

УДК 577.151

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТНО-ЛОКАЛИЗОВАННОЙ АТФазы (НУКЛЕОТИДАЗЫ) ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕРНОМОРСКОГО СКАТА МОРСКОЙ ЛИСИЦЫ *RAJA CLAVATA* L.

© 2020 г. Ю. А. Силкин^{1,*}, Е. Н. Силкина¹, М. Ю. Силкин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН”, п/о Курортное, г. Феодосия, Россия

*e-mail: ysilkin@mail.ru

Поступила в редакцию 03.03.2019 г.

После доработки 15.08.2019 г.

Принята к публикации 10.10.2019 г.

Исследовали биохимические свойства и некоторые кинетические характеристики поверхностно-локализованной АТФазы (ЕС 3.6.1.5) цельных эритроцитов черноморского ската морской лисицы *Raja clavata* L. Показано, что активность фермента варьировала у исследованных рыб от 1.5 до 3.5 нмоль Φ_n /мин/мкл упакованных клеток и была максимальной в присутствии 3.0–6.0 мМ двухвалентных катионов Mg^{2+} . Экто-АТФаза обладала широкой субстратной специфичностью в отношении расщепления нуклеозидтрифосфатов. Фермент был толерантен к изменению рН среды, проявляя максимальную активность в диапазоне значений рН от 5.5 до 7.7. Энзим имел высокое сродство к субстрату и найденная константа Михаэлиса (K_m) составляла 12.0 ± 1.0 мкМ, а V_{max} – 2.35 ± 0.02 нмоль Φ_n /мин/мкл упакованных клеток. Экто-АТФаза эритроцитов *R. clavata* была устойчива в течение 4 суток в условиях хранения этих клеток при температуре $+4^\circ C$ и проявляла толерантность к высоким концентрациям мочевины.

Ключевые слова: Mg^{2+} -зависимая экто-АТФаза, плазматическая мембрана, эритроциты, рыбы

DOI: 10.31857/S004445292001012X

ВВЕДЕНИЕ

Эритроциты животных являются одними из первых объектов, на которых были начаты систематические исследования поверхностно-локализованных АТФаз. Для этих АТФаз и других ферментов, активный центр которых расположен на поверхности плазматической мембраны и действие которых направлено на субстраты во внеклеточной среде, был предложен термин “экто-фермент” [1]. АТФазы эритроцитов обладают широкой субстратной специфичностью, расщепляя нуклеозидтри/нуклеозиддифосфаты, и согласно современной классификации получили название экто-нуклеозидтрифосфат/дифосфогидролаза (Э-НТФДаза) (ЕС 3.6.1.5) [2]. Систематические исследования Д. Бенсика и соавт. [3] экто-АТФазной активности эритроцитов у 34 видов позвоночных животных, охватывающих практически все классы позвоночных, показали существенные различия активностей фермента между ядерными и безъядерными красными клетками. При этом ядерные эритроциты позвоночных демонстрировали на порядки более высокую экто-АТФазную активность. Согласно этим исследованиям пресноводные костистые рыбы значительно уступают по этому показателю амфибиям, рептилиям и птицам. Активность экто-АТФазы эритроцитов этих рыб колебалась в пределах от 0.003 до 0.9 нмоль Φ_n /мин/мкл эритроцитов [3]. Эритроциты морских рыб обладают более высокой экто-нуклеотидазной активностью по сравнению с пресноводными рыбами. Так, по данным Э. Трамса и соавт. [4] экто-АТФазная активность эритроцитов рыбы-пилы составляла 3.6 нмоль Φ_n /мин/мкл эритроцитов, а найденная нами экто-АТФаза на эритроцитах костистой рыбы скорпены имела активность 4.5–9.0 нмоль Φ_n /мин/мкл эритроцитов [5].

Много вопросов вызывает функциональное назначение этих АТФаз. Согласно современным представлениям, основной функцией расположенных на поверхности эритроцитов теплокровных животных экто-нуклеотидаз является контроль концентрации внеклеточных нуклеотидов – агонистов пуриnergических/пиримидинергических рецепторов. Нуклеотидазы путем их гидролиза, конкурируя с P2-рецепторами за внеклеточный пул нуклеотидов, модулируют функции этих ре-

цепторов [6]. В связи с этим эритроциты могут выступать одновременно и в качестве “доноров” и “потребителей” макроэргических фосфатов – “выключателями” P_2 рецепторов сосудистого эндотелия за счет захвата и расщепления выделенного ими же АТФ [7]. Тем не менее доказательства, подтверждающих регуляторную роль экто-АТФаз в пуринэргической сигнализации для многих ферментов, не найдено. Нет таких доказательств и для экто-АТФаз эритроцитов позвоночных, а найденный высокий уровень концентрации нуклеотидов в крови рыб и относительно высокая активность экто-АТФаз в самих эритроцитах ставят под сомнение лишь сигнальную функцию внеклеточного АТФ [8]. Кроме того, многие экто-нуклеотидазы относятся к полифункциональным ферментам и могут взаимодействовать с внеклеточным белковым матриксом и сами выступать в качестве трансдукторов сигналов в клетку [2].

Исследование свойств экто-АТФаз эритроцитов у хрящевых рыб обусловлено нашими предположениями о возможном участии фермента в изменении реологических свойств крови [9]. Эритроциты морской лисицы с их крупными линейными размерами (27×15 мкм) и с достаточно жесткой плазматической мембраной могут существенным образом затруднять движение крови в капиллярах [10]. Как мы полагаем, выделение тепла при гидролизе АТФ экто-нуклеотидазами может облегчать движение эритроцитов в капиллярном отделе кровотока. В связи с этим изучение физиолого-биохимических свойств экто-АТФазной (нуклеотидазной) активности эритроцитов у этих рыб является актуальным направлением исследований. Проведенные исследования являются также продолжением изучения свойств экто-АТФаз у разных видов черноморских рыб. Цель настоящего исследования состояла в изучении биохимических свойств (от рН среды, концентрации Mg^{2+} , субстратной специфичности) и кинетических характеристик (K_m и V_{max}) экто-АТФазы эритроцитов черноморского ската – морской лисицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили с мая по октябрь на эритроцитах морской лисицы (*Raja clavata* L.), обитающей в шельфовой зоне Юго-Восточного Крыма. Морская лисица широко распространенный вид ската. Самки достигают длины 125 см, а самцы – 70–85 см. Морская лисица – холодолюбивый вид, редко подходит в места с малыми глубинами, чаще держится на глубине от 50 до 70 м с оптимальным для этого вида температурным диапазоном обитания от +8 до +18°C. Рыб отлавливали при помощи ставного невода. Акклимацию рыб проводили в непроточных, аэрируемых воздухом бассейнах (емкость – 1000 л), в течение 2–4 сут,

при температуре от +14 до +17°C. Кровь получали пункцией желудочка сердца и переносили в охлажденный (+4°C) раствор для отмывания эритроцитов от плазмы в соотношении 1:10. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (50 ед/мл крови). Эритроциты трижды отмывали от плазмы в десятикратном объеме физиологического раствора следующего состава (ммоль/л): 220 NaCl, 300 мочевины, 10 Трис-НСl-буфера, (рН 7.0–7.4). Осаждение клеток проводили на центрифуге К-23 (Германия) (1500 об./мин, 2 мин при +4°C). Надосадочную жидкость декантировали. Слой лейкоцитов, расположенный на поверхности осажденных эритроцитов, аккуратно удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Отмытые эритроциты ресуспендировали в небольшом количестве физиологического раствора и определяли гематокрит (Hct) на центрифуге TL-11 (Германия). Суспензию клеток разводили физраствором до величины гематокрита, равного 0.035%.

Определение активности экто-АТФазы проводили по методике А. Казеннова и соавт. [11] с модификацией инкубационной среды для цельных эритроцитов ската. Инкубационная среда для определения активности экто-АТФазы содержала в (мМ): мочевины 400, 135 NaCl, 5 KCl, 6 $MgCl_2$, 50 Трис-НСl, рН 7.4. Концентрация основного субстрата АТФ-динатриевой соли в разных экспериментах варьировала от 0.05 до 2.0 мМ. Конечная концентрация цитозинтрифосфата (ЦТФ), гуанозинтрифосфата (ГТФ), уридинтрифосфата (УТФ), креатинтрифосфата (КФ) и адениндифосфата (АДФ) составляла 2.0 мМ. Температура инкубации эритроцитов ската составляла +15°C, время инкубации – 2 мин. Реакцию гидролиза макроэргических фосфатов экто-АТФазой останавливали добавлением 0.2 мл 20%-ной ТХУ. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об./мин. По модифицированному А. Казенновым и М. Масловой методу Чена в надосадочной жидкости (супернатант) определяли содержание неорганического фосфата, по накоплению которого судили об активности фермента [12].

Согласно этой модификации методики, при определении содержания Φ_n в пробе, в качестве восстановителя фосфорномолибденовой кислоты, помимо аскорбиновой кислоты, использовали хлористое олово ($SnCl_2$). К 0.9 мл H_2O приливали 0.1 мл супернатанта, смешивали с 0.8 мл реактива “А” [10 н. $H_2SO_4 + H_2O + 5\%$ -ный раствор $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ в соотношении 1:2:1] и через 1–2 мин при непрерывном помешивании прибавляли 0.2 мл реактива “В” [0.2% раствор аскорбиновой кислоты в 0.2% растворе $SnCl_2$, приготовленном непосредственно перед определением из маточного 24%-ного раствора $SnCl_2$ в концентрированной HCl]. Через 15 мин инкубации, при комнатной температуре, интенсивность развившейся

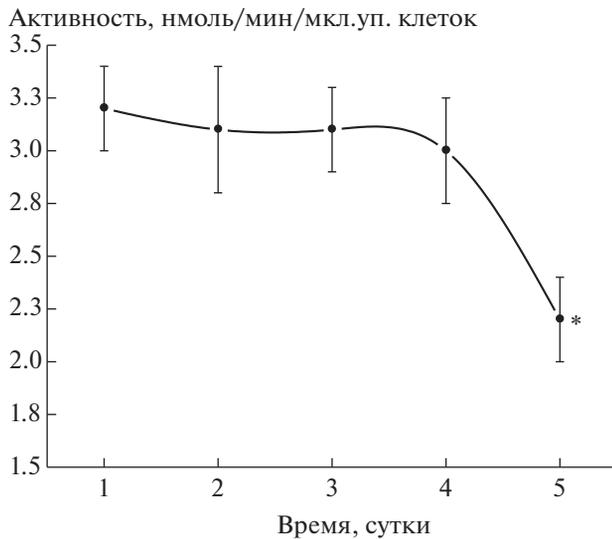


Рис. 1. Активность экто-АТФазы эритроцитов *R. clavata* в процессе хранения суспензии отмываемых клеток при +4°C.

* Достоверность различий по сравнению с предыдущими измерениями активности фермента — $r < 0.05$.

окраски молибденового синего оценивали на спектрофотометре Spocol 11 (Германия) по поглощению света при 720 нм. Калибровочный график показал прямолинейную зависимость экстинкций от содержания в пробе от 10 до 100 нмоль Φ_n .

Для определения устойчивости фермента при хранении суспензий при +4°C ежедневно измеряли удельную активность экто-нуклеотидазы на протяжении 5 сут.

Изучение зависимости удельной активности фермента от pH инкубационной среды проводили в диапазоне pH 5.0–8.0. Исследование зависимости активности фермента от концентрации двухвалентных ионов Mg^{2+} осуществляли в диапазоне концентрации катиона от 0 до 6.0 мМ при pH 6.8 и 7.4.

Для выяснения субстратной специфичности изучали гидролитическую активность экто-нуклеотидазы эритроцитов *R. clavata* в присутствии ряда макроэргических субстратов: цитозинтрифосфата (ЦТФ), гуанинтрифосфата (ГТФ), урацилтрифосфата (УТФ), креатинфосфата (КФ), аденозиндифосфата (АДФ). Конечная концентрация всех субстратов в инкубационной среде составляла 2 мМ.

Скорость ферментативной реакции экто-АТФазы *R. clavata* от концентрации АТФ описывалась гиперболой. Для определения кинетических характеристик (K_m и V_{max}) изучали зависимость начальной скорости реакции (V_0) фермента от concentra-

ции АТФ (от 0 до 0.25 мМ). Расчет K_m проводили по формуле:

$$K_m = [S] (V_{max}/V_0 - 1), \quad (1)$$

где K_m — константа Михаэлиса; $[S]$ — концентрация субстрата; V_{max} — максимальная скорость реакции; V_0 — начальная скорость реакции при текущей концентрации субстрата.

Подбирали условия, при которых скорости реакции $V_0 = V_{max}/2$. При этом уравнение (1) преобразуется в $K_m = [S]$ (2) и константа Михаэлиса становится равной концентрации субстрата. Поэтому K_m экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы выражали в микромолях (мкМ).

Активность экто-АТФазы выражали в нмоль Φ_n /мин/мкл упакованных клеток. Все результаты были получены при проведении 5–7 независимых экспериментов. 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. Различия считались достоверными при $r < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования показали, что удельная активность экто-АТФазы морской лисицы в стандартных условиях эксперимента при температуре +15°C и оптимальной pH инкубационной среды (7.4) колебалась от 1.5 до 3.2 нмоль Φ_n /мин/мкл упакованных клеток.

Важной характеристикой фермента является устойчивость его активности в процессе хранения суспензии клеток после выделения и отмывки эритроцитов от плазмы крови. Как показали наблюдения, экто-АТФаза эритроцитов *R. clavata* была устойчива к передержке клеток на холоде (+4°C). Хранение ресуспендированных эритроцитов морской лисицы в течение четырех суток не вызывало изменений в активности фермента. В следующие пятое сутки активность фермента эритроцитов морской лисицы начинала убывать и к концу пятисуточного хранения падала на 30% от исходного уровня (рис. 1).

Одной из важных характеристик любого фермента является определение pH оптимума среды для его активности. Результаты исследования pH оптимума, полученные на эритроцитах *R. clavata*, представлены на рис. 2. Как видно из рисунка, самая низкая активность фермента у ската (1.4 нмоль Φ_n /мин/мкл упакованных клеток) отмечена при pH 5.0. При смещении pH в сторону нейтральной области активность фермента резко возрастала до 1.9 нмоль Φ_n /мин/мкл упакованных клеток и держалась на этом уровне до pH, равной 7.7. То есть кривая pH зависимости имела типичную колоко-

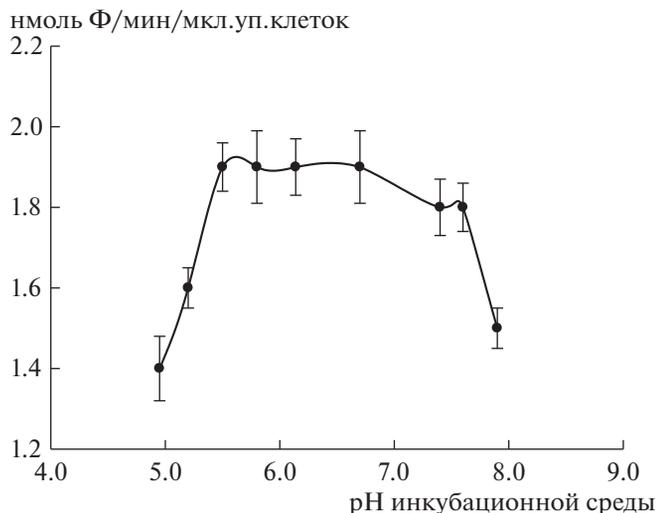


Рис. 2. Зависимость активности экто-АТФазы эритроцитов *R. clavata* от рН среды.

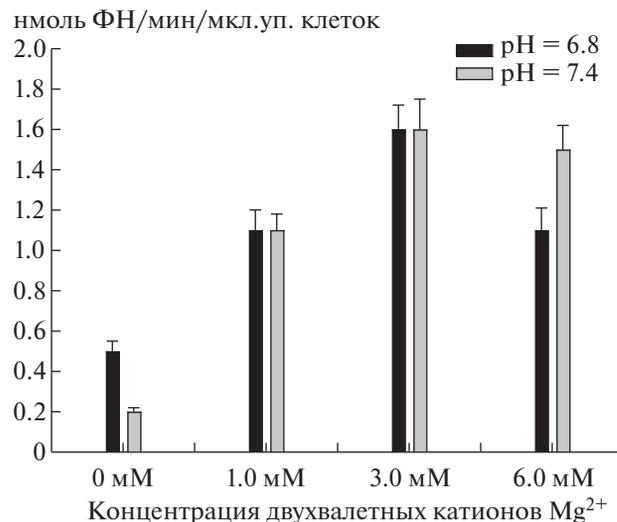


Рис. 3. Активность экто-АТФазы эритроцитов *R. clavata* в зависимости от концентрации ионов Mg²⁺ и рН среды при +15°C.

лообразную форму с довольно широким плато, с параметрами рН от 5.5 и до 7.7. Следует отметить, что рН зависимость активности экто-фермента в эритроцитах ската отличалась сдвигом оптимума в более кислую сторону (рис. 2).

Как известно, экто-АТФаза эритроцитов рыб и других позвоночных животных не проявляет активности в отсутствие двухвалентных катионов Mg²⁺ или Ca²⁺. Это обусловлено тем, что в качестве субстрата экто-АТФазы используют не чистый АТФ, а его комплекс с ионами двухвалентных катионов Mg²⁺ и/или Ca²⁺ [1, 2]. В связи с этим была исследована зависимость активности фермента от наличия различных концентраций ионов Mg²⁺ в инкубационной среде. Для определения активности фермента использовали инкубационные среды с различным содержанием ионов Mg²⁺ и имеющих два разных показателя рН, смещенных от нейтрального значения в кислую и щелочную области. Данные полученных экспериментов представлены на рис. 3. Показано, что при концентрации ионов Mg²⁺, равной менее 3.0 мМ, активность фермента не проявлялась в полной мере. Полное насыщение фермента субстратом (Mg²⁺-АТФ) происходило, когда концентрация Mg²⁺ составляла 3.0 мМ. Более высокая концентрация двухвалентного катиона

(6.0 мМ) не изменяла активности экто-АТФазы в эритроцитах *R. clavata* при рН 7.4 и уменьшалась на 30% при рН 6.8 (рис. 3). Добавление в инкубационную среду 1.0 мМ Na₂-этилендиаминотетраацетата (Na₂-ЭДТА) приводило к полному ингибированию экто-АТФазной активности плазматических мембран эритроцитов ската (данные не показаны).

Исследование субстратной специфичности показало, что фермент обладает способностью расщеплять, кроме АТФ, и другие нуклеотиды (табл. 1). Как видно из табл. 1, скорость ферментативного расщепления АТФ была самой высокой и в 3–6 раз превышала интенсивность гидролиза других макроэргических соединений в аналогичных условиях. Так, скорость расщепления ЦТФ была в 3 раза меньше, ГТФ – в 5 раз, УТФ – в 4 раза, КФ – в 6 раз, а АДФ в 1.9 раза, в сравнении со скоростью расщепления АТФ. Эти результаты позволяют заключить, что данный фермент обладает широкой субстратной специфичностью и также может называться экто-нуклеотидазой.

Также нами были проведены исследования основных кинетических параметров экто-АТФазы эритроцитов ската в зависимости от концентрации АТФ. Эти исследования выполнялись при температуре +15°C. Как показали предыдущие экспери-

Таблица 1. Удельная активность экто-АТФазы (нмоль Φ_н/мин/мкл клеток) в эритроцитах *R. clavata* в присутствии различных субстратов

Концентрация субстрата АТФ, мМ	Субстраты					
	АТФ	ЦТФ	ГТФ	УТФ	КФ	АДФ
0.2	3.5 ± 0.2 (6)	1.1 ± 0.1 (6)	0.7 ± 0.1 (6)	0.8 ± 0.1 (5)	0.5 ± 0.1 (5)	1.8 ± 0.1 (7)

Примечание: цифры в скобках равно числу опытов – (n).

Таблица 2. Константа Михаэлиса (K_m) и максимальная скорость накопления ортофосфата (V_{max}) при ферментативном гидролизе АТФ экто-АТФазой эритроцитов *S. porcus* и *R. clavata* при +15°C

Вид	K_m , мкМ	V_{max} (нмоль Φ_n /мин/мкл упакованных клеток)
<i>Raja clavata</i> L.	12.0 ± 1.0 (7)	2.35 ± 0.02 (7)
<i>Scorpaena porcus</i> L.*	55.0 ± 13.0 (5)**	10.0 ± 0.60 (5)

Примечание: цифры в скобках равно числу опытов – (n); * – данные из статьи [6]**; достоверность различий по сравнению с K_m *R. clavata* – $r < 0.05$.

менты, эта температура являлась оптимальной для эритроцитов рыб [5]. Данные по этим исследованиям представлены в табл. 2 и на рис. 4.

Как видно из рис. 4, кривая зависимости начальной скорости реакции (V_0) от концентрации субстрата [АТФ] подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен. После проведения соответствующих расчетов мы определили константу Михаэлиса (K_m) и максимальную скорость (V_{max}). Полученная константа K_m для эритроцитов ската (табл. 2) оказалась почти в 5 раз ниже, чем константа Михаэлиса экто-АТФазы у эритроцитов скорпены. Соответственно и V_{max} экто-фермента у хрящевого вида аналогичным образом отличалась от костистого вида рыб. Полученные различия могут свидетельствовать о более высоком сродстве к субстрату экто-АТФазы эритроцитов ската по сравнению со скорпеной.

ОБСУЖДЕНИЕ

Поверхностно-локализованная экто-АТФаза эритроцитов *R. clavata* относится к семейству экто-нуклеотидаз, которые являются ключевыми ферментами, осуществляющими гидролиз внеклеточных макроэргических нуклеозидтрифосфатов. Как полагают, основная функциональная роль внекле-

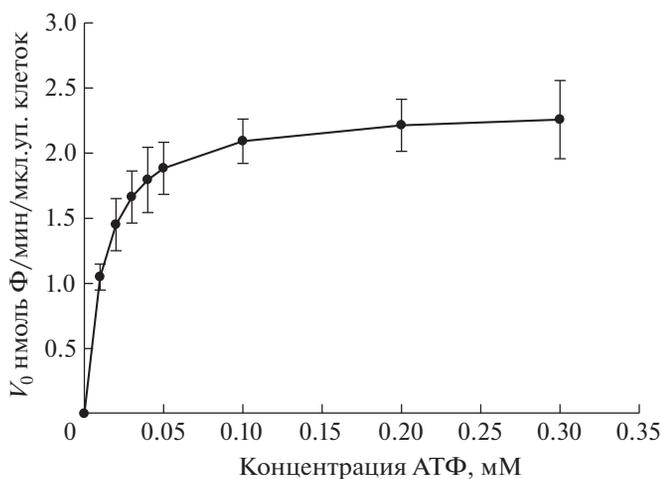


Рис. 4. Зависимость скорости реакции (V_0) экто-АТФазы *R. clavata* от концентрации АТФ при +15°C.

точного нуклеотидного гидролиза связана с конкуренцией экто-АТФаз и нуклеотидных (P2) рецепторов за доступность лиганда. Тонкости механизма такого контроля пока не изучены, но этот процесс очень актуален для передачи пуриnergического сигнала. Гидролиз АТФ может приводить к предотвращению десенсibilизации рецептора или прекращению активации рецептора в результате гидролиза лиганда или также к активации рецептора образующимися продуктами гидролиза [6]. Принимая во внимание то, что внеклеточная концентрация АТФ в плазме крови рыб поддерживается постоянно на микромолярном уровне, можно полагать, что функциональная роль данного фермента у этих позвоночных не ограничивается только конкуренцией за АТФ с P2 рецепторами сосудистого эндотелия и теми же рецепторами других клеток крови. Во всяком случае сосудорасширяющих эффектов при перфузии тканей суспензией взвешенных в физиологическом растворе эритроцитов лососевых не наблюдается [8]. Это может свидетельствовать в пользу того, что экто-АТФазы эритроцитов рыб осуществляют гидролиз внеклеточного АТФ с неизвестными для нас целями и эти важные (с учетом больших концентраций внеклеточного пула АТФ) функции экто-нуклеотидаз нам еще предстоит открыть.

Согласно современным исследованиям некоторые экто-нуклеотидазы плазматических мембран эндотелия, лимфоцитов и ряда других тканей способны отщеплять не только конечной γ -фосфат АТФ, но и следующий β -фосфат. В результате такого непрерывного гидролиза происходит распад АТФ до АМФ без существенного накопления АДФ. Физиологический смысл такого гидролиза понятен. АДФ является агонистом пуриновых рецепторов на тромбоцитах и его неконтролируемое накопление в плазме крови может провоцировать агрегацию тромбоцитов и образование тромбов, способных при соответствующих патологических состояниях затруднять или полностью блокировать кровотоки [13]. В ранних работах также есть указания на способность экто-нуклеотидаз эритроцитов птиц и крыс отщеплять от нуклеозидтрифосфатов два фосфорных остатка по “апиразному” типу [4, 14]. Семейство нуклеозидтрифосфат/дифосфогидролаз (Э-НТФДаз) включает 8 типов ферментов, которые имеют номерные обозначения. Четыре фермента (Э-НТФДаз1, Э-НТФДаз2,

Э-НТФДаза 3, Э-НТФДаза 8) относят к экто-ферментам, а Э-НТФДазы 4–7 относят к энзимам с внутриклеточной локализацией. Э-НТФДаза эритроцитов позвоночных до настоящего времени не имеет номенклатурного номера. Отсутствие этих сведений связано, прежде всего, с большими трудностями по выделению ферментов и получению их очищенных препаратов. Применение детергентов для дезинтеграции плазматической мембраны клеток, как показывают исследования, всегда приводило к потере их каталитической активности. Следует также отметить, что идентификация экто-нуклеотидазы эритроцитов человека и других млекопитающих затруднена ввиду того, что ее активность имеет на порядки более низкую способность к гидролизу макроэргических фосфатов по сравнению с эритроцитами других позвоночных животных [3, 15].

Экто-АТФаза эритроцитов *R. clavata* обладала в 4–10 раз более высокой активностью относительно активности экто-АТФаз эритроцитов пресноводных рыб, которая варьировала у них от 0.003 до 0.9 нмоль Φ_n /мин/мкл упакованных клеток [3]. Наши ранние исследования показали, что экто-АТФазная активность у морских рыб тоже имеет довольно широкий диапазон колебания. Так, в эритроцитах смариды, ставриды и скорпены активность фермента составляла 0.17, 0.2 и 6.4, а у ската – морского кота – 2.1 нмоль Φ_n /мин/мкл упакованных клеток. Причины столь широкого варьирования активности экто-АТФазы у рыб неизвестны. Однако нам удалось установить прямую корреляцию между активностью фермента и содержанием насыщенных жирных кислот в плазматических мембранах эритроцитов рыб. Согласно этим исследованиям, при сравнении активности фермента и уровня содержания насыщенных жирных кислот в плазматических мембранах двух черноморских скатов – морской лисицы и морского кота, оказалось, что более высокая активность экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы соответствовала большему содержанию насыщенных жирных кислот в ее мембране (соответственно – 44.1 и 35%). Наличие такой же корреляции в активности фермента и содержания насыщенных жирных кислот в плазматических мембранах эритроцитов было отмечено нами также и у костистых черноморских рыб [9]. Недавние исследования показали, что активность экто-нуклеотидазы 1 плазматической мембраны человека зависит от ее липидного окружения. Показано, что удаление холестерина из липидного окружения фермента понижало его активность. Это понижение активности экто-нуклеотидазы 1 носило обратимый характер. При повторном возвращении холестерина в локус ферментативного окружения мембраны активность экто-АТФазы быстро восстанавливалась [16].

Все исследования по изучению влияния различных факторов на активность экто-АТФазы эритроцитов *R. clavata* проводили при температуре +15°C. Эта температура соответствует зоне комфортного существования данного вида рыб в природе. Зона нижнего предела существования соответствовала температуре +5°C, а верхнего предела – температуре +25°C.

На свежeweделенных, отмытых и ресуспендированных в физиологических средах эритроцитах рыб нами была исследована устойчивость удельной активности фермента в процессе их хранения при +4°C. Как показали эти исследования, экто-АТФаза эритроцитов *R. clavata* была устойчива к хранению эритроцитов в холоде (+4°C) и в течение четырех суток практически не теряла активности. Напротив, экто-АТФаза эритроцитов скорпены при хранении суспензий клеток в аналогичных условиях уже в течение первых суток теряла более 30% своей активности, что вынуждало проводить эксперименты только на свежeweделенных препаратах [5]. Таким образом, в отношении хранения клеток в холоде активность экто-АТФазы эритроцитов ската оказалась более устойчивой по сравнению с экто-АТФазой эритроцитов скорпены. Возможно, это является отражением физиологических особенностей организма, так как морская лисица – холодолюбивая рыба. Эта особенность давала возможность проводить эксперименты с большими объемами выделенных клеток, не опасаясь падения активности фермента в течение 2 и даже 4 сут.

Как уже отмечалось, исследованная активность экто-АТФазы эритроцитов *R. clavata* от рН имела колоколообразную форму и была сдвинута в кислую сторону. Экто-нуклеозидтрифосфат/дифосфогидролаза (Э-НТФДаза) 1, 3, 8 из мембран человека имела рН оптимум при рН 7.0–7.4, в то время как Э-НТФДаза 2 обладала сдвинутым в кислую сторону рН оптимумом [17]. Для исследованных нами морских костистых рыб рН оптимум находился в диапазоне 7.2–7.4. Все эксперименты по изучению биохимических свойств экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы также были выполнены при рН 7.4 ввиду того, что у всех позвоночных (в том числе и у скатов) рН крови отклоняется от нейтральной точки всегда в щелочную сторону на 0.4–0.6 единиц [18].

Для проявления своей активности экто-АТФаза эритроцитов *R. clavata* нуждалась в присутствии двухвалентных катионов Mg^{2+} и/или Ca^{2+} . Необходимость присутствия двухвалентных катионов объясняется особенностями гидролиза макроэргических фосфатов в активном центре фермента, где отрицательный заряд фосфатных групп нуклеозидфосфатов уменьшается комплексобразованием катиона двухвалентного металла. Благодаря этому происходит эффективный разрыв макроэргической связи и отщепление фосфорного остатка в ак-

тивном центре Э-НТФДазы. Хелатирование двухвалентных катионов 1.0 мМ Na₂-ЭДТА приводило к полному подавлению ферментативной активности поверхностной экто-нуклеотидазы [2]. Использование ЭДТА в качестве ингибитора экто-нуклеотидазной активности, позволившего четко разделить АТФазы на поверхностные и внутриклеточные ферменты, было предложено Венкстерном и Энгельгардтом [1].

Исследования мембранных АТФаз на эритроцитах рыб были проведены и другими исследователями. Так П. Соренсом была найдена нечувствительная к убаину Mg-зависимая АТФаза в эритроцитах камбалы *Platichthys flesus* L. Эти исследования выполнялись на препаратах плазматических мембран. Найденная Mg²⁺-АТФаза по своим свойствам вполне могла быть отнесена к эктоферменту. Энзим для проявления своей активности нуждался в присутствии ионов Mg²⁺ и Ca²⁺, имел рН оптимум от 6.5 до 7.2 и обладал широким спектром субстратной специфичности. Mg²⁺-АТФаза ингибировалась ионами Cu²⁺ и Zn²⁺, а также трифлюоперазином и этакриновой кислотой [19].

Как показали исследования, экто-нуклеотидаза *R. clavata* обладала широкой субстратной специфичностью, способной расщеплять различные макроэргические соединения. АТФ в этом ряду являлась самым предпочтительным субстратом, далее следовали АДФ и другие нуклеозидтрифосфаты. Хуже всего фермент осуществлял гидролиз креатинфосфата (КФ). В литературе для сравнительных характеристик экто-нуклеотидаз используют отношение скоростей гидролиза АТФ/АДФ. Экто-нуклеотидаза ската расщепляла эти субстраты в отношении, примерно 2:1 (табл. 2). Таким же соотношением скоростей гидролиза этих субстратов обладала экто-нуклеотидаза 1 плазматической мембраны человека и мыши [17].

Экто-нуклеотидаза эритроцитов *R. clavata* продемонстрировала кинетику Михаэлиса-Ментен для гидролиза АТФ. Расчет значения K_m экто-нуклеотидазы плазматической мембраны эритроцитов морской лисицы и скорпены (12.0 и 55.0 мкМ) показал, что экто-АТФаза у ската обладала более высоким сродством к АТФ (табл. 2). Полученное значение K_m для морской лисицы совпало со значениями константы Михаэлиса к АТФ для клонированной из плазмиды экто-нуклеотидазы 1 плазматической мембраны мыши (инвентарный номер NM 009848) (12.0 мкМ) и была близка для аналогичной экто-нуклеотидазы 1 плазматической мембраны человека (17.0 мкМ) (инвентарный номер U87967) [17]. Полученные величины K_m для эритроцитов лисицы позволили установить насыщающую концентрацию субстрата при проведении дальнейших экспериментов. Считается, что в случае отсутствия субстратного торможения насыща-

ющая концентрация субстрата для фермента составляет не менее 10 K_m . Поэтому в дальнейших экспериментах концентрация АТФ при изучении биохимических свойств экто-АТФаз эритроцитов рыб была равна 0.2–0.5 мМ. Удельная активность экто-АТФазы эритроцитов *R. clavata* при +15°C была больше, чем V_{max} , рассчитанная по кинетической кривой, и составляла 3.2 нмоль Ф_n/мин/мкл упакованных клеток.

Сравнение между K_m экто-нуклеотидаз плазматических мембран эритроцитов рыб и полумаксимальной эффективной концентрации лиганда (EC₅₀) для нуклеотидных рецепторов имеет физиологическое значение, поскольку оно предоставляет информацию о том, какие из этих ферментов могут регулировать функцию P2 рецепторов. Наши результаты показывают, что все кажущиеся константы K_m Э-НТФДаз эритроцитов рыб, полученных для АТФ, находились в нижнем микромолярном диапазоне. Это свидетельствовало о том, что они могут принимать участие в регуляторной функции P2X и P2Y клеточных рецепторов.

Хрящевые рыбы: скаты и акулы, представляют собой уникальные организмы, так как осмотическая концентрация их крови всегда выше, чем морская вода. Для обеспечения этой осмотичности в крови хрящевых рыб, кроме NaCl, вклад которого составляет только 60% [20], накапливается большое количество мочевины и триметиламинооксида [21]. В крови морской лисицы, как показали наши исследования, концентрация мочевины составляла порядка 350–400 мМ (не опубликованные данные). В связи с этим экто-АТФазы эритроцитов скатов можно считать толерантными к высоким концентрациям мочевины в плазме крови. Для других позвоночных мочевины является высокотоксичным интермедиатом, способным вызывать окислительный стресс. Конечным результатом этого стресса в результате действия мочевины является повреждение мембранных структур клеток и их органелл, а также патогенеза обменных процессов. Это негативно сказывается на состоянии эритроцитов и может приводить их к гибели [22].

Ранними исследованиями было показано, что общий обмен у хрящевых значительно ниже, чем у костистых видов рыб [23]. Энергетика эритроцитов исследованных нами хрящевых и костистых рыб имеет такую же направленность [24]. Мерой биоэнергетической активности процессов в эритроцитах рыб может служить внутриклеточная концентрация АТФ. Концентрация АТФ в эритроцитах морской лисицы составляла 0.47 ± 0.04 мкМ/мл крови [25], что почти в 6 раз было ниже, чем в эритроцитах скорпены – 2.77 ± 0.14 мкМ/мл крови [26]. Возможно, более низкая активность экто-АТФаз эритроцитов морской лисицы напрямую связана с их низкой внутриклеточной концентрацией АТФ. Кроме того, различия в активностях экто-нуклео-

тидаз эритроцитов хрящевых и костистых рыб могут быть обусловлены особенностями белкового, жирового и фосфолипидного состава их плазматических мембран. Наши исследования показали, что плазматическая мембрана морской лисицы имела большую величину белково-липидного отношения (1.9) по сравнению со скорпеной (1.1) [27]. Возможно, это обусловлено более высоким содержанием белка в плазматических мембранах эритроцитов ската (65%) по сравнению с содержанием белка (53%) у скорпены. Плазматическая мембрана скорпены имела не только более высокое содержание липидов, но и, как уже указывалось выше, более высокий уровень насыщенных жирных кислот. Это свидетельствовало о том, что плазматическая мембрана эритроцитов скорпены обладала меньшей деформационной способностью, по сравнению с плазматической мембраной ската. Прямая корреляция между содержанием насыщенных жирных кислот и активностью фермента плазматических мембран эритроцитов хрящевых и костистых рыб может указывать на возможное участие экто-фермента за счет теплового гидролиза АТФ в изменении локальных деформационных свойств мембран эритроцитов рыб [9]. Такие изменения деформационных свойств эритроцитов особенно востребованы в капиллярном отделе кровотока, где сопротивление движению клеток максимально, а давление крови имеет минимальные значения. Механическая деформация и рост гипоксии являются факторами, стимулирующими выход АТФ из эритроцитов в плазму крови. Локальная концентрация АТФ, с учетом микронных слоев плазмы между эритроцитом и стенкой капилляра, может существенно превышать средневзвешенную ее концентрацию для всей крови рыб в целом (3.0 мкМ) [8]. Поэтому именно в капиллярном отделе кровотока при последовательном, в цепочке друг за другом, “корпускулярном” движении эритроцитов, экто-АТФазы эритроцитов должна быть максимально активна. Крупные эритроциты *R. clavata*, бесспорно, должны иметь большие трудности при проходе в капиллярном отделе кровотока. Проблему может усугублять неспособность сердца этих рыб создавать высокое внутрисосудистое кровяное давление. Тем не менее, эти эритроциты без особых затруднений преодолевают капиллярный отдел, хотя их скорость движения уступает скорости движения клеток у костистых рыб [18]. Вспомогательные механизмы, обеспечивающие преодоление капилляров крупными ядерными эритроцитами рыб, неизвестны. В связи с этим нами было показано, что высокая активность экто-АТФазы эритроцитов рыб сопряжена с выделением тепла на поверхности их мембран [28]. Возможно, тепловой гидролиз АТФ, за счет работы экто-АТФазы, может обеспечивать, например, изменение количества водных пор в мембране, и вызывать перераспределение воды в системе плазма—

эритроциты и тем самым понижать вязкость плазмы в капиллярном отделе кровотока [29]. Этот разогрев, вероятно, может также обеспечивать повышение проницаемости плазматической мембраны эритроцитов для ионов Ca^{2+} . Вход Ca^{2+} в эритроциты может изменять упругие свойства их цитоскелета и играть важную роль в восстановлении формы эритроцитов (гиперупругость) после деформационных нагрузок [30]. Во всяком случае реакция теплового гидролиза АТФ на поверхности эритроцита может отражать участие экто-АТФаз в механизмах обеспечения эффекта Фарреуса-Лингквиста [9]. Причины, вызывающие двадцатикратное падение вязкости крови у позвоночных в капиллярах, диаметром менее 300 мкм, пока не находят рационального объяснения и остаются местом поиска вероятных “участников” этого процесса и активных дискуссий вокруг новых предположений и гипотез.

Полученные данные о биохимических свойствах и кинетических характеристиках экто-АТФаз плазматических мембран эритроцитов *R. clavata* показали достаточно большую сопоставимость их свойств с экто-нуклеотидазами плазмид гомойотермных животных и человека [17]. Это может свидетельствовать о том, что функциональные характеристики фермента были заложены еще на ранних этапах эволюции. Столь раннее приобретение отражает важность этих ферментов для функционирования эритроцитов позвоночных и всей системы крови в целом. В соответствии со своими свойствами экто-АТФазу морской лисицы можно отнести к эктонуклеозидтрифосфат/дифосфогидролазе I типа. Дальнейшие исследования дадут более точный ответ на системную принадлежность экто-АТФаз плазматических мембран эритроцитов рыб.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы гос. задания № АААА-А19-119012490045-0 Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Венкстern Т.В., Энгельгардт В.А. Поверхностно-локализованная аденозин-полифосфатаза ядерных эритроцитов. Докл. Акад. Наук СССР. 102(1):

- 133–136. 1955. [Venkstern T.V., Engelgardt V.A. Adenosine-polyphosphatase of surfaces of nuclear erythrocytes. Dokl Akad Nauk SSSR. 1955 102(1): 133–136. (in Russ)].
2. Zimmermann H., Zebisch M., Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic Signal. 8: 437–502. 2012.
 3. Bencic D.C., Yates T.J., Ingermann R.L. Ecto-ATPase activity of vertebrate blood cells. Physiol. Zool. 70(6): 621–630. 1997.
 4. Trams E.G., Lauter C.J., Jr N.S. Interspecies variation of divalent cation-activated ecto-ATPases. Comp. Biochem. Physiol. 69(B): 195–199. 1981.
 5. Силкин Ю.А., Силкина Е.Н. Mg²⁺-зависимая экто-АТФаза плазматической мембраны эритроцитов скорпены (*Scorpaena porcus*). Биохимические свойства и некоторые кинетические характеристики. Ж. эвол. биохим. и физиол. 36(5): 401–405. 2000. [Silkin Y.A., Silkina E.N. Mg-Dependent ecto-ATPase in the erythrocyte plasma membrane of *Scorpaena porcus*: biochemical properties and kinetic parameters. J. Evol. Biochem. Physiol. 36(5): 401–405. 2000. (in Russ)].
 6. Gerasimovskaya E., Kaczmarek E. (Eds.) Extracellular ATP and adenosine as regulators of endothelial cells function. Implication for health and disease. Springer Science + Business Media B.V. 2010.
 7. Ellsworth M.L., Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A.H., Ditrich H.H., Sprague R.S. Erythrocytes: Oxygen sensors and modulators of vascular tone in regions of low PO₂. Physiology (Bethesda). 24: 107–116. 2009.
 8. Jensen F.B. The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow. J. Exp. Biol. 212: 3387–3393. 2009.
 9. Силкин Ю.А., Силкина Е.Н. Роль экто-АТФаз плазматических мембран эритроцитов в гемодинамике рыб. Ж. эвол. биохим. и физиол. 53(1): 62–74. 2017. [Silkin Y.A., Silkina E.N. The role of ecto-ATPases of erythrocyte plasma membrane in hemodynamics of fishes. J. Evol. Biochem. Physiol. 53(1): 69–84. 2017].
 10. Силкин Ю.А., Силкина Е.Н., Черняева В.Н., Василец В.Е. Исследование размерных характеристик и морфологических особенностей эритроцитов у некоторых черноморских рыб разного эволюционного положения и экологической специализации. Вопросы ихтиологии. 59(1): 87–93. 2019. [Silkin Y.A., Silkina E.N., Chernyaeva V.N., Vasilets V.E. Study of dimensional and morphological characteristics of erythrocytes in some black sea fish of different evolution position and ecological specialization. Journal of Ichthyology. 59(1): 97–103. 2019].
 11. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Савина Г.В. Сравнительная характеристика свойств Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитов человека и карпа *Cyprinus carpio*. Ж. эвол. биохим. и физиол. 20(2): 167–173. 1984. [Kazennov A.M., Maslova M.N., Savina G.V. Comparative characteristics of the properties of erythrocyte Na, K-ATPase in man and the carp *Cyprinus carpio*. J. Evol. Biochem. Physiol. 20(2): 167–173. 1984. (in Russ)].
 12. Казеннов А.М., Маслова М.Н. Особенности активации детергентами Na, K-аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных. Ж. эвол. биохим. и физиол. 16(5): 430–436. 1980. [Kazennov A.M., Maslova M.N. Features of vertebrate brain Na, K-adenosine triphosphatase activation by detergents. J. Evol. Biochem. Physiol. 16(5): 430–436. 1980 (in Russ)].
 13. Pinsky D.J., Broekman M.J., Peschon J.J., Stocking K.L., Fujita T., Ramasamy R., Connolly E.S., Jr, Huang J., Kiss S., Zhang Y., Choudhri T.F., McTaggart R.A., Liao H., Drosopoulos J.H.F., Price V.L., Marcus A.J., Maliszewski C.R. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. J. Clin. Invest. 109: 1031–1040. 2002.
 14. Венкстern Т.В., Энгельгардт В.А. Распространение экто-аденозинполифосфатазы и характеристика некоторых ее свойств. Биохимия. 22(5): 911–916. 1957. [Venkstern T.V., Engel'gardt V.A. Distribution of ecto-adenosinpolyphosphatase and characteristics of certain of its properties. Biokhimiia. 22(5): 911–916. 1957. (in Russ)].
 15. Chen W., Guidotti G. Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. Biochem Biophys. Res. Commun. 282: 90–95. 2001.
 16. Papanikolaou A., Papafotika A., Murphy C., Papamarcaki T., Tsolas O., Drab M., Kurzchalia T.V., Kasper M., Christoforidis S. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. J. Biol. Chem. 280: 26406–26414. 2005.
 17. Kukulski F., Lévesque S.A., Lavoie É.G., Lecka J., Bigonnesse F., Knowles A.F., Robson S.C., Kirley T.L., Sévigny J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTP-Dase 1, 2, 3 and 8. Purinergic Signal. 1: 193–204. 2005.
 18. Шмидт-Нильсен К. Физиология животных. Приспособление и среда кн. 1. М.: Мир. 1982. [Schmidt-Nielsen K. Animal physiology. Adaptation and environment. Cambridge, London, New York, Melbourne. 1979 (Russ. Ed. Schmidt-Nielsen K. Fiziologiya zhivotnykh. Prispособlenie i sreda kn.1. Moscow: Mir. 1982)].
 19. Sorensen P.G. The Mg²⁺-dependent ATPase from the erythrocyte plasma membrane of the flounder *Platichthys flesus* L. general properties and some observations on the steady state kinetics. Comp. Biochem. Physiol. 75B(1): 153–161. 1983.
 20. Силкин Ю.А. Исследование пассивной проницаемости эритроцитов хрящевых и костистых рыб Черного моря для ионов натрия и калия. Автореф. канд. дис. Л. 1989. [Silkin Y.A. Issledovanie passivnoy proniczaemosti eritrocitov xryashhevyyh i kostistyx ryb Chernogo morya dlya ionov natriya i kaliya. [Study of passive penetration of Black Sea cartilage and bony fish erythrocytes for sodium and potassium ions. PhD thesis Biol. Sci.] Avtoref. kand. dis. L. 1989. (in Russ)].
 21. Проссер Л. Обмен воды: осмотический баланс, гормональная регуляция. В книге Сравнительная физиология животных. под ред. Л. Проссера. Т. 1: 27–161. М. Мир. 1977. [Prosser C.L. Water exchange: osmotic balance, hormonal regulation. In book Comparative animal physiology. Part 1: 27–161. Philadelphia: W.B. Saunders. 1973. (Russ. Ed. Prosser C.L. Sravnitel'naya fiziologiya zhivotnyh. Moscow. Mir. 1977)].

22. *Vaziri N.D.* Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol.* 24(5): 469–473. 2004.
23. *Hughes G.M.* On the respiration of *Torpedo marmorata*. *J. exp. Biol.* 73: 85–105. 1978.
24. *Силкин Ю.А., Коротков С.М., Силкина Е.Н.* Исследование биоэнергетических особенностей эритроцитов черноморских рыб – морского кота (*Dasyatis pastinaca* L.) и скорпены (*Scorpaena porcus* L.). *Биофизика.* 62(3): 540–546. 2017. [*Silkin Y.A., Silkina E.N., Korotkov S.M.* The study of the bioenergetic characteristics of the red blood cells of Black Sea fish: the common stingray (*Dasyatis pastinaca* L.) and black scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) *Biophysics.* 62(3): 434–439. 2017. (in Russ)].
25. *Leray C.* Patterns of purine nucleotides in fish erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 64(B): 77–82. 1979.
26. *Новицкая В.Н., Солдатов А.А., Парфенова И.А.* Функциональная морфология, сопряжение мембранных и метаболических функций у ядерных эритроцитов *Scorpaena porcus* L. в условиях экспериментальной гипоксии. *Доповіді Національної академії наук України.* 10: 131–135. 2011. [*Novitskaya V.N., Soldatov A.A., Parfyonova I.A.* Functional morphology, coupling of membrane and metabolic functions in *Scorpaena porcus* L. nuclear erythrocytes under experimental hypoxia conditions. *Doklady Nacionalnoj akademii nauk Ukrainy.* 10: 131–135. 2011. (in Russ)].
27. *Силкин Ю.А., Круглова Э.Э.* Белково-липидный состав плазматических мембран эритроцитов рыб – морской лисицы и скорпены. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 27(4): 422–426. 1991. [*Silkin Yu.A., Kruglova E.E.* Protein-lipid composition of plasma membranes of fish erythrocytes – sea fox and scorpens. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 27(4): 422–426. 1991. (in Russ)].
28. *Силкин Ю.А., Столбов А.Я., Силкина Е.Н., Силкин М.Ю.* Динамика теплопродукции эритроцитов скорпены *Scorpaena porcus*, Linnaeus, 1758 (*Scorpaeniformes*) in vitro. *Биология моря.* 43(2): 133–138. 2017. [*Silkin Y.A., Stolbov A.Y., Silkin E.N., Silkin M.Y.* The dynamics of heat production in erythrocytes of the scorpion fish (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758) in vitro. *Russian Journal of Marine Biology.* 43(2): 133–138. 2017 (in Russ)].
29. *Katiukhin L.N.* About a mechanism of the Fahraeus-Lindqvist effect. *J. Blood Disorders Transf.* 5(5): 211–213. 2014.
30. *Larsen F.L., Katz S., Roufogalis B.D., Braoks D.E.* Physiological shear stress enhance the calcium ion permeability of human erythrocytes. *Nature.* 294: 667–668. 1981.

A Study of Some Biochemical Properties of Ecto-ATPase in Erythrocytes of the Black Sea Thornback Ray *Raja clavata* L.

Yu. A. Silkin^{a,#}, E. N. Silkina^a, and M. Yu. Silkin^a

^a *T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve, Branch of the A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Crimea, Feodosia, Kurortnoye, Russia*

[#]*e-mail: ysilkin@mail.ru*

Biochemical properties and some kinetic characteristics of whole-erythrocyte ecto-ATPase (EC 3.6.1.5) were studied in the Black Sea thornback ray *Raja clavata* L. It was shown that enzyme activity varied from 1.5 to 3.5 nmol P_n /min/ μ L of packed cells and peaked in the presence of 3.0–6.0 mM Mg^{2+} . Ecto-ATPase exhibited broad substrate specificity towards cleaving nucleoside triphosphates. The enzyme was tolerant to changes in ambient pH and exhibited maximum activity in the pH range from 5.5 to 7.7. The enzyme also showed high substrate affinity, with the Michaelis constant (K_M) found to be $12.0 \pm 1.0 \mu$ M and V_{max} being 2.35 ± 0.2 nmol P_n /min/ μ L of packed cells. Erythrocyte ecto-ATPase in *R. clavata* was resistant to keeping erythrocytes at 4°C for 4 days and exhibited tolerance to high concentrations of urea.

Keywords: Mg^{2+} -dependent ecto-ATPase, plasma membrane, erythrocytes, fish