

Экологическая физиология и биохимия гидробионтов

УДК 597.554.3:574.532:574.64

ВЛИЯНИЕ МЕДИ В СУБЛЕТАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ И ТЕРМАЛЬНОГО СТРЕССА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОДИ ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS*

И. Л. Голованова*, А. А. Филиппов, Е. А. Куливацкая,
В. А. Подгорная, А. К. Смирнов, Г. М. Чуйко

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: *golovanova@ibiw.ru
Поступила в редакцию 10.09.2022

Исследовано хроническое действие растворенной в воде меди и последующего теплового стресса на протеолитическую активность (ПА) и амилолитическую активность (АА) в кишечнике, а также активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и содержание водорастворимого белка (ВРБ) в мозге у молоди плотвы *Rutilus rutilus*. У рыб контрольной (0 мкг/л Cu) и опытных групп (0.01 и 0.1 мг/л Cu) определены значения сублетальной температуры методом критического термического максимума (КТМ) при скорости нагрева воды 8°C/ч. Экспозиция рыб в течение 7 и 14 сут не влияла на термоустойчивость молоди плотвы. Средние значения КТМ составили 27.5°C у рыб контрольной и опытных групп. Повышение температуры воды снижало АА на 21%, активность АХЭ на 24%, но повышало ПА на 32% у рыб контрольной группы. У рыб, подвергавшихся воздействию Cu, АА была ниже на 22–34%, ПА – на 57% лишь при концентрации Cu 0.01 мг/л на 14 сут опыта. Последующий температурный стресс не менял реакции протеиназ и гликозидаз на действие Cu. Активность АХЭ была на 28% ниже контроля после воздействия Cu (0.1 мг/л), а кратковременная термическая нагрузка усиливала ингибирующее действие Cu и при более низкой концентрации. Увеличение количества ВРБ на 36–58% выявлено лишь после 7 сут воздействия Cu, при этом температурный стресс не влиял на величину эффекта. В целом Cu в концентрациях, встречающихся в водной среде, может снижать активность пищеварительных гидролаз в кишечнике молоди плотвы, уменьшая скорость ассимиляции белковых и углеводных компонентов пищи. Торможение активности АХЭ мозга усиливается последующим температурным стрессом. Полученные результаты важны при оценке экологических рисков хронического действия Cu в зонах термального загрязнения водоемов.

Ключевые слова: плотва, Cu, протеолитическая активность, амилолитическая активность, ацетилхолинэстераза мозга, водорастворимый белок, верхняя сублетальная температура, критический термический максимум.

DOI: 10.47021/0320-3557-2022-7-16

ВВЕДЕНИЕ

Антропогенное химическое и термальное загрязнение водной среды является важным фактором, влияющим на жизнедеятельность гидробионтов. За последние несколько десятилетий степень загрязнения водных экосистем микроэлементами увеличилась вследствие их широкого использования в сельскохозяйственных, химических и промышленных процессах. Медь обнаружена почти во всех водоемах мира, а ее концентрация варьирует от 0.05 до 0.56 мг/л [Zhang et al., 2019], существенно превышая допустимые концентрации ($Cu^{2+} < 0.001$ мг/л) для воды рыбохозяйственных водоемов России [Перевозников, Богданова, 1999 (Perevoznicov, Bogdanova, 1999)]. Являясь необходимым для жизни микроэлементом, Cu принимает активное участие в обмене веществ, однако в высоких дозах – это тяжелый металл с выраженным токсическим эффектом.

Температура часто играет ведущую роль в регуляции основных физиологических про-

цессов у эктотермов, поскольку скорость всех биохимических реакций у них напрямую зависит от температуры окружающей среды. Аномальные изменения температуры, потепление климата, расширение зон термального загрязнения меняют температурную среду обитания рыб. Увеличение температуры водной среды может влиять не только на физиолого-биохимические показатели рыб [Голованов, 2013 (Golovanov, 2013)], но и на реакцию организма на химические агенты [Sokolova, Lannig, 2008; Zebral et al., 2019]. Воздействие сублетальных концентраций Cu [de Lima et al., 2013; Gioda et al., 2013; Kumar, Nandan, 2014; Kuz'mina, 2017; Golovanova et al., 2021], а также термального стресса [Голованов, 2013 (Golovanov, 2013); Golovanova et al., 2013] на физиолого-биохимические показатели костистых рыб достаточно исследовано. При этом установлено, что низкочастотное магнитное поле (50 Гц) нивелирует тормозящий эффект растворенной в воде меди (0.001, 0.01 и

0.1 мг/л) на АА и активность мальтазы в кишечнике плотвы [Golovanova et al., 2021], а введение витамина С в концентрации 2.5 мг/л снижает токсическое действие Cu (0.17 и 0.34 мг/л) на гуморальные и биохимические показатели у анабаса *Anabas testudineus* [Kumar, Nandan, 2014]. Есть предположение, что тепловой стресс может влиять на физиологические процессы у рыб таким же образом, как и воздействие растворенной в воде Cu [Sokolova, Lannig, 2008]. Однако влияние хронического действия Cu в сублетальных концентрациях и последующей функциональной нагрузки в виде термального стресса на активность пищеварительных и холинэргических ферментов у рыб ранее не исследовали.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Двухлетки плотвы *Rutilus rutilus* (масса 6.23 ± 0.49 г, длина тела – 7.65 ± 0.16 см) были отловлены в конце сентября 2020 г. в прибрежной зоне Рыбинского водохранилища (Россия) при температуре воды 16°C и доставлены в лабораторию в течение 1 ч после поимки. В течение двух месяцев рыб содержали в 200 л аквариумах с постоянной аэрацией при температуре воды $15.5 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7.5–7.6, содержание O_2 8.0–9.7 мг/л в условиях постоянного фотопериода (свет/темнота 12/12 ч, свет 07:00–19:00). Затем в течение 10-ти сут рыб акклиматизировали к температуре 14°C . До начала экспериментов и в период акклиматизации рыб кормили ежедневно личинками хирономид *Chironomus* sp. в количестве 5–10% массы тела. Затем рыб разделили на 3 группы по 24 экз. (2 повторности). Рыб контрольной группы поместили в 2 аквариума объемом 135 л с чистой водой, опытных групп – в 4 аквариума с водой, содержащей растворы $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 0.01 или 0.1 мг/л, рассчитанной по содержанию ионов Cu^{2+} в соли. Эти концентрации для плотвы составляют соответственно 1/20 и 1/2 от ЛК_{50} (концентрация, летальная для 50% особей за 48 ч), а концентрация анионов SO_4^{2-} в исследуемых растворах была нетоксичной [Перечень..., 1999 (Perchen'..., 1999)]. Воду и раствор меди в аквариумах (на 80% от начального объема) меняли 2 раза в неделю без отсадки рыб. Температурный режим и фотопериод оставались постоянными. Во время эксперимента рыб кормили 1 раз в сутки личинками хирономид из расчета 4% от общей массы тела.

По истечении 7 и 14 сут опыта группу рыб (по 6 экз. в каждой, две повторности) помещали в экспериментальный аквариум объемом 60 л, оборудованный системой нагрева и

Плотва населяет водоемы Европы, Сибири, бассейны Каспийского и Аральского морей. Наибольшее промысловое значение в России имеют вобла, тарань и сибирская плотва. Молодь плотвы проявляет высокую чувствительность к действию ряда природных и антропогенных факторов и часто используется в различных экспериментах [Голованов, 2013 (Golovanov, 2013); Talikina et al., 2013; Krylov et al., 2019].

Цель работы – оценить хроническое сублетальное действие растворенной в воде Cu на термоустойчивость, активность кишечных протеиназ (ПА) и гликозидаз (АА), а также активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и содержание водорастворимого белка (ВРБ) в мозге молоди плотвы *Rutilus rutilus*.

аэрации. Температуру воды в аквариуме повышали со скоростью $8^\circ\text{C}/\text{ч}$ до потери рыбами локомоторной способности (переворот кверху брюшком), сублетальное значение температуры фиксировали как КТМ. Такая скорость повышения температуры отмечена при аварийных сбросах подогретых вод промышленных предприятий, а также часто применяется в качестве стандартной при определении термоустойчивости рыб [Голованов, 2013 (Golovanov, 2013)]. Продолжительность эксперимента не превышала 2 ч, рыб при этом не кормили. Рыб контрольной группы содержали при температуре акклиматизации и не подвергали нагреву. По 6 экз. рыб были взяты для биохимического анализа: определения активности пищеварительных гликозидаз, активности АХЭ мозга и содержания водорастворимого белка. Всего исследовано 144 экз. рыб.

Для определения активности пищеварительных гидролаз готовили индивидуальные гомогенаты из средней части кишечника при помощи стеклянного гомогенизатора, добавляя охлажденный до $2\text{--}4^\circ\text{C}$ раствор Рингера для холоднокровных животных (110 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 1.3 мМ CaCl_2 , pH 7.4). Растворы субстратов (1%-ный раствор казеина и 1.8%-ный картофельный крахмал) готовили на таком же растворе Рингера. Инкубацию гомогената и субстрата проводили в течение 20–60 мин при температуре 20°C pH 7.4 при непрерывном перемешивании.

Протеолитическую активность (главным образом трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина модифицированным методом Ансона с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [Kuz'mina et al., 2021]. Амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов,

гидролизующих крахмал (α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20), оценивали по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона [Уголев и др., 1969 (Ugolev et al., 1969)]. Активность ферментов определяли в 3 повторностях с учетом фона (количества продуктов реакции в начальном гомогенате). Интенсивность окраски образцов измеряли на спектрофотометре Lambda 25 UV/VIS (Perkin & Elmer, USA) при длине волны 670 нм. Скорость гидролиза выражена в микромолях продуктов реакции на грамм влажной массы ткани в мин (мкмоль/г · мин).

Перед анализом активности АХЭ (ацетилхолинацетилгидролаза КФ 3.1.1.17) готовили гомогенаты из целого мозга с добавлением 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.5) при помощи диспергатора КА Т10 Ultra-Turrax. Затем пробы центрифугировали на рефрижераторной центрифуге Mikro 22R при 10000 g и температуре 4°C в течение 10 мин. Для биохимического анализа использовали супернатант.

Активность АХЭ определяли методом Элмана [Ellman et al., 1961] в собственной модификации [Chuiko et al., 2003] при температуре 30°C в течение 10–30 мин. В качестве субстрата использовали иодид ацетилтиохолина (АТХ) в конечной концентрации $4.3 \cdot 10^{-4}$ М, и проявляющего реагента – 5.5-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ) в конечной

концентрации $7.1 \cdot 10^{-5}$ М. Остановку ферментативной реакции проводили добавлением 0.1% раствора неостигмин метил сульфата (neostigmine methyl sulfate). Все реактивы фирмы Sigma, USA.

Содержание ВРБ определяли по методу Бредфорд [Bradford, 1976]. Для калибровки использовали альбумин из сыворотки человека (производство фирмы Reanal) в концентрации 1.25 мг/мл. Активность АХЭ выражали в мкмоль/мин на 1 г сырой ткани, содержание ВРБ – в мг на 1 г сырой ткани. Измерение каждой пробы проводили в трех повторностях: активность АХЭ – при длине волны 412 нм, содержание белка – при 595 нм на спектрофотометре SPECTROstar Nano BMG LABTECH.

Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок ($M \pm m$). Данные по исследованным параметрам рыб из двух повторностей эксперимента объединяли, $n = 12$. Достоверность различий между показателями оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, Тьюки-тест). Для определения влияния нагрева воды и разных концентраций Cu на изученные характеристики использовали двухфакторный дисперсионный анализ. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса и длина тела плотвы в течение эксперимента изменилась незначительно и на 14 сут составила 5.77 ± 0.32 г и 7.55 ± 0.14 см у рыб контрольной и 5.12 ± 0.25 г, 7.35 ± 0.09 см (Cu 0.01 мг/л), 5.31 ± 0.34 г, 7.29 ± 0.13 см (Cu 0.1 мг/л) опытных групп ($p > 0.05$).

Изменений в температурной устойчивости молоди плотвы после 7 и 14 сут воздействия Cu не обнаружено. Средние значения КТМ фактически не различались, составив 27.5°C для контрольной и первой опытной (0.01 мг/л) групп, и 27.4°C для второй опытной (0.1 мг/л) группы ($p > 0.05$). Время экспозиции рыб в растворах Cu не оказало статистически значимого влияния на уровень КТМ ($p > 0.05$).

У рыб, подвергавшихся действию Cu, АА была на 22–34% ниже контроля (табл. 1). Значения ПА были на 57% ниже контроля (14 сут) при концентрации Cu 0.01 мг/л, при более высокой концентрации – выше на 27%. Последующее резкое повышение температуры воды не меняло выявленных эффектов. При этом сам температурный стресс снижал ПА и АА на 16–21% по сравнению с рыбами контрольной группы, не подвергшихся токсической и тер-

мальной нагрузкам. Дисперсионный анализ показал статистически значимое влияние Cu на ПА и АА (табл. 2), сила тормозящего эффекта составила 86 и 51% на 14-е сутки опыта. Кроме того, обнаружено значимое влияние нагрева воды на ПА, сила эффекта равна 47%.

Активность АХЭ в мозге плотвы была ниже на 28 % по сравнению с контролем спустя семь суток экспозиции в растворе Cu с концентрацией 0.1 мг/л (табл. 1). Краткосрочная термальная нагрузка снизила активность АХЭ на 26 и 29% у плотвы, выдержанной в растворах Cu (0.01 и 0.1 мг/л соответственно) по сравнению с контрольной группой рыб, не подвергшихся токсической и термальной нагрузкам. Содержание ВРБ было на 58 и 47% выше контроля при концентрации Cu 0.01 мг/л и 0.1 мг/л соответственно. Последующая термальная нагрузка не повлияла на содержание ВРБ.

На 14-е сутки эксперимента активность АХЭ мозга рыб, находившихся в растворах Cu с концентрацией 0.1 мг/л, была на 16% ниже контроля (табл. 1). Нагрев воды со скоростью 8°C/ч у рыб опытных групп еще больше снизил активность АХЭ – на 30 и 29% (Cu 0.01 и

0.1 мг/л соответственно) по сравнению с контрольной группой. При этом температурное воздействие снижало активность АХЭ на 24% от контроля. Содержание ВРБ у рыб, подвергшихся токсической и термальной нагрузкам, статистически значимо не отличалось от значений показателя в контрольной группе. Диспер-

сионный анализ показал статистически значимое влияние Cu на АХЭ и ВРБ в течение первых семи суток. Сила тормозящего эффекта составила 19 и 33% соответственно (табл. 2). Также отмечено значимое влияние нагрева воды на АХЭ, сила эффекта на 14 сут составила 24%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Температура среды играет как непосредственную роль в распространении и выживании эктотермов посредством воздействия на их физиологию, так и косвенную, влияя на восприимчивость организма к другим биотическим и абиотическим стрессорам. В основе взаимодействия эффектов температуры и металлов лежит нарушение обмена веществ, а изменение энергетического метаболизма играет ключевую роль в синергических эффектах этих факторов [Sokolova, Lannig, 2008].

Ранее при экспозиции пецилии *Poecilia vivipara* в растворах Cu (9 и 20 мкг/л) в течение 96 ч при температуре 22°C и 28°C было показано, что акклимация к повышенной температуре увеличивает токсичность этого металла. Физиологический механизм связан с повышенным накоплением Cu в тканях и окислительным стрессом, проявляющимся в снижении общей антиоксидантной способности и повышении окислительных повреждений. Этот эффект тканеспецифичен и наиболее выражен в печени. Кроме того, воздействие Cu при повышенной температуре понижает значения КТМ, что может привести к снижению термостойкости рыб и поставит под угрозу их выживание [Zebral et al., 2019]. Повышение температуры воды со скоростью 4°C/ч и особенно 50°C/ч увеличивало чувствительность кишечных гликозидаз молоди плотвы к *in vitro* действию Cu в концентрациях 0.1–25 мг/л. Это проявлялось как в увеличении тормозящего эффекта при одной и той же концентрации, так и в снижении АА при более низких концентрациях Cu [Golovanova, Golovanov, 2014].

Снижение активности пищеварительных (протеаза, амилаза) и антиоксидантных (супероксиддисмутаза, каталаза) ферментов в кишечнике и гепатопанкреасе отмечено при длительной 20-суточной экспозиции молоди карася *Carassius carassius* к растворенной в воде Cu (0.3 и 0.6 мг/л). Однако активность всех ферментов значительно увеличивалась при кратковременном воздействии (1 сут) и наиболее высокой концентрации Cu (0.6 мг/л). После 20-суточного пребывания в чистой воде она восстанавливалась до контрольного уровня [Jiang et al., 2016].

В нашей работе установлено, что Cu в концентрациях, встречающихся в водной среде, может изменять активность пищеварительных гидролаз в кишечнике молоди плотвы. Если АА снижалась при экспозиции в концентрациях 0.01 и 0.1 мг/л Cu, то ПА – снижалась при более низкой и повышалась при более высокой концентрации металла. Последующая функциональная нагрузка (нагрев воды со скоростью 8°C/ч до достижения КТМ) не влиял на выявленные эффекты. В то же время, сам термальный стресс снижал АА на 21% и повышал ПА на 32% от контроля (группа рыб, не подвергшихся токсической и термальной нагрузкам). Снижение активности пищеварительных гидролаз при хроническом действии Cu или резком повышении температуры среды, приводящее к замедлению ассимиляции пищи, согласуется с полученными ранее данными [Golovanova et al., 2013; Kuz'mina, 2017; Golovanova et al., 2021]. В то же время отсутствие влияния термального стресса на активность протеиназ и гликозидаз в результате хронического действия Cu выявлено впервые. Повышение ПА в кишечнике плотвы согласуется с ростом активности протеиназ в гепатопанкреасе карася при 1 сут воздействии Cu в концентрации 0.6 мг/л [Jiang et al., 2016], указывая на зависимость эффекта от продолжительности воздействия и концентрации металла.

Активность АХЭ в мозге и других органах и тканях достаточно давно и часто используется как один из наиболее известных биомаркеров для оценки состояния здоровья рыб и качества среды их обитания при ее загрязнении такими загрязняющими веществами как фосфорорганические (ФОП) и карбаматные (КП) пестициды (Sturn et al., 1999; Kirby et al., 2000; Tlili et al., 2010; Nunes, 2011). Другие вещества – либо не действуют, либо повышают активность АХЭ. Причем, если для ФОС и КП однозначно установлено ингибирование активности АХЭ рыб как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, то для других веществ таких данных пока недостаточно.

Таблица 1. Протеолитическая и амилолитическая активность в кишечнике, активность АХЭ и содержание ВРБ в мозге у молоди плотвы контрольной (Cu 0 мг/л без нагрева воды) и экспериментальных групп**Table 1.** Proteolytic and amylolytic activities in the intestine, AChE activity and WSP content in brain of juvenile roach of the control (Cu 0 mg/l without water heating) and experimental groups

Показатель Indicator	Контроль Control	Cu 0.01 мг/л Cu 0.01 mg/l	Cu 0.1 мг/л Cu 0.1 mg/l	Нагрев воды Water heating	Нагрев во- ды+Cu 0.01 мг/л Water heat- ing +Cu 0.01 mg/l	Нагрев во- ды+Cu 0.1 мг/л Water heat- ing +Cu 0.1 mg/l
7 сут						
Протеолитическая активность, мкмоль/г·мин Proteolytic activity, $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$	4.24±0.25 _a	4.42±0.11 _a	4.12±0.29 _a	5.61±0.26 _б	4.82±0.12 _{а,б}	5.53±0.23 _б
Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин Amylolytic activity, $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$	57.67±2.95 _a	39.17±1.25 _в	44.83±2.09 _{б,в}	45.56±3.76 _{б,в}	37.83±1.97 _б	51.50±1.15 _{а,б}
Активность АХЭ, мкмоль/г·мин AChE activity, $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$	18.46±1.14 _a	15.49±0.89 _{а,б}	13.38±0.66 _б	15.55±1.37 _{а,б}	13.58±0.50 _б	13.07±0.64 _б
Содержание ВРБ, мг/г WSP content, mg/g	15.85±1.26 _a	25.06±0.86 _в	23.26±1.12 _в	17.72±1.47 _{а,б}	21.51±1.47 _{б,в}	23.40±0.48 _б
14 сут						
Протеолитическая активность, мкмоль/г·мин Proteolytic activity, $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$	6.40±0.19 _a	2.77±0.14 _г	8.11±0.19 _б	5.40±0.22 _в	2.33±0.19 _г	8.63±0.15 _б
Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин Amylolytic activity, $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$	59.50±3.12 _a	39.33±2.28 _в	39.83±3.03 _в	55.67±2.75 _{а,б}	39.67±1.81 _б	46.50±0.84 _{б,в}
Активность АХЭ, мкмоль/г·мин AChE activity, $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$	15.73±1.22 _a	14.78±0.77 _{а,б}	13.15±0.49 _{б,в}	11.93±0.83 _в	11.06±0.93 _б	11.19±0.40 _б
Содержание ВРБ, мг/г WSP content, mg/g	31.61±1.51 _{а,б}	34.17±1.70 _а	29.78±0.83 _б	31.60±0.97 _{а,б}	29.11±1.05 _б	30.25±0.96 _б

Примечание. Здесь и в табл. 2: АХЭ – ацетилхолинэстераза, ВРБ – водорастворимый белок; показатели в строке с разными индексами статистически значимо различаются (ANOVA, Тьюки-тест, $p \leq 0.05$).

Note. Here and in table 2: AChE is acetylcholinesterase, WSP is water-soluble protein; parameters in a row with different letters are statistically significantly different (ANOVA, Tukey test, $p \leq 0.05$).

В последнее время показано, что ионы Cu в условиях *in vitro* при прямом межмолекулярном взаимодействии не ингибируют активность АХЭ мозга аквариумной рыбки данио-рерио *Danio rerio* в ряду концентраций от 0.01 до 20 мМ (0.64–1280 мг/л). При этом расчетная концентрация Cu, ингибирующая активность АХЭ в этих условиях на 50% (IC_{50}), составляет 55.78 мМ (3570 мг/л) [de Lima et al., 2013]. Для АХЭ мозга манагуанской цихлазомы *Parachromis managuensis*, значение IC_{50} для Cu в условиях *in vitro* составляет 773 мкМ (49.5 мг/л) [de Araújo et al., 2016]. Следует отметить, что такие экстремально высокие концентрации не встречаются в природных вод-

ных объектах. Обычно концентрация Cu в чистых поверхностных водах находится на уровне нескольких микрограммов на литр, а в загрязненных – несколько сот микрограммов [Zhang et al., 2019]. В тех же экспериментах в условиях *in vivo* экспозиция *Danio rerio* в растворах Cu с концентрацией 0.02 и 0.06 мг/л в течение семи суток не влияла на активность АХЭ во внутренних органах, но на вторые сутки была выше контроля на 175% при большей концентрации металла [de Lima et al., 2013].

В другом *in vivo* исследовании при хроническом экспонировании лепорины *Leporinus obtusidens* в течение 30 сут в растворах Cu со сходными концентрациями, 0.018 и 0.038 мг/л,

Таблица 2. Статистическая значимость влияния Cu и последующего повышения температуры воды на протеолитическую и амилолитическую активность в кишечнике, активность АХЭ и содержание ВРБ в мозге у молоди плотвы; в скобках сила влияния каждого фактора (%)

Table 2. Statistical significance of the effect of Cu and the subsequent increase in water temperature (T) on proteolytic and amylolytic activity in the intestine, AChE activity and the content of WSP in the brain in roach fry; in brackets is the strength of influence of each factor (%)

Показатель Indicator	Фактор 7 сут Factor 7 days			Фактор 14 сут Factor 14 days		
	Cu Cu	Нагрев воды Water heating	Нагрев воды+Cu Water heating+Cu	Cu Cu	Нагрев воды Water heating	Нагрев воды+Cu Water heating+Cu
Протеолитическая активность Proteolytic activity	0.3820 (3)	0.0000 (47)	0.0533 (9)	0.0000 (86)	0.0421 (0)	0.0004 (2)
Амилолитическая активность Amylolytic activity	0.0000 (31)	0.2501 (1)	0.0010 (15)	0.0000 (51)	0.5976 (0)	0.1047 (4)
Активность АХЭ AChE activity	0.0004 (19)	0.0262 (6)	0.3666 (2)	0.1359 (4)	0.0000 (24)	0.4523 (2)
Содержание ВРБ WSP content	0.0000 (33)	0.6245 (0)	0.1028 (4)	0.3152 (3)	0.1266 (3)	0.0475 (8)

Примечание. Влияние фактора статистически значимо при уровне значимости $p \leq 0.05$.

Note. The influence of the factor is statistically significant at the significance level $p \leq 0.05$.

также наблюдали повышение активности АХЭ мозга по сравнению с первоначальным уровнем соответственно на 56 и 40%, а на 45-е сут – на 75 и 125% [Gioda et al., 2013]. В то же время аккумуляция Cu в мозге рыб в начале эксперимента и через 30 и 45 суток экспонирования в растворах металла с этими концентрациями равнялись соответственно <4, 29.2 и 30.3 мкг/г сырой ткани. Это более чем в 250 раз ниже, чем значения IC_{50} АХЭ для *Danio rerio* [de Lima et al., 2013] и сопоставимо с IC_{50} АХЭ манагуанской цихлазомы *Parachromis managuensis*. В почках, мышцах и печени рыб содержание Cu в течение всего эксперимента оставалось на одном уровне <4 мкг/г сырой ткани независимо от концентрации, в которой их экспонировали. Ранее было показано, что при индуцированном инъекцией адреналина стресс-ответе у окуня *Perca fluviatilis* активность АХЭ в мозге на начальном этапе коротко-срочно снижается, а потом повышается и остается стабильно повышенной в течение не менее трех суток [Pavlov et al., 1994]. Такую же динамику демонстрировало и содержание ВРБ в мозге рыб. У стерляди *Acipenser ruthenus* повышенная активность АХЭ и содержание ВРБ в мозге после инъекции кортикостероида дексаметазона (искусственный аналог стресс-гормона гидрокортизола) сохранялась соответственно в течение 21 и 14 сут [Чуйко и др., 2011 (Chuiko et al., 2011)]. Все это позволяет заключить, что повышенный уровень этих показателей в мозге является частью стресс-ответа рыб на действие различных стресс-

факторов. Можно предположить, что повышение или незначительное краткосрочное снижение с последующим повышением активности АХЭ и содержания ВРБ в мозге рыб при их экспонировании к токсикантам, не обладающим прямым антихолинэстеразным действием, в частности Cu, как раз и является таким стресс-ответом.

В эксперименте с плотвой концентрации Cu, в которых экспонировали рыб, были сопоставимы с теми, что использовались в экспериментах с лепориной [Gioda et al., 2013], но время экспозиции было в 3–4 раза меньше. При этом активность АХЭ в мозге плотвы в течение экспозиции в растворах Cu снижалась. Это противоположным образом отличается от результатов предыдущих исследований, приведенных выше, где активность АХЭ рыб возрастала. Однако следует отметить, что статистически значимое снижение активности фермента у плотвы было <30% и наблюдалось при экспонировании рыб в наибольшей из всех исследованных концентраций 0.1 мг/л при достаточно продолжительной экспозиции (7 и 14 сут). Можно предположить, что в этих условиях концентрация Cu, накопившаяся в мозге рыб, достигла такого уровня, когда начал проявляться ее ингибирующий эффект относительно АХЭ мозга плотвы. Чтобы подтвердить это предположение, необходимы дополнительные исследования *in vitro*. Вместе с тем, это было начальной фазой стресс-ответа на токсическое действие. У этих же рыб с самого начала эксперимента наблюдалось устой-

чивое повышение содержания ВРБ, что свидетельствует в пользу второго предположения.

Краткосрочная термальная функциональная нагрузка еще больше снижала активность АХЭ в мозге рыб, как у контрольных (интактных) рыб, так и у экспонированных в растворах Си, а содержание ВРБ не изменилось по сравнению с рыбами, не подвергавшимся термальной нагрузке. Полученные ре-

зультаты предполагают, что при нагреве воды еще более усиливается ингибирующее действие Си на АХЭ мозга, в то время как повышенный уровень ВРБ может указывать на интенсификацию связанных с усилением синтеза белка *de novo* репарационных процессов, направленных на противодействие токсическому действию Си.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе установлено, что хроническое воздействие Си в сублетальных концентрациях 0.01 и 0.1 мг/л в течение 7 и 14 сут, а также увеличение температуры воды со скоростью 8°C/ч приводят к изменению ПА и АА в кишечнике, а также активности АХЭ и содержания ВРБ в мозге молоди плотвы. Резкое повышение температуры воды снижало АА и активность АХЭ, но повышало ПА у рыб, не подвергавшихся действию Си. У экспонированных к Си рыб, АА была ниже контроля, ПА – лишь при наименьшей концентрации Си на 14-е сутки (при большей концентрации Си ПА повышалась на 27–35%). Последующий температурный стресс не изменял реакции протеиназ и гликозидаз на действие Си. Активность АХЭ снижалась после воздействия

Си (0.1 мг/л), при этом последующая термическая нагрузка усиливала ингибирующее действие металла. Увеличение содержания ВРБ выявлено лишь на 7 сут воздействия Си, при этом температурный стресс не оказывал влияния на выявленный эффект. Не отмечено значительных различий в значениях КТМ у рыб контрольной и подвергшихся воздействию Си групп. Полученные данные свидетельствуют о зависимости активности пищеварительных и холинэргических ферментов от времени экспозиции и концентрации Си, а также термального стресса. Результаты работы позволяют оценить экотоксикологический риск хронического действия Си на физиолого-биохимические показатели рыб при резком повышении температуры окружающей среды.

Работа выполнена в рамках государственного задания 121051100100-8 и 121050500046-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голованов В.К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. Москва: Полиграф-Плюс, 2013. 300 с.
- Перевозников М.А., Богданова Е.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. СПб: ГосНИОРХ, 1999. 228 с.
- Перечень рыбохозяйственных нормативов, предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. Москва: Всерос. научно-исследовательский ин-т рыб. хоз-ва и океанограф. 1999. 304 с.
- Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Масевич Ц.Г., Надирова Т.Я., Тимофеева Н.М. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука. 1969. 216 с.
- Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние кортикостероида дексаметазона и хендлинга на активность ацетилхолинэстеразы и содержание водорастворимого белка в мозге стерляди *Acipenser ruthenus* Linnaeus // Рыбоводство и рыболовство. 2011. № 7. С.39–43.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
- Chuiko, G.M., Podgornaya, V. A., Zhelnin, Y.Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences // Comp. Biochem. Physiol. 2003. Vol. 135B. № 1. P. 55–61. DOI: 10.1016/s1096-4959(03)00048-4
- Crawshaw L.I., Wollmuth L.P. Effective loci and roles of acetylcholine in temperature regulation of goldfish // Amer. J. Physiol. (Reg. Integr. Comp. Physiol.). 1992. Vol. 263. № 32. P. 596–601. DOI: 10.1152/ajpregu.1992.263.3.R596
- de Araújo M.C., Assis C.R.D., Silva L.C., Machado D.C., Silva K.C.C., Lima A.V.A., Carvalho L.B., Jr., de Souza Bezerra R., de Oliveira M.B.M. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions // Aquat. Toxicol. 2016. Vol. 177. P. 182–189. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.05.019
- de Lima D., Roque G. M., de Almeida E.A. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*) // Mar. Environ. Res. 2013. Vol. 91. P. 45–51. DOI: 10.1016/j.marenvres.2012.11.005
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochem. Pharmacol. 1961. Vol. 70. Iss. 2. P. 88–90. DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9

- Gioda C.R., Loro V.L., Pretto A., Salbego J., Dressler V., Flores E. M. M. Sublethal zinc and copper exposure affect acetylcholinesterase activity and accumulation in different tissues of *Leporinus obtusidens* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2013. Vol. 90. Iss. 1. P. 12–16. DOI: 10.1007/s00128-012-0896-0
- Golovanova I.L., Filippov A.A., Chebotareva Yu.V., Krylov V.V. Long-Term consequences of the effect of copper and an electromagnetic field on the size and weight parameters and activity of digestive glycosidases in under yearlings of roach *Rutilus rutilus* // Inland Water Biol. 2021. Vol. 14. № 3. P. 331–339. DOI: 10.1134/S1995082921020048
- Golovanova I.L., Golovanov V.K. Effect of rate of increase of water temperature on sensitivity of fish digestive glycosidases to action of copper and zinc // J. Evol. Biochem. Physiol. 2014. Vol. 50. Iss. 1. P. 27–33. DOI: 10.1134/S0022093014010046
- Golovanova I.L., Golovanov V.K., Smirnov A.K., Pavlov D.D. Effect of ambient temperature increase on intestinal mucosa amylolytic activity in freshwater fish // Fish Physiol. Biochem. 2013. Vol. 39. № 6. P. 1497–1504. DOI: 10.1007/s10695-013-9803-9
- Jiang H., Kong X., Wang S., Guo H. Effect of copper on growth, digestive and antioxidant enzyme activities of juvenile Qihe crucian carp, *Carassius carassius*, during exposure and recovery // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2016. Vol. 96. № 3. P. 333–340. DOI 10.1007/s00128-016-1738-2
- Kirby M.F., Morris S., Hurst M., Kirby S.J., Neall P., Tylor T., Fagg A. The Use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle Tissue as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries // Mar. Pollut. Bull. 2000. Vol. 40. № 9. P. 780–791. DOI: 10.1016/S0025-326X(00)00069-2
- Krylov V.V., Chebotareva Y.V., Izyumov Y.G. Delayed consequences of the influence of simulated geomagnetic storms on roach *Rutilus rutilus* embryos // J. Fish Biol. 2019. Vol. 95. Iss. 6. P. 1422–1429. DOI: 10.1111/jfb.14150
- Kumar B.N.G., Nandun S.B. Effect of copper on the humoral and biochemical indices of the teleost fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) // Walailak J. Sci. Tech. 2014. Vol. 11. № 10. P. 871–882. DOI: 10.2004/wjst.v11i9.678
- Kuz'mina V.V. Digestion in fish: A new view. Balty: Lambert, 2017. 310 p.
- Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Pivovarova E.A., Bushkareva A.S., Vostrova U.A., Poltoratskaya A.V. Influence of saproel on the activity of intestinal peptidases of broiler chickens // J. Indonesian Trop. Anim. Agric. 2021. Vol. 46. № 1. P. 67–74. DOI:10.14710/jitaa.46.1.67-74
- Nunes B. The use of cholinesterases in ecotoxicology // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2011. Vol. 212. P. 29–59. DOI: 10.1007/978-1-4419-8453-1_2 10.1007/978-1-4419-8453-1_2
- Pavlov D.F., Chuiko G.M., Shabrova A.G. Adrenaline induced changes of acetylcholinesterase activity in the brain of perch (*Perca fluviatilis* L.) // Comp. Biochem. Physiol. 1994. Vol. 108C. № 1. P. 113–115. DOI: 10.1016/1367-8280(94)90096-5
- Sokolova I.M., Lannig G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change // Clim. Res. 2008. Vol. 37. P. 181–201. DOI: 10.3354/cr00764
- Sturn A., Silva de Assis H.C., Hansen P.-D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination // Mar. Environ. Res. 1999. Vol. 47. P. 389–398. DOI: 10.1016/S0141-1136(98)00127-5
- Talikina M.G., Krylov V.V., Izyumov Y.G., Chebotareva Yu.V. The effect of a typical magnetic storm on mitosis in the embryo cells and the length and weight of roach (*Rutilus rutilus* L.) prolarvae // Inland Water Biol. 2013. Vol. 6. № 1. P. 48–51. DOI: 10.1134/S1995082912030145
- Tlili S., Jebali J., Banni M., Haouas Z., Mlayah A., Helal A.N., Boussetta H. Multimarker approach analysis in common carp *Cyprinus carpio* sampled from three freshwater sites // Environ. Monit. Assess. 2010. Vol. 168. P. 285–298. DOI: 10.1007/s10661-009-1112-5
- Zebal Y.D., Roza M., Fonseca J.S., Costa P.G., Stürmer C.O., Zocke T.G., Pizzol J.L.D., Robaldo R.B., Bianchini A. Waterborne copper is more toxic to the killifish *Poecilia vivipara* in elevated temperatures: Linking oxidative stress in the liver with reduced organismal thermal performance // Aquat. Toxicol. 2019. Vol. 209. P. 142–149. DOI: 10.1016/j.aquatox.2019.02.005.
- Zhang J.L., Fang L., Song J.Y., Luo X., Fu K.D., Chen L.Q. Health risk assessment of heavy metals in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) from the upper Mekong River // Environ. Sci. Pollut Res. 2019. Vol. 26. Iss. 10. P. 9490–9499. DOI: 10.1007/s11356-019-04291-2.

REFERENCES

- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein–dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Mikryakov D.V., Mikryakov V.R. Influence of dexamethasone, a corticosteroid, and handling upon acetylcholinesterase activity and water-soluble protein content in brain of *Acipenser ruthenus* Linnaeus. *Fish Breeding and Fisheries*, 2011, no. 7, pp. 39–43. (In Russian)
- Chuiko, G.M., Podgornaya, V. A., Zhelmin, Y.Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2003, vol. 135B, no. 1, pp. 55–61. doi: 10.1016/s1096-4959(03)00048-4
- Crawshaw L.L., Wollmuth L.P. Effective loci and roles of acetylcholine in temperature regulation of goldfish. *Amer. J. Physiol. (Reg. Integr. Comp. Physiol.)*, 1992, vol. 263, no. 32, pp. 596–601. doi: 10.1152/ajpregu.1992.263.3.R596
- de Araújo M.C., Assis C.R.D., Silva L.C., Machado D.C., Silva K.C.C., Lima A.V.A., Carvalho L.B., Jr., de Souza Bezerra R., de Oliveira M.B.M. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): from physicochem-

- ical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. *Aquatic Toxicology*, 2016, vol. 177, pp. 182–189. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.05.019
- de Lima D., Roque G. M., de Almeida E.A. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Environ. Res.*, 2013, vol. 91, pp. 45–51. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.11.005.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, vol. 70, iss. 2, pp. 88–90. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9
- Gioda C.R., Loro V.L., Pretto A., Salbego J., Dressler V., Flores E. M. M. Sublethal zinc and copper exposure affect acetylcholinesterase activity and accumulation in different tissues of *Leporinus obtusidens*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2013, vol. 90, iss. 1, pp. 12–16. doi: 10.1007/s00128-012-0896-0
- Golovanov V.K. Temperature criteria of the life activity of freshwater fish. Moscow, Poligraf-Plus, 2013. 300 s. (In Russian)
- Golovanova I. L., Golovanov V. K. Effect of rate of increase of water temperature on sensitivity of fish digestive glycosidases to action of copper and zinc. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2014, vol. 50, iss. 1, pp. 27–33. doi: 10.1134/S0022093014010046
- Golovanova I.L., Filippov A.A., Chebotareva Yu.V., Krylov V.V. Long-Term consequences of the effect of copper and an electromagnetic field on the size and weight parameters and activity of digestive glycosidases in underyearlings of roach *Rutilus rutilus*. *Inland Water Biology*, 2021, vol. 14, no. 3, pp. 331–339. doi: 10.1134/S1995082921020048
- Golovanova I.L., Golovanov V.K., Smirnov A.K., Pavlov D.D. Effect of ambient temperature increase on intestinal mucosa amyolytic activity in freshwater fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 2013, vol. 39, no 6, pp. 1497–1504. doi: 10.1007/s10695-013-9803-9
- Jiang H., Kong X., Wang S., Guo H. Effect of copper on growth, digestive and antioxidant enzyme activities of juvenile Qihe crucian carp, *Carassius carassius*, during exposure and recovery. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2016, vol. 96, no. 3, pp. 333–340. doi 10.1007/s00128-016-1738-2
- Kirby M.F., Morris S., Hurst M., Kirby S.J., Neall P., Tylor T., Fagg A. The Use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle Tissue as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries. *Mar. Pollut. Bull.*, 2000, vol. 40, no. 9, pp. 780–791. doi: 10.1016/S0025-326X(00)00069-2
- Krylov V.V., Chebotareva Y.V., Izyumov Y.G. Delayed consequences of the influence of simulated geomagnetic storms on roach *Rutilus rutilus* embryos. *J. Fish Biol.*, 2019, vol. 95, iss. 6, pp. 1422–1429. doi: 10.1111/jfb.14150
- Kumar B.N.G., Nandun S.B. Effect of copper on the humoral and biochemical indices of the teleost fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). *Walailak J. Sci. Tech.*, 2014, vol. 11, no. 10, pp. 871–882. doi:10.2004/wjst.v11i9.678
- Kuz'mina V.V. Digestion in fish: A new view. Balty: Lambert, 2017. 310 p.
- Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Pivovarova E.A., Bushkareva A.S., Vostrova U.A., Poltoratskaya A.V. Influence of sa-propel on the activity of intestinal peptidases of broiler chickens. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.*, 2021, vol. 46, no. 1, pp. 67–74. doi: 10.14710/jitaa.46.1.67-74
- Nunes B. The use of cholinesterases in ecotoxicology. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2011, vol. 212, pp. 29–59. doi: 10.1007/978-1-4419-8453-1_2
- Pavlov D.F., Chuiko G.M., Shabrova A.G. Adrenaline induced changes of acetylcholinesterase activity in the brain of perch (*Perca fluviatilis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1994, vol. 108C, no. 1, pp. 113–115. doi: 10.1016/1367-8280(94)90096-5
- Perechen' rybokhozyaistvennykh normativov, predel'no dopustimyykh kontsentratsii (PDK) i orientirovochno bezopasnykh urovnei vozdeystviya (OBUV) vrednykh veshchestv dlya vody vodnykh ob'ektov, imeyushchikh rybokhozyaistvennoe znachenie. Moscow, Vseross. Nauchno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Okeanograf., 1999. 304 p. (In Russian)
- Perevoznicov M.A., Bogdanova E.A. Heavy metals in the freshwater ecological systems. St. Petersburg, GosNIORKH, 1999. 228 p. (In Russian).
- Sokolova I.M., Lannig G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.*, 2008, vol. 37, pp. 181–201. doi: 10.3354/cr00764
- Sturn A., Silva de Assis H.C., Hansen P.-D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar. Environ. Res.*, 1999, vol. 47, pp. 389–398. doi: 10.1016/S0141-1136(98)00127-5
- Talikina M.G., Krylov V.V., Izyumov Y.G., Chebotareva Yu.V. The effect of a typical magnetic storm on mitosis in the embryo cells and the length and weight of roach (*Rutilus rutilus* L.) prolarvae. *Inland Water Biology*, 2013, vol. 6, no. 1, pp. 48–51. doi: 10.1134/S1995082912030145
- Tlili S., Jebali J., Banni M., Haouas Z., Mlayah A., Helal A.N., Boussetta H. Multimarker approach analysis in common carp *Cyprinus carpio* sampled from three freshwater sites. *Environ. Monit. Assess.*, 2010, vol. 168, pp. 285–298. doi: 10.1007/s10661-009-1112-5
- Ugolev A.M., Iezuitova N.N., Masevich C., Nadirova T. Ya., Timofeeva N. M. Study of the digestive tract in humans. Review of modern methods. Leningrad, Science, 1969. 216 p. (In Russian)
- Zebal Y.D., Roza M., Fonseca J.S., Costa P.G., Stürmer C.O., Zocke T.G., Pizzol J.L.D., Robaldo R.B., Bianchini A. Waterborne copper is more toxic to the killifish *Poecilia vivipara* in elevated temperatures: Linking oxidative stress in the liver with reduced organismal thermal performance. *Aquat. Toxicol.*, 2019, vol. 209, pp. 142–149. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.02.005.

Zhang J.L., Fang L., Song J.Y., Luo X., Fu K.D., Chen L.Q. Health risk assessment of heavy metals in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) from the upper Mekong River. *Environ. Sci. Pollut Res.*, 2019, vol. 26, iss. 10, pp. 9490–9499. doi: 10.1007/s11356-019-04291-2.

**EFFECTS OF SUBLETHAL CONCENTRATIONS OF COPPER
AND THERMAL STRESS ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS
OF JUVENILE ROACH *RUTILIUS RUTILIUS***

**I. L. Golovanova^{*}, A. A. Filippov, E. A. Kulivatskaya,
V. A. Podgornaya, A. K. Smirnov, G. M. Chuiko**

*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Russia, e-mail: *golovanova@ibiw.ru*

Revised 10.09.2022

The effects of 7- and 14-day exposure to water-dissolved Cu at sublethal concentrations 0.01 and 0.1 mg/L and subsequent increase in water temperature at a rate of 8°C/h on intestinal proteolytic activity (PA) and amylolytic activity (AA), as well as brain acetylcholinesterase (AChE) activity and water-soluble protein (WSP) content in juvenile roach *Rutilus rutilus* have been in vivo studied. Additionally, the values of upper sublethal temperature were determined by the critical thermal maximum (CTM) method. The values of the CTM (27.5°C) did not differ in fish of control (exposure to 0 µg/L Cu) and Cu-exposed groups. After Cu exposure AA was 22–34% lower, PA was 57–64% lower at Cu concentration 0.01 mg/L, but 27–35% higher at Cu concentration 0.1 mg/L. Subsequent temperature stress did not change the response of proteinases and glycosidases to Cu. An increase in water temperature decreased AA by 21%, AChE activity by 24% in fish of the control group; but increased PA by 32%. AChE activity was 24–28% lower than the control after exposure to Cu (0.1 mg/L and short-term thermal load increased the inhibitory effect of Cu. An increase of WSP content by 36–58% was revealed only after 7 days of exposure to Cu, while temperature stress did not change of the effect. In general, Cu at concentrations found in the aquatic environment can reduce the activity of digestive hydrolases in the intestines of juvenile roach, reducing the rate of assimilation of protein and carbohydrate food components. Inhibition of brain AChE activity is enhanced by subsequent temperature stress. No significant differences were noticed in CTM values in fish of control and Cu-exposed group. The results obtained are important in assessing the environmental risks of chronic exposure to Cu in the zones of thermal pollution of water bodies.

Keywords: roach, Cu, intestinal proteolytic and amylolytic activities, brain AChE and water-soluble protein, upper sublethal temperature, critical thermal maximum