

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ АЗИДА, ФТОРИДА, ОРТОВАНАДАТА И ЭДТА НАТРИЯ НА ЭКТО-АТФАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ СКОРПЕНЫ (*SCORPAENA PORCUS* L.) И МОРСКОЙ ЛИСИЦЫ (*RAJA CLAVATA* L.)

© 2021 г. Ю. А. Силкин^{1,*}, Е. Н. Силкина¹, М. Ю. Силкин¹

¹ Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», Феодосия, Россия

*e-mail: ysilkin@mail.ru

Поступила в редакцию 15.04.2021 г.

После доработки 23.05.2021 г.

Принята к публикации 29.05.2021 г.

Исследовали влияние солей азидата, фторида, ортованадата и ЭДТА натрия на экто-АТФазную активность эритроцитов скорпены (*Scorpaena porcus* L.) и морской лисицы (*Raja clavata* L.). Показано, что в ответ на воздействие миллимолярных (мМ) концентраций выбранных биохимических агентов выявлены значительные различия гидролитической активности экто-АТФаз плазматической мембраны эритроцитов хрящевых и костистых рыб. Так, экто-АТФаза эритроцитов морской лисицы была практически нечувствительна к действию азидата натрия. Напротив, экто-АТФаза эритроцитов скорпены была чувствительна к действию азидата натрия, который при 20 мМ концентрации на 65% блокировал активность фермента. Фермент эритроцитов ската сохранял значительную активность (37%) при высоких (60 мМ) концентрациях фторида натрия, а экто-АТФаза эритроцитов скорпены при этой концентрации блокировалась почти полностью. ЭДТА выступал как модификатор активности экто-АТФазы морской лисицы: при концентрации его до 6 мМ активно блокировался гидролиз АТФ (на 58%), а при более высоких концентрациях происходила стимуляция (до 20%) активности экто-АТФазы. Увеличение концентрации ЭДТА (до 12 мМ) в суспензиях эритроцитов скорпены постоянно стимулировало ингибиторный эффект комплексона (до 52% от контроля). Ортованадат слабо блокировал активность экто-АТФаз эритроцитов исследованных рыб. Указанные различия отражают большую толерантность экто-АТФаз эритроцитов морской лисицы, к действию взятых в опыты химических реагентов по сравнению со скорпеной. Отсутствие ингибирующего эффекта азидата натрия на экто-АТФазу эритроцитов морской лисицы позволяет предположительно отнести эту экто-НТФДазу к семейству экто-НТФДаз 2-го типа, тогда как экто-НТФДаз эритроцитов скорпены к экто-НТФДазам 1-го типа,

Ключевые слова: рыбы, эритроциты, экто-АТФазы, натриевые соли азидата, фторида, ортованадата, ЭДТА

DOI: 10.31857/S0044452921050077

Хорошо известно, что эритроциты позвоночных выделяют АТФ во внеклеточное пространство либо в виде патологического или физиологического ответа на деформацию и стресс [1]. Установлено, что АТФ и другие макроэргические фосфаты пурин-пиримидиновой природы, взаимодействуя с P2X и P2Y рецепторами, являются важными регуляторами межклеточных коммуникаций. Выделенная, внеклеточная АТФ и другие макроэргические фосфаты разрушаются в крови рыб за счет активности экто-нуклеотидазы эритроцитов и других экто-ферментов клеток кровеносной системы. Поэтому экто-нуклеотидазы являются основными регуляторами уровня выделенных эритроцитами в плазму крови межклеточных медиаторов и обеспечивают «выключение» сигнала, вызванного взаи-

модействием сигнальной молекулы и рецептора [2]. Наши ранние исследования свойств экто-нуклеотидазы эритроцитов скорпены (*Scorpaena porcus* L.) и ската — морской лисицы (*Raja clavata* L.) показали, что фермент имел высокую ферментативную активность (6.4 и 3.0 ммоль Φ_n /мин/мл эритроцитов соответственно). Экто-АТФаза была наделена широкой субстратной специфичностью, имела широкий диапазон pH оптимума, требовала для проявления своей максимальной активности присутствия двухвалентных катионов Ca^{2+} или Mg^{2+} [3, 4]. Все найденные ранее свойства указывали на то, что экто-нуклеотидаза эритроцитов рыб относится к ферментам семейства Е-типа, которые часто в литературе называют экто-АТФазами, экто-апиразами, нуклеозидтрифосфат-дифосфо-гидролаза-

ми (НТФДазы). Ингибиторный анализ является важным инструментом исследования свойств ферментов. В отношении экто-нуклеотидаз это особенно актуально, так как поиск специфических ингибиторов позволит упорядочить классификацию энзимов, выявить особенности их строения. В прикладном аспекте, как показали недавние исследования, это может иметь выходы на полезные терапевтические эффекты. Так, НТФДазы эритроцитов и других форменных элементов отвечают за уровень нуклеозиддифосфатов в плазме крови и тем самым регулируют тромбoreгуляторную функцию крови и функцию сосудистого тонуса. Изменение внеклеточных нуклеотидов и аденозина может увеличивать или уменьшать активность P1 и P2 рецепторов и тем самым открывает перспективу использования различных веществ в качестве иммунномоделирующих, противораковых агентов, а также лечения расстройств сердечно-сосудистой и нервной системы. Многие патогенные организмы содержат экто-АТФазы, которые за счет влияния на внеклеточную концентрацию АТФ способны нарушать иммунные ответы хозяина. Поэтому экто-АТФазы патогенных организмов являются привлекательными мишенями для воздействия на них лекарственных средств [5]. Е-АТФазы по способности подвергаться воздействию миллимолярных концентраций азидата натрия (NaN_3) были разделены на два подсемейства: чувствительные и нечувствительные к действию ингибитора [6]. Азид является хорошо известным ингибитором митохондриальной АТФазы и цитохром с оксидазы [7]. В связи с этим важно было понять наличие влияния NaN_3 на активность экто-нуклеотидаз эритроцитов рыб и действие выбранных реагентов на другие энергетические пути в клетке. В этих исследованиях мы попытались оценить влияние на активность экто-АТФазы эритроцитов рыб фторида (NaF) и ортованадата (Na_3VO_4) натрия, которые, как известно, являются ингибиторами гликолиза. Важной характеристикой фермента является изучение воздействия на его активность ЭДТА динатриевой соли, которая осуществляет связывание двухвалентных катионов, необходимых для процесса ферментативного гидролиза АТФ. Таким образом, в задачи настоящего исследования входило изучение влияния на активность экто-АТФаз эритроцитов рыб азидата, фторида, ортованадата и ЭДТА натрия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использовали два вида рыб — скат, морская лисица (*Raja clavata* L.) и скорпена (*Scorpaena porcus* L.). Рыб отлавливали в прибрежной акватории Карадагской бухты (Юго-восточный Крым), используя для поимки скатов донные снасти с крючками, а для скорпены — донные сети. Отловленных рыб помещали в бассейны с морской

водой с искусственной аэрацией. Скатыв содержались в бассейне объемом 25000 л, а скорпена — в бассейнах 1000 л. Забор крови проводили после недельной акклимации рыб в бассейнах. У ската кровь отбирали пункцией сердца, а у скорпены — пункцией хвостовой вены. Условия содержания рыб и все процедуры по отбору образцов соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, международным, национальным и/или институциональным принципам. Отобранную кровь сразу помещали в охлажденный физиологический раствор в соотношении 1:20. Состав физиологического раствора для ската (мМ): 220 NaCl + 400 мочевины + 10 Tris HCl + 5 Ед/мл гепарин ($\text{pH} = 7.3\text{--}7.4$); для скорпены (мМ): 180 NaCl + 10 Tris HCl + 5 Ед/мл гепарин ($\text{pH} = 7.3\text{--}7.4$). Эритроциты от надосадочной жидкости отделяли путем центрифугирования на центрифуге К-23 (Германия) в течение 10 мин при относительном центробежном ускорении ротора ($\text{RCF} = \text{relative centrifugal field}$) 377–671 g и температуре $+4^\circ\text{C}$. Надосадочную жидкость отсасывали, а полученные клетки разводили до гематокрита (Ht) = 0.05–0.07, полученную суспензию клеток использовали в экспериментах.

Для изучения воздействия биохимических агентов инкубацию подготовленных суспензий эритроцитов скорпены и ската проводили в средах с конечной концентрацией (мМ): азидата натрия (NaN_3) — 2.5, 5, 10, 15, 20; фторида натрия (NaF) — 10, 20, 30, 40, 50, 60; ЭДТА — 2, 4, 6, 8, 10; ортованадата натрия (Na_3VO_4) — 1, 2, 3, 4, 5.

Для определения активности экто-АТФазы в цельных эритроцитах использовали методику А. Казеннова и соавт. [8]. Инкубационная среда для определения активности экто-АТФазы эритроцитов скорпены содержала в конечной концентрации (мМ) следующие ингредиенты: 125 NaCl + 5 KCl + 6 MgCl_2 + 50 Tris-HCl , pH 7,4; для эритроцитов ската: 400 мочевины + 135 NaCl + 5 KCl + 6 MgCl_2 + 50 Tris-HCl , pH 7, 4. В инкубационных пробирках смешивали 0.1 мл инкубационной среды, 0.1 мл H_2O (контроль) или 0.1 мл раствора ингибитора, 0.1 мл раствора АТФ- Na_2 до концентрации 0.5 мМ. Реакцию запускали добавлением 0.1 мл суспензии эритроцитов. Температура инкубации в стандартных условиях и при определении кинетических констант составляла $+20^\circ\text{C}$. Реакцию останавливали добавлением 0.2 мл 20%-ной ТХУ. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при $\text{RCF} = 1958$ g. В надосадочной жидкости по модифицированному А. Казенновым и М. Масловой [9] методу Чена и соавт. [10] определяли содержание неорганического фосфата, по накоплению которого судили об активности фермента. Активность экто-АТФазы выражали в нмоль Φ_{H} /мин/мкл упакованных клеток. При сравнении эффективности ингибиторного воздействия для

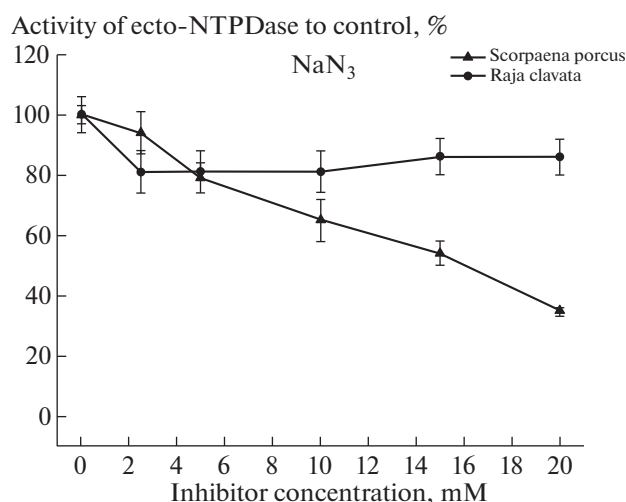


Рис. 1. Динамика изменения активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб (%) при воздействии мМ концентраций азиды натрия (NaN_3).

каждого действующего вещества рассчитывали концентрацию 50% ингибирования активности экто-АТФазы эритроцитов рыб (I_{50}). Для удобства сравнительного анализа воздействия выбранных солей на экто-АТФазную активность эритроцитов рыб все графики выполнены с использованием процентного изменения активности фермента относительно активности физиологического оптимума энзима (контроль).

Во всех экспериментах использовали стандартные методы статистической обработки результатов. Все результаты представлены в виде $x \pm S_x$. Достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1 и на рис. 1–4. Как видно в табл. 1 и на рис. 1 азид натрия (NaN_3) по-разному воздействовал на активность экто-АТФазы эритроцитов у скорпены и морской лисицы. У скорпены при нарастании концентрации ингибитора активность фермента падала примерно пропорционально величине действующей концентрации. На графике это падение имело вид практически прямой линии с максимумом снижения активности на 65% от исходной, при действующей концентрации азиды в 20 мМ (рис. 1). Концентрация ингибитора (NaN_3), при которой активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены составляла половину от ее контрольного уровня (I_{50}), оказалась равной 15 мМ (табл. 1).

У морской лисицы ингибирующий эффект азиды (на 19%) отмечен только на фоне добавления начальной концентрации (2.5 мМ) агента. Дальней-

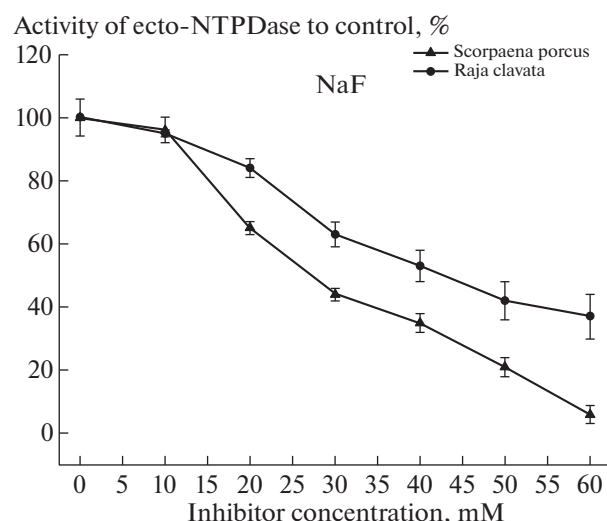


Рис. 2. Динамика изменения активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб (%) при воздействии мМ концентраций фторида натрия (NaF).

шее увеличение концентрации NaN_3 не приводило к изменению активности экто-АТФазы эритроцитов ска- (рис. 1), что свидетельствовало об отсутствии чувствительности фермента к этому реагенту.

Ингибирующий эффект фторида натрия (NaF) на экто-АТФазную активность эритроцитов скорпены имел нелинейный характер (рис. 2). Незначительное снижение (на 4%) активности фермента при 10 мМ концентрации фторида сменялось его стремительным падением при увеличении его концентрации. Наиболее значительное снижение уровня активности фермента наблюдалось при концентрации фторида в 20 и 30 мМ (65% и 44% от исходного уровня соответственно). Дальнейшее увеличение концентрации реагента приводило к замедлению падения активности фермента. При 40 мМ концентрации NF уровень активности фермента составлял 35% от контрольного уровня, а при 50 мМ концентрации активность экто-АТФазы не превышала 21%. При 60 мМ концентрации фторида натрия активность энзима составляла всего 6% от исходного уровня, что свидетельствовало о высокой эффективности ингибирующего воздействия NaF (рис. 2).

Влияние NaF на активность экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы имело сходные черты с его воздействием на активность экто-фермента эритроцитов скорпены. Однако в эритроцитах ска-та падение активности фермента под действием фторида было менее стремительным. Так, при 30 мМ концентрации фторида снижение активности экто-АТФазы составляло 37% от контрольного уровня, а при 60 мМ концентрации реагента активность фермента снижалась на 63%. Остаточная ак-

Таблица 1. Влияние различных ингибиторов на активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены и морской лисицы

Вид	Ингибитор	Концентрация ингибитора (мМ)	Активность (нмольФн/мин/мкл)	Активность в (%) к контролю	Число опытов	I ₅₀ (мМ)
СКОРПЕНА (SCORPAENA PORCUS L.)	NaN ₃ (азид натрия)	0 (контроль)	4.8 ± 0.3	100 ± 6	7	15
		2.5	4.5 ± 0.3	94 ± 7	7	
		5	3.8 ± 0.2	79 ± 5	7	
		10	3.1 ± 0.2*	65 ± 7	7	
		15	2.6 ± 0.1*	54 ± 4	7	
		20	1.7 ± 0.02*	35 ± 1	7	
	NaF (фторид натрия)	0 (контроль)	4.8 ± 0.3	100 ± 6	7	37
		10	4.6 ± 0.2	96 ± 4	5	
		20	3.1 ± 0.2	65 ± 6	6	
		30	2.1 ± 0.05*	44 ± 2	6	
		40	1.7 ± 0.04*	35 ± 2	6	
		50	1.0 ± 0.03*	21 ± 3	6	
		60	0.3 ± 0.01*	6 ± 3	6	
	ЭДТА	0 (контроль)	4.8 ± 0.3	100 ± 6	7	12
		2	4.7 ± 0.3	98 ± 4	7	
		4	3.8 ± 0.2	79 ± 3	7	
		6	3.2 ± 0.2	67 ± 6	7	
		8	2.9 ± 0.1*	60 ± 3	7	
		10	2.7 ± 0.1*	56 ± 4	7	
		12	2.3 ± 0.08*	48 ± 3	7	
	Na ₃ VO ₄ (ортованадат натрия)	0 (контроль)	5.0 ± 0.2	100 ± 4	7	
		1	4.9 ± 0.3	98 ± 6	7	
		2	4.8 ± 0.1	96 ± 2	7	
		3	4.3 ± 0.1	86 ± 2	7	
		4	4.4 ± 0.2	88 ± 5	7	
		5	4.7 ± 0.1	94 ± 2	7	
МОРСКАЯ ЛИСИЦА (RAJA CLAVATA L.)	NaN ₃ (азид натрия)	0 (контроль)	3.7 ± 0.1	100 ± 3	7	—
		2.5	3.0 ± 0.2	81 ± 7	7	
		5	3.0 ± 0.2	81 ± 7	7	
		10	3.0 ± 0.2	81 ± 7	7	
		15	3.2 ± 0.2	86 ± 6	7	
		20	3.2 ± 0.2	86 ± 6	7	
	NaF (фторид натрия)	0 (контроль)	3.8 ± 0.2	100 ± 6	7	51
		10	3.6 ± 0.05	95 ± 1	7	
		20	3.2 ± 0.1	84 ± 3	7	
		30	2.4 ± 0.1	63 ± 4	7	
		40	2.0 ± 0.1*	53 ± 5	7	
		50	1.6 ± 0.1*	42 ± 6	7	
		60	1.4 ± 0.1*	37 ± 7	7	

Таблица 1. Окончание

Вид	Ингибитор	Концентрация ингибитора (мМ)	Активность (нмольФн/мин/мкл)	Активность в (%) к контролю	Число опытов	I ₅₀ (мМ)
	ЭДТА	0 (контроль)	3.9 ± 0.2	100 ± 5	7	4
		2	3.6 ± 0.2	92 ± 6	5	
		4	1.95 ± 0.1*	50 ± 5	5	
		6	1.65 ± 0.1*	42 ± 6	5	
		8	1.9 ± 0.1*	49 ± 5	5	
		10	2.1 ± 0.1*	54 ± 5	5	
		12	2.4 ± 0.1	62 ± 4	5	
	Na ₃ VO ₄ (ортованадат натрия)	0 (контроль)	3.4 ± 0.2	100 ± 6	5	
		1	2.9 ± 0.1	85 ± 3	5	
		2	2.6 ± 0.1	77 ± 4	5	
		3	2.5 ± 0.1	74 ± 4	5	
		4	2.5 ± 0.1	74 ± 4	5	
		5	2.4 ± 0.1	71 ± 4	5	

Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем $p < 0.05$.

тивность экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы при 60 мМ концентрации NF была в 6 раз выше, чем у скорпены и составляла 37% от контрольного уровня (рис. 2, табл. 1). На более высокую ингибирующую активность фторида натрия в отношении экто-АТФазы эритроцитов скорпены указывает его I₅₀ (37 мМ), что почти в 1.4 раза меньше, чем I₅₀ для эритроцитов морской лисицы (51 мМ) (табл. 1).

Воздействие ЭДТА на активность экто-ферментов у исследованных костистых и хрящевых рыб также имело свои особенности. При возрастании концентрации ЭДТА до 6 мМ комплексон вызывал торможение активности экто-АТФазы эритроцитов как у скорпены, так и у морской лисицы (табл. 1, рис. 3). Однако ингибирующий эффект ЭДТА у эритроцитов морской лисицы был более выражен и, уже при 4 мМ концентрации ЭДТА, активность фермента снижалась на 50% от контрольного уровня. В эритроцитах скорпены при нарастании концентрации ингибитора от 2 до 12 мМ снижение активности происходило медленнее и 50% ингибирование (I₅₀) наступало при концентрации ингибитора в 12 мМ. В отличие от скорпены у морской лисицы, начиная с 8 мМ концентрации ЭДТА, происходило увеличение активности фермента, который к 12 мМ уровню реагента составлял 62% от контроля (рис. 3). Таким образом, у морской лисицы ЭДТА в зависимости от действующей концентрации вызывал как ингибирование, так и стимулирование активности экто-АТФазы плазматической мембраны ее эритроцитов. У скорпены подобный эффект не наблюдался.

Результаты действия ортованадата натрия представлены в табл. 1 и на рис. 4. Как видно из представленных данных действие ортованадата на активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены подобно действию ЭДТА на экто-фермент красных клеток крови морской лисицы (рис. 3). При низких концентрациях (1–3 мМ) ортованадат вызывал слабое ингибирование фермента, максимум активности которого составлял 86% при 3 мМ концентрации этого реагента. При дальнейшем увеличении концентрации Na₃VO₄ (4 и 5 мМ) наблюдалась

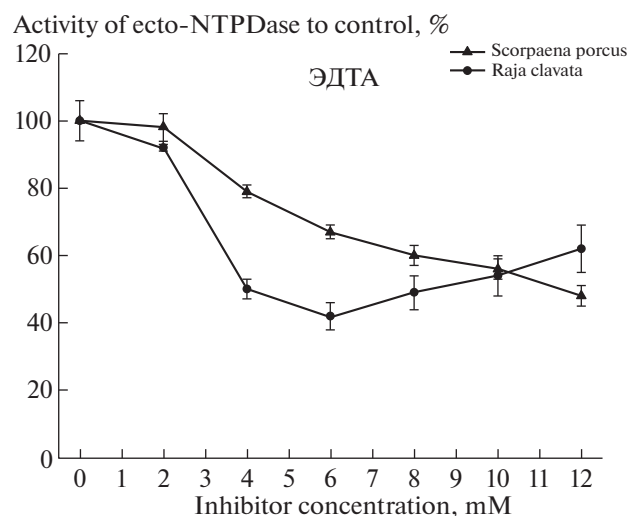


Рис. 3. Динамика изменения активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб (%) при воздействии мМ концентраций ЭДТА.

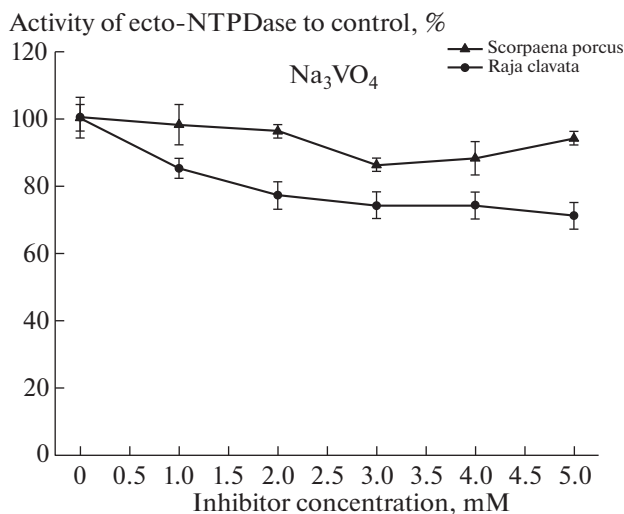


Рис. 4. Динамика изменения активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб (%) при воздействии mM концентраций ортованадата натрия (Na_3VO_4).

стимуляция активности экто-АТФазы, которая на фоне 5 mM концентрации ортованадата натрия составляла 94% от исходного уровня.

Ортованадат в эритроцитах морской лисицы, по мере возрастания его концентрации, также как и у скорпены, слабо ингибировал экто-АТФазную активность. Максимум ингибиторного эффекта при 5 mM концентрации ортованадата составлял 29% и был несколько выше у морской лисицы, чем у скорпены (24%). Ортованадат натрия у морской лисицы не вызывал повышения активности при высоких концентрациях в среде инкубации и не выступал как модификатор экто-нуклеотидазы ската (рис. 4, табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Азид натрия является хорошо известным ингибитором митохондриальной АТФазы ($F_1 F_o$) типа с $I_{50} \approx 0.04$ мкМ [7]. Так как NaN_3 ингибирует и водорастворимую АТФазу (F_1), был сделан вывод о том, что местом связывания ингибитора является F_1 субъединица фермента, часто называемая фактором сопряжения. Точный механизм взаимодействия ингибитора с фактором сопряжения неизвестен, однако считается, что азид действует через механизм стабилизации неактивной формы фермента — $F_1^* \cdot \text{АДФ} \cdot \text{Mg}$ [11]. Для определения в гомогенатах тканей активности АТФаз V- и P- типа, в реакционную смесь включают азид натрия (1–5 mM) для подавления митохондриальной активности в препаратах. В 1962 г. Джонесу и Эрнстеру при исследовании микросомальных препаратов печени крыс удалось выявить еще одну азинингибируемую АТФазу, не связанную с митохондри-

альным комплексом гепатоцитов [12]. Эта АТФаза отличалась по своим биохимическим свойствам от АТФазы ($F_1 F_o$), она была наделена широкой субстратной специфичностью и, кроме АТФ, могла гидролизовать и другие нуклеозидтрифосфаты (НТФ) и некоторые нуклеозиддифосфаты (НДФ), поэтому получила название НТФДифосфогидролаза (НТФДаза). Важным отличием найденной НТФДазы было то, что концентрация азидата натрия, необходимая для полумаксимального ингибирования активности фермента, была в mM диапазоне, что на порядок было больше концентрации NaN_3 , необходимой для I_{50} АТФазы ($F_1 F_o$). Доказательства того, что ингибированная азидом АТФаза встроена в плазматическую мембрану с наружной ее стороны, были получены в 90-х годах прошлого века [13]. В настоящее время известно, что АТФазы, активный центр которых, находится на поверхности мембраны, составляют одно семейство E-АТФаз (E — обозначает экто). Эти АТФазы характеризуются широкой субстратной специфичностью, необходимостью присутствия, для проявления активности ионов двухвалентных катионов Ca^{2+} или Mg^{2+} и практически полным отсутствием чувствительности к действию специфических ингибиторов АТФаз V и F — типа [14]. Трудности исследования экто-АТФаз обусловлены их высокой чувствительностью к инактивации детергентами. Поэтому попытки выделения экто-НТФДаз из мембран клеток часто заканчивались неудачами и только в 1992 г. гликопротеин фермента, из поперечных канальцев мышечных волокон кролика, был успешно очищен в чистом виде [15]. Дальнейшие исследования позволили выявить четыре экто-нуклеозид-трифосфат/дифосфогидролазы (НТФДаз), которые были разделены на подсемейства с порядковыми номерами 1, 2, 3 и 8 (НТФДаза 1, НТФДаза 2, НТФДаза 3, НТФДаза 8) [16]. В литературе нами не найдено примеров выделения чистых препаратов экто-НТФДаз из эритроцитов рыб, других позвоночных животных и человека.

Экто-НТФДазы хрящевых и костистых рыб демонстрировали разную чувствительность к действию mM концентраций азидата натрия (рис. 1). Экто-НТФДаза морской лисицы была малочувствительна к действию азидата, в то время как экто-АТФаза скорпены ингибировалась под действием азидата, демонстрируя довольно высокие значения $I_{50} = 15$ mM (табл. 1). Исходя из полученных данных, ввиду того что НТФДазы — 2-го типа других клеток вообще были нечувствительны к действию mM концентраций азидата натрия [17], экто-НТФДазы скорпены и морской лисицы могут быть отнесены к разным подсемействам. Экто-НТФДаза скорпены к экто-НТФДазам — 1-го типа, а морской лисицы — к экто-НТФДазам — 2-го типа. Линейный ход кривой ингибирования экто-НТФДазы эритроцитов скорпены азидом натрия свидетель-

ствовал о том, что ингибирование фермента носит дозозависимый характер. Возрастающая концентрация ингибитора пропорционально тормозила ферментативную активность экто-АТФазы, что свидетельствовало о достаточно высокой ингибирующей активности азидата в отношении экто-НТФДазы скорпены. Экто-НТФДазы эритроцитов ската проявляла высокую устойчивость к действию ингибитора и при возрастании его концентрации до 20 мМ, фермент стабильно сохранял активность на уровне 86% (см. табл. 1 и рис. 1). Причины такой стабильности неизвестны, но можно предположить, что активный центр экто-НТФДазы эритроцитов морской лисицы отличается от экто-фермента скорпены и возможно его устройство обеспечивает толерантность к присутствию высоких концентраций азидата натрия.

Фторид натрия достаточно эффективно ингибировал работу экто-АТФаз эритроцитов рыб при $I_{50} = 37$ мМ — для скорпены и $I_{50} = 51$ мМ — для морской лисицы (табл. 1). Поэтому фторид натрия можно отнести к высокоактивным ингибиторам [18], способным при мМ концентрациях блокировать работу экто-НТФДаз в эритроцитах рыб. Ход кривых ингибирования экто-НТФДаз у морской лисицы и скорпены имеют сходный характер. Тем не менее, ингибирование фермента у скорпены, при аналогичных условиях, было более значимым и при 60 мМ концентрации NaF активность энзима, блокировалась полностью (на 94%) (см. рис. 2).

Фторид натрия в мМ концентрациях является эффективным блокатором многих ферментов, включая и АТФазы [19]. Специальных исследований по определению механизма ингибирования фторидом натрия экто-НТФДаз нами в литературе найдено не было. Однако известно, что соединения фтора обладают высоким сродством к ионам ряда металлов и в частности к иону Ca^{2+} . Известно, что все экто-АТФазы функционируют в присутствии двухвалентных катионов Mg^{2+} или Ca^{2+} . Можно предположить, что хотя магний и не образует стабильных комплексов с фторид-ионом, но он может взаимодействовать с ним [20], вызывая изменение фермент-субстратного комплекса в виде ингибиторного эффекта. Кроме того, ионы фтора способны связываться с функциональными группами аминокислотных остатков в активном центре ферментов, что также вызывает их ингибирование. Таким же путем ингибируются активности $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{АТФазы}$ и ряда других фосфатаз [19]. Как показали исследования Н.И. Агалаковой и Г.П. Гусева [20], воздействие фторида натрия индуцирует апоптоз эритроцитов крыс. Как полагают исследователи, активация гибели эритроцитов происходит за счет увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , которую провоцирует фторид в результате активации неселективных Ca^{2+} -проницаемых каналов и ингибирования активности

мембранной Ca^{2+} -АТФазы. Кроме того, цитозольный Ca^{2+} вызывал, за счет активации Ca^{2+} активируемых- K^+ -каналов, резкое падение внутриклеточной концентрации ионов K^+ . Вместе с потерей K^+ происходил выход, осмотически связанной воды и сморщивание клеток, что в конечном счете приводило к гибели эритроцитов крыс.

Ингибиторный эффект *in vitro* высоких концентраций фторида натрия антиоксидантных (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза) ферментов показан на эритроцитах человека [21]. Отмечено дозозависимое ингибирование активностей указанных выше антиоксидантных ферментов, что вызывало рост активных форм кислорода (АФК) и формирование реакции окислительного стресса на мембранах и во внутриклеточном пространстве эритроцитов. Как полагают J. Gutierrez-Salinas и соавт. [22], это приводит к перекисному окислению липидов мембран, повреждению белковых макромолекул на поверхности и внутри клеток, падению энергетического метаболизма. Доказательством падения энергетического обмена в эритроцитах является наблюдаемое снижение внутриклеточной концентрации АТФ и АДФ под воздействием NaF [23]. Падение энергетического заряда эритроцитов обусловлено блокированием NaF-енолазы — одного из ключевых ферментов гликолиза. [24]. Однако в настоящее время получены данные о том, что енолаза не всегда является мишенью фторида [25]. Согласно современной гипотезе, гликолиз тормозится в результате внутриклеточного подкисления, которое возникает в процессе окислительного стресса индуцированного высокими концентрациями фторида натрия [26]. Кроме этого, фторид натрия дезорганизует работу митохондрий, вызывая падение мембранного потенциала и образования гигантской поры в их наружной мембране [27]. Это приводит к набуханию матрикса, разрыву наружной мембраны и выходу из митохондрий цитохрома c. Все это тормозит работу дыхательной цепи, подавляет синтез АТФ и, в конечном счете, ведет к развитию апоптоза и гибели клеток [28]. Таким образом, воздействие фторида натрия на эритроциты рыб носит многовекторный характер, следствие которого выражается в необратимом падении активности экто-НТФДаз на фоне окислительного стресса, внутриклеточного энергетического коллапса и, в конечном счете — гибели клеток.

Ортованадат натрия (Na_3VO_4) относится к соединению с широким спектром действия на различные ферменты живой клетки. Считается, что среди многочисленных неорганических солей пентавалентный ванадий является наиболее токсичным [29]. Показано, что ортованадат (VO_4^{3-}) в эритроцитах снижал скорость гликолиза, ингибируя активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [30]. Ванадат проявлял нейротоксичные

свойства, блокируя в нейронах работу холинэстеразы и Ca^{2+} , Mg^{2+} АТФазы [31]. В почечных канальцах ванадат ингибировал Na^+ , K^+ -АТФазу, что приводило к отеку и натрийурии [32]. Также ванадат является эффективным ингибитором экто-АТФаз эпителия куриного яйцевода [6] и поэтому использование его в настоящем исследовании можно считать вполне обоснованным. В наших исследованиях действие ортованадата на экто-НТФДазу эритроцитов рыб выражалось в значительном снижении активности фермента (рис. 3, табл. 1). Ферментативный ответ экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы был более выражен и его активность, после воздействия в 2 мМ концентрации, падала на 25%, оставаясь на этом уровне вне зависимости от последующего увеличения действующей концентрации ортованадата. Максимальный ингибиторный эффект на активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены наблюдался при 3 мМ концентрации реагента, а дальнейшее увеличение действующей концентрации ортованадата приводило к стимуляции активности фермента. Такое действие ортованадата можно рассматривать как модификацию активности фермента, а сам ортованадат следует рассматривать как модификатор активности экто-АТФазы, а не только как ее ингибитор. Эффекты, которые показывает ванадий, при воздействии на ферменты многообразны и зависят от типа ткани, собственных свойств фермента и даже концентрации ванадата [33]. Механизм действия ванадата на активность АТФаз до конца не расшифрован. Полагают, что тетраэдрический анион ванадата подобен фосфатному аниону и поэтому ванадат может взаимодействовать с различными физиологическими субстратами, с которыми функционирует анион фосфата. В общих чертах, ванадатная и фосфатная группы по своей тетраэдрической морфологии очень похожи сферическим распределением заряда во внешней сфере. Однако чистый ионный заряд этих ионов при pH, близкому к 7.0, отличается, что может приводить к различным взаимодействиям с электрофильными группами в активном центре АТФаз. Существуют и другие различия, основным из которых является восприимчивость ванадата к (одно-электронному) восстановлению, вследствие наличия низколежащих d орбиталей и координационных чисел больше 4, обычно 5 или 6. Следствием этого является генерация пяти- или шестикоординатных анионов, фиксации ванадата координацией к функциональным группам, обеспечиваемым аминокислотными боковыми цепями белков [34]. Таким образом, ванадат структурно может выступать конкурентом в занимаемых фосфором местах, в активных центрах ферментов и других местах. Кроме того, ванадат может связываться с АДФ и другими макроэргическими соединениями и тем самым влиять на активность АТФаз через модификацию захватываемых ими субстратов [35].

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота и ее динатриевая соль) относится к малотоксичным анионитам и ее главное свойство — образование устойчивых водорастворимых комплексов с ионами металлов. Экто-НТФДазы в качестве субстрата используют двухкомпонентный $\text{Mg}^{2+}(\text{Ca}^{2+})$ -АТФ [11]. ЭДТА- Na_2 препятствует формированию металл-нуклеозид-трифосфатного комплекса и тем самым является ингибирующим фактором, способным блокировать гидролиз экто-ферментами макроэргических фосфатов. ЭДТА была использована в качестве мощного ингибитора поверхностных НТФДаз еще в самом раннем периоде изучения экто-энзимов. Так, в 1957 г. Т.В. Венкстерну и В.А. Энгельгардту [36] при помощи 1 мМ ЭДТА удалось полностью блокировать экто-АТФазу эритроцитов голубя и доказать, что взрывной характер гидролиза гомогенатов эритроцитов птицы, обусловлен активностью именно этого фермента. Ими было подчеркнуто, что действие ЭДТА носит обратимый характер и добавление Mg^{2+} или Ca^{2+} на фоне блокатора полностью восстанавливало активность экто-АТФазы.

В наших экспериментах ЭДТА был малоэффективным ингибитором и вызывал частичное блокирование (40–50%) активности фермента в эритроцитах рыб даже при 12 мМ концентрации. Эта концентрация на порядок превышала концентрацию комплекса, использованного в опытах на эритроцитах голубя (рис. 4, табл. 1). В экспериментах с эритроцитами скорпены для ЭДТА константа ингибирования (I_{50}) составляла 12 мМ, что совпало с максимальной концентрацией реагента использованной в этих экспериментах. В отношении экто-НТФДазы эритроцитов морской лисицы ингибиторный эффект ЭДТА наблюдался только при низких концентрациях блокатора (2, 4, 6 мМ). При 6 мМ концентрации ЭДТА активность фермента снижалась максимально (на 58%). Константа ингибирования (I_{50}) для этой части кривой составляла 4 мМ (рис. 4). При более высоких концентрациях (8, 10, 12 мМ) наблюдалась реверсивная активация активности экто-НТФДазы, которая постепенно возрастала на 20% (табл. 1) и I_{50} для этой части кривой составляла 9 мМ. В данном случае ЭДТА выступал как модифицирующий агент. Причины активации активности экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы неизвестны. Однако присутствие ЭДТА способно вызывать активацию Ca^{2+} АТФазы мембран эритроцитов человека. По мнению Вольфа [37] эти изменения могут происходить в результате «частичной денатурации» фермента под действием комплекса. Ингибиторный эффект ЭДТА у морской лисицы заканчивался, когда концентрация ингибитора и концентрация присутствующего в среде инкубации Mg^{2+} выравнивались до эквимолекулярных значений. У скорпены последующее наращивание концентрации ингибито-

ра вызывало лишь незначительное понижение активности фермента. При таких концентрациях ЭДТА в среде инкубации уже не должно было бы быть свободных двухвалентных катионов. Тем не менее экто-НТФДазы исследованных рыб продолжала сохранять активность на уровне 50–60%. Эти результаты свидетельствовали в пользу особых способностей экто-НТФДаз эритроцитов рыб. Можно полагать, что экто-НТФДазы эритроцитов рыб способны функционировать в условиях дефицита двухвалентных катионов, что маловероятно, или иметь их внутриклеточные резервы, при выходе которых из эритроцитов в окружающее пространство они способны поддерживать активность поверхностных АТФаз. Такие возможности у эритроцитов есть. Еще в 1969 г. при изучении движения Ca^{2+} через мембрану эритроцитов человека было установлено наличие активной экструзии Ca^{2+} из эритроцитов, что может поддерживать или даже активировать активность Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы [38]. Согласно современным исследованиям, механизм экструзии опосредован мощным трансмембранным кальциевым насосом, который способен быстро удалять кальций из цитозольного пространства эритроцитов [39]. Нельзя не отметить важность и мембранного Ca^{2+} . Высокие концентрации ЭДТА могут удалить все двухвалентные катионы из инкубационной среды суспензии эритроцитов, но не могут удалить мембраносвязанный кальций [40], что может обеспечивать поддержание активности экто-АТФаз.

Полученные в наших исследованиях эффекты необходимо рассматривать как интегральный ответ активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб ввиду многовекторности действий выбранных реагентов. С этим связаны трудности интерпретаций полученных результатов при работе с суспензиями цельных эритроцитов. Как уже указывалось выше, в доступной нам литературе ссылок на выделение из плазматических мембран эритроцитов позвоночных и получение чистых препаратов экто-НТФДаз нами не найдено. При выделении экто-НТФДаз из других клеток исследователи сталкиваются с трудностями, связанными с очень большой чувствительностью экто-АТФаз к действию детергентов и других агентов, применяемых для дезинтеграции мембраны. Под действием этих веществ поверхностно-локализованные АТФазы распадаются на фрагменты с потерей активности [41]. Местом приложения для выбранных ингибиторов являются не только активный центр и белковая молекула экто-фермента, не только катионы металлов, но и энергетика эритроцитов в целом. Блокирование гликолиза и дыхания митохондриального комплекса эритроцитов посредством ингибирования ключевых ферментов и дезинтеграции функционирования митохондриального матрикса приводит к существенному снижению энергетического по-

тенциала эритроцитов и может оказывать влияние на работу экто-НТФДаз.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что экто-НТФДазы эритроцитов хрящевых и костистых рыб существенно различаются по резистентности к действию выбранных биохимических агентов. Экто-НТФДазы эритроцитов морской лисицы обладает большей устойчивостью к выбранным нами реагентам. Возможно, причины такой устойчивости обусловлены наличием особой толерантности эритроцитов хрящевых рыб к высоким концентрациям мочевины (у морской лисицы около 400 мМ), которую они накапливают в плазме крови для поддержания осмотического равновесия с окружающей средой. Во всяком случае, это требует особых конструктивных решений на молекулярном уровне ввиду того, что мочевина для остальных эритроцитов позвоночных является сильнейшим ядом, и даже небольшие сбои в фильтрующей системе почек ведут к катастрофическим последствиям. Отсутствие ингибирующего эффекта азида натрия на экто-АТФазу эритроцитов морской лисицы позволяет предположительно отнести эту экто-НТФДазу к семейству экто-НТФДаз 2-го типа, тогда как экто-НТФДазы эритроцитов скорпены к экто-НТФДазам 1-го типа. Функциональное назначение экто-АТФаз плазматических мембран эритроцитов рыб не установлено, но присутствие постоянно высоких концентраций АТФ [42] в плазме крови рыб и высокие значения удельной активности экто-ферментов рыб [3, 4] свидетельствуют о значимой роли этих АТФаз в физиологии эритроцитов и кровотока в целом.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания КНС–ПЗ РАН филиала ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”, номер гос. регистрации 121032300019-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ю.А. Силкин и Е.Н. Силкина, осуществили планирование, сбор данных, написание и редактирование манускрипта. М.Ю. Силкин осуществлял техническую поддержку при проведении экспериментальных исследований, участвовал в обработке и обсуждении экспериментальных данных, оформлении иллюстраций и редактировании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barnstock G* (2015) Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signaling. *Purinergic Signalling* 11: 411–434. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9462-7>
2. *Yegutkin GG* (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49 (6): 473–497. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>
3. *Silkin YuA, Silkina EN, Silkin MYu* (2017) The dynamics of heat production in erythrocytes of the scorpion fish (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758). *In vitro* 43(2):164–170. <https://doi.org/10.1134/S1063074017020092>
4. *Silkin YA, Silkina EN* (2017) The study of 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. <https://doi.org/10.1134/S0006350917030204>
5. *al-Rashida M, Iqbal J* (2014) Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase and alkaline phosphatase inhibitors. *Medicinal Research Reviews* 34(4):703–743. <https://doi.org/10.1002/med.21302>
6. *Knowles A, Nagy AK* (1999) Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur. J. Biochem* 262: 349–357. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00389.x>
7. *Pullman ME, Penefsky HS, Datta A, Racker E* (1960) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 235: 3322–329.
8. *Казеннов АМ, Маслова МН, Савина ГВ* (1984) Сравнительная характеристика свойств Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитов человека и карпа *Cyprinus carpio*. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 20 (2): 167–173. [*Kazennov AM, Maslova MN, Savina GV* (1984) Sravnitel'naya harakteristika svojstv Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитов человека и карпа *Cyprinus carpio*. *J. Evol Biochem Physiol* 20 (2): 167–173. (in Russ)].
9. *Казеннов АМ, Маслова МН* (1980) Особенности активации детергентами Na , K -аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 16 (50): 430–436. [*Kazennov A.M., Maslova M.N.* (1980) Osobennosti aktivacii detergentami Na , K -аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных. *J. Evol Biochem Physiol* 16 (50): 430–436. (in Russ)].
10. *Chen PS, Jr, Toribara TY, Warner H* (1956) Microdetermination of phosphorus *Anal. Chem.* 28: 1756–1758.
11. *Vasilyeva E.V., Minkov I.B., Fitin A.F., Vinogradov A.D.* (1982) Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite. *Biochem. J.* 202: 15–23. <https://doi.org/10.1042/bj2020009>
12. *Ernster L, Jones LC* (1962) Study of the nucleoside tri- and diphosphatase activities of rat liver microsomes. *J. Cell Biol.* 15: 563–577. <https://doi.org/10.1083/jcb.15.3.563>
13. *Strobel RS, Nagy AK, Knowles AF, Buegel J, Rosenberg MO* (1996) Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 271: 16232–16331. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16323>
14. *Plesner L* (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158:141–214. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62487-0](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62487-0)
15. *Treuheit MJ, Vaghy PL, Kirley TL* (1992) Mg^{2+} -ATPase from rabbit skeletal muscle transverse tubules is a 67-kilodalton glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 267:11777–11782.
16. *Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bi-gonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Seigny J* (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling* 1: 193–204. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-6217-x>
17. *Knowles AF, Li C* (2006) Molecular cloning and characterization of expressed human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (E-NTPDase 8) and its soluble extracellular domain. *Biochemistry* 45:7323–7333. <https://doi.org/10.1021/bi052268e>
18. *Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo ML* (2010) Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 188: 319–333. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.011>
19. *Adamek E, Pawiowska-Gyral K, Bober K* (2005) In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann. Acad. Med. Stetin* 51 (2): 69–85.
20. *Agalakova NI, Gusev GP* (2011) Fluoride-induced death of rat erythrocytes *in vitro*. *Toxicology In Vitro* 25: 1609–1618. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.06.006>
21. *Antonny B, Bigay J, Chabre M* (1990) A novel magnesium-dependent mechanism for the activation of transducin by fluoride. *FEBS Letters* 268 (1): 277–280. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81027-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81027-1)
22. *Gutiérrez-Salinas J, García-Ortiz L, Morales González JA, Hernández-Rodríguez S, Ramírez-García S, Núñez-Ramos NR, Madrigal-Santillán E* (2013) In vitro effect of sodium fluoride on malondialdehyde concentration and on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in human erythrocytes. *Scientific World Journal* 2013: 864–718. <https://doi.org/10.1155/2013/864718>
23. *Suska M* (2001) The effect of sodium fluoride on the adenine nucleotide pool in erythrocytes of Wistar rats. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 14 (4): 369–373. PMID: 11885920
24. *Qin J, Chai G, Brewer JM, Lovelace LL, Lebiada L* (2006) Fluoride inhibition of enolase: crystal structure and thermodynamics. *Biochem.* 45: 793–800. <https://doi.org/10.1021/bi051>
25. *Liao Y, Chen J, Brandt BW et al.* (2015) Identification and functional analysis of genome mutations in a fluoride-resistant *Streptococcus mutans* strain. *PLOS ONE* 10: e0122630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122630>

26. Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA et al. (2009) Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. Clin. Chem. 55: 1019–1021. <https://doi.org/10.1016/j.hem.2008.12.170> <https://doi.org/10.1373/clinc>
27. Izquierdo-Vega JA, Sánchez-Gutiérrez M, Del Razo ML (2008) Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. Toxicology and Applied Pharmacology 230 (3): 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.008>
28. Anuradha CD, Kanno S, Hirano S (2001) Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. Biol. Med. 31 (3): 367–373. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00591-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00591-3)
29. Sugiyama H, Matsugo S, Misu H et al. (2013) Regulation of the physiological effects of peroxidovanadium (V) complexes by the electronic nature of ligands. J. Inorg. Biochem. 121: 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.014>
30. Benabe JE, Echegoyen LA, Pastrana B, Martinez-Maldonado M (1987) Mechanism of inhibition of glycolysis by vanadate. J. Biol. Chem. 262 (20): 9555–9560. PMID: 3036865
31. Robinson JD (1981) Vanadate inhibition of brain (Ca²⁺ Mg²⁺)-ATPase. Neurochem. Res. 6 (3): 225–232. <https://doi.org/10.1007/BF00964038>
32. Barceloux DG (1999) Vanadium. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 37 (2): 265–278. <https://doi.org/10.1081/clt-100102425>
33. Treviño S, Díaz A, Sánchez-Lara E, Sanchez-Gaytan BL, Perez-Aguilar JM, González-Vergara E (2019) Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. Biological Trace Element Research 188: 68–98. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1540-6>
34. Turner TL, Nguyen VH, McLaughlan CC, Dymon Z, Dorsey BM, Hooker JD, Jones MA (2012) Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* in vitro. J. Inorg. Biochem. 108: 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.009>
35. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D (2012) Biochemical and medical importance of vanadium compounds. Acta Biochim. Pol. 59 (2): 195–200. PMID: 22693688
36. Венкстерн ТВ, Энгельгардт ВА (1957) Аспространение экто-аденозилполифосфатазы и характеристика некоторых ее свойств. Биохимия 22 (5): 911–916. [Venkstern TV, Engelhardt VA (1957) Distribution of ecto-adenosinopolyphosphatase and characteristics of certain of its properties. Biochim. 22 (5): 911–916 (in Russ)].
37. Wolf HU (1972) Effects of Ethylenediaminetetra-acetate and Deoxycholate on Kinetic Constants of the Calcium Ion-Dependent Adenosine Triphosphatase of Human Erythrocyte Membranes. Biochem. J. 130: 311–314. <https://doi.org/10.1042/bj1300311>
38. Schatzman HJ, Vincenzi FF (1969) Calcium movements across the membrane of human red cells. J. Physiol. 201 (2): 369–395. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1969.sp008761>
39. Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L (2013) Calcium in red blood cells – a perilous balance. Int. J. Mol. Sci. 14 (5): 9848–9872. <https://doi.org/10.3390/ijms14059848>
40. Durriti-Cubria M, Seifen E, Schmidt HL (1967) Calcium content and uptake by erythrocyte stomata. Hoppe Seiler Z. Physiol. Chem. 348 (8): 1043–1046. PMID: 4233216
41. Christoforidis S, Papamarcaki T, Galaris D, Kellner R, Tsolas O (1995) Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. Eur. J. Biochem. 234: 66–74. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.066_c.x
42. Jensen FB, Agnisola C, Novak I (2009) ATP release and extracellular nucleotidase activity in erythrocytes and coronary circulation of rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 152: 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.007>

THE EFFECT OF AZIDE, FLUORIDE, ORTHOVANADATE, AND EDTA SODIUM SALTS ON ECTO-ATPASE ACTIVITY OF RED BLOOD CELLS IN A SCORPIONFISH (*SCORPAENA PORCUS* L.) AND THORNBARK 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 of the Russian Academy of Sciences — Branch of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Feodosiya, Russia

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

The effect of azide, fluoride, orthovanadate and EDTA sodium salts on the ecto-ATPase activity in red blood cells (RBCs) of a scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) and thornback ray (*Raja clavata* L.) was studied. It was shown that under the influence of millimolar (mM) concentrations of the selected biochemical agents, significant differences in the hydrolytic activity of RBC plasma membrane ecto-ATPases were revealed in cartilaginous vs. teleost fish. For example, thornback ray RBC ecto-ATPase was practically insensitive to sodium azide. In contrast, scorpionfish RBC ecto-ATPase was sensitive to sodium azide, which blocked the enzyme activity by 65% at a concentration of 20 mM. Thornback ray RBC ecto-ATPase retained a significant activity (37%) at high (60 mM) concentrations of sodium fluoride, while scorpionfish RBC ecto-ATPase was almost completely blocked at this concentration. EDTA acted as a modifier of thornback ray ecto-ATPase activity: at concentrations

of up to 6 mM, ATP hydrolysis was actively blocked (by 58%), and at higher concentrations, ecto-ATPase activity was stimulated (up to 20%). An increase in the EDTA concentration (up to 12 mM) in suspensions of scorpionfish RBCs constantly stimulated the inhibitory effect of the chelator (up to 52% vs. control). The activity of ecto-ATPases in RBCs of the studied fish species was weakly blocked by sodium orthovanadate. These differences may reflect a higher tolerance of thornback ray RBC ecto-ATPase to the effect of the above chemical reagents compared to a scorpionfish. The absence of the sodium azide inhibitory effect on thornback ray RBC ecto-ATPase suggests that this ecto-ATPase may be referred to a family of type 2 ecto-NTPDases (ENTPD2), while scorpionfish ecto-ATPase may belong to type 1 ecto-NTPDases (ENTPD1).

Keywords: fish, erythrocytes, ecto-ATPases, sodium salts of azide, fluoride, orthovanadate, EDTA