

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ И ТЕРМАЛЬНОГО СТРЕССА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОДИ КАРАСЯ *CARASSIUS GIBELIO* С РАЗНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ РТУТИ

А. А. Филиппов, И. Л. Голованова*, Е. А. Куливацкая, В. А. Подгорная,
А. К. Смирнов, Г. М. Чуйко, В. В. Крылов, Д. Э. Котиков, В. Т. Комов

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: *golovanova@ibiw.ru

Поступила в редакцию 20.07.2024

Исследовано влияние кратковременного воздействия низкочастотного электромагнитного поля (50Гц, 10 мкТл) и термального стресса (нагрев воды со скоростью 8°C/ч) на амилолитическую (АА) и протеолитическую (ПА) активность, активность мальтазы (АМ) в кишечнике, а также активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и содержание водорастворимого белка (ВРБ) в мозге у молоди карася *Carassius gibelio*, в течение 2 мес. получавшего корм с низким (НСР) 0.07 мг/кг и высоким (ВСР) 0.182 мг/кг сырой массы содержанием ртути. Содержание ртути в мышцах рыб ВСР группы (0.40 и 0.66 мг/кг) было примерно в 2 раза выше по сравнению с НСР группой (0.22 и 0.30 мг/кг) через 1 и 2 мес. соответственно. Через 2 мес. опыта АА увеличилась на 30–48%, ПА снизилась на 30% лишь в ВСР группе, при этом статистически значимых различий у рыб НСР и ВСР групп не выявлено. Уровень АМ был выше на 77% (НСР) и на 340% (ВСР) по сравнению с 1-ым месяцем, при этом он был выше на 36% в ВСР, чем в НСР группе. Изменений активности АХЭ как в разные месяцы, так и между НСР и ВСР группами не выявлено. Содержание ВРБ было на 40% ниже у рыб НСР группы во 2-ой по сравнению с 1-ым месяцем. Последующий температурный стресс (Т) снижал АА и ПА, электромагнитное поле (ЭМП) и его сочетание с Т, как правило, повышало активность этих ферментов у рыб обеих групп. Снижение активности АХЭ (ЭМП+Т) и ВРБ (Т) выявлено лишь у рыб ВСР группы. В целом, ртуть, поступающая с кормом, повышает активность исследованных пищеварительных ферментов, но не влияет на активность АХЭ в мозге, а содержание ВРБ снижает только в 1-й месяц. Последующий температурный стресс и действие ЭМП могут изменять величину и направленность эффекта. Полученные результаты важны при оценке экологических рисков хронического действия ртути в зонах термального и электромагнитного загрязнения водоемов.

Ключевые слова: карась, пищеварительные ферменты, кишечник, ацетилхолинэстераза, водорастворимый белок, мозг, ртуть, биоаккумуляция, электромагнитное поле, температурный стресс.

DOI: 10.47021/0320-3557-2024-18-29

ВВЕДЕНИЕ

Ртуть, наряду с кадмием, медью и цинком, относится к числу тяжелых металлов, оказывающих токсическое воздействие на гидробионтов, изменяя их физиолого-биохимический статус. Попадая в водоемы, она подвергается процессам бактериального метилирования и может аккумулироваться в тканях рыб в концентрациях, значительно превышающих содержание металла в воде и кормовых организмах [Schartup et al., 2019]. Высокие концентрации ртути (от 1 до 3 мг/кг) неоднократно регистрировали в мышцах рыб из водоемов северо-запада России [Haines et al., 1995; Vermtssen et al., 2004], при этом до 90–99% ртути находится в более токсичной метилированной форме [Bloom, 1992; Amlund et al., 2007].

Ртуть поступает в организм рыб с водой через жабры, но основной путь поступления — трофический [Hall et al., 1997]. В ряде экспериментов изучено влияние поступающей с пищей ртути на активность пищеварительных гидролаз в кишечнике молоди рыб. При этом установлены изменения активности протеиназ и гликозидаз, а также кинетических характеристик гидролиза

белковых и углеводных компонентов корма при повышенном накоплении ртути в мышцах пресноводных рыб [Кузьмина, 2018 (Kuz'mina, 2018); Golovanova, Komov, 2005; Golovanova et al., 2008; Kuz'mina et al., 2013]. Также было продемонстрировано, что мозг рыб является органом-мишенью для метилртути, которая может легко преодолевать гематоэнцефалический барьер и оказывать токсичное воздействие на организм [Farina et al., 2013], изменяя поведение рыб [Zhou et al., 1996; Pereira et al., 2015].

Скорость накопления тяжелых металлов, в том числе и ртути, в организме пойкилотермных животных в значительной мере определяется температурой среды обитания, что позволяет предположить увеличение токсичности некоторых загрязнителей при повышении температуры воды [Li et al., 2021]. Было установлено, что нагрев воды со скоростью 8°C/ч приводил к снижению активности кишечных гликозидаз (АА и АМ), а также активности АХЭ (на 29%) и содержания ВРБ мозга (на 28%) в мозге у ротана *Perccottus glenii* Dybowski, 1877 [Golovanova et al., 2019].

Электромагнитное загрязнение окружающей среды стало одним из важных антропогенных факторов. Вблизи крупных промышленных центров его значительную часть составляют различные по интенсивности электромагнитные поля (ЭМП) промышленной частоты (50 Гц). Они присутствуют и в рыбоводных хозяйствах, сопровождая работу оборудования, подключенного к электросети. Установлено, что действие низкочастотного ЭМП (50 Гц, 10 мкТл) в период раннего эмбриогенеза может изменять размерно-массовые показатели и активность пищеварительных гликозидаз в кишечнике молоди плотвы *Rutilus rutilus* (L.), а также нивелировать тормозящее действие

ионов меди на амилалитическую активность [Golovanova et al., 2021]. В то же время влияние накопленной ртути в сублетальных концентрациях и последующей функциональной нагрузки в виде термального стресса и действия ЭМП на активность пищеварительных и холинэргических ферментов у рыб ранее не исследовали.

Цель работы — оценить активность кишечных гликозидаз и протеиназ, а также активность ацетилхолинэстеразы и содержание водорастворимого белка в мозге у сеголетков карася с разным накоплением ртути при последующем воздействии электромагнитного поля и температурного стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена в феврале–марте 2021 г. в лабораторных условиях на неполовозрелой молоди серебряного карася *Carassius gibelio* (Bloch, 1782). Сеголетков карася (возраст 0+) отлавливали из прудов экспериментальной прудовой базы “Сунога” ИБВВ РАН в сентябре 2020 г. В лаборатории их помещали в аквариумы объемом 200 л с проточной водой и температурой воды 16–18°C. В течение 4 мес. все рыбы получали корм (10% от массы тела) с низким содержанием ртути (НСР, 0.07 мг/кг), состоящий из смеси рыбного фарша — мышцы минтая *Theragra chalcogramma* (Pallas, 1814), составлявшего 47% по массе, сухого комбикорма (TetraPondSticks) — 8%, желатина — 4% и воды — 41%. В процессе приготовления корма рыбный фарш, смешанный с измельченным комбикормом, заливали теплой водой с растворенным в ней желатином и затем все тщательно перемешивали. После застывания желатина готовый корм нарезают на небольшие порции и хранили в морозильной камере (–18°C).

Перед началом эксперимента по 12 одноразмерных карасей (всего 96 особей) разместили в 8 аквариумов объемом 50 л, оборудованных системой аэрации. В период адаптации к экспериментальным условиям (14 сут) рыб кормили один раз в сутки кормом с НСР в количестве 10% массы тела, 90% замену воды в аквариумах проводили 2 раза в неделю без отсадки рыб. Температура воды в аквариумах в течение эксперимента составила 19–21°C. Ее регистрировали круглосуточно с помощью электронного терморегулятора (MASTERKIT NM8036) с цифровыми датчиками (SN18B20). Для искусственного освещения использовали светодиодные лампы в режиме день/ночь 12:12 ч.

После начала эксперимента в течение последующих 2 мес. рыбам в первых четырех аквариумах продолжали давать корм с низким содержанием ртути (группа НСР, 0.07 мг/кг).

В других четырех аквариумах им давали корм с высоким содержанием ртути (ВСР, 0.182 мг/кг): фарш из мышц речного окуня *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758), отловленного в Рыбинском водохранилище, сухого комбикорма (TetraPondSticks), желатина и воды в тех же пропорциях.

Содержание общей ртути измеряли в трех повторностях как в фарше из мышц рыб, так и в готовых кормах, отбирая по пять образцов из общей массы. В мышцах минтая содержится 15.3±0.4 г белка в расчете на 100 г сырой массы [Горбатенко, Лаженцев, 2016 (Gorbatenko, Lazhentsev, 2016)], окуня — 17.3±0.1 г [Макеева, Ключко, 2021 (Makeeva, Klyuchko, 2021)]. Поскольку более 99% ртути в мышцах рыб находится в связанном с белком состоянии [Amlund et al., 2007], а количество белка в мышечной ткани этих видов приблизительно равно, они были использованы в качестве основы для приготовления корма с низким и высоким содержанием ртути.

По истечении 2-х месяцев по 6 экз. рыб из обеих групп были взяты для вариантов с дополнительным экспериментальным воздействием и последующего биохимического анализа: 1) без дополнительного воздействия (НСР и ВСР), 2) подвергнуты действию низкочастотного магнитного поля (10 мкТл 50Гц) в течение 24 ч (НСР+ЭМП и ВСР+ЭМП); 3) подвергнуты температурному воздействию путем нагрева воды со скоростью 8°C/ч до сублетальной температуры (НСР+Т и ВСР+Т); 4) подвергнуты нагреву воды после действия ЭМП (НСР+ЭМП+Т и ВСР+ЭМП+Т).

Температурную устойчивость молоди карпа определяли, используя метод критического термического максимума (КТМ) [Beitinger, 2000]. Сравнение температурной устойчивости рыб НСР и ВСР групп проводили одновременно, используя два прозрачных бокса из органического стекла объемом 60 л.

Мощная система аэрации (два распылителя, соединенных с воздушным компрессором) исключала возможность возникновения температурной неоднородности среды и недостатка кислорода. Температура воды на момент начала опытов соответствовала температуре воды в аквариумах с рыбами экспериментальных групп. В каждый из экспериментальных боксов помещали по 6 экз. рыб НСР или ВСР группы. После небольшого адаптационного периода (15 мин) начинали нагрев воды (нагреватель мощностью 0.7 кВт) с постоянной скоростью $\sim 8^\circ\text{C}/\text{ч}$ до потери рыбами равновесия (поворот набок или кверху брюшком). Температура воды в этот момент соответствовала верхней сублетальной, а рыбы к моменту окончания эксперимента сохраняли жизнеспособность. 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.

Для определения влияния ЭМП по 6 рыб НСР и ВСР групп помещали в емкости (5 л) с водой и принудительной аэрацией. ЭМП с частотой 50 Гц и величиной индукции 10 мкТл создавали в системах колец Гельмгольца диаметром 0.5 м, центральная ось которых располагалась перпендикулярно плоскости Земли (емкости с рыбой были размещены в центре двух систем колец Гельмгольца). Сигнал на обмотку колец поступал от двух генераторов ГЗ-102 (Москва, СССР). Частоту и индукцию генерируемого ЭМП в кольцах Гельмгольца контролировали при помощи магнитометра НВ0599Б (НПО “ЭНТ”, г. Санкт-Петербург, Россия). Продолжительность действия поля составляла 24 ч, рыб при этом не кормили.

Всего было проведено 8 вариантов эксперимента: НСР; ВСР; НСР+ЭМП, ВСР+ЭМП; НСР+Т, ВСР+Т; НСР+ЭМП+Т, ВСР+ЭМП+Т.

По завершении экспериментальных воздействий рыб обездвигивали механически и проводили биоанализ. Образцы мышечной ткани (1–2 г) отбирали индивидуально у каждой особи в районе спинного плавника, замораживали и хранили при -18°C . Содержание общей ртути в пробах мышц рыб определяли на атомно-адсорбционном спектрометре РА915М с пиролитической приставкой ПИРО (Lumex, Санкт-Петербург). Точность анализа (минимальный предел обнаружения ртути 0.001 мкг/г) оценивали с помощью сертифицированного биологического материала DORM-4 и DOLT-5 (Институт химии окружающей среды, Оттава, Канада) через

каждые 20 измерений (относительная разность в процентах (RPD) $< 10\%$). Различия между повторностями в среднем составили 7.3%. Концентрация ртути в мышцах рыб представлена в мг/кг сырой массы.

Для определения активности пищеварительных ферментов готовили суммарные гомогенаты из слизистой оболочки медиального отдела кишечника от 6 экз. рыб каждой экспериментальной группы, используя раствор Рингера для холоднокровных животных (110 ммоль NaCl, 1.9 ммоль KCl, 1.3 ммоль CaCl₂, pH 7.4). Его же применяли для приготовления растворов субстратов (растворимый картофельный крахмал в концентрации 18 г/л, мальтоза в концентрации 50 ммоль/л и 1%-ный казеин). Инкубацию гомогената и субстрата проводили в течение 20–30 мин при температуре 20°C , pH 7.4.

Уровень АА, отражающей суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал (б-амилаза КФ 3.2.1.1, глюкоамилаза КФ 3.2.1.3 и мальтаза КФ 3.2.1.20), оценивали модифицированным методом Нельсона [Уголев и др., 1969 (Ugolev, 1969)], АМ — глюкозооксидазным методом с помощью набора для клинической биохимии “Фотоглюкоза” (ООО “Импакт”, Россия). Уровень ПА (главным образом, трипсина, КФ 3.4.21.4) определяли по увеличению концентрации тирозина модифицированным методом Ансона с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [Kuz'mina et al., 2021]. Интенсивность окраски образцов измеряли на спектрофотометре Lambda 25 UV/VIS (Perkin & Elmer, USA) при длине волны 505 и 670 нм. Активность ферментов определяли в пяти биохимических повторностях. Скорость гидролиза выражена в микромолях продуктов реакции на грамм влажной массы ткани в минуту (мкмоль/г×мин).

Для определения активности АХЭ (ацетилхолинацетилгидролаза КФ 3.1.1.17) готовили гомогенаты из целого мозга рыб с добавлением 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.5) при помощи диспергатора IKAT10 Ultra-Turrax. Затем пробы центрифугировали на микроцентрифуге 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 4.3×10^{-4} М, и проявляющего реагента — 5.5-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ) в конечной концентрации 7.1×10^{-5} М. Остановку ферментативной реакции проводили добавлением 0.1%-ного раствора

неостигмин метил сульфата (neostigmine methylsulfate). Все реактивы фирмы Sigma, USA.

Содержание ВРБ определяли по методу [Bradford, 1976]. Для калибровки использовали альбумин из сыворотки человека (производство фирмы Reanal, Венгрия) 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 спектрометре SPECTROstar Nano BMG LABTECH.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общее содержание ртути. Содержание ртути в мышцах рыб до опыта составило 0.19 ± 0.02 мг/кг. У рыб ВСР группы оно было примерно в 2 раза выше (0.40 ± 0.01 через 1 мес. и 0.66 ± 0.01 мг/кг через 2 мес.), чем у рыб НСР группы (0.22 ± 0.01 и 0.30 ± 0.01 мг/кг соответственно), $p \leq 0.05$. Масса тела рыб до начала эксперимента составила 2.75 ± 0.14 г, длина тела 5.06 ± 0.07 см. Через 2 мес. масса тела была выше на 96–120%, длина тела — на 26–27%, при этом значимых различий в длине и массе рыб НСР и ВСР групп не выявлено.

Активность пищеварительных ферментов. В конце 2-го месяца опыта АА была выше на 46% в НСР группе и на 30% в ВСР группе по сравнению с 1-м месяцем, при этом различий в уровне активности между НСР и ВСР группами не выявлено (табл. 1). Уровень ПА был на 30% ниже во 2-ой месяц по сравнению с 1-ым лишь в ВСР группе, различия между НСР и ВСР группами отмечены лишь в 1-ый месяц (ПА в ВСР группе была выше на 36% по сравнению с НСР), через два месяца они отсутствовали. Уровень АМ у рыб НСР группы был на 77%, а ВСР группы на 340% выше во 2-ой месяц по сравнению с 1-ым. Различия АМ между группами были статистически значимы, причем в 1-ый месяц АМ была на 45% ниже, а во 2-ой месяц на 36% выше в ВСР группе по сравнению с НСР группой.

У рыб НСР группы через 1 мес. эксперимента активность пищеварительных ферментов увеличилась на 25–40% при действии ЭМП (табл. 1). Температурный стресс приводил лишь к снижению АМ на 35%, совместное действие ЭМП и роста температуры не меняло активность ферментов. У рыб ВСР группы АА снизилась на 18%, ПА — на 21% при совместном действии ЭМП и температуры. Температурный стресс снижал лишь ПА на 17%. АМ была выше на 86% при действии ЭМП, на 133% при действии температуры и на 206% при совместном действии факторов.

Результаты, представляли в виде средних значений и их ошибок ($M \pm m$). Статистическую значимость различий между показателями оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one way ANOVA). Для определения влияния нагрева воды и действия ЭМП на изученные характеристики использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two way ANOVA, Tukey test). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Через 2 мес. эксперимента у рыб НСР группы АА и ПА были выше контроля на 26 и 32% (АМ ниже на 18%) при действии ЭМП и на 30 и 46% соответственно при совместном действии ЭМП и температуры. При этом температурный стресс снижал АА и ПА на 25 и 17% соответственно. У рыб ВСР группы изменения АА и ПА носили аналогичный характер. АМ была ниже на 28% лишь при действии температуры.

Дисперсионный анализ показал статистически значимое влияние ЭМП, а также температуры на активность пищеварительных ферментов (табл. 2). Совместное действие этих факторов отсутствует лишь в НСР группе в 1-ый месяц опыта. Через 2 мес. отмечено значимое совместное влияние факторов на АА и ПА в НСР и ВСР группах и отсутствие влияния на АМ.

Активность АХЭ в мозге. После одного месяца эксперимента активность АХЭ варьировала в пределах 7.55–10.16 мкмоль/г×мин, но эта вариабельность не имела статистической значимости ни для одного варианта эксперимента как внутри каждой группы, так и между группами (табл. 1). Однако на уровне тенденции можно отметить снижение активности фермента в варианте ВСР без дополнительного воздействия, а также в вариантах НСР+Т, НСР+ЭМП+Т и во всех вариантах ВСР по сравнению с вариантом НСР без дополнительного воздействия. Между вариантами группы ВСР никаких тенденций не прослеживается.

Через 2 мес. эксперимента активность фермента варьировала в пределах 6.86–9.53 мкмоль/г×мин. При этом статистически значимых и на уровне тенденций различий в активности фермента между вариантами в группе НСР не выявлено, как и между сходными вариантами из обеих групп. Вместе с тем, в группе ВСР зарегистрировано статистически значимое снижение на 31% активности фермента в варианте ВСР+ЭМП+Т по сравнению с вариантом ВСР+ЭМП.

Таблица 1. Активность гликозидаз (амилолитическая активность и активность мальтазы) и протеиназ в кишечнике, активность АХЭ и содержание ВРБ в мозге у молодой карася с разным содержанием ртути при действии ЭМП и температурного стресса

Table 1. Activity of glycosidases (amylolytic activity, maltase) and proteinases in the intestine, AChE activity and WSP content in brain of juvenile golden carp with different mercury content under the influence of EMF and temperature stress

Показатель Indicator	НСР LMC	НСР+ЭМП LMC+EMF	НСР+Т LMC+T	НСР+ЭМП+Т LMC+EMF+T	ВСР HMC	ВСР+ЭМП HMC+EMF	ВСР+Т HMC+T	ВСР+ЭМП+Т HMC+EMF+T
1 мес. / month								
Амилолитическая активность, мкмоль/г×мин Amylolytic activity, μmol/g×min	228.0±4.4 ^a	284.0±6.5 ^b	204.0±5.8 ^a	202.7±12.2 ^a	254.7±9.9 ^г	218.7±11.6 ^{г,д} *	217.3±9.6 ^{г,д}	208.0±13.2 ^д
Протеолитическая активность, мкмоль/г×мин Proteolytic activity, μmol/g×min	5.30±0.26 ^a	7.02±0.20 ^b	5.19±0.21 ^a	5.51±0.29 ^a	7.23±0.17 ^{г*}	6.91±0.12 ^г	6.04±0.24 ^{д*}	5.72±0.24 ^д
Активность мальтазы, мкмоль/г×мин Activity of maltase, μmol/g×min	11.91±0.64 ^a	16.72±0.11 ^b	7.77±0.40 ^b	12.49±0.14 ^a	6.55±0.34 ^{г*}	12.21±0.10 ^{д*}	15.27±0.88 ^е *	20.01±0.16 ^{ж*}
Активность АХЭ, мкмоль/г×мин AChE activity, μmol/g×min	10.16±0.74 ^a	9.28±0.97 ^a	7.63±0.4 ^a	7.55±0.65 ^a	7.90±0.26 ^г	7.83±0.85 ^г	7.36±0.23 ^г	7.79±0.70 ^г
Содержание ВРБ, мг/г WSP content, mg/g	11.25±0.74 ^a	9.05±0.79 ^{а,б}	9.73±0.57 ^{а,б}	8.36±0.83 ^б	6.39±0.49 ^{г,д*}	8.65±0.84 ^д	5.52±0.59 ^{г*}	5.13±0.66 ^{г*}
2 мес. / month								
Амилолитическая активность, мкмоль/г×мин Amylolytic activity, μmol/g×min	338.7±16.1 ^a #	426.7±9.4 ^b #	253.3±10.9 ^b #	440.0±5.9 ^б #	333.3±11.9 ^г #	493.3±12.5 ^д #	226.7±10.1 ^ж #	640.0±42.7 ^{е*} #
Протеолитическая активность, мкмоль/г×мин Proteolytic activity, μmol/g×min	4.77±0.12 ^a	6.32±0.26 ^b	3.96±0.23 ^a	6.98±0.23 ^б	5.05±0.15 ^г	6.53±0.26 ^д	4.11±0.07 ^е	6.74±0.20 ^д #
Активность мальтазы, мкмоль/г×мин Activity of maltase, μmol/g×min	21.14±0.50 ^a #	17.39±0.06 ^b #	22.84±0.15 ^б #	20.50±0.33 ^a #	28.83±0.90 ^{г*} #	26.70±1.38 ^{г*} #	20.79±0.51 ^д #	27.54±1.06 ^{г*} #
Активность АХЭ, мкмоль/г×мин AChE activity, μmol/g×min	9.53±0.57 ^a	8.08±0.25 ^a	9.60±0.77 ^a	7.99±0.22 ^a	8.46±0.33 ^{г,д}	8.96±0.25 ^г	7.81±0.41 ^{г,д}	6.86±0.69 ^д
Содержание ВРБ, мг/г WSP content, mg/g	6.77±0.94 ^a #	7.49±0.42 ^a	7.64±0.49 ^a #	5.81±0.37 ^a #	8.41±0.50 ^г	6.49±0.28 ^{г,д} #	5.67±0.71 ^д	7.32±0.65 ^{г,д} #

Примечание. Здесь и в табл. 2: НСР — низкое содержание ртути, ВСР — высокое содержание ртути, ЭМП — электромагнитное поле, Т — температурный стресс, АХЭ — ацетилхолинэстераза, ВРБ — водорастворимый белок; показатели внутри групп в строке с разными надстрочными индексами: ^{а, б, в} (НСР), ^{г, д, е, ж} (ВСР) статистически значимо различаются; “*” — различия показателей в аналогичных вариантах в группах НСР и ВСР статистически значимы; “#” — различия показателей в столбце в 1-ый и 2-ой месяц опыта статистически значимы (ANOVA, Тьюки-тест, $p \leq 0.05$).

Note. Here and in table 2: LMC — low mercury content, HMC — high mercury content, EMF — electromagnetic field, AChE is acetylcholinesterase, WSP is water-soluble protein; parameters in a row within groups with different superscripts letters ^{а, б, в} (LMC), ^{г, д, е, ж} (HMC) are statistically significantly different; “*” — differences in parameters in similar variants in the LMC and HMC groups are statistically significant; “#” — differences in parameters in the column in the 1 and 2 month of the experiment are statistically significant (ANOVA, Tukey test, $p \leq 0.05$).

Таблица 2. Статистическая значимость влияния накопленной ртути, последующего действия ЭМП и температурного стресса на активность гликозидаз (амилолитическая активность и активность мальтазы) и протеиназ в кишечнике, активность АХЭ и содержание ВРБ в мозге у молоди карася; в скобках сила влияния каждого фактора (%)

Table 2. Statistical significance of the influence of accumulated mercury, the subsequent effect of EMF and temperature stress on the activity of glycosidases (amylolytic activity and maltase activity) and proteinases in the intestine, AChE activity and the content of WSP in the brain of juvenile golden carp; in brackets is the strength of influence of each factor (%)

Показатель Indicator	НСП+ЭМП LMC+EMF	НСП+Т LMC+T	НСП+ЭМП+Т LMC+EMF+T	ВСП+ЭМП HMC+EMF	ВСП+Т HMC+T	ВСП+ЭМП+Т HMC+EMF+T	Hg
1 мес. / month							
Амилолитическая активность, мкмоль/г×мин Amylolytic activity, $\mu\text{mol/g}\times\text{min}$	0.0001 (86)	0.0111 (57)	0.0871 (32)	0.0467 (41)	0.0271 (48)	0.0226 (50)	0.0406 (43)
Протеолитическая активность, мкмоль/г×мин Proteolytic activity, $\mu\text{mol/g}\times\text{min}$	0.0008 (77)	0.7631 (1)	0.6061 (3)	0.1667 (22)	0.0036 (67)	0.0009 (77)	0.0003 (83)
Активность мальтазы, мкмоль/г×мин Activity of maltase, $\mu\text{mol/g}\times\text{min}$	0.0001 (87)	0.0006 (79)	0.3988 (9)	0.0000 (97)	0.0000 (92)	0.0000 (99)	0.0001 (83)
Активность АХЭ, мкмоль/г×мин AChE activity, $\mu\text{mol/g}\times\text{min}$	0.4881 (5)	0.0159 (46)	0.0244 (41)	0.9353 (0)	0.1546 (19)	0.8848 (0)	0.0166 (45)
Содержание ВРБ, мг/г WSP content, mg/g	0.0368 (37)	0.0656 (30)	0.0123 (48)	0.0429 (35)	0.2849 (11)	0.1571 (19)	0.0000 (84)
2 мес. / month							
Амилолитическая активность, мкмоль/г×мин Amylolytic activity, $\mu\text{mol/g}\times\text{min}$	0.0015 (74)	0.0024 (71)	0.0004 (81)	0.0000 (91)	0.0001 (85)	0.0001 (86)	0.7969 (1)
Протеолитическая активность, мкмоль/г×мин Proteolytic activity, $\mu\text{mol/g}\times\text{min}$	0.0006 (79)	0.0131 (56)	0.0000 (90)	0.0013 (75)	0.0005 (80)	0.0002 (85)	0.1790 (21)
Активность мальтазы, мкмоль/г×мин Activity of maltase, $\mu\text{mol/g}\times\text{min}$	0.0001 (87)	0.0120 (57)	0.3182 (12)	0.2336 (17)	0.0001 (88)	0.3832 (10)	0.0001 (87)
Активность АХЭ, мкмоль/г×мин AChE activity, $\mu\text{mol/g}\times\text{min}$	0.0078 (52)	0.9458 (0)	0.0044 (57)	0.2502 (13)	0.2429 (13)	0.0613 (31)	0.0523 (33)
Содержание ВРБ, мг/г WSP content, mg/g	0.3467 (9)	0.4432 (10)	0.2036 (16)	0.0076 (53)	0.0105 (50)	0.2175 (15)	0.0620 (31)

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 $p \leq 0.05$.

При анализе временной динамики активности фермента в аналогичных вариантах в каждой группе статистически значимое ее повышение на 25.8% после 2-го месяца эксперимента относительно 1-го месяца отмечено только в варианте НСР+Т. Во всех остальных вариантах в обеих группах статистически значимых различий показателя с увеличением продолжительности эксперимента не обнаружено.

Дисперсионный анализ выявил значимое влияние температуры и совместного действия двух факторов в 1-ый мес., а также ЭМП во 2-ой мес. на активность АХЭ лишь в группе НСР (табл. 2). Значимое влияние ЭМП отмечено в обеих группах, при этом сила влияния фактора не превышала 53%.

Содержание ВРБ в мозге. После 1-го месяца эксперимента в группе НСР обнаружено статистически значимое снижение на 35% содержания ВРБ в варианте НСР+ЭМП+Т по сравнению с вариантом без дополнительных воздействий (табл. 1). Между остальными вариантами этой группы различий не выявлено.

В группе ВСР в вариантах ВСР+ЭМП зарегистрировано статистически значимое на 35–69% более высокое содержание ВРБ относительно других вариантов этой группы. При сравнении содержания ВРБ для одинаковых вариантов между группами обнаружено более низкое значение показателя, чем в группе НСР в вариантах без дополнительного воздействия, ВСР+Т и ВСР+ЭМП+Т. Различия соответственно равнялись 76, 76 и 63%.

Накопление ртути в мышцах морских и пресноводных рыб при ее повышенном содержании в корме было продемонстрировано в ряде работ [Rodgers, Beamish, 1982; Golovanova, Komov, 2005; Amlund et al., 2007; Golovanova et al., 2008; Kuz'mina et al., 2013; Garina, 2023; Melakea et al., 2023]. Так, у атлантической трески *Gadus morhua* L., в течение трех месяцев получавшей корм с содержанием 0.95 ± 0.03 г Hg/г корма, ее концентрация в мышцах составила 0.38 ± 0.04 г Hg/г сырой массы, в 10 раз превышая уровень в контроле, при этом на долю метилртути приходилось 90–95% общей ртути [Amlund et al., 2007]. Аналогичный результат был показан и для атлантического лосося *Salmo salar* L., причем почти вся ртуть (>99%) была обнаружена в белковой фракции [Amlund et al., 2007]. У молоди серебряного карася *Carassius auratus* (L., 1758), в течение трех месяцев получавшей корм с пониженным и повышенным содержанием ртути, показатель в мышцах возрастал в 3.2 и 11.7 раз соответственно [Garina, 2023]. При этом отмечено повышение

Через 2 мес. эксперимента содержание ВРБ в группе НСР статистически значимо не различалось между разными вариантами эксперимента. В группе ВСР в варианте ВСР+Т значение показателя было статистически значимо на 48% ниже, чем в варианте без дополнительного воздействия. При сравнении значений показателя аналогичных вариантов между группами статистически значимых различий не выявлено.

Анализ временной динамики показал статистически значимое снижение содержания ВРБ на 27–66% в группе НСР в вариантах без дополнительной нагрузки, НСР+Т и НСР+ЭМП+Т по сравнению с их величинами после 1-го месяца эксперимента. В группе ВСР в варианте ВСР+ЭМП отмечено статистически значимое повышение значения показателя на 33%, в варианте ВСР+ЭМП+Т — его повышение на 43% относительно 1-го месяца.

Дисперсионный анализ выявил значимое влияние ЭМП и совместного действия ЭМП и Т на содержание ВРБ в НСР группе лишь в 1-ый месяц (табл. 2). У рыб ВСР группы отмечено значимое влияние лишь ЭМП как в 1-ый, так и во 2-ой месяц, при этом сила влияния фактора не превышала 53%.

Температурная устойчивость. Накопление ртути, как и последующее действие ЭМП не влияло на температурную устойчивость серебряного карася НСР и ВСР групп. Средние значения верхней сублетальной температуры (КТМ) для обеих групп составили 36.0 ± 0.1 °C.

ОБСУЖДЕНИЕ

концентрации общего белка, общего холестерина и липопротеинов высокой плотности в крови рыб в зависимости от количества ртути в корме и длительности эксперимента.

При повышенном содержании ртути в корме установлены изменения активности эндогенных антиоксидантных ферментов в мозге атлантического лосося *Salmo salar* L. [Bertseen et al., 2003], активности пищеварительных гликозидаз и протеиназ в кишечнике молоди карповых и окуневых видов рыб [Golovanova, Komov, 2005; Golovanova et al., 2008; Kuz'mina et al., 2013]. В 6-месячном эксперименте на молоди карпа *Cyprinus carpio* L., получавшей корм с содержанием ртути 0.17 мг/кг сырой массы, показано, что с ростом накопления ртути в мышцах до 1.24 мг/кг активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника, как правило, снижается, протеиназ увеличивается [Kuz'mina et al., 2013]. В нашей работе накопление ртути в мышцах молоди карася, не превышающее 0.66 мг/кг, в течение 2-х месяцев увеличивало активность кишечных протеиназ и в большей

мере гликозидаз, при этом АА и АМ демонстрируют прямую зависимость от продолжительности опыта и уровня накопленного металла. Однако различия в уровне активности у рыб НСР и ВСР групп отмечены лишь для мембранного фермента мальтазы.

Температура среды влияет как непосредственно на физиологию эктотермов, так и косвенно, изменяя 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].

В нашей работе показано, что краткосрочная термальная функциональная нагрузка, как правило, снижает активность пищеварительных гликозидаз и протеиназ, в большей мере у рыб ВСР группы через 2 мес. Действие ЭМП в течение 1 ч, напротив, повышает ее, а совместное действие ЭМП и Т через 1 мес. снижает, через 2 мес. повышает АА и ПА, в большей мере у рыб с большим накоплением ртути в мышцах. Ранее было показано, что кратковременное (1 ч) пребывание золотого карася *Carassius carassius* в комбинированном магнитном поле с параметрами резонанса для ионов Са снижало уровень АА и ПА в кишечнике, с параметрами резонанса для ионов К приводило к снижению лишь АА [Kuz'mina et al., 2015].

Известно, что соединения ртути, поступающая в организм, могут оказывать нейротоксическое действие [Chang, 1977]. Одним из наиболее часто и давно используемых при проведении экотоксикологических исследований биомаркеров нейротоксического действия загрязняющих веществ является активность АХЭ [Nunes, 2011]. Анализ полученных данных показал, что экспонирование карася в течение 2 мес. к ртутьсодержащей диете и накопление металла в мышцах рыб до уровня ≤ 0.66 мг/кг не оказывало статистически значимого влияния на активность АХЭ в мозге рыб. Однако на уровне тенденции отмечается снижение активности фермента с увеличением содержания ртути в рыбе. Возможно, дальнейшее повышение ее уровня сможет оказать влияние на активность фермента. Все варианты дополнительного краткосрочного воздействия на рыб повышением температуры и электромагнитным полем независимо от уровня накопленной ртути в их организме также, в основном, не привели к изменению активности АХЭ.

Похожие результаты были получены другими авторами. Например, было показано, что экспонирование черного толстоголова

(*Pimephales promelas*) в течение 10 сут в растворах с концентрацией $\text{HgCl}_2 \leq 13.57$ мкг/л приводило к ее биоаккумуляции в мышцах рыб в еще более высоких дозах (≤ 8.02 мг/кг), чем в нашем эксперименте. Однако это не вызывало статистически значимых изменений активности АХЭ в их мышцах [Grippe, Heath, 2003]. Вместе с тем, такой уровень биоаккумуляции ртути изменял пищевое поведение рыб, увеличивая время поиска и нахождения ими пищи в эксперименте. В другом исследовании для рыбы золотистый шайнер *Notemigonus crysoleucas* (Mitchill, 1814) в течение 90 суток использовали диету, содержащую 0.455 (НСР) и 0.959 (ВСР) мг/кг ртути [Webber, Haines, 2003]. Это привело к концу эксперимента к ее накоплению в целом организме и мозге соответственно в дозах 230 и 477 мкг/кг (НСР) и 536 и 1118 мкг/кг (ВСР). Активность АХЭ в мозге рыб при этом не изменилась ни в одном из вариантов опыта и не отличалась от контрольного уровня. В то же время оборонительное поведение рыб было нарушено. Вероятно, механизм нейротоксического действия ртути связан не только с ингибированием АХЭ и нарушением нейротрансдукции в холинергическом отделе, но и с другими биохимическими процессами в нервной системе.

Известно, что ртуть в природной водной среде существует как в неорганической, так и органической форме. В донных отложениях водоемов неорганические соединения ртути подвергаются процессам бактериального метилирования и аккумулируются в тканях гидробионтов преимущественно в своей более токсичной метилированной форме [Schartup et al., 2019; Amlund et al., 2007]. В экспериментах *in vitro* детально изучен механизм молекулярного взаимодействия с АХЭ разных животных только для неорганической формы ртути [Frasco et al., 2007]. Установлено, что степень и механизм ингибирования АХЭ ионом этого металла зависит от видовых особенностей наличия свободных сульфгидрильных групп и их локализации в молекуле фермента. При наличии таких групп в активном центре фермента ингибирование необратимо и следует кинетике псевдопервого порядка, которая завершается в течение 1 ч в микромолярном диапазоне. Когда свободная сульфгидрильная группа не чувствительна к ртути или отсутствует, то ингибирование обратимо и происходит в миллимолярном диапазоне. Взаимодействует ли органическая форма ртути с АХЭ и каков механизм этого взаимодействия до сих пор, не совсем ясно. Скорее всего, отсутствие снижения активности АХЭ в мозге рыб в нашей и других приведенных выше работах

обусловлено неспособностью органической формы ртути ингибировать фермент.

Наряду с отсутствием влияния ртути на активность АХЭ нами было выявлено к концу 1-го месяца эксперимента снижение содержания ВРБ в мозге карася во всех вариантах группы ВСР по сравнению с группой НСР, за исключением варианта ВСР+ЭМП, где значения показателя были повышенными. При этом в обеих группах самое низкое содержание ВРБ отмечалось в варианте с ЭМП+Т. Выявленные различия между группами могут быть связаны с дегенеративными процессами в основных отделах мозга, вызванными сокращением числа нервных клеток в результате действия накопленной ртути. Такие эффекты были обнаружены ранее у белого морского леща (*Diplodus sargus*) при его экспонировании в растворе неорганической ртути с концентрацией 2 мкг/л в течение 14 сут [Pereira et al.,

2016]. Различия в содержании ВРБ в мозге карася в нашем эксперименте при дополнительном краткосрочном воздействии в разных сочетаниях ЭМП и Т могут быть обусловлены их влиянием на процессы анаболизма и катаболизма белка.

При экспонировании карася в течение 2 мес. при ртутьсодержащей диете различия в содержании ВРБ между группами НСР и ВСР и между разными вариантам внутри групп, в основном, нивелировались. Возможно, это связано с достижением в группе НСР критического уровня накопления ртути (30–40 мг/кг), влияющего на процессы метаболизма белка, который в группе ВСР был достигнут в течение 1 мес., а также снижением в результате этого потенциальных модифицирующих эффектов ЭМП и Т. Однако указанные выше предположения для их выяснения требуют дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, поступающая с кормом ртуть интенсивно накапливается в мышечной ткани молоди карася, при этом, как правило, повышает активность исследованных пищеварительных ферментов, но не влияет на активность АХЭ в мозге, а содержание ВРБ снижает только в 1-й месяц. При этом различия внутри групп НСР и ВСР, как правило, отсутствуют. Последующее кратковременное воздействие ЭМП или температурный стресс могут модифицировать выявленные эффекты. Температурный стресс снижает АА и ПА, а действие ЭМП отдельно и в сочетании с температурным стрессом, напротив, повышает активность пищеварительных

ферментов у рыб НСР и ВСР группы. При этом сила эффекта зависит от количества ртути в корме, продолжительности воздействия и типа фермента. Снижение активности АХЭ отмечено лишь у рыб ВСР группы при последующей функциональной нагрузке ЭМП+Т, а снижение содержания ВРБ выявлено лишь при температурном стрессе. Результаты работы позволяют оценить экотоксикологический риск хронического поступления малых доз ртути на физиолого-биохимические показатели рыб при последующем резком повышении температуры окружающей среды и действии низкочастотных ЭМП.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124032500018-8.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводились в соответствии с правилами работы с животными, утвержденными Комиссией по биоэтике ИБВВ РАН, протокол № 12 от 25.01.2024 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голованов В.К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. М.: Полиграф-Плюс, 2013. 300 с.
- Горбатенко К.М., Лаженцев А.Е. Биохимический состав и калорийность минтая // Изв. ТИНРО. 2016. Т. 184. С. 93–104.
- Кузьмина В.В. Процессы пищеварения у рыб. Новые факты и гипотезы: монография / Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. Ярославль: Филигрань, 2018. 300 с.
- Макеева А.В., Ключко Н.Ю. Исследования по совершенствованию рецептуры формованных мороженых полуфабрикатов из речного окуня *Perca fluviatilis* повышенной биологической ценности // Известия КГТУ. 2021. № 60. С. 97–110. DOI: 10.46845/1997-3071-2021-60-97-110.
- 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.
- Amlund H., Lundbye A.K., Berntssen M.H.G. Accumulation and elimination of methylmercury in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) following dietary exposure // Aquat. Toxicol. 2007. Vol. 83, № 4. P. 323–330. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.05.008.
- Beitinger T.L., Bennett W.A., McCauley R.W. Temperature Tolerances of North American Freshwater Fishes Exposed to Dynamic Changes in Temperature // Environ. Biol. Fish. 2000. Vol. 58. P. 237–275. DOI: 10.1023/A:1007676325825.
- Berntssen M.H.G., Hylland K., Julshamn K. Lundbye A.-K., Waagbo R. Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish feed // Aquaculture Nutrition. 2004. Vol. 10. P. 83–97. DOI: 10.1046/j.1365-2095.2003.00282.x.

- Bloom N.S. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissues // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1992. Vol. 49. P. 1010–1017. DOI: 10.1139/f92-113.
- 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.
- Chang L.W. Neurotoxic effects of mercury (A review) // *Environmental Research.* 1977. Vol. 14(3). P. 329–373. DOI: 10.1016/0013-9351(77)90044-5.
- 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.
- 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, № 2. P. 88–90. DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- Farina M., Avila D.S., da Rocha J.B.T., Aschner M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury // *Neurochem. Int.* 2013. Vol. 62. P. 575–594. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.12.006
- Frasco M.F., Colletier J.-P., Weik M., Carvalho F., Guilhermino L., Stojan J., Fournier D. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury // *FEBS Journal.* 2007. Vol. 274(7), 1849–1861. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05732.x.
- Garina D.V. Influence of chronic intake of small doses of mercury on some biochemical parameters of lipid and protein metabolism in goldfish *Carassius auratus* (L., 1758) // *Ecosystem Transformation.* 2023. Vol. 6, № 3. P. 86–104. DOI: 10.23859/estr-220505.
- 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 Biol.* 2021. Vol. 14, № 3. P. 331–339. DOI: 10.1134/S1995082921020048.
- Golovanova I.L., Golovanov V.K., Chuiko G.M., Podgornaia V.A., Aminov A.I. Effects of Roundup herbicide at low concentration and of thermal stress on physiological and biochemical parameters in Amur sleeper *Percottus glenii* Dybowski juveniles // *Inland Water Biol.* 2019. № 4. P. 462–469. DOI: 10.1134/S1995082919040059.
- Golovanova I.L., Komov V.T. Impact of Mercury on Hydrolysis of Carbohydrates in the Intestine of the River Perch *Perca fluviatilis* // *J. Ichthyology.* 2005. Vol. 45. № 8. P. 663–668.
- Golovanova I.L., Komov V.T., Gremyatchikh V.A. Hydrolysis of Carbohydrates in Roach (*Rutilus rutilus* L.) at Different Levels of Mercury Accumulation // *Inland Water Biol.* 2008. Vol. 1. № 3. P. 296–302. DOI: 10.1134/S1995082908030140.
- Grippe M.A., Heath A.G. The effect of mercury on the feeding behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*) // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003. Vol. 55. P. 187–198. DOI: 10.1016/S0147-6513(02)00071-4.
- Haines T.A., Komov V.T., Matey V.E., Jagoe C.H. Perch mercury content is related to acidity and color of 26 Russian lakes // *Water Air Soil Pollut.* 1995. Vol. 85. P. 823–828. DOI: 10.1007/BF00476931.
- Hall B.D., Bodaly R.A., Furge R.J.P., Rudd J.W.M., Rosenberg D.M. Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish // *Water Air Soil Pollut.* 1997. Vol. 100. P. 13–24. DOI: 10.1023/A:1018071406537.
- Kuz'mina V.V., Komov V.T., Gremyachikh V.A., Rusanova P.V. Activity of Digestive Hydrolases in Carp *Cyprinus carpio* with Different Mercury Content in Food // *J. Ichthyol.* 2013. Vol. 53, № 4. P. 301–309. DOI: 10.7868/S0042875213020082.
- Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Pivovarova E.A., Bushkareva A.S., Vostrova U.A., Poltoratskaya A.V. Influence of saporopel 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.
- Kuz'mina V.V., Ushakova N.V., Krylov V.V. The Effect of Magnetic Fields on the Activity of Proteinases and Glycosidases in the Intestine of the Crucian Carp *Carassius carassius* // *Biology Bulletin.* 2015. Vol. 42, № 1. P. 61–66. DOI: 10.1134/S1062359015010070.
- Li Z.-H., Li P., Wu Y. Effects of waterborne mercury at different temperatures on hematology and energy metabolism in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) // *Int. J. of Environ. Sci. and Tech.* 2021. Vol. 18, № 6. P. 1489–1498. DOI: 10.1007/s13762-020-02906-7.
- Melakea B.A., Endalewa S.M., Alamerewa T.S. Bioaccumulation of Perfluoroalkyl Substances and Mercury in Fish Tissue: A Global Systematic Review // *J. Polymer Sci.* 2023. Vol. 8, № 2. P. 21–25. DOI: 10.36648/2471-9935.23.8.011.
- Nunes B. The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 2011. Vol. 212. P. 29–59. DOI: 10.1007/978-1-4419-8453-1_2.
- Pereira P., Puga S., Cardoso V., Pinto-Ribeiro F., Raimundo J., Barata M., Pousro-Ferreira P., Pacheco M., Almeida A. Inorganic mercury accumulation in brain following waterborne exposure elicits a deficit on the number of brain cells and impairs swimming behavior in fish (white seabream-*Diplodus sargus*) // *Aquat. Toxicol.* 2016. Vol. 170. P. 400–412. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.11.031.
- Rodgers D.W., Beamish F.W.H. Dynamics of dietary methylmercury in rainbow trout, *Salmo gairdneri* // *Aquat. Toxicol.* 1982. Vol. 2. P. 271–290.
- Schartup A.T., Thackray C.P., Qureshi A., Dassuncao C., Gillespie K., Hanke A., Sunderland E.M. Climate change and overfishing increase neurotoxicant in marine predators // *Nature.* 2019. Vol. 572. P. 648–650. DOI: 10.1038/s41586-019-1468-9.
- 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.

- Webber H.M., Haines T.A. Mercury effects on predator avoidance behavior of a forage fish, golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) // *Environ. Toxicol. Chem.* 2003. Vol. 22, № 7. P. 1556–1561. DOI: 10.1002/etc.5620220718.
- Zhou T., Scali R., Weis P., Weis J.S. Behavioral effects in mummichog larvae (*Fundulus heteroclitus*) following embryonic exposure to methylmercury // *Mar. Environ. Res.* 1996. Vol. 42. P. 45–49.

REFERENCES

- Amlund H., Lundebye A.K., Berntssen M.H.G. Accumulation and elimination of methylmercury in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) following dietary exposure. *Aquat. Toxicol.*, 2007, vol. 83, no 4. pp. 323–330. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.05.008.
- Beitinger T.L., Bennett W.A., McCauley R.W. Temperature Tolerances of North American Freshwater Fishes Exposed to Dynamic Changes in Temperature. *Environ. Biol. Fish.*, 2000, vol. 58, pp. 237–275. doi: 10.1023/A:1007676325825.
- Berntssen M.H.G., Hylland K., Julshamn K. Lundebye A.-K., Waagbo R. Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish feed. *Aquaculture Nutrition*, 2004, vol. 10, pp. 83–97. doi: 10.1046/j.1365-2095.2003.00282.x.
- Bloom N.S. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1992, vol. 49, pp. 1010–1017. doi: 10.1139/f92-113.
- 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.
- Chang L.W. Neurotoxic effects of mercury (A review). *Environmental Research.*, 1977, vol. 14(3). pp. 329–373. doi: 10.1016/0013-9351(77)90044-5.
- 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, no. 1, pp. 55–61. doi: 10.1016/s1096-4959(03)00048-4.
- 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, no. 2, pp. 88–90. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- Farina M., Avila D.S., da Rocha J.B.T., Aschner, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem. Int.*, 2013, vol. 62, pp. 575–594. doi: 10.1016/j.neuint.2012.12.006
- Frasco M.F., Colletier J.-P., Weik M., Carvalho F., Guilhermino L., Stojan J., Fournier D. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *FEBS Journal*, 2007, vol. 274(7), pp. 1849–1861. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05732.x.
- Garina D.V. Influence of chronic intake of small doses of mercury on some biochemical parameters of lipid and protein metabolism in goldfish *Carassius auratus* (L., 1758). *Ecosystem Transformation*, 2023, vol. 6, no. 3, pp. 86–104. doi: 10.23859/estr-220505.
- Golovanov V.K. Temperature criteria of the life activity of freshwater fish. Moscow, Poligraf-Plus, 2013. 300 s. (In Russian)
- 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 Biol.*, 2021, vol. 14, no. 3. pp. 331–339. doi: 10.1134/S1995082921020048.
- Golovanova I.L., Golovanov V.K., Chuiko G.M., Podgornaia V.A., Aminov A.I. Effects of Roundup herbicide at low concentration and of thermal stress on physiological and biochemical parameters in Amur sleeper *Perccottus glenii* Dybowski juveniles. *Inland Water Biol.*, 2019, no. 4. pp. 462–469. doi: 10.1134/S1995082919040059.
- Golovanova I.L., Komov V.T. Impact of Mercury on Hydrolysis of Carbohydrates in the Intestine of the River Perch *Perca fluviatilis*. *J. Ichthyology*, 2005, vol. 45, no. 8, pp. 663–668.
- Golovanova I.L., Komov V.T., Gremyatchikh V.A. Hydrolysis of Carbohydrates in Roach (*Rutilus rutilus* L.) at Different Levels of Mercury Accumulation. *Inland Water Biol.*, 2008, vol. 1, no. 3, pp. 296–302. doi: 10.1134/S1995082908030140.
- Gorbatenko K.M., Lazhentsev A.E. Biochemical composition and calorie content of pollock *Theragra chalcogramma* in the Okhotsk Sea. *Izv. TINRO*, 2016, vol. 184, pp. 93–104. (In Russian)
- Grippo M.A., Heath A.G. The effect of mercury on the feeding behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2003, vol. 55, pp. 187–198. doi: 10.1016/S0147-6513(02)00071-4.
- Haines T.A., Komov V.T., Matey V.E., Jagoe C.H. Perch mercury content is related to acidity and color of 26 Russian lakes. *Water Air Soil Pollut.*, 1995, vol. 85, pp. 823–828. doi: 10.1007/BF00476931.
- Hall B.D., Bodaly R.A., Furge R.J.P., Rudd J.W.M., Rosenberg D.M. Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish. *Water Air Soil Pollut.*, 1997, vol. 100, pp. 13–24. doi: 10.1023/A:1018071406537.
- Kuz'mina V.V., Komov V.T., Gremyachikh V.A., Rusanova P.V. Activity of Digestive Hydrolases in Carp *Cyprinus carpio* with Different Mercury Content in Food. *J. Ichthyol.*, 2013, vol. 53, no. 4. pp. 301–309. doi: 10.7868/S0042875213020082.
- Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Pivovarova E.A., Bushkareva A.S., Vostrova U.A., Poltoratskaya A.V. Influence of spropel 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.
- Kuz'mina V.V., Ushakova N.V., Krylov V.V. The Effect of Magnetic Fields on the Activity of Proteinases and Glycosidases in the Intestine of the Crucian Carp *Carassius carassius*. *Biology Bulletin*, 2015, vol. 42, no. 1. pp. 61–66. doi: 10.1134/S1062359015010070.
- Kuz'mina, V.V. Digestive Processes in Fish. New Facts and Hypotheses. Yaroslavl, Filigran', 2018. 300 p. (In Russian)

- Li Z.-H., Li P., Wu Y. Effects of waterborne mercury at different temperatures on hematology and energy metabolism in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Int. J. of Environ. Sci. and Tech.*, 2021, vol. 18, no. 6, pp. 1489–1498. doi: 10.1007/s13762-020-02906-7.
- Makeeva A.V., Klyuchko N.Yu. Research on recipe of mold frozen semi-manufactured goods improving from river perch *Perca fluviatilis* with increased biological value. *Izvestiya KGTU*, 2021, no. 60. pp. 97–110. (In Russian)
- Melakea B.A., Endalewa S.M., Alamerewa T.S. Bioaccumulation of Perfluoroalkyl Substances and Mercury in Fish Tissue: A Global Systematic Review. *J. Polymer Sci.*, 2023, vol. 8, no. 2, pp. 21–25. doi: 10.36648/2471-9935.23.8.011.
- Nunes B. The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011, vol. 212, pp. 29–59. doi: 10.1007/978-1-4419-8453-1_2.
- Pereira P., Puga S., Cardoso V., Pinto-Ribeiro F., Raimundo J., Barata M., Pousro-Ferreira P., Pacheco M., Almeida A. Inorganic mercury accumulation in brain following waterborne exposure elicits a deficit on the number of brain cells and impairs swimming behavior in fish (white seabream-Diplodus sargus). *Aquat. Toxicol.*, 2016, vol. 170. pp. 400–412. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.11.031.
- Rodgers D.W., Beamish F.W.H. Dynamics of dietary methylmercury in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquat. Toxicol.*, 1982, vol. 2, pp. 271–290.
- Schartup A.T., Thackray C.P., Qureshi A., Dassuncao C., Gillespie K., Hanke A., Sunderland E.M. Climate change and overfishing increase neurotoxicant in marine predators. *Nature*, 2019, vol. 572, pp. 648–650. doi: 10.1038/s41586-019-1468-9.
- 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.
- 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)
- Webber H.M., Haines T.A. Mercury effects on predator avoidance behavior of a forage fish, golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, vol. 22, no. 7, pp. 1556–1561.
- Zhou T., Scali R., Weis P., Weis J.S. Behavioral effects in mummichog larvae (*Fundulus heteroclitus*) following embryonic exposure to methylmercury. *Mar. Environ. Res.*, 1996, vol. 42, pp. 45–49.

INFLUENCE OF ELECTROMAGNETIC FIELD AND THERMAL STRESS ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF JUVENILE CRUCIAN CARP *CARASSIUS GIBELIO* WITH DIFFERENT MERCURY CONTENT

**A. A. Filippov, I. L. Golovanova*, E. A. Kulivatskaya, V. A. Podgornaya,
A. K. Smirnov, G. M. Chuiko, V. V. Krylov, D. E. Kotikov, V. T. Komov**

Papanin Institute of Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences

152742, Borok, Russia, e-mail: *golovanova@ibiw.ru

Revised 20.07.2024

The effect of short-term exposure to a low-frequency electromagnetic field (50 Hz, 10 μ T) and thermal stress (water heating at a rate of 8 $^{\circ}$ C/h) on amylolytic (AA) and proteolytic (PA) activities, and maltase (AM) activity in the intestine, as well as acetylcholinesterase (AChE) activity and water-soluble protein (WSP) content in the brain of juvenile crucian carp *Carassius gibelio* fed a diet for 2 months with low (LMC; 0.07 mg/kg wet weight) and high (HMC; 0.182 mg/kg w.w) mercury were studied. The mercury content in the fish muscles of the HMC group (0.40 and 0.66 mg/kg) was approximately 2 times higher compared to the LMC group (0.22 and 0.30 mg/kg) after 1st and 2nd months of exposure, respectively. After 2 months of the experiment, AA increased by 30–48%, PA decreased by 30% only in the HMC group, while statistically significant differences were not revealed in the fish of the LMC and HMC groups. At this time AM levels were 77% (LMC) and 340% (HMC) higher compared to their values after 1st month, and simultaneously it was 36% higher in the HMC group than in the LMC group. No changes in AChE activity were revealed either in different months or between the LMC and HMC groups. The WSP content was 40% lower in the fish of the LMC group in the 2nd month compared to the 1st month. Subsequent temperature stress (T) decreased AA and PA, electromagnetic field (EMF) and its combination with T, as a rule, increased the activity of these enzymes in fish of both groups. A decrease in the activity of AChE (EMF+T) and WSP (T) was found only in fish of the HMC group. In general, mercury entering with food increases the activity of the studied digestive enzymes, but does not affect the brain AChE activity and WSP content decreases only in the 1st month. Subsequent temperature stress and the action of EMF can change the magnitude and direction of the effect. The obtained results are important for assessing the environmental risks of chronic mercury exposure in areas of thermal and electromagnetic pollution of water bodies.

Keywords: crucian carp, digestive enzymes, intestine, acetylcholinesterase, water-soluble protein, brain, mercury, bioaccumulation, electromagnetic field, temperature stress