

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БУСУЛЬФАНА ДЛЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ ГОНАД ПТИЦ

М. Т. Тагиров, А. Б. Артеменко, С. Н. Ткаченко, Л. В. Терещенко, А. В. Терещенко

Институт птицеводства УААН

В двух экспериментах уточнили эффективность использования бусульфана в качестве химического агента для стерилизации гонад птиц при проведении биотехнологических исследований. Для получения герминативных химер птиц бусульфана (300 нг/яйцо) инъецируют в подзародышевую полость после предварительной инкубации яиц в течение 8–10 часов при 37,8 °С. Перед инъекцией донорских клеток для инактивации бусульфана яйца инкубируют при 31–32 °С в течение 24 часов.

Для стерилизации гонад цыплят в опытах по их трансплантации используют трехкратное введение 70 мкг бусульфана в яйцо через каждые 24 часа инкубации, или однократное введение 250 мкг бусульфана в свежеснесенные яйца, что обеспечивает стерильность гонад на уровне 46,2 % от контроля.

Ключевые слова: БУСУЛЬФАН, СТЕРИЛИЗАЦИЯ ГОНАД, ПТИЦА, ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, БЛАСТОДЕРМА.

Бусульфана (1,4-бутандиол диметансульфонат) представляет собой алкилирующий агент с химической структурой $\text{CH}_3\text{-O}_2\text{S-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-SO}_2\text{-CH}_3$. Он был открыт Haddow и Timmis (1953), когда они пытались увеличить терапевтический эффект азотистого иприта. Был исследован ряд сульфоновых кислот в связи с их алкилирующей способностью, в частности, бусульфана (Вu) показал сильный ингибирующий эффект на рост у крыс карциномы, и избирательное подавление хронической лейкемии костного мозга. [1].

Впоследствии, Вu широко использовался как химиотерапевтический агент при лечении рака, а именно при лечении лейкемии костного мозга, бронхиальной карциномы, пересадке костного мозга и аутоиммунных заболеваниях [2].

В 1953 Vollag впервые сообщает, что Вu проявляет неблагоприятный эффект на половые клетки. Когда самцам крыс в брюшную полость вводили 2 мг/кг Вu с интервалом в две недели, после 30 дней или 60 дней в семенниках не было найдено ни сперматид, ни сперматозоидов. При вскрытии на 120-ый или 150-ый день после обработки наблюдалось полное разрушение зародышевого эпителия в семенниках крыс [3]. Craig и др. (1958) и Jackson и др. (1958) сообщают, что вызванное Вu бесплодие у мужских особей развивалось в течение 50 дней или спустя 8 недель после однократного внутрибрюшного введения Вu в дозе 10 мг/кг [4, 5].

В другой работе, две внутрибрюшинные дозы Вu были введены крысе с интервалом в 24 дня. Семенники были почти полностью лишены своих сперматогенных клеток спустя 20 дней после второй инъекции. Сорок восемь дней спустя выжившие сперматогонии вступили в фазу активного быстрого роста. На 96 день, наблюдался нормальный сперматогенез, и у 80 % крыс была восстановлена плодовитость через 120 дней после воздействия на них Вu [6]. Эти данные указали, что сперматогонии могли возобновить свою деятельность после обработки Вu. Hemsworth и Jackson (1962) широко изучившие влияние Вu на развитие эмбриональных гонад, обнаружили, что он имеет выборочный эффект на половые клетки [7]. В их экспериментах крысам делали внутрибрюшную инъекцию Вu с арахисовым маслом (10

мг/кг) с 2-дневным интервалом между 5-ым и 20-ым днями беременности. И мужские и женские гонады потомства казались нормальными, если обработка была выполнена в 5-ый или 7-ой день беременности. Однако, мужские гонады были полностью бесплодны, когда обработка была выполнена между 11–14 днями беременности. Точно так же в яичниках фактически отсутствовали половые клетки, когда обработка была выполнена между 13 и 16 днями беременности. Яичники также развивались нормально, если Вu вводили в дни последующие после 18-го дня беременности [8, 9]. Эти периоды максимального разрушения половых клеток совпадают с миграционной фазой первичных половых клеток (ППК) и началом максимально быстрого увеличения их количества [10]. Впоследствии, была изучена ультраструктура крысиных ППК после введения однократной дозы Вu (10 мг/кг) для того, чтобы объяснить их чувствительность к Вu. Гипертрофия ядер в ППК наблюдалась на 18 часов после инъекции Вu. Впоследствии, было выявлено массовое вырождение ППК через 24 часа после обработки. Однако не наблюдалось никаких цитологических изменений соматических клеток.

Обработка Вu — успешный метод, используемый для деградации эндогенных половых клеток в семенниках эмбрионов-реципиентов перед трансплантацией туда половых клеток донора [11–13]. Вu проявляет подобный эффект и на ППК в развивающемся эмбрионе птицы [14]. В куриные яйца инъецировались 25 и 125 мкг. Вu на 48, 60, и 72 часа инкубации. Доза Вu 125 мкг привела к элиминации половых клеток в течение 4 дней и вызвала последующие морфологические изменения в мужских и женских гонадах. Эмбрионы, в которые вводили 125 мкг Вu на 48 день инкубации, были бесплодны [15]. Эти данные показали, что Вu действует на ППК в миграционной стадии.

С целью оценки эффекта Вu на дифференциацию гонад японского перепела Hallet and Wentworth (1991) вводили две дозы относительно высоких концентраций Вu в белок инкубированных яиц. Обработка Вu (210 мкг, суспендированных в 50 мкл белка яиц перепела) не имела никакого эффекта на гонады 23 птиц при оценке через 3 дня и 10 недель. Только у половины птиц наблюдалось уменьшение числа половых клеток после введения 420 мкг Вu до начала инкубации [16]. Однако, Furuta и Fujihara (1999) вводили 0,25 мкг Вu в 40 мкл. ФСБ в эмбрионы кур до начала инкубации и наблюдали значительное сокращение числа ППК на 15 стадии развития [17]. Как видно из приведенных данных, эффект Вu на ППК куриных зародышей в отличие от млекопитающих совершенно непредсказуем. Возможно, это связано с трудностями доставки Вu в развивающийся эмбрион птицы. Так как Вu проявляет в отношении эмбрионов птиц тератогенный эффект [18], очень важно определить соответствующую дозу и средство транспортировки к развивающему зародышу, чтобы эффективно стерилизовать его гонады.

Aige-Gil и Simkiss (1991) вводили Вu в эмбрионы кур на 48-ой час инкубации в дозах от 1 до 50 мкг для сравнения трех методов доставки Вu. При суспендировании Вu в ФСБ или непосредственной обработки у 14 % эмбрионов наблюдались уродства конечностей. Растворение препарата в ДМСО и обработка эмбрионов приводило к уродствам туловища у 28 % эмбрионов даже при дозе 10 мкг. Поэтому, оба эти метода доставки были отставлены. При суспендировании 100 мкг Вu в 50 мкл кунжутного масла и введении непосредственно в желток яйца выявлено относительно небольшое количество уродств и более чем 95 % эмбрионов были стерильны на 6-день инкубации. Применение суспензии Вu/масло при введении ее в желток на 48 ч инкубации был принят как эффективный метод уменьшения числа ППК в развивающемся эмбрионе [19].

Введение Вu на 48 часов инкубации с целью производства половых химер птицы могло повредить ППК донора, так как трансплантацию ППК обычно производят на 48–72 ч инкубации, а период полураспада Вu составляет от 10 до 18 часов [20]. Поэтому Vick и др. (1993) использовали дозы 0, 25, 50, и 250 мкг. Вu в 40 мкл. кунжутного масла и вводили в желток эмбрионов на 24 ч. инкубации. Анализ гистологических срезов гонад эмбрионов в

возрасте 16 дней показал дозависимый характер чувствительности ППК эмбриона на обработку Ви. Введение 50 мкг Ви снизило у 16-дневных эмбрионов количество половых клеток в раза. В дальнейших экспериментах при попытке получения половых химер с помощью пересадки гонадных ППК в эмбрионы, предварительно стерилизованные введением 50 мкг Ви на 24-ом часу инкубации, эффективность трансплантации клеток увеличилась в среднем с 4 до 14 % [21]. Эксперименты продемонстрировали, что индекс стерильности, полученный при введении 50 мкг Ви на 24 ч инкубации, составлял 75 % для левых и 78 % для правых гонад эмбрионов на одной и той же стадии развития. Вторичное заселение частично стерилизованных эмбрионов гонадными ППК приводило к 3-кратному увеличению числа ППК в гонадах на 28 стадии развития [22]. Эти эксперименты продемонстрировали, что Ви может быть успешно использован для стерилизации гонад эмбрионов-реципиентов птиц с целью получения половых химер.

Следует отметить, что во всех случаях, когда применялся Ви, последующая инъекция донорских клеток производилась в кровяное русло зародышей 3–3,5 суточного возраста. Микроинъекцию в кровяное русло на ранних стадиях развития значительно сложнее осуществить из-за частых случаев кровоизлияний и гибели зародышей, чем введение клеток в подзародышевую полость.

Таким образом, несмотря на положительный эффект, наблюдаемый во многих работах, следует отметить, что часто результаты действия Ви оказываются непредсказуемыми. Поэтому такие параметры, как продолжительность и место воздействия, концентрация Ви, стадия развития эмбриона, нуждаются в уточнении для получения стабильных результатов.

Материалы и методы

Исследования проводились в лаборатории репродукции птицы Института птицеводства УААН на оплодотворенных яйцах кур породы род-айленд красный в возрасте 30–40 недель. Яйца для исследований мылись в теплом мыльном растворе, тщательно споласкивались и протирались 70 % — раствором этилового спирта. Для подавления пролиферации половых клеток использовали Ви (Sigma-Aldrich), который растворяли в очищенном 10 % растворе диметилформамида (ДМФ) или диметилсульфоксида (ДМСО).

В первой серии экспериментов уточняли концентрацию и схему инъекции Ви в подзародышевую полость в экспериментах по получению инъекционных химер птиц. Инъекцию раствора Ви в подзародышевую область проводили в ламинарном шкафу, где обеспечивались локальные стерильные условия, через окошко в скорлупе диаметром 5–6 мм, с помощью стеклянной микропипетки с внешним диаметром не более 40–45 мкм.

Во второй серии экспериментов исследовали степень химической стерилизации гонад птиц после инъекции различных концентраций Ви в яйцо в экспериментах по трансплантации гонад. Раствор Ви инъецировали в белок яйца при помощи инсулинового шприца. Для этого, сначала в области воздушной камеры прокалывали скорлупу, а затем в экваториальной области яйца вводили расчетное количество Ви в яйцо. Данная процедура предотвращает вытекание инъецированного раствора. Образовавшиеся в результате проколов отверстия в скорлупе заклеивали горячим парафином.

Результаты и обсуждение

Для учета времени действия Ви при инъекции донорских клеток в эмбрион-реципиент был проведен эксперимент по влиянию кратковременного снижения температуры во время инкубации на выводимость яиц (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние кратковременного снижения температуры во время инкубации на выводимость яиц.

Варианты	Количество яиц, (шт.)	Количество цыплят	
		шт.	%
К	27	23	85,2
1	20	13	65,0
2	16	5	31,3
3	18	14	77,5

К — свежие неинкубированные яйца, 1 — яйца на протяжении 5 суток прогревались до 37,8 °С по 2 часа, после чего были инкубированы при стандартных условиях до вывода, 2 — яйца на протяжении 5 суток прогревались до 37,8 °С по 2 часа, просверливали отверстие в скорлупе, заклеивали, после чего были инкубированы при стандартных условиях до вывода, 3 — яйца на протяжении 48 часов прогревались до 37,8 °С, после чего инкубировались на протяжении 35 часов при 33 °С, после чего были переведены в стандартные условия инкубации до вывода.

Вскрытие яиц в варианте 3 на 4-ые сутки инкубации показало, что эмбрионы развиваются с отставанием: в опыте — 17 стадия развития (53–64 часа), в контроле — 21 стадия (84 часа).

На основе полученных данных в дальнейших исследованиях для обработки яиц Ви была принята схема, согласно которой яйца-реципиенты прогревались в инкубаторе при 37,8 °С на протяжении 8–10 часов, что соответствует промежуточной стадии формирования первичной полоски, после чего в каждое яйцо вводилось рассчитанное количество Ви. Ви вводили микропипеткой в подзародышевую полость эмбриона в объеме 3–5 мкл жидкости. Яйца-реципиенты инкубировались с Ви не менее 24 часов (время активности Ви при 33 °С).

Ви растворяли в диметилформамиде. Диметилформамид, будучи сильным растворителем, обладает пагубным действием на живые ткани, поэтому конечную его концентрацию доводили до 10 % разбавлением питательной средой ДМЕМ (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние разных концентраций Ви на эмбриональное развитие

Количество Ви в яйце, нг	Количество заложенных на инкубацию яиц (шт.)	Количество живых эмбрионов на 18 сутки развития		Количество вылупившихся цыплят	
		шт	%	шт	%
100	11	8	72, 7	3	27, 2
200	15	13	86, 6	7	46, 6
300	15	11	73, 3	8	53, 3
480	15	7	46, 6	6	40, 0
0 (контроль)	18	18	100, 0	18	100, 0

Следует отметить, что кроме представленных в таблице концентраций были апробированы и другие варианты: 50, 70 и 100 мкг Ви на яйцо. Ви растворяли в диметилформамиде или диметилсульфоксиде, который потом разбавляли подсолнечным маслом в соотношении 1:1. При инъекции таких концентраций Ви в подзародышевую

полость в непосредственной близости от бластодиска всегда наблюдался повышенный отход зародышей с различными уродствами развития. Ни один из этих вариантов не дал приемлемых положительных результатов.

Как видно из представленных результатов, выводимость яиц в группах, где инъецировались 100 и 200 нг Ви ниже, чем при более высоких концентрациях. Возможно, это связано с тем, что сама процедура вскрытия яиц оказывает значительное повреждающее влияние на эмбриональное развитие, что было замечено нами ранее [23].

В группах, где инъецировались 300 нг Ви на яйцо у полученных цыплят в суточном возрасте определяли массу гонад (табл. 3). Вес семенников у цыплят вылупившихся после инъецирования бусульфана был на 29,3 % меньше, чем в контроле.

Таблица 3.

Влияние инъекции Ви в эмбрион на массу гонад суточного цыпленка.

Вариант	Количество (шт.)	Масса (мг.)
Контроль (самки)	8	10,25±0,52
Опыт (самки)	8	8,56±0,77
Контроль (самцы)	9	9,0±0,91
Опыт (самцы)	11	6,36±0,32 *

* — разница достоверная при $P < 0,05$

Для химической стерилизации гонад и получения химер герминативной линии необходимо произвести обработку бусульфаном на определенной стадии развития эмбриона, то есть достижения промежуточной стадии формирования первичной полоски. Для этого необходима предварительная инкубация яиц-реципиентов продолжительностью 8–10 часов при 37,8 °С. Бусульфан вводится в подзародышевую полость в концентрации 300 нг/яйцо. Активность бусульфана сохраняется на протяжении 24 часов, и для того чтобы бусульфан не вызвал элиминации вновь внесенных первичнополовых клеток при получении химер необходимо провести инкубацию яиц не менее 24 часов при 30–32 °С.

Во второй серии экспериментов в белок свежеснесенных яиц вводили сравнительно высокие концентрации Ви: однократная инъекция 250 мкг/яйцо — 40 шт., трехкратная инъекция 70 мкг/яйцо — 40 шт., трехкратная инъекция 250 мкг/яйцо — 40 шт., однократная инъекция 500 мкг/яйцо — 40 шт., трехкратная инъекция 500 мкг/яйцо — 40 шт.. В качестве контроля служили три группы:

1. контроль — интактные яйца (40 шт.);
2. яйца, в которые проводилась однократная инъекция 70 мкл 10 %-ого раствора ДМСО — 40 шт.;
3. яйца, в которые проводилась трехкратная инъекция по 70 мкл 10 %-ого раствора ДМСО — 40 шт.

Контрольная однократная инъекция 10 % раствора ДМСО, который использовали для растворения Ви, приводит к снижению вывода цыплят до 72,7 %, а трехкратная — до 27,3 %. Повышение количества Ви до 500 мкг на один эмбрион, даже при однократном инъецировании, приводит к гибели всех эмбрионов на 1–11 сутки инкубации (рис. 1). Ввод в эмбрион более 250 мкг Ви приводит увеличению количества уродств до 10 %. Увеличение количества введенного Ви, как одноразовое, так и многократное, приводит к смещению гибели эмбрионов на более ранние стадии развития, вплоть до 3-х–1-х суток.

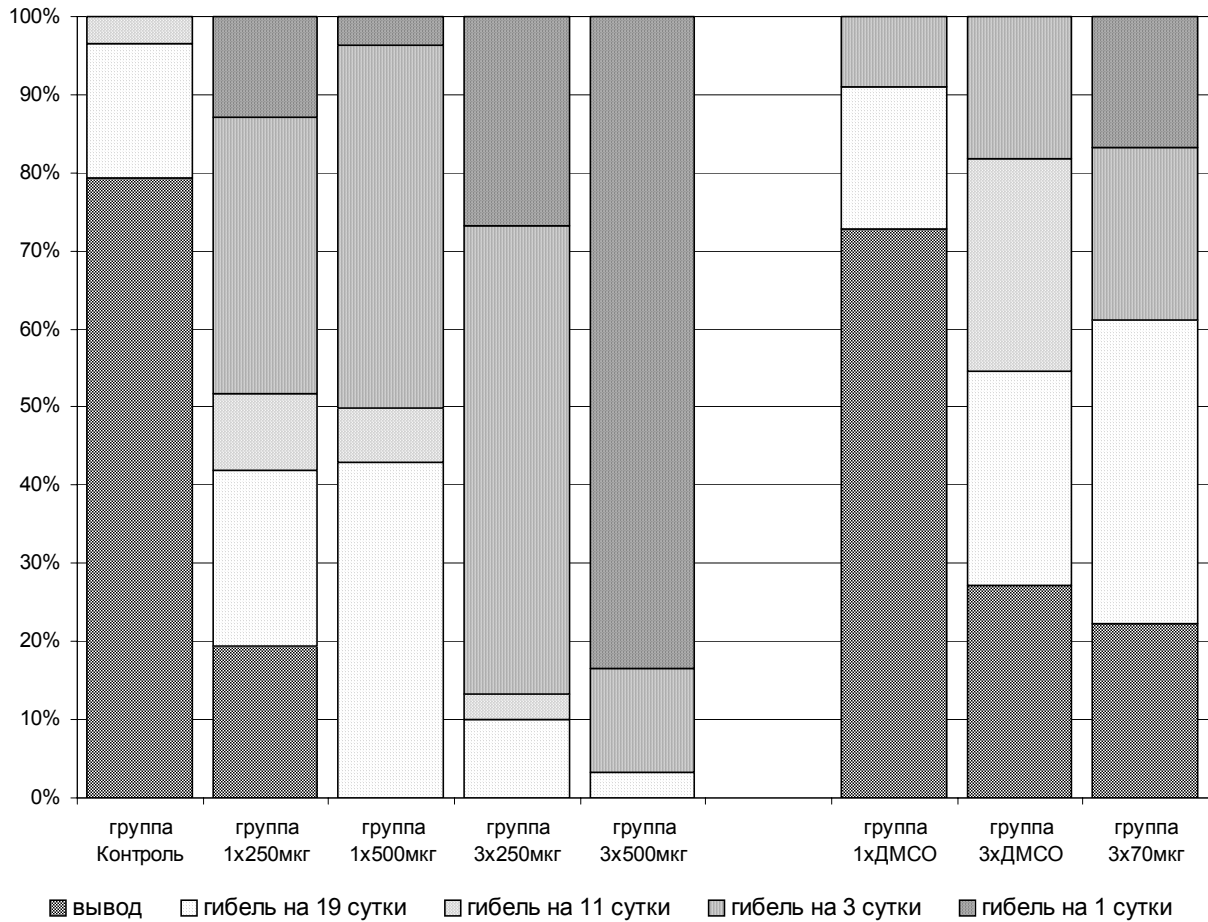
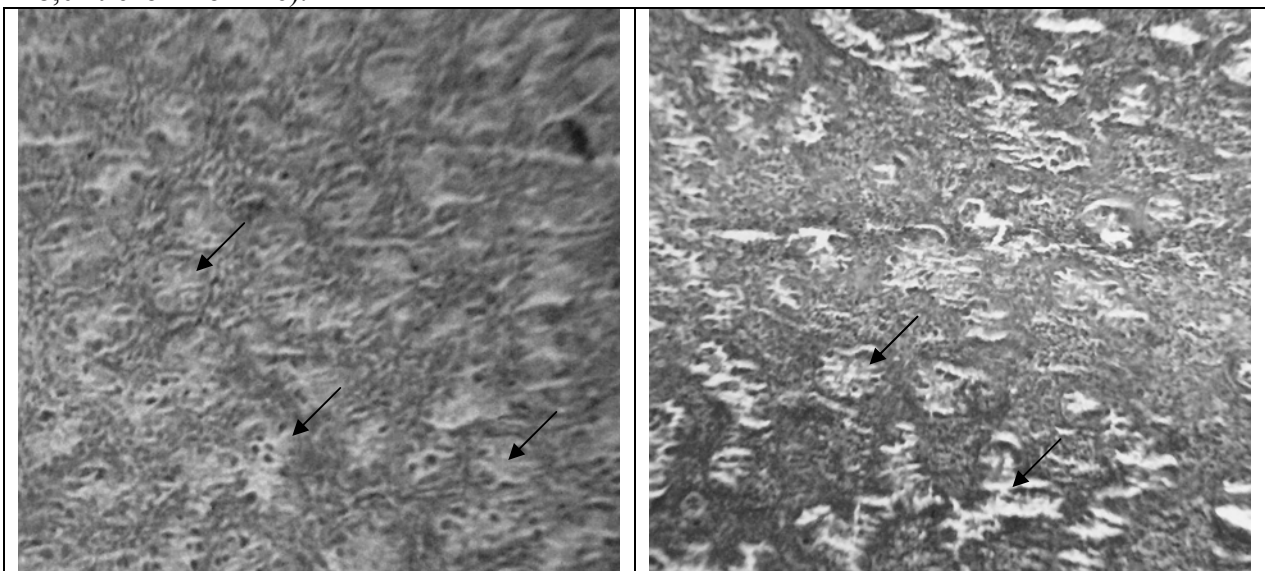
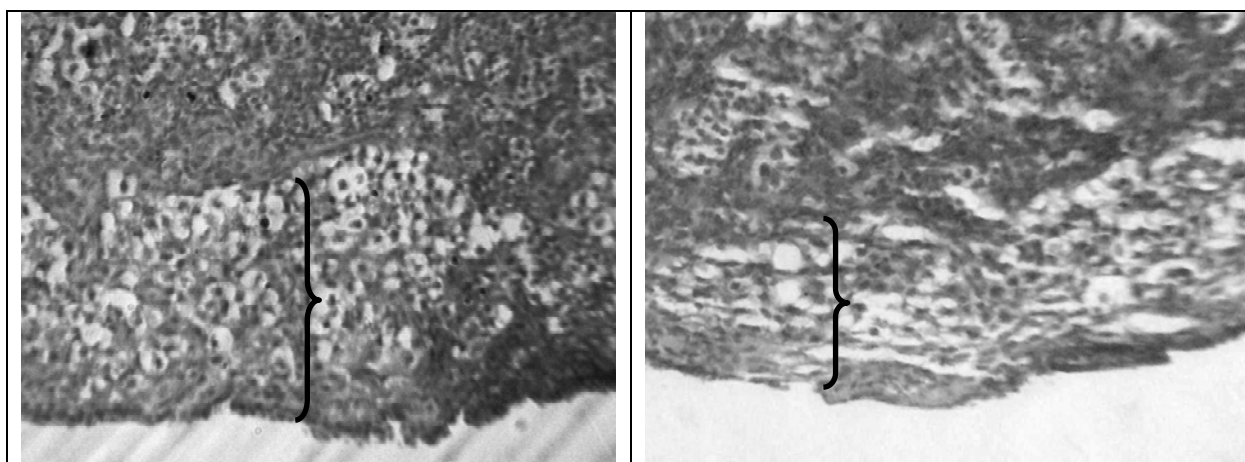


Рис. 1. Влияние инъекции Ви на вывод цыплят и гибель эмбрионов при инкубации.

Использование трехкратного инъектирования 70 мкг бусульфана на один эмбрион приводит к снижению количества канальцев в семенниках в 1,8 раз. Количество сперматоцитов на срезе одного канальца при этом снижается с $14,2 \pm 0,6$ до $11,8 \pm 0,4$ шт. (при $P < 0,001$). Таким образом, количество сперматоцитов (рис. 2) на единицу площади среза семенника снижается до 46,2 % от контроля (с 255,6 половых клеток в контроле до 118,0 клеток в опыте).



А	Б
<p><i>Рис. 2.</i> Гистологический срез семенника суточного цыпленка после трехкратного инъектирования 70 мкг Ви, контроль (А) и опыт (Б) (x250). Стрелками указаны каналы семенника.</p>	



А	Б
<p><i>Рис. 3.</i> Гистологический срез яичника суточного цыпленка после трехкратного инъектирования 70 мкг Ви, контроль (А) и опыт (Б) (x300). Фигурными скобками выделен корковый слой яичника.</p>	

Количество ооцитов также значительно снижено при обработке яичников Ви (рис. 3). Как видно из рисунка, на гистологических срезах появляются обширные участки, где вместо ооцитов формируются пустоты, толщина коркового слоя яичника утончается от 1/3 до 1/2 раза.

При планировании экспериментов исходили из необходимости проведения процедуры микроинъекции донорских клеток в подзародышевую полость, а не в кровяное русло. Поэтому в первом эксперименте мы выяснили, что на ранних стадиях развития (48 часовые эмбрионы) возможно снижение температуры инкубации — до 33 °С в течение 35 часов — без значительного снижения выводимости инкубируемых яиц — 77,5 %. Контроль за развитием эмбрионов показала, что зародыши при таких условиях отстают в своем развитии на 24 часа. Это время можно использовать для химического воздействия на зародыш с целью подавления развития собственных первичных половых клеток. Так как многие исследователи, работавшие с Ви, отмечали его тератогенный эффект, мы исходили из необходимости применения его минимальной концентрации. Такая концентрация может иметь эффект только в случае доставки химического агента в непосредственной близости от зародыша. Ви инъектировали проколом центральной области бластодермы в подзародышевую полость. Минимальное количество подзародышевой жидкости на промежуточной стадии формирования первичной полоски должно было обеспечивать оптимальные условия для проявления алкилирующего эффекта Ви. Анализ влияния различных концентраций Ви на выводимость инкубируемых яиц показал сравнительно высокие результаты выводимости яиц (более 50 %) при использовании концентрации 300 нг/яйцо, которая была использована в дальнейших экспериментах.

Таким образом, разработанная схема химической стерилизации гонад в экспериментах по получению химер герминативной линии включает следующие этапы:

1. Прединкубация яиц-реципиентов 8–10 часов при 37,8 °С (промежуточная стадия формирования первичной полоски);
2. Химическая обработка яиц-реципиентов алкилирующим агентом Ви. Ви вводится в подзародышевую полость в концентрации 300 нг/яйцо.

3. Инкубация яиц не меньше 24 часов при 30–32 °С — время действия Ви, на протяжении которого он теряет свою активность.
4. Инъекция донорских клеток в подзародышевую полость и инкубация до вывода при стандартных условиях инкубации.

В результате второй серии экспериментов выяснено, что трехкратная инъекция по 70 мкг через каждые 24 часа инкубации или однократная инъекция 250 мкг Ви в свежеснесенное яйцо позволяет получить курей стерильных по половым клеткам на уровне 46,2 %. Дальнейшее повышение концентрации Ви нецелесообразно, так как приводит к повышенному гибели эмбрионов и снижению вывода цыплят.

Перспективы дальнейших исследований. Разработанные подходы найдут применение в экспериментах по управлению детерминации пола и повышению эффективности создания трансгенной птицы с контролируруемыми хозяйственно-полезными признаками.

М. Т. Тагіров, А. В. Артеменко, С. Н. Ткаченко, Л. В. Терещенко, А. В. Терещенко

BUSULFAN USING FOR BIRDS' GONAD STERILIZATION

S u m m a r y

Effectiveness of busulfan treatment as a chemical agent for birds' gonad sterilization was specified in two experiments. Busulfan (300 ng/egg) is injected into subgerminal cavity after preliminary egg incubation at 37,8 °C for 8–10 hr for the production of chick germ line chimeras. Before the injection of donor cells, for inactivation of busulfan action the eggs are incubated at 31–32 °C for 24 hr.

For sterilization of chick gonads in gonad transplantation experiments three-fold busulfan injection of 70 µg/egg every 24 hr of incubation or single injection of 250 µg/egg of busulfan into fresh laid eggs is used, which ensure 46,2 % of gonad sterilization.

М. Т. Тагіров, А. В. Артеменко, С. Н. Ткаченко, Л. В. Терещенко, А. В. Терещенко

ВИКОРИСТАННЯ БУСУЛЬФАНУ ДЛЯ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ГОНАД ПТИЦІ

Р е з ю м е

У двох експериментах уточнили ефективність використання бусульфану в якості хімічного агенту для стерилізації гонад птиці при проведенні біотехнологічних досліджень. Для отримання гермінативних химер птиці бусульфан (300 нг/яйце) ін'єкують у підзародкову порожнину після попередньої інкубації яєць протягом 8–10 год при 37,8 °С. Перед ін'єкцією донорських клітин для інактивації бусульфану яйця інкубують при 31–32 °С протягом 24 год.

Для стерилізації гонад курчат у дослідах з їх трансплантації використовують трьохкратне введення 70 мкг бусульфану в яйце через кожні 24 год інкубації або однократне введення 250 мкг бусульфану в свіжі яйця, що забезпечує стерильність гонад на рівні 46,2 % від контролю.

1. *Haddow A.* Myleran in chronic myeloid leukemia: chemical constitution and biological action / *Haddow A., Timmis G. T.* // *Lancet.* — 1953. — V. 1. — P. 207–208.
2. *Bishop J. B.* Toxicological review of busulfan (Myleran) / *Bishop J. B., Wasson J. S.* // *Mutation Research.* — 1986. — V. 168. — P. 15–45.
3. *Bollag W.* The effect of myleran on rat gonads / *Bollag W.* // *Experientia.* — 1953. — V. 9. — P. 268.

4. *Craig A. W.* Sensitivity of the spermatogenic process in the rat to radiomimetic drugs and X-rays / Craig A. W., Fox B. W., Jackson H. // *Nature*. — 1958. — V. 181. — P. 353–354.
5. *Jackson H.* Antifertility substances and their assessment in the male rodent / Jackson H., Fox B. W., Craig A. W. // *Journal of Reproduction and Fertility*. — 1961. — V. 2. — P. 447–465.
6. *Jiang F. X.* Behavior of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat / Jiang F. X. // *Anatomical Embryology*. — 1998. — V. 198. — P. 53–61.
7. *Hemsworth B. N.* Effect of 'busulfan' on the fetal gonad / Hemsworth B. N., Jackson H. // *Nature*. — 1962. — V. 195. — P. 816–817.
8. *Hemsworth B. N.* Effect of busulfan on the developing gonad of the male rat / Hemsworth B. N., Jackson H. // *Journal of Reproduction and Fertility*. — 1963. — V. 5. — P. 187–194.
9. *Hemsworth B. N.* Effect of busulfan on the developing ovary in the rat / Hemsworth B. N., Jackson H. // *Journal of Reproduction and Fertility*. — 1963. — V. 6. — P. 229–233.
10. *Merchant H.* Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells, An Ultrastructural Study / Merchant H. // *Developmental Biology*. — 1975. — V. 44. — P. 1–21.
11. *Brinster R. L.* Spermatogenesis following male germ cell transplantation. / Brinster R. L., Zimmermann W. Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1994. — V. 91. — P. 11298–11302.
12. *Kim J.* Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig / Kim J., Jung-Ha H., Lee H., Chung K // *Molecular Reproduction and Development*. — 1997. — V. 46. — P. 515–526.
13. *Ogawa T.* Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat / Ogawa T., Dobrinski I., Brinster R. L. // *Tissue & Cell*. — 1999. — V. 31. — P. 461–472.
14. *Reynaud G.* The effect of busulfan on the germ cell line of the quail embryo / Reynaud G. // *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* — 1981. — V. 70. — P. 251–258.
15. *Reynaud G.* Action du busulfan sur La lignee germinale de L'embryo de poulet / Reynaud G. // *Extrait Bull. Soc. Aool. France*. — 1977. — V. 102. — P. 417–429.
16. *Hallett J. S.* The effects of busulfan on gonadal differentiation and development in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) / Hallett J. S., Wentworth B. C. // *Poultry Science*. — 1991. — V. 70, № 7. — P. 1619–1621.
17. *Furuta H.* Proliferation of exogenously injected primordial germ cells (PGCs) into busulfan-treated chicken embryos / Furuta H., Fujihara N. // *Asian Journal of Andrology*. — 1999. — V. 1, № 4. — P. 187–190.
18. *Swartz W. J.* Response of early chick embryos to busulfan / Swartz W. J. // *Teratology*. — 1980. — V. 21. — P. 1–8.
19. *Aige-Gil V.* Sterilisation of avian embryos with busulphan / Aige-Gil V., Simkiss K. // *Research in Veterinary science*. — 1991. — V. 50, № 2. — P. 139–144.
20. *Addison I. E.* The effect of cysteine on the immuno-suppressive activity of busulfan, cyclophosphamide, and nitrogen mustard / Addison I. E., Berenbaum M. C. // *British Journal of Cancer*. — 1971. — V. 25, N 1. — P. 172–181.
21. *Vick L.* Germ-line chimaeras can produce both strains of fowl with high efficiency after partial sterilization / Vick L., Luke G., Simkiss K. // *Journal of Reproduction and Fertility*. — 1993. — V. 98, N 2. — P. 637–641.
22. *Bresler M.* Manipulations of germ-cell populations in the gonad of the fowl / Bresler M., Behnam J., Luke G., Simkiss K. // *British Poultry Science*. — 1994. — V. 35, N 2. — P. 241–247.
23. *Тагіров М. Т.* Вдосконалення методу реабілітації оперованих яєць : Українська конференція молодих учених та аспірантів з питань птахівництва : Тез. Доп / Тагіров М. Т., Терещенко О. В., Артеменко О. Б., Білецька Г. В. — Харків, 1992. — С. 4.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення ВРХ, д. б. н., професор Янович В. Г.