

ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ДЕЙСТВИЯ МЕДИ
И ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА РАЗМЕРНО-МАССОВЫЕ
ПОКАЗАТЕЛИ И АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ
ГЛИКОЗИДАЗ У СЕГОЛЕТКОВ ПЛОТВЫ *Rutilus rutilus*

© 2021 г. И. Л. Голованова^а, *, А. А. Филиппов^а, Ю. В. Чеботарева^а, В. В. Крылов^а

^аИнститут биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук,
пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия

*e-mail: golovanova@ibiw.ru

Поступила в редакцию 24.06.2020 г.

После доработки 21.07.2020 г.

Принята к публикации 30.09.2020 г.

При изучении отдаленных последствий отдельного и совместного с низкочастотным электромагнитным полем (50 Гц, 10 мкТл) действия ионов Cu^{2+} (0.001, 0.01 и 0.1 мг/л) в период раннего эмбриогенеза выявлены изменения размерно-массовых показателей, активности гликозидаз (сахаразы, мальтазы, амилолитической активности) и кинетических характеристик гидролиза мальтозы в кишечнике сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* (L.). Масса тела, длина тела и кишечника были больше у рыб, подвергнутых воздействию как электромагнитного поля отдельно, так и в сочетании с ионами Cu^{2+} . В целом, по сравнению с контролем, активность сахаразы и мальтазы была выше, а амилолитическая активность ниже у рыб, подвергавшихся различным вариантам воздействия указанных факторов. Электромагнитное поле нивелировало тормозящий эффект Cu^{2+} на амилолитическую активность и активность мальтазы. Значения константы Михаэлиса (K_m) гидролиза мальтозы превышали таковые в контроле, отражая снижение сродства ферментов к субстрату при отдельном и совместном действии Cu и электромагнитного поля во время раннего развития плотвы. Полученные результаты важны при оценке экологических рисков в промышленных зонах.

Ключевые слова: плотва, эмбриогенез, электромагнитное поле, Cu , пищеварение, гликозидазы, сахараза, мальтаза, амилолитическая активность

DOI: 10.31857/S0320965221020054

ВВЕДЕНИЕ

Антропогенное химическое загрязнение водной среды – важный фактор, влияющий на жизнедеятельность гидробионтов. Тяжелые металлы не подвергаются биодegradации и могут накапливаться в тканях рыб в значительном количестве даже при низком содержании в воде и седиментах (Моисеенко, 2019; Zhang et al., 2019; Outa et al., 2020). Использование серноокислой меди для контроля развития водорослей и патогенных организмов в прудовом рыбоводстве, а также в качестве фунгицида в сельском хозяйстве, наряду с промышленным загрязнением, увеличивает количество этого металла в водных экосистемах. Концентрации Cu от 0.05 до 0.56 мг/л обнаружены в воде большинства водоемов мира, подверженных антропогенной нагрузке (Firat, Kargin, 2010; Jiang et al., 2016; Zhang et al., 2019), что зна-

чительно превышает допустимые концентрации ($\text{Cu}^{2+} < 0.001$ мг/л) для воды рыбохозяйственных водоемов России (Перечень..., 1999). Медь (Cu) является микроэлементом, необходимым для жизни, так как принимает участие в обмене веществ, регулирует многие реакции клеточного дыхания и активность ряда ферментов (Watanabe et al., 1997). Недостаток Cu приводит к задержке роста и низкой эффективности питания у ряда видов рыб (Tan et al., 2011; Остроумова, 2012; Tang et al., 2013). Однако медь в больших дозах – это тяжелый металл с выраженным токсическим эффектом. Избыток Cu во время раннего развития рыб снижает выживаемость эмбрионов (Mahrosh et al., 2014), замедляет скорость развития и рост (Jeziarska et al., 2009; Jiang et al., 2016; Yuan et al., 2016), вызывает структурно-функциональные нарушения в различных органах и тканях (Witeska et al., 2014; Sfakianakis et al., 2015). Основной механизм негативного действия Cu на организм рыб связан с нарушением осморегуляции и изменением

Сокращения: АА – амилолитическая активность; ЭМП – электромагнитные поля.

синтеза и активности ряда ферментов (Grossel et al., 2004).

В естественных условиях, как правило, на рыб действует несколько отличающихся по своей природе агентов. Это может приводить к усилению эффектов токсических веществ (Кузьмина, 2008; Golovanova et al., 2013; Zebal et al., 2019). Одним из факторов, сопутствующих загрязнению вод тяжелыми металлами, являются ЭМП. Они встречаются в естественных водоемах при электролове рыбы, работе электрорыбозаградителей, под высоковольтными линиями электропередач, при работе источников или преобразователей электрической энергии (Ohman et al., 2007; Kavet et al., 2016; Krylov et al., 2016). Вблизи крупных населенных пунктов и промышленных центров значительную часть электромагнитного загрязнения составляют различные по интенсивности ЭМП промышленной частоты (50 Гц в России). Эти поля присутствуют также в рыбоводческих хозяйствах, сопровождая работу оборудования, подключенного к электросети.

В последние годы накоплено много данных о действии низкочастотных ЭМП на темпы раннего развития, а также морфологические и биохимические показатели рыб (Golovanova et al., 2013; Krylov et al., 2016; Samiee, Samiee, 2017; Khoshroo et al., 2018; Fey et al., 2020). Рост, развитие и жизнеспособность рыб в значительной мере зависят от эффективности питания, которая определяется количеством и качеством корма, а также способностью переваривать и усваивать основные компоненты пищи. Углеводы, несмотря на относительно низкое содержание в естественном рационе большинства видов рыб, играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма. Об эффективности начальных этапов переваривания углеводов можно судить по активности гликозидаз — ферментов, гидролизующих ди- и полисахариды в различных отделах пищеварительного тракта. Пищеварительные ферменты рыб хорошо адаптированы к условиям существования, и их свойства могут меняться при действии ряда природных и антропогенных факторов (Kuz'mina, 2017). Так, чувствительность пищеварительных гликозидаз плотвы *Rutilus rutilus* (L.) к Cu изменяется после воздействия на эмбрионы ЭМП низкой частоты (72.5 Гц, 150 мкТл) (Golovanova et al., 2013), имитации магнитной бури (Filiprov et al., 2015), а также при смещении суточной геомагнитной вариации (Golovanova et al., 2019). Комплексное влияние Cu в концентрациях, встречающихся в водной среде, и ЭМП промышленной частоты на пищеварительную функцию рыб ранее почти не исследовали (Golovanova et al., 2013). Отдаленные последствия действия различных факторов на зародыши представляют особый интерес, поскольку рыбы на ранних стадиях развития особенно чувствительны к действию химических

и физических факторов (Jeziarska et al., 2009; Witeska et al., 2014; Chidiebere, 2019). Также следует отметить, что эмбрионы и ранние личинки рыб полностью лишены возможности покинуть экологически неблагополучные районы.

Цель работы — оценить отдаленные последствия действия ионов Cu^{2+} в концентрациях, встречающихся в компонентах водной среды, и ЭМП промышленной частоты на активность гликозидаз в период эмбриогенеза и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* (L.).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования были использованы развивающиеся эмбрионы плотвы *R. rutilus* (L.). Половые продукты получены от трех самок и четырех самцов, выращенных и содержавшихся на прудовой базе “Сунога” Института биологии внутренних вод РАН. Осемененную сухим способом икру (~3 тыс. шт. в каждом варианте опыта) помещали в кристаллизаторы с речной водой. После приклеивания икринок ко дну (через 5–10 мин после оплодотворения) воду сливали и заполняли кристаллизаторы равными объемами растворов $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 0.001, 0.01 и 0.1 мг/л, рассчитанной по содержанию ионов Cu^{2+} в соли, или речной водой (варианты “контроль” и “ЭМП”). Самая низкая концентрация была равна допустимой концентрации ионов Cu^{2+} для воды рыбохозяйственных водоемов, а концентрация анионов SO_4^{2-} в исследуемых растворах была нетоксичной (Перечень..., 1999). Водные растворы Cu готовили каждый раз при смене воды путем последовательных разведений. Воду и растворы Cu в кристаллизаторах меняли дважды в сутки — утром и вечером.

Четыре кристаллизатора с развивающимися эмбрионами плотвы размещали в ЭМП с частотой 50 Гц и величиной индукции 10 мкТл. Поле создавали в системах колец Гельмгольца диаметром 0.5 м, центральная ось которых располагалась перпендикулярно плоскости Земли (по два кристаллизатора с развивающимися эмбрионами 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).

Опыты проводили в восьми вариантах экспериментальных условий: контроль, растворы $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией ионов Cu^{2+} 0.001, 0.01 и 0.1 мг/л; действие ЭМП; действие ЭМП в присутствии ионов Cu^{2+} в концентрации 0.001, 0.01 и 0.1 мг/л. Экспозицию эмбрионов во всех

вариантах опыта проводили с 14 по 17 мая 2018 г. в период от оплодотворения до шестого личиночного этапа (Ланге и др., 1975), который характеризуется началом движения эмбрионов и при температуре инкубации 16–19°C составил 72 ч. После рассасывания желточного мешка и перехода на внешнее питание по 400 экз. личинок из каждого варианта опыта выпустили в однотипные выростные пруды с естественной кормовой базой. Здесь плотва находилась до конца сентября. Смертность плотвы в прудах была минимальна и не зависела от примененного воздействия. Комплексную оценку отдаленных последствий воздействия Си и ЭМП проводили на основе анализа размерно-массовых показателей, активности пищеварительных гликозидаз и кинетических характеристик гидролиза мальтозы у четырехмесячной молоди.

Для определения активности гликозидаз рыб обездвигивали, затем вскрывали брюшную полость, извлекали кишечника, помещали их на стекло ледяной бани и освобождали от химуса. С помощью стеклянного гомогенизатора готовили индивидуальные гомогенаты из медиального отдела кишечника 20 экз. рыб каждой экспериментальной группы ($n = 20$), используя раствор Рингера для холоднокровных животных (110 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 1.3 мМ CaCl₂, pH 7.4). Растворы субстратов (растворимый картофельный крахмал в концентрации 18 г/л, сахаразы и мальтозы в концентрации 50 ммоль/л) готовили на таком же растворе Рингера. Гомогенаты использовали сразу после приготовления либо после хранения в герметичных контейнерах при температуре –18°C. При хранении гомогенатов в этих условиях активность панкреатических ферментов сохраняется в течение четырех месяцев, мембранных ферментов – до двух лет (Solovyev, Gisbert, 2016). Инкубацию гомогената и субстрата проводили в течение 20–30 мин при температуре 20°C, pH 7.4 при непрерывном перемешивании.

Для оценки суммарной активности ферментов, гидролизующих крахмал (α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20), и активности сахаразы КФ 3.2.1.48 использовали модифицированный метод Нельсона (Уголев и др., 1969), а активности мальтазы – глюкооксидазный метод с использованием набора для клинической биохимии “Фотоглюкоза” (ООО “Импакт”, Россия). Активность ферментов определяли в трех биохимических повторностях и выражали в (мкмоль/(г · мин)) продуктов реакции, образующихся за 1 мин инкубации в расчете на 1 г влажной массы ткани с учетом фона (количества глюкозы в исходном гомогенате). Кинетические характеристики гидролиза мальтозы – значения кажущейся константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V_{max}) опре-

деляли графическим методом Лайнуивера–Берка, строя для каждой повторности графики зависимости ферментативной активности от концентрации субстрата в координатах двойных обратных величин.

Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок ($M \pm m$). Распределение изученных показателей не отличалось от нормального (тест Шапиро–Уилка), поэтому значимость различий оценивали с помощью апостериорного критерия Тьюки после проведения однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при $p \leq 0.05$. Для определения влияния ЭМП и разных концентраций ионов Cu²⁺ на изученные характеристики использовали двухфакторный дисперсионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Длина сеголетков контрольной группы была 7.99 ± 0.04 см, масса – 9.08 ± 0.14 г (табл. 1). Воздействие ионов Cu²⁺ во время эмбриогенеза не влияло на морфометрические показатели сеголетков за исключением длины и массы тела при концентрации 0.01 мг/л, которые были на 6 и 14% выше, чем в контроле. Абсолютная и относительная масса кишечника при концентрации 0.1 мг/л была на 36 и 26% соответственно ниже контрольного значения. Экспозиция в ЭМП вызывала увеличение массы тела на 32%, длины тела на 11%, длины кишки на 16% и снижение относительной массы кишки на 25% по сравнению с контролем. Совместное действие ЭМП и ионов Cu²⁺ во всех исследованных концентрациях приводило к увеличению длины и массы тела сеголетков, а также длины кишечника при концентрации меди 0.01 и 0.1 мг/л. Наряду с этим, относительная масса кишки была на 25–37% ниже контроля, абсолютная масса – на 29% лишь при самой низкой концентрации ионов Cu²⁺ (табл. 1).

Экспозиция эмбрионов в ЭМП, независимо от концентрации ионов Cu²⁺, приводила к увеличению размерно-массовых показателей рыб. Дисперсионный анализ показал сильное статистически значимое влияние экспозиции эмбрионов в ЭМП на длину ($F[1.152] = 196.61, p < 0.001, \eta^2 = 0.56$), массу ($F[1.152] = 248.86, p < 0.001, \eta^2 = 0.62$) и размеры кишечника ($F[1,152] = 26.25, p < 0.001, \eta^2 = 0.15$) у сеголетков. Влияние ионов Cu²⁺ на длину ($F[3.152] = 11.65, p < 0.001, \eta^2 = 0.19$), массу ($F[3.152] = 16.29, p < 0.001, \eta^2 = 0.24$) и размеры кишечника ($F[3.152] = 5.07, p < 0.01, \eta^2 = 0.09$) у сеголетков были также значимы, но заметно слабее. Эти эффекты вызваны различиями в размерно-массовых показателях у рыб, экспонированных в разных концентрациях ионов Cu²⁺ во время раннего развития.

Таблица 1. Размерно-массовые характеристики сетелетков плотвы контрольной и экспериментальных групп

Показатели	Контроль	Cu ²⁺ , мг/л			ЭМП	ЭМП + Cu ²⁺ , мг/л		
		0.001	0.01	0.1		0.001	0.01	0.1
Длина тела, см	7.99 ± 0.04 ^a	8.10 ± 0.09 ^a	8.43 ± 0.05 ^b	7.81 ± 0.09 ^a	8.89 ± 0.09 ^c	9.01 ± 0.09 ^c	8.89 ± 0.07 ^c	
Масса тела, г	9.08 ± 0.14 ^a	9.29 ± 0.32 ^{ab}	10.34 ± 0.23 ^{bc}	8.27 ± 0.27 ^a	12.00 ± 0.29 ^d	13.08 ± 0.21 ^d	12.60 ± 0.29 ^d	
Длина кишки, см	7.40 ± 0.20 ^{ab}	7.03 ± 0.30 ^a	7.99 ± 0.17 ^{abc}	7.13 ± 0.31 ^a	8.58 ± 0.29 ^c	8.48 ± 0.25 ^c	8.33 ± 0.16 ^{bc}	
Относительная длина кишки	0.93 ± 0.03 ^a	0.86 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.02 ^a	0.91 ± 0.03 ^a	0.96 ± 0.03 ^a	0.94 ± 0.03 ^a	0.94 ± 0.02 ^a	
Масса кишки, г	0.14 ± 0.01 ^{ab}	0.13 ± 0.01 ^{bc}	0.17 ± 0.00 ^b	0.09 ± 0.01 ^d	0.14 ± 0.01 ^{abc}	0.15 ± 0.01 ^{ab}	0.12 ± 0.01 ^{bcd}	
Относительная масса кишки	0.015 ± 0.001 ^a	0.014 ± 0.001 ^{ab}	0.016 ± 0.000 ^a	0.011 ± 0.001 ^{bc}	0.011 ± 0.001 ^{bc}	0.011 ± 0.001 ^{bc}	0.010 ± 0.001 ^c	

Примечание. Здесь и в табл. 2 разными надстрочными индексами даны статистически значимые различия показателей в строке (ANOVA, Тьюки-тест, $p \leq 0.05$); $M \pm m$ — средние значения ± ошибка; ЭМП — 50 Гц, 10 мкТл.

Уровень АА у подопытных рыб был ниже контроля на 55% при концентрации Cu^{2+} 0.1 мг/л и на 18–19% при более низких концентрациях ионов меди (табл. 2).

Активность мальтазы снижалась на 23% лишь при самой низкой концентрации металла. При более высоких концентрациях ионов Cu^{2+} она превышала контрольное значение на 53–71%, в то время как активность сахаразы была на 223–305% выше контроля. Действие ЭМП приводило к снижению АА и активности мальтазы на 63 и 20% соответственно, и повышению активности сахаразы на 79% от контроля. Совместное действие ЭМП и ионов Cu^{2+} , как правило, повышало активность гликозидаз (табл. 2). Только после экспозиции эмбрионов в ЭМП при концентрации ионов Cu^{2+} 0.1 мг/л АА была на 50% ниже, чем у рыб контрольной группы. Как раздельное, так и совместное действие ионов Cu^{2+} и ЭМП приводило к росту значений K_m гидролиза мальтозы на 30–147%, отражая снижение сродства ферментов к субстрату. Значения V_{\max} изменялись в соответствии с изменениями активности мальтазы.

Дисперсионный анализ показал статистически значимое влияние экспозиции эмбрионов в растворах Cu на АА ($F[3.152] = 70.05$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.58$), активность мальтазы ($F[3.152] = 163.08$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.76$) и на активность сахаразы ($F[3.152] = 286.46$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.85$) у сеголетков. Эти эффекты были следствием различий в активности гликозидаз у рыб, экспонированных в разных концентрациях ионов Cu^{2+} во время раннего развития. Кроме этого, обнаружено значимое влияние комбинированного воздействия ЭМП и ионов Cu^{2+} на АА ($F[3.152] = 61.41$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.55$), активность мальтазы ($F[3.152] = 20.02$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.28$) и активность сахаразы ($F[3.152] = 255.96$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.83$) у сеголетков. При этом в естественном геомагнитном поле проявляется тенденция к дозовой зависимости эффектов ионов Cu^{2+} , а в комбинации с ЭМП она отсутствует.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Размерно-массовые показатели и уровень активности гликозидаз у сеголетков контрольной группы свидетельствуют о высокой функциональной активности пищеварительной системы и хорошей кормовой базе выростных прудов в течение первых четырех месяцев жизни плотвы. Обработка зародышей Cu в концентрации 0.01 мг/л (но не 0.001 мг/л) в течение первых трех суток после оплодотворения приводит к увеличению размерно-массовых показателей у молоди плотвы, что согласуется с полученными ранее данными

(Golovanova et al., 2013). Более высокая концентрация Cu 0.1 мг/л не влияет на массу и размер развивающейся молоди, однако приводит к снижению абсолютной и относительной массы кишечника. Воздействие ЭМП (50 Гц, 10 мкТл) на развивающиеся эмбрионы также ведет к увеличению линейно-массовых показателей у молоди плотвы, что согласуется с данными наших предыдущих работ (Golovanova et al., 2013; Krylov et al., 2016). Так, более крупные в сравнении с контролем сеголетки выростали после экспозиции эмбрионов плотвы в ЭМП с интенсивностью 1.4–1.6 мкТл и частотой 72.5 или 500 Гц в течение первых двух суток после оплодотворения (Krylov et al., 2016). Однако если воздействие ЭМП приходилось на другие временные отрезки эмбриогенеза, то размерно-массовые характеристики, напротив, уменьшались (Krylov et al., 2016). Разнонаправленные изменения этих показателей наблюдали и при экспозиции эмбрионов в имитации геомагнитной бури (Krylov et al., 2019). По-видимому, ЭМП оказывает влияние на элементы сложной сети процессов, от которых зависит рост рыб. Однако то, каким будет эффект, зависит как от параметров ЭМП, так и от отрезка в эмбриогенезе, на который пришлось воздействие.

Даже кратковременное (0.5 или 1 ч) воздействие низкочастотного ЭМП (50 Гц) с величиной индукции >3 мТл приводит к гистопатологическим изменениям в мозге молоди карпа *Cyprinus carpio* (L.), выраженность которых была пропорциональна интенсивности ЭМП и продолжительности воздействия (Samiee, Samiee, 2017). У молоди карпа, в течение 2 ч подвергнувшегося воздействию ЭМП (50 Гц) с индукцией >0.1 мТл, отмечены изменения иммуно-физиологического статуса (Khoshroo et al., 2018). Даже в течение 60 сут после воздействия наблюдали снижение активности лизоцима и комплемента, а также увеличение активности аспаратаминотрансферазы, аланина, трансаминазы и щелочной фосфатазы в сыворотке крови (Khoshroo et al., 2018). При действии (1 сут) на годовиков карпа ионов Cu в концентрации от 0.5 до 8 мг/л и ЭМП (50 Гц) напряженностью от 25 до 400 А/м отмечено появление микроядер и других ядерных нарушений в эритроцитах, причем при сочетанном действии этих факторов суммарные частоты возникающих ядерных аномалий были меньше частот, индуцируемых каждым из факторов (Крюков, 2018).

В нашей работе отдаленные последствия совместного воздействия ЭМП и Cu в течение трех суток после оплодотворения проявились в снижении АА, а также активности мальтазы при концентрации ионов 0.001 мг/л, указывая, что замедление скорости начальных этапов ассимиляции углеводов может происходить без негативного влияния на рост молоди. Ускорение роста может быть обусловлено высоким усвоением низкомо-

Таблица 2. Активность гликозидаз в кишечнике сеголетков плотвы контрольной и экспериментальных групп

Показатели	Контроль	Cu, мг/л			ЭМП	ЭМП + (Cu, мг/л)		
		0.001	0.01	0.1		0.001	0.01	0.1
AA, мкмоль/(г · мин)	63.75 ± 4.21 ^a	51.33 ± 2.22 ^b	52.25 ± 2.18 ^b	28.83 ± 1.98 ^c	23.33 ± 1.24 ^c	56.08 ± 2.09 ^{ab}	77.50 ± 3.43 ^d	31.68 ± 0.87 ^c
Активность сахаразы, мкмоль/(г · мин)	0.31 ± 0.03 ^a	0.40 ± 0.01 ^a	0.99 ± 0.02 ^c	1.25 ± 0.02 ^d	0.55 ± 0.04 ^b	1.08 ± 0.02 ^c	1.37 ± 0.04 ^e	0.55 ± 0.03 ^b
Активность мальтазы, мкмоль/(г · мин)	3.79 ± 0.07 ^a	2.91 ± 0.07 ^b	5.80 ± 0.13 ^{cd}	6.50 ± 0.08 ^d	3.02 ± 0.12 ^b	3.78 ± 0.17 ^a	6.47 ± 0.22 ^d	5.22 ± 0.32 ^c
K _m гидролиза мальтозы, мкмоль	3.82 ± 0.19 ^a	5.05 ± 0.19 ^b	6.46 ± 0.30 ^c	4.95 ± 0.07 ^b	8.35 ± 0.31 ^{de}	9.45 ± 0.27 ^e	8.12 ± 0.19 ^d	6.21 ± 0.33 ^c
V _{max} , мкмоль/(г · мин)	3.97 ± 0.08 ^a	2.94 ± 0.05 ^c	6.95 ± 0.10 ^c	7.64 ± 0.09 ^d	3.13 ± 0.09 ^e	3.95 ± 0.07 ^a	7.08 ± 0.14 ^c	4.77 ± 0.16 ^b

лекулярных пептидов и свободных аминокислот, а также повышением эффективности заключительных этапов ассимиляции углеводов. В то же время активность сахаразы во всех вариантах воздействия ЭМП и Cu, и мальтазы при более высоких концентрациях металла была выше, чем у рыб контрольной группы. Ранее показано, что воздействие ЭМП (72.5 Гц, 150 мкТл) или его сочетания с Cu в концентрации 0.001 и 0.01 мг/л в течение двух суток после оплодотворения приводило к снижению активности сахаразы в кишечнике молоди плотвы (Golovanova et al., 2013). Эти данные свидетельствуют о том, что сила и направленность эффекта зависят от продолжительности воздействия, характеристик ЭМП, концентрации ионов меди и сочетания этих факторов, а также от типа фермента. Снижение АА при действии ЭМП и Cu в эмбриональный период может быть связано с наибольшим тормозящим влиянием этих факторов на активность панкреатической α -амилазы. Следует отметить, что тормозящий эффект Cu на АА в условиях геомагнитного поля сменяется на стимулирующий при действии ЭМП. В первом случае торможение составило 18–55% от контроля (геомагнитное поле, концентрация меди 0 мг/л), во втором случае стимулирующий эффект составил 36–232% (за 100% принята АА при действии ЭМП и концентрации Cu 0 мг/л). Тот же феномен отмечен и для мальтазы при наименьшей концентрации Cu – снижение активности на 23% в первом случае и повышение на 25% от контроля во втором. Замечено, что в естественном геомагнитном поле проявляется тенденция к зависимости активности ферментов от концентрации Cu, тогда как при действии ЭМП дозовая зависимость пропадает, что подтверждается стабильностью показателей, зарегистрированных при концентрации ионов Cu^{2+} 0.1 мг/л. Уменьшение сродства фермента к субстрату, выявленное в нашей работе, может приводить к снижению эффективности ассимиляции этого дисахарида у сеголетков плотвы.

Медь, проникая через оболочку яйцеклетки, может накапливаться в икре и оказывать прямое действие на оплодотворение и развития зародышей. У личинок карпа, эмбриональное развитие которых проходило в растворе Cu (0.2 мг/л), выявлены деформации тела, негативно влияющие на двигательную активность, эффективность питания и выживаемость (Witeska, Lugowska, 2004). Избыток Cu во время оплодотворения снижал выживаемость икры, вызывал задержку вылупления и появление деформаций у атлантического лосося *Salmo salar* L. (Mahrosh et al., 2014), а также снижал активность пищеварительных гликозидов у молоди плотвы (Golovanova et al., 2013) и антиоксидантных ферментов у молоди желтого горбыля *Larimichthys croceus* (Rich.) (Yuan et al., 2016). У карпов, содержащихся 4 ч в растворе

ацетата Cu (1 мг/л), отмечено изменение механической прочности кишечного эпителия, проявляющееся в десквамации живых эпителиоцитов (Карпенко и др., 2019). Поскольку рост и развитие органов пищеварения зависит от структурной целостности клеточной мембраны, эти изменения могут отрицательно сказаться на эффективности пищеварения рыб. Действие растворенной в воде Cu в концентрации 0.3 и 0.6 мг/л в течение 20 сут снижало активность пищеварительных (протеазы и амилазы) и антиоксидантных (каталазы и супероксиддисмутазы) ферментов в гепатопанкреасе и кишечнике молоди обыкновенного карася *Carassius carassius* (L.), но повышало активность этих ферментов при концентрации меди 0.6 мг/л и кратковременном (1 сут) воздействии (Jiang et al., 2016). После дальнейшего пребывания в чистой воде в течение 20 сут активность всех ферментов восстанавливалась до контрольного уровня. Концентрация Cu 0.6 мг/л и длительное (20 сут) воздействие необратимо снижали скорость роста рыб (Jiang et al., 2016). В то же время у молоди белого амура *Stenopharyngodon idella* (Valenciennes), получавшего с пищей от 0.74 до 3.75 мг Cu на 1 кг корма в течение 8 нед, отмечено увеличение массы тела и потребления пищи, а также активности трипсина, химотрипсина и липазы в гепатопанкреасе на фоне снижения активности амилазы (Tang et al., 2013). Эти данные показывают, что сила и направленность действия Cu на активность пищеварительных ферментов рыб зависят от стадии развития рыб, концентрации металла, продолжительности воздействия, а также от пути поступления (с водой или пищей).

Выводы. Раздельное и совместное с низкочастотным ЭМП (50 Гц, 10 мкТл) действие ионов Cu^{2+} (0.001, 0.01 и 0.1 мг/л) в период раннего эмбриогенеза может изменять размерно-массовые показатели и активность пищеварительных гликозидов в кишечнике молоди плотвы. Действие ЭМП и его сочетания с Cu увеличивает длину и массу сеголетков. У рыб, подвергавшихся разным вариантам воздействия указанных факторов, активность мальтазы и сахаразы, как правило, повышалась, АА снижалась. Сила и направленность эффекта зависят от концентрации ионов Cu^{2+} , наличия ЭМП, сочетания этих факторов, а также типа фермента. Полученные результаты важны для прогнозирования риска совместного и раздельного воздействия физических и химических агентов во время эмбриогенеза на гидролитическую функцию пищеварительной системы и рост рыб.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118012690102-9 и тема № АААА-А18-118012690222-4), а также при частичной поддержке темы Президиума РАН: 0122-2018-0001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Карпенко Л.Ю., Полистовская П.А., Енукашвили А.И. 2019. Влияние тяжелых металлов на механическую прочность эпителия кишечника карпа // Актуальные вопр. вет. биол. № 1 (41). С. 41. <https://doi.org/10.24411/2074-5036-2019-10013>
- Крюков В.И. 2018. Индукция микроядер в эритроцитах карпа при сочетанном действии ионов меди и низкочастотного переменного электромагнитного поля // Биология в сел. хоз-ве. № 2 (19). С. 17.
- Кузьмина В.В. 2008. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов. Ярославль: Принтхаус.
- Ланге Н.О., Дмитриева Е.Н., Исламгазиева Р.Б. 1975. Особенности развития жереха *Aspius aspius* (L.) нижнего течения р. Урал // Особенности развития рыб в различных естественных и экспериментальных условиях. Москва: Наука.
- Моисеенко Т.И. 2019. Биодоступность и экотоксичность металлов в водных системах: критические уровни загрязнения // Геохимия. Т. 64. № 7. С. 675.
- Остроумова И.Н. 2012. Биологические основы кормления рыб. Санкт-Петербург: Гос. НИИ озер. и реч. рыб. хоз-ва.
- Перечень рыбохозяйственных нормативов, предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. 1999. Москва: Изд-во Всерос. научно-исследовательский ин-т рыб. хоз-ва и океанограф.
- Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Масевич Ц.Г. и др. 1969. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Ленинград: Наука.
- Chidiebere E.E. 2019. Acute Toxicity of Copper and Zinc and their Lethal Concentration on *Clarias Gariepinus* (Cat Fish) // Biomed. J. Sci. & Tech Res. V. 17. Is. 5. P. 13160. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.17.003076>
- Fey D.P., Greszkiewicz M., Jakubowska M. et al. 2020. Otolith fluctuating asymmetry in larval trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, as an indication of organism bilateral instability affected by static and alternating magnetic fields // Sci. Total Environ. V. 707. P. 135489. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135489>
- Filippov A.A., Aminov A.I., Golovanova I.L. et al. 2015. Effect of magnetic storm on the sensitivity of juvenile roach intestinal glycosidase to heavy metals (Cu, Zn) and the herbicide Roundup // Inl. Water Biol. V. 8. № 4. P. 417. <https://doi.org/10.1134/S1995082915040070>
- Firat O., Kargin F. 2010. Response of *Cyprinus carpio* to copper exposure: alterations in reduced glutathione, catalase and proteins electrophoretic patterns // Fish Physiol. Biochem. V. 36. № 4. P. 102.
- Golovanova I.L., Filippov A.A., Krylov V.V. et al. 2013. Effect of a Magnetic Field and Copper upon Activity of Hydrolytic Enzymes in Roach (*Rutilus rutilus*) Underyearlings // J. Ichthyology. V. 53. № 3. P. 225. <https://doi.org/10.1134/S0032945213020045>
- Golovanova I.L., Filippov A.A., Chebotareva Yu.V. et al. 2019. Effect of a shift in diurnal geomagnetic variation on the activity and sensitivity of digestive glycosidases in roach underyearlings to heavy metals // Izvestiya, Atmospheric and Oceanic Physics. V. 55. № 11. P. 1623. <https://doi.org/10.1134/S0001433819110033>
- Grossel M., McDonald M., Wood C.M., Walsh P.J. 2004. Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*). I. Hydromineral balance and plasma nitrogenous waste product // Aquat. Toxicol. V. 68. № 3. P. 249.
- Jezińska B., Ługowska K., Witeska M. 2009. The affects of heavy metals on embryonic development of fish (a review) // Fish Physiol. Biochem. V. 35. № 4. P. 625.
- Jiang H., Kong X., Wang S., Guo H. 2016. 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. V. 96. № 3. P. 333. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1738-2>
- Kavet R., Wyman M.T., Klimley A.P. 2016. Modeling magnetic fields from a DC power cable buried beneath San Francisco Bay based on empirical measurements // PLoS One. V. 11. Is. 2. e0148543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148543>
- Khoshroo M.M.-Z., Mehrjan M.S., Samiee F. et al. 2018. Some immunological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling to acute extremely low-frequency electromagnetic fields (50 Hz) // Fish Physiol. Biochem. V. 44. Is. 1. P. 235. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0429-1>
- Krylov V.V., Chebotareva Y.V., Izyumov Yu.G. 2016. Delayed consequences of extremely low-frequency magnetic fields and the influence of adverse environmental conditions on roach *Rutilus rutilus* embryos // J. Fish Biol. V. 88. Is. 4. P. 1283. <https://doi.org/10.1111/jfb.12869>
- Krylov V.V., Chebotareva Y.V., Izyumov Yu.G. 2019. Delayed consequences of the influence of simulated geomagnetic storms on roach *Rutilus rutilus* embryos // J. Fish Biol. V. 95. Is. 6. P. 1422. <https://doi.org/10.1111/jfb.14150>
- Kuz'mina V.V. 2017. Digestion in fish. A new view. Baltý: LAP Lambert Acad. Publ.
- Mahrosh U., Kleiven M., Meland S. et al. 2014. Toxicity of road deicing salt (NaCl) and copper (Cu) to fertilization and early developmental stages of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // J. Hazardous Materials. V. 280. P. 331.
- Ohman M.C., Sigraý P., Westerberg H. 2007. Offshore windmills and the effects of electromagnetic fields on fish // Ambio. V. 36. P. 630.
- Outa J.O., Kowenje C.O., Avenant-Oldewage A., Jirsa F. 2020. Trace Elements in Crustaceans, Mollusks and Fish in the Kenyan Part of Lake Victoria: Bioaccumulation, Bioindication and Health Risk Analysis // Arch. Environ. Contam. Toxicol. V. 78. Is. 4. P. 589. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00715-0>
- Samiee F., Samiee K. 2017. Effect of extremely low frequency electromagnetic field on brain histopathology of Caspian Sea *Cyprinus carpio* // Electromagn. Biol. Med. V. 36. Is. 1. P. 31. <https://doi.org/10.3109/15368378.2016.1144064>
- Sfakianakis D.G., Renieri E., Kentouri M., Tsatsakis A.M. 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities:

- A review // Environ. Res. V. 137. P. 246.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014>
- Solovyev M., Gisbert E. 2016. Influence of time, storage temperature and freeze/thaw cycles on the activity of digestive enzymes from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // Fish Physiol. Biochem. V. 42. № 5. P. 1383.
- Tan X.Y., Luo Z., Liu X., Xie C.X. 2011. Dietary copper requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* // Aquacult. Nutr. V. 17. Is. 2. P. 170.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00720.x>
- Tang Q.Q., Feng L., Jiang W.D. et al. 2013. Effects of Dietary Copper on Growth, Digestive, and Brush Border Enzyme Activities and Antioxidant Defense of Hepatopancreas and Intestine for Young Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) // Biol. Trace Elem. Res. V. 155. Is. 3. P. 370.
<https://doi.org/10.1007/s12011-013-9785-6>
- Watanabe T., Kiron V., Satoh S. 1997. Trace minerals in fish nutrition // Aquaculture. V. 151. № 1–4. P. 185.
- Witeska M., Lugowska K. 2004. The effect of copper exposure during embryonic development on deformations of newly hatched common carp larvae, and further consequences // Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries. V. 7. № 2.
- Witeska M., Sarnowski P., Lugowska K., Kowal E. 2014. The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of ide *Leuciscus idus* L. // Fish Physiol. Biochem. V. 40. № 1. P. 151.
<https://doi.org/10.1007/s10695-013-9832-4>
- Yuan L., Li M., Zhang Yu., Tao Z. 2016. The protective effects of dietary zinc on dietary copper toxicity in large yellow croaker *Larimichthys croceus* // Aquaculture. V. 462 P. 30.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.034>
- Zebal Y.D., Roza M., Fonseca J.S. et al. 2019. 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. V. 209. P. 142.
- Zhang J.L., Fang L., Song J.Y. et al. 2019. Health risk assessment of heavy metals in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) from the upper Mekong River // Environ. Sci. Pollut. Res. V. 26. Is. 10. P. 9490.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04291-2>

Delayed Consequences of the Influence of Copper and Electromagnetic Field on Size-Mass Parameters and Activity of Digestive Glycosidases in Roach *Rutilus rutilus* Underyearlings

I. L. Golovanova¹*, A. A. Filippov¹, Yu. V. Chebotareva¹, and V. V. Krylov¹

¹*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavl oblast, Russia*

*e-mail: golovanova@ibiw.ru

Delayed consequences of the separate and combined influence of Cu²⁺ (0.001, 0.01, and 0.1 mg/L) and a low-frequency electromagnetic field (50 Hz, 10 μT) on roach *Rutilus rutilus* (L.) embryos have been studied. The treatments led to changes in the size-mass parameters, the activity of glycosidases (sucrase, maltase, amylolytic activity) and the kinetic characteristics of maltose hydrolysis in the intestines of underyearlings exposed as embryos. Increased body weight, body length, and intestine length were revealed in fish exposed to the electromagnetic field and the combined treatment of electromagnetic field and Cu²⁺ ions. Compared with the control, the activities of sucrase and maltase were higher while the amylolytic activity was lower in roach exposed to different combinations of studied impacts. The electromagnetic field compensated the inhibitory influence of Cu²⁺ on amylolytic and maltase activity. The values of the Michaelis constant (K_m) of maltose hydrolysis in the intestines of underyearlings exposed to studied impacts exceeded those in the control. This result indicates a decreasing in the enzyme affinity for the substrate probably caused by the separate and combined influence of Cu²⁺ and the electromagnetic field on the roach during early development. The results are important for the assessing of environmental risks in industrial areas.

Keywords: roach, embryogenesis, electromagnetic field, Cu, digestion, glycosidases, sucrase, maltase, amylolytic activity