



Экто-АТФазы, морфометрия и теплопродукционная активность эритроцитов хрящевых и костистых черноморских рыб

Ю.А. Силкин¹ * , М.Ю. Силкин¹ , Е.Н. Силкина¹ , С.О. Омельченко² 

¹ Карадагская научная станция имени Т.И. Вяземского – природный заповедник Российской академии наук – филиал Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», Российская академия наук, Россия, 298188, г. Феодосия, пос. Курортное, ул. Науки, д. 24;

² Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Россия, 295007, г. Симферополь, просп. Вернадского, д. 4

*e-mail: ysilkin@mail.ru

Изучены активность экто-АТФазы и размерные характеристики эритроцитов у двух видов хрящевых и десяти видов костных рыб, а также теплопродукционная активность суспензии эритроцитов у *Scorpaena porcus* и *Raja clavata*. Показано, что активность экто-АТФазы красных клеток крови (red blood cells – RBC) между хрящевыми рыбами различается в 1,5 раза и составляет у *Raja clavata* 3,1 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, а у *Dasyatis pastinaca* – 2,1 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC. Для эритроцитов костистых рыб характерна более значительная изменчивость активности экто-АТФазы, которая между своими крайними значениями различалась более, чем в 60 раз (у *Scorpaena porcus* она составила 6,4 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, у *Spicara flexuosa* и некоторых других видов – 0,1 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC). При сравнении размерных характеристик эритроцитов и величин активности экто-АТФазы была показана прямая связь между этими показателями. Исследование теплопродукции суспензий эритроцитов морской лисицы и скорпены показало, что при добавлении АТФ к суспензии выделенных клеток (1 мг/мл) происходит значительное увеличение температуры в экспериментальной ячейке. Эритроциты морской лисицы и скорпены демонстрировали разную динамику генерации тепла. Так ΔT , генерируемая эритроцитами скатов, была почти в два раза ниже, чем в эритроцитах скорпены. Общая продолжительность процесса генерации тепла до максимума ΔT в суспензии эритроцитов морской лисицы была почти в четыре раза короче, чем у скорпены. Однако процесс понижения температуры в суспензии эритроцитов скорпены происходил в два с лишним раза медленнее, чем у морской лисицы. Полученные результаты показали, что экто-АТФазы эритроцитов рыб, по-видимому, несут функцию источника локальной генерации тепла на поверхности эритроцита и, тем самым, могут быть глубоко интегрированы в функционирование мембраны клетки и всего кровотока в целом.

Ключевые слова: рыбы, температура, эритроциты, цитоморфометрия, АТФ, теплопродукция, экто-АТФаза

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-8

Введение

Экто-АТФаза, открытая Венкстерн и Энгельгардтом [1, 2] на ядерных эритроцитах ряда холоднокровных (аксолотль, лягушка, черепахи) и теплокровных (голубь) организмах в середине прошлого столетия, является ферментом, функциональное назначение которого до настоящего времени полностью не выяснено. Активность фермента в ядерных эритроцитах позвоночных варьирует в широких пределах, и, по данным Бенкика, Ятеса и Ингерманна [3], этот диапазон может составлять

между самыми низкими и высокими показателями активности шесть порядков. Особенно высокая активность энзима показана в крупных, по линейным размерам, ядерных красных клетках крови (Red Blood Cells – RBC) земноводных, «рекордсменом» среди которых является активность фермента в эритроцитах тритона (*Taricha rivularis* ~ 192,0 ± 107,5 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC) и длиннопалой саламандры (*Ambystoma macrodactylum* ~ 107,5 ± 45,4 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC). Эти исследования продемонстрировали взаимосвязь раз-

мерных характеристик ядерных эритроцитов и высоких показателей активности их экто-АТФаз. Эти же исследования также показали достаточно большой диапазон вариабельности активности экто-АТФазы эритроцитов у пресноводных костистых рыб Северной Америки. Пересчет представленных данных в удобные для сравнения единицы активности показал, что активность фермента у серебряного карася (*Carassius auratus*) составляет ~ 0,17 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, у канального сомика (*Ictalurus punctatus*) ~ 0,03 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, у солнечного синежаберного окуня (*Lepomis macrochirus*) ~ 0,013 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, а у большегубого чукчуна (*Catostomus macrocheilus*) ~ 0,005 моль Φ_n /мин/мкл RBC [3]. Как видно из представленных значений, разброс активности экто-фермента в эритроцитах пресноводных рыб был довольно значителен (в 5–34 раза).

Исследований о взаимосвязи размерных характеристик эритроцитов и активности экто-АТФаз у морских видов рыб в доступной научной литературе нами не найдено. Также функциональное назначение экто-АТФазы эритроцитов позвоночных, в том числе пресноводных и морских рыб, до настоящего времени до конца не установлено.

Хорошо известно, что экто-АТФазы эритроцитов позвоночных осуществляют гидролиз АТФ в околкеклеточном пространстве [3]. До недавнего времени считалось, что концентрация АТФ в плазме крови позвоночных близка к нулю и ее выход из эритроцитов теплокровных во внеклеточное пространство в наномолекулярных количествах обусловлено функцией пуриnergической сигнализации, направленной на регуляцию капиллярного кровотока [4]. Однако совсем недавно было установлено присутствие в плазме радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) значительного количества АТФ. Наличие микромолярных концентраций (не менее 3 μ M) АТФ в плазме крови рыб постоянно поддерживается за счет выделения макроэрга эритроцитами. Предполагается, что этот процесс и, соответственно, концентрация АТФ увеличивается с ростом деформационных нагрузок крупных эритроцитов рыб в капиллярном отделе кровотока [5]. Однако причины высокого уровня внеклеточного АТФ в кровотоке рыб точно не установлены, и эта проблематика открыта для более детального исследования. Как уже было сказано, АТФ в плазме крови постоянно подвергается ферментативному, тепловому гидролизу – в основном, за счет внеклеточных АТФаз эритроцитов, эндотелиальных клеток сосудов, и еще других, неустановленных, «участников» этого процесса.

Целью данного исследования было изучение активности экто-АТФазы, размеров эритроцитов и их теплопродукционной активности у некоторых хрящевых и костистых черноморских рыб.

Материалы и методы

Объекты исследования. Эксперименты проведены на эритроцитах двух видов хрящевых и десяти видов костистых черноморских рыб. Хрящевые рыбы: морская лисица (*Raja clavata* Linnaeus, 1758) и морской кот, хвосток (*Dasyatis pastinaca* Linnaeus, 1758). Костистые виды рыб: скорпена (морской ерш) (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758); звездочет (морская корова) (*Uranoscopus scaber* Linnaeus, 1758); рулена (*Symphodus tinca* Linnaeus, 1758); ласкирь (*Diplodus annularis* Linnaeus, 1758); бычок-кругляк (*Gobius melanostopus* Pallas, 1814); смарида (*Spicara flexuosa* Raneseque, 1810); ставрида (*Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev); налим (*Gaidropsarus mediterraneus* Linnaeus, 1758), черноморский калкан (*Scophthalmus maeoticus*, Pallas, 1814), морской петух (*Chelidonichthys lucerne* Linnaeus, 1758).

Рыб отлавливали в районе восточного побережья Крымского полуострова – горного массива Карадаг – с помощью ставного невода и доставляли в лабораторию в пластиковых баках с принудительной аэрацией. Транспортировка длилась 30–40 мин. После отлова хрящевых рыб (скаты) рассаживали в бассейны объемом 1000 л, костистых рыб – в аквариумы емкостью до 300 л. В бассейнах и аквариумах осуществлялась принудительная аэрация и поддерживалась температура +10–12°C для холодолюбивых и +14–17°C для теплолюбивых рыб. Акклимация рыб после отлова длилась в течение 2–4 сут без кормления, после чего рыб брали в опыт.

Получение эритроцитов. Забор крови у хрящевых рыб осуществляли путем пункции желудочка сердца инъекционной иглой, от одной особи можно было получить до 10 мл крови. Такого количества крови от одного ската хватало для проведения серии опытов. У костистых рыб кровь получали путем пункции хвостовой вены: от одной костистой рыбы можно было получить от 0,5 до 1 мл крови, поэтому для проведения опытов кровь отбирали от пяти или семи особей. Все исследования проводили в день забора крови, если эксперименты не требовали большего времени. Полученную кровь переносили в охлажденный физиологический раствор для отмывания эритроцитов от плазмы в соотношении 1:10. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (50 ед/мл крови) (Спофа, Чехия). Эритроциты отмывали от плазмы дважды, после чего центрифугировали при 1500 об./мин, в течение 5 мин на центрифуге К-23 (Janetzki, Германия) в десятикратном объеме изотонического раствора следующего состава (в ммоль/л): для хрящевых рыб – 220 NaCl, 400 мочевины, 10 Трис-НСI-буфера, (рН 7,3–7,4); для костистых рыб – 180 NaCl, 10 Трис-НСI-буфера, (рН 7,3–7,4). После центрифугирования эритроциты отделяли от лейкоцитов и плазмы.

Гематокрит суспензий эритроцитов определяли с помощью гематокритной центрифуги ТН-11 (Janetzki, Германия).

Морфометрия эритроцитов рыб. Сразу после взятия крови у рыб готовили мазки, которые после необходимых процедур окрашивали красителем по Романовскому-Гимза [6]. Оптические исследования мазков проводили на бинокулярном микроскопе STUDAR EK PZO (Польша) с использованием стандартных объективов PZO (Польша) 40/0.65 (160/0.17), 100/1.3 ОI (160/0.17). Для получения снимков использовалась цифровая камера МС-6.3 USB 3.0 фирмы ЛОМО (Россия). На полученных фотографиях клеток определяли линейные размеры эритроцитов с помощью компьютерной программы ImageJ 1,44r [7]. Измеряли большой и малый диаметр клеток и площадь эритроцитов. Линейные значения размеров эритроцитов были получены на основании 100 промеров. Площадь эритроцитов рыб определяли по формуле:

$$\text{площадь эритроцитов } (S) = \pi \cdot \frac{LD}{2} \cdot \frac{SD}{2},$$

где S – площадь эритроцита (мкм^2); π – число пи; LD – большая ось клетки; SD – малая ось клетки [8].

Определение активности экто-АТФазы эритроцитов рыб. Для определения активности экто-АТФазы в цельных эритроцитах и препаратах мембран использовали методику Казеннова с соавт. [9]. Инкубационная среда для определения активности экто-АТФазы эритроцитов ската содержала в конечной концентрации (мМ) следующие ингредиенты: 400 – мочевины, 135 – NaCl, 5 – KCl, 6 – MgCl₂, 1 – ЭДТА, 50 – Трис-HCl, pH = 7,4; для эритроцитов костистых рыб: 125 – NaCl, 5 – KCl, 6 – MgCl₂, 1 – ЭДТА, 50 – Трис-HCl, pH = 7,4. В инкубационных пробирках смешивали 0,1 мл инкубационной среды, 0,1 мл H₂O, 0,1 мл 2,0 мМ раствора АТФ-Na₂. Реакцию запускали добавлением 0,1 мл суспензии эритроцитов. Температура инкубации в стандартных условиях составляла +20°C. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об./мин. В надосадочной жидкости по модифицированному Казенновым и Масловой [10] методу Чена с соавт. [11] было определено содержание неорганического фосфата (Φ_n), по накоплению которого судили об активности фермента. Согласно такой модификации методики, при определении содержания Φ_n в пробе, в качестве восстановителя фосфорномолибденовой кислоты, помимо аскорбиновой кислоты, использовали хлористое олово (SnCl₂). К 0,9 мл H₂O приливали 0,1 мл супернатанта, смешивали с 0,8 мл реактива «А» [10 NH₂SO₄ + H₂O + 5% раствор (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O в соотношении 1:2:1], через 1–2 мин при непрерывном помещи-

вании прибавляли 0,2 мл реактива «В» (25 мг аскорбиновой кислоты растворяли в 12 мл H₂O, в который добавляли 0,1 мл 24%-ного раствора SnCl₂ в концентрированной HCl). Через 15 мин инкубации при комнатной температуре интенсивность развившейся окраски молибденового синего оценивали на спектрофотометре Specol 11 (Carl Zeiss, Германия) по поглощению света при длине волны в 720 нм. Калибровочный график показал прямолинейную зависимость экстинкции при содержании в пробе от 10 до 100 нмоль Φ_n . Активность экто-АТФазы рыб выражали в нмоль Φ_n /мин/мкл RBC.

Изучение теплопродукции суспензий эритроцитов морской лисицы и скорпены. Исследования проводили в модифицированном для этих целей макрокалориметре [12]. Объемы суспензий в экспериментальной ячейке (Т1) эритроцитов исследованных рыб были разными ввиду сложности получения достаточного количества эритроцитов. Для ската конечный объем суспензии составлял 5,0 мл (4,5 мл суспензии клеток + 0,5 мл физиологического раствора, содержащего 5 мг АТФ), а для скорпены – 2,0 мл (1,5 мл суспензии клеток + 0,5 мл физиологического раствора, содержащего 2 мг АТФ). Конечная концентрация АТФ в экспериментальных ячейках составляла 1 мг/мл суспензии. Параллельно готовили такую же контрольную ячейку (Т2) с соответствующим определенному виду рыб физиологическим раствором. Эксперименты проводили при комнатной температуре (+20°C). Ячейки, в которых проводились исследования (Т1 и Т2), представляли собой пластиковые пробирки с внешней термоизоляцией емкостью 10,5 мл с крышкой из материала с малой теплопроводностью. Внесение 0,5 мл термостатированной аликвоты АТФ проводилось непосредственно в ячейку с суспензией эритроцитов с помощью микродозатора. В измерительные ячейки также помещались платиновые резистивные термодатчики HEL700-102ВАА-В00. Резистивные термодатчики фирмы Honeywell (США) с сопротивлением в 1 кОм являются миниатюрными, квадратной формы с размерами 1,5–2,0 мм и толщиной 0,1 мм платиновыми сенсорами. Они позволяют производить измерение температуры в установке с точностью до $\pm 0,0001^\circ\text{C}$ при частоте измерений в 0,16 Гц и с точностью до $\pm 0,0015^\circ\text{C}$ при максимальной частоте измерений в 6,65 Гц. Особенностью дифференциального метода является использование двух ячеек – контрольной (Т2) и измерительной (Т1), находящихся в макрокалориметре, для исключения внешнего и внутреннего теплообмена. В работе использовали измерение $\Delta T = T1 - T2$, которое представляло разность температуры в измерительной (Т1) и контрольной (Т2) ячейках, что исключало артефакты внешних тепловых воздействий и повышало надежность получаемых

данных. Сигналы от датчиков с дискретностью 6,65 измерений в секунду при помощи специального электронного блока и разработанной программы конвертировались в компьютер. В конечном виде эти измерения обрабатывались при помощи специального программного обеспечения и записывались в виде массива данных. На экране монитора программа выводила график, который позволял проводить оперативную оценку текущих изменений температуры внутри ячейки. Скорость изменения температуры в ячейке выражали в °С/ч. Полученные экспериментальные данные обрабатывались с помощью программы OriginPro фирмы OriginLabCorp.

Объем материала. Число выполненных опытов – 1756: из них по определению активности фермента – 146, по определению теплопродукции эритроцитов – 12, по морфологии эритроцитов – 1200. Данные подвергали статистической обработке и представляли как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение ($\bar{x} \pm S'\bar{x}$). Достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента (t) при уровне значимости $p < 0,05$. Для определения нормальности распределения сравниваемых групп использовали критерий Колмогорова-Смирнова, корреляцию между выборками рассчитывали в модуле Statistics программы OriginPro (США).

Результаты исследования

Изучение цитоморфометрических характеристик и активности экто-АТФазы эритроцитов рыб. Полученные результаты по линейным размерам эритроцитов и величинам активности экто-АТФазы в них у исследованных рыб представлены в таблице.

По своим размерным характеристикам эритроциты скатов оказались самыми крупными клетками (*Raja clavata* – $26,8 \times 14,0$ мкм; *Dasyatis pastinaca* – $23,9 \times 15,5$ мкм) среди эритроцитов исследованных рыб. По площади клеток эритроциты *Raja clavata* и *Dasyatis pastinaca* также характеризовались близкими значениями ($294,5 \pm 9,4$ и $290,8 \pm 7,8$ мкм² соответственно) и значительно превосходили показатели самых крупных эритроцитов исследованных костистых рыб. Среди костистых рыб самые большие клетки были у *Scorpaena porcus*. Крупные эритроциты были также отмечены у *Uranoscopus scaber* и у *Symphodus tinca* (таблица). У пяти исследованных видов (в порядке следования в таблице от *Diplodus annularis* до *Spicara flexuosa*) размеры эритроцитов были достаточно близкими. Величины их площадей колебались от 50 до 62,3 мкм². Самыми мелкими среди исследованных видов рыб оказались эритроциты *Trachurus mediterraneus ponticus* и *Gaidropsarus*

Таблица

Размерные характеристики эритроцитов и активность экто-АТФазы в них у морских рыб

Виды рыб	Размеры эритроцитов (мкм)		Площадь эритроцитов (S _{мкм²})	Активность экто-АТФазы (нмоль Ф _n /мин/мкл RBC)
	Большая ось (LD)	Малая ось (SD)		
<i>Хрящевые</i>				
<i>Raja clavata</i>	26,8 ± 1,6	14,0 ± 0,9	294,5 ± 9,4	3,1 ± 0,1 (25)
<i>Dasyatis pastinaca</i>	23,9 ± 1,8	15,5 ± 1,3	290,8 ± 7,8	2,1 ± 0,1 (17)
<i>Костистые</i>				
<i>Scorpaena porcus</i>	14,4 ± 0,3	8,7 ± 0,1	98,3 ± 8,8	6,4 ± 0,2 (38)
<i>Uranoscopus scaber</i>	12,7 ± 1,1	8,3 ± 0,7	82,7 ± 9,3	4,2 ± 1,3 (7)
<i>Symphodus tinca</i>	11,5 ± 0,8	7,8 ± 0,6	70,4 ± 10,3	1,2 ± 0,3 (5)
<i>Diplodus annularis</i>	10,9 ± 0,4	7,3 ± 0,1	62,5 ± 5,6	0,36 ± 0,05 (7)
<i>Gobius melanostopus</i>	10,1 ± 0,9	7,6 ± 0,7	57,9 ± 6,3	0,11 ± 0,01 (5)
<i>Chelidonichthys lucerne</i>	9,8 ± 0,4	6,9 ± 0,1	53,1 ± 7,0	0,2 ± 0,01 (5)
<i>Scophthalmus maeoticus</i>	9,3 ± 0,2	7,2 ± 0,2	52,6 ± 8,6	0,3 ± 0,03 (5)
<i>Spicara flexuosa</i>	9,5 ± 0,1	6,7 ± 0,1	50,0 ± 4,9	0,1 ± 0,01 (6)
<i>Trachurus mediterraneus ponticus</i>	7,8 ± 0,4	5,0 ± 0,3	30,6 ± 2,6	0,12 ± 0,02 (21)
<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>	6,5 ± 0,3	4,1 ± 0,2	20,9 ± 1,8	0,1 ± 0,02 (5)

Примечание: данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение; число в скобках – количество повторов; цифры в скобках – количество повторных опытов. Коэффициент корреляции (r) между площадью эритроцитов и активностью экто-АТФазы у костистых рыб: $0,8261 \pm 0,2301$ ($p < 0,05$).

mediterraneus. Линейные размеры их клеток составляли всего $7,8 \times 5,0$ и $6,5 \times 4,1$ мкм (таблица), а площадь, соответственно, 30,6 и 21 мкм². Эритроциты *Scorpaena porcus* по площади в три раза уступали по этому показателю эритроцитам скатов. Площадь эритроцитов *Trachurus mediterraneus ponticus* была меньше площади эритроцитов скатов почти в 10 раз, а *Gaidropsarus mediterraneus* – в 15 раз (таблица).

Экто-АТФаза эритроцитов *Raja clavata* и *Dasyatis pastinaca* демонстрировала достаточно близкие значения своей активности ($3,1 \pm 0,1$; $2,1 \pm 0,1$ соответственно) различие которых между скатами составляло всего около 30% (таблица).

Активность экто-АТФазы эритроцитов среди исследованных костистых рыб характеризовалась значительной вариабельностью в способности расщеплять АТФ. Между высокими и низкими значениями активности фермента эритроцитов костистых рыб различия превышали 60-кратную величину (таблица). Самой высокой активностью экто-АТФазы обладали эритроциты *Scorpaena porcus* и *Uranoscopus scaber*. Относительно высокая активность фермента также была отмечена у *Symphodus tinca*. У остальных костистых рыб активность фермента была относительно низкой и колебалась от 0,1 до 0,36 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC (таблица). Корреляционный анализ между совокупностью значений площади эритроцитов костистых рыб и активностью экто-АТФазы в них показал достоверную прямую взаимосвязь (коэффициент корреляции был равен $0,8261 \pm 0,2301$,

при $\rho < 0,05$) между величиной площади клеток и активностью их фермента.

Изучение теплопродукции суспензий эритроцитов морской лисицы. Теплограмма суспензии эритроцитов (объемом в 5 мл) морской лисицы после добавления АТФ (1 мг/мл) представлена на рис. 1.

Из представленной теплограммы видно, что начальный этап эксперимента в ячейках характеризовался отсутствием значимых изменений ΔT , что свидетельствовало о стабилизации температуры как в экспериментальной (Т1), так и в контрольной (Т2) ячейках. Момент добавления в суспензию эритроцитов ската АТФ демонстрирует линия резкого падения температуры в ячейке на $0,08^\circ\text{C}$. Это было связано с реакцией термодатчика на струйное добавление раствора с макроэргическим субстратом. В течение $0,075$ ч после этого наблюдали быстрое нарастание температуры в ячейке, максимум которой превышал исходный уровень на $0,082^\circ\text{C}$. Скорость этого процесса была достаточно высокой и в начальный момент составляла $9,2^\circ\text{C}/\text{ч}$, затем в течение 9–10 мин она постепенно снижалась до $2,6^\circ\text{C}/\text{ч}$ и к моменту температурного максимума составляла $0,4^\circ\text{C}/\text{ч}$ (рис. 1). После этого наблюдали постепенное снижение температуры к исходному, нулевому, значению ΔT , которое было достигнуто после $0,65$ -часового интервала с момента добавления АТФ. Общий перепад температуры в процессе эксперимента, с учетом падения температуры в момент добавления раствора АТФ, составил $0,1619^\circ\text{C}$ (рис. 1).

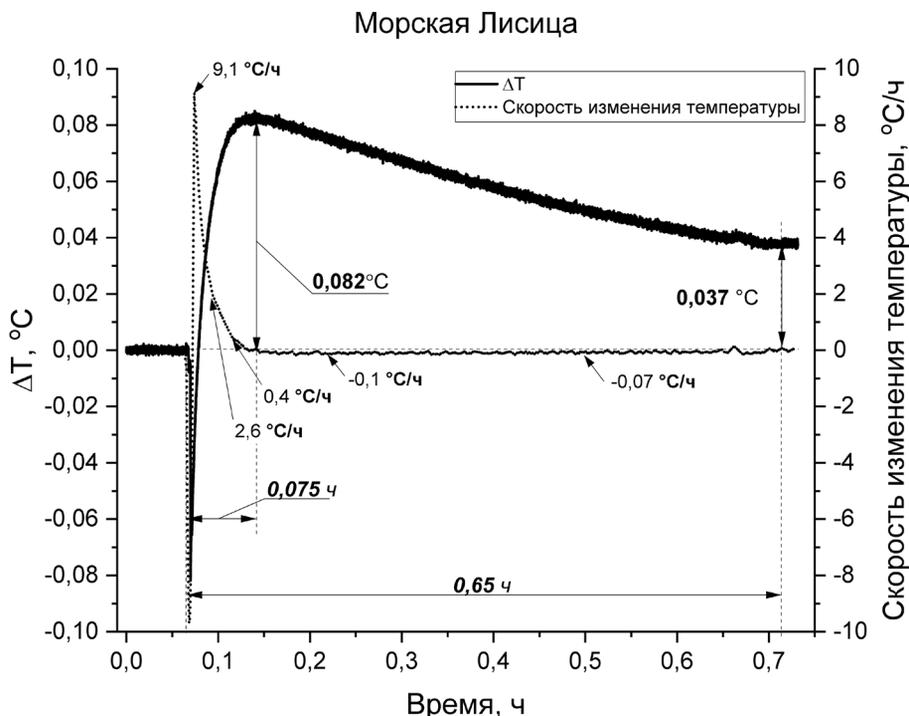


Рис. 1. Изменение температуры в суспензии эритроцитов морской лисицы при добавлении АТФ.

Примечание: $\Delta T^\circ\text{C} = T1 - T2$, разность температуры в измерительной (Т1) и контрольной (Т2) ячейках; цифры вдоль кривой — скорость процесса в $^\circ\text{C}/\text{ч}$.

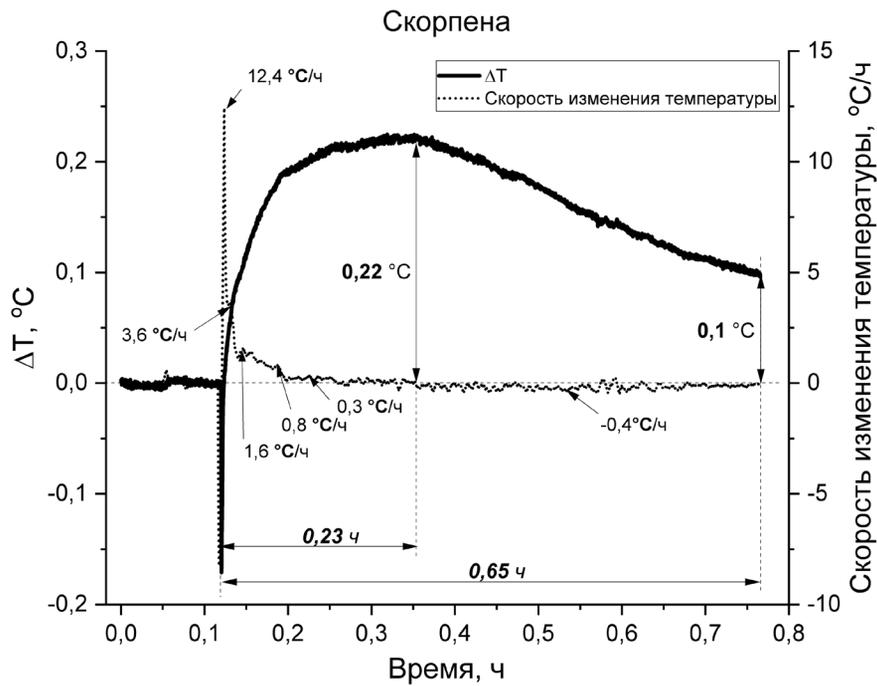


Рис. 2. Изменение температуры в суспензии эритроцитов скорпены при добавлении АТФ.

Примечание: $\Delta T^{\circ}\text{C} = T_1 - T_2$, разность температуры в измерительной (T_1) и контрольной (T_2) ячейках; цифры вдоль кривой — скорость процесса в $^{\circ}\text{C}/\text{ч}$.

Изучение теплопродукции суспензий эритроцитов скорпены. Теплограмма суспензии эритроцитов (объемом 2 мл) скорпены после добавления АТФ (1 мг/мл) представлена на рис. 2. Из рисунка видно, что опыт с суспензией эритроцитов скорпены демонстрирует несколько иную динамику прироста температуры в ячейке после добавления АТФ. Как и в предыдущем опыте, температура исходного раствора АТФ немного не совпала с температурой суспензии клеток в ячейке T_1 , поэтому разность температур (ΔT) в ячейке T_1 в этот момент несколько снизилась на $0,1889^{\circ}\text{C}$ относительно температуры в контрольной ячейке T_2 . Однако, несмотря на падение ΔT , процесс теплопродукции в суспензии эритроцитов скорпены оказался способен в течение $0,23$ ч не только компенсировать эту разницу, но и осуществить прирост ΔT на $0,22^{\circ}\text{C}$. Скорость прироста температуры в суспензии скорпены в начале процесса составляла $12,4^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, затем постепенно снижалась до $3,6^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ и к достижению максимума составила $0,3-0,4^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. Весь процесс увеличения температуры в эритроцитах скорпены занимал $0,23$ ч с момента добавления АТФ. Общий перепад температуры в суспензии клеток скорпены составлял $0,4089^{\circ}\text{C}$ (рис. 2).

Обсуждение результатов

Систематические исследования поверхностных АТФаз начались в середине 40-х гг. пионерскими работами Манна [13]. Манн обнаружил расщепление внеклеточной АТФ в суспензии

сперматозоидов, а Ротштейн и Мейер детально изучили и описали способность дрожжевых клеток расщеплять в окружающей среде фосфорные производные, в том числе и адениловые нуклеотиды. В последующие десятилетия число работ, связанных с изучением поверхностных нуклеотидаз, начинает быстро расти, а «география» встречаемости фермента(ов) среди доклеточных форм, животных и растительных клеток — стремительно расширяться [14]. Интерес к изучению этих ферментов — как ранее, так и в настоящее время — обусловлен широтой распространения, загадочностью их функционального назначения и высокими значениями удельной активности на поверхности некоторых клеток. Эритроциты позвоночных относятся к одним из первых клеток, на которых были открыты экто-АТФазы и показана их высокая активность [1, 2]. Авторы, ввиду высокой активности эктофермента на поверхности эритроцитов позвоночных (голубь, лягушка, аксолотль, черепаха), выдвинули предположение о важной биологической роли этого энзима в функционировании клетки. Эти исследования долгое время не имели продолжения до того момента, пока не было установлено, что экто-АТФазы безъядерных эритроцитов теплокровных принимают участие в качестве «выключателя» P_2 -рецепторов. Эти рецепторы обеспечивают активацию механизмов выделения закиси азота (NO), вызывающей расширение сосудов и увеличение притока O_2 в те ткани, которые в нем нуждаются. [4]. Однако установленная закономерность на эритроцитах теплокровных не была подтверж-

дена Йенсенем и соавторами [5] при поиске этого механизма на эритроцитах форели. Ключевым моментом в этих исследованиях явилось установление факта постоянного присутствия в крови радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) АТФ в высокой (~3 мМ) концентрации. Высокие фоновые значения АТФ в крови рыб свидетельствуют о том, что макроэргические фосфаты постоянно выделяются эритроцитами в плазму и играют другую роль в функционировании кровотока. Однако стимуляция дополнительного выделения АТФ за счет изменения насыщенности гемоглобина кислородом или увеличения в инкубационной среде содержания CO_2 не приводила к дополнительному выходу АТФ из эритроцитов форели. Это полностью противоречило тем экспериментам, когда эритроциты млекопитающих (хомяки, кролики, крысы, человек) при увеличении в плазме и клетках CO_2 и снижении насыщенности внутриклеточного гемоглобина кислородом высвобождали из эритроцитов АТФ, которая посредством активации P2-рецепторов эндотелия сосудов приводила к локальному расширению артериол и капилляров [15]. Авторы сделали вывод о том, что функциональное назначение экто-АТФазы ядерных эритроцитов может быть совсем иным, чем у безъядерных эритроцитов млекопитающих, и не связано с активацией сосудорасширяющих механизмов.

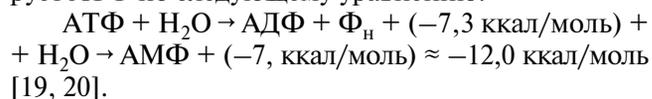
Самые крупные эритроциты скатов (морская лисица и морской кот) не обладают самой высокой активностью фермента и мы, по ряду причин, рассматриваем их отдельно от костистых рыб. Скаты – представители хрящевых рыб, которые эволюционно отличаются от костистых рыб. Эти рыбы имеют существенные различия по составу тканей, анатомии, физиологии и биохимии их функционирования. Эритроциты – не исключение из этого правила. Так, эритроциты скатов имеют необычайную толерантность к высоким концентрациям мочевины (~400 мМоль), что, видимо, является совершенно иным способом поддержания осмотического баланса с морской средой. Нами также установлено, что экто-АТФазы морской лисицы и скорпены относятся к разным подсемействам, которые по-разному чувствительны к действию азида натрия [16]. Как самые крупные клетки эритроциты скатов должны были бы демонстрировать самую высокую экто-АТФазную активность. Однако самую высокую активность фермента демонстрируют эритроциты скорпены (таблица). Скорее всего отсутствие строгой «стехиометрии» размеров клеток и активности фермента у скатов по сравнению с костистыми рыбами, видимо, обусловлено наличием еще каких-то важных факторов, которые еще предстоит установить.

В наших исследованиях прослеживается четкая корреляционная взаимосвязь между размерными характеристиками эритроцитов костистых

рыб и величиной их экто-АТФазной активности (таблица). У костистых рыб крупные эритроциты скорпены, звездочета, рулены демонстрировали высокую экто-АТФазную активность. С уменьшением размеров эритроцитов рыб от 10 мкм по LD и меньше 8 мкм – по SD и площади – менее 60 мкм² – активность фермента варьировала от 0,1 до 0,3 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, что было (за исключением *Carassius auratus*) на порядок и более выше, чем в эритроцитах пресноводных рыб [3]. Следует отметить, что представленные данные по активности экто-АТФазы эритроцитов рыб ограничены небольшой выборкой видов, хотя и на этом материале зависимость величины активности фермента прослеживается достаточно четко. Активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены, обладающей среди исследованных морских видов рыб самой высокой активностью фермента, была в 16–30 раз ниже, чем активность энзима эритроцитов у бесхвостых амфибий (см. Введение) [15].

Размеры клеток тритона (*Taricha rivularis*) и длиннопалой саламандры (*Ambystoma macrodactylum*) составляют, соответственно, 41×26 мкм и 65×37 мкм [17, 18]. Значения активности экто-АТФазы у бесхвостых амфибий (*Taricha rivularis* ~ 192,0 ± 107,5 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC) и длиннопалой саламандры (*Ambystoma macrodactylum* ~ 107,5 ± 45,4 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC) вполне соответствуют нашим выводам о том, что размеры эритроцитов определяют порядок активности их экто-АТФаз [3].

Экто-АТФазы уникальны ввиду расположения на поверхности плазматической мембраны клетки их активного центра, ориентированного для выполнения гидролиза АТФ во внеклеточном пространстве, окружающем эритроцит. Однако экто-АТФазы в системе крови никогда не рассматривались в качестве фактора, влияющего на реологию кровотока. Присутствие микромолярных концентраций внеклеточной АТФ в примембранном пространстве эритроцита, должно носить характер постоянно действующего фактора. Во-первых, одной из функций экто-АТФаз может быть регуляция поддержания необходимых концентраций АТФ в сосудах. Во-вторых, ферментативная реакция экто-АТФазы является экзотермической ввиду того, что гидролиз АТФ не сопряжен с образованием какой-либо химической связи или с выполнением работы по переносу ионов и других субстратов. Экто-АТФаза катализирует АТФ по следующему уравнению:



На «побочный» эффект выделения тепла экто-АТФазами эритроцитов позвоночных в результате их ферментативной активности исследователи особого внимания не обращали. Однако необходи-

мость в использовании тепловой энергии актуальна для функционирования плазматических мембран как ядерных, так и безъядерных эритроцитов. Тепло в примембранной области клетки может иметь большое значение для изменения вязкоэластичных свойств плазматической мембраны при продвижении эритроцитов в капиллярах и в реологии кровотока в целом. Можно полагать, что для нормального функционирования самой мембраны и ее компонентов в клетке наличие внеклеточного пула АТФ является совершенно необходимым условием. В связи более «жесткого» состава поверхностного монослоя мембраны, может происходить подогрев этого монослоя за счет теплового гидролиза внеклеточной АТФ и выравнивание вязкоэластичных свойств мембраны в целом [21, 22]. Как мы полагаем, экто-АТФазы эритроцитов, кроме подогрева собственной мембраны совместно с экто-АТФазами эндотелия капилляров, могут оказывать тепловое воздействие на пристеночный слой плазмы и, тем самым, снижать вязкостные характеристики крови. Это может происходить за счет дополнительного выделения во внеклеточное пространство АТФ, которое усиливается с ростом деформации эритроцитов в капиллярном отделе кровотока [23].

Эритроциты морской лисицы и скорпены демонстрировали разную динамику генерации тепла для достижения максимума ΔT . Так, общая продолжительность процесса генерации тепла до максимума ΔT в суспензии эритроцитов морской лисицы была почти в четыре раза короче, чем у скорпены (рис. 1, 2). Такое течение процесса в эритроцитах морской лисицы можно объяснить бóльшим количеством клеток используемой суспензии. Гематокрит суспензий эритроцитов морской лисицы составлял в экспериментах 50%, а у скорпены – только 30%. Кроме того, исходная температура добавляемой АТФ в суспензию ската была подобрана существенно лучше, ее перепад был всего $0,08^\circ\text{C}$ по сравнению с этим показателем для скорпены, где расхождение температурных показателей добавляемого субстрата и суспензии составляло $0,1889^\circ\text{C}$ (рис. 1, 2). В дополнение к вышеперечисленным фактам, процесс снижения температуры в ячейках с суспензией мог быть обусловлен или исчерпанием ресурса добавленной внеклеточной АТФ или блокировкой функциональной активности экто-АТФазы продуктами реакции. Факт того, что процесс снижения температуры в суспензии эритроцитов скорпены происходил в 2 с лишним раза более медленными темпами, чем у морской лисицы (рис. 1, 2), свидетельствует о том, что экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы и скорпены различаются по своим свойствам. Эти различия могут быть обусловлены разной активностью экто-АТФаз исследованных рыб, сродством их к субстрату, а также влиянием на

активность энзимом продуктов гидролитического распада АТФ и др. [16].

Общий перепад температуры в ячейке с суспензией эритроцитов скорпены был на $0,2470^\circ\text{C}$ больше, чем у морской лисицы. Больше была у скорпены и амплитуда повышения ΔT ($0,22^\circ\text{C}$) относительно исходного уровня (рис. 2). Несмотря на очевидную разницу в амплитуде температурного ответа на добавление АТФ к суспензиям эритроцитов хрящевых и костистых рыб, для приведения этих опытов к сопоставимым условиям, необходимо произвести перерасчет прироста ΔT скорпены с учетом особенностей объема проб и величиной гематокрита клеточной суспензии. Так, полученный прирост необходимо разделить на 2,5 и умножить на 1,67. Таким образом, скорректированное ΔT скорпены составило $(0,22^\circ\text{C} : 2,5) \times 1,67 = 0,147^\circ\text{C}$. Ввод поправок обусловлен разным объемом суспензий эритроцитов морской лисицы и скорпены ($5,0 \text{ мл} : 2,0 \text{ мл} = 2,5$) и, соответственно, разной их теплоемкостью, а также разностью по гематокриту ($50\% : 30\% = 1,67$). Поправочные коэффициенты рассчитаны на основании предположения о линейной зависимости теплопродукции от объема и гематокрита суспензии. Расчет теплопродукционной активности эритроцитов скорпены с поправочными коэффициентами показал ($0,147 : 0,08$) в 1,84 раза более высокое значение, чем у морской лисицы. Этот результат хорошо согласовался с кратностью по активности экто-фермента ($\text{нмоль } \Phi_n / \text{мин} / \text{мкл RBC}$) у эритроцитов исследованных рыб ($6,4 : 3,4 = 1,88$) и свидетельствовал в пользу корректности полученных экспериментальных данных. Более высокую начальную скорость нарастания температуры в суспензии эритроцитов скорпены ($12,4^\circ\text{C}/\text{ч}$) по сравнению с морской лисицей ($9,2^\circ\text{C}/\text{ч}$) также можно объяснить более высокой активностью экто-фермента в эритроцитах морского ерша.

Таким образом, эритроциты хрящевых рыб – морской лисицы и костистой скорпены – отличались по своей способности генерировать тепло. Эритроциты скорпены в настоящем опыте демонстрировали бóльшую теплопродукционную активность по расчетной амплитуде и по продолжительности генерации тепла. Возможно, бóльшая продолжительность функциональной активности экто-АТФазы эритроцитов скорпены также обусловлена меньшей чувствительностью фермента у этой рыбы к побочным продуктам гидролиза АТФ по сравнению с ферментом эритроцитов морской лисицы.

Полученные результаты подтверждают наши предположения и свидетельствуют в пользу гипотезы о важности ферментативного теплового гидролиза АТФ экто-АТФазой для функционирования эритроцитов морской лисицы и скорпены. Важно отметить, что после окончания эксперимента в ячейке с суспензией клеток, в результате

естественного осаждения эритроцитов, надосадочная жидкость была совершенно прозрачной без признаков гемолиза. Отсутствие гемолиза в ячейке на протяжении всего эксперимента может быть надежным критерием того, что тепловыделение происходит за счет экто-АТФаз, а не за счет работы внутриклеточных Na^+ -, K^+ - и Ca^{2+} -АТФаз.

Существует еще ряд фактов, которые свидетельствуют об участии экто-АТФаз в функционировании плазматической мембраны эритроцита и всего кровотока в целом.

Так, экспериментальным подтверждением возможного участия тепловой энергии гидролиза АТФ экто-АТФазами в изменении вязкоэластичных параметров их плазматических мембран явился факт, связанный с расхождением этих характеристик в цельных клетках и их «теньях» [24]. В «теньях» эритроцитов вязкость мембраны оказалась на 50% больше, чем в нативных клетках. Это свидетельствовало о том, что в нативных мембранах эритроцитов действовал фактор, способствующий снижению вязкости плазматической мембраны. Не менее интересным является отсутствие понимания физической природы 20-кратного падения вязкости крови в сосудах с диаметром меньше 300 мкм, названного эффектом Фареуса-Линдквиста [25]. Высокая теплопродукционная активность экто-АТФаз эритроцитов в микрососудах могла бы существенно продвинуть решение этого вопроса. И, наконец, нельзя пройти мимо факта наличия частичной «теплокровности» у рыб с высокой экто-АТФазной активностью их эритроцитов. Как показывают исследования последних лет, имеют более высокую температуру тела примерно 2–2,5 тысячи малоподвижных рыб, что составляет около 0,1% от общего количества ныне живущих видов [26]. Исследования на планктоноядных гигантских, малоподвижных акулах *Cetorhinus maximus* [27] показали, что температура тела этих рыб была на 1,0–1,5°C выше температуры среды. Причины и источники этого феномена авторами не были определены. Ими было выдвинуто предположение о том, что более высокая температура тела этих рыб связана с физиологией кровеносной системы, а не с работой мышц. Не менее интересен факт наличия «теплокровности» у красноперого Опаха (*Lampris guttatus*) [28]. У этой малоподвижной и живущей на большой глубине рыбы температурный перепад может составлять не менее 5°C. Авторы указывают на то, что эта рыба имеет теплую кровь, однако источником эндотермии они считают работу мышц грудных плавников. Как мы полагаем, такая разность температуры тела и окружающей среды может быть обусловлена наличием другого внутреннего источника эндотермии, на роль которого могла бы вполне претендовать экто-АТФаза эритроцитов рыб.

Заключение

Эволюция размерных характеристик эритроцитов и уровня гематокрита крови тесно связана с мощностью сердечной мышцы и ее способностью поддерживать такое кровяное давление, которое обеспечивает необходимый уровень транспорта кислорода к тканям и органам в соответствии с энергетическими потребностями организма. Крупные эритроциты у позвоночных, возможно, являются маркерами «слабого сердца», не способного создавать высокое кровяное давление. Рыбы – не исключение из этого правила. Крупные эритроциты обнаружены нами у тех видов рыб, которые характеризовались наличием слабого сердца, невысоким уровнем обмена и низкими показателями гематокрита (скаты, скорпена, звездочет). Напротив, у быстроплавающих активных костистых рыб (ставрида, смарида, налим) активность экто-АТФазы эритроцитов была низкой, как и размеры их эритроцитов. Полученные данные по размерам эритроцитов рыб и величине активности их экто-фермента положительно коррелировали между собой, что наводит на мысль о большей вовлеченности экто-АТФаз в регуляцию реологии кровотока. Капилляры являются самым труднопроходимым отделом кровотока, и крупные эритроциты, вероятно, нуждаются в механизмах, обеспечивающих облегченное преодоление этого отдела кровеносной системы. Мы полагаем, что экто-АТФазы плазматических мембран как раз и могут служить этим целям. Величина их активности пропорциональна размерным характеристикам эритроцитов рыб и составу плазматической мембраны этих клеток.

Хорошо известно, что крупные эритроциты легко преодолевают капилляры с меньшим диаметром, чем диаметр клеток. Выделение тепла за счет гидролиза АТФ на поверхности эритроцитов рыб может способствовать понижению вязкостных характеристик плазмы, плазматической мембраны и всего эритроцита в целом, что может значительно облегчить движение крупных эритроцитов в капиллярах.

Наличие теплопродукционной активности суспензий эритроцитов морской лисицы и скорпены является убедительным свидетельством использования тепловой энергии гидролиза АТФ эритроцитами рыб как для поддержания функционального состояния собственной плазматической мембраны, так и, возможно, для улучшения реологических характеристик в капиллярном отделе кровотока. Эти опыты демонстрируют факт, что в природе ничего не теряется бесследно. Тепло, как побочный продукт гидролитической активности поверхностных экто-АТФаз, используется позвоночными с ядерными эритроцитами гораздо шире, чем млекопитающими. У этих позвоночных экто-АТФазы являются не столько «выключателя-

ми» Р2ХУ-рецепторной активности, сколько, как показали наши исследования, регуляторами функции источника локальной генерации тепла на поверхности эритроцита и, тем самым, глубоко интегрированы в жизнедеятельность клетки и всего кровотока в целом.

Исследование выполнено в рамках темы НИР «Изучение фундаментальных характеристик морских гидробионтов, обеспечивающих их функцио-

нирование в экосистемах и служащих основой их рационального использования и сохранения» (регистрационный номер 124030100100-0). Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи. В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63 EU) и положении ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными (протокол № 75од от 06.06.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Венкстерн Т.В., Энгельгардт В.А. Поверхностно-локализованная аденозин-полифосфатаза ядерных эритроцитов. *Докл. Акад. наук СССР*. 1955;102(1):133–136.
2. Венкстерн Т.В., Энгельгардт В.А. Распространение экто-аденозилполифосфатазы и характеристика некоторых ее свойств. *Биохимия*. 1957;22(5):911–916.
3. Bencic D.C., Yates T.J., Ingermann R.L. Ecto – ATPase activity of vertebrate blood cells. *Physiol. Zool.* 1997;70(6):621–630.
4. González-Alonso J., Olsen D. B., Saltin B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery. Role of circulating ATP. *Circ. Res.* 2002;91(11):1046–1055.
5. Jensen F.B., Agnisola C., Novak I. ATP release and extracellular nucleotidase activity in erythrocytes and coronary circulation of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2009;152(3):351–356.
6. Пищенко Е.В. *Гематология пресноводных рыб*. Новосибирск: Новосиб. Гос. Аграр. Ун-т; 2002. 48 с.
7. Girish V., Vijavalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/Image. *Indian J. Cancer*. 2004;41(1):41–47.
8. Acharya G., Mohanty P.K., Comparative cetomorphometry of red blood cells of some fishes. *African J. Biol. Sci.* 2019;1(1):23–32
9. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Савина Г.В. Сравнительная характеристика свойств Na^+ , K^+ - АТФазы эритроцитов человека и карпа *Cyprinus carpio*. *Ж. эвол. биохим. физиол.* 1984;20(2):167–173.
10. Казеннов А.М., Маслова М.Н. Особенности активации детергентами Na, К-аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных. *Ж. эвол. биохим. физиол.* 1980;16(5):430–436.
11. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 1956;28(11):1756–1758.
12. Stolbov A.Y., Mishurov V.G., Shadrin N.V. The macrocalorimetric method in hydrobiology: description of the pilot device. *Mar. Ecol.* 2009;77(3):94–96.
13. Mann T. Studies on the metabolism of semen. *Biochem. J.* 1945;39(5):451–458.
14. Rothstein A., Meier R. The relationship of the cell surface to metabolism I Phosphatases in the cell surface of living yeast cells. *J. Comp. Cell. Physiol.* 1948; 32(1) :77–95.
15. Sprague R.S., Stephenson A.H., Ellsworth M.L. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* 2007;18(9):350–355.
16. Силкин Ю.А., Силкина Е.Н., Силкин М.Ю. Влияние солей азида фторида, ортованадата и ЭДТА натрия на экто-АТФазную активность эритроцитов скорпены (*Scorpaena porcus* L.) и морской лисицы (*Raja clavata* L.). *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2021;57(5):380–391.
17. Glomski C.A., Tamburlin J., Hard R., Chatnani M. The phylogenetic odyssey of erythrocyte IV. *The amphibians. Hystol. Hystopathol.* 1997;12(1):147–170.
18. Лисничая Е.Н., Ефимов В.Г. Особенности исследования морфологического состава крови рептилий. *Научно-технічний бюллетень НОЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*. 2014;2(1):1–13.
19. Zimmermann H., Zebisch M., Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* 2012;8(3):437–502.
20. Yegutkin G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2014;49(6):473–497.
21. Кребс Е.М. *Липиды клеточных мембран*. Л.: Наука. 1981. 339 с.
22. Забеленский С.А., Чеботарева М.А., Шуколюкова Е.П., Никитина Е.Р., Кривченко А.И. Жирнокислотный состав фосфолипидов эритроцитов крысы при стрессе (длительное плавание). *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2019;55(1):37–42.
23. Wan J., Ristenpart W. D., Stone H.A. Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(43):16432–16437.
24. Aloni B., Shinitzky M., Livne A. Dynamics of erythrocyte lipids in intact cells, in ghost membranes and in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1974;348(3):438–441.
25. Katiukhin L. N. About of mechanism of the Fahraeus-Lindquist-effec. *J. Blood Disorders Transf.* 2014;5(5):211–213.
26. Dickson K.A., Crahan J. B. Evolution consequences of endothermy in fishes. *Physiol. Biochem. Zool.* 2004;77(6):998–1018.
27. Dolton H.R., Jackson A.L., Deavill R., Hall J., Hall G., McManus G., Perkins M.W., Rolfe R.A., Snelling E.P., Houghton J.D.R., Sims D.W., Payne N.L. Regionally endothermic traits in planktivorous basking sharks *Cetorhinus maximus*. *Endang. Species Res.* 2023;51(2): 227–232.
28. Wegner N.C., Snodgrass O.E., Dewar H., Hyde J.R. Whole-body endothermy in a mesopelagic fish, the opah, *Lampris guttatus*. *Science*. 2015;348(6236):786–789.

Поступила в редакцию 02.12.2024

После доработки 02.06.2025

Принята в печать 19.06.2025

RESEARCH ARTICLE

Ecto-ATPases, morphometry and heat production activity of erythrocytes of cartilaginous and teleost fishes of the Black Sea

Yu.A. Silkin^{1*} , M.Yu. Silkin¹ , E.N. Silkina¹ , S.O. Omelchenko² 

¹ Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences – Branch of the Federal Research Center, Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Nauki st., 24, Kurortnoye settlement, Feodosia, 298188, Russia;

² Vernadsky Crimean Federal University, pr. Vernadskogo, 4, Simferopol, 295007, Russia

*e-mail: ysilkin@mail.ru

The activity of ecto-ATPase and the size characteristics of erythrocytes in two species of cartilaginous and ten species of bony fishes, as well as the heat-production activity of the erythrocyte suspension in *Scorpaena porcus* and *Raja clavata* were studied. It was shown that the activity of ecto-ATPase of red blood cells (RBC) between cartilaginous fishes differs by 1.5 times and is 3.1 nmol Fn/min/ μ l RBC in *Raja clavata*, and 2.1 nmol Fn/min/ μ l RBC in *Dasyatis pastinaca*. Erythrocytes of teleost fish are characterized by a more significant variability of ecto-ATPase activity, which differed between its extreme values by more than 60 times (in *Scorpaena porcus* it was 6.4 nmol Fn/min/ μ l RBC, in *Spicara flexuosa* and some other species – 0.1 nmol Fn/min/ μ l RBC). When comparing the size characteristics of erythrocytes and the values of ecto-ATPase activity, a direct relationship was shown between these indicators. A study of heat production in suspensions of thresher and scorpionfish erythrocytes showed that adding ATP to a suspension of isolated cells (1 mg/ml) significantly increased the temperature in the experimental cell. The erythrocytes of the thresher and scorpionfish demonstrated different heat generation dynamics. Thus, ΔT generated by stingray erythrocytes was almost two times lower than in scorpionfish erythrocytes. The total duration of the heat generation process to the maximum ΔT in the thresher erythrocyte suspension was almost four times shorter than in the thresher. However, the process of temperature reduction in the thresher erythrocyte suspension occurred more than two times slower than in the thresher. The results obtained showed that ecto-ATPases of fish erythrocytes apparently function as a source of local heat generation on the erythrocyte surface and, thus, can be deeply integrated into the functioning of the cell membrane and the entire blood flow as a whole.

Keywords: fish, temperature, erythrocytes, cytomorphometry, ATP, heat production, ecto-ATPase

Funding: The study was carried out within the framework of the research topic “Study of the fundamental characteristics of marine hydrobionts that ensure their functioning in ecosystems and serve as the basis for their rational use and conservation” (No. 124030100100-0).

Сведения об авторах

Силкин Юрий Александрович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторией биохимии и физиологии гидробионтов Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел: 8-978-917-60-29; e-mail: ysilkin@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1916-8327>

Силкин Михаил Юрьевич – канд. физ-мат. наук, ст. науч. сотр., лаборатории биохимии и физиологии гидробионтов Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел: 8-978-917-60-29; e-mail: my.silkin@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7499-0375>

Силкина Елизавета Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатории биохимии и физиологии гидробионтов Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел: 8-978-917-60-29; e-mail: pater3@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2059-1015>

Омельченко Светлана Олеговна – канд. биол. наук, доц. кафедры общей биологии и генетики Института биохимических технологий, экологии и фармации, Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Тел.: 8-978-917-60-29; e-mail: svet.omelchenko@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8539-6487>