

АКТИВНІСТЬ ТА ВМІСТ ІЗОЗИМІВ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗИ В КЛІТИНАХ ГРАНУЛЬОЗНОГО ШАРУ З ФОЛІКУЛІВ ЯЄЧНИКІВ КОРІВ

Ю. В. Боднар¹, канд. с.-г. наук,
Н. В. Кузьміна¹, канд. біол. наук,
Д. Д. Остапів¹, д-р с.-г. наук,
С. Й. Кава², канд. вет. наук,
О. І. Чайковська³, канд. біол. наук, с. н. с.,
Р. Д. Остапів³, канд. біол. наук

¹Інститут біології тварин НААН
вул. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна
oddost@ukr.net

²Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

³Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна
alexandra.dndki@gmail.com

Вивчали активність та вміст ізоформ супероксиддисмутази (СОД) в клітинах гранульози з фолікулів яєчників корів. Для досліджень після забою корів відбирали яєчники, які за фізіологічним станом ділили на групи: зі "свіжою" овуляцією, на місці овульованого фолікула є відтулина, жовте тіло відсутнє або діаметр до 5 мм, колір червоний (n = 14); з "раннім" жовтим тілом, діаметр 10–20 мм, колір червоний або брунатний (n = 41); з "пізнім" жовтим тілом, діаметр 5–15 мм, колір жовтий (n = 32); "фолікулярного росту", без жовтого тіла (n = 84). Використовували яєчники корів з фолікулами малими (< 4 мм), середніми (4 – 7 мм) і великими (> 7 мм). З фолікулів отримували антральну рідину, з якої виділяли клітини гранульози. Клітини суспендували, відповідно до об'єму фолікулярної рідини, в середовищі Dulbeccos modified Eagle medium (DME) з додаванням еструсної сироватки корів, фолікулярної рідини, інсуліну і гепарину. В культурі клітин визначали: концентрацію протеїну, активність та ізозими супероксиддисмутази.

Встановлено, що клітини гранульози характеризуються активністю СОД – $12,4 \pm 0,74$ МО/мг протеїну ($6,8 \pm 1,72$ – $19,8 \pm 3,75$ МО/мг білка). Активність СОД в культурі клітин гранульози забезпечують 5 – 6 ізоформ ензиму. Виявлено, що ізоформи за місцем локалізації розділені на цитозольні, мітохондріальний й позаклітинний протеїни СОД. Цитозольна ізоформа представлена 3 – 4, а на мітохондріальну і позаклітинну припадає по одному активному протеїну ензиму. Активність ензиму й вміст ізоформ залежить від розміру фолікулів з яких вилучені клітини й фізіологічного стану яєчників. Досліджені показники характеризують напруженість окисного метаболізму як в цілому в клітинах, так і в окремих їх частинах і органелах. Для культивування доцільно відбирати клітини гранульози з фолікулів яєчника «фолікулярного росту» і «пізнього жовтого тіла» оскільки для них характерна стабільно висока активність СОД, яка забезпечує захист внутрішньоклітинних компонентів від цитотоксичної дії супероксиданіону.

Ключові слова: СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, КЛІТИНИ ГРАНУЛЬОЗИ, ФОЛІКУЛИ, ЯСЧНИКИ, КОРОВИ.

ACTIVITY AND CONTENT OF SUPEROXIDEDISMUTASE ISOZYMES IN GRANULOSE CELLS FROM COW OVARY FOLLICLES

Yu. V. Bodnar¹, N. V. Kuzmina¹, D. D. Ostapiv¹, S. W. Kawa², O. I. Chajkovska³, R. D. Ostapiv³

¹Institute of Animal Biology of NAAS
Stus street, 38, Lviv, 79043, Ukraine
oddost@ukr.net

²Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv
Pekarska street., 50, Lviv, 79010, Ukraine

³State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
Donetska street, 11, Lviv, 79019, Ukraine
alexandra.dndki@gmail.com

The activity and content of superoxide dismutase isoforms (SOD) in granulosa cells from cow ovarian follicles were studied for research after slaughter of cows ovaries were selected, which according to the physiological state were divided into groups: with "fresh" ovulation, at the site of the ovulated follicle there is a hole, no corpus luteum or diameter up to 5 mm, red color (n = 14); with "early corpus luteum", diameter 10-20 mm, color red or brown (n = 41); with "late corpus luteum", diameter 5–15 mm, color yellow (n = 32); "follicular growth", without the corpus luteum (n = 84). The ovaries of cows with small (<4 mm), medium (4 - 7 mm) and large (> 7 mm) follicles were used. Antral fluid was obtained from the follicles, from which granulosa cells were isolated. Cells were suspended according to the volume of follicular fluid in the medium Dulbeccos modified Eagle medium (DME) with the addition of estrus serum of cows, follicular fluid, insulin and heparin. In cell culture, protein concentration, activity, and superoxide dismutase isozymes were determined.

It was found that granulosa cells are characterized by SOD activity - 12.4 ± 0.74 IU / mg protein (6.8 ± 1.72 - 19.8 ± 3.75 IU / mg protein). The activity of SOD in the culture of granulosa cells had 5–6 isoforms of the enzyme. It was found that isoforms at the site of localization are divided into cytosolic, mitochondrial and extracellular proteins of SOD. The cytosolic isoform were represented by 3 - 4, and mitochondrial and extracellular have one active protein of the enzyme. The activity of the enzyme and the content of isoforms depended on the size of the follicles from which the cells are removed and the physiological state of the ovaries. The studied indicators characterize the intensity of oxidative metabolism as a whole in cells and in their individual parts and organelles. For cultivation, it is advisable to select granulosa cells from ovarian follicles of "follicular growth" and "late corpus luteum" because they are characterized by consistently high activity of SOD, which protects intracellular components from the cytotoxic action of superoxide anion.

Keywords: SUPEROXIDE DISMUTASE, GRANULOSE CELLS, FOLLICLES, OVARIES, COWS.

Активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту (АОЗ) у фолікулах яєчників самок знищує цитотоксичні продукти Оксигену, забезпечує збереженість генетичного матеріалу й існування ооцит-кумулясних комплексів, значною мірою визначає здатність до запліднення статевих клітин і розвитку ембріонів (Kwon et al., 1999; Hensley et al., 2000; Zeron et al., 2001; Droge, 2002; Lenzi et al., 2002; Devine, & Perreault, 2012). Відомо, що ключовим ензимом АОЗ є супероксиддисмутаза (СОД), яка існує в трьох генетично зумовлених ізоформах, які містяться в різних компартментах клітин та виконують різні функції. При

цьому, рівень утворення та інтенсивність знищення АФО визначається рядом факторів *in vivo*: дією гонадотропних гормонів, впливом різноманітних ендо- і екзогенних чинників, що, своєю чергою, впливає на здатність клітин виживати за культивування (Schreck, & Baeuerle, 1991; Friedman et al., 1997; Combelles et al., 2010). Тому, вивчали активність та вміст ізозимів СОД в зв'язку з фізіологічним станом статевої залози і розміром фолікулів корів.

Матеріали і методи. Для досліджень після забою корів відбирали яєчники. Статеві залози оцінювали візуально і за фізіологічним станом ділили на групи: з "свіжою" овуляцією, на місці овульованого фолікула є відтулина, жовте тіло відсутнє або діаметр до 5 мм, колір червоний (СО; n = 14); з "раннім" жовтим тілом, діаметр 10–20 мм, колір червоний або брунатний (РЖТ; n = 41); з "пізнім" жовтим тілом, діаметр 5–15 мм, колір жовтий (ПЖТ; n = 32); "фолікулярного росту", без жовтого тіла (ФР; n = 84). Використовували яєчники корів з фолікулами малими (< 4 мм), середніми (4 – 7 мм) і великими (> 7 мм) (Huzevaty et al., 1995). З фолікулів вказаних діаметрів, шляхом аспірації, отримували антральну рідину, центрифугували при 2000 об./хв супернатант відділяли, а осад клітин суспендували, відповідно до об'єму фолікулярної рідини, в середовищі Dulbeccos modified Eagle medium (DME) з додаванням (в мас. %): еструсної сироватки корів 8-12 %; фолікулярної рідини – 10-12 %, інсуліну (4 мкг/мл), гепарину (5 тис. од.) – 0,001 - 0,0015 мл). В культурі клітин визначали: концентрацію протеїну реактивом Фоліна-Чокальтеу (Lowry et al., 1951); активність супероксиддисмутази – за кількістю нітроформазану, що утворюється в реакції між феназинметасульфатом та НАДН (Chevari et al., 1991). Ізозими СОД виявляли після електрофорезу в 10 % ПААГ для чого зразки культури клітин розбавляли 1:4 Трис-гліциновим буфером (рН 8,5), додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,02 мл проби (концентрація протеїну ~ 100 мкг). Проводили електрофорез. Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом Beauchamp та Fridovich (Beauchamp & Fridovich, 1971) в модифікації (Kuzmina & Ostapiv, 2008; Vlizlo et al., 2012).

Результати й обговорення. Встановлено, що клітини гранульози проявляють активність СОД - $12,4 \pm 0,74$ МО/ мг протеїну (табл. 1).

Таблиця 1

Активність супероксиддисмутази за інкубування клітин гранульози, $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	Фолікул, мм	n	Активність СОД, МО/ мг протеїну
«свіжа овуляція»	> 7	3	17,8±5,48
	4 - 7	3	17,0±4,95
	4 <	3	19,8±3,75
«раннє жовте тіло»	> 7	5	9,3±3,18
	4 - 7	3	6,8±1,72**
	4 <	3	8,2±1,96
«пізнє жовте тіло»	> 7	9	18,9±3,99
	4 - 7	6	17,5±4,99
	4 <	7	14,1±3,47
«фолікулярний ріст»	> 7	33	12,2±1,47
	4 - 7	29	11,1±1,38
	4 <	31	11,4±1,24

Примітка: Різниця статистично вірогідна порівняно з максимальною величиною значенням – **p < 0,01

Активність ензиму антиоксидантного захисту залежать від фізіологічного стану яєчників з яких отримані клітини. Висока активність СОД характерна для клітин із статевих залоз «свіжої овуляції» та «пізнього жовтого тіла» (17,0 – 18,2 МО/ мг протеїну), нижча на 31,8 - 36,3 % з «фолікулярного росту» і найменша (8,1±1,41 МО/ мг протеїну) з «раннього жовтого тіла». Різниця між максимальною і мінімальною величинами значень показника – 55,5 % (p < 0,01).

Таким чином, для гранульози з фолікулів яєчника «фолікулярного росту», характерна стабільна активність СОД. У клітин з фолікулів яєчників «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла» проявляється тенденційно вища активність ензиму, що може вказувати на активування окисних процесів й інтенсивніше утворення $O_2^{\cdot-}$. Клітини гранульози яєчника «раннього жовтого тіла» характеризуються найнижчою активністю СОД, що свідчить про потенційне нагромадження $O_2^{\cdot-}$ і, як наслідок, порушення обмінних процесів та їх уразливість. Активність СОД забезпечують окремі ізоформи, які в процесі електрофоретичного розділення проявляються на фореграмах окремими смугами. Зокрема, на фореграмах СОД гранульози виявляється 5 – 6 смуг протеїнів з активністю ензиму (рис.).

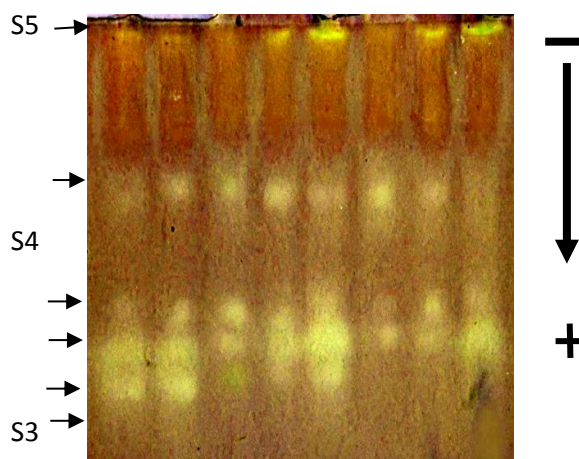


Рис. Ізоформи СОД клітин гранульози: S5; S4; S3; S2; S1; S0

Ізоформи за електрофоретичною рухливістю й, відповідно, величиною молекули, відповідають: позаклітинній, мітохондріальній та цитозольній СОД. При цьому, залежно від фізіологічного стану яєчника у клітинах гранульози кількість смуг активних протеїнів, інтенсивність проявлення в ПААГ та їх вміст неоднакові. Так, зона рухливості цитозольної ізоформи СОД представлена в основному трьома протеїнами ензиму S1, S2 і S3. Крім того, у клітин гранульози, яка отримана з яєчника «фолікулярного росту» проявляється додатковий, найбільш рухливий в електричному полі, ізоформ Cu,Zn-СОД – S0. В зоні рухливості мітохондріальної (Mn-СОД) та позаклітинної (ES-СОД) СОД виявлено по одній смузі активних протеїнів ензиму, відповідно, S4 (Mn-СОД) і S5 (ES-СОД).

Поряд з якісною відмінністю спектру ізоформ відрізняється й їх вміст. Зокрема, за культивування гранульози з фолікулів яєчника «свіжої овуляції» високий вміст S3 ($29,3 \pm 7,06$ %) і понижений ($6,7 \pm 0,72$ %) – S5 (позаклітинного; табл. 2).

Таблиця 2

Вміст ізоформ СОД в культурі клітин гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника, %; $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	n	Вміст ізоформ				
		Cu,Zn-СОД; СОД1			Mn-СОД	ES-СОД
		S1	S2	S3	S4	S5
свіжа овуляція	9	$15,7 \pm 2,40$	$18,7 \pm 7,66$	$29,3 \pm 7,06$	$29,7 \pm 7,09$	$6,7 \pm 0,72$
раннє жовте тіло	11	$13,7 \pm 1,10$	$13,3 \pm 3,41$	$15,7 \pm 1,78$	$44,7 \pm 5,36^*$	$12,7 \pm 1,19^{**}$
пізнє жовте тіло	22	$16,1 \pm 1,90$	$22,6 \pm 2,75^*$	$15,7 \pm 1,70$	$32,0 \pm 2,76$	$13,6 \pm 1,74^{***}$
фолікулярний ріст	93	$18,6 \pm 1,20^{**}$	$19,9 \pm 1,24$	$19,7 \pm 1,29$	$31,3 \pm 1,59$	$10,5 \pm 0,69^{***}$

Примітка: у цій і наступній табл.: Різниця статистично вірогідна порівняно з мінімальною величиною значенням: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

У культурі клітин з інших фізіологічних станів яєчників, порівняно зі «свіжою овуляцією», навпаки, вміст S3 нижчий на 9,6 – 13,6 %, а S5 в 1,5 – 2 рази ($p < 0,01$ – 0,001)

вищий. Крім того, більш високий вміст S1 у клітин з яєчників «фолікулярного росту» (18,6±1,20 %), менший з «пізнього жовтого тіла» та «свіжої овуляції», відповідно, 15,7 і 16,1 %, а найнижчий (13,7 ± 1,10 %) з «раннього жовтого тіла». Різниця між мінімальною і максимальною величинами значення 4,9 % (p < 0,01). Подібна відмінність встановлена за вмістом S2: високий (22,6±2,75 %) у клітин з «пізнього жовтого тіла», нижчий на 2,7 – 3,9 % з «фолікулярного росту» та «свіжої овуляції» і найменший (13,3±3,41 %) з «раннього жовтого тіла». Різниця між вмістом S2 клітин отриманих з яєчників «пізнього» і «раннього жовтого тіл» становить 9,3 % (p < 0,05). Вміст Mn-СОД у клітин з яєчника «раннього жовтого тіла» максимальний (44,7±5,36 %) і на 12,7 – 15,0 % (p < 0,05) нижчий з інших фізіологічних станів статевих залоз. У гранульозі з яєчника «свіжої овуляції» вміст ES-СОД (6,7±0,72 %) найнижчий і на 3,8 – 6,9 % (p < 0,01 – 0,001) вищий у клітин з інших фізіологічних станів статевих залоз. Таким чином, для гранульози з яєчника «фолікулярного росту» за культивування характерний стабільно високий вміст Cu,Zn- та ES-СОД і понижений Mn-СОД; «пізнього жовтого тіла» – підвищений вміст S2 Cu,Zn- і ES-СОД; «раннього жовтого тіла» – максимально високий вміст Mn- і ES-СОД та понижений Cu,Zn-СОД; «свіжої овуляції» – високий вміст S3 Cu,Zn-СОД та низький Mn- і ES-СОД.

Отримані результати свідчать про високу здатність клітин гранульози з яєчника «фолікулярного росту» за культивування захищати внутрішньоклітинні компоненти від O₂⁻. При цьому, нагромадження супероксиданіону в мітохондріях низьке й, відповідно, понижений вміст мітохондріального ізоциму СОД. У клітин гранульози з інших фізіологічних станів статевої залози за культивування активуються процеси утворення O₂⁻: в цитозолі - з яєчників «пізнього жовтого тіла» та «свіжої овуляції» і в мітохондріях – з «раннього жовтого тіла». Крім того, для гранульози з яєчника «свіжої овуляції» характерний низький захист від O₂⁻ зовнішньої поверхні мембрани клітин.

Подібні відмінності виявлені за дослідження вмісту ізоцимів СОД у клітинах з урахуванням розміру фолікулів, з яких вони вилучені. Для культури гранульози з фолікулів більше 7 мм, порівняно з меншими, яєчника «свіжої овуляції» вміст S1 і S3 вищий, відповідно, на 6,0 – 11,0 % та 21,0 – 29,0 %, S2 і S4 нижчий на 24,0 – 31,0 та 25,0 – 27,0 % (табл. 3).

Таблиця 3

Вміст ізоцимів СОД в клітинах гранульози залежно від розміру фолікулів, з яких вони отримані і фізіологічного стану яєчника, %; M ± m

Стан яєчника	мм	n	Вміст ізоцимів				
			S1	S2	S3	S4	S5
«свіжа овуляція»	>7	3	21,0±5,17	6,0±0,47***	46,0±0,94	20,0±0,94	7,0±0,35
	4-7	3	11,0±1,18	37,0±1,41	25,0±1,90	22,0±1,89	5,0±0,24
	4<	3	15,±0,94	13,0±1,30	17,0±0,94	47,0±1,20	8,0±0,47
«раннє жовте тіло»	>7	5	15,0±1,89	18,0±1,31	20,0±0,71	32,0±1,89	15,0±0,94
	4-7	3	15,0±0,71	5,0±0,47***	13,0±1,43***	54,0±2,36	13,0±1,18
	4<	3	9,0±0,72*	18,0±2,36	14,0±0,94***	48,0±1,89	11,0±1,33
«пізнє жовте тіло»	>7	9	16,2±2,20	23,4±3,32	14,8±2,73	30,6±3,29	15,0±2,42
	4-7	6	18,8±3,80	21,0±5,55	17,4±2,93	35,0±4,66	7,8±1,37
	4<	7	13,4±3,60	22,4±5,79	15,8±1,58	31,6±6,48	16,8±3,03
«фолікулярний ріст»	>7	33	22,8±2,10	20,1±2,03	18,0±1,93	28,3±2,10	10,8±1,10
	4-7	29	18,1±1,90	19,9±2,37	21,1±2,93	31,2±3,56	9,7±1,31
	4<	31	15,2±1,80	19,3±2,26	20,7±2,00	34,4±2,84	10,4±1,32

У клітинах гранульози з фолікулів 4 – 7 мм яєчника «раннього жовтого тіла», порівняно з малими і великими, на 13,0 % менший вміст S2 і на 6,0 – 22,0 % більший S4. При цьому, вміст S3 і S5, відповідно, вищий на 6,0 – 7,0 % і 2,0 – 4,0 % у гранульозі з фолікулів більше 7 мм, порівняно з меншими. Культура клітин з яєчника «пізнього жовтого тіла», не залежно від розміру фолікулів, характеризується майже однаковим вмістом ізоцимів СОД: 13,4 – 18,8 %

– S1, 21,0 – 23,4 % – S2, 14,8 – 17,4 % – S3, 30,6 – 35,0 % – S4. Однак, вміст S5 в культурі з середнього фолікула, порівняно до інших за розміром, нижчий на 7,2 - 9,0 % ($p < 0,05$). У гранульозі з яєчника «фолікулярного росту» зі збільшенням фолікула від менше 4 до більше 7 мм при культивуванні зростає вміст S1 (на 7,5 %; $p < 0,01$) і на 6,1 % знижується S4.

Отже, у гранульозі зі статевої залози «фолікулярного росту» вище окисне навантаження на цитозольні структури й проявляється тенденція до послаблення захисту мітохондрій від $O_2^{\cdot-}$. У гранульозі із середніх фолікулів яєчників «пізнього жовтого тіла» існує понижена здатність утилізувати $O_2^{\cdot-}$ у позаклітинному просторі й, відповідно, захищати зовнішню поверхню мембрани клітин, а «раннього жовтого тіла» – як знижена здатність перетворювати $O_2^{\cdot-}$ в цитозолі, так і надмірне його утворення в мітохондріях. Для клітин гранульози з яєчника «свіжої овуляції» характерне порушення балансу між вмістом окремих ізоформ СОД, що зумовлено, ймовірно, запрограмованим впливом статевих гормонів (гонадотропінів) на метаболічні процеси *in vivo* (ще до вилучення клітин з фолікулів).

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що клітини гранульози проявляють активність СОД, яка залежить від фізіологічного стану яєчників з яких вони отримані.

2. Клітини з великого фолікула яєчників «фолікулярного росту» та «пізнього жовтого тіла» характеризуються стабільно високою активністю СОД, що свідчить про високий рівень антиоксидантного захисту гранульози. Підвищена активність ензиму у гранульозі з всіх фолікулів яєчника «свіжої овуляції» та низька з великого і середнього - «раннього жовтого тіла» вказують на дисбаланс окисних процесів в клітинах й пониженою здатністю до виживання.

3. На фореграмах СОД виявляється 5 - 6 смуг протеїнів з активністю ензиму. При цьому залежно від фізіологічного стану яєчника у клітинах гранульози кількість смуг активних протеїнів, інтенсивність проявлення в ПААГ та їх вміст неоднакові.

4. Вміст ізозимів СОД у клітинах гранульози залежить від розміру фолікулів, з яких вони вилучені.

Перспективи досліджень. Вивчити активність і спектр ізозимів супероксиддисмутази за тривалого культивування клітин гранульози фолікулів яєчників корів.

References

Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44. 276–287.

Chevari S.N., Andyan, T.A., Shtrenger, Ya.I. (1991). *Opređenje antioksidantnykh parametrov krvi i ikh diagnosticheskoe znachenie v pozhilom vozraste.* *Lab. Delo.* 10. 9-13. [in Russian].

Combelles, C., Holick, E., Paoletta, L., Walker, D. et al. (2010). Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles *Reprod.* 139. 871–881.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* — 2002. 82. 47–95.

Devine, P.J. & Perreault, S.D. (2012). Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity. *Biol. of Reprod.* 86. 2–27.

Friedman, C., Danforth, D., Herbosa-Encarnacion, C., Arbogast, L. et. al. (1997). Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction. *Fertil. Steril.* 68. 607–612.

Hensley, K., Robinson, K., Garitta, S., Salsman, S. (2000). Oxygen species, cell signalling and cell injury. *Free Rad. Biol. Med.* 28. 1456–1462.

Huzevatyi, O.Ye., Yasynskiy V.V., Smulka, L.V. et al. (1995). Otsinka funktsionalnogo stanu ootsyt-kumulyusnykh kompleksiv koriv zalezho vid typu yayechnyca. *Visnyk agrarnoi nauky*. 11. 94-98. [in Ukrainian].

Kuzmina, N.V. & Ostapiv, D.D. (2008). Aktyvnist superoksyd dysmutazy i glutation peroxydazy v riznykh organakh i krovii koriv. *Biologiya tvaryn*. 12. 423-429. [in Ukrainian].

Kwon, H., Yang, H., Hwang, K. et al. (1999). Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. *Obstet. Gynaecol. Res.* 25. 359 – 366.

Lenzi, A., Gandini, L., Lombardo, F., Picardo, M. et al. (2002). Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic Contraception. 65. 301–304.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fair, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 1. 264–275.

Schreck, R. & Baeuerle, P.A. (1991). A role for oxygen radicals as second messenger. *Trends. Cell. Biol.* 1. 39–42.

Vlizlo, V.V., Fedoruk, R.S., Ratych I.B. et al. (2012). Laboratorni metody doslidzhen v biologii, tvarynnytstvi ta veterynarnij medytsyni. *Lviv. Spolom.* 764. [in Ukrainian].

Zeron, Y., Ocherentny, A., Kedar, O., Borochoy, A. et al. (2001). Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reprod.* 121. 447–454.