

© А. Д. ШАЛАБОДОВ

Тюменский государственный университет
shalabodov@utmn.ru

УДК 577.352(075)

**ОСОБЕННОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
ТРАНСМЕМБРАННЫХ ФЕРМЕНТОВ
В ЭРИТРОЦИТАХ И МЕМБРАННЫХ ПРЕПАРАТАХ
ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

**FEATURES DETECT THE ACTIVITY
OF TRANSMEMBRANE ENZYMES IN ERYTHROCYTES
AND MEMBRANE PREPARATIONS
OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES**

В статье анализируются методы выявления активности трансмембранных ферментов в эритроцитах и в мембранных препаратах эритроцитов млекопитающих (в том числе человека). Широко распространенный метод выявления активности транспортных АТФаз в цельных эритроцитах с применением Твин-20 позволяет выявлять активность фермента без изменения кооперативного взаимодействия субъединиц Na,K-АТФазы в ходе реакционного цикла. При получении мембранных препаратов эритроцитов с помощью гипоосмотического гемолиза по методу Dodge et.al. примерно 80% мембранных препаратов при помещении их в среду определения ферментативной активности «замыкаются», формируя латентную форму фермента, выявить которую не представляется возможным без мягкого увеличения проницаемости мембран для открытия доступа субстрату и кофакторам к активным центрам. Внесение 0,5-1 мМ ЭДТА в среду гемолиза предотвращает этот процесс, что позволяет в 2-4 раза увеличить выявляемую активность ферментов в мембранных препаратах эритроцитов. Предполагается, что мембранные препараты (тени) эритроцитов при их получении (гемолизе эритроцитов) в присутствии хелаторов двухвалентных ионов теряют способность к «замыканию» в результате потери периферических белков мембранного скелета (скорее всего спектрина и актина).

The article analyzes the methods of detecting the activity of transmembrane enzymes in erythrocytes and in membrane preparations of erythrocytes of mammals (including humans). A widespread method of detecting the activity of transport ATPases in whole erythrocytes with the use of Tween-20 can detect the activity of the enzyme without changing the cooperative interaction of the subunits of the Na,K-ATPase during the reaction cycle. Upon receipt of membrane preparations of erythrocytes using hypoosmotic hemolysis by the method of Dodge et.al. about 80% of the membrane preparations at

their premises on environ of the enzyme activity determination are «closed», forming a latent form of the enzyme, to identify which is not possible without a mild increase in the permeability of the membrane to open access of substrate and cofactors to the active sites. The introduction of 0.5-1 mM EDTA in the environment of the hemolysis prevents the process that allows a 2-4 fold increase in detectable enzyme activity in the membrane preparations of erythrocytes. It is assumed that the membrane preparations (shadows) of erythrocytes when they are received (hemolysis of erythrocytes) in the presence of chelators of divalent ions lose the ability to «closure» as a result of loss of peripheral membrane proteins of the skeleton (most likely the spectrin and actin).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Эритроцит, мембранные препараты эритроцитов, АТФаза, детергент, хелатор.

KEY WORDS. Erythrocyte, membrane preparations of erythrocytes, ATPase, detergent, chelator.

Эритроциты являются удобным объектом исследования (особенно на человеке), так как, во-первых, это наиболее легкодоступная для экспериментатора ткань и, во-вторых, несложные процедуры гемолиза и центрифугирования в промывающих средах позволяют получить однородные мембранные препараты (тени эритроцитов), что значительно упрощает интерпретацию полученных результатов.

Одним из наиболее распространенных методов выявления активности транспортных АТФаз в цельных эритроцитах является метод А. М. Казеннова [9]. В соответствии с этим методом промытые и упакованные цельные эритроциты млекопитающих прединкубируются с детергентом Твин-20 для открытия доступа субстрату и ионам-активаторам к активным центрам фермента, локализованным на цитоплазматической стороне мембраны. После изменения проницаемости мембраны эритроциты помещаются в среду определения ферментативной активности. Учитывая, что Твин-20 является поверхностно-активным веществом, была проведена серия исследований, которая показала, что в используемой концентрации (5 мг/мл клеток) детергент не изменяет кооперативное взаимодействие субъединиц фермента и тем самым не препятствует конформационным изменениям фермента в ходе реакционного цикла [17]. Сегодня многие авторы используют данный метод выявления активности ферментов (в том числе транспортных АТФаз) в эритроцитах млекопитающих и человека при различных стрессах и патологиях [4, 6, 7, 13, 16]. Важно отметить, что использование этого метода позволяет сохранить внутриклеточное содержимое, в котором обнаружены модуляторы активности ферментов, в том числе транспортных АТФаз [5, 14, 20].

Однако большинство экспериментаторов предпочитают работать с мембранными препаратами эритроцитов. Широко распространенным способом получения мембранных препаратов (теней) эритроцитов является метод Dodge et.al. [12]. Эритроциты помещаются в гипоосмотический раствор (10 mM Трис-НСI буфер) с определенным значением рН (как правило 7,4-7,6), что сопровождается выходом гемоглобина и внутриклеточного содержимого в раствор. Последующее промывание мембранных препаратов в соответствующих средах позволяет получить препараты клеток, сохраняющих форму эритроцитов. Однако следует отметить, что определение активности трансмембранных ферментов в таких препаратах клеток (в частности транспортных АТФаз) показало большую ва-

риабельность в их удельной активности [3, 18]. Это связано с тем, что каждый исследователь при получении препаратов мембран использует свою среду гемолиза, а также промывающие растворы без учета того, что при помещении их в изотоничную среду определения ферментативной активности они способны «замыкаться» [10]. В результате формируется латентная форма фермента, выявить которую *in vitro* можно только при использовании метода мягкого повреждения мембраны для увеличения ее проницаемости к субстрату и кофакторам ферментов.

Действительно, полученные нами результаты исследований [10] показали, что примерно 80% мембранных препаратов, полученных после гемолиза в среде, не содержащей хелаторов двухвалентных ионов (10 мМ трис-НСI, рН 7,6 при 25°C) «замыкаются» при помещении их в изотоничную инкубационную среду, что затрудняет выявление активности Na,K-АТФазы. Прединкубация теней эритроцитов с Твин-20 в концентрации 0,5 мг/мл клеток позволила выявить латентную активность Na,K-АТФазы в «замкнутых» тенях, однако только в том случае, если в среде определения ферментативной активности присутствовал ЭДТА.

Повысить выявляемую активность в мембранных препаратах (уменьшить латентную форму фермента) можно введением в среду гемолиза эритроцитов ЭДТА, причем внесение 1 мМ ЭДТА позволяет получить более стабильно воспроизводимую активность Na,K-АТФазы, чем в случае 0,5 мМ ЭДТА. Прединкубация таких теней эритроцитов с Твин-20 в ранее указанной концентрации позволила повысить выявляемую активность фермента на 20-30%, что указывает на наличие латентной формы фермента даже в препаратах, полученных с применением ЭДТА в среде гемолиза.

Анализируя полученные нами данные, можно заключить, что примерно в 20% мембранных препаратов выявляется активность фермента, если в среду гемолиза и промывающие растворы не вводить ЭДТА, 50-60% теней теряют способность «замыкаться», если в среду гемолиза ввести 0,5-1,0 мМ ЭДТА, и наконец, 20-30% теней эритроцитов сохраняют латентную форму фермента, выявить которую можно только после прединкубации с детергентом и в присутствии ЭДТА в среде определения ферментативной активности. Таким образом, используя разные среды гемолиза, экспериментаторы получают мембранные препараты с различным процентом латентной активности — в этом случае становится понятна причина 3-4-кратных различий в выявлении активности транспортных АТФаз в мембранных препаратах эритроцитов млекопитающих, в том числе и человека.

В чем же причина различной способности теней эритроцитов «замыкаться» и маскировать истинную активность ферментов? По нашему мнению, мембранные препараты эритроцитов при их получении теряют способность к «замыканию» после потери периферических белков мембранного скелета (скорее всего спектрина и актина) в результате хелации ионов кальция, так как внесение их в среду гемолиза предотвращало этот процесс [10, 11]. Анализируя собственные данные и данные литературных источников, можно предположить, что различная способность к «замыканию» теней эритроцитов обусловлена различным «возрастным» составом эритроцитов. Известно, что молодые популяции эритроцитов обладают лучшей деформируемостью по сравнению со старыми формами

[8, 15]. В то же время, деформируемость мембраны эритроцитов определяется физико-химическими свойствами спектрин-актиновой сети [1]. Кроме того, не исключено, что белки мембранного скелета эритроцитов могут принимать непосредственное участие в регуляции активности транспортных АТФаз [19].

Логично предположить, что «изношенная» спектрин-актиновая сеть старой популяции эритроцитов при помещении их в растворы с низкой ионной силой при гемолизе эритроцитов значительно легче удаляется с цитоплазматической стороны мембраны, чем с мембраны молодой популяции эритроцитов, которые не теряют способность «замыкаться» даже в отсутствие ЭДТА в среде гемолиза — на это указывают наши результаты [13]. Бесспорным является то, что экспериментаторам при трактовке результатов исследования следует учитывать различную способность мембранных препаратов «замыкаться» в среде определения ферментативной активности. В первую очередь, это относится к исследованиям на различных по возрасту популяциях эритроцитов, полученных, например, в градиенте плотности сахарозы, а также в модельных экспериментах, связанных с кровопусканием и стрессированием животных, когда отмечается изменение в русле крови молодых популяций эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennett V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeleton / V. Bennett // *Biochem. Biophys. Acta*. 1989. V. 988. No 1. Pp. 107-121.
2. Dodge G. T., Mitchell C., Hanahan D. G. The preparation and chemical characterization of hemoglobin-free ghosts human erythrocyte / G. T. Dodge, C. Mitchell, D. G. Hanahan // *Arch. Biochem. Biophys.* 1963. V. 100. No 1. Pp. 119-130.
3. Kazennov A. M., Maslova M. N., Matskevich Yu. A., Rustamov F. A., Shalabodov A. D. Species variability of erythrocyte transport ATPases in mammals / A. M. Kazennov, M. N. Maslova, Yu. A. Matskevich, F. A. Rustamov, A. D. Shalabodov // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 1998. V. 119. No 1. Pp. 169-175.
4. Ryazantseva N. V., Novitsk V. V. Structural abnormalities and changes in Na,K-ATPase activity in erythrocyte membranes in patients with neurotic disorders / N. V. Ryazantseva, V. V. Novitsk // *Buletin of Experimental Biologi and Medicine*. 2002. V. 134. No 1. Pp. 75-77.
5. Sen P. C. Endogenous modulators in the regulation of ion transporting enzymes: structure, function, interaction. Recent advancements and future perspectives / P. C. Sen // *Adv. Biol. Chem.* 2011. No 1. Pp. 74-92.
6. Skverchinskaya E. A., Tavrovskaya T. V., Novozhilov A. V. Na⁺/K⁺ — ATPase activity in rat erythrocytes after prolonged starvation / E. A. Skverchinskaya, T. V. Tavrovskaya, A. V. Novozhilov // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2013. V. 49. No 2. Pp. 183-192.
7. Клиническое значение активности натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы в эритроцитах при физиологической беременности и при гестозе: дис. ... канд. мед. наук / А. В. Аверина. СПб. 2011. 120 с.
8. Белкин А. В., Марьинских В. В., Турбасова Н. В. Шалабодов А. Д. Исследование вязкоэластичных свойств мембран эритроцитов крыс с различным уровнем двигательной активности и их реакция на стрессы различной этиологии / А. В. Белкин, В. В. Марьинских, Н. В. Турбасова А. Д. Шалабодов // *Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование*. 2007. № 3. С. 234-239. 17

9. Казеннов А. М., Маслова М. Н., Шалабодов А. Д. Исследование активности Na,K-АТФазы в эритроцитах млекопитающих / А. М. Казеннов, М. Н. Маслова, А. Д. Шалабодов // Биохимия. 1984. Т. 49. № 7. С. 1089-1095.
10. Казеннов А. М., Маслова М. Н., Шалабодов А. Д. Механизм активирующего действия детергентов и хелаторов на Na,K-АТФазу теней безъядерных эритроцитов / А. М. Казеннов, М. Н. Маслова, А. Д. Шалабодов // Биохимия. 1986. Т. 51. № 2. С. 224-229.
11. Казеннов А. М., Рустамов Ф. А., Фролова О. В., Шалабодов А. Д. Сравнительное изучение свойств убаинчувствительной фосфатазы в тенях и бесспектриновых мембранах эритроцитов крысы / А. М. Казеннов, Ф. А. Рустамов, О. В. Фролова, А. Д. Шалабодов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1996. Т. 32. № 4. С. 393-401.
12. Кравец Е. Б., Степовая Е. А., Кошечев Т. Ю., Медведева О. Д., Яковлева Н. М., Ядмаа О., Ананина Е. А. Липидный состав и активность Na⁺, K⁺-АТФазы мембраны эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа при дислиппротеинемиях / Е. Б. Кравец, Е. А. Степовая, Т. Ю. Кошечев, О. Д. Медведева, Н. М. Яковлева, О. Ядмаа, Е. А. Ананина // Сахарный диабет. 2010. № 1. С. 1-44.
13. Крылов В. Н., Дерюгина А. В., Константинова А. И. Электрофоретическая подвижность и активность Na, K-АТФазы эритроцитов у крыс при стрессе / В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина, А. И. Константинова // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 11. С. 1297-1302.
14. Мацкевич Ю. А., Казеннов А. М., Шалабодов А. Д. Сравнительное исследование внутриклеточной регуляции активности транспортных АТФаз в безъядерных эритроцитах / Ю. А. Мацкевич, А. М. Казеннов, А. Д. Шалабодов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1994. Т. 30. № 5. С.690-697.
15. Сторожок С. А., Санников А. Г., Захаров Ю. М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства / С. А. Сторожок, А. Г. Санников, Ю. М. Захаров. Тюмень, Изд-во Тюменского государственного университета, 1997. 140 с.
16. Терехина Н. А., Зитта Д. В., Субботин В. М. Активность аденозинтрифосфатазы эритроцитов периферической крови у больных колоректальным раком / Н. А. Терехина, Д. В. Зитта, В. М. Субботин // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 5. С. 20.
17. Фролова О. В., Шалабодов А. Д. Влияние Твин-20 на функционирование Na,K-АТФазы эритроцитов крысы / О. В. Фролова, А. Д. Шалабодов // Научный вестник Тюменского государственного университета. 1996. Т. 1. С. 40-45.
18. Шалабодов А. Д. Роль мембранного скелета эритроцитов млекопитающих в функционировании транспортных АТФаз: дис. ... д-р биол. наук / А. Д. Шалабодов. СПб., 1997. 274 с.
19. Шалабодов А. Д., Маслова М. Н., Кыров Д. Н. Влияние солюбилизованных белков мембранного скелета эритроцитов на активность Na,K-АТФазы / А. Д. Шалабодов, М. Н. Маслова, Д. Н. Кыров // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2015. Т. 1. № 1 (1). С. 172-181.
20. Шалабодов А.Д. Механизмы регуляции активности транспортных АТФаз эритроцитов млекопитающих / А. Д. Шалабодов // Научный вестник Тюменского государственного университета. Серия: Биология. 1997. Т. 2. С. 19-29.

REFERENCES

1. Bennett V. The Spectrin-actin Junction of Erythrocyte Membrane Skeleton // Biochem. Biophys. Acta. 1989. V. 988. No 1. Pp. 107-121.

2. Dodge G. T., Mitchell C., Hanahan D. G. The Preparation and Chemical Characterization of Hemoglobin-free Ghosts Human Erythrocyte // Arch. Biochem. Biophys. 1963. V. 100. No 1. Pp. 119-130.
3. Kazennov A. M., Maslova M. N., Matskevich Yu. A., Rustamov F. A., Shalabodov A. D. Species Variability of Erythrocytes Transport of ATPases in Mammals // Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 1998. V. 119. No 1. Pp. 169-175.
4. Ryazantseva N. V., Novitski V. V. Structural Abnormalities and Changes in Na,K-ATPase Activity in Erythrocyte Membranes in Patients with Neurotic Disorders // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2002. V. 134. No 1. Pp. 75-77.
5. Sen P. C. Endogenous Modulators in the Regulation of Ion Transporting Enzymes: Structure, Function, Interaction. Recent advancements and future perspectives // Adv. Biol. Chem. 2011. No 1. Pp. 74-92.
6. Skverchinskaya E. A., Tavrovskaya T. V., Novozhilov A. V. Na⁺/K⁺ — ATPase Activity in Rat erythrocytes after Prolonged Starvation // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2013. V. 49. No 2. Pp. 183-192.
7. Averina A. V. Klinicheskoe znachenie aktivnosti natriy-kalievoy adenzotrifosfatazy v eritrotsitah pri fiziologicheskoy beremennosti i pri gestoze: Diss. ... kand. med. Nauk [The Clinical Significance of the Activity of the Sodium-potassium ATPase in Erythrocytes During Normal Pregnancy and Preeclampsia: Autoabstract dis. Cand. Sci. (Med.)]. St. Petersburg, 2011. 120 p. (in Russian)
8. Belkin A. V., Maryinskikh V. V., Turbasova N. V., Shalabodov A. D. Issledovanie vyazkoelastichnykh svoystv membran eritrotsitov kryis s razlichnyim urovnem dvigatelnoy aktivnosti i ih reaktsiya na stressyi razlichnoy etiologii [Study of the Viscoelastic Properties of the Membranes of Erythrocytes in Rats with Different Levels of Motor Activity and their Response to Stress of Various Etiology] // Vestnik Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya i prirodnopolzovanie [Tyumen State University Herald. Ecology and nature management]. 2007. No 3. Pp. 234-239. (in Russian)
9. Kazennov A. M., Maslova M. N., Shalabodov A. D. Issledovanie aktivnosti Na,K-ATFazy v eritrotsitah mlekopitayuschih [Study of the Na,K-ATPase Activity in Mammalian Erythrocytes] // Biohimiya [Biochemistry]. 1984. V. 49. No 7. Pp. 1089-1095. (in Russian)
10. Kazennov A. M., Maslova M. N., Shalabodov A. D. Mehanizm aktiviruyushchego deystviya detergentov i helatorov na Na,K-ATFazu teney bez'yadernykh eritrotsitov [The Mechanism of Action of Activating Detergent and Chelators on the Na, K-ATPase Shadows of Enucleated Erythrocytes] // Biohimiya [Biochemistry]. 1986. V. 51. No 2. Pp. 224-229. (in Russian)
11. Kazennov A. M., Rustamov F. A., Frolova O. V., Shalabodov A. D. Sravnitelnoe izuchenie svoystv uabainchuvstvitelnoy fosfatazy v tenyah i besspektrinovykh membranah eritrotsitov kryisy [A Comparative Study of the Properties of Ouabain-sensitive Phosphatase in Rat Erythrocyte Ghosts and Spectrin-free Membranes] // Zhurnal evolyutsionnoy biokhimi i fiziologii [The Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology]. 1996. V. 32. No 4. Pp. 393-401. (in Russian).
12. Kravetz E. B., Stepovaya E. A., Koshchevets T. Yu., Medvedeva O. D., Yakovleva N. M., Yadmaa O., Ananina E. A. Lipidnyy sostav i aktivnost NA⁺, K⁺-ATFazy membrany eritrotsitov u patsientov s sahnym diabetom 2 tipa pri dislipoproteinemiyah [Lipid Composition and Activity of the NA⁺, K⁺-ATPase of Erythrocytes Membranes in Patients with Type 2 Diabetes when Dislipoproteinemia] // Saharnyy diabet [Diabetes]. 2010. No 1. Pp. 41-44. (in Russian)
13. Krylov V. N., Deryugina A. V., Konstantinova A. I. Elektroforeticheskaya podvizhnost i aktivnost Na, K-ATFazy eritrotsitov u kryis pri stresse [Electrophoretic Mobility and Activity of Na, K-ATPase of Erythrocytes in Rats under Stress]

- and Activity of Na, K-ATPase in Rats under Stress] // Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I. M. Sechenova [Russian physiological journal named after I. M. Sechenov]. 2014. V. 100. No 11. Pp. 1297-1302. (in Russian)
14. Matskevitch Yu. A., Kazennov A. M., Shalabodov A. D. A Srovnitelnoe issledovanie vnutrikletchnoy regulyatsii aktivnosti transportnykh ATPaz v bez'yadernykh eritrotsitakh [Comparative Study of the Intracellular Regulation of Transport ATPase Activity in Non-nucleated Erythrocytes] // Zhurnal evolyutsionnoy biokhimi i fiziologii [The Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology]. 1994. V. 30. No 5. Pp. 690-697. (in Russian).
 15. Storozhok S. A., Sannikov A. G., Zakharov Yu. M. Molekulyarnaya struktura membran eritrotsitov i ikh mekhanicheskie svoystva [The Molecular Structure of the Membranes of Erythrocytes and their Mechanical Properties]. Tyumen, [Izd-vo Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta] Tyumen State University publisher. 1997. 140 p. (in Russian)
 16. Terekhina N. A., Zitta D. V., Subbotin V. M. Aktivnost adenozintrifosfatazy eritrotsitov perifericheskoy krovi u bolnykh kolorektalnym rakom [Adenosinetriphosphatase Activity of Erythrocytes of Peripheral Blood in Patients with Colorectal Cancer] // Klinicheskaya laboratornaya diagnostika [Clinical Laboratory Services]. 2005. No 5. P. 20. (in Russian)
 17. Frolova O. V., Shalabodov A. D. Vliyanie Tvin-20 na funktsionirovanie Na,K-ATFazy eritrotsitov kryisy [Effect of Tween-20 on the Operation of Na, K-ATPase of Rat] // Nauchnyy vestnik Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta [Scientific Tyumen State University Herald]. 1996. V. 1. Pp. 40-45. (in Russian)
 18. Shalabodov A. D. Rol membrannogo skeleta eritrotsitov mlekopitayuschih v funktsionirovanii transportnykh ATFaz: Diss... d-ra biol. Nauk [The role of the membrane skeleton of erythrocytes of mammals in the functioning of the transport ATPase: Diss. ... Doctor of medical sciences]. St. Petersburg, 1997. 274 p. (in Russian)
 19. Shalabodov A. D. Maslova M. N., Kyrov D. N. Vliyanie solyubilizirovannykh belkov membrannogo skeleta eritrotsitov na aktivnost Na,K-ATFazy [Influence of Solubilized Proteins of Membranous Erythrocytes Skeleton on Na,K-ATPhase activity] // Vestnik Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya i prirodopolzovanie [Tyumen State University Herald. Ecology and nature management]. 2015. V. 1. No 1 (1). Pp. 172-181. (in Russian)
 20. Shalabodov A. D. Mekhanizmy regulyatsii aktivnosti transportnykh ATFaz eritrotsitov mlekopitayuschih [Mechanisms of Regulation of the Activity of Transport ATPase of Mammals] // Nauchnyy vestnik Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya [Scientific Tyumen State University Herald. Series: Biology]. 1997. V. 2. Pp. 19-29. (in Russian)

Автор публикации

Шалабодов Александр Дмитриевич — доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры анатомии и физиологии человека и животных Института биологии Тюменского государственного университета

Author of the publication

Alexander D. Shalabodov — Dr. Sci (Biol.), Professor, Department of Anatomy and Physiology of Humans and Animals of Institute of Biology, Tyumen State University