

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭЛИМИНАЦИИ СПЕРМАТОГЕННЫХ КЛЕТОК ПЕТУХОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БУСУЛЬФАНА В РАЗЛИЧНЫХ ДОЗАХ

© Н. А. Волкова,¹ А. Н. Ветох, А. В. Доцев, И. П. Новгородова,
Л. А. Волкова, О. А. Артемьева, Н. А. Зиновьева

*Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л. К. Эрнста,
пос. Дубровицы, Московская обл. 142132;
¹e-mail: natavolkova@inbox.ru*

Изучена эффективность использования бусульфана для элиминации сперматогенных клеток семенников петухов с целью прекращения сперматогенеза. Максимальный эффект регистрировали при введении бусульфана в дозе 80 мг на 1 кг живой массы. При использовании бусульфана в данной дозе отмечали уменьшение диаметра семенных канальцев на 81 % по сравнению с контролем, обусловленное элиминацией значительной доли сперматогенных клеток (99 %). Наиболее устойчивыми к воздействию бусульфана оказались клетки Сертоли и сперматогонии. При полной элиминации других типов сперматогенных клеток наблюдали уменьшение в семенных канальцах семенников количества клеток Сертоли и сперматогоний по сравнению с контролем на 39 и 98 % соответственно. Восстановление сперматогенеза у петухов отмечали через 3—4 мес после введения бусульфана. Однако концентрация спермиев в эякуляте была низкой и составляла только 2—4 % от нормы. Нормализация концентрации спермиев наблюдалась через 9—10 мес после инъекции препарата.

Ключевые слова: сперматогенез, петухи, бусульфан, сперматогонии, клетки Сертоли.

Получение трансгенных и химерных сельскохозяйственных животных и птиц посредством генетической трансформации и трансплантации донорских мужских половых клеток является одним из перспективных направлений современной биотехнологии, рассматривающихся в качестве альтернативы традиционным методам селекции и трансгенеза (Brinster, 2002; Sato et al., 2002; Min et al., 2011; Zheng et al., 2014). Способность спермиев переносить экзогенную ДНК в яйцеклетку в процессе оплодотворения обуславливает высокий интерес к использованию половых клеток самцов для получения особей с заданными признаками. В случае интеграции рекомбинантной ДНК в геном хозяина трансген может устойчиво передаваться в ряде поколений. Кроме того, ввиду проведения манипуляций на взрослых особях значительно сокращаются материальные и временные затраты на получение трансгенного потомства.

В эпителиосперматогенном слое семенных канальцев семенников самцов выделяют несколько типов клеток (Жункейра, Карнейро, 2009). Наибольший интерес представляет использование стволовых клеток семенников — сперматогоний типа А, являющихся недифференцированными половыми клетками (McLean, 2005). Популяция данного типа сперматогенных клеток немногочисленна. Они располагаются на базальной мембране семенных канальцев и обладают способностью к самообновлению и дифференцировке, обеспечивая непрерывность протекания процесса сперматогенеза с образованием зрелых половых клеток самцов — спермиев. Данные свойства сперматогоний делают их удобными клетками-мишенями для

введения рекомбинантной ДНК (трансгенез), а также использования в качестве генетического материала для сохранения и поддержания генофонда ценных пород и линий животных и птиц (криобанки) (Dobrinski, 2005; Olive, Cuzin, 2005; Волкова и др., 2012).

Технология получения трансгенных и химерных особей с использованием клеток гонад самцов предусматривает получение культуры донорских клеток и их трансплантацию в семенники самцов-реципиентов. Используемые в данном случае самцы-реципиенты рассматриваются в качестве своеобразных «биореакторов», в семенниках которых происходит выработка эндогенных спермиев, несущих донорскую генетическую информацию. Перспективность данной технологии показана на лабораторных и сельскохозяйственных животных (Brinster, Avarbock, 1994; Rodriguez-Sosa et al., 2006; Oatley, 2010).

Ключевым моментом, обуславливающим эффективность трансплантации донорских сперматогоний, является подготовка самцов-реципиентов, направленная на элиминацию собственных сперматогенных клеток в семенниках. Для этих целей рассматривается использование двух основных методических подходов — использование облучения (Withers et al., 1974; Meistrich et al., 1978) и химическая стерилизация (Bucci, Meistrich, 1987). В последнем случае используют бусульфан. Действие данного препарата, вызывающего стерильность самцов, было показано в экспериментах на лабораторных животных (Kim et al., 1997; Ogawa et al., 1997; Dobrinski et al., 2000; Panahi et al., 2015), свиньях (Kim et al., 1997; Савченкова и др.,

2006) и птицах (Li et al., 2008; Yu et al., 2010; Tagirov, Golovan, 2012).

Целью наших исследований являлось изучение эффективности элиминации сперматогенных клеток в семенных канальцах семенников петухов при использовании различных доз бусульфана.

Для оценки эффективности использования препарата были проведены детальные гистологические исследования семенных канальцев семенников петухов, отражающие динамику изменения размеров семенных канальцев после введения бусульфана, количества сперматогенных клеток в них с оценкой клеточного состава и изучена результативность восстановления сперматогенеза.

Материал и методика

Объектом исследований служили самцы петухов породы Первомайская в возрасте 6 мес.

Для прекращения эндогенного сперматогенеза использовали раствор бусульфана (Sigma, США). Бусульфан растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (Sigma, США). Полученный раствор стерилизовали путем фильтрации через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (фильтрационная насадка на шприц). Препарат в объеме до 1 мл вводили непосредственно в семенники путем множественной инъекции (5—6 уколов) с помощью инсулинового шприца U-100 с иглой 29G (0.33 × 13 мм). Кормление птиц прекращали за 24 ч до операции, поение — за 12 ч. Для анестезии использовали Рометар (20 мг/мл) в количестве 1.5—2.0 мл на голову.

Доступ к семеннику для введения бусульфана обеспечивали через разрез за последним ребром. Птицу фиксировали в боковом положении. Разрез длиной 3—4 см вели вниз, начиная от контура длиннейшего мускула спины по переднему краю последнего ребра. Зондом или инъекционной иглой смещали вниз кишечник, в результате чего открывался оперативный доступ к семеннику. Через один разрез осуществляли инъекции в оба семенника.

Бусульфан вводили в расчете на 1 кг живой массы в дозах 40, 60, 80 и 100 мг. В качестве контроля были использованы самцы, с которыми не проводили манипуляций. В каждом случае было использовано не менее 5 самцов.

Для гистологического исследования фиксацию фрагментов семенников проводили в растворе Буэна (пикриновая кислота, уксусная кислота и формалин в соотношении 15 : 1 : 5) (Panheas, Германия) в течение 48 ч. Гистологические препараты семенников готовили по общепринятой методике, включающей в себя дегидратацию ткани в спиртах возрастающей концентрации, пропитку в смеси ксилол—парафин и заключение в парафин (Саркизов, Перов, 1996). Препараты окрашивали гематоксилин-эозином (BioVitrum, Россия). С целью исключения получения ошибочных результатов для анализа отбирали только семенные канальцы, имеющие округлую форму и просвет на поперечных срезах. Идентификацию клеток сперматогенного ряда проводили исходя из их морфологии: клетки Сертоли характеризуются наличием светлого ядра неправильной формы с одним или несколькими ядрышками; сперматогонии располагаются на базальной мембране или клетках Сертоли и имеют круглое или овальное ядро правильной формы, равномерно окрашиваемое (Жункейра, Карнейро, 2009). В образцах от

каждого самца было исследовано не менее 30 семенных канальцев. Гистологический анализ проводили с использованием микроскопа Ni-U (Nikon, Япония). Обработку и анализ изображений проводили с применением пакета программ NIS-Elements (Nikon, Япония).

Были изучены следующие показатели — диаметр семенных канальцев, количество сперматогенных клеток в них, клеточный состав популяции сперматогенных клеток и доля «пустых» семенных канальцев от общего числа исследованных семенных канальцев. К «пустым» семенным канальцам относили канальцы с небольшим количеством сперматогенных клеток, расположенных в один ряд на базальной мембране и представленных преимущественно клетками Сертоли и единичными сперматогониями.

Эффективность восстановления сперматогенеза у петухов после их обработки бусульфаном оценивали на основе анализа качественных и количественных показателей сперматозоидов в эякуляте. Изучали следующие показатели — состояние акросом, целостность хроматина, доля атипичных клеток и концентрация спермиев. Было изучено изменение данных показателей в динамике до введения бусульфана и через 4 и 9 мес после введения препарата.

Сбор семени осуществляли методом абдоминального массажа. Концентрацию спермиев определяли с использованием программы «Зоосперм 1.0» (ООО «ВидеоТест», Россия). Суспензию сперматозоидов помещали в счетную камеру Маклера, проводили запись видеозаписей, на основе анализа которых проводили автоматическое распознавание и оценку каждого сперматозоида по заданным параметрам.

Морфологию спермиев и сохранность акросом оценивали методом дифференциальной окраски с использованием набора Дифф-Квик («ДИАХИМ», НПФ «АБРИС+», Россия). Суспензию сперматозоидов наносили на предметное стекло, высушивали и фиксировали в метаноле в течение 5 мин. Окраску препаратов проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Для оценки целостности хроматина оценивали наличие разрывов в ДНК с помощью акридин-оранжевого теста (АО-тест, Россия). Суспензию сперматозоидов наносили на предметное стекло, высушивали и фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты в соотношении 3 : 1 в течение 1.5 ч при 4 °С. Мазки высушивали и наносили раствор красителя (20 мл 0.1 М раствора лимонной кислоты, 1.25 мл 0.2 М Na₂HPO₄ и 5 мл 1%-ного водного раствора акридин-оранжевого (Biochem, Франция). Выдерживали в течение 5 мин, удаляли краситель, высушивали и оценивали флуоресценцию под микроскопом Ni-U (Nikon, Япония). Головки сперматозоидов с поврежденным хроматином дают красную флуоресценцию, с неповрежденным хроматином — зеленую.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы R 3.3.2 (R Core Team, 2012). Визуализацию данных осуществляли с помощью R пакета «ggplot2» (Wickham, 2009). Расчет критерия Шапиро—Уилка показал, что полученные данные имели не нормальное распределение, вследствие чего для оценки влияния концентрации бусульфана на изучаемые показатели применяли непараметрический дисперсионный анализ Краскела—Уоллиса с апостериорным множественным сравнением при помощи критерия Манна—Уитни с поправкой Бонферрони.

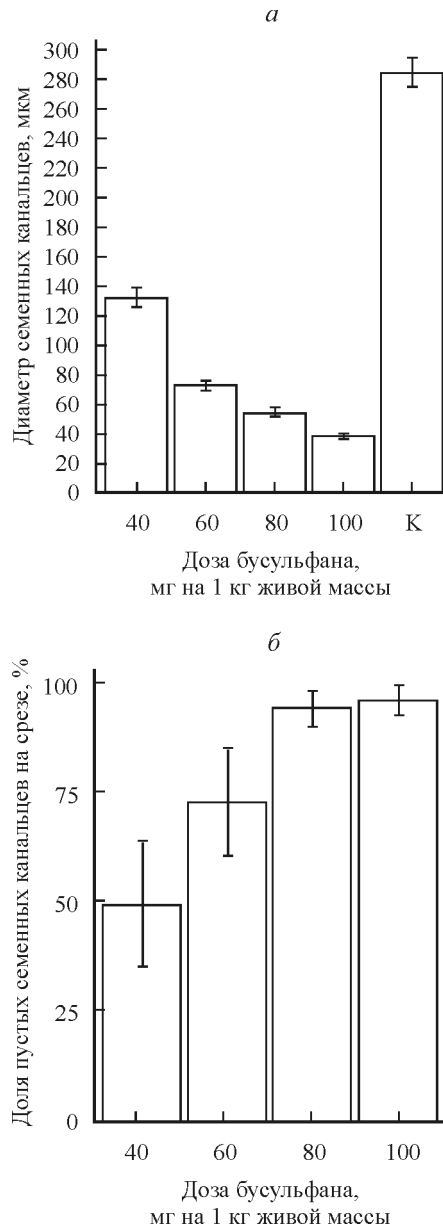


Рис. 1. Диаметр семенных канальцев семенников петухов (а) и доля «пустых» канальцев (б) после введения бусульфана в разных дозах.

Данные представлены в виде средней арифметической и 95%-ного доверительного интервала.

Результаты и обсуждение

Бусульфан вводили в семенники в дозе от 40 до 100 мг на 1 кг живой массы. При выборе диапазона дозы препарата основывались на результатах исследований, полученных ранее на лабораторных и сельскохозяйственных животных (Kim et al., 1997; Ogawa et al., 1997; Dobrinski et al., 2000; Li et al., 2008; Yu et al., 2010; Tagirov, Golovan, 2012; Panahi et al., 2015), в том числе на результатах исследований, проведенных ранее на свиньях на базе ВИЖ им. Л. К. Эрнста (Савченкова и др., 2006). Следует отметить, что в указанных исследованиях бусульфан вводили внутривенно. В наших исследованиях мы использовали введение данного препарата непосредственно в семенники.

Через 1 мес после инъекции бусульфана проводили оценку сперматогенеза у подопытных самцов. Гистологические исследования структуры семенников выявили изменение размеров семенных канальцев и наличия в них сперматогенных клеток в зависимости от концентрации вводимого препарата (рис. 1). Так, при введении бусульфана в концентрации 40 мг на 1 кг живой массы диаметр семенных канальцев составил 132 ± 3 мкм, что было на 54 % меньше, чем в контроле (284 ± 4 мкм, $p < 0.01$). При увеличении концентрации бусульфана отмечали уменьшение диаметра семенных канальцев ($p < 0.01$). При дозе 60 мг/кг данный показатель не превышал 72.0 ± 1.3 мкм,

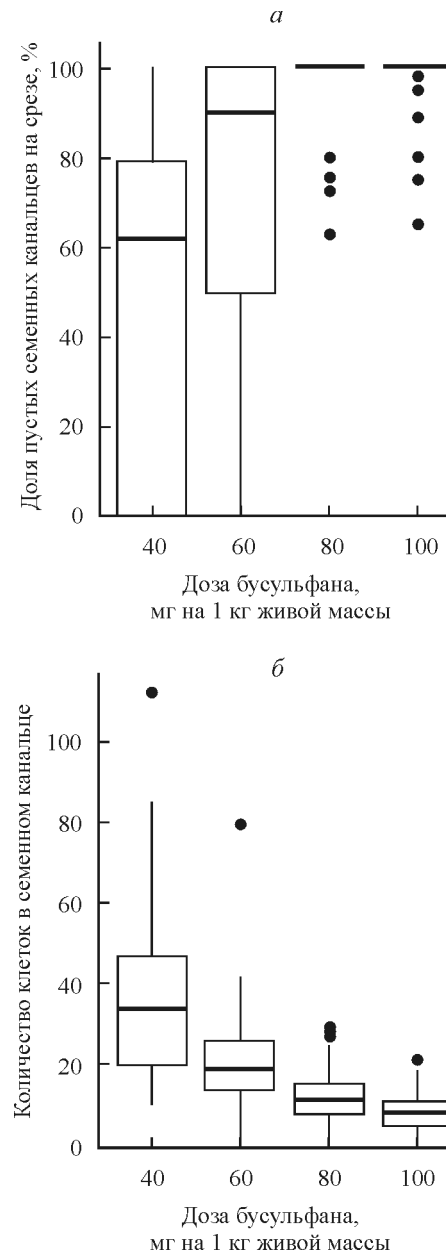


Рис. 2. Наличие (а) и количество (б) сперматогенных клеток в семенных канальцах петухов после введения бусульфана в различных дозах.

На графиках отражено распределение значений изучаемых показателей в сравнительном аспекте между экспериментальными группами. Данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей и выбросов.

Таблица 1

**Состав популяции сперматогенных клеток семенных канальцев семенников петухов
после введения различных доз бусульфана**

Доза бусульфана, мг на 1 кг живой массы	Количество сперматогенных клеток в 1 семенном канальце, шт			
	всего	клетки Сертоли	сперматогонии	сперматоциты 1-го порядка
40	36 ± 2	17 ± 1	17 ± 1	2.0 ± 0.4
60	20 ± 2	15 ± 1	5 ± 1	—
80	12 ± 1	11 ± 1	1.0 ± 0.1	—
100	9 ± 1	8 ± 1	1.0 ± 0.2	—
Контроль	884 ± 7	18 ± 3	69 ± 5	150 ± 2

при 80 мг/кг — 55.0 ± 1.2 , при 100 мг/кг — 38.0 ± 1.4 мкм; разница с контролем достигала 75, 81 и 87 % соответственно.

Изучение заполненности семенных канальцев сперматогенными клетками выявило высокий процент «пустых» семенных канальцев, к которым относили канальцы с небольшим количеством сперматогенных клеток, расположенных в один ряд на базальной мембране. Гистологический анализ образцов, взятых из разных участков семенников, показал, что доля семенных канальцев с элиминированными сперматогенными клетка-

ми на срезах варьировала в зависимости от используемой дозы бусульфана и составила в среднем 50 ± 7 , 73 ± 6 , 94 ± 2 и 96 ± 2 % при использовании данного препарата в концентрациях 40, 60, 80 и 100 мг на 1 кг живой массы соответственно. Статистический анализ полученных данных выявил меньшую вариабельность данного показателя при использовании бусульфана в высоких концентрациях — 80 и 100 мг на 1 кг живой массы (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о результативности исключения сперматогенеза у петухов при введении бусульфана непосредственно в ткань семенника. При этом

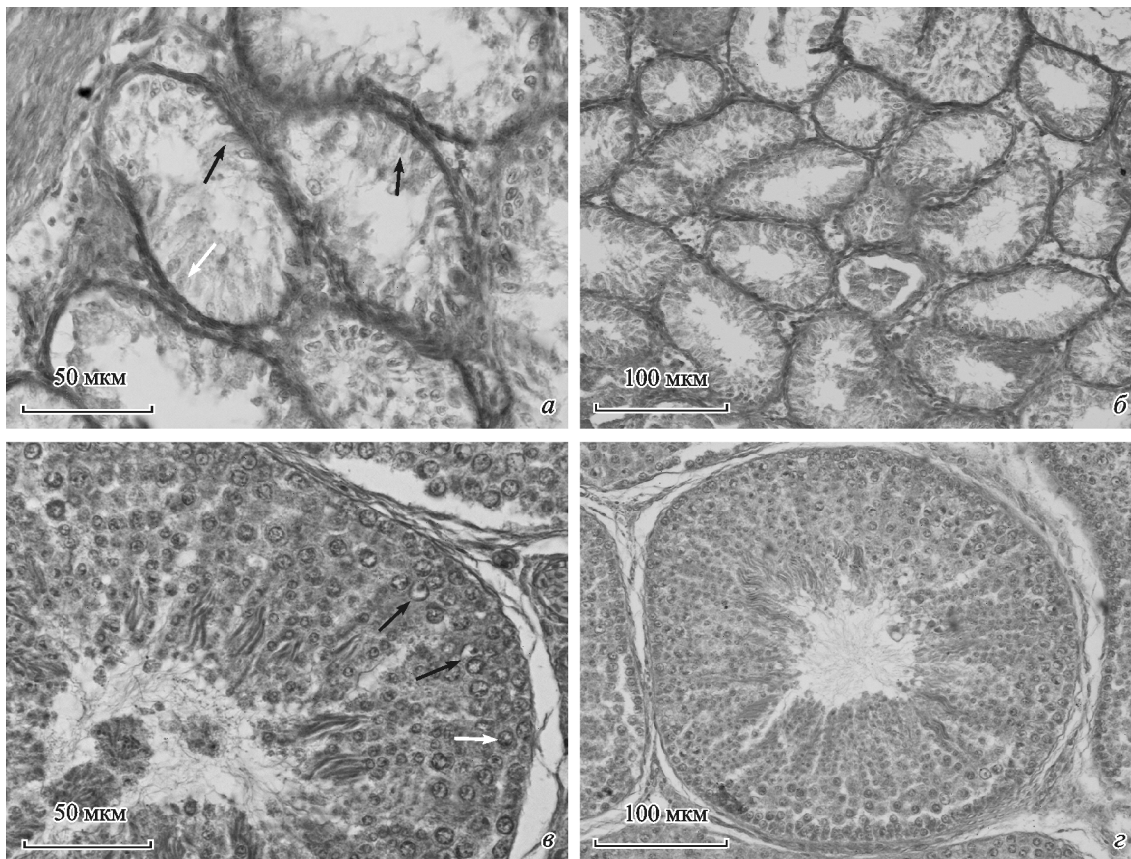


Рис. 3. Семенные канальцы 6-месячного петуха.

a, б — после обработки бусульфаном (80 мг на 1 кг живой массы), в семенных канальцах видны сперматогенные клетки, представленные клетками Сертоли и единичными сперматогониями; *в, з* — контроль, в семенных канальцах представлены все типы сперматогенных клеток (клетки Сертоли, сперматогонии, сперматоциты 1-го и 2-го порядков, сперматиды и спермии). Окраска гематоксилин-эозином. Клетки Сертоли показаны черными стрелками, сперматогонии — белыми.

действие бусульфана отмечалось не только в местах инъекции препарата, но распространялось и на значительную часть сперматогенной ткани органа.

В исследованиях, проведенных ранее на лабораторных животных и птицах, также отмечалось уменьшение размеров семенников у опытных особей по сравнению с контролем (Савченкова, 2006; Tagirov, Golovan, 2012). Однако детальных гистологических исследований, охватывающих динамику изменения размеров семенных канальцев и клеточного состава популяции сперматогенных клеток, не проводили.

В наших исследованиях было показано, что уменьшение диаметра семенных канальцев было обусловлено значительным снижением количества сперматогенных клеток в них. При использовании бусульфана в концентрации 40 мг/кг количество клеток в 1 семенном канальце варьировало от 5 до 112 клеток и составило в среднем 36 ± 2 клетки при аналогичном показателе в контрольной группе 884 ± 7 клеток. При введении бусульфана в концентрациях 60, 80 и 100 мг на 1 кг живой массы отмечали достоверное ($p < 0.01$) снижение данного показателя по сравнению с контролем на 97.7, 98.6 и 98.9 % соответственно (табл. 1). С увеличением концентрации бусульфана вариабельность признака значительно уменьшалась (рис. 2).

Анализ состава сперматогенных клеток семенных канальцев показал, что данная популяция клеток была представлена преимущественно клетками Сертоли и сперматогониями, что говорит о наибольшей устойчивости данных типов клеток к негативному воздействию бусульфана (рис. 3). При этом с увеличением концентрации бусульфана доля сперматогоний значительно снижалась ($p < 0.01$). При введении бусульфана в семенники в концентрации 40 мг/кг соотношение клеток Сертоли и сперматогоний было одинаковым — 50 и 50 % соответственно. С повышением концентрации до 60 мг/кг соотношение данных типов клеток составило соответственно 75 и 25 %, до 80 мг/кг — 92 и 8, до 100 мг/кг — 89 и 11 %.

Исходя из полученных данных в качестве оптимальной дозы бусульфана для элиминации сперматогенных клеток семенников можно рекомендовать введение 80 мг препарата на 1 кг живой массы. Использование бусульфана в большей концентрации — 100 мг/кг — не дает значительного улучшения результативности удаления сперматогенных клеток. Несмотря на достоверные различия по диаметру семенных канальцев и количеству сперматогенных клеток в них, установленные при введении бусульфана в данных концентрациях, следует отметить отсутствие различий по клеточному составу популяции сперматогенных клеток в семенных канальцах. Соотношение клеток Сертоли и сперматогоний в обоих случаях было относительно одинаковым.

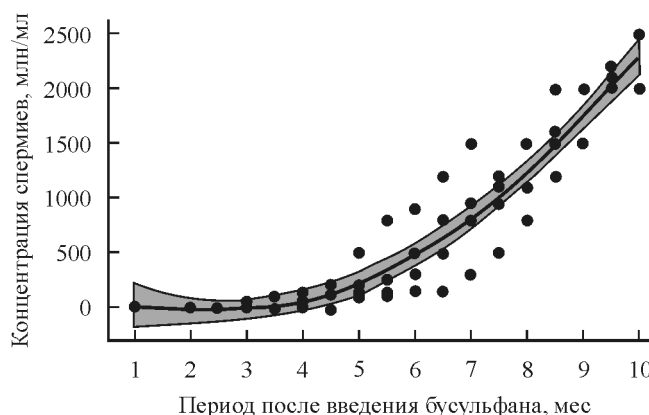


Рис. 4. Восстановление сперматогенеза у петухов после введения бусульфана.

Данные представлены в виде абсолютных значений показателя и линией, сглаженной по методу локальной регрессии, представленной со стандартной ошибкой.

Ряд исследователей отмечают результативность двукратного введения бусульфана в элиминации сперматогенных клеток в семенных канальцах семенников (Tagirov, Golovan, 2012; Panahi et al., 2015). Результаты наших исследований показывают достаточность однократного введения бусульфана для эффективного выключения сперматогенеза: использование бусульфана в концентрации 80 мг/кг позволяет элиминировать до 99 % сперматогенных клеток. Проведение двукратной обработки бусульфаном нежелательно ввиду токсичности препарата и необходимости проведения хирургических манипуляций для получения оперативного доступа к семеннику. Кроме того, полное удаление клеток Сертоли может негативно сказаться на колонизации донорских клеток в семенных канальцах петухов-реципиентов, так как развитие сперматогенных клеток идет на клетках Сертоли.

Для оценки эффективности восстановления сперматогенеза у петухов после их обработки бусульфаном было осуществлено введение данного препарата в семенники 4 петухов. Возобновление сперматогенеза у подопытных самцов наблюдали через 3.5—4.0 мес после инъекции (рис. 4). Однако концентрация спермиев в эякуляте была низкой — 50—100 млн/мл, что составило только 2—4 % от нормы. При этом показатели сохранности акросом и целостности хроматина были в пределах нормы, что свидетельствует об отсутствии стойкого негативного влияния бусульфана в оптимальной дозе (80 мг на 1 кг живой массы) на структуру ДНК половых клеток (табл. 2). Полное восстановление сперматогенеза наблюдали через 9—10 мес после инъекции бусульфана.

Полученные данные свидетельствуют о результативности использования бусульфана для выключения спер-

Т а б л и ц а 2

Влияние бусульфана на качественные показатели спермы петухов

Показатель	До введения бусульфана	После введения бусульфана	
		4-й мес	9-й мес
Целостность хроматина, %	96.0 ± 1.6	95.0 ± 1.6	96.0 ± 1.4
Сохранность акросом, %	97.0 ± 0.5	96.0 ± 1.1	98.0 ± 0.6
Доля атипичных клеток, %	4.0 ± 0.4	5.0 ± 0.6	4.0 ± 0.7

матогенеза у петухов, при этом оптимальная доза препарата составляет 80 мг на 1 кг живой массы. Использование бусульфана в данной дозе способствовало уменьшению диаметра семенных канальцев и снижению количества сперматогенных клеток в них по сравнению с контролем на 81 и 99 % соответственно. Клеточный состав популяции сперматогенных клеток был представлен преимущественно клетками Сертоли (92 %) и незначительным количеством сперматогоний (8 %). Наличия других типов сперматогенных клеток в семенных канальцах выявлено не было. Восстановление сперматогенеза у петухов отмечалось через 3—4 мес после введения бусульфана с нормализацией концентрации спермиев в эякуляте к 9 мес после инъекции препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-16-10059).

Список литературы

- Волкова Н. А., Волкова Л. А., Фомин И. К., Зиновьева Н. А., Лоцманова Н. С. 2012. Оптимизация условий введения рекомбинантной ДНК в сперматогенные клетки семенников петухов *in vivo*. С-х. биол. 6 : 56—60. (Volkova N. A., Volkova L. A., Fomin I. K., Zinovieva N. A., Lotsmanova N. S. 2012. Optimization of conditions for recombinant DNA injection into spermatogenic cells of the chicken *in vivo*. Animal and Dairy Sci. 6 : 56—60.)
- Жункейра Л. К., Карнейро Ж. 2009. Гистология: атлас, учебное пособие. (Пер. с англ. под ред. В. Л. Быкова). М.: GEOTAR-Media. 576 с. (Zhunkeira L. K., Carneiro J. 2009. Histology: atlas, study guide. (Translated from English under the editorship of V. L. Bykov). Moscow: GEOTAR-Media. 576 p.)
- Савченкова И. П., Коржикова С. В., Костерева Н. В., Эрнст Л. К. 2006. Культивирование и трансплантация сперматогоний типа А хряков. Онтогенез. 37 (4) : 292—300. (Savchenkova I. P., Korjikova S. V., Kostereva N. V., Ernst L. K. 2006. Cultivation and transfer of porcine type A spermatogonia. Russ. J. Develop. Biol. 37 (4) : 242—249.)
- Саркизов Д. С., Перова Ю. П. 1996. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина. 544 с. (Sarkizov D. S., Perova Yu. P. 1996. Microscopic technique: manual. Moscow: Medicine. 544 p.)
- Brinster R. L. 2002. Germline stem cell transplantation and transgenesis. Science. 296 : 2174—2176.
- Brinster R. L., Avarbock R. 1994. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91 : 11 303—11 307.
- Bucci L. R., Meistrich M. L. 1987. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. Mutat. Res. 176 : 259—268.
- Dobrinski I. 2005. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. Anim. Reprod. Sci. 89 : 137—145.
- Dobrinski I., Avarbock M. R., Brinster R. L. 2000. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. Mol. Reprod. Develop. 57 : 270—279.
- Kim J. H., Jung-Ha H. S., Lee H. T. 1997. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. Mol. Reprod. Develop. 46 : 515—526.
- Li B., Sun G., Sun H., Xu Q., Gao B., Zhou G., Zhou W., Wu X., Bao W., Yu F., Wang K., Chen G. 2008. Efficient generation of transgenic chickens using the SSCs *in vivo* and *ex vivo* transfection. Sci. China C Life Sci. 51 : 734—742.
- McLean D. J. 2005. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. Cell Tissue Res. 322 : 21—31.
- Meistrich M. L., Hunter N., Suzuki N., Trostle P. K., Withers H. R. 1978. Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation. Radiat. Res. 74 : 349—362.
- Min S., Qing S. Q., Hui Y. Y., Zhi F. D., Rong Q. Y., Feng X., Chun L. B. 2011. Generation of antiviral transgenic chicken using spermatogonial stem cell transfected *in vivo*. African J. Biotechnol. 10 : 15 678—15 683.
- Oatley J. M. 2010. Spermatogonial stem cell biology in the bull: development of isolation, culture, and transplantation methodologies and their potential impacts on cattle production. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 67 : 133—143.
- Ogawa T., Arechaga J. M., Avarbock M. R., Brinster R. L. 1997. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. Int. J. Develop. Biol. 41 : 111—122.
- Olive V., Cuzin F. 2005. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37 : 246—250.
- Panahi M., Keshavarz S., Rahmanifar F., Tamadon A., Mehra-bani D., Karimaghani N., Sepehrimanesh M., Aqababa H. 2015. Busulfan induced azoospermia: Stereological evaluation of testes in rat. Vet. Res. Forum. 6 : 273—278.
- R Core Team. 2012. R A Language and environment for statistical computing. Foundation for statistical computing. Vienna, Austria. 2012. URL: <http://www.R-project.org>.
- Rodriguez-Sosa J. R., Dobson H., Hahnel A. 2006. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. Theriogenol. 66 : 2091—2103.
- Sato M., Ishikawa A., Kinura M. 2002. Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible *in vivo* gene transfer system via epididymal spermatozoa. Mol. Reprod. Develop. 61 : 49—56.
- Tagirov M., Golovan S. 2012. The effect of busulfan treatment on endogenous spermatogonial stem cells in immature roosters. Poultry Sci. 91 : 1680—1685.
- Wickham H. 2009. ggplot2 : elegant graphics for data analysis. New York: Springer-Verlag. 213 p.
- Withers H. R., Hunter N., Barkley Jr. H. T., Reid B. O. 1974. Radiation survival and regeneration characteristics of spermatogenic stem cells of mouse testis. Radiat. Res. 57 : 88—103.
- Yu F., Ding L. J., Sun G. B., Sun P. X., He X. H., Ni L. G., Li B. C. 2010. Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells. Mol. Reprod. Develop. 77 : 340—347.
- Zheng Y., Zhang Y., Qu R., He Y., Tian X., Zeng W. 2014. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. Reproduction. 147 : 65—74.

THE EFFECT OF BUSULFAN AT DIFFERENT CONCENTRATIONS ON THE ELIMINATION OF SPERMATOGENIC CELLS IN CHICKEN MALES

*N. A. Volkova,¹ A. N. Vetokh, A. V. Dotsev, I. P. Novgorodova,
L. A. Volkova, O. A. Artemieva, N. A. Zinovieva*

All-Russian Research Institute of Animal Husbandry Named After Academy Member L. K. Ernst,
Dubrovitsy, Moscow region, 142132;

¹ e-mail: natavolkova@inbox.ru

The effect of busulfan treatment on elimination of spermatogenic cells in chicken males' testes was studied with the aim of switching off spermatogenesis. It was found that the optimal concentration of this drug was 80 mg/kg of live weight. With the introduction of busulfan into the testes of male chickens at this concentration, the diameter of the seminiferous tubules was reduced by 81 % as compared to the control group, due to the elimination of a significant proportion of spermatogenic cells (up to 99 %). The most resistant cells to busulfan treatment were Sertoli cells and spermatogonia. With complete elimination of other types of spermatogenic cells, the number of Sertoli cells and spermatogonia in the testicle tubules decreased by 39 and 98 %, respectively, in comparison with the control group. Spermatogenesis recovery was observed 3—4 months after the administration of busulfan. However, the concentration of spermatozoa in the ejaculate was low and amounted to only 2—4 % as compared to the norm. Normalization of sperm concentration was observed 9—10 months after injection of the drug.

Key words: spermatogenesis, chicken males, busulfan, spermatogonia, Sertoli cells.
