

ІЗОФОРМИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ В ТКАНИНАХ РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ БУГАЇВ

Н. Кузьміна, Д. Остапів
inenbiol@mail.lviv.ua

Інститут біології тварин НААН,
вул. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Вміст активних форм Оксигену (АФО) на оптимальному рівні підтримується антиоксидантною системою, ключову роль в якій відіграє супероксиддисмутаза (СОД). У репродуктивних органах самців ензим існує у трьох генетично зумовлених формах — мітохондрійній, цитозольній і позаклітинній. Тому важливим є констатування не тільки змін активності СОД, але й перерозподілу ізоформ ензиму за сперміогенезу і дозрівання спермій, а після еякуляції — їх існування. Мета роботи — дослідити вміст ізоформ СОД у тканинах репродуктивної системи бугаїв. Для досліджень використовували тканини сім'яників та епідидиміса, які відбирали після забою бугаїв ($n=5$). Спермії з епідидиміса вимивали 0,9 % розчином NaCl. Тканини гомогенізували за 4 °C в 0,25M сахарозі за 6000 об/хв. протягом 2 хв. Гомогенат центрифугували 15 хв. за 8000 об/хв. і відбирали надосадову рідину для дослідження ізоформ ензиму. Ізоформи СОД виявляли після електрофорезу у 10 % поліакриламідному гелі фарбуванням пластин гелю методом Beauchamp і Fridovich в нашій модифікації. Вміст ізоформ розраховували за допомогою програми TotalLab TL120. У сім'янику, епідидимісі та епідидимальних сперміях бугаїв виявлено п'ять ізоформ СОД. У тканині сім'яників — 2,4–2,8 % S1- та S2-ізоформ, 23,6–24,6 % — S3- та S5 і 46,6±0,9 % S4-ізоформи. У голівці епідидиміса — відповідно, 10,4±0,4 та 58,3±1,7 % S1- та S4-ізоформ, на 3,3 % і 12,6 % ($P<0,001$) менше у тілі і 5,6±0,6 та 43,2±0,6 % у хвості. Вміст S3- та S5-ізоформ СОД у голівці епідидиміса — відповідно, 12,4±3,5 і 6,2±1,3 %, у тілі підвищується на 1,2 та 15,1 % ($P<0,001$), у хвості становить 17,0±0,2 та 22,2±2,6 %. Вміст S2-ізоформи у голівці епідидиміса — 12,6±0,3 % і залишається на тому ж рівні у тканинах тіла та хвоста. Вміст ізоформ СОД епідидимальних спермій залежить від локалізації в морфологічних частинах придатку сім'яників. Вміст S1-ізоформи у сперміях голівки епідидимуса — 18,4±1,5 %, зростає до 29,1±3,0 % в сперміях з тіла і хвоста. Вміст S2-ізоформи в сперміях зі зміною морфологічної частини голівка → тіло → хвіст епідидимуса зростає з 19,6±1,6 % на 6,7 та 14,7 % ($P<0,05$) відповідно. Вміст S3-ізоформи високий (14,7±1,6 %) у сперміях тіла, на 5,1 % нижчий з хвоста і найнижчий (4,5±0,6 %) з голівки придатків. Вміст S4-ізоформи у сперміях знижується зі зміною частини придатку: голівка → тіло → хвіст з 52,3±5,6 % на 29,5 % ($P<0,001$) і на 30,5 % ($P<0,01$) відповідно. Вміст S5-ізоформи низький (5,2–5,9 %) у сперміях з голівки та хвоста і на 1,9 % вищий з тіла епідидиміса. У тканинах сім'яників і епідидиміса та сперміях проявляється п'ять ізоформ СОД. У тканині сім'яників активність СОД переважно реалізується S3, S4 і S5-ізоформами, епідидиміса — S2, S3, S4 і S5, а у сперміях з епідидиміса: голівки — S1, S2 і S5, тіла — S1, S2, S3 і S4 та хвоста — S1, S2 і S4.

Ключові слова: СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ІЗОФОРМИ, РЕПРОДУКТИВНІ ОРГАНИ, СПЕРМІЇ, БУГАЇ, ЕЛЕКТРОФОРЕЗ

SUPERROXIDDYSMUTASE ISOFORMS IN TISSUES OF REPRODUCTIVE ORGANS OF BULLS

N. Kuzmina, D. Ostapiv
inenbiol@mail.lviv.ua

Institute of Animal Biology NAAS,
38 V. S Stus str., Lviv 79034, Ukraine

The content of AFO is optimally supported by the antioxidant system. In it superoxide dismutase (SOD) plays the key role. In the reproductive organs of males the enzyme exists in three genetically predisposed forms — mitochondrial, cytosolic and extracellular. Therefore, it is important to state not only the changes in the activity of SOD, but also the redistribution of enzyme isoforms when studying spermiogenesis and after ejaculation. The purpose of work is to investigate the content of SOD isoforms in the tissues of the reproductive system of the bulls. Tissues of the testicles and epididymis, which were taken after the slaughter of the bulls ($n=5$) were used. Epididymium spermatozoa were washed with 0.9 % NaCl solution. Tissues were homogenized at 4 °C in 0.25M sucrose at 6000 rpm within 2 min.

Homogenate was centrifuged for 15 min at 8000 rpm, supernatant was taken for study of enzyme isoforms. SOD isoforms were detected after electrophoresis in 10 % polyacrylamide gel by staining gel plates using Beauchamp and Fridovich method in our modification. Content of isozymes was calculated with TotalLab TL120 program. Five isoforms of SOD were detected in testicle tissues, epididymis and in spermatozoa. In testicle tissue isoform distribution was: 2.4–2.8 % S1- and S2-isoforms, 23.6–24.6 % S3- and S5-, and 46.6±0.9 % S4-isoforms. In epididymis head it was 10.4±0.4 and 58.3±1.7 % for S1- and S4-isoforms, respectively, on 3.3 % and 12.6 % ($P<0.001$) lower in body and 5.6±0.6 and 43.2±0.6 % in tail. Content S3 and S5 isoforms in epididymis head was 12.4±3.5 and 6.2±1.3 %, respectively, in body — 1.2 and 15.1 % ($P<0.001$) higher and in tail — 17.0±0.2 and 22.2±2.6 %. The content of S2 isoform in epididymis head was 12.6±0.3 % and remained at same level in tissues of body and tail. Content of SOD isoforms in epididymal sperm depends on localization in morphological parts of the epididymis. S1-isoform content in spermatozoa of epididymis head was 18.4±1.5 %, increased to 29.1±3.0 % in spermatozoa from body and tail. S2-isoform content in spermatozoa with change in morphological parts: head → body → tail of epididymis increased from 19.6±1.6 % to 6.7 and 14.7 % ($P<0.05$), respectively. S3-isoform content was high (14.7±1.6 %) in body of epididymis, lower by 5.1 % in tail and the lowest (4.5±0.6 %) in head. S4-isoform content in spermatozoa is reduced with a change in part of epididymis: head → body → tail with 52.3±5.6 %, 29.5 % ($P<0.001$) and 30.5 % ($P<0.01$), respectively. S5-isoform content was low (5.2–5.9 %) in sperm from head and tail and on 1.9 % higher in epididymis body. There are five isoforms of SOD in tissues of testicles and epididymis and in spermatozoa. In tissues of bull testicles the activity of SOD is mainly realized by S3, S4 and S5 isoforms, in epididymis — by S2, S3, S4 and S5, and in sperm from epididymis: heads — S1, S2 and S5, bodies — S1, S2, S3 and S4 and in tails — S1, S2 and S4.

Keywords: SUPEROXIDE DISMUTASE, ISOFORMS, REPRODUCTIVE ORGANS, SPERMATOZOA, BULLS, ELECTROPHORESIS

Функціонування репродуктивної системи самців тісно пов'язане з інтенсивним окисним метаболізмом — синтезом і використанням АТФ, утворенням і нагромадженням активних форм кисню (АФК) та їх утилізацією [1]. Вміст АФК на оптимальному рівні підтримується багатокомпонентною антиоксидантною системою, провідну роль в якій відіграє супероксиддисмутаза (СОД). В репродуктивних органах самців, як й інших тканинах, ензим існує у трьох генетично зумовлених формах — мітохондрійній, цитозольній і позаклітинній [7]. Інтенсивність генерації та перетворення АФК у репродуктивній системі самців проявляє особливості. Виявлено, що у сім'янику активність СОД вища порівняно з придатком, а у придатку сім'яника, його голівці — вища порівняно з хвостом [9]. Найнижча активність вказаного ферменту встановлена в еякуляті. Однак зниження активності СОД не завжди може бути маркером послабленого антиоксидантного захисту й, відповідно, погіршення фізіологічних якостей статевих клітин. Це зумовлено тим, що вміст окремих ізоформ ензиму з неоднозначною силою корелює з виживанням спермій бугаїв в еякуляті [4]. Отже, для встановлення особливостей функціонування репродуктивних органів самців важливим є констатування не тільки змін загальної активності СОД, але й перерозподіл її ізоформ

в процесі сперміогенезу і дозрівання статевих клітин, а після еякуляції — їх існування.

Мета роботи — дослідити вміст ізоформ СОД у тканинах репродуктивної системи бугаїв.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували тканини сім'яників та епідидиміса, які відбирали після забою бугаїв ($n=5$). Спермії з епідидиміса вимивали 0,9 % розчином NaCl. Тканини гомогенізували за 4 °C в 0,25М сахарозі за 6000 об/хв. протягом 2 хв. Гомогенат центрифугували 15 хв. за 8000 об/хв. і відбирали надосадову рідину для дослідження ізоформ ензиму. Ізоформи СОД виявляли після електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) для чого зразки (спермії чи надосадову рідину) розбавляли 1:4 Трис-гліциновим буфером (рН 8,5), додавали 0,05 мл 40 % сахарози. До лунок концентруючого гелю вносили 0,04 мл проби, концентрація протеїну 100 мкг. Проводили електрофорез. Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом [2] в нашій модифікації [11]: після електрофорезу пластини ПААГ інкубували у розчині 1,23 мМ НСТ в 0,15 М Na/K фосфатному буфері (рН 7,8) в темряві за кімнатної температури. Через 15 хв ПААГ тричі промивали дистильованою водою і заливали

інкубаційним середовищем: 28 мМ ТЕМЕД і 0,028 мМ рибофлавіну в 0,15 М Na/K фосфатному буфері (рН 7,8). Через 20 хв інкубування у темряві пластини гелю промивали дистильованою водою і опромінювали 7 хв ультрафіолетом для генерації $O_2^{\cdot-}$ рибофлавіном. Пластини ПААГ набували темно-фіолетового забарвлення, окрім зон з ізоформами СОД, які залишалися прозорими унаслідок перетворення $O_2^{\cdot-}$. Вміст ізозимів розраховували за допомогою програми *TotalLab TL120*.

Статистичний аналіз отриманих результатів проведено методом варіаційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента та η — кореляційного відношення [8].

Результати й обговорення

Аналізом ізоформ ензиму у тканинах репродуктивних органів встановлено, що у сім'янику і його придатку проявляється п'ять ізоформ СОД (рис. А, Б). Зокрема, ізоформи S3, S4 і S5 різних частин придатку, порівняно з сім'яником, характеризуються вищою електрофоретичною рухливістю. Аналогічно, для спермійв придатків сім'яників характерні п'ять протеїнів СОД (рис. С, D), які після зафарбування чіткіше проявляються у спермійв з голівки та хвоста придатку і слабше — з його тіла.

Кількісний аналіз спектру протеїнів ензиму тканини сім'яників бугаїв свідчить, що для неї характерний порівняно низький (2,4–2,8 %) вміст S1 та S2, середній (23,6–24,6 %) вміст S3 та S5 і високий (46,6±0,9 %) — S4-ізоформ (табл.).

У придатку, залежно від його морфологічної частини, вміст ізоформ СОД змінюється. Вміст S1-і S4-ізоформ в голівці високий (10,4±0,4 і 58,3±1,7 %), на 3,3 і 12,6 % ($P<0,001$) знижується у тілі і становить 5,6±0,6 і 43,2±0,6 % у хвості, що нижче від максимального, відповідно, на 4,8 % і 15,1 % ($P<0,001$). Водночас вміст S3- та S5-ізоформ зростає: у голівці придатків — низький (відповідно, 12,4±3,5 і 6,2±1,3 %), підвищується на 1,2 та 15,1 % ($P<0,001$) у тілі і становить 17,0±0,2 та 22,2±2,6 % у хвості, що вище від мінімального значення на 4,6 та 16,0 %. Вміст S2-ізоформи у голівці придатків — 12,6±0,3 % і залишається

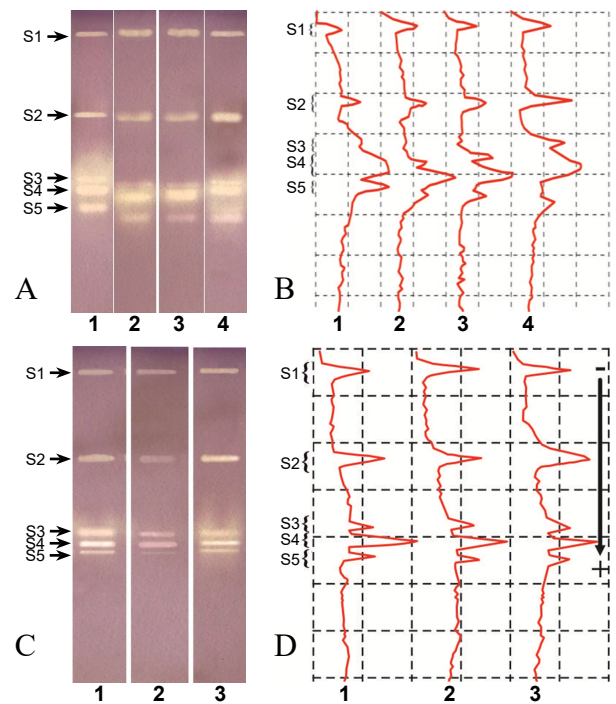


Рис. Ізоформи СОД репродуктивних органів та спермійв епідидиміса бугаїв: А — копії фореграм тканин: 1 — сім'яник, придаток сім'яників, 2 — голівка, 3 — тіло, 4 — хвіст; В — денситограма протеїнів тканин репродуктивних органів; С — копії фореграм спермійв придатків: 1 — голівки, 2 — тіла, 3 — хвоста, D — денситограма протеїнів спермійв. S1–S5 — ізоформи ензиму

Fig. SOD isozymes of reproductive organs and spermatozoa from epididymis of bulls: A — copies of tissue foregrams: 1 — testicles, epididymis, 2 — spermatozoa head, 3 — spermatozoa body, 4 — spermatozoa tail; B — densitogram of reproductive organs proteins; C — copies of epididymis spermatozoa foregrams: 1 — spermatozoa head, 2 — spermatozoa body, 3 — spermatozoa tail; D — densitogram of spermatozoa proteins. S1–S5 — SOD isozymes

на тому ж рівні у тканинах тіла та хвоста придатків сім'яників.

Вміст ізоформ СОД епідидимальних спермійв залежить від локалізації в морфологічних частинах придатку сім'яників. Так, вміст S1-ізоформи у сперміях голівки придатку 18,4±1,5 %, що більше на 16,0 % ($P<0,001$) і 8,0 % ($P<0,01$), ніж у тканинах сім'яників та голівки придатку відповідно. Вміст цієї ізоформи зростає на 10,7 % до 29,1±3,0 % в статевих клітинах з тіла, порівняно з голівкою, і залишається на тому ж рівні у сперміях хвоста придатків. Вміст S2-ізоформи зі зміною морфологічної частини голівка → тіло → хвіст придатків у сперміях зростає з 19,6±1,6 % на 6,7 та 14,7 % ($P<0,05$) відповідно. Слід зауважити, що у сперміях, отриманих з голівки придатків, вміст S2-ізоформи ви-

Вміст ізоформ СОД в тканинах репродуктивних органів і сперміях придатків сім'яників бугаїв ($M \pm m$, $n=5$)
SOD isozyme content in reproductive organ tissues and epididymis spermatozoa of bulls ($M \pm m$, $n=5$)

Тканини / спермії Tissue / spermatozoa		Вміст ізоформ, % / Isozymes content, %				
		S1	S2	S3	S4	S5
сім'яників / testicles		2,4±0,4	2,8±0,2	23,6±0,7	46,6±0,9	24,6±1,3
придатків сім'яників epididymis	голівка / head	10,4±0,4***	12,6±0,3***	12,4±3,5*	58,3±1,7***	6,2±1,3***
	тіло / body	7,1±0,9**	12,4±1,0***	13,6±0,2***	45,7±1,5	21,3±0,9
	хвіст / tail	5,6±0,6**	12,0±1,4***	17,0±0,2***	43,2±0,6*	22,2±2,6
спермії епідидиміса epididymis spermatozoa	голівка / head	18,4±1,5***	19,6±1,6***	4,5±0,6***	52,3±5,6	5,2±0,4***
	тіло / body	29,1±3,0 [#]	26,3±3,8	14,7±1,6 ^{###}	22,8±2,0 ^{###}	7,1±0,6
	хвіст / tail	28,4±3,0 [#]	34,3±4,6 [#]	9,6±2,2	21,8±3,8 [#]	5,9±0,8

Примітка: * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$ — різниця статистично вірогідна порівняно з тканиною сім'яників; [#] — $P<0,05$; ^{##} — $P<0,01$; ^{###} — $P<0,001$ — різниця статистично вірогідна порівняно зі сперміями голівки придатків.

Note: * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$ — the difference is statistically significant compared to the testicular tissue; [#] — $P<0,05$; ^{##} — $P<0,01$; ^{###} — $P<0,001$ — the difference is statistically significant compared to the spermatozoa of epididymis head.

щий на 16,8 % ($P<0,001$) та 7,0 % ($P<0,01$), ніж у тканинах сім'яників і голівки придатку. Вміст S3-ізоформи високий (14,7±1,6 %) у сперміях тіла, нижчий на 5,1 % хвоста і найнижчий (4,5±0,6 %) у статевих клітинах голівки придатків. Різниця між мінімальним і максимальним значеннями становить 10,2 % ($P<0,001$). Вміст S4-ізоформи у сперміях знижується зі зміною частини придатку: голівка → тіло → хвіст з 52,3±5,6 % на 29,5 % ($P<0,001$) і на 30,5 % ($P<0,01$), відповідно. Вміст S5-ізоформи низький (5,2–5,9 %) у сперміях голівки та хвоста і вищий на 1,2–1,9 % з тіла придатків. При цьому вміст вказаного протеїну у сперміях на 17,5–19,4 % ($P<0,001$) нижчий порівняно з тканиною сім'яників.

Відмінності вмісту ізоформ СОД характеризують інтенсивність окисних процесів у репродуктивному тракті самців й фізіологічні потреби статевих клітин за дозрівання й існування. Так, високий вміст СОД4 у сім'янику бугаїв зумовлений інтенсивним рівнем метаболічних процесів, що відбуваються в цитозолі за розмноження, росту, дозрівання і формування спермій. У придатку сім'яника, де спермії дозрівають і нагромаджуються, набувають здатності до руху й запліднення яйцеклітини [12], ізоформи СОД виконують регуляторну роль. При цьому, як випливає з результатів вивчення ізоформ СОД у тканині придатку сім'яника, зі зміною морфологічної частини голівка → тіло → хвіст вміст мітохондріального ізоформу (СОД2) не

змінюється, що вказує на захист тканини від надлишку O_2^- і підтримання рівня ресинтезу АТФ для процесів дозрівання спермій. Крім того, стабільно підвищений вміст мітохондріальної СОД може вказувати на захист ДНК мітохондрій, оскільки O_2^- здатний ініціювати процес пероксидації ДНК та розриви її спіралі [10, 4]. Поряд з цим, вміст позаклітинного (СОД1) і цитозольного (СОД4) ізоформ поступово знижується, а СОД3 і СОД5 — зростає. Вказані зміни характеризують пріоритети, які властиві морфологічним частинам тканини придатку сім'яника — забезпечення процесів дозрівання спермій, яке полягає в утворенні лецитин-альбумінової оболонки, що покриває статеві клітини і забезпечує стійкість проти зовнішніх факторів. Крім захисної оболонки, в каналі придатка сім'яника спермії набувають негативного електричного заряду, що запобігає їх аглютинації. Слід також зауважити, що придаток сім'яника є місцем тривалого зберігання спермій. Тому процеси утворення оболонки, набування негативного заряду і тривале зберігання спермій супроводжується підвищеним рівнем метаболічної активності, яка характеризується інтенсивним утворенням O_2^- в тканині придатку сім'яника. Зниження вмісту позаклітинної (СОД1) і цитозольної (СОД4) та підвищення інших цитозольних (СОД3 і СОД5) ізоформ свідчить про зниження метаболічної активності у тканині хвоста придатку і процес завершення дозрівання спермій.

Водночас у сперміїв з голівки придатку підвищений вміст СОД4-ізоциму, а з тіла і хвоста — вміст позаклітинного (СОД1) і мітохондріального (СОД2) ізоцимів. Це зумовлено тим, що спермії з голівки придатка сім'яника генерують у два рази більше $O_2^{\cdot -}$ і H_2O_2 , ніж з хвоста [6].

Знижений вміст цитозольних ізоцимів сперміїв хвоста придатка сім'яника зумовлений особливостями їх дозрівання і підготовки до запліднення ооцита (процесів акросомної реакції і капацитації). Для вказаних статевих клітин характерний підвищений рівень окиснення поліненасичених жирних кислот ліпідів цитоплазматичних мембран та інтенсивна генерація $O_2^{\cdot -}$ ланками ланцюга дихання мітохондрій [5], збільшений вміст внутрішньоклітинного цАМФ і активування каскаду реакцій фосфорилування тирозину. Отже, понижений вміст цитозольних ізоцимів СОД у сперміїв хвоста придатка сім'яника (зрілих і здатних до запліднення ооцита) характеризує меншу потребу в контролюванні рівня АФО і, відповідно, в захисті (збереженні) їхніх мембранних структур. При цьому у сперміях бугая, отриманих з тіла і хвоста придатка, проявляється високий вміст (18,4–29,1 %) позаклітинної СОД (S1-ізоформи). Отриманий результат свідчить, що, з одного боку, ізоформа ензиму здатна адсорбуватись на мембранах, а з іншого — про важливу роль позаклітинної СОД в забезпеченні фізіологічних функцій придатку — захисті структурних компонентів (мембран) статевих клітин при дозріванні в репродуктивному тракті [9].

Висновки

1. У тканинах сім'яників і придатків, сперміях епідидиміса бугаїв проявляється п'ять ізоформ СОД.

2. Активність СОД реалізується переважно такими ізоформами: у тканині сім'яників бугаїв — S3, S4 і S5, у придатку — S2, S3, S4 і S5, а у сперміях епідидиміса: голівки — S1, S2 і S5, тіла — S1, S2, S3 і S4, хвоста — S1, S2 і S4.

3. Вміст ізоцимів СОД, його зміни в тканині придатку сім'яника характеризують фізіологічні процеси дозрівання сперміїв — утворення оболонки, набування негативного заряду і тривале зберігання.

4. Вміст цитозольних ізоцимів СОД сперміїв хвоста придатка сім'яника характеризує їхню фізіологічну зрілість і здатність запліднювати ооцит.

Перспективи подальших досліджень.

Дослідити вміст ізоформ супероксиддисмутази у тканинах репродуктивної системи кнурів.

1. Bansal A. K., Bilaspuri G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2011, ID 686137, 7 p. DOI: 10.4061/2011/686137.
2. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1971, vol. 44, issue 1, pp. 276–287. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.
3. Kosenko M. V., Chuhriy B. M., Kotsyumbas I. Ya, Klevets L. O. *Reproductive function and andrological screening of bulls*. Lviv, 2007, 186 p. (in Ukrainian)
4. Marnett L. J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2000, vol. 21, issue 3, pp. 361–370. DOI: 10.1093/carcin/21.3.361.
5. Miki K. Energy metabolism and sperm function. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 2007, vol. 65. pp. 309–325.
6. Noblanc A., Kocer A., Chabory E., Vernet P., Saez F., Cadet R., Conrad M., Drevet J. R. Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *Journal of Andrology*, 2011, vol. 32, issue 6, pp. 12–16. DOI: 10.2164/jandrol.110.012823.
7. Pecker R. Abramsson L., Marklund S. L. Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 1997, vol. 3, issue 12, pp. 1061–1066. DOI: 10.1093/molehr/3.12.1061.
8. Plohin N. A. *Biometrics*. Moscow, MGU, 1970, pp. 53–60. (in Russian)
9. Skrzycki M., Czeczot H. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) — structure, properties and functions. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 2004, vol. 24, issue 58, pp. 301–311. (in Polish)
10. Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004, vol. 266, issue 1, pp. 37–56. DOI: 10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89.
11. Vlizlo V. V. (ed.), Fedoruk R. S., Ratych I. B., Kuzmina N. V. *Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary*. A reference book. Lviv, Spolom, 2012, 764 p. (in Ukrainian)
12. Yablonsky V. A., Khomyn S. P., Zaviryuha V. I. *Biotechnological and molecular-genetic fundamentals of animals reproduction*. Lviv, Afisha, 2009, 218 p. (in Ukrainian)