandis*) // *Environmental Science & Technology*. 2013. № 10 (47). C. 5074–5082.
67. Dzhumaniiazova I., Filatova T. S., Zakyrjanova G. F., Shamshura A. V., Pustovit O. B., Abramochkin D. V., Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia Changes in repolarizing currents in mouse cardiomyocytes following chronic atorvastatin exposure // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2025. № 8 (180). C. 189–195.
68. Eckert R., Chad J. E. Calcium-Dependent Regulation of Calcium Channel Inactivation под ред. D. L. Alkon, C. D. Woody, Boston, MA: Springer US, 1986. C. 261–282.
69. Edmunds R. C., Gill J. A., Baldwin D. H., Linbo T. L., French B. L., Brown T. L., Esbaugh A. J., Mager E. M., Stieglitz J., Hoenig R., Benetti D., Grosell M., Scholz N. L., Incardona J. P. Corresponding morphological and molecular indicators of crude oil toxicity to the developing hearts of mahi mahi // *Scientific Reports*. 2015. № 1 (5). C. 17326.
70. Edwards N. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment—A review // *J. Environ. Qual.* 1983. № 4 (12). C. 427–441.
71. Elajnaf T., Baptista-Hon D. T., Hales T. G. Potent Inactivation-Dependent Inhibition of Adult and Neonatal NaV1.5 Channels by Lidocaine and Levobupivacaine // *Anesthesia & Analgesia*. 2018. № 3 (127). C. 650–660.
72. Emigh Cortez A. M., DeMarco K. R., Furutani K., Bekker S., Sack J. T., Wulff H., Clancy C. E., Vorobyov I., Yarov-Yarovoy V. Structural modeling of hERG channel–drug interactions using Rosetta // *Frontiers in Pharmacology*. 2023. (14). C. 1244166.

73. European Food Safety Authority (EFSA) Polycyclic aromatic hydrocarbons in food - scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain // EFSA J. 2008. № 8 (6). C. 1–114.
74. Ferron L., Capuano V., Deroubaix E., Coulombe A., Renaud J.-F. Functional and Molecular Characterization of a T-type Ca²⁺ Channel During Fetal and Postnatal Rat Heart Development // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2002. № 5 (34). C. 533–546.
75. 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 // Journal of Experimental Biology. 2019. C. jeb.202242.
76. Filatova T. S., Borodkov A. S., Karkhov A. M., Dzhumaniiiazova I. H., Pustovit O. B., Abramochkin D. V. The mechanisms of effects of oil-derived polyaromatic hydrocarbons on cardiac electrical activity in navaga cod (*Eleginus nawaga*) // Vestnik Moskovskogo universiteta. Seria 16. Biologia. 2024. № №2S, 2024. C. 89–97.
77. Filatova T. S., Kuzmin V. S., Dzhumaniiiazova I., Pustovit O. B., Abramochkin D. V., Shiels H. A. 3-Methyl-phenanthrene (3-MP) disrupts the electrical and contractile activity of the heart of the polar fish, navaga cod (*Eleginus nawaga*) // Chemosphere. 2024. (357). C. 142089.
78. Filatova T. S., Mikhailova V. B., Guskova V. O., Abramochkin D. V. The Effects of Phenanthrene on the Electrical Activity in the Heart of Shorthorn Sculpin (*Myoxocephalus scorpio*) // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2022. № S1 (58). C. S44–S51.
79. Filatova T. S., Shamshura A. V., Abramochkin D. V. Effects of Phenanthrene on Electrical Activity of Ventricular Cardiomyocytes in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2024. № 4 (60). C. 1298–1308.
80. Furutani K., Tsumoto K., Chen I.-S., Handa K., Yamakawa Y., Sack J. T., Kurachi Y. Facilitation of *I* Kr current by some hERG channel blockers suppresses early afterdepolarizations // Journal of General Physiology. 2019. № 2 (151). C. 214–230.
81. G. I. Agapkina P. A. C. A. A. Shelepchikov, E. S. Brodskii, D. B. Feshin, N. G. Bukhan'ko & S. P. Balashova Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of Moscow // Moscow University Soil Science Bulletin. 2007. (62). C. 149–158.
82. Galli G. L. J., Lipnick M. S., Block B. A. Effect of thermal acclimation on action potentials and sarcolemmal K⁺ channels from Pacific bluefin tuna cardiomyocytes // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2009. № 2 (297). C. R502–R509.
83. Garrido A., Jiménez-Guerrero P., Ratola N. Levels, trends and health concerns of atmospheric PAHs in Europe // Atmos. Environ. 2014. (99). C. 474–484.
84. Geier M. C., James Minick D., Truong L., Tilton S., Pande P., Anderson K. A., Teeguarden J., Tanguay R. L. Systematic developmental neurotoxicity assessment of a representative PAH Superfund mixture using zebrafish // Toxicology and Applied Pharmacology. 2018. (354). C. 115–125.

85. Genge C. E., Muralidharan P., Kemp J., Hull C. M., Yip M., Simpson K., Hunter D. V., Claydon T. W. Zebrafish cardiac repolarization does not functionally depend on the expression of the hERG1b-like transcript // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2024. № 1 (476). C. 87–99.
86. Giardoglou P., Beis D. On Zebrafish Disease Models and Matters of the Heart // *Biomedicines*. 2019. № 1 (7). C. 15.
87. Gillis T. E., Marshall C. R., Xue X.-H., Borgford T. J., Tibbits G. F. Ca^{2+} binding to cardiac troponin C: effects of temperature and pH on mammalian and salmonid isoforms // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000. № 5 (279). C. R1707–R1715.
88. Gillis T. E., Shiels H. A., Vornanen M., Gamperl A. K. Cardiac thermal acclimation and adaption of the heart to extreme temperatures Elsevier, 2024.C. 268–282.
89. Gillis T. E., Tibbits G. F. Beating the cold: the functional evolution of troponin C in teleost fish // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2002. № 4 (132). C. 763–772.
90. Gonçalves R., Scholze M., Ferreira A. M., Martins M., Correia A. D. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior // *Environmental Research*. 2008. № 2 (108). C. 205–213.
91. Gonzalez F. J., Fernandez-Salguero P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice // *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 1998. № 12 (26). C. 1194–1198.
92. Gregoris E., Argiriadis E., Vecchiato M., Zambon S., De Pieri S., Donato A., Contini D., Piazza R., Barbante C., Gambaro A. Gas-particle distributions, sources and health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated naphthalenes (PCNs) in Venice aerosols // *Sci. Total Environ*. 2014. (476–477). C. 393–405.
93. Haritash A. K., Kaushik C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review // *J. Hazard. Mater*. 2009. № 1–3 (169). C. 1–15.
94. Hassinen M., Abramochkin D. V., Vornanen M. Seasonal acclimatization of the cardiac action potential in the Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*, Gadidae) // *Journal of Comparative Physiology B*. 2014. № 3 (184). C. 319–327.
95. Hassinen M., Haverinen J., Hardy M. E., Shiels H. A., Vornanen M. Inward rectifier potassium current (I_{K1}) and Kir2 composition of the zebrafish (*Danio rerio*) heart // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2015. № 12 (467). C. 2437–2446.
96. Hassinen M., Haverinen J., Vornanen M. Electrophysiological properties and expression of the delayed rectifier potassium (ERG) channels in the heart of thermally acclimated rainbow trout // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008. № 1 (295). C. R297–R308.

97. Hassinen M., Haverinen J., Vornanen M. Molecular basis and drug sensitivity of the delayed rectifier (IKr) in the fish heart // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2015. (176–177). C. 44–51.
98. Hassinen M., Korajoki H., Abramochkin D., Krivosheya P., Vornanen M. Transcript expression of inward rectifier potassium channels of Kir2 subfamily in Arctic marine and freshwater fish species // *Journal of Comparative Physiology B*. 2019. № 6 (189). C. 735–749.
99. Hassinen M., Laulaja S., Paajanen V., Haverinen J., Vornanen M. Thermal adaptation of the crucian carp (*Carassius carassius*) cardiac delayed rectifier current, I_{Ks} , by homomeric assembly of K_v 7.1 subunits without MinK // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011. № 1 (301). C. R255–R265.
100. Hatano N., Ohya S., Muraki K., Giles W., Imaizumi Y. Dihydropyridine Ca^{2+} channel antagonists and agonists block $K_v4.2$, $K_v4.3$ and $K_v1.4$ K^+ channels expressed in HEK293 cells // *British Journal of Pharmacology*. 2003. № 3 (139). C. 533–544.
101. 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 // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2017. № 2 (312). C. R165–R171.
102. Haverinen J., Badr A., Korajoki H., Hassinen M., Vornanen M. Dual effect of polyaromatic hydrocarbons on sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) activity of a teleost fish (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2024. (276). C. 109785.
103. Haverinen J., Dzhumaniazova I., Abramochkin D. V., Hassinen M., Vornanen M. Effects of Na^+ channel isoforms and cellular environment on temperature tolerance of cardiac Na^+ current in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Journal of Experimental Biology*. 2021. № 8 (224). C. jeb241067.
104. Haverinen J., Hassinen M., Dash S. N., Vornanen M. Expression of calcium channel transcripts in the zebrafish heart: dominance of T-type channels // *Journal of Experimental Biology*. 2018. C. jeb.179226.
105. Haverinen J., Hassinen M., Korajoki H., Vornanen M. Cardiac voltage-gated sodium channel expression and electrophysiological characterization of the sodium current in the zebrafish (*Danio rerio*) ventricle // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2018. (138). C. 59–68.
106. Haverinen J., Hassinen M., Vornanen M. Fish cardiac sodium channels are tetrodotoxin sensitive // *Acta Physiologica*. 2007. № 3 (191). C. 197–204.
107. Haverinen J., Hassinen M., Vornanen M. Effect of Channel Assembly (KCNQ1 or KCNQ1 + KCNE1) on the Response of Zebrafish I_Ks Current to I_Ks Inhibitors and Activators // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2022. № 5 (79). C. 670–677.

108. Haverinen J., Vornanen M. Temperature acclimation modifies Na⁺ current in fish cardiac myocytes // *Journal of Experimental Biology*. 2004. № 16 (207). C. 2823–2833.
109. Haverinen J., Vornanen M. Responses of Action Potential and K⁺ Currents to Temperature Acclimation in Fish Hearts: Phylogeny or Thermal Preferences? // *Physiological and Biochemical Zoology*. 2009. № 5 (82). C. 468–482.
110. Haverinen J., Vornanen M. Atrioventricular block, due to reduced ventricular excitability, causes the depression of fish heart rate in fish at critically high temperatures // *Journal of Experimental Biology*. 2020. C. jeb.225227.
111. Haworth T. E., Haverinen J., Shiels H. A., Vornanen M. Electrical excitability of the heart in a Chondrostei fish, the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2014. № 9 (307). C. R1157–R1166.
112. Hayakawa K., Onoda Y., Tachikawa C., Hosoi S., Yoshita M., Chung S. W., Kizu R., Toriba A., Kameda T., Tang N. Estrogenic/Antiestrogenic Activities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Monohydroxylated Derivatives by Yeast Two-Hybrid Assay // *Journal of Health Science*. 2007. № 5 (53). C. 562–570.
113. Hicken C. E., Linbo T. L., Baldwin D. H., Willis M. L., Myers M. S., Holland L., Larsen M., Stekolnik M. S., Rice S. D., Collier T. K., Scholz N. L., Incardona J. P. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. № 17 (108). C. 7086–7090.
114. Hien T. T., Nam P. P., Yasuhiro S., Takayuki K., Norimichi T., Hiroshi B. Comparison of particle-phase polycyclic aromatic hydrocarbons and their variability causes in the ambient air in Ho Chi Minh City, Vietnam and in Osaka, Japan, during 2005-2006 // *Sci. Total Environ*. 2007. № 1 (382). C. 70–81.
115. Hirano M., Tanaka S., Asami O. Classification of polycyclic aromatic hydrocarbons based on mutagenicity in lung tissue through DNA microarray // *Environ. Toxicol*. 2013. № 11 (28). C. 652–659.
116. Hosaka Y., Iwata M., Kamiya N., Yamada M., Kinoshita K., Fukunishi Y., Tsujimae K., Hibino H., Aizawa Y., Inanobe A., Nakamura H., Kurachi Y. Mutational Analysis of Block and Facilitation of HERG Current by A Class III Anti-Arrhythmic Agent, Nifekalant // *Channels*. 2007. № 3 (1). C. 198–208.
117. Hose J. E., McGurk M. D., Marty G. D., Hinton D. E., Brown E. D., Baker T. T. 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*. 1996. № 10 (53). C. 2355–2365.
118. Howsam M., Jones K. C. Sources of PAHs in the Environment под ред. A. H. Neilson, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. C. 137–174.

119. Hu W., Clark R. B., Giles W. R., Shibata E., Zhang H. Physiological Roles of the Rapidly Activated Delayed Rectifier K⁺ Current in Adult Mouse Heart Primary Pacemaker Activity // International Journal of Molecular Sciences. 2021. № 9 (22). C. 4761.
120. Huang C. L.-H. Murine Electrophysiological Models of Cardiac Arrhythmogenesis // Physiological Reviews. 2017. № 1 (97). C. 283–409.
121. Hussain K., Hoque R. R., Balachandran S., Medhi S., Idris M. G., Rahman M., Hussain F. L. Monitoring and Risk Analysis of PAHs in the Environment под ред. C. M. Hussain, Cham: Springer International Publishing, 2018. C. 1–35.
122. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures // IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 2010. (92). C. 1–853.
123. Ifegwu O. C., Anyakora C. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Part I. Exposure // Adv. Clin. Chem. 2015. (72). C. 277–304.
124. Incardona J. P., Carls M. G., Day H. L., Sloan C. A., Bolton J. L., Collier T. K., Scholz N. L. Cardiac Arrhythmia Is the Primary Response of Embryonic Pacific Herring (*Clupea pallasii*) Exposed to Crude Oil during Weathering // Environmental Science & Technology. 2009. № 1 (43). C. 201–207.
125. Incardona J. P., Carls M. G., Holland L., Linbo T. L., Baldwin D. H., Myers M. S., Peck K. A., Tagal M., Rice S. D., Scholz N. L. Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring // Scientific Reports. 2015. № 1 (5). C. 13499.
126. Incardona J. P., Collier T. K., Scholz N. L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2004. № 2 (196). C. 191–205.
127. Incardona J. P., Gardner L. D., Linbo T. L., Brown T. L., Esbaugh A. J., Mager E. M., Stieglitz J. D., French B. L., Labenia J. S., Laetz C. A., Tagal M., Sloan C. A., Elizur A., Benetti D. D., Grosell M., Block B. A., Scholz N. L. *Deepwater Horizon* crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014. № 15 (111).
128. Jackson H. A., Accili E. A. Evolutionary analyses of KCNQ1 and HERG voltage-gated potassium channel sequences reveal location-specific susceptibility and augmented chemical severities of arrhythmogenic mutations // BMC Evolutionary Biology. 2008. № 1 (8). C. 188.
129. Jernelöv A. The threats from oil spills: now, then, and in the future // Ambio. 2010. № 5–6 (39). C. 353–366.
130. Johansen J. L., Allan B. J. M., Rummer J. L., Esbaugh A. J. Oil exposure disrupts early life-history stages of coral reef fishes via behavioural impairments // Nature Ecology & Evolution. 2017. № 8 (1). C. 1146–1152.

131. Joukar S. A comparative review on heart ion channels, action potentials and electrocardiogram in rodents and human: extrapolation of experimental insights to clinic // *Laboratory Animal Research*. 2021. № 1 (37). C. 25.
132. Jung J.-H., Kim M., Yim U. H., Ha S. Y., Shim W. J., Chae Y. S., Kim H., Incardona J. P., Linbo T. L., Kwon J.-H. Differential Toxicokinetics Determines the Sensitivity of Two Marine Embryonic Fish Exposed to Iranian Heavy Crude Oil // *Environmental Science & Technology*. 2015. № 22 (49). C. 13639–13648.
133. Jürgens A., Webber A. C., Gottsberger G. Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips // *Phytochemistry*. 2000. № 6 (55). C. 551–558.
134. Kalyaanamoorthy S., Lamothe S. M., Hou X., Moon T. C., Kurata H. T., Houghton M., Barakat K. H. A structure-based computational workflow to predict liability and binding modes of small molecules to hERG // *Scientific Reports*. 2020. № 1 (10). C. 16262.
135. Karyab H., Yunesian M., Nasser S., Mahvi A. H., Ahmadkhaniha R., Rastkari N., Nabizadeh R. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in drinking water of Tehran, Iran // *J Environ Health Sci Eng*. 2013. № 1 (11). C. 25.
136. Kazlauskas A., Poellinger L., Pongratz I. Evidence That the Co-chaperone p23 Regulates Ligand Responsiveness of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. № 19 (274). C. 13519–13524.
137. Keen A. N., Klaiman J. M., Shiels H. A., Gillis T. E. Temperature-induced cardiac remodeling in fish // *Journal of Experimental Biology*. 2016. C. jeb.128496.
138. Keith L. H. The source of U.S. EPA's sixteen PAH priority pollutants // *Polycycl. Aromat. Compd*. 2015. № 2 (35). C. 147–160.
139. Kerr J. M., Melton H. R., Exxon Production Research Co., McMillen S. J., Magaw R. I., Chevron Research & Technology Co., Naughton G., Little A. D. Polyaromatic Hydrocarbon Content in Crude Oils Around the World 1999.
140. Keyte I. J., Harrison R. M., Lammel G. Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons--a review // *Chem. Soc. Rev*. 2013. № 24 (42). C. 9333–9391.
141. Kim K.-H., Jahan S. A., Kabir E., Brown R. J. C. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects // *Environ. Int*. 2013. (60). C. 71–80.
142. Kim Y.-H., Kim K.-H. A simple methodological validation of the gas/particle fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air // *Sci. Rep*. 2015. (5). C. 11679.
143. King J. H., Huang C. L.-H., Fraser J. A. Determinants of myocardial conduction velocity: implications for arrhythmogenesis // *Frontiers in Physiology*. 2013. (4).

144. Knollmann B. C., Sirenko S., Rong Q., Katchman A. N., Casimiro M., Pfeifer K., Ebert S. N. Kcnq1 contributes to an adrenergic-sensitive steady-state K⁺ current in mouse heart // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007. № 1 (360). C. 212–218.
145. Ko F.-C., Baker J. E. Partitioning of hydrophobic organic contaminants to resuspended sediments and plankton in the mesohaline Chesapeake Bay // Mar. Chem. 1995. № 2–3 (49). C. 171–188.
146. Ko S.-H., Lenkowski P. W., Lee H. C., Mounsey J. P., Patel M. K. Modulation of Nav1.5 by α 1- and α 3-subunit co-expression in mammalian cells // Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 2005. № 4 (449). C. 403–412.
147. Kocan R. M., Hose J. E., Brown E. D., Baker T. T. Pacific herring (*Clupea pallasii*) embryo sensitivity to Prudhoe Bay petroleum hydrocarbons: laboratory evaluation and in situ exposure at oiled and unoled sites in Prince William Sound // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1996. № 10 (53). C. 2366–2375.
148. Kocan R. M., Marty G. D., Okihira M. S., Brown E. D., Baker T. T. Reproductive success and histopathology of individual Prince William Sound Pacific herring 3 years after the (*Exxon Valdez*) oil spill // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1996. № 10 (53). C. 2388–2393.
149. 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. № 2 (153).
150. Kong S.-R., Yamamoto M., Shaari H., Hayashi R., Seki O., Mohd Tahir N., Fadzil M. F., Sulaiman A. The significance of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in Borneo peat core for the reconstruction of fire history // PLoS One. 2021. № 9 (16). C. e0256853.
151. Korajoki H., Vornanen M. Expression of SERCA and phospholamban in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart: comparison of atrial and ventricular tissue and effects of thermal acclimation // Journal of Experimental Biology. 2012. № 7 (215). C. 1162–1169.
152. Körner J., Albani S., Sudha Bhagavath Eswaran V., Roehl A. B., Rossetti G., Lampert A. Sodium Channels and Local Anesthetics—Old Friends With New Perspectives // Frontiers in Pharmacology. 2022. (13). C. 837088.
153. Korsh J., Shen A., Aliano K., Davenport T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Breast Cancer: A Review of the Literature // Breast Care. 2015. № 5 (10). C. 316–318.
154. Kramer J. [и др.]. Cross-site and cross-platform variability of automated patch clamp assessments of drug effects on human cardiac currents in recombinant cells // Scientific Reports. 2020. № 1 (10). C. 5627.
155. Krupenio N. N., Parmuzin I. Yu., 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. № 11 (29). C. 648–652.

156. Kubly K. L., Stecyk J. A. W. Temperature-dependence of L-type Ca^{2+} current in ventricular cardiomyocytes of the Alaska blackfish (*Dallia pectoralis*) // *Journal of Comparative Physiology B*. 2015. № 8 (185). C. 845–858.
157. Kupersmidt S., Snyders D. J., Raes A., Roden D. M. A K^{+} Channel Splice Variant Common in Human Heart Lacks a C-terminal Domain Required for Expression of Rapidly Activating Delayed Rectifier Current // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. № 42 (273). C. 27231–27235.
158. Lai Y.-C., Tsai C.-H., Chen Y.-L., Chang-Chien G.-P. Distribution and sources of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons at an industrial region in Kaohsiung, Taiwan // *Aerosol Air Qual. Res.* 2017. № 3 (17). C. 776–787.
159. Lammel G., Sehili A. M., Bond T. C., Feichter J., Grassl H. Gas/particle partitioning and global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons--a modelling approach // *Chemosphere*. 2009. № 1 (76). C. 98–106.
160. Lari E., Steinkey D., Razmara P., Mohaddes E., Pyle G. G. Oil sands process-affected water impairs the olfactory system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. (170). C. 62–67.
161. Lawal A. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review // *Cogent Environ. Sci.* 2017. № 1 (3). C. 1339841.
162. Leong I. U. S., Skinner J. R., Shelling A. N., Love D. R. Identification and expression analysis of *kcnh2* genes in the zebrafish // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. № 4 (396). C. 817–824.
163. Lipiatou E., Tolosa I., Simó R., Bouloubassi I., Dachs J., Marti S., Sicre M.-A., Bayona J. M., Grimalt J. O., Saliott A., Albaiges J. Mass budget and dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean Sea // *Deep Sea Res. Part 2 Top. Stud. Oceanogr.* 1997. № 3–4 (44). C. 881–905.
164. Liu J., Jia J., Grathwohl P. Dilution of concentrations of PAHs from atmospheric particles, bulk deposition to soil: a review // *Environ. Geochem. Health*. 2022. № 12 (44). C. 4219–4234.
165. Liu L.-Y., Kukučka P., Venier M., Salamova A., Klánová J., Hites R. A. Differences in spatiotemporal variations of atmospheric PAH levels between North America and Europe: data from two air monitoring projects // *Environ. Int.* 2014. (64). C. 48–55.
166. Lohmann R., Gioia R., Jones K. C., Nizzetto L., Temme C., Xie Z., Schulz-Bull D., Hand I., Morgan E., Jantunen L. Organochlorine pesticides and PAHs in the surface water and atmosphere of the North Atlantic and Arctic Ocean // *Environ. Sci. Technol.* 2009. № 15 (43). C. 5633–5639.
167. London B., Wang D. W., Hill J. A., Bennett P. B. The transient outward current in mice lacking the potassium channel gene *Kv1.4* // *The Journal of Physiology*. 1998. № 1 (509). C. 171–182.
168. Łyszczarz S., Lasota J., Szuszkiewicz M. M., Błońska E. Soil texture as a key driver of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) distribution in forest topsoils // *Sci. Rep.* 2021. № 1 (11). C. 14708.

169. Ma Y., Xie Z., Yang H., Möller A., Halsall C., Cai M., Sturm R., Ebinghaus R. Deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the North Pacific and the Arctic // *J. Geophys. Res.* 2013. № 11 (118). C. 5822–5829.
170. Macianskiene R., Bito V., Raeymaekers L., Brandts B., Sipido K. R., Mubagwa K. Action potential changes associated with a slowed inactivation of cardiac voltage-gated sodium channels by KB130015 // *British Journal of Pharmacology*. 2003. № 8 (139). C. 1469–1479.
171. Magnuson J. T., Bautista N. M., Lucero J., Lund A. K., Xu E. G., Schlenk D., Burggren W. W., Roberts A. P. Exposure to Crude Oil Induces Retinal Apoptosis and Impairs Visual Function in Fish // *Environmental Science & Technology*. 2020. № 5 (54). C. 2843–2850.
172. Magnuson J. T., Khursigara A. J., Allmon E. B., Esbaugh A. J., Roberts A. P. Effects of Deepwater Horizon crude oil on ocular development in two estuarine fish species, red drum (*Sciaenops ocellatus*) and sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018. (166). C. 186–191.
173. Maier S. K. G., Westenbroek R. E., McCormick K. A., Curtis R., Scheuer T., Catterall W. A. Distinct Subcellular Localization of Different Sodium Channel α and β Subunits in Single Ventricular Myocytes From Mouse Heart // *Circulation*. 2004. № 11 (109). C. 1421–1427.
174. Maliszewska-Kordybach B. Sources, Concentrations, Fate and Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Environment. Part A: PAHs in Air // *Pol. J. Environ. Stud.* 1999. № 3 (8). C. 131–136.
175. Manoli E., Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis // *Trends Analyt. Chem.* 1999. № 6 (18). C. 417–428.
176. Marchal G. A., Remme C. A. Subcellular diversity of Nav1.5 in cardiomyocytes: distinct functions, mechanisms and targets // *The Journal of Physiology*. 2023. № 5 (601). C. 941–960.
177. Marris C. R., Kompella S. N., Trafford A. W., Hancox J. C., Shiels H. A. The air pollutant phenanthrene disrupts calcium cycling and alters repolarization in female sheep ventricular cardiomyocytes // *Physiological Reports*. 2025. № 16 (13). C. e70471.
178. Masih J., Singhvi R., Taneja A., Kumar K., Masih H. Gaseous/particulate bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), seasonal variation in North central part of rural India // *Sustain. Cities Soc.* 2012. (3). C. 30–36.
179. Maylie J., Morad M. Evaluation of T- and L-type Ca^{2+} currents in shark ventricular myocytes // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1995. № 5 (269). C. H1695–H1703.
180. Menichini E. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability // *Sci. Total Environ.* 1992. № 1–2 (116). C. 109–135.

181. Meyer B. K., Pray-Grant M. G., Vanden Heuvel J. P., Perdew G. H. Hepatitis B Virus X-Associated Protein 2 Is a Subunit of the Unliganded Aryl Hydrocarbon Receptor Core Complex and Exhibits Transcriptional Enhancer Activity // *Molecular and Cellular Biology*. 1998. № 2 (18). C. 978–988.
182. Minard A. Y., Clark C. J., Ahern C. A., Piper R. C. Beta-subunit-eliminated eHAP expression (BeHAPe) cells reveal new properties of the cardiac voltage-gated sodium channel // 2023.
183. Mogi A., Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer // *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. (2011). C. 583929.
184. Moore J. W., Ramamoorthy S. Organic Chemicals in Natural Waters: Applied Monitoring and Impact Assessment / J. W. Moore, S. Ramamoorthy, Springer Science & Business Media, 2012. 318 c.
185. Moorthy B., Chu C., Carlin D. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer // *Toxicol. Sci.* 2015. № 1 (145). C. 5–15.
186. Mu Q., Shiraiwa M., Octaviani M., Ma N., Ding A., Su H., Lammel G., Pöschl U., Cheng Y. Temperature effect on phase state and reactivity controls atmospheric multiphase chemistry and transport of PAHs // *Sci Adv.* 2018. № 3 (4). C. eaap7314.
187. Musa Bandowe B. A., Rückamp D., Bragança M. A. L., Laabs V., Amelung W., Martius C., Wilcke W. Naphthalene production by microorganisms associated with termites: Evidence from a microcosm experiment // *Soil Biol. Biochem.* 2009. № 3 (41). C. 630–639.
188. Näbauer M., Beuckelmann D. J., Überfuhr P., Steinbeck G. Regional Differences in Current Density and Rate-Dependent Properties of the Transient Outward Current in Subepicardial and Subendocardial Myocytes of Human Left Ventricle // *Circulation*. 1996. № 1 (93). C. 168–177.
189. Nebert D. W., Dalton T. P., Okey A. B., Gonzalez F. J. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer // *J. Biol. Chem.* 2004. № 23 (279). C. 23847–23850.
190. Neilson A. N. PAHs and Related Compounds: Chemistry / A. N. Neilson, Springer, 2010. 414 c.
191. Nelson D., Heuer R. M., Cox G. K., Stieglitz J. D., Hoenig R., Mager E. M., Benetti D. D., Grosell M., Crossley D. A. Effects of crude oil on in situ cardiac function in young adult mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) // *Aquatic Toxicology*. 2016. (180). C. 274–281.
192. Nerbonne J. M. Mouse models of arrhythmogenic cardiovascular disease: challenges and opportunities // *Current Opinion in Pharmacology*. 2014. (15). C. 107–114.
193. Nerbonne J. M., Kass R. S. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization // *Physiological Reviews*. 2005. № 4 (85). C. 1205–1253.
194. Nguyen P. T., DeMarco K. R., Vorobyov I., Clancy C. E., Yarov-Yarovoy V. Structural basis for antiarrhythmic drug interactions with the human cardiac sodium channel // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. № 8 (116). C. 2945–2954.

195. Nikolaou K., Masclet P., Mouvier G. Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere — A critical review // *Sci. Total Environ.* 1984. № 2 (32). C. 103–132.
196. Noreng S., Li T., Payandeh J. Structural Pharmacology of Voltage-Gated Sodium Channels // *Journal of Molecular Biology.* 2021. № 17 (433). C. 166967.
197. Oliva A. L., La Colla N. S., Arias A. H., Blasina G. E., Lopez Cazorla A., Marcovecchio J. E. Distribution and human health risk assessment of PAHs in four fish species from a SW Atlantic estuary // *Environmental Science and Pollution Research.* 2017. № 23 (24). C. 18979–18990.
198. Olowojuni O., Olaifa F. E., Oyebola O. O. Bioaccumulation and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon in *Pseudolithus* species in the Gulf of Guinea, Ondo State, Nigeria // *Scientific Reports.* 2025. № 1 (15). C. 37637.
199. Orowe A. U., Ikponmwen E. G. Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles exposed to crude oil contaminated water // *Chemistry of the Total Environment.* 2022. № 1 (2). C. 10–16.
200. Palmisano V. F., Gómez-Rodellar C., Pollak H., Cárdenas G., Corry B., Faraji S., Nogueira J. J. Binding of Azobenzene and p-Diaminoazobenzene to the Human Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.4 // 2020.
201. Pampanin D., Sydnes M. Polycyclic aromatic hydrocarbons a constituent of petroleum: Presence and influence in the aquatic environment InTech, 2013.
202. Patel A. B., Shaikh S., Jain K. R., Desai C., Madamwar D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches // *Front. Microbiol.* 2020. (11). C. 562813.
203. Peng X., Sun X., Yu M., Fu W., Chen H., Chen J. Chronic exposure to environmental concentrations of phenanthrene impairs zebrafish reproduction // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2019. (182). C. 109376.
204. Plaut I. Critical swimming speed: its ecological relevance // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology.* 2001. № 1 (131). C. 41–50.
205. Polkowska Z., Cichała-Kamrowska K., Ruman M., Koziół K., Krawczyk W. E., Namieśnik J. Organic pollution in surface waters from the Fuglebekken basin in Svalbard, Norwegian Arctic // *Sensors.* 2011. № 9 (11). C. 8910–8929.
206. Ramesh A., Archibong A., Hood D., Guo Z., Loganathan B. Global Environmental Distribution and Human Health Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons CRC Press, 2011. C. 96–124.
207. Ramírez N., Cuadras A., Rovira E., Marcé R. M., Borrull F. Risk assessment related to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in gas and particle phases near industrial sites // *Environ. Health Perspect.* 2011. № 8 (119). C. 1110–1116.
208. Ravindra K., Sokhi R., Van Grieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation // *Atmos. Environ.* 2008. № 13 (42). C. 2895–2921.

209. Reid B. C., Ghazarian A. A., DeMarini D. M., Sapkota A., Jack D., Lan Q., Winn D. M., Birnbaum L. S. Research opportunities for cancer associated with indoor air pollution from solid-fuel combustion // *Environ. Health Perspect.* 2012. № 11 (120). C. 1495–1498.
210. Rengarajan T., Rajendran P., Nandakumar N., Lokeshkumar B., Rajendran P., Nishigaki I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2015. № 3 (5). C. 182–189.
211. Rodgers K. M., Udesky J. O., Rudel R. A., Brody J. G. Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms // *Environ. Res.* 2018. (160). C. 152–182.
212. Rosati B., Dong M., Cheng L., Liou S.-R., Yan Q., Park J. Y., Shiang E., Sanguinetti M., Wang H.-S., McKinnon D. Evolution of ventricular myocyte electrophysiology // *Physiological Genomics.* 2008. № 3 (35). C. 262–272.
213. Rose P., Schleimer J.-H., Schreiber S. Modifications of sodium channel voltage dependence induce arrhythmia-favouring dynamics of cardiac action potentials // *PLOS ONE.* 2020. № 8 (15). C. e0236949.
214. Rybicki B. A., Nock N. L., Savera A. T., Tang D., Rundle A. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in prostate carcinogenesis // *Cancer Lett.* 2006. № 2 (239). C. 157–167.
215. Saeed T., Al-Mutairi M. Comparative composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sea water-soluble fractions of different Kuwaiti crude oils // *Advances in Environmental Research.* 2000. № 2 (4). C. 141–145.
216. Salgado-Almario J., Molina Y., Vicente M., Martínez-Sielva A., Rodríguez-García R., Vincent P., Domingo B., Llopis J. ERG potassium channels and T-type calcium channels contribute to the pacemaker and atrioventricular conduction in zebrafish larvae // *Acta Physiologica.* 2024. № 2 (240). C. e14075.
217. Schlenker L. S., Welch M. J., Meredith T. L., Mager E. M., Lari E., Babcock E. A., Pyle G. G., Munday P. L., Grosell M. Damsels in Distress: Oil Exposure Modifies Behavior and Olfaction in Bicolor Damselfish (*Stegastes partitus*) // *Environmental Science & Technology.* 2019. № 18 (53). C. 10993–11001.
218. Schram G., Pourrier M., Melnyk P., Nattel S. Differential Distribution of Cardiac Ion Channel Expression as a Basis for Regional Specialization in Electrical Function // *Circulation Research.* 2002. № 9 (90). C. 939–950.
219. Schroder E. A., Burgess D. E., Zhang X., Lefta M., Smith J. L., Patwardhan A., Bartos D. C., Elayi C. S., Esser K. A., Delisle B. P. The cardiomyocyte molecular clock regulates the circadian expression of *Kcnh2* and contributes to ventricular repolarization // *Heart Rhythm.* 2015. № 6 (12). C. 1306–1314.

220. Sehnert A. J., Huq A., Weinstein B. M., Walker C., Fishman M., Stainier D. Y. R. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility // *Nature Genetics*. 2002. № 1 (31). C. 106–110.
221. Shen H., Huang Y., Wang R., Zhu D., Li W., Shen G., Wang B., Zhang Y., Chen Y., Lu Y., Chen H., Li T., Sun K., Li B., Liu W., Liu J., Tao S. Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions // *Environ. Sci. Technol.* 2013. № 12 (47). C. 6415–6424.
222. Shiels H. A., Di Maio A., Thompson S., Block B. A. Warm fish with cold hearts: thermal plasticity of excitation–contraction coupling in bluefin tuna // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011. № 1702 (278). C. 18–27.
223. Shiels H. A., Paajanen V., Vornanen M. Sarcolemmal ion currents and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in ventricular myocytes from the cold stenothermic fish, the burbot (*Lota lota*) // *Journal of Experimental Biology*. 2006. № 16 (209). C. 3091–3100.
224. Shiels H. A., Vornanen M., Farrell A. P. Effects of temperature on intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in trout atrial myocytes // *Journal of Experimental Biology*. 2002. № 23 (205). C. 3641–3650.
225. Sørhus E., Incardona J. P., Furmanek T., Goetz G. W., Scholz N. L., Meier S., Edvardsen R. B., Jentoft S. Novel adverse outcome pathways revealed by chemical genetics in a developing marine fish // *eLife*. 2017. (6). C. e20707.
226. Sørhus E., Incardona J. P., Karlsen Ø., Linbo T., Sørensen L., Nordtug T., Van Der Meeren T., Thorsen A., Thorbjørnsen M., Jentoft S., Edvardsen R. B., Meier S. Crude oil exposures reveal roles for intracellular calcium cycling in haddock craniofacial and cardiac development // *Scientific Reports*. 2016. № 1 (6). C. 31058.
227. Sørhus E., Nakken C. L., Donald C. E., Ripley D. M., Shiels H. A., Meier S. Cardiac toxicity of phenanthrene depends on developmental stage in Atlantic cod (*Gadus morhua*) // *Science of The Total Environment*. 2023. (881). C. 163484.
228. Srogi K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review // *Environmental Chemistry Letters*. 2007. № 4 (5). C. 169–195.
229. Stading R., Gastelum G., Chu C., Jiang W., Moorthy B. Molecular mechanisms of pulmonary carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Implications for human lung cancer // *Seminars in Cancer Biology*. 2021. (76). C. 3–16.
230. Stecyk J. A. W., Couturier C. S., Abramochkin D. V., Hall D., Arrant-Howell A., Kubly K. L., Lockmann S., Logue K., Trueblood L., Swalling C., Pinard J., Vogt A. Cardiophysiological responses of the air-breathing Alaska blackfish to cold acclimation and chronic hypoxic submergence at 5°C // *Journal of Experimental Biology*. 2020. C. jeb.225730.

231. Sun L., Zuo Z., Chen M., Chen Y., Wang C. Reproductive and transgenerational toxicities of phenanthrene on female marine medaka (*Oryzias melastigma*) // *Aquatic Toxicology*. 2015. (162). C. 109–116.
232. Sun Y., Yu H., Zhang J., Yin Y., Shi H., Wang X. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure // *Chemosphere*. 2006. № 8 (63). C. 1319–1327.
233. Tan J., Choi J. S., Soderlund D. M. Coexpression with auxiliary β subunits modulates the action of tefluthrin on rat Nav1.6 and Nav1.3 sodium channels // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2011. № 3 (101). C. 256–264.
234. Tao E., Corry B. Drugs exhibit diverse binding modes and access routes in the Nav1.5 cardiac sodium channel pore // *Journal of General Physiology*. 2025. № 2 (157). C. e202413658.
235. Tikhonov D. B., Zhorov B. S. Mechanism of sodium channel block by local anesthetics, antiarrhythmics, and anticonvulsants // *Journal of General Physiology*. 2017. № 4 (149). C. 465–481.
236. Tsuji Y., Yamazaki M., Shimojo M., Yanagisawa S., Inden Y., Murohara T. Mechanisms of torsades de pointes: an update // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2024. (11). C. 1363848.
237. Turner R. E., Overton E. B., Meyer B. M., Miles M. S., Hooper-Bui L. Changes in the concentration and relative abundance of alkanes and PAHs from the Deepwater Horizon oiling of coastal marshes // *Mar. Pollut. Bull.* 2014. № 1–2 (86). C. 291–297.
238. Vagge G., Cutroneo L., Castellano M., Canepa G., Bertolotto R. M., Capello M. The effects of dredging and environmental conditions on concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in the water column // *Mar. Pollut. Bull.* 2018. (135). C. 704–713.
239. Van Drooge B. L., Fernández P., Grimalt J. O., Stuchlík E., Torres García C. J., Cuevas E. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in remote European and Atlantic sites located above the boundary mixing layer // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2010. № 6 (17). C. 1207–1216.
240. Van Egeren D., Kohli K., Warner J. L., Bedard P. L., Riely G., Lepisto E., Schrag D., LeNoue-Newton M., Catalano P., Kehl K. L., Michor F., AACR Project GENIE Consortium represented by Shawn Sweeney Genomic analysis of early-stage lung cancer reveals a role for TP53 mutations in distant metastasis // *Sci. Rep.* 2022. № 1 (12). C. 19055.
241. 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 // *Environ. Toxicol. Chem.* 2019. № 10 (38). C. 2145–2153.
242. Vijayanand M., Ramakrishnan A., Subramanian R., Issac P. K., Nasr M., Khoo K. S., Rajagopal R., Greff B., Wan Azelee N. I., Jeon B.-H., Chang S. W., Ravindran B. Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in the water environment: A review on toxicity, microbial biodegradation, systematic biological advancements, and environmental fate // *Environ. Res.* 2023. (227). C. 115716.

243. Vikhorev P. G., Vikhoreva N. N. Cardiomyopathies and Related Changes in Contractility of Human Heart Muscle // International Journal of Molecular Sciences. 2018. № 8 (19). C. 2234.
244. Vornanen M. L-Type Ca^{2+} Current in Fish Cardiac Myocytes: Effects of Thermal Acclimation and β -Adrenergic Stimulation // Journal of Experimental Biology. 1998. № 4 (201). C. 533–547.
245. Vornanen M. The temperature dependence of electrical excitability in fish hearts // Journal of Experimental Biology. 2016. № 13 (219). C. 1941–1952.
246. Vornanen M., Badr A., Haverinen J. Cardiac arrhythmias in fish induced by natural and anthropogenic changes in environmental conditions // Journal of Experimental Biology. 2024. № 20 (227). C. jeb247446.
247. Vornanen M., Hassinen M. Zebrafish heart as a model for human cardiac electrophysiology // Channels. 2016. № 2 (10). C. 101–110.
248. Vornanen M., Hassinen M., Haverinen J. Tetrodotoxin Sensitivity of the Vertebrate Cardiac Na^{+} Current // Marine Drugs. 2011. № 11 (9). C. 2409–2422.
249. Vornanen M., Haverinen J., Egginton S. Acute heat tolerance of cardiac excitation in the brown trout (*Salmo trutta fario*) // Journal of Experimental Biology. 2013. C. jeb.091272.
250. Vornanen M., Shiels H. A., Farrell A. P. Plasticity of excitation–contraction coupling in fish cardiac myocytes // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2002. № 4 (132). C. 827–846.
251. Wang L., Feng Z.-P., Kondo C. S., Sheldon R. S., Duff H. J. Developmental Changes in the Delayed Rectifier K^{+} Channels in Mouse Heart // Circulation Research. 1996. № 1 (79). C. 79–85.
252. Wang R., Tao S., Wang B., Yang Y., Lang C., Zhang Y., Hu J., Ma J., Hung H. Sources and pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons transported to Alert, the Canadian High Arctic // Environ. Sci. Technol. 2010. № 3 (44). C. 1017–1022.
253. Wang R., Yousaf B., Sun R., Zhang H., Zhang J., Liu G. Emission characterization and $\delta(13)\text{C}$ values of parent PAHs and nitro-PAHs in size-segregated particulate matters from coal-fired power plants // J. Hazard. Mater. 2016. (318). C. 487–496.
254. Wang W., Simonich S. L. M., Wang W., Giri B., Zhao J., Xue M., Cao J., Lu X., Tao S. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and gas/particle partitioning at background, rural village and urban sites in the North China Plain // Atmos. Res. 2011. № 2 (99). C. 197–206.
255. Wang Z., Yue L., White M., Pelletier G., Nattel S. Differential Distribution of Inward Rectifier Potassium Channel Transcripts in Human Atrium Versus Ventricle // Circulation. 1998. № 22 (98). C. 2422–2428.

256. Westenbroek R. E., Bischoff S., Fu Y., Maier S. K. G., Catterall W. A., Scheuer T. Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013. (64). C. 69–78.
257. Wilcke W. Synopsis polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil—a review // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2000.
258. Wilcke W. Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil // *Geoderma*. 2007. № 3 (141). C. 157–166.
259. Witt G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea // *Mar. Pollut. Bull.* 1995. № 4 (31). C. 237–248.
260. Wu L., Zhong L., Ru H., Yao F., Ni Z., Li Y. Thyroid disruption and growth inhibition of zebrafish embryos/larvae by phenanthrene treatment at environmentally relevant concentrations // *Aquatic Toxicology*. 2022. (243). C. 106053.
261. Xiao Y.-F., Ke Q., Wang S.-Y., Auktor K., Yang Y., Wang G. K., Morgan J. P., Leaf A. Single point mutations affect fatty acid block of human myocardial sodium channel α subunit Na^+ channels // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. № 6 (98). C. 3606–3611.
262. Xu C., Dong D., Meng X., Su X., Zheng X., Li Y. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil surfaces under UV irradiation // *Journal of Environmental Sciences*. 2013. № 3 (25). C. 569–575.
263. Xu E. G., Mager E. M., Grosell M., Pasparakis C., Schlenker L. S., Stieglitz J. D., Benetti D., Hazard E. S., Courtney S. M., Diamante G., Freitas J., Hardiman G., Schlenk D. Time- and Oil-Dependent Transcriptomic and Physiological Responses to *Deepwater Horizon* Oil in Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) Embryos and Larvae // *Environmental Science & Technology*. 2016. № 14 (50). C. 7842–7851.
264. Yaar S., Filatova T. S., England E., Kompella S. N., Hancox J. C., Bechtold D. A., Venetucci L., Abramochkin D. V., Shiels H. A. Global Air Pollutant Phenanthrene and Arrhythmic Outcomes in a Mouse Model // *Environmental Health Perspectives*. 2023. № 11 (131). C. 117002.
265. Yang Q., Du L., Tsai K., Wang X., Li M., You Q. Pharmacophore Mapping for Kv1.5 Potassium Channel Blockers // *QSAR & Combinatorial Science*. 2009. № 1 (28). C. 59–71.
266. Yang Y., Guo P., Zhang Q., Li D., Zhao L., Mu D. Seasonal variation, sources and gas/particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in Guangzhou, China // *Sci. Total Environ.* 2010. № 12 (408). C. 2492–2500.
267. Yarotsky V., Elmslie K. S. Roscovitine, a cyclin-dependent kinase inhibitor, affects several gating mechanisms to inhibit cardiac L-type ($\text{Ca}_v1.2$) calcium channels // *British Journal of Pharmacology*. 2007. № 3 (152). C. 386–395.

268. Yarotskyy V., Gao G., Du L., Ganapathi S. B., Peterson B. Z., Elmslie K. S. Roscovitine Binds to Novel L-channel (CaV1.2) Sites That Separately Affect Activation and Inactivation // *Journal of Biological Chemistry*. 2010. № 1 (285). C. 43–53.
269. Yin F., John G. F., Hayworth J. S., Clement T. P. Long-term monitoring data to describe the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in Deepwater Horizon oil submerged off Alabama's beaches // *Sci. Total Environ*. 2015. (508). C. 46–56.
270. Zhai Y., Wang H., Lin X., Xia X. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in different tissues of zebrafish (*Danio rerio*) investigated with PBTK model // *Environmental Science and Pollution Research*. 2023. № 54 (30). C. 116313–116324.
271. Zhang D., Wang J., Zeng H. Soil polycyclic aromatic hydrocarbons across urban density zones in Shenzhen, China: Occurrences, source apportionments, and spatial risk assessment // *Pedosphere*. 2016. № 5 (26). C. 676–686.
272. Zhang H. B., Luo Y. M., Wong M. H., Zhao Q. G., Zhang G. L. Distributions and concentrations of PAHs in Hong Kong soils // *Environ. Pollut*. 2006. № 1 (141). C. 107–114.
273. Zhang H., Zhang H., Wang C., Wang Y., Zou R., Shi C., Guan B., Gamper N., Xu Y. Auxiliary subunits control biophysical properties and response to compound NS5806 of the Kv4 potassium channel complex // *The FASEB Journal*. 2020. № 1 (34). C. 807–821.
274. Zhou P., Babcock J., Liu L., Li M., Gao Z. Activation of human ether-a-go-go related gene (hERG) potassium channels by small molecules // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2011. № 6 (32). C. 781–788.
275. Europe's environment: the fourth assessment под ред. European Environment Agency, Luxembourg: Publications Office, 2007. 1 с.