

УДК 577.151:597.2/.5(262.5)

## ЭКТО-АТФаза ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЕЕ АКТИВНОСТЬ

© 2025 г. Ю. А. Силкин\* (ORCID: 0000-0002-1916-8327),  
Е. Н. Силкина (ORCID: 0000-0003-2059-1015),  
М. Ю. Силкин (ORCID: 0000-0001-7499-0375)

Карадагская научная станция им. Т. И. Вяземского ФИЦ ИнБЮМ,  
Феодосия, 298187 Россия  
\*e-mail: ysilkin@mail.ru

Поступила в редакцию 08.05.2024 г.

После доработки 18.10.2024 г.

Принята к публикации 27.11.2024 г.

Исследовали влияние размеров эритроцитов, а также белково-липидного, фосфолипидного и жирнокислотного составов плазматических мембран на активность мембранной экто-АТФазы у двух хрящевых (*Raja clavata*, *Dasyatis pastinaca*) и восьми видов костистых (*Scorpaena porcus*, *Uranoscopus scaber*, *Symphodus tinca*, *Diplodus annularis*, *Neogobius melanostomus*, *Spicara flexuosum*, *Trachurus mediterraneus*, *Gaidropsarus mediterraneus*) черноморских рыб. Показана связь высокой активности экто-АТФазы с размерами эритроцитов как у хрящевых, так и у костистых видов рыб. Найдено более высокое относительное содержание белка в мембранах черноморских скатов, что, вероятно, отражает эволюционный тренд уменьшения доли белковой компоненты и роста липидов у костистых рыб. Установлено, что эритроциты рыб с высоким содержанием белка в мембране обладали более высокой активностью экто-фермента. Фосфолипиды плазматических мембран эритроцитов рыб представлены пятью семействами — фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, монофосфоинозитид и сфингомиелин. Высокое содержание фосфолипидов и, в частности, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в плазматических мембранах эритроцитов рыб является базисом в формировании их бислойного матрикса. Плазматические мембраны, имеющие более высокое содержание насыщенных жирных кислот, обладали более высокой активностью экто-АТФазы, что указывало на важную роль фермента в физиологии мембраны клетки и всего кровотока в целом.

**Ключевые слова:** размеры, белково-липидный состав, фосфолипидный состав, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, экто-АТФаза, мембраны, эритроциты, рыбы

DOI: 10.31857/S0134347525020026, EDN: GBUXPO

Наиболее важным фактором внешнего воздействия на рыб является температура воды. В прибрежной зоне Черного моря температура воды в зимние месяцы понижается до 3.0–5.0°C, а на большем удалении от Карадагского побережья — до 7.0°C. Вертикальное распределение температуры показывает, что самыми холодными в течение всего года являются глубины от 30 до 150 м (место зимовки рыб), где температура не превышает 7.5–8.5°C (Куклев и др.,

2019). В летние месяцы на глубине от 17 до 30 м наблюдается термоклин с конечной температурой не выше 8.0–9.0°C (Трошенко, Субботин, 2018). Эти данные свидетельствуют о том, что прибрежные донные и пелагические виды черноморских рыб подавляющую часть своей жизни проводят в условиях низких температур. Все это влияет на метаболизм рыб и определяет уникальность их системы кровообращения, которая, используя особые свойства эритроцитов,

плазмы и других форменных элементов, способна быстро и адекватно реагировать на внешние воздействия.

Способность эритроцитов рыб и других позвоночных животных расщеплять внеклеточную АТФ с выделением тепла обусловлена наличием на поверхности клеток экто-АТФазы, функциональная роль которой до настоящего времени неизвестна и является предметом споров и активных дискуссий (Силкин и др., 2017; Jensen et al., 2009). Экто-фермент, открытый почти 70 лет тому назад на эритроцитах ряда холоднокровных позвоночных (Венкстерн, Энгельгардт, 1957), поражает необычайно широкой вариабельностью величины активности. Колебания активности фермента могут составлять шесть порядков (Bencic et al., 1997), что свидетельствует о его важной роли в функционировании ядерных эритроцитов позвоночных. Однако до сих пор не выявлены причины колебания активности фермента. Скорее всего, это связано с отсутствием понимания физиологической роли экто-АТФазы в функционировании плазматической мембраны эритроцитов.

Ранее было показано, что четко прослеживается зависимость между высокой удельной активностью фермента и размерными характеристиками ядерных эритроцитов позвоночных (Bencic et al., 1997). Величина активности фермента у крупных клеток рыб, земноводных, рептилий и птиц иногда на порядки превышала его активность у более мелких эритроцитов.

Экто-АТФаза является интегральным белком плазматической мембраны и ее активность зависит от липидного окружения (Grinthal, Guidotti, 2006). Этот фермент до сих пор не выделен из эритроцитарной мембраны в чистом виде в связи с зависимостью активности экто-АТФазы от состояния белково-липидного состава мембран. Солюбилизация мембраны при помощи детергентов приводила к тому, что фермент почти полностью терял свою активность (Wang et al., 1998). Ядерные эритроциты позвоночных (черепахи, змеи) имели в 50 раз большие значения модуля упругости, чем безъядерные эритроциты млекопитающих (человек, опоссум) (Ивенс, Скейлак, 1982). Мы предположили, что высокая удельная активность экто-АТФазы ядерных эритроцитов у некоторых видов позвоночных и их теплопродукционная активность могли быть компенсацией особенностей

состава и структуры мембраны клетки. В основе “жесткости” плазматической мембраны эритроцитов позвоночных лежит ее белковый, фосфолипидный и жирнокислотный составы. Проверку этого и других предположений мы постарались провести в ходе исследований при изучении состава мембран эритроцитов разных рыб. Ранее было показано, что снижение холестерина в плазматических мембранах клеток почки мышей и собак снижало ферментативную активность экто-АТФазы (Papanikolaou et al., 2005). Эти результаты позволили предположить, что экто-АТФаза локализована в липидных доменах мембран, которые обогащены холестерином. После этого стало понятно, что насыщенные липиды играют важную роль в формировании высокой активности фермента.

Таким образом, в задачи исследования входило выяснение связи активности экто-АТФазы с морфометрическими характеристиками эритроцитов, с белковым, фосфолипидным и жирнокислотным составом их плазматических мембран у некоторых хрящевых и костистых видов черноморских рыб.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования были эритроциты двух видов хрящевых и восьми видов костистых черноморских рыб. *Хрящевые виды* рыб (скаты): морская лисица *Raja clavata* Linnaeus, 1758 и морской кот *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758). Костистые виды рыб: скорпена *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758), звездочет *Uranoscopus scaber* (Linnaeus, 1758), зеленушка *Symphodus tinca* (Linnaeus, 1758), ласкирь *Diplodus annularis* (Linnaeus, 1758), бычок кругляк *Neogobius melano-stomus* (Pallas, 1814), смарида *Spicara flexuosum* Rafinesque, 1810, ставрида *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) и налим *Gaidropsarus mediterraneus* (Linnaeus, 1758).

В процессе проведения исследований видовой состав рыб варьировал и в каждом разделе мы указывали, от каких рыб были взяты эритроциты для тех или иных экспериментов.

Рыб отлавливали в районе восточного побережья Крымского полуострова (горный массив Карадаг) с помощью ставного невода и доставляли в лабораторию в пластиковых баках с аэрацией. Отлов рыб осуществляли в период

осеннего нагула при температуре, мало отличающейся от температуры содержания их в неволе. Транспортировка длилась 30–40 мин. После отлова хрящевых рыб рассаживали в бассейны объемом 1000 л, костистых рыб – в аквариумы емкостью 300 л. В бассейнах и аквариумах осуществляли аэрацию и поддерживали температуру 10–12°C для холодолюбивых и 14–17°C для теплолюбивых видов. Акклимация рыб после отлова длилась в течение двух–четырех суток без кормления.

#### Получение эритроцитов

Забор крови у хрящевых видов рыб осуществляли путем пункции желудочка сердца инъекционной иглой. От одной особи можно было получить до 10–15 мл крови. Этого количества хватало для проведения всех опытов. У костистых видов кровь получали путем пункции хвостовой вены. От одной рыбы можно было получить от 0.5 до 1.0 мл крови, поэтому для проведения опытов кровь отбирали у 5–15 особей. Все исследования проводили в день забора крови, если эксперименты не требовали большего времени.

Полученную кровь переносили в охлажденный физиологический раствор в соотношении 1:10 для отмывания эритроцитов от плазмы. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (50 ед./мл крови) (“Спофа”, Чехия). Эритроциты отмывали от плазмы дважды, после чего центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об./мин на центрифуге К-23 (Германия) в десятикратном объеме изотоничного раствора следующего состава (ммоль/л): для хрящевых видов – 220 NaCl, 400 мочевины, 10 Трис-НСl-буфера, (рН 7.3–7.4); для костистых – 180 NaCl, 10 Трис-НСl-буфера, (рН 7.3–7.4). Гематокрит суспензий эритроцитов определяли с помощью гематокритной центрифуги TL-11 (Германия).

#### Определение размерных характеристик эритроцитов

Для морфологического анализа эритроцитов делали мазки крови, высушивали их на воздухе, фиксировали этиловым спиртом и окрашивали краской Романовского–Гимза (Золотницкая, 1987, Пищенко, 2002). На каждом мазке окуляр-микрометром светооптического микроскопа “Биолар” (Польша), оборудованного камерой

Olympus C-7070, фотографировали эритроциты рыб. По полученным фотографиям клеток определяли линейные размеры эритроцитов и их ядер с помощью компьютерной программы ImageJ 1.44р (Girish, Vijavalakshmi, 2004). Площадь эритроцитов рыб рассчитывали по формуле:

$$S = \pi LD/2 \times SD/2,$$

где  $S$  – площадь эритроцита (мкм<sup>2</sup>),  $\pi$  – число пи;  $LD$  – большая ось клетки,  $SD$  – малая ось клетки (Acharya, Mohanty, 2019).

#### Получение препаратов плазматических мембран эритроцитов для изучения их белково-липидного состава

Исследование фосфолипидного состава и состава жирных кислот основных семейств фосфолипидов (ФЛ) плазматических мембран эритроцитов проводили на двух видах черноморских скатов: морская лисица *Raja clavata* и морской кот *Dasyatis pastinaca*, а также трех видах костистых рыб: скорпена *Scorpaena porcus*, смарида *Spicara flexuosum*, ставрида *Trachurus mediterraneus*.

Для того чтобы отделить ядра клеток, отмытые от плазмы эритроциты помещали в 1.375 моль/л ( $\rho = 1.176$ ) раствора сахарозы + 50 мМ трис – НСl буфер (рН = 7.4) в соотношении 1:3. Это вызывало обезвоживание эритроцитов, их трижды замораживали при –17°C и оттаивали при комнатной температуре для того, чтобы вызвать нарушение целостности мембраны (Мосягин и др., 2010). После этого смесь центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об./мин на центрифуге К-23 (Германия) и отделяли фракцию ядер от теней эритроцитов. Тени эритроцитов осаждали при 15000 об./мин на центрифуге К-24 (Германия). Осадок теней являлся препаратом плазматических мембран эритроцитов рыб.

Одну часть полученных плазматических мембран использовали для определения концентрации белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951) в модификации Питерсона (Peterson, 1977) и выражали ее в мг белка/мл препарата. Другую часть препарата мембран помещали в хлороформ-метанольную смесь (2:1) и в таком виде хранили до проведения определения фосфолипидного и жирнокислотного составов. Экстракцию

липидов проводили по методу Фолча (Folch, 1957). Количество общих липидов в пробах определяли взвешиванием высушенных в вакууме до постоянной массы аликвот экстракта. Содержание липидов определяли по фосфору (Fiske, Subbarow, 1925) и выражали в процентах к суммарному количеству липидов в экстракте или к каждой фракции фосфолипида. Для разделения фосфолипидов на отдельные фракции использовали двухмерную тонкослойную хроматографию на силикагеле КСК в следующих системах растворителей — хлороформ : метанол : 28% аммиак (81.2:31.2:6.0) и хлороформ : метанол : ацетон : уксусная кислота : вода (62.0:12.5:25.0:12.5:6.25) (Rouser et al., 1966). Метилловые эфиры жирных кислот получали щелочным трансметилированием 0.21 М NaOH на абсолютном метаноле (Foote et al., 1965). Анализ метиловых эфиров проводили на газожидкостном хроматографе (Pye-104, Англия), на хромосорбе W при 194°C. Содержание отдельных жирных кислот оценивали по площади пика. Результаты выражали в процентах от всех жирных кислот пробы. Идентификацию жирных кислот проводили сравнением относительных времен удержания проб и стандартов. Индекс двойных связей определяли по формуле:

$$\text{ИДС} = \sum \text{Моноеновые} + 2 * \text{Диеновые} + \\ + 3 * \text{Триеновые} + 4 * \text{Тетраеновые} + \\ + 5 * \text{Пентаеновые} + 6 * \text{Гексаеновые} / 100,$$

2\*–6\* — количество двойных связей в составе жирных кислот, коэффициент ненасыщенности (КН) =  $\sum$  ненасыщенных кислот /  $\sum$  насыщенных кислот.

#### *Определение активности экто-АТФазы эритроцитов*

Для определения активности экто-АТФазы в эритроцитах и препаратах мембран использовали методику А. Казеннова с соавторами (1984). Инкубационная среда для определения активности экто-АТФазы эритроцитов ската содержала в конечной концентрации (мМ) следующие ингредиенты: 400 мочевины, 135 NaCl, 5 KCl, 6 MgCl<sub>2</sub>, 1 ЭДТА, 50 Трис-НCl, pH 7.4; для эритроцитов костистых видов — 125 NaCl, 5 KCl, 6 MgCl<sub>2</sub>, 1 ЭДТА, 50 Трис-НCl, pH 7.4. В инкубационных пробирках смешивали 0.1 мл

инкубационной среды, 0.1 мл H<sub>2</sub>O, 0.1 мл раствора АТФ-Na<sub>2</sub>, концентрация которой в разных экспериментах варьировала от 0.05 до 2.0 мМ (0.5 мМ в стандартных условиях). Реакцию запускали добавлением 0.1 мл суспензии эритроцитов или препарата мембран. Температура инкубации в стандартных условиях и при определении кинетических констант составляла 15°C (в отдельных опытах 5°C и 25°C). Реакцию останавливали добавлением 0.2 мл 20%-й трихлоруксусной кислоты. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об./мин. В надосадочной жидкости по модифицированному А. Казенновым и М. Масловой (1980) методу Чена (Chen et al., 1956) было определено содержание неорганического фосфата, по накоплению которого судили об активности фермента. При определении содержания  $\Phi_n$  в пробе в качестве восстановителя фосфорномолибденовой кислоты, помимо аскорбиновой кислоты, использовали хлористое олово (SnCl<sub>2</sub>). К 0.9 мл H<sub>2</sub>O приливали 0.1 мл супернатанта, смешивали с 0.8 мл реактива "А" [10 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O + 5% раствор (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O в соотношении 1:2:1] и через 1–2 мин при непрерывном помешивании добавляли 0.2 мл реактива "В" [0.2% раствор аскорбиновой кислоты в 0.2% растворе SnCl<sub>2</sub>, приготовленном непосредственно перед определением из 24% раствора SnCl<sub>2</sub> в концентрированной HCl]. Через 15 мин инкубации при комнатной температуре интенсивность развившейся окраски молибденового синего оценивали на спектрофотометре Specol 11 (Германия) по поглощению света при 720 нм. Калибровочный график показал прямолинейную зависимость экстинкций от содержания в пробе от 10 до 100 нмоль  $\Phi_n$ . Активность экто-АТФазы рыб выражали в нмоль  $\Phi_n$ /мин/мкл упакованных клеток.

Данные подвергали статистической обработке и представляли как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение. Достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента при уровне значимости  $p \leq 0.05$ . Для определения нормальности распределения сравниваемых групп использовали критерий Колмогорова—Смирнова, корреляцию между выборками рассчитывали в модуле Statistics программы OriginPro.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Крупные эритроциты у ряда исследованных хрящевых и костистых видов рыб (морская лишица, морской кот, скорпена, звездочет) имели более высокую экто-АТФазную активность по сравнению с мелкими клетками других рыб (ставрида, налим, ласкирь, бычок, смарида). Это хорошо видно при сравнении площадей эритроцитов рыб, в расчет которых входят размеры большой и малой осей клеток (табл. 1).

Результаты активности экто-АТФазы эритроцитов у хрящевых рыб были достаточно близки, тогда как максимальный разброс активности фермента у костистых рыб составлял почти два порядка, а точнее, более чем шестидесятикратную величину (табл. 1).

Оценка белково-липидного состава плазматической мембраны эритроцитов некоторых черноморских хрящевых и костистых видов рыб представлена в табл. 2. Содержание общего белка в мембранах скатов составляло 9.4–9.6 мг/мл, в мембранах костистых рыб было меньше и колебалось в диапазоне 7.0–8.0 мг/мл. По содержанию общих липидов у хрящевых и костистых видов рыб наблюдали обратную тенденцию. В препаратах костистых видов содержание общих липидов было в 1.6–1.9 раза выше, чем у хрящевых. Содержание фосфолипидов в препаратах костистых рыб в 1.8–2.9 раза

превышало их содержание у скатов (табл. 2). Относительное содержание белка в препаратах скатов составляло 61.0–65.0%, а липидная фракция — 35.0–39.0%. Липидов у костистых рыб было больше (47.0–56.0%), а белков меньше (44.0–53.0%), чем у исследованных хрящевых видов. Белок/липидное отношение (Б/Л) более наглядно отражает наметившуюся тенденцию более высокого содержания белкового компонента в мембране эритроцитов хрящевых рыб по сравнению с костистыми видами прибрежного ихтиоценоза (табл. 2). Тем не менее, активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены оказалась в 2–3 раза выше активности фермента в эритроцитах скатов (табл. 1). Видимо эти различия связаны не только с валовым содержанием белков и липидов.

Мы попытались более детально исследовать фосфолипидный состав липидной фракции плазматической мембраны эритроцитов исследованных рыб (табл. 3). Основные фосфолипиды плазматических мембран эритроцитов рыб представлены пятью семействами — фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилсерин (ФС), монофосфоинозитид (МФИ), сфингомиелин (СФМ). Фосфатидная кислота и ряд других фосфолипидов присутствовали в незначительных количествах (0.1–0.8%) и поэтому не были включены в таблицу.

**Таблица 1.** Размеры эритроцитов и активность экто-АТФазы некоторых черноморских рыб

Вид	Размеры клеток (мкм)		Площадь поверхности эритроцита ( $S_{\text{мкм}}^2$ )	Активность экто-АТФазы (нмоль Фн/мин/мкл RBC)
	Большая ось	Малая ось		
Хрящевые				
<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)
Костистые				
<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>Neogobius melanostomus</i>	10.1±0.9	7.6±0.7	57.9±6.3	0.11±0.01 (5)
<i>Spicara flexuosum</i>	9.5±0.1	6.7±0.1	50.0±4.9	0.09±0.03 (6)
<i>Trachurus mediterraneus</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±0.03 (5)

Примечание. В скобках — количество повторных опытов; линейные значения размеров эритроцитов получены от 100 промеров; коэффициент корреляции между совокупностью значений площади эритроцитов костистых рыб и активностью их экто-АТФазы составил  $0.8261 \pm 0.2301$  с достоверностью  $p \leq 0.05$ .

**Таблица 2.** Содержание белка, липидов и фосфолипидов в плазматических мембранах эритроцитов некоторых черноморских рыб

Вид	Общий белок (мг/мл препарата)	Общие липиды (мг/мл препарата)	Фосфолипиды (мг/мг белка)	Относительное содержание белка и липидов (% от суммы)		
				Белок (Б)	Липиды (Л)	Б/Л
<i>Dasyatis pastinaca</i>	9.4±0.3 (n = 9)	0.550±0.023 (n = 9)	0.285±0.025 (n = 9)	61	39	1.6
<i>Raja clavata</i>	9.6±0.2 (n = 12)	0.531±0.037 (n = 12)	0.265±0.031 (n = 12)	65	35	1.9
<i>Scorpaena porcus</i>	8.0±0.1 (n = 9)	0.887±0.034* (n = 9)	0.500±0.046* (n = 9)	53	47	1.1
<i>Spicara flexuosum</i>	7.2±0.2* (n = 9)	0.966±0.026 * (n = 9)	0.715±0.037* (n = 9)	48	52	0.9
<i>Trachurus mediterraneus</i>	7.0±0.1* (n = 11)	0.998±0.029* (n = 11)	0.764±0.042* (n = 11)	44	56	0.8

\*Достоверность различий между значениями костистых и хрящевых видов рыб ( $p < 0.05$ ).

Примечание. n — количество повторных опытов.

**Таблица 3.** Фосфолипидный состав плазматических мембран эритроцитов некоторых черноморских рыб

Вид	Относительное содержание фосфолипидов (% от суммы)									
	ФХ			ФЭА				ФС	МФИ	СФМ
	П	Д	сумма	П	Д	сумма	П/Д			
<i>Raja clavata</i>	1.2±0.3	49.5±2.5	50.7±2.8	13.6±1.4	17.7±0.9	31.3±2.3	0.8	6.1±0.7	5.7±0.6	4.6±0.4
<i>Dasyatis pastinaca</i>	1.8±0.4	37.0±1.8	38.8±2.2	15.8±1.6	14.3±1.4	30.1±3.0	1.1	6.2±0.8	8.5±1.0	12.1±1.1
<i>Scorpaena porcus</i>	0.8±0.2	50.3±2.5	51.1±2.7	1.8±0.1	24.2±1.2	26.0±1.3	0.07	13.1±1.8	4.3±0.5	4.3±0.5
<i>Trachurus mediterraneus</i>	1.0±0.2	60.6±3.0	61.6±3.2	1.2±0.2	19.1±0.9	20.3±1.1	0.06	8.9±0.9	2.7±0.5	6.2±0.7
<i>Spicara flexuosum</i>	2.1±0.4	58.0±2.9	60.1±3.3	3.8±0.6	16.6±0.8	20.4±1.4	0.2	8.7±1.1	6.6±1.0	3.0±0.4

Примечание. ФХ — фосфатидилхолин, ФЭА — фосфатидилэтанолламин, ФС — фосфатидилсерин, МФИ — монофосфоинозитид, СФМ — сфингомиелин, П — плазмалогенная и Д — диацильная формы ФХ и ФЭА; П/Д — отношение плазмалогенной формы ФЭА к диацильной.

Доля ФХ — основного структурообразующего мембранного компонента эритроцитов рыб в мембранах морской лисицы составила 50.7%, а морского кота — 38.8% от всех фосфолипидов (табл. 3). У скорпены доля ФХ была равна его содержанию в мембранах морской лисицы (51.1%), тогда как у ставриды и смариды содержание ФХ было выше и составляло 61.6 и 60.1% соответственно.

Сумма ФХ и ФЭА в мембранах эритроцитов рыб была доминирующей. Их суммарное содержание варьировало у хрящевых рыб от 69

до 82%, а у костистых видов — от 77.0 до 81.0%. В эритроцитарной мембране эти фосфолипиды присутствовали как в диацильной (Д), так и в плазмалогенной форме (П). У всех рыб в мембране эритроцитов плазмалогенная форма ФХ относительно его диацильной формы составляла от 1.3 до 4.8%, поэтому ФХ представлен в основном диацильной формой. Фосфолипид ФЭА у хрящевых видов также присутствовал в двух формах, причем они находились почти в паритетных отношениях (П/Д = 0.8–1.1). В мембранах эритроцитов костистых видов ФЭА присутствовал в основном в диацильной

форме, поэтому отношение П/Д у этой группы рыб было очень низким и составляло 0.06–0.2 (табл. 3). ФХ и ФЭА у теплолюбивого представителя хрящевых видов (морской кот) находились примерно в равных отношениях, в то время как у холодолюбивого вида (морская лисица) и у костистых рыб ФХ > ФЭА. У костистых видов отношение ФХ к ФЭА  $\geq 2.0$ .

Фосфолипиды с повышенной кислотностью (ФС и МФИ), имеющие отрицательный заряд, относятся к минорным компонентам плазматических мембран эритроцитов исследованных рыб. Относительное содержание ФС было больше в мембранах костистых, чем хрящевых видов, в отношении МФИ прослеживалась обратная тенденция. Небольшой отрицательный заряд при нейтральном рН несет и ФЭА, поэтому общий заряд липидной составляющей этих мембран отрицательный.

СФМ также может быть отнесен к минорным компонентам мембран эритроцитов рыб.

В эритроцитах морского кота его содержание составляло 12.1%, тогда как у остальных исследованных рыб колебалось в пределах 3.0–6.2%.

Исследования фосфолипидного состава не выявили различий, способных объяснить колебания активности экто-АТФазы в эритроцитах рыб. Необходимо было исследовать суммы насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в плазматической мембране (табл. 4).

У хрящевых видов, суммы моно-, ди-, тетра- и пентаеновых кислот практически совпадали (51.1% — у морского кота и 51.7% — у морской лисицы). Основное отличие заключалось в содержании гексаеновых кислот в мембранах: в эритроцитах морского кота оно было почти в 3 раза выше, чем в эритроцитах морской лисицы. Гексаеновые кислоты представлены в ФЛ рыб докозагексаеновой кислотой. Высокое содержание докозагексаеновой кислоты у морского кота обеспечивает этому виду самые высокие ИДС и КН (табл. 4). Для всех

**Таблица 4.** Содержание насыщенных и ненасыщенных фосфолипидов в плазматических мембранах эритроцитов некоторых черноморских рыб (% от суммы жирных кислот), индекс двойных связей (ИДС), коэффициент ненасыщенности (КН) и активность экто-АТФазы

Жирные кислоты	Хрящевые рыбы		Костистые рыбы		
	<i>Dasyatis pastinaca</i>	<i>Raja clavata</i>	<i>Scorpaena porcus</i>	<i>Spicara flexuosum</i>	<i>Trachurus mediterraneus</i>
Насыщенные	35.1	43.7	54.8	41.7	49.0
C <sub>12:0</sub>	0.4	—	—	—	—
C <sub>14:0</sub>	0.3	1.5	4.0	9.5	1.4
C <sub>15:0</sub>	—	—	1.2	2.4	0.4
C <sub>16:0</sub>	15.3	33.2	21.5	20.3	34.8
C <sub>17:0</sub>	3.1	—	—	—	—
C <sub>18:0</sub>	16.0	9.0	28.1	9.5	12.4
Ненасыщенные	64.9	56.3	45.2	58.3	51.0
Моноеновые	20.1	19.5	17.4	21.2	29.8
Диеновые	1.7	2.9	3.7	1.6	—
Триеновые	—	—	0.4	1.6	2.8
Тетраеновые	19.2	21.9	10.4	12.7	4.1
Пентаеновые	10.1	7.4	5.0	10.6	4.8
Гексаеновые	13.8	4.6	8.3	10.6	9.5
ИДС	2.3	1.8	1.4	2.0	1.4
КН	1.9	1.3	0.8	1.4	1.0
Удельная активность экто-АТФазы эритроцитов рыб (нмоль Ф <sub>н</sub> /мин/мкл эритроцитов)	2.1±0.1 (n = 9)	3.4±0.1 (n = 9)	6.4±0.2 (n = 17)	0.1±0.01 (n = 10)	0.17±0.02 (n = 14)

исследованных рыб (за исключением ставриды) характерно большое содержание моноеновых и тетраеновых кислот в составе суммарных ФЛ мембран эритроцитов. Распределение остальных ЖК у рыб носит видоспецифичный характер и не имеет каких-либо закономерностей. У костистых видов содержание докозагексаеновой кислоты было примерно одинаковым. Однако сумма ненасыщенных кислот была самой низкой у скорпены (45.2%), более высокой у ставриды (51.0%) и самой высокой у смариды (58.3%). Плазматические мембраны эритроцитов смариды по составу ненасыщенных ЖК были сходны с мембранами морского кота. В соответствии с этим распределились ИДС и КН, хотя ИДС у ставриды за счет низкого содержания тетраеновых кислот оказался равным таковому у скорпены.

У рыб с высокой экто-АТФазной активностью величина фосфолипидов плазматических мембран эритроцитов имела отрицательную взаимосвязь с коэффициентом соотношения ФХ + СФМ/ ФЭА + ФС. У рыб с высокой экто-АТФазной активностью это соотношение имело относительно низкие значения: у морской лисицы 1.48, у морского кота 1.40, у скорпены 1.42. У рыб с низкой активностью экто-АТФазы этот коэффициент был выше и составлял у ставриды 2.32, а у смариды 2.17.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Эритроциты рыб и других позвоночных животных, за исключением млекопитающих, имеют ядро и представляют по форме уплощенные, двояковыпуклые, эллипсоидные клетки. Ввиду того, что эритроциты существуют как отдельные клетки жидкой ткани, их внешняя морфология и внутренняя структура поддерживается независимо от контакта с другими клетками, их мембрана и цитоскелет сформированы наиболее полным образом (Cohen, 1991). Уплощенная форма имеет ряд преимуществ для ускорения скорости газообмена за счет уменьшения диффузионных расстояний, а эллипсоид, что еще более важно, ориентирует клетку в потоке таким образом, что уменьшает общую вязкость крови (Fischer et al., 1998). Эллиптичность уменьшает также эффективный диаметр клетки, что существенным образом облегчает прохождение эритроцитами капиллярного отдела

кровенотока. Тем не менее, ядросодержащие эритроциты проявляют меньшую деформируемость по сравнению с безъядерными эритроцитами млекопитающих. Мембрана эритроцитов млекопитающих более эластична и может легче деформироваться в потоке, подстраиваясь под ход его течения, повышая стабильность и, в итоге, снижая вязкостные характеристики крови. По образному выражению Фишера (Fischer et al., 1998) — эритроциты млекопитающих в потоке ведут себя, как “капли жидкости”, в то время как ядерные эритроциты других позвоночных, ведут себя как “твердые тела”.

Наши исследования показали, что соотношение размерных характеристик эритроцитов и величины активности экто-АТФазы у хрящевых и костистых видов рыб не носило линейного характера. Скаты, в отличие от костистых видов, имели более крупные по размеру эритроциты, а активность экто-АТФазы в них была низкой по сравнению с этим показателем в крупных клетках костистых рыб. Причины этих различий не установлены. В то же время у исследованных нами костистых рыб более крупные эритроциты обладали более высокой экто-АТФазной активностью (табл. 1).

Причины более высокой экто-АТФазной активности у крупных эритроцитов до конца не ясны. Можно предположить, что более высокая активность фермента крупных клеток является адаптационным ответом на высокие деформационные нагрузки при движении их по сосудам, особенно в капиллярном отделе кровотока. Считается, что размеры эритроцитов и капилляров у позвоночных эволюционировали параллельно и размеры капилляров только на 25% меньше размеров эритроцитов (Snyder, Sheafor, 1999). Однако это правило не всегда подтверждается, и крупным клеткам крови приходится сталкиваться с очень мелкими капиллярами. Поэтому крупным ядерным эритроцитам преодолеть мелкие капилляры (например, у форели диаметр капилляра равен 3.0 мкм, а клетки — 15.7×10.4 мкм) особенно сложно (Glomski et al., 1992). Тем не менее, эритроциты у таких рыб эффективно преодолевают микрокапиллярный отдел кровотока. Внешним проявлением этого процесса в капиллярах является, как уже указывалось выше, “корпускулярное” движение эритроцитов, при котором

клетки необычайно легко по очереди втягиваются в просвет сосуда и, подобно микропоршням, проталкивают плазму, эффективно выполняя ее локальное обновление, что очень важно для осуществления как транспирационной, так и трофической функции (Skalak, Branemark, 1969). Выполнение такого “корпускулярного” движения требует энергетических затрат и может происходить, видимо, за счет тепловой энергии расщепления внеклеточного АТФ, осуществляемого экто-АТФазами эндотелиальных клеток и эритроцитов. Отщепление первых двух молекул фосфорной кислоты от АТФ сопровождается большим энергетическим эффектом: на один грамм молекулы фосфорной кислоты выделяется 30.6 кДж/моль (7.3 ккал/моль) тепловой энергии (Комов, Шведова, 2015). Деформация эритроцитов форели сопровождается увеличением выхода АТФ (Jensen et al., 2009), и, по-видимому, усилением процесса теплопродукции. Возможно, что повышение деформационных характеристик мембран эритроцитов за счет тепловой энергии гидролиза АТФ может улучшать скорость движения клеток, а также скорость переноса кислорода через эритроцитарную мембрану, тем самым сокращая время газообмена в тканях. В то же время, ухудшение деформационных характеристик эритроцитов обуславливает развитие застойных явлений в микроциркуляторном русле и, как следствие, возникновение тканевой гипоксии (Kikuchi et al., 1994).

Взаимосвязь размерных характеристик ядерных эритроцитов и величины активности их экто-АТФазы обнаружена у различных таксонов позвоночных животных (Bencic et al., 1997). Особо отмечено, что практически все ядерные эритроциты позвоночных демонстрировали высокую активность экто-АТФазы по сравнению с безъядерными эритроцитами млекопитающих. Так, в эритроцитах костистых рыб разброс активности фермента был близок к нашим данным и не превышал двух порядков. Сравнение величин активности экто-АТФазы эритроцитов у других классов позвоночных с их линейными размерами показало, что самая высокая активность экто-АТФазы наблюдалась у крупных клеток крови хвостатых амфибий. Например, у протея размеры эритроцитов были  $58 \times 5$  мкм, а у гигантской амфиумы —  $70 \times 40$  мкм (Мещеряков, 2002; Липунова, Скоркина, 2007;

Bencic et al., 1997). Размеры эритроцитов у бесхвостых амфибий были существенно меньше и составляли 20–25 мкм в длину и 12–14 мкм в ширину (Коржуев, 1973; Glomski et al., 1997). Разброс активности между бесхвостыми и хвостатыми амфибиями был особенно велик и составлял более четырех порядков. Рептилии, включающие черепах, змей и крокодилов, также характеризовались большими размерами эритроцитов (в среднем  $20 \times 12$  мкм) и высокими значениями активности фермента в них (Лисничая, Ефимов, 2014). Разброс активности экто-АТФазы эритроцитов у рептилий был меньше, чем у амфибий и не превышал двух порядков. Размеры эритроцитов птиц и активность экто-АТФазы были сравнимы с этими показателями рыб (Липунова, Скоркина, 2007).

Связь размерных характеристик ядерных эритроцитов позвоночных с высокой активностью экто-АТФазы этих клеток имеет и эволюционный аспект. Изменение размеров красных клеток крови происходило дважды. Первый раз крупные эритроциты появляются у бесчелюстных (миноги, миксины) с последующим уменьшением их размера у челюстных костистых рыб. Второй раз — у предков и ныне живущих хвостатых амфибий — тритонов, протеев и т.д. Это обусловлено неспособностью примитивных бесчелюстных и первых наземных позвоночных поддерживать в кровеносной системе высокое давление, которое необходимо для преодоления сопротивления капиллярного отдела кровотока (Snyder, Sheaford, 1999). Большие эритроциты и крупные капилляры являлись единственным выходом, и экто-АТФазную активность с ее теплопродукцией можно рассматривать как адаптационный механизм для оптимизации движения клеток в этом отделе кровеносной системы.

Одним из возможных факторов, способных воздействовать на активность экто-АТФазы, является состав мембраны. Известно, что белково-липидный состав мембран определяет вязкость структуры и может влиять на конформацию интегрального фермента, каким является экто-АТФаза. Конформационные перестройки фермента в связи с изменением их липидного окружения в плазматических мембранах эритроцитов улучшают или уменьшают способность энзима к связыванию субстрата и определяют скорость течения ферментативной реакции.

Так, снижение холестерина в плазматических мембранах почечных клеток мышей и собак уменьшало ферментативную активность экто-АТФазы (Papanikolaou et al., 2005).

У исследованных нами хрящевых и костистых рыб соотношение белковых и липидных компонентов в плазматической мембране имело существенные различия. По содержанию липидов (47.0–56.0%) и белков (44.0–53.0%) мембраны костистых видов были близки к мембране куньей акулы, где содержание этих компонентов составляло 53.5 и 40.5 %, соответственно (Warren et al., 1979). В мембранах скатов содержание общего белка было более высоким (61.0–65.0%), чем у костистых видов (табл. 2). С учетом этого, белково-липидное соотношение в плазматических мембранах эритроцитов морской лисицы и морского кота было выше (1.6 и 1.9), чем в мембранах морских костистых рыб (1.1, 0.9, 0.8). Более высокое относительное содержание белка в мембранах черноморских скатов отражает, на наш взгляд, эволюционный тренд уменьшения доли белковой компоненты и роста липидов у костистых видов. Если судить по величине активности экто-АТФазы исследованных нами хрящевых и костистых рыб (табл. 1), то более высокое содержание белка в мембране может быть маркером для выявления эритроцитов с высокой активностью энзима. Самые высокие значения активности экто-фермента были получены у рыб, имеющих самое высокое белково-липидное соотношение в мембранах эритроцитов (табл. 2).

Фосфолипиды в плазматических мембранах эритроцитов морской лисицы и морского кота составляли 50.0 и 52.0%, а в эритроцитах скорпены, смариды и ставриды — 56.0, 74.0 и 76.0% соответственно (табл. 3). Эти результаты хорошо согласуются с данными по содержанию фосфолипидов в плазматических мембранах эритроцитов позвоночных. Высокое содержание фосфолипидов выявлено в мембранах эритроцитов лягушки (~75%) и крысы (~78%) (Забеленский и др., 2014). В мембранах эритроцитов атлантического лосося (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) содержание общих фосфолипидов также было высоким и составляло 70–75% от общих липидов (Thompson et al., 1995). Более высокое содержание фосфолипидов (81.0%) было обнаружено в мембранах эритроцитах ручьевой форели

(*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) (Bolis, Fänge, 1979). Этими же авторами были показаны высокие значения общих фосфолипидов в эритроцитах ряда морских видов рыб: бопса *Boops boops* (Linnaeus, 1758) (82.0%), европейского керчака *Myoxocephalus scorpius* (Linnaeus, 1758) (80.0%) и северной путассу *Micromesistius poutassou* (Risso, 1827) (81%).

ФХ и ФЭА у всех исследованных нами рыб являются “мажорными” компонентами плазматической мембраны эритроцитов. У других морских хрящевых и костистых видов ФХ также является самой большой в процентном отношении фракцией всех фосфолипидов. Например, в плазматических мембранах эритроцитов кошачьей акулы *Scyliorhinus stellaris* (Linnaeus, 1758) было найдено 58.3% ФХ (Bolis, Fänge, 1979). В мембранах эритроцитов у шести костистых рыб, по данным тех же исследователей, концентрация ФХ колебалась от 56.9 до 61.5%. ФЭА, как и у изученных нами рыб, была второй по величине фракцией фосфолипидов. Содержание ФЭА в мембранах эритроцитов морских рыб колебалось от 19.6 до 21.4% (Bolis, Fänge, 1979). Таким образом, отношение ФХ и ФЭА было всегда  $\geq 2.0$  у всех костистых видов. Сумма фракций ФХ и ФЭА у всех исследованных нами мембран эритроцитов рыб составляла 77.1–81.9%, за исключением морского кота (68.9%) (табл. 3). Это практически совпадает с суммой ФХ и ФЭА у других морских рыб (76.5–82.9%) (Bolis, Fänge, 1979). Вышеизложенные факты позволяют сделать вывод о том, что высокое содержание фосфолипидов и, в частности, ФХ и ФЭА, в плазматических мембранах является базисом в формировании бислоевого матрикса, а упорядоченность их структуры повышает прочность и износостойкость плазмалеммы эритроцитов.

Фосфолипиды наружного и внутреннего слоев плазматической мембраны эритроцитов человека и других позвоночных имеют асимметричный состав (Мецлер, 1980). Соотношение сумм “мажорных” фосфолипидов внешнего и внутреннего слоев мембраны (ФХ + СФМ/ФЭА + ФС) используют для характеристики степени их асимметрии (Kazennov et al., 1998). Расчет этого коэффициента для исследованных рыб показал, что у мембран эритроцитов с высокой экто-АТФазной активностью (морской кот,

скорпена, морская лисица) он был существенно ниже (1.40, 1.42, 1.48), по сравнению с мембранами эритроцитов рыб с низкой активностью фермента (смариды, ставриды) (2.17, 2.32). Меньшая величина коэффициента соотношения  $\Phi X + \text{СФМ}/\Phi ЭА + \Phi С$  может свидетельствовать о большей сбалансированности состава между внешними и внутренними слоями мембраны и большей ее “жесткости”, что нашло отражение в величине активности экто-АТФазы эритроцитов этих рыб.

Наличие определенных фракций в плазматических мембранах существенным образом влияет на ее свойства. При исследовании фосфолипидного состава плазматических мембран важная роль отводится поиску взаимосвязи между соотношениями отдельных фракций фосфолипидов и активностью мембранных АТФаз (Забелинский и др., 2014).

Важным фактором фосфолипидного состава мембран явилось наличие насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Сравнение величин активности экто-АТФаз и КН плазматических мембран эритроцитов рыб показало наличие взаимозависимости между этими показателями. Исходя из величин ИДС и КН, самыми пластичными оказались мембраны морского кота и смариды, а самыми “жесткими” у морской лисицы и скорпены (табл. 4). Активность экто-АТФаз в эритроцитах морской лисицы и скорпены была максимальной, в то время как коэффициент ненасыщенности мембран у этих рыб имел минимальную величину по сравнению с другими видами (табл. 4).

Насыщенные жирные кислоты формируют более упорядоченные структуры. Данные по соотношению насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в плазматических мембранах эритроцитов у различных животных не демонстрируют уменьшения или увеличения вязкости мембран в процессе эволюционного развития. Убедительно показано, что плазматические мембраны эритроцитов рыб, имеющие более высокое содержание насыщенных жирных кислот, обладали более высокой активностью экто-АТФазы, что свидетельствует о важной роли фермента в физиологии мембраны и всего кровотока в целом (табл. 4). Насыщенность мембраны коррелирует с ее “жесткостью” или модулем упругости (Ивенс, Скейлак,

1982). Для каждого вида позвоночных модуль упругости как интегральная характеристика мембраны складывается, вероятно, из совокупности ряда факторов. Состояние микровязкости мембран и степень их деформации сильно зависят от рН, осмолярности, температуры, липидного спектра, газового состава крови, дефицита меди, действия тяжелых металлов и других поллютантов (Боровская и др., 2010; Cook et al., 1987; Abu-Salah et al., 1992).

Сравнивая уровень содержания жирных кислот в фосфолипидах во внешнем ( $\Phi X$ ) и внутреннем ( $\Phi ЭА + \Phi С$ ) слоях мембраны эритроцитов у исследованных видов (Силкин и др., 2012) можно заключить, что внутренний слой имеет большую текучесть по сравнению с наружным монослоем. Это обусловлено высоким процентом содержания полиеновых жирных кислот в “мажорных” фракциях внутреннего монослоя мембраны. Более жесткий, наружный монослой, вероятно способен обеспечивать большую прочность эритроцитарной мембраны. Однако различие в вязкоэластичных свойствах с внутренним монослоем, как мы полагаем, требует наличия компенсаторного механизма, который бы мог обеспечить интегральные белки и другие компоненты мембраны стабильными условиями функционирования. Экто-АТФаза за счет тепловой энергии гидролиза, выделяемого на поверхность эритроцита АТФ, возможно, может постоянно обеспечивать такую компенсацию.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ядерные эритроциты рыб, в отличие от безъядерных эритроцитов млекопитающих, значительно дольше существуют в русле крови. Следовательно, плазматическая мембрана ядерных эритроцитов рыб подвергается более значительным деформационным нагрузкам в процессе выполнения газотранспортной функции. Поэтому белково-липидный состав плазматической мембраны должен сочетать в себе, с одной стороны, прочность, а с другой, достаточную пластичность и износостойкость при сдвиговых деформациях в капиллярах, где эти нагрузки максимальны. Крупные ядерные эритроциты занимают особое место в решении этих сложных задач. Их мембраны уникальны, но вместе с тем и наиболее слабо изучены. Проведенное

нами исследование было направлено на то, чтобы вскрыть взаимосвязь линейных размеров, белково-липидного и жирнокислотного составов плазматических мембран и активности экто-АТФазы. Экто-АТФаза ввиду внеклеточной локализации активного центра, высокой ферментативной активности и генерации тепловой энергии способна существенным образом влиять на вязкоэластичные свойства плазматической мембраны и всего кровотока в целом.

Проведенные исследования на рыбах позволили заключить, что активность экто-АТФазы плазматических мембран эритроцитов имеет связь с размерными характеристиками клеток, которая более выражена в крупных клетках как у хрящевых, так и у костистых рыб. Белково-липидный, фосфолипидный и жирнокислотный состав плазматических мембран эритроцитов рыб показал, что его формирование осуществляется строго индивидуально для каждого вида и не все принципы организации этого набора компонентов ясны. У скатов доля белковой фракции превышает долю липидной компоненты более чем в 1.5 раза. Уменьшение доли белкового компонента в составе мембраны эритроцитов костистых рыб происходит с ростом их естественной подвижности. Благодаря высокому содержанию насыщенных жирных кислот в мембранах эритроцитов их высокоактивная экто-АТФаза выполняет функцию “компенсаторного” адаптационного механизма. Тепловая энергия гидролиза АТФ обеспечивает оптимальное функционирование плазматической мембраны эритроцита, оптимизацию ее вязкоэластичных свойств в капиллярном отделе и во всем кровотоке. Эта тепловая энергия лежит в основе свободного “корпускулярного” движения крупных ядерных эритроцитов в капиллярах, наблюдаемого в натуральных экспериментах (Шмидт-Ниельсен, 1982). Кроме того, даже небольшой набор взятых для исследования видов рыб убедительно показывает экологическую детерминацию направленности такого отбора. Исследованные нами скапы, скорпена, зеленушка в ходе жизненного цикла периодически сталкиваются или даже большую часть своей жизни проводят при низкой температуре. Пойкилотермные организмы, обладающие ядерными эритроцитами, видимо, приспособились использовать тепловую энергию ферментативного гидролиза АТФ

на поверхности эритроцитов не только для оптимизации своих функций, но и для противостояния стрессовому воздействию низких температур. Этот адаптационный механизм помогает им не только выживать, но и расширять свой природный ареал, осваивая более холодные области, недоступные конкурентам.

#### ФИАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы НИР “Изучение фундаментальных характеристик морских гидробионтов, обеспечивающих их функционирование в экосистемах и служащих основой их рационального использования и сохранения”. Регистрационный номер 124030100100-0. Никаких дополнительных грантов на проведение работ и руководство данным конкретным исследованием получено не было.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63 EU), положениях ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными. Эксперименты с животными (рыбами) проводили в соответствии с Руководством выполнения работ при осуществлении рыболовства в научно-исследовательских и контрольных целях на 2022–2024 гг. “Комплексные исследования водных биоресурсов и среды их обитания в азово-черноморском бассейне (Черное и Азовское моря)” на основании Приказа Росрыболовства № 793 от 28 декабря 2022 года.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г. и др.* Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменение при патологиях разного генезиса // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2010. Т. 3. № 73. С. 334–354.
- Венкстern Т.В., Энгельгардт В.А.* Распространение экто-аденозилполифосфатазы и характеристика некоторых ее свойств // Биохимия. 1957. Т. 22. Вып. 5. С. 911–916.
- Забелинский С.А., Чеботарева М.А., Шуколюкова Е.П., Кривченко А.И.* Жирнокислотный состав фосфолипидов эритроцитов миноги, лягушки, крысы

- и спектр поглощения их липидных экстрактов // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2014. Т. 50. № 4. С. 269–274.
- Золотницкая Р.П.* Методы гематологических исследований. Лабораторные методы исследования в клинике (Справочник). М.: Медицина, 1987. С. 106–148.
- Ивенс И., Скейлак Р.* Механика и термодинамика биологических мембран. М.: Мир, 1982. 304 с.
- Казеннов А.М., Маслова М.Н.* Особенности активации детергентами Na, K-аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных // Журн. эвол. биохим. и физиол. 1980. Т. 16. № 5. С. 430–436.
- Казеннов А.М., Маслова М.Н., Савина Г.В.* Сравнительная характеристика свойств Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы эритроцитов человека и карпа *Cyprinus carpio* // Журн. эвол. биохим. и физиол. 1984. 20. № 2. С. 167–173.
- Комов В.П., Шведова В.Н.* Биохимия. М.: Юрайт, 2015. 640 с.
- Коржуев П.А.* Проблема оксигенации гемоглобина // Успехи физиол. наук. 1973. Т. 4. № 3. С. 69–112.
- Куклев С.Б., Зацепин А.Г., Подымов А.И.* Формирование холодного промежуточного слоя в шельфово-склоновой зоне северо-восточной части Черного моря // Океанол. исслед. 2019. Т. 47. № 3. С. 58–71.
- Липунова Е.А., Скоркина М.Ю.* Физиология крови. Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. 324 с.
- Лисничная Е.Н., Ефимов В.Г.* Особенности исследования морфологического состава крови рептилий // Научно-технический бюллетень НДЦ биобезопасности та екологічного контролю ресурсів АПК. 2014. Т. 2. № 1. С. 120–125.
- Мецлер Д.* Биохимия. Химические реакции в живой клетке. Т. 1. М.: Мир, 1980. 407 с.
- Мещеряков Ф.А.* Физиология системы крови лимфы и иммунитета. Ставрополь: АГРУС, 2003. 99 с.
- Мосягин В.В., Максимов В.И., Фурман Ю.В.* Особенности АТФаз ядерных и цитоплазматических мембран цыплят-бройлеров // Вестн. Орел ГАУ. 2010. Т. 2. № 23. С. 39–41.
- Пищенко Е.В.* Гематология пресноводных рыб. Новосибирск: Новосибир. гос. аграр. ун-т, 2002. 48 с.
- Силкин Ю.А., Силкина Е.Н., Забелинский С.А.* Особенности фосфолипидного и жирнокислотного состава плазматических мембран эритроцитов черноморских рыб // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2012. Т. 48. № 1. С. 38–44.
- Силкин Ю.А., Силкина Е.Н.* Роль экто-АТФаз плазматических мембран эритроцитов в гемодинамике рыб // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2017. Т. 53. № 1. С. 62–74.
- Трощенко О.А., Субботин А.А.* Гидрологические особенности // Биология Черного моря у берегов Юго-Восточного Крыма. Симферополь: ИТ “Ариал”, 2018. Гл. 2.3. С. 46–59.
- Шмидт-Нюельсен К.* Физиология животных, приспособление и среда Кн. 1. М.: Мир, 1982. 416 с.
- Abu-Salah K.M., Al-Othman A.A., Lei K.Y.* Lipid composition and fluidity of the erythrocyte membrane in copper-deficient rats // Br. J. Nut. 1992. V. 68. P. 435–443.
- Acharya G., Mohanty P.K.* Comparative cytomorphometry of red blood cells of some fishes // Afr. J. Biol. Sci. 2019. V. 1. № 1. P. 23–32. <https://doi.org/10.33472/AFJBS.1.1.2019.23-32>
- Bencic D.C., Yates T.J., Ingermann R.L.* Ecto-ATPase activity of vertebrate blood cells // Physiol. Zool. 1997. V. 70. № 6. P. 621–630.
- Bolis L., Fänge R.* Lipid composition of the erythrocyte membrane of some marine fish // Comp. Biochem. Physiol. B. 1979. V. 62. P. 345–348.
- Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H.* Microdetermination of phosphorus // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 11. P. 1756–1758.
- Cohen W.D.* The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes // Int. Rev. Cytol. 1991. V. 130. P. 37–84.
- Cook L.R., Stohs S.J., Angle C.R. et al.* Erythrocyte membrane microviscosity and phospholipid composition in lead workers // Br.J. Ind. Med. 1987. V. 44. P. 841–844.
- Fischer U., Ototake M., Nakanishi T.* Life span of circulating blood cells in gibeluna crucian carp (*Carassius auratus langsdorffii*) // Fish Shellfish Immunol. 1998. V. 8. P. 339–349.
- Fiske C.H., Subbarow Y.* The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. 1925. V. 66. № 2. P. 375–400.
- Folch J.I., Lees M., Sloane Stanley G.H.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
- Footo J.L., Allen R.J., Agranoff B.W.* Fatty acids in esters and cerebroside of human brain in phenylketonuria // J. Lipid Res. 1965. V. 6. P. 518–524.
- Girish V., Vijayvalakshmi A.* Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ // Indian J. Cancer. 2004. V. 41. № 1. Art. ID47.
- Glomski C.A., Tamburlin J., Chainani M.* The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. III. Fish, the lower vertebrate experience // Histol. Histopathol. 1992. V. 7. P. 501–528.
- Glomski C.A., Tamburlin J., Hard R., Chainani M.* The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians // Histol. Histopathol. 1997. V. 12. P. 147–170.
- Grinthal G., Guidotti G.* CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? // Purinergic Signalling. 2006. V. 2. P. 391–398.

- 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.* 2009. V. 152. P. 351–356.
- Kazennov A.M., Maslova M.N., Matskevich Yu.A. et al.* Species variability of erythrocyte transport ATPases in mammals // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1998. V. 119. № 1. P. 169–175.
- Kikuchi Y., Da Q.W., Fujino T.* Variation in red blood cell deformability and possible consequences for oxygen transport to tissue // *Microvasc. Res.* 1994. V. 47. № 2. P. 222–231.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
- Papanikolaou A., Papafotika A., Murphy C. et al.* Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39 // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 26406–26414.
- Peterson G.L.* A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // *Anal. Biochem.* 1977. V. 83. P. 346–356.
- Rouser G., Siakotos A.N., Fleischer S.* Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots // *Lipids.* 1966. V. 1. № 1. P. 85–86.
- Snyder G.K., Sheafor B.A.* Red blood cells: centerpiece in the evolution of the vertebrate circulatory system // *Am. Zool.* 1999. V. 39. P. 189–198.
- Skalak R., Branemark P.* Deformation of red blood cells in capillaries // *Science.* 1969. V. 164. P. 717–719.
- Thompson K.D., Henderson R.J., Tatner M.F.* A comparison of the lipid composition of peripheral blood cells and head kidney leucocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1995. V. 112. № 1. P. 83–92.
- Wang T.F., Ou Y., Guidotti G.* The transmembrane domains of ectoapyrase (CD<sub>39</sub>) affect its enzymatic activity and quaternary structure // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 24814–24821.
- Warren L., Buck C.A., Rabinowitz J.L., Sherman I.W.* Isolation and characterization of the erythrocyte surface membrane of the smooth dogfish, *Mustelus canis* // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1979. V. 62. P. 471–479.

## Ecto-ATPase of Erythrocyte Plasma Membrane in Black Sea Fishes and Factors Affecting Its Activity

© 2025 Yu. A. Silkin\*, E. N. Silkina, M. Yu. Silkin

*Vyazemsky Karadag Scientific Station, Federal Research Center,  
Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences,  
Feodosia, 298187 Russia  
\*e-mail: ysilkin@mail.ru*

The effect of erythrocyte sizes and protein-lipid, phospholipid, and fatty acid compositions of plasma membranes on the activity of the membrane ecto-ATPase was studied in two cartilaginous (*Raja clavata*, *Dasyatis pastinaca*) and eight teleost species (*Scorpaena porcus*, *Uranoscopus scaber*, *Symphodus tinca*, *Diplodus annularis*, *Neogobius melanostomus*, *Spicara flexuosum*, *Trachurus mediterraneus*, *Gaidropsarus mediterraneus*) of Black Sea fishes. The relationships between the high ecto-ATPase activity and the erythrocyte sizes were shown for both cartilaginous and teleost fish species. A higher relative protein content was found in membranes of the Black Sea rays, which probably indicates an evolutionary trend of decreasing proportion of the protein component and increasing lipids in teleost fishes. It was determined that fish erythrocytes with high protein content in the membrane have higher ecto-enzymatic activity. Plasma membrane phospholipids of fish erythrocytes are represented by five families: phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PEA), phosphatidylserine, monophosphoinositide, and sphingomyelin. The high content of phospholipids and, in particular, PC and PEA in plasma membranes of fish erythrocytes is the basis for the formation of their bilayer matrix. Plasma membranes with a higher content of saturated fatty acids exhibited a higher ecto-ATPase activity, which indicated an important role of the enzyme in the physiology of the cell membrane and the blood flow in general.

**Keywords:** size, protein-lipid content, phospholipid composition, saturated and unsaturated fatty acids, ecto-ATPase, membranes, erythrocytes, fish