

ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЕ И В СПЕРМАТОЗОИДАХ САМЦОВ БЕЛЫХ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ВОЗДЕЙСТВИЮ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МАЛОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Николаев А.А., Ушакова М. В., Николаева Н.Н.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru

Распространенность бесплодия составляет приблизительно 15% всех браков, при этом на мужские факторы приходится от 30 до 50% этого показателя. Многочисленные исследования показывают, что качество и количество сперматозоидов у мужчин снижается из года в год. Цель данного исследования: изучение свойств щелочной фосфатазы репродуктивной системы крыс в условиях гонадотоксического действия миллиметрового излучения слабой интенсивности и их связь с репродуктивной функцией. Исследованию подвергались половозрелые самцы крыс (числом 42) линии Wistar массой $200 \pm 10,0$ г. Воздействие электромагнитным излучением осуществлялось в течение 30 дней по 30 мин. ежедневно. Для создания электромагнитного поля использовали генератор монохроматических электромагнитных волн («Явь-1-7,1»; $\lambda = 7,1$ мм; частота $f = 42,194$ ГГц). Полученные данные доказывают присутствие щелочной фосфатазы (ЩФ) на поверхности сперматозоидов самцов белых крыс и описывают активность фермента как в семенной плазме, так и в экстрактах сперматозоидов при разных значениях pH. Измерения при pH 7,0 указывают на то, что ЩФ в эякуляте не очень активна, поэтому ее роль заключается скорее в ингибировании капацитации, активация которой сопровождается активным дефосфорилированием. Кроме того, мы нашли некоторые интересные корреляции между ЩФ и параметрами качества спермы. Обнаружено снижение активности ЩФ после воздействия микроволнового излучения, которое приводит к повышению термостабильности этого фермента и снижению его функциональных возможностей, которые в совокупности с другими факторами могут лежать в основе идиопатического бесплодия.

Ключевые слова: щелочная фосфатаза, семенная плазма, сперматозиды, микроволновое излучение, самцы белых крыс.

CHARACTERISTIC OF ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN THE SEMINAL PLASMA AND IN THE SPERMATOOA OF MALE RATS WHITE EXPOSED TO MICROWAVE RADIATION OF SMALL INTENSITY

Nikolaev A.A. Ushakova M.V., Nikolaeva N.N.

FGBOU VO Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru

The prevalence of infertility is approximately 15% of all marriages, with male factors accounting for 30 to 50% of this indicator. The number of sperm in men is decreasing from year to year. The purpose of this study: to study the properties of rat alkaline phosphatase in the reproductive system under conditions of a weak degree of gonadotoxic effects of millimeter radiation and their relationship with reproductive function. Researchers were exposed to sexually mature male Wistar rats weighing 200 ± 10.0 g. Exposure to electromagnetic radiation was carried out for 30 days for 30 minutes daily. To create an electromagnetic field, a monochromatic electromagnetic wave generator was used (Yav-1-7.1; $\lambda = 7.1$ mm; frequency $f = 42.194$ GHz). The obtained data prove the presence of alkaline phosphatase on the surface of the sperm of male white rats and describing the activity of the enzyme both in the seminal plasma and in extracts of sperm at different pH values. Measurement at pH 7.0 leads to the fact that its role is rather to conduct capacitations, the activation of which is accompanied by active dephosphorylation. In addition, we found some interesting correlations between alkaline phosphatase and sperm quality parameters. A decrease in the activity of U after exposure to microwave radiation was found, which leads to an increase in the thermal stability of this enzyme and a decrease in its functional capabilities.

Keywords: alkaline phosphatase, seminal plasma, sperm, microwave radiation, male white rats.

Распространенность бесплодия составляет приблизительно 15% всех браков, при этом на мужские факторы приходится от 30 до 50% этого показателя [1]. Многочисленные

исследования показывают, что качество и количество сперматозоидов у мужчин снижается из года в год [2].

Производство, передача, распределение и использование электроэнергии сопровождается воздействием на организм низкочастотных электромагнитных полей. Микроволновое излучение используется в многочисленных телекоммуникационных системах, поэтому изучение его влияния на биосистемы является актуальной задачей. Изучению влияния электромагнитных полей как высоких, так и низких частотных диапазонов на живые организмы посвящено достаточно большое количество работ. Были проведены комплексные исследования воздействия микроволнового излучения на компоненты мужской репродуктивной системы [3].

Щелочная фосфатаза (ЩФ) является ферментом, который катализирует отщепление фосфатных групп от нескольких субстратов. Этот фермент присутствует в секретах мужских половых желез, и его активность была обнаружена в сперме различных видов млекопитающих [4]. Присутствие ЩФ в секретах гениталий самцов предполагает роль в репродукции млекопитающих, и в частности в метаболизме сперматозоидов [5]. Однако до сих пор не было получено однозначных данных о роли ЩФ в процессах репродукции. Традиционным способом выяснения физиологической роли того или иного агента служит исследование его в условиях патологии или стрессовой ситуации.

Цель исследования: изучить свойства щелочной фосфатазы репродуктивной системы крыс в условиях гонадотоксического действия миллиметрового излучения слабой интенсивности и их связь с изменениями количественных и качественных параметров сперматогенеза.

Материал и методы исследования

Исследованию подвергались половозрелые самцы крыс (числом 42) линии Wistar массой $200 \pm 10,0$ г. Крыс содержали с 12/12-часовым циклом свет / темнота и свободным доступом к пище и воде в течение 8 недель, крысы были случайным образом разделены на две группы. Крыс в контрольной группе содержали в стандартных условиях, в то время как опытная группа О-1 подвергалась облучению микроволновым электромагнитным излучением низкой интенсивности, воздействие электромагнитным излучением осуществлялось в течение 30 дней по 30 мин. ежедневно. Для создания электромагнитного поля использовали генератор монохроматических электромагнитных волн («Явь-1-7,1»; $\lambda = 7,1$ мм; частота $f = 42,194$ ГГц). Таким образом, были сформированы две группы: контрольная (К) и опытная (О-1), по 21 животному в каждой. Работа с лабораторными животными выполнялась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ № 755 от 12.08.88 МЗ СССР). Состояние

тестикулярного сперматогенеза оценивали с помощью метода В.П. Маминой и Д.И. Семёнова [6]. Морфологическое исследование состояния ткани семенников и семенных канальцев проводилось на парафиновых срезах. Срезы семенников толщиной 7 мкм изготавливали на микротоме Microm HM-400 (Германия) и окрашивали гематоксилин-эозином. Полученные препараты изучались на универсальном микроскопе Nu (Германия), соединенном с цветной телевизионной камерой Pixera (США). Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерной программы Image Tool (версия 3,0). Определяли продольные и поперечные диаметры извитых семенных канальцев, высоту сперматогенного эпителия, количество интерстициальных эндокриноцитов (клеток Лейдига) в пересчете на один семенной каналец. Для получения эякулята использовали метод электростимуляции семенного бугорка через слизистую прямой кишки [7], позволяющую получить max 0,6 мл семенной жидкости. Концентрацию сперматозоидов оценивали с использованием гемоцитометрической камеры Горяева. Две аликвоты (по 0,1 мл) спермы оставляли неразбавленными: одну использовали для получения семенной плазмы, а другую - для получения сперматозоидов для анализа активности ЩФ. Третью аликвоту (0,1 мл) спермы разводили в расширителе Kenney в концентрации $4,0 \times 10^6$ сперматозоидов/мл для анализа качества спермы (подвижность сперматозоидов, жизнеспособность, целостность митохондриальной мембраны). Кроме того, отдельно оценивали состояние сперматогенеза по морфологическим и кинетическим показателям эпидидимальных сперматозоидов. Концентрацию белка в семенной плазме и экстрактах сперматозоидов измеряли по методу Брэдфорда [8] с использованием БСА в качестве стандарта белка. Семенную плазму получали двумя последующими центрифугированиями аликвоты эякулята в центрифуге minispin plus при 12000 g в течение 15 минут при 4 °С. Полученный супернатант наблюдали на микроскопе для проверки отсутствия сперматозоидов или их фрагментов. Сперматозоиды дважды промывали в PBS (900 g в течение 3 минут при комнатной температуре). Затем осадок спермы обрабатывали ультразвуком в PBS и затем центрифугировали при 12000 g в течение 15 минут при 4 °С; наконец, осадок отбрасывали и супернатант анализировали на активность ЩФ. Активность ЩФ измеряли с помощью спектрофотометрического анализа, который отслеживает изменение поглощения при 405 нм, когда пара-нитрофенилфосфат (pNPP, бесцветный) превращается в пара-нитрофенол (желтый). Щелочную фосфатазу анализировали в 50 mM трис-HCl-буфере при 25 °С при различных значениях pH (7,0, 8,0 и 9,0). Активность фермента выражали в виде удельной активности, нмоль / мин / мг белка [9]. Чтобы лучше охарактеризовать изоформу ЩФ, проводили термоингибирование ЩФ, как описано Vucsi et al. [10]. Образцы выдерживали при 60, 65, 70 и 75 °С в течение 30 минут, затем помещали на лед и активность измеряли в течение 30 мин. при pH 9,0. Статистическую

обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft). Поверку распределения результатов проводили по критерию Колмогорова-Смирнова, так как распределение показателей не отличалось от нормального (значимость различий оценивали по Стьюденту), для описания полученных количественных признаков данные представляли в виде средней (M) и ошибки средней (m). Различия между выборками считались достоверными при значении для $p < 0,05$. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента. Количественная оценка линейной связи между двумя независимыми величинами определялась с использованием коэффициента ранговой корреляции по Спирмену

Результаты исследования и их обсуждение

В результате воздействия микроволнового излучения малой интенсивности было зафиксировано изменение структуры слоя клеток сперматогенного эпителия, изменение размеров клеток сперматогенного эпителия как в сторону увеличения, так и снижения. Отмечено достоверное увеличение случаев разрыва базальной мембраны. Если в контрольной группе в среднем наблюдалось 2-3 разрыва на 10 полей зрения, то в группе О-1 это число достигало 6-7. Морфометрические исследования показали в группе О-1 рост числа клеток Лейдига при снижении площади ядер клеток Лейдига с $23,0 \pm 1,01$ мкм² в контрольной группе до $14,2 \pm 2,3$ мкм² в группе О-1 ($p < 0,01$). При хроническом воздействии микроволнового излучения малой интенсивности наблюдалось снижение общего количества сперматогенных клеток в сравнении с контролем (3140 ± 655 и 5236 ± 470 млн соответственно). Кроме того, отмечался дисбаланс между разными типами сперматогенных клеток. Наиболее уязвимыми к воздействию микроволн оказались сперматогонии-А, относительный уровень которых был заметно снижен по сравнению с контрольной группой (в контрольной группе $26,2 \pm 3,1\%$, а после воздействия микроволнового излучения малой интенсивности – группа О-1 только $19,2 \pm 4,22\%$, $p < 0,001$). Общее количество зрелых сперматозоидов снизилось в 1,5 раза в сравнении с контролем ($P < 0,001$). В популяции сперматозоидов отмечалось двукратное увеличение процентного содержания патологических форм (микроцефалия, макроцефалия, аномальная форма головки, патология шейки, цитоплазматическая капля и т.п.) ($45,2\%$) в сравнении с контролем ($18,2\%$). Количество мёртвых сперматозоидов возросло в 6,5 раз.

Как показано в таблице 1, активность ЩФ в семенной жидкости значительно различается в зависимости от трех анализируемых значений рН, увеличение активности очевидно с рН 7,0 до 8,0 (почти в 6 раз), а также с рН 8,0 до 9,0 (более чем в 8 раз). В результате воздействия микроволнового излучения малой интенсивности удельная активность ЩФ достоверно снижается и также зависит от кислотности окружающей среды. Однако следует отметить,

что оптимум рН щелочной фосфатазы после воздействия микроволнового излучения малой интенсивности резко сужается, и если в контрольной группе активность ЩФ при рН 8,0 и 9,0 отличается более чем в 8 раз, то после воздействия микроволнового излучения малой интенсивности это различие составляет 31 раз, или точнее 3094,1% при рН=9.0 по отношению к активности при рН=8.0

Таблица 1

Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в семенной плазме при разных значениях рН под воздействием микроволнового излучения малой интенсивности

Значения рН	Контрольная группа (n=21) Удельная активность (нмоль/мин/мг белка) ЩФ в семенной плазме ($M \pm m$)	Опытная группа (n=21) Удельная активность (нмоль/мин/мг белка) ЩФ в семенной плазме ($M \pm m$)	р
рН=7,0	11,1±2,2	4,6±1,2	<0,05
рН=8,0	64,2±12.8	13.7±3.8	<0,05
рН=9,0	531.2±49.7	423.9±18.1	<0,05

Таблица 2

Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в экстрактах сперматозоидов при разных значениях рН

Значения рН	Контрольная группа (n=21) Удельная активность (нмоль/мин/мг белка) ЩФ в экстрактах сперматозоидов ($M \pm m$)	Опытная группа (n=21) Удельная активность (нмоль/мин/мг белка) ЩФ в экстрактах сперматозоидов ($M \pm m$)	р
рН=7,0	5.6±2.1	4.1±0.6	>0,05
рН=8,0	21.9±8.2	14.8 ±2.85	>0,05
рН=9,0	212.2±19.7	97.2± 24.5	<0,001

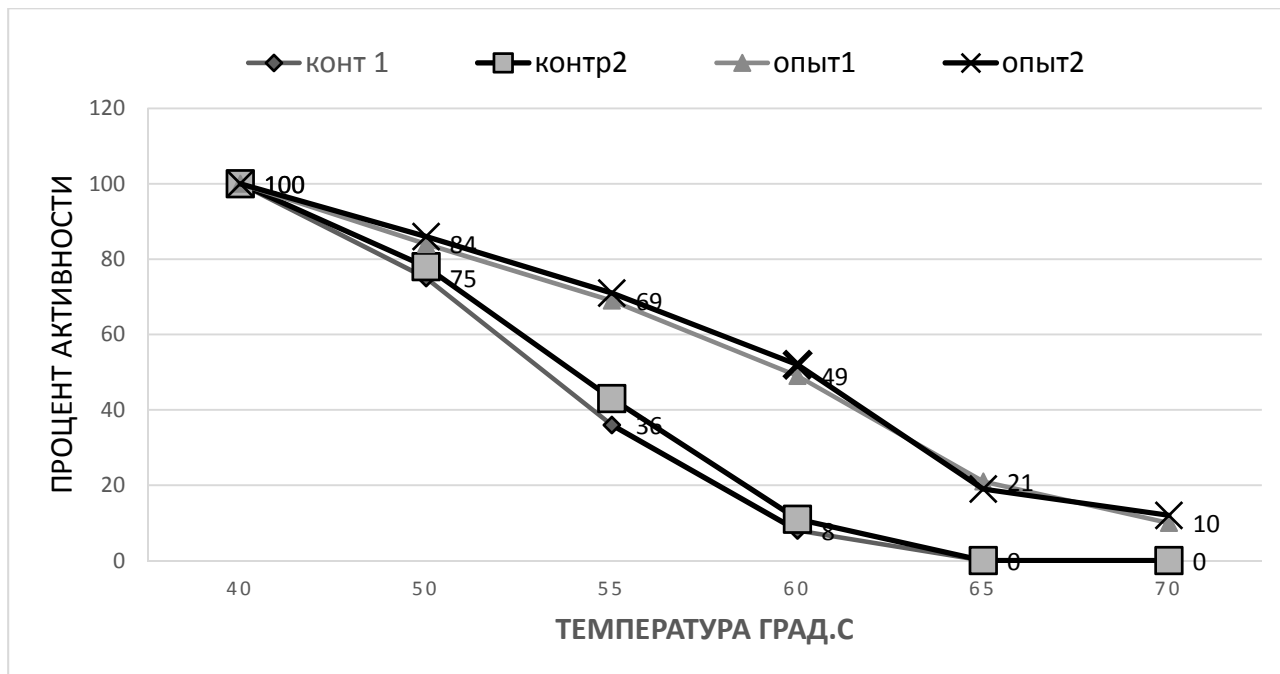
Как видно из табл. 2, ЩФ в экстрактах сперматозоидов проявляет свою максимальную активность при рН=9.0, так же как и в семенной плазме, увеличение активности очевидно с рН 7,0 до 8,0 (почти в 4 раза), а также с рН 8,0 до 9,0 (почти в 10 раз). В результате воздействия микроволнового излучения малой интенсивности удельная активность щелочной фосфатазы достоверно снижается, и особенно это проявляется при рН=9.0. В отличие от семенной плазмы, оптимум рН ЩФ после воздействия микроволнового

излучения малой интенсивности не подвергается таким резким изменениям, как в семенной плазме, видимо, из-за фиксированного положения на мембране сперматозоидов.

Дальнейшее увеличение рН до 10, 11 и 12 показало заметное снижение активности ЩФ как в семенной плазме, так и в экстрактах сперматозоидов. Эти данные не вошли в таблицы 1 и 2, т.к. очевидным оптимумом рН для ЩФ как в контрольной, так и в опытной группах является рН=9,0. Сравнение активности ЩФ в районе оптимума рН во всех исследованных группах показало, что суммарная удельная активность ЩФ в экстрактах сперматозоидов и семенной плазмы контрольной группы составила в среднем 843,4 нмоль/мин/мг белка, а эта же сумма в опытной группе в среднем 521,1 нмоль/мин/мг белка, что составляет 62% от контрольной группы и является достоверным различием ($p < 0,01$). Достоверное снижение активности ЩФ можно отнести к спермаксическим эффектам миллиметрового излучения низкой интенсивности. Активность ЩФ семенной плазмы значительно выше, чем в экстрактах сперматозоидов (при всех протестированных значениях рН 7,0, 8,0 и 9,0), с минимальным средним соотношением соответственно 2,5: 1 при рН 9,0 и максимальным 3:1 при рН 8,0. Это не удивительно: другие авторы [10] показали, что вклад сперматозоидов в активность всего эякулята низок по сравнению с семенной плазмой. Однако эти исследователи получили лишь косвенное указание на активность ЩФ в сперматозоидах, поскольку они вычитали активность необработанных образцов спермы из активности семенной плазмы, тогда как в нашем исследовании мы обнаружили эффективную активность ЩФ непосредственно в экстрактах сперматозоидов. Роль ЩФ, прикрепленной к поверхности сперматозоидов, является более интригующей: в экстрактах сперматозоидов мы обнаружили значительное снижение активности ЩФ в опытной группе только при рН=9,0. Это снижение составило 2,9 раза, или 34,4% от контроля. При рН 7,0 и 8,0 эти различия недостоверны. При рассмотрении соотношения активности ЩФ в семенной плазме и в экстрактах сперматозоидов обнаружено, что в контрольной группе это соотношение составляет 1,88:1 в пользу семенной плазмы, в опытной группе это соотношение равно 4,4:1 (сравнивали только средние значения). Этому факту можно дать два объяснения. Во-первых, известно, что повреждающее действие микроволнового излучения обеспечивается резонансными колебаниями молекул биологических мембран [11]. Во-вторых, активность ЩФ в экстрактах сперматозоидов коррелирует с числом сперматозоидов в эякуляте. По нашим данным, при рН=9,0 активность ЩФ в экстрактах сперматозоидов в контрольной группе в расчете на 1 млн сперматозоидов составляет $3,17 \pm 0,12$ нмоль/мин/мг белка. Активность ЩФ в экстрактах сперматозоидов в опытной группе в расчете на 1 млн сперматозоидов составляет $1,07 \pm 0,03$ нмоль/мин/мг белка. Таким образом, даже в расчете на единицу концентрации сперматозоидов уровень ЩФ на

поверхности сперматозоидов снижается более чем в 3 раза под действием микроволнового излучения слабой интенсивности.

Следует подчеркнуть, что активность ЩФ при физиологическом рН в сперме, равном 7,0, минимальна, и разумно предположить, что основная функция ЩФ реализуется после эякуляции, в процессе оплодотворения [12].



Зависимость активности щелочной фосфатазы от температуры (активность при 40 °C принята за 100%): контр 1 - активность ЩФ в семенной плазме контрольной группы; контр 2 - активность ЩФ в экстрактах сперматозоидов контрольной группы; опыт 1 - активность ЩФ в семенной плазме опытной группы; опыт 2 - активность ЩФ в экстрактах сперматозоидов опытной группы

Тест на тепловое ингибирование, проведенный в отношении активности ЩФ в семенной плазме, показал сложный характер снижения активности в зависимости от температуры. Как показано на рисунке, ЩФ в семенной плазме самцов белых крыс легко и быстро ингибируется под воздействием тепла, теряя 64% активности уже при 55 °C. Аналогично себя ведет и ЩФ в экстрактах сперматозоидов. В контрольной группе наблюдается достоверное повышение термостабильности ЩФ как в семенной плазме, так и в экстрактах сперматозоидов. Причем если при температуре 50 °C различия в снижении активности в контрольной и опытных группах составляют не более 10% и могут быть случайными ($p > 0,05$), то при увеличении температуры до 55 °C активность ЩФ в контрольной группе сохраняется на уровне 70% от исходного (71% в семенной плазме и 69% в экстрактах сперматозоидов) и практически более чем на 30% выше, чем в контроле (рис.)

($p < 0,01$). Активность ЩФ снижается в опытной группе ниже 10% от исходного уровня только при прогревании до 70 °С или на 10 градусов выше, чем в контрольной группе.

Микроволновое излучение не только влияет на активность ЩФ семенной плазмы и экстрактов сперматозоидов, но при исследовании термолабильности выясняется, что именно этот техногенный фактор изменяет устойчивость ЩФ к температуре. Возможных механизмов этого процесса несколько, но наиболее часто такие явления объясняют стабилизацией третичной структуры фермента под влиянием микроволнового излучения в случае отсутствия резонансных колебаний в структуре белка [13]. Молекулы фермента в функционально активном состоянии служат регуляторами физических и химических процессов, включенных в общую схему метаболизма, и управляют через белковые рецепторы функциями клеток репродуктивной системы. Акустоэлектрические колебания (волны Фрелиха) способны вызвать изменения третичной структуры белка-фермента. Эти изменения мы регистрируем как повышение термостабильности, но уплотнение трехмерной конфигурации может привести к изменению структуры активного центра и извращению функциональной способности фермента, что неминуемо скажется на нарушении функции органа или ткани [14]. В случае с ЩФ семенной плазмы и экстрактов сперматозоидов это может привести к расстройству репродуктивной функции и бесплодию. Подтверждением этому служит сравнение показателей качества сперматозоидов с активностью ЩФ.

Таблица 3

Коэффициент корреляции Спирмена между активностью ЩФ в экстрактах сперматозоидов и качеством спермы самцов белых крыс после воздействия низкоинтенсивного микроволнового излучения

	Коэффициент корреляции r	Достоверность взаимосвязи p
ЩФ активность (нмоль/мин/мг белка)	1,0	
Концентрация сперматозоидов, млн	0,471	0,032
% подвижных	0,801	0,0087
% живых сперматозоидов	0,784	0,0064

Примечание: r - коэффициент ранговой корреляции Спирмена, p – значимость корреляций.

В таблице 3 показана взаимосвязь между активностью ЩФ в экстрактах сперматозоидов и показателями качества сперматозоидов в опытной группе. Хотя в экстрактах сперматозоидов контрольной группы не было обнаружено корреляции между подвижностью и активностью ЩФ из экстрактов сперматозоидов ($r_s = 0,288$), в образцах контрольной группы были зафиксированы положительные корреляции между активностью

ЩФ в экстрактах сперматозоидов и процентом подвижных сперматозоидов ($r_s = 0,801$), между активностью ЩФ в экстрактах сперматозоидов и процентом живых сперматозоидов ($r_s = 0,784$).

Заключение

Полученные данные доказывают присутствие ЩФ на поверхности сперматозоидов самцов белых крыс и описывают активность фермента как в семенной плазме, так и в экстрактах сперматозоидов при разных значениях pH. Измерения при pH 7,0 указывают на то, что ЩФ в эякуляте далека от своего оптимума pH, поэтому ее роль заключается скорее в ингибировании капацитации, активация которой сопровождается активным дефосфорилированием. Активность на поверхности сперматозоидов при достижении маточно-трубного перехода может быть повышена за счет более высокого pH в этой части женского полового тракта. Кроме того, мы нашли некоторые интересные корреляции между ЩФ и параметрами качества спермы. Наконец, мы наблюдали снижение активности ЩФ после воздействия микроволнового излучения, которое приводит к повышению термостабильности этого фермента и снижению его функциональных возможностей, которые в совокупности с другими факторами могут лежать в основе идиопатического бесплодия.

Список литературы

1. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin. Biochem. 2018. Vol.62.no.12.P.2-10. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
2. Anawalt BD. Approach to male infertility and induction of spermatogenesis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013. vol. 98.no7. P.3532–3542.
3. Николаев А.А., Кузнецова М.Г. Сердюков В.Г. Гонадотоксическое действие миллиметрового излучения. Астрахань, 2013. 78 с.
4. Bell D.J., Lake P.E. A comparison of phosphomonoesterase activities in the seminal plasmas of the domestic cock, turkey tom, boar, bull, buck rabbit and of man. Reprod. Fertil. 1962. vol.17. no3. P.363–368.
5. Collodel G, Nerucci F, Signorini C, Iacoponi F, Moretti E. Associations between biochemical components of human semen with seminal conditions. Syst. Biol. Reprod. Med. 2019 vol.65.no.2. P.155-163.
6. Мамина В.П Семенов Д.И Метод определения количества сперматогенных клеток семенника в клеточной суспензии // Цитология. 1976. Т.18. №7. С.913-915.

7. Рыжаков Д.И., Молодюк А.В., Артифексов С.Б. Функционально-морфологическое исследование половой системы самцов белых крыс с использованием метода электростимуляции // Изв АН СССР, серия биол. 1980. № 1. С.133-135.
8. Луцкий Д.Л., Николаев А.А., Ложкина Л.В. Белковый спектр эякулятов различной фертильности // Урология и нефрология. 1998. № 2. С. 48-52.
9. Bucci D., Isani G., Giaretta E., Spinaci M., Tamanini C., Ferlizza E. Alkaline phosphatase in boar sperm function. *Andrology*. 2014. vol.112. no.1. P.100–106. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2013.00159.x
10. Bucci D., Giaretta E., Spinaci M., Rizzato G., Isani G., Mislei B., Mari G., Tamanini C., Galeati G. Characterization of alkaline phosphatase activity in seminal plasma and in fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 2016 vol. 85. no.2. P.288-295. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.007.
11. Николаев А.А., Логинов П.В. Показатели сперматогенеза мужчин, подверженных воздействию неблагоприятных условий среды // Урология. 2015. № 5. С. 60-66.
12. Katila T. Post-mating inflammatory response of the uterus. *Reprod. Domest. Anim.* 2016. vol.47.no. 1. P.31–41.
13. Бецкий О.В., Котровская Т.И., Лебедева Н.Н. Миллиметровые волны в биологии и медицине // Радиолокация и связь: материалы 3-й Всероссийской конференции. М., 2009. С.146-150.
14. Ramos-Payán M., Ocaña-González J.A., Fernández-Torres R.M., MasPOCH S., Bello-López M.Á. Recent advances in sample pre-treatment for emerging methods in proteomic analysis. *Talanta*. 2017. vol.174. no.4. P.738-751.