

Владимир Иванович Трухачев

Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, ректор, доктор сельскохозяйственных наук, доктор экономических наук, профессор, академик РАН, Россия, Москва
E-mail: rector@rgau-msha.ru

Сергей Петрович Данников

Ставропольский государственный аграрный университет, доцент кафедры физиологии, хирургии и акушерства, кандидат биологических наук, Россия, Ставрополь
E-mail: ds.as@mail.ru

Андрей Николаевич Квочко

Ставропольский государственный аграрный университет, профессор кафедры физиологии, хирургии и акушерства, доктор биологических наук, профессор, Россия, Ставрополь
E-mail: kvochko@yandex.ru

**ОЦЕНКА БЕЛКОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ГЕПАТОЦИТАХ НУТРИЙ
В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

Изучены параметры активности областей ядрышковых организаторов и суммарного содержания белка в гепатоцитах самок и самцов нутрий в постнатальном онтогенезе. Объектом исследования служили 30 клинически здоровых самок и самцов нутрий стандартного окраса клеточного содержания в возрасте 1 сутки, 2 месяца, 4,5 месяца, 7,5 месяцев и 12 месяцев. Установлено, что AgNOR в ядрах гепатоцитов нутрий имеют округлую или близкую к ней форму, а их количество находится в пределах от 1 до 2, при этом 2 зоны AgNOR встречаются намного реже. Анализ параметров AgNOR показал, что максимальное количество AgNOR в ядрах гепатоцитов выявлено в возрасте 4,5 месяца, при этом суммарная площадь AgNOR в этом возрасте, напротив, имела минимальные значения. Минимальное количество AgNOR в ядрах гепатоцитов у самок нутрий регистрируется в возрасте 7,5 месяцев, а у самцов – в возрасте 12 месяцев, при этом максимальная суммарная площадь AgNOR у самок нутрий была в возрасте 2 месяца, а у самцов в 12 месяцев. Доля суммарной площади AgNOR от общей площади ядра гепатоцитов у самок и самцов имела максимальные значения в 2-месячном возрасте, а максимальные у самок в 7,5 и у самцов – в 4,5 месяца. Повышение суммарного белка гепатоцитов у самцов нутрий наблюдается в возрасте 7,5 месяцев, а у самок – в 12 месяцев, при этом наиболее низкие значения этого показателя установлены у особей обоего пола в 2-месячном возрасте. С первого дня и до 4,5 месяцев жизни у самок и самцов нутрий наблюдается одинаковая возрастная динамика параметров AgNOR и оптической плотности суммарного белка в гепатоцитах, а в 7,5- и 12-месячном возрасте значения данных показателей приобретают разную возрастную динамику.

Ключевые слова: нутрии, постнатальный онтогенез, печень, гепатоциты, ядрышковые организаторы, белки.

Vladimir I. Trukhachev

Russian State Agrarian University – MAA named after K.A. Timiryazev, rector, doctor of agricultural sciences, doctor of economics, professor, the academician of RAS, Russia, Moscow
E-mail: rector@rgau-msha.ru

Sergey P. Dannikov

Stavropol State Agrarian University, associate professor of the chair of physiology, surgery and obstetrics, candidate of biology, Russia, Stavropol
E-mail: ds.as@mail.ru

Andrey N. Kvochko

Stavropol State Agrarian University, professor of the chair of physiology, surgery and obstetrics, doctor of biological sciences, professor, Russia, Stavropol
E-mail: kvochko@yandex.ru

THE ASSESSMENT OF PROTEIN METABOLISM IN NUTRIA HEPATOCYTES IN POSTNATAL ONTOGENESIS

The parameters of the nucleolar organizer regions activity and the total protein content in hepatocytes of female and male nutria in postnatal ontogenesis were studied. The objects of the study were 30 clinically healthy standard color female and male nutria of cage keeping at the age of 1 day, 2 months, 4.5 months, 7.5 months and 12 months. It was found that AgNOR in the nuclei of nutria hepatocytes had had a rounded shape or close to it, and their number ranges from 1 to 2, while 2 AgNOR zones were much less common. The analysis of AgNOR parameters showed that the maximum amount of AgNOR in hepatocyte nuclei had been detected at the age of 4.5 months, while the total AgNOR area at this age, on the contrary, had minimum values. The minimum amount of AgNOR in hepatocyte nuclei in female nutria is recorded at the age of 7.5 months, and in males at the age of 12 months, while the maximum total AgNOR area in female nutria was at the age of 2 months, and in males at 12 months. The proportion of the total area of AgNOR from the total area of the nucleus of hepatocytes in females and males had the maximum values at 2 months of age, and the maximum in females – at 7.5 and in males – at 4.5 months. An increase in the total protein of hepatocytes in male nutria was observed at the age of 7.5 months, and in females – at 12 months, while the lowest values of this indicator were found in individuals of both sexes at 2 months of age. From the first day to 4.5 months of life, female and male nutria have the same age dynamics of the AgNOR parameters and optical density of the total protein in hepatocytes, and at 7.5 and 12 months of age, the values of these indicators acquire different age dynamics.

Keywords: *nutria, postnatal ontogenesis, liver, hepatocytes, nucleolar organizers, proteins.*

Введение. Печень является сложным многофункциональным экзо- и эндокринным органом. Эндокринные функции включают секрецию гормонов, таких как инсулиноподобные факторы роста, ангиотензиноген и тромбопоэтин, в то время как основная экзокринная функция – желчевыделение. Печень необходима для хранения гликогена, детоксикации лекарств, контроля метаболизма, регуляции синтеза и транспорта холестерина, метаболизма мочевины и секреции широкого спектра белков плазмы, включая альбумин и паполипротеины [1]. Кроме того, печень обладает значительной врожденной регенеративной способностью за счет деления гепатоцитов и пролиферации клеток-предшественников. Однако при хроническом воспалении эти резервы в конечном итоге иссекают [2, 3].

Гепатоциты, основные паренхиматозные клетки печени, играют ключевую роль в метаболизме, детоксикации и синтезе белка. Гепатоциты также активируют врожденный иммунитет против микроорганизмов, выделяя гуморальные факторы врожденного иммунитета [4].

Известно, что белки – центральное звено всех биохимических реакций в живых организмах. Механизмы синтеза и транспорта белка в животных клетках имеют комплекс видовых, половых и возрастных различий [5–7], что, в свою очередь, диктует необходимость изучения особенностей белкового метаболизма в клетках органов и тканей с большим охватом представителей животного мира с учетом половозрастной принадлежности.

Области ядрышковых организаторов осуществляют синтез 18S, 5.8S и 28S классов рибосомальной РНК, непосредственно принимающих участие в сборке рибосом, в которых, в свою очередь, происходит синтез белка [8]. Морфометрические параметры областей ядрышковых организаторов позволяют дать оценку белково-синтетической функции клеток [9].

Нутрии, как объект звероводства и как представители дикой природы, являются крайне малоизученными, о чем говорит низкая публикационная активность в области биологии и ветеринарии этого вида животных. Однако широкое

распространение по всему миру, а также близкое соседство с человеком делает необходимым контролировать здоровье и популяцию нутрий посредством углубленного изучения биологических процессов, происходящих в их организме.

Цель работы. Определить параметры активности областей ядрышковых организаторов и суммарного содержания белка в гепатоцитах самок и самцов нутрий в постнатальном онтогенезе.

Материал и методы. Исследования проведены с 2014 по 2020 г. На кафедре физиологии, хирургии и акушерства, в научно-диагностическом и лечебном ветеринарном центре ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» и частных фермерских хозяйствах Краснодарского края.

Объектом исследования служили 30 клинически здоровых самок и самцов нутрий (по 3 самки и 3 самца в каждой возрастной группе) стандартного окраса клеточного содержания в возрасте 1 сутки (новорожденность), 2 месяца (окончание молочного вскармливания), 4,5 месяца (половое созревание), 7,5 месяцев (физиологическое созревание) и 12 месяцев (зрелые особи).

Кормление нутрий осуществлялось комбинированным способом согласно рекомендациям В.Ф. Кладовщикова (1998) [10].

Для выполнения исследований проводили этаназию нутрий в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. У самцов и самок каждой возрастной группы проводили отбор печени для гистохимических исследований. Материал фиксировали в 10%-м водном растворе нейтрального формалина, проводили через спирты возрастающей крепости и ксилол, а затем заливали в гистологическую среду «Гистомикс». После заливки кусочки органов фиксировали на стандартные гистологические кассеты и приготавливали гистосрезы толщиной 5 мкм.

Для выявления областей ядрышковых организаторов (AgNOR) в ядрах гепатоцитов гистосрезы печени окрашивали нитратом серебра по оригинальной методике, предложенной W.M. Howell, D.A. Black (1980) [11]. Реакция на сум-

марные белки проводилась с использованием водного сулемового раствора бромфенолового синего [12].

С каждого препарата печени выполняли по 10 цифровых снимков случайно выбранных полей зрения при увеличении 400 (для препаратов с реакцией с водным сулемовым раствором бромфенолового синего) и 1000 (для препаратов, окрашенных нитратом серебра). В каждом снимке с реакцией с водным сулемовым раствором бромфенолового синего выполняли по 10 измерений оптической плотности гепатоцитов. В каждом снимке препаратов, окрашенных нитратом серебра, выполняли 10 подсчетов количества AgNOR и по 10 измерений суммарной площади AgNOR и ядра гепатоцитов, долю суммарной площади AgNOR от общей площади ядра гепатоцитов рассчитывали математически.

Определение оптической плотности и морфометрические исследования проводили с использованием программы Видео-Тест Морфология 5.1 для Windows.

Числовые данные обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа и множественного сравнения Ньюмена – Кейлса в программе Primer of Biostatistics 4.03 для Windows, где n – объем выборки, M – среднее арифметическое выборки, m – стандартная ошибка среднего. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. AgNOR в ядрах гепатоцитов нутрий имеют округлую или близкую к ней форму (рис. 1), а их количество находится в пределах от 1 до 2, при этом 2 зоны AgNOR встречаются намного реже.

Числовые данные параметров активности AgNOR в ядрах гепатоцитов нутрий разного пола и возраста представлены в таблице 1.

Наибольшее количество AgNOR в ядрах гепатоцитов нутрий зарегистрировано в возрасте 4,5 месяцев, при этом у самцов значение этого показателя имеет достоверные различия с предыдущим возрастом (больше на 4,85 %), а у самок – с последующей возрастной группой (больше на 6,49 %). Между остальными возрастными группами, а также между самками и самцами одного возраста достоверных различий по количеству ОЯОР не выявлено.

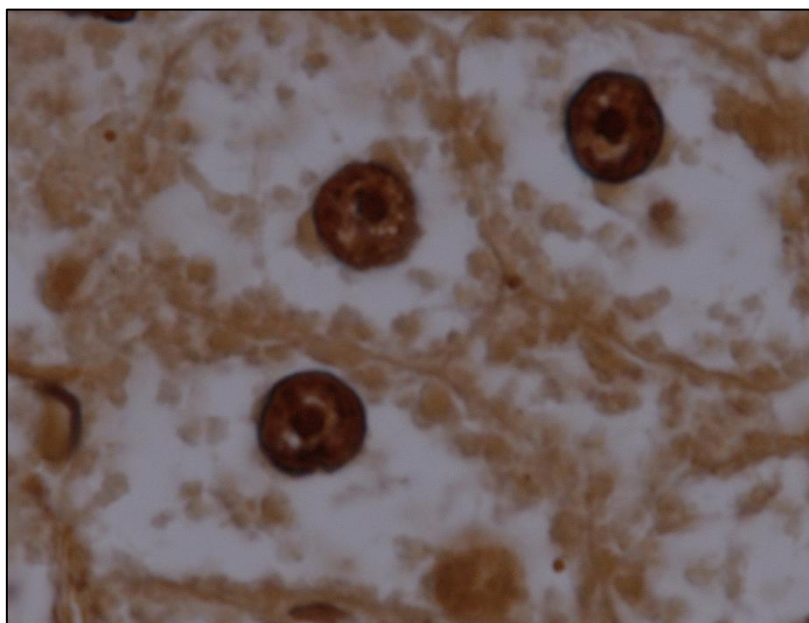


Рис. 1. AgNOR в ядрах гепатоцитов самца нутрии в возрасте 12 месяцев (импрегнация серебром, $\times 1000$)

Таблица 1

Параметры активности AgNOR в ядрах гепатоцитов нутрий разных половозрастных групп

Пол	Возраст				
	1 сутки M \pm m	2 месяца M \pm m	4,5 месяца M \pm m	7,5 месяца M \pm m	12 месяцев M \pm m
Количество AgNOR					
Самка (n=300)	1,057 \pm 0,013	1,047 \pm 0,012	1,083 \pm 0,016	1,017 \pm 0,008*	1,033 \pm 0,010
Самец (n=300)	1,043 \pm 0,012	1,030 \pm 0,010	1,080 \pm 0,016*	1,033 \pm 0,010	1,010 \pm 0,006
Суммарная площадь AgNOR, мкм ²					
Самка (n=300)	3,015 \pm 0,035	3,177 \pm 0,033*#	2,529 \pm 0,026*#	2,761 \pm 0,036*#	3,034 \pm 0,031*
Самец (n=300)	2,944 \pm 0,028	2,979 \pm 0,026	2,441 \pm 0,024*	2,595 \pm 0,027*	3,108 \pm 0,027*
Доля суммарной площади AgNOR от общей площади ядра					
Самка (n=300)	0,100 \pm 0,001	0,101 \pm 0,001#	0,090 \pm 0,001*#	0,086 \pm 0,001*#	0,094 \pm 0,001*
Самец (n=300)	0,091 \pm 0,001	0,106 \pm 0,001*	0,087 \pm 0,001*	0,092 \pm 0,001*	0,095 \pm 0,001*

Здесь и далее: * – статистическая значимость различий с более ранней возрастной группой; # – у самок по сравнению с самцами одной возрастной группы.

При анализе суммарной площади AgNOR в ядрах гепатоцитов нутрий установлено, что с первого дня и до двухмесячного возраста значение этого показателя достоверно возрастает только у самцов нутрий на 5,37 %. С двух и до 4,5-месячного возраста суммарная площадь AgNOR в ядрах гепатоцитов у самок и самцов нутрий достоверно уменьшается на 25,62 и 22,04 % соответственно. В период с 4,5 и до 7,5 месяцев жизни значение исследуемого показателя достоверно возрастает у самок нутрий на

9,17 %, а у самцов – на 6,31 %. В возрасте двенадцати месяцев суммарная площадь AgNOR в ядрах гепатоцитов у самок и самцов нутрий продолжает увеличиваться на 9,88 и 19,74 % соответственно, по сравнению с предыдущим возрастом.

При сравнении суммарной площади AgNOR в ядрах гепатоцитов нутрий между самками и самцами одного возраста достоверные различия установлены только в возрасте 2, 4,5 и 7,5 месяцев, при этом у самок значение данного

показателя было больше, чем у самцов, на 6,65 %; 3,61 и 6,40 % соответственно.

Доля суммарной площади AgNOR от общей площади ядра гепатоцитов нутрий с первого дня и до двух месяцев жизни достоверно увеличивается только у самцов – на 16,48 %. В период с 2 и до 4,5 месяцев жизни значение этого показателя достоверно уменьшается у самок нутрий на 12,22 %, у самцов – на 21,84 %. С 4,5 и до 7,5-месячного возраста доля суммарной площади AgNOR от общей площади ядра гепатоцитов у самок нутрий достоверно уменьшается на 4,65 %, а у самцов, напротив, увеличивается на 5,75 %. В возрасте 12 месяцев значение данного показателя как у самок, так и у самцов нутрий достоверно больше на 9,30 и 3,26 % соответственно, чем у особей 7,5-месячного возраста.

При анализе оптической плотности суммарного белка в гепатоцитах нутрий установлено (рис. 2, табл. 2), что с первого дня и до двух месяцев жизни значение данного показателя достоверно уменьшается – у самок на 19,48 %, а у самцов – на 9,33 %. С 2 до 4,5-месячного возраста оптическая плотность суммарного белка в гепатоцитах нутрий достоверно возрастает – у самок на 11,04 %, а у самцов – на 14,66 %. С 4,5 и до 7,5 месяцев жизни значение этого показателя достоверно возрастает только у самцов нутрий – на 9,88 %, а у самок остается неизменным. В возрасте 12 месяцев оптическая плотность суммарного белка в гепатоцитах у самок нутрий достоверно возрастает на 11,70 %, а у самцов, напротив, уменьшается на 15,95 % по сравнению с особями предыдущей возрастной группы.

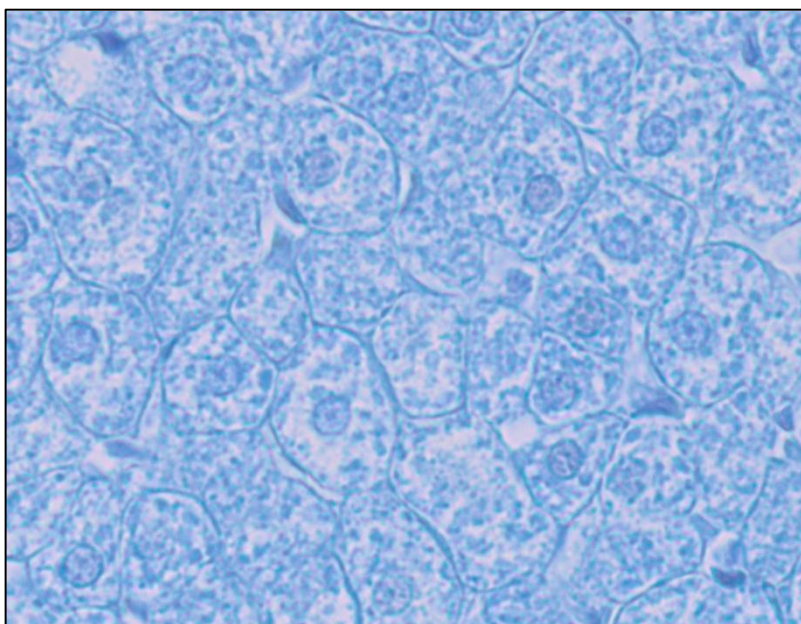


Рис. 2. Гепатоциты самки нутрии в возрасте 4,5 месяцев (реакция на суммарные белки с водным сулемовым раствором бромфенолового синего, $\times 400$)

Таблица 2

Оптическая плотность суммарного белка в гепатоцитах нутрий разных половозрастных групп, у.е.

Пол	Возраст				
	1 сутки M \pm m	2 месяца M \pm m	4,5 месяца M \pm m	7,5 месяцев M \pm m	12 месяцев M \pm m
Самка (n=300)	0,184 \pm 0,002 [#]	0,154 \pm 0,001 [*]	0,171 \pm 0,001 [*]	0,171 \pm 0,001 [#]	0,191 \pm 0,002 ^{*#}
Самец (n=300)	0,164 \pm 0,001	0,150 \pm 0,001 [*]	0,172 \pm 0,001 [*]	0,189 \pm 0,001 [*]	0,163 \pm 0,001 [*]

Между самками и самцами нутрий одного возраста достоверные различия оптической плотности суммарного белка выявлены только в возрасте одних суток, 7,5 месяцев и 12 месяцев. При этом в односуточном и двенадцатимесячном возрасте значение данного показателя достоверно выше у самок нутрий на 12,20 и 17,18 % соответственно, а в 7,5-месячном возрасте оптическая плотность суммарного белка в гепатоцитах нутрий достоверно выше у самцов на 10,53 %.

Из анализа полученных данных становится очевидно, что однодневный возраст нутрий характеризуется достаточно высокими значениями исследуемых показателей в гепатоцитах, что может свидетельствовать о достаточно активном клеточном метаболизме, вероятно, связанном с защитно-приспособительными реакциями в их организме после рождения.

Однако при достижении двухмесячного возраста оптическая плотность суммарного белка гепатоцитов демонстрирует значительное снижение по сравнению с однодневными особями, при этом суммарная площадь AgNOR и доля суммарной площади AgNOR от общей площади ядра, напротив, возрастают. Объяснением данной закономерности может быть формирование дефицита пластических компонентов, в частности белков, в гепатоцитах двухмесячных нутрий на фоне повышенной белково-синтетической функции гепатоцитов, что, на наш взгляд, связано с повышенной потребностью организма в белках и параллельным прекращением молочного вскармливания.

В 4,5-месячном возрасте у нутрий вновь регистрируется повышение оптической плотности суммарного белка и количества AgNOR, при этом суммарная площадь AgNOR и доли суммарной площади AgNOR от общей площади ядра значительно понижаются. Выявленная особенность может свидетельствовать об относительном уменьшении белково-синтетического потенциала гепатоцитов, связанных с изменениями в организме во время полового созревания.

7,5-месячный возраст нутрий сопровождается максимальным значением суммарного белка у самцов и минимальными количеством AgNOR и доли суммарной площади AgNOR от общей площади ядра у самок нутрий. Суммарная площадь AgNOR в данном возрасте как у самок, так и самцов начинает возрастать.

В 12-месячном возрасте наблюдается максимальное увеличение оптической плотности

суммарного белка у самок и максимальная суммарная площадь AgNOR у самцов нутрий.

Изменения параметров AgNOR в ядрах и оптической плотности суммарного белка гепатоцитов у особей разного пола и одного возраста на поздних этапах постнатального онтогенеза (7,5 и 12 месяцев) наглядно демонстрируют появление разной возрастной динамики этих показателей. При этом на ранних этапах постнатального онтогенеза нутрий (одни сутки, два и четыре с половиной месяца) значения исследуемых показателей, несмотря на ряд достоверных половых различий, сохраняют на одинаковую возрастную динамику. Данная закономерность может быть доказательством того, что после полового созревания белковый метаболизм в гепатоцитах у нутрий имеет более существенные различия в своей скорости и направленности.

Выводы. AgNOR в ядрах гепатоцитов нутрий имеют округлую или близкую к ней форму, а их количество находится в пределах от 1 до 2, при этом 2 зоны AgNOR встречаются намного реже.

Анализ параметров AgNOR показал, что максимальное количество AgNOR в ядрах гепатоцитов выявлено в возрасте 4,5 месяцев, при этом суммарная площадь AgNOR в этом возрасте, напротив, имела минимальные значения. Минимальное количество AgNOR в ядрах гепатоцитов у самок нутрий регистрируется в возрасте 7,5 месяцев, а у самцов – в возрасте 12 месяцев, при этом максимальная суммарная площадь AgNOR у самок нутрий была в возрасте 2 месяца, а у самцов в 12 месяцев. Доля суммарной площади AgNOR от общей площади ядра гепатоцитов у самок и самцов имела максимальные значения в двухмесячном возрасте, а максимальные у самок в 7,5, у самцов – в 4,5 месяца.

Повышение суммарного белка гепатоцитов у самцов нутрий наблюдается в возрасте 7,5 месяцев, а у самок – в 12 месяцев, при этом наиболее низкие значения этого показателя установлены у особей обоего пола в двухмесячном возрасте.

С первого дня и до 4,5 месяцев жизни у самок и самцов нутрий наблюдается одинаковая возрастная динамика параметров AgNOR и оптической плотности суммарного белка в гепатоцитах, а в 7,5 и 12-месячном возрасте значения данных показателей приобретают разную возрастную динамику.

Литература

1. *Si-Tayeb K., Lemaigre F.P., Duncan S.A.* Organogenesis and Development of the Liver // *Developmental Cell*. 2010. Vol. 18, № 2. P. 175–189.
2. *Kung J.W.C, Forbes S. J.* Stem cells and liver repair // *Current Opinion in Biotechnology*. 2009. Vol. 20, № 5. P. 568–574.
3. *Mao S.A., Glorioso J.M., Nyberg S.L.* Liver regeneration // *Translational Research*. 2014. Vol. 163, № 4. P. 352–362.
4. *Zhou Z., Xu M.J., Gao B.* Hepatocytes: a key cell type for innate immunity // *Cellular and Molecular Immunology*. 2016. Vol. 13, № 3. P. 301–315.
5. *Mays P.K., McAnulty R.J., Laurent G.J.* Age-related changes in rates of protein synthesis and degradation in rat tissues // *Mechanisms of Ageing and Development*. 1991. Vol. 59, № 3. P. 229–241.
6. *Tipton K.D.* Gender differences in protein metabolism // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001. Vol. 4(6). P. 493–498.
7. Protein synthesis and quality control in aging / *Anisimova A.S, Alexandrov A.I., Makarova N.E., Gladyshev V.N., Dmitriev S.E.* // *Aging (Albany NY)*. 2018. Vol. 10, № 12. P. 4269–4288.
8. *Cooper G.M.* The Cell. A Molecular approach. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. 625 p.
9. Nucleolar organizer regions: their significance in protein synthesis and consequent release of factors that attract immature lymphocytes in different types of thymic epitheliocytes and in different stages of thymic development / *N. Papadopoulos, A. Kotini, M. Lambropoulou, D. Tamiolakis* // *Clinical and experimental obstetrics and gynecology*. 2002. Vol. 29, № 1. P. 57–61.
10. *Кладовщиков В.Ф.* Кормление нутрий // *Кролиководство и звероводство*. 1998. № 3. С. 29–31.
11. *Howell W.M., Black D.A.* Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980. Vol. 36, № 8. P. 1014–1015.
12. *Hornatowska J.* Visualisation of pectins and proteins by microscopy. STFI-Packforsk report No. 87/2005. 22 pp.

Literatura

1. *Si-Tayeb K., Lemaigre F.P., Duncan S.A.* Organogenesis and Development of the Liver // *Developmental Cell*. 2010. Vol. 18, № 2. P. 175–189.
2. *Kung J.W.C, Forbes S. J.* Stem cells and liver repair // *Current Opinion in Biotechnology*. 2009. Vol. 20, № 5. P. 568–574.
3. *Mao S.A., Glorioso J.M., Nyberg S.L.* Liver regeneration // *Translational Research*. 2014. Vol. 163, № 4. P. 352–362.
4. *Zhou Z., Xu M.J., Gao B.* Hepatocytes: a key cell type for innate immunity // *Cellular and Molecular Immunology*. 2016. Vol. 13, № 3. P. 301–315.
5. *Mays P.K., McAnulty R.J., Laurent G.J.* Age-related changes in rates of protein synthesis and degradation in rat tissues // *Mechanisms of Ageing and Development*. 1991. Vol. 59, № 3. P. 229–241.
6. *Tipton K.D.* Gender differences in protein metabolism // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001. Vol. 4(6). P. 493–498.
7. Protein synthesis and quality control in aging / *Anisimova A.S, Alexandrov A.I., Makarova N.E., Gladyshev V.N., Dmitriev S.E.* // *Aging (Albany NY)*. 2018. Vol. 10, № 12. P. 4269–4288.
8. *Cooper G.M.* The Cell. A Molecular approach. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. 625 p.
9. Nucleolar organizer regions: their significance in protein synthesis and consequent release of factors that attract immature lymphocytes in different types of thymic epitheliocytes and in different stages of thymic development / *N. Papadopoulos, A. Kotini, M. Lambropoulou, D. Tamiolakis* // *Clinical and experimental obstetrics and gynecology*. 2002. Vol. 29, № 1. P. 57–61.
10. *Kladovshhikov V.F.* Kormlenie nutrij // *Krolikovodstvo i zverovodstvo*. 1998. № 3. S. 29–31.
11. *Howell W.M., Black D.A.* Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980. Vol. 36, № 8. P. 1014–1015.
12. *Hornatowska J.* Visualisation of pectins and proteins by microscopy. STFI-Packforsk report No. 87/2005. 22 pp.