

УДК 661. 185.1: 599.323.4:612.35: 57.015.2

Боднар Ю.В., Кузьміна Н.В., Сачко Р.Г., Остапів Д.Д.

E-mail: inenbiol@mail.lviv.ua

Інститут біології тварин НААН, м Львів

**АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ ТА ІНТЕНСИВНІСТЬ СИНТЕЗУ
СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН
ГРАНУЛЬОЗНОГО ШАРУ ФОЛІКУЛІВ КОРІВ**

Досліджували активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту та інтенсивність утворення стероїдних гормонів клітинами гранульозного шару фолікулів яєчників корів за культивування. Для проведення досліджень відбирали яєчники корів відповідно до фізіологічного стану: «свіжої овуляції», «раннього» і «пізнього жовтого тіла» та «фолікулярного зростання». Для досліджень використані статеві залози корів з фолікулами розміром до 4 мм (малі), 4 - 7 мм (середні) і понад 7 мм (великі). Встановлено, що клітини гранульози за культивування проявляють активність ензимів антиоксидантного захисту: супероксиддисмутази - 6,8 - 19,8 МО/мг білка, глутатіонпероксидази і каталази, відповідно, 0,08 - 1,14 та 0,28 - 0,57 мкмоль/хв×мг білка. При цьому, для культури клітин характерний синтез і нагромадження стероїдних гормонів в середовищі культивування (нмоль/л): тестостерону – 0,04 - 1,75, естрадіолу – 4,2 - 11,3 і прогестерону – 17,7 - 77,0. Інтенсивність утворення гормонів клітинами гранульози за культивування *in vitro* залежить від розміру фолікулів і фізіологічного стану яєчників корів з яких вони вилучені. Найвищою інтенсивністю синтезу статевих гормонів за культивування *in vitro* характеризується гранульоза з великих фолікулів яєчника «пізнього жовтого тіла» (нмоль/л): тестостерону - $5,8 \pm 1,81$, естрадіолу - $11,3 \pm 2,00$ і прогестерону - $77,0 \pm 12,70$. Виявлено, що активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту клітин характеризує інтенсивність синтезу стероїдних гормонів культурою гранульози.

Ключові слова: ензими антиоксидантного захисту, концентрація гормонів, гранульоза, культивування, фолікул, яєчник, корови

УДК 661. 185.1: 599.323.4:612.35: 57.015.2

Боднар Ю.В., Кузьміна Н.В., Сачко Р.Г., Остапів Д.Д.

Інститут биологии животных НААН, г. Львов

**АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА И ИНТЕНСИВНОСТЬ СИНТЕЗА
ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК
ГРАНУЛЕЗНОГО ШАРА ФОЛЛИКУЛОВ КОРОВ**

Исследовали активность энзиматического звена антиоксидантной защиты и интенсивность образования стероидных гормонов клетками гранулезного шара фолликулов яичников коров при культивировании. Для проведения исследований отбирали яичники коров соответственно

физиологическому состоянию: «свежей овуляции», «раннего» и «позднего желтого тела» и «фолликулярного роста». Для исследований использовали половые железы коров с фолликулами размером до 4 мм (малые), 4 - 7 мм (средние) и больше 7 мм (большие). Установлено, что клетки гранулы при культивировании проявляют активность энзимов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы - 6,8 - 19,8 МО/мг белка, глутатионпероксидазы и каталазы, соответственно, 0,08 - 1,14 та 0,28 - 0,57 мкмоль/мин×мг белка. При этом, для культуры клеток характерный синтез и накопление стероидных гормонов в среде культивирования (нмоль/л): тестостерона - 0,04 - 1,75, эстрадиола - 4,2 - 11,3 и прогестерона - 17,7 - 77,0. Интенсивность образования гормонов клетками гранулы при культивировании *in vitro* зависит от размера фолликулов и физиологического состояния яичников коров с которых они получены. Наивысшей интенсивностью синтеза половых гормонов при культивировании *in vitro* характеризуется гранула с больших фолликулов яичника «позднего желтого тела» (нмоль/л): тестостерона - $5,8 \pm 1,81$, эстрадиола - $11,3 \pm 2,00$ и прогестерона - $77,0 \pm 12,70$. Выявлено, что активность энзиматического звена антиоксидантной защиты клеток характеризует интенсивность синтеза стероидных гормонов культурой гранулы.

Ключевые слова: энзимы антиоксидантной защиты, концентрация гормонов, гранула, культивирование, фолликул, яичник, коровы

UDC 661. 185.1: 599.323.4:612.35: 57.015.2

Bodnar Yu.V., Kuzmina N.V., Sachko R.G., Ostapiv D.D.

Institute of animal biology NAAS, Lviv

ANTIOXIDANT DEFENSE AND INTENSITY OF HORMONE SYNTHESIS AT COW OVARIAN FOLLICLE OF GRANULOSE LATER CULTIVATION

*Activity of antioxidant defense enzymatic link and intensity of steroid hormone synthesis at at cow ovarian follicle of granulose layer cultivation were studied. For studies cow ovaries with physiological state: “fresh ovulation”, “early” and “late corpora lutea” and “follicular growth” were extirpated. For researches cow gonades with follicle size till 4 mm (small), 4–7 mm (average), over 7 mm (big) were used. It is set that granulose cells when cultivating have such activity of antioxidant defense enzymes: superoxide dismutase – 6,8 – 19,8 UI/mg of protein, glutathione peroxidase and catalase, correspondingly, 0,08 – 1,14 and 0,28 – 0,57 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ of protein. Herewith, granulose culture characterizes by synthesis and accumulation of steroid hormones in cultivation medium (nmol/l): testosterone – 0,04 - 1,75, estradiole – 4,2 - 11,3 and progesterone – 17,7 - 77,0. Intensity of granulose cell hormone synthesis at cultivation *in vitro* depends on follicle size and cow ovarian physiological state from which they are extirpated. Granulose from big ovarian follicles of “late corpora lutea” is characterized by highest sex hormones synthesis intensity at cultivating *in vitro* (nmol/l): testosterone – $5,8 \pm 1,81$, estradiole – $11,3 \pm 2,00$ and progesterone – $77,0 \pm 12,70$. Activity of cell antioxidant defense enzymatic link characterizes steroid hormone synthesis intensity by granulose culture.*

Key words: *antioxidant defense enzymes, hormone concentration, granulose, cultivation, follicle, ovary, cows.*

Клітини гранульозного шару фолікулів яєчників засвоюють поживні речовини середовищ культивування, проявляють дихальну активність і продукують статеві гормони. В процесі окисного метаболізму утворюються активні форми кисню (АФК), для знищення яких у клітинах функціонує ефективна система антиоксидантного захисту (АОЗ), що складається з двох ланок: ензиматичної і неензиматичної. Знешкодження АФК за участі ензиматичної системи АОЗ здійснюється супероксиддисмутазою (СОД; ЕС 1.15.1.1), каталазою (КАТ; ЕС 1.11.1.6) і селензалежною та незалежною глутатіонпероксидазами (ГПО; GSH-Px; ЕС 1.11.1.9). СОД перетворює супероксид - аніон в реакції дисмутації на перекис водню і молекулярний кисень. Знищення перекису водню здійснюється КАТ чи ГПО. У пероксидазній реакції відновлена форма глутатіону (GSH) окиснюється до GSSG (окисненої форми глутатіону). У клітині GSSG відновлюється за участі НАДФН і глутатіонредуктази (ГР; GSSG - Rx; ЕС 1.6.4.27). Активність вказаних ензимів клітин фолікулів яєчників залежить від багатьох факторів. Зокрема встановлено, що активність ензимів АОЗ у фолікулярній рідині і клітинах фолікулів залежить від віку [1]. З віком знижується відношення між активністю ензимів: каталаза / СОД, що спричиняє нагромадження АФК і викликає оксидативний стрес. Автори пов'язують нагромадження АФК з наростанням гіпоксичних явищ, порушенням мікроциркуляції і функцій клітин гранульозного шару [2]. Крім цього, важливе значення для функціонування клітин фолікулів мають гормони. Встановлено, що ФСГ стимулює синтез глутатіону (GSH) і підвищує антиоксидантний захист культури гранульози [3]. При цьому, більш активний синтез і зростання вмісту відновленої форми глутатіону проявляється за присутності естрадіолу [4]. Подібну залежність від рівня гормонів (інтенсивності стероїдогенезу) виявлено при вивченні активності СОД в фолікулах і клітинах гранульози [5].

Оскільки клітини гранульози проявляють активність ензимів ферментативної ланки антиоксидантного захисту і здатні синтезувати статеві гормони *in vitro*, вивчали активність СОД, ГПО і КАТ та концентрацію естрадіолу, прогестерону і тестостерону в культурі клітин за тривалого культивування.

Матеріал і методи. Для досліджень підібрані клінічно здорові корови-аналоги української чорно-рябої молочної породи, віком 6 - 8 років. Після забою корів відбирали яєчники різного фізіологічного стану [6]: фолікулярного зростання (без жовтого тіла); зі свіжою овуляцією (на місці фолікула є відтулина, жовте тіло відсутнє або червоного кольору, діаметром до 0,5 см); з раннім жовтим тілом (червоного або брунатного кольору, діаметром 1,0-2,0 см); з пізнім жовтим тілом (жовтого кольору, діаметром 0,5-1,5 см). Для досліджень використані статеві залози корів з фолікулами розміром до 4 мм (малі), 4 - 7 мм (середні) і понад 7 мм (великі). Для отримання клітин гранульози аспірували фолікули, антральну рідину центрифугували 10 хв при 2000 об/хв, супернатант

відділяли, а осад клітин суспендували в середовищах культивування клітин: Basal Medium Eagle (BME) і RPMI-1640 з додаванням (в мас.%): еструсної сироватки корів 8-12 %; фолікулярної рідини - 10-12 %, гепарин (5 тис. од.) – 0,0005-0,0015). У культурі клітин визначали: активність супероксиддисмутази - за кількістю нітроформазану, що утворюється в реакції між феназинметасульфатом та НАДН (МО/мг білка) [7], каталази методом Королюк М.А. та ін. (мкмоль/хв×мг білка) [8], глутатіонпероксидази - з використанням реактиву Елмана (мкмоль/хв×мг білка) [9] і концентрацію гормонів (естрадіолу, прогестерону і тестостерону; нмоль/л середовища культивування клітин) - імуноферментним методом з використанням наборів реактивів фірми «DRG». Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за М.О. Плохінським [10].

Результати дослідження. Клітини гранульози за культивування проявляють активність ензимів АОЗ: СОД - $12,4 \pm 0,74$ МО/мг білка, ГПО і КАТ, відповідно, $0,61 \pm 0,06$ та $0,39 \pm 0,02$ мкмоль/хв×мг білка і характеризуються синтезом гормонів: тестостерону – $1,6 \pm 0,36$, естрадіолу – $7,5 \pm 0,70$ і прогестерону – $37,9 \pm 3,74$ нмоль/л (табл. 1, 2). Активність ензимів антиоксидантного захисту і утворення гормонів гранулозою впродовж культивування залежать від фізіологічного стану яєчників.

Таблиця 1

Активність ензимів антиоксидантної системи за інкубування клітин гранульози, М±m

Стан яєчника	Фолікул, мм	n	Вміст білка, мг/мл	Активність ензимів		
				СОД, МО/мг білка	ГПО, мкмоль/хв×мг білка	КАТ, мкмоль/хв×мг білка
Свіжа овуляція	> 7	3	$11,1 \pm 3,32$	$17,8 \pm 5,48$	$0,24 \pm 0,05$	$0,56 \pm 0,15$
	4 - 7	3	$11,9 \pm 3,64$	$17,0 \pm 4,95$	$0,25 \pm 0,07$	$0,54 \pm 0,16$
	4 <	3	$8,2 \pm 1,63$	$19,8 \pm 3,75$	$0,27 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,18$
Раннє жовте тіло	> 7	5	$15,2 \pm 3,60$	$9,3 \pm 3,18$	$1,14 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,04$
	4 - 7	3	$21,0 \pm 4,15$	$6,8 \pm 1,72$	$0,09 \pm 0,02^{***}$	$0,28 \pm 0,04$
	4 <	3	$16,1 \pm 3,52$	$8,2 \pm 1,96$	$0,08 \pm 0,01^{***}$	$0,40 \pm 0,05$
Пізнє жовте тіло	> 7	9	$10,8 \pm 2,96$	$18,9 \pm 3,99$	$0,80 \pm 0,22$	$0,53 \pm 0,09$
	4 - 7	6	$13,3 \pm 5,17$	$17,5 \pm 4,99$	$0,83 \pm 0,37$	$0,55 \pm 0,10$
	4 <	7	$12,8 \pm 5,03$	$14,1 \pm 3,47$	$1,01 \pm 0,37$	$0,51 \pm 0,08$
Фолікулярний ріст	> 7	33	$15,1 \pm 2,15$	$12,2 \pm 1,47$	$0,72 \pm 0,12$	$0,50 \pm 0,06$
	4 - 7	29	$16,3 \pm 2,18$	$11,1 \pm 1,38$	$0,57 \pm 0,09$	$0,30 \pm 0,04$
	4 <	31	$14,5 \pm 1,53$	$11,4 \pm 1,24$	$0,61 \pm 0,12$	$0,31 \pm 0,04$

Примітка. Різниця статистично вірогідна порівняно з максимальною величиною показника: *** $p < 0,001$

За час культивування висока активність СОД проявляється у клітин з фолікулів статевої залози «свіжої овуляції» та «пізнього жовтого тіла» ($17,0 - 18,2$ МО/мг білка), нижча на $31,8 - 36,3$ % «фолікулярного росту» і найменша «раннього жовтого тіла» ($8,1 \pm 1,41$ МО/мг білка). Різниця між максимальною і мінімальною величинами значень показника – $55,5$ % ($p < 0,01$). Подібну залежність виявлено при дослідженні ензимів, які перетворюють H_2O_2 . Активність ГПО низька за «раннього жовтого тіла» ($0,09 \pm 0,01$ мкмоль/хв×мг білка), на $64,0$ % збільшується при «свіжій овуляції» і ще на $86,0 - 89,7$ %

($p < 0,001$) вища при «фолікулярному рості» та «пізньому жовтому тілі». Аналогічно, активність КАТ понижена за «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» ($0,34 - 0,36$ мкмоль/хв×мг білка) та вища за «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла» ($0,53 - 0,56$ мкмоль/хв×мг білка).

При цьому, найвища концентрація гормонів встановлена в культурі клітин зі статевої залози «пізнього жовтого тіла»: тестостерону – $3,3 \pm 1,28$, естрадіолу – $9,1 \pm 1,30$ і прогестерону – $58,0 \pm 11,15$ нмоль/л (табл. 2). Нижча здатність утворювати тестостерон (на 39,4 %) характерна для клітини з яєчників «фолікулярного росту», ще менша (на 60,4 %) «свіжої овуляції» і найнижча «раннього жовтого тіла» ($0,40 \pm 0,12$ нмоль/л). Різниця між максимальною і мінімальною величинами значень – 87,9 % ($p < 0,05$). Аналогічно, нижчу на 15,4 - 18,7 % інтенсивність утворення естрадіолу ($7,4 - 7,7$ нмоль/л), порівняно з максимальним значенням, забезпечує культивування гранульози з яєчників «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» та ще меншу (на 45,1 %) - зі «свіжої овуляції».

Таблиця 2

Концентрація гормонів в середовищі за культивування гранульози, $M \pm m$

Стан яєчника	Фолікул, мм	n	Концентрація гормонів, нмоль/л		
			Тестостерон	Естрадіол	Прогестерон
Свіжа овуляція	> 7	3	$1,75 \pm 0,25$	$4,2 \pm 2,20$	$54,0 \pm 10,61$
	4 - 7	3	$1,22 \pm 0,37$	$4,7 \pm 0,40$	$68,0 \pm 8,16$
	4 <	3	$1,00 \pm 0,57$	$5,7 \pm 0,60$	$37,0 \pm 9,18^*$
Раннє жовте тіло	> 7	5	$0,50 \pm 0,21$	$7,8 \pm 2,50$	$59,1 \pm 11,13$
	4 - 7	3	$0,58 \pm 0,15$	$6,8 \pm 2,30$	$17,7 \pm 3,07^{**}$
	4 <	3	$0,04 \pm 0,01^{**}$	$8,6 \pm 3,0$	$18,9 \pm 3,76^{**}$
Пізнє жовте тіло	> 7	9	$5,8 \pm 1,81$	$11,3 \pm 2,0$	$77,0 \pm 12,70$
	4 - 7	6	$0,61 \pm 0,41^*$	$10,3 \pm 1,90$	$49,2 \pm 18,41$
	4 <	7	$1,01 \pm 0,69$	$5,3 \pm 1,30^*$	$44,0 \pm 20,14$
Фолікулярний ріст	> 7	33	$2,40 \pm 1,23$	$7,9 \pm 1,60$	$50,5 \pm 14,36$
	4 - 7	29	$2,50 \pm 1,07$	$7,6 \pm 2,40$	$34,3 \pm 12,96$
	4 <	31	$0,91 \pm 0,56$	$6,5 \pm 3,0$	$24,0 \pm 11,78$

Примітка. Різниця статистично вірогідна порівняно з максимальною величиною показника:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

На відміну, за культивування клітин майже однакова концентрація прогестерону, порівняно з максимальним значенням, виявлена у культурі клітин з яєчника «свіжої овуляції» ($52,9 \pm 7,13$ нмоль/л) і нижча на 37,6 - 45,0 % з «раннього жовтого тіла» та «фолікулярного росту». Отже, понижена активність ензиматичної системи АОЗ у культурі клітин проявляється низьким синтезом тестостерону, а активування ензимів - характеризує високу естрогенсинтезуючу здатність гранульози.

Активність ензимів АОЗ та інтенсивність синтезу гормонів гранульози впродовж культивування залежать від розміру фолікулів, з яких вилучені клітини. У клітин з фолікулів менше 4 мм понижена активність СОД - $12,0 \pm 1,14$ МО/мг білка, ГПО - $0,62 \pm 0,11$ мкмоль/хв×мг білка і КАТ - $0,35 \pm 0,04$ мкмоль/хв×мг білка, а за розміру більше 7 мм величини значень вищі,

відповідно, на 11,2, 8,9 і 30,0 %. При цьому, найнижча концентрація гормонів виявлена за культивування клітин з малих фолікулів (менше 4 мм): тестостерону - $0,7 \pm 0,33$, естрадіолу - $6,9 \pm 1,60$ і прогестерону - $27,0 \pm 6,05$ нмоль/л. Збільшення розміру фолікулів до 7 мм характеризує інтенсивніший синтез гормонів клітинами: на 58,9 % - тестостерону, на 8,0 % - естрадіолу і на 22,0 % - прогестерону і при більше 7 мм величини значень ще вищі, відповідно, на 75,0, 16,9 і 54,4 %.

Подібну залежність встановлено між активністю ензимів АОЗ за культивування гранульози, залежно від розміру фолікула та фізіологічного стану яєчника, і синтезом гормонів клітинами. Так, найвищі величини активності ензимів встановлені при культивуванні клітин з великого фолікула яєчника «пізнього жовтого тіла»: СОД - $18,9 \pm 3,99$ МО/ мг білка, ГПО і КАТ, відповідно, $0,80 \pm 0,22$ і $0,53 \pm 0,09$ мкмоль/хв×мг білка. Найнижчі величини значень ензимів АОЗ характерні для культури гранульози з фолікулів яєчника «раннього жовтого тіла»: СОД ($6,8 \pm 1,72$ МО/ мг білка) і КАТ ($0,28 \pm 0,04$ мкмоль/хв×мг білка) - з середнього та ГПО ($0,08 \pm 0,01$ мкмоль/хв×мг білка) - з малого. При цьому, висока концентрація гормонів виявлена у культурі клітин з фолікулів більше 7 мм яєчника «пізнього жовтого тіла» (тестостерон - $5,8 \pm 1,81$, естрадіол - $11,3 \pm 2,00$ і прогестерон - $77,0 \pm 12,70$ нмоль/л). Низькі величини досліджуваних показників за культивування гранульози: тестостерону ($0,04 \pm 0,01$ нмоль/л) і прогестерону ($17,7 \pm 3,07$ нмоль/л) встановлені з фолікулів яєчників, відповідно, з малих і середніх «раннього жовтого тіла», а естрадіолу ($4,2 \pm 2,20$ нмоль/л) - з великих «свіжої овуляції».

Таким чином, активність ензимів АОЗ клітин гранульози впродовж культивування залежить від розміру фолікула та фізіологічного стану яєчника. Висока активність СОД, ГПО і КАТ характеризує інтенсивний синтез естрогенів та їх нагромадження в середовищі культивування, а понижений антиоксидантний захист клітин гранульози проявляється однозначним зниженням утворення гормонів.

Висновки:

1. Клітини гранульози за культивування проявляють активність ензимів антиоксидантного захисту: СОД - $12,4 \pm 0,74$ МО/ мг білка, ГПО і КАТ, відповідно, $0,61 \pm 0,06$ та $0,39 \pm 0,02$ мкмоль/хв×мг білка.

2. Для культури гранульози характерний синтез і нагромадження стероїдних гормонів в середовищі культивування: тестостерону - $1,6 \pm 0,36$, естрадіолу - $7,5 \pm 0,70$ і прогестерону - $37,9 \pm 3,74$ нмоль/л.

3. Інтенсивність утворення гормонів клітинами гранульози за культивування *in vitro* залежить від розміру фолікулів і фізіологічного стану яєчників корів, з яких вони вилучені.

4. Активність ензиматичної ланки АОЗ характеризує здатність та інтенсивність синтезу стероїдних гормонів клітинами гранульози.

Література

1. Carbone M. C. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. / M. C. Carbone, C. Tatone, S. Delle

Monache, R. Marci, D. Caserta, R. Colonna // *Molecular Human Reproduction*. — 2003. — V. 9. — № 11. — P. 639 – 643.

2. Friedman C. Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction. / C. Friedman, D. R. Danforth, C. Herbosa-Encarnacion, L. Arbogast, B. M. Alak, D. B. Seifer // *Fertil. Steril*. — 1997. — V. 68. — P. 607 – 612.

3. Tsai-Turton M. Opposing effects of glutathione depletion and FSH on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles. / M. Tsai-Turton, U. Luderer // *Endocrinology*. — 2006. — V. 147. — P. 1224 – 1236.

4. Yvonne D. Ulrike Luderer Follicle-stimulating hormone and estradiol interact to stimulate glutathione synthesis in rat ovarian follicles and granulosa cells. / D. Yvonne, N. Brooke, Nakamura // *Biol. Reprod*. — 2009. — V. 81. — P. 636 – 646.

5. Catherine M. H. Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles *Reproduction*. / M. H. Catherine, A. Emily, Holick, J. Louis Paoella, C. David // *Qiaqia Wu Walker*. — 2010. — V. 139. — P. 871 – 881.

6. Гузеватий О. Є. Оцінка функціонального стану ооцит-кумулясних комплексів корів залежно від типу яєчника / О. Є. Гузеватий, В. В. Ясінський, Л. В. Смудка та ін. // *Вісник аграрної науки*. — 1995. — № 11. — С. 94 – 98.

7. Чевари С. Н. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Н. Чевари, Т. А. Андян, Я. И. Штрэнгер // *Лаб. дело*. — 1991. — № 10. — С. 9 – 13.

8. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // *Лаб. дело*. — 1991. — № 12. — С. 16 – 19.

9. Моим В. М. Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах. / В. М. Моим / *Лаб. дело*. — 1986. — № 12. — С. 724 – 727.

10. Плохинский Н. А. Биометрия. / Н. А. Плохинский // М.: МГУ. — 1970. — С. 53 – 60.

Рецензент – д.с.-г.н., профессор Шаловило С.Г.