

УДК 636.3:576

Научная статья



Открытый доступ

DOI: 10.32634/0869-8155-2022-365-12-65-70

Л.А. Волкова,✉**Н.А. Волкова**

Федеральный исследовательский центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста,
Подольск, Дубровицы,
Российская Федерация

✉ ludavolkova@inbox.ru

Поступила в редакцию:

16.09.2022

Одобрена после рецензирования:

05.10.2022

Принята к публикации:

10.11.2022

Research article



Open access

DOI: 10.32634/0869-8155-2022-365-12-65-70

Ludmila A. Volkova,✉**Natalia A. Volkova**

Federal Research Center for Animal Husbandry
named after Academy Member L.K. Ernst,
Podolsk, Dubrovitsy, Russian Federation

✉ ludavolkova@inbox.ru

Received by the editorial office:

16.09.2022

Accepted in revised:

05.10.2022

Accepted for publication:

10.11.2022

Получение и характеристика культуры сперматогенных клеток самцов межвидовых гибридов домашних овец и архара

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Создание криобанков биологического материала является одним из ключевых методов сохранения и поддержания биоразнообразия генетических ресурсов животных. Широко используемым для сохранения в условиях криобанков биоматериалом являются зрелые половые клетки самцов – сперматозоиды. В качестве перспективной альтернативы рассматривается использование для данных целей стволовых клеток семенников – сперматогоний, что делает возможным отбор биоматериала от неполовозрелых животных с ценным генотипом. В статье представлены данные по получению культуры сперматогоний самцов межвидовых гибридов домашних овец с архаром.

Методы. Объектом исследований являлись сперматогенные клетки межвидовых гибридов овец романовской породы и архара. Материалом для получения культуры сперматогенных клеток служили семенники гибридных самцов. Были оптимизированы условия выделения и поддержания в культуре *in vitro* сперматогоний с использованием гистологических, цитологических и культуральных методов.

Результаты. Установлено, что на результативность получения культуры сперматогенных клеток, максимально обогащенной сперматогониями, влияет возраст самцов, от которых отбирают биоматериал, предварительная очистка сперматогоний от других типов сперматогенных и соматических клеток семенника, ростовая среда и тип фидерного слоя, используемые для культивирования сперматогоний. Показано, что оптимальным возрастом самцов для отбора биоматериала является возрастной период от рождения до 4 месяцев. В этот период клетки эпителиосперматогенного слоя семенных канальцев семенников гибридных самцов представлены в основном одним типом сперматогенных клеток – сперматогониями (92–100%). Установлено, что максимальная очистка сперматогоний от других типов клеток достигается посредством их разделения по адгезии. Высокая интенсивность роста и формирования колоний сперматогоний наблюдается при их культивировании на фидерном слое, сформированном первичной культурой собственных клеток Сертоли, а также клетками Сертоли барана. В данных условиях прикрепление сперматогоний к клеткам фидерного слоя отмечается на 1–2-й день культивирования, формирование колоний – на 6-й день культивирования.

Ключевые слова: Ovis, межвидовые гибриды, романовская порода, архар, сперматогонии, сперматогенные клетки, культура клеток

Для цитирования: Волкова Л.А., Волкова Н.А. Получение и характеристика культуры сперматогенных клеток самцов межвидовых гибридов домашних овец и архара. *Аграрная наука*. 2022; 365 (12): 65–70. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-365-12-65-70>

© Волкова Л.А., Волкова Н.А.

Obtaining and characterization of the spermatogenic cell culture of males from interspecific hybrids of domestic sheep and argali

ABSTRACT

Relevance. The creation of biological material cryobanks is one of the key methods for the conservation and maintenance of the biodiversity of animal genetic resources. The biomaterial widely used for preservation in cryobank conditions are mature germ cells of males – spermatozoa. As a promising alternative for these purposes is considered the use of testis stem cells – spermatogonia which makes it possible to select biomaterial from immature animals with a valuable genotype. The article presents data on obtaining a culture of spermatogonia of males of interspecific hybrids of domestic sheep with argali.

Methods. The object of research was spermatogenic cells of sheep's interspecific hybrids from the Romanov breed with argali. The testes of hybrid males served as a material for obtaining a spermatogenic cells culture. The conditions for isolating and maintaining spermatogonia in culture *in vitro* were optimized using histological, cytological, immunohistochemical and cultural methods.

Results. It has been established that the effectiveness of obtaining a spermatogenic cells culture, maximally enriched with spermatogonia, are affected by the age of the males from which the biomaterial is taken, the preliminary purification of spermatogonia from other types of spermatogenic and somatic testicular cells, the growth medium and the type of feeder layer used for the cultivation of spermatogonia. It is shown that the optimal age of males for the selection of biomaterial is the age period from birth to 4 months. During this period, the cells of the epitheliospermatogenic layer in the seminiferous tubules of the testes from hybrid males are mainly represented by one type of spermatogenic cells – spermatogonia (92–100%). The maximum purification of spermatogonia from other types of cells is achieved by separating them according to adhesion. High intensity of growth and formation of spermatogonia colonies is observed when they are cultivated on the feeder layer formed by the primary culture of own Sertoli cells, as well as Sertoli cells from another rams. Under these conditions, the attachment of spermatogonia to the cells of the feeder layer is noted on the 1st – 2nd day of cultivation, the formation of colonies – on the 6th day of cultivation.

Key words: Ovis, interspecific hybrids, Romanov breed, argali, spermatogonia, spermatogenic cells, cell culture

For citation: Volkova L.A., Volkova N.A. Obtaining and characterization of the spermatogenic cell culture of males from interspecific hybrids of domestic sheep and argali. *Agrarian science*. 2022; 365 (12): 65–70. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-365-12-65-70> (In Russian).

© Volkova L.A., Volkova N.A.

Введение / Introduction

Сохранение биоразнообразия генофонда сельскохозяйственных животных является одной из приоритетных задач [1]. Эффективным решением данной проблемы служит консервация генетических ресурсов животных, которая может быть осуществлена двумя путями: посредством разведения и поддержания генофондных стад или создания криобанков биологического материала [2–4]. Последний подход находит все большее применение ввиду более низких материальных затрат, так как при равном финансовом обеспечении позволяет сохранять большее количество генетического материала по сравнению с разведением и содержанием животных в условиях питомников, зоопарков, племенных предприятий и т.д. Кроме того, создание криобанков биологического материала делает возможным его сохранение в течение длительного времени без привязки к ареалу обитания конкретных видов.

Основным биоматериалом, используемым для сохранения в условиях криобанков, являются половые клетки самцов. В настоящее время для большинства видов сельскохозяйственных животных разработаны и оптимизированы с учетом видовых особенностей методические подходы по получению и криоконсервации семени самцов, что находит широкое практическое применение в животноводстве. Вместе с тем при разведении и получении животных с ценным генотипом не всегда возможно получение семени от самцов. В ряде случаев возникает необходимость отбора биоматериала от неполовозрелых животных. В качестве альтернативы могут быть использованы половые клетки самцов на более ранних стадиях их развития – сперматогонии, сперматоциты, сперматиды. Наибольший интерес представляет использование сперматогоний, которые относят к стволовым клеткам семенников. Популяция данного типа сперматогенных клеток немногочисленна. Они располагаются на базальной мемbrane 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 удобным биологическим материалом для криоконсервации в условиях криобанков в рамках сохранения генетических ресурсов и ценных генотипов животных.

Технология получения химерных особей с использованием сперматогоний самцов предусматривает получение культуры донорских клеток и их трансплантацию в семенники самцов-реципиентов [5]. Используемые в данном случае самцы-реципиенты рассматриваются в качестве своеобразных «биореакторов», в семенниках которых происходит выработка эндогенных спермиев, несущих донорскую генетическую информацию. Ключевым моментом, обуславливающим эффективность данной технологии, является получение культуры сперматогенных клеток. На сегодняшний день выделены и охарактеризованы сперматогонии лабораторных животных – мышей [6] и хомячков [7], некоторых видов сельскохозяйственных животных – свиней [8, 9], крупного рогатого скота [10], коз [11], сельскохозяйственной птицы – кур [12, 13], а также рыб [14].

Целью данной работы явилось получение и характеристика сперматогенных клеток самцов межвидовых гибридов овец романовской породы и архара.

Материалы и методы / Materials and methods

Объектом исследований являлись сперматогенные клетки самцов межвидовых гибридов овец романовской

породы и архара. Материалом для выделения культуры сперматогенных клеток служили семенники, полученные при кастрации или убое самцов в возрасте 2, 3, 4 и 5 месяцев.

На первом этапе были проведены гистологические исследования семенников гибридных самцов. Был изучен состав сперматогенных клеток (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды) эпителиосперматогенного слоя семенных канальцев семенников с целью определения возраста самцов, оптимального для отбора биоматериала. Образцы ткани семенника фиксировали в растворе Буэна, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Готовили гистологические срезы толщиной 5–6 мкм и окрашивали гематоксилин-эозином. Идентификацию типов сперматогенных клеток проводили по их морфологии. От каждого самца было проанализировано не менее 100 семенных канальцев. Анализ гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа «Ni-U» («Nikon», Япония), оснащенного пакетом программ «NIS-Elements» («Nikon», Япония) для обработки и анализа изображений.

На втором этапе была получена и охарактеризована культура сперматогенных клеток семенников гибридных самцов. Дезагрегацию ткани семенника проводили посредством ее последовательной механической и ферментативной обработок. Семенники обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом, декапсулировали и промывали в физиологическом растворе с высоким содержанием антибиотика – антимикотика («Invitrogen», США). Ткань семенника измельчали с помощью ножниц и инкубировали последовательно в растворах 0,1%-ной коллагеназы («Invitrogen», США) и 0,25%-ного трипсина («Invitrogen», США) при 37 °C. Морфологическую оценку свежевыделенной популяции сперматогенных клеток проводили визуально под фазово-контрастным микроскопом («Nikon», Япония).

Культивирование сперматогенных клеток осуществляли на фидерных слоях и чашках Петри, обработанных 0,2%-ным раствором желатина. В качестве фидерного слоя использовали первичные фибробласты и первичные клетки Сертоли барана, первичные фибробласты и первичные клетки Сертоли гибридных самцов. Для приготовления фидерных слоев клетки после достижения 80% монослоя обрабатывали раствором митомицина С («Sigma», США). Концентрацию данного препарата и продолжительность обработки фидерных клеток подбирали эмпирически.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «Microsoft Excel». Для определения средних (M) и стандартных ошибок (m) использовали метод описательной статистики. Для сравнения средних между группами использовали t -критерий Стьюдента. Полученные данные представлены с доверительным коэффициентом 0,95.

Результаты / Results and discussion

Гистологическая структура паренхиматозной ткани семенников самцов межвидовых гибридов овец романовской породы и архара была представлена системой извитых семенных канальцев. На поперечном срезе семенные канальцы характеризовались наличием собственной оболочки и эпителиосперматогенного слоя. Эпителиосперматогенный слой был образован поддерживающими клетками Сертоли и многочисленной популяцией сперматогенных клеток разных типов (сперматогонии, сперматоциты). Состав клеток эпители-

осперматогенного слоя семенных канальцев изменялся в зависимости от возраста самцов. В возрасте 2 и 3 месяцев в эпителиосперматогенном слое идентифицировались только 2 типа клеток – клетки Сертоли и сперматогонии. Сперматогонии располагались на базальной мемbrane семенного канальца, клетки Сертоли – как на базальной мембране, так и в толще эпителиосперматогенного слоя вблизи базальной мембранны (рис. 1A–B).

В возрасте 4 месяцев наряду с клетками Сертоли и сперматогониями в семенных канальцах выявлялись

единичные сперматоциты, которые располагались над сперматогониями (рис. 1C). К 5-месячному возрасту доля сперматоцитов в общем числе сперматогенных клеток значительно увеличивалась. В данном возрасте сперматогонии располагались плотным слоем на базальной мембране. Над сперматогониями выявлялись 1–2 слоя сперматоцитов. Внутри семенных канальцев формировался просвет (рис. 1D).

Таким образом, проведенные гистологические исследования показали, что у самцов межвидовых гибридов домашних овец и архара в возрасте 2–3 месяцев сперматогенные клетки семенных канальцев семенников были представлены сперматогониями (100%). В более позднем возрасте доля сперматогоний от общего числа сперматогенных клеток снижалась. В возрасте 4 месяцев данный показатель составил 92%, в возрасте 5 месяцев – 54% (рис. 2). Исходя из этого, в дальнейших исследованиях для получения культуры сперматогенных клеток, максимально обогащенной сперматогониями, использовали семенники гибридных самцов в возрасте 2 и 3 месяцев.

При дезагрегации ткани семенника посредством ее механической обработки визуализировались небольшие кусочки ткани размером 1–2 мм. Дальнейшая их ферментативная обработка способствовала получению клеточной супензии, представленной преимущественно обособленными клетками. Встречалось также небольшое количество конгламератов клеток.

Полученная клеточная супензия была представлена сперматогенными клетками (сперматогониями) и многочисленной популяцией соматических клеток, в частности фибробластами, клетками Сертоли и интерстициальными клетками. Для очистки сперматогоний от других типов клеток проводили их разделение по способности к адгезии. С этой целью полученную после механической и ферментативной обработки ткани семенника супензию клеток высевали в культуральные фляконы и инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 37 °C в течение 4 часов. По окончании культивирования супернатант с непрекрепившимися клетками переносили в новый культуральный флякон и продолжали инкубировать в течение 22–24 часов, после чего вновь переносили супернатант с непрекрепившимися клетками на чашки Петри, обработанные желатином. Через 36–48 часов сперматогонии

Рис. 1. Гистологическая структура семенных канальцев семенников межвидовых гибридов овец романовской породы и архара: А – в возрасте 2 месяцев, В – в возрасте 3 месяцев, С – в возрасте 4 месяцев, Д – в возрасте 5 месяцев. 1 – клетки Сертоли, 2 – сперматогонии, 3 – сперматоциты, 4 – эпителиосперматогенный слой семенного канальца, 5 – просвет семенного канальца. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение х400

Fig. 1. Histological structure of the seminiferous tubules of the testes in interspecific hybrids from sheep of the Romanov breed with argali: A – at the age of 2 months, B – at the age of 3 months, C – at the age of 4 months, D – at the age of 5 months. 1 – Sertoli cells, 2 – spermatogonia, 3 – spermatocytes, 4 – epitheliospermatogenic layer of the seminiferous tubule, 5 – lumen of the seminiferous tubule. Hematoxylin-eosin stain. Magnification x400

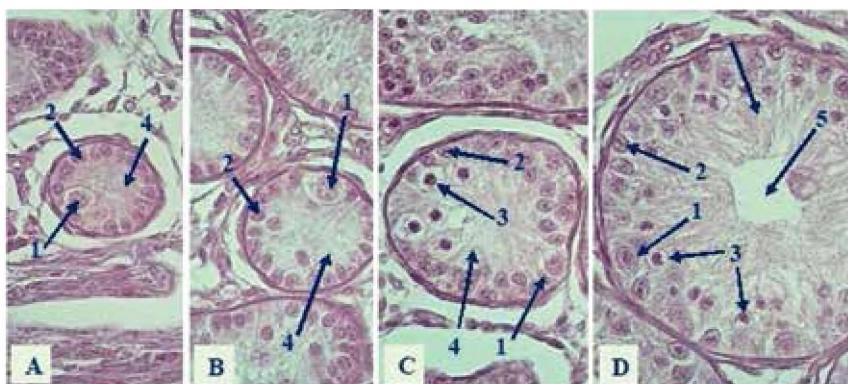


Рис. 2. Состав сперматогенных клеток эпителиосперматогенного слоя семенных канальцев семенников межвидовых гибридов овец романовской породы и архара. По оси X – значение признака в процентном выражении, %; по оси Y – возраст самцов, мес.

Fig. 2. The composition of spermatogenic cells of the epitheliospermatogenic layer in the seminiferous tubules of the testes in interspecific hybrids from sheep of the Romanov breed with argali. Along the X axis – the value of the feature in percentage terms, %; along the Y axis – the age of males, months



прикреплялись к поверхности чашек Петри. Сперматогонии имели шарообразную форму. Их размер варьировал от 17 до 26 мкм. На 10-е сутки культивирования формировались колонии сперматогоний, постепенно увеличившиеся в размерах к 12-м суткам культивирования (рис. 3А).

Следует отметить, что используемые на начальном этапе культивирования сперматогенных клеток культуральные флаconы после удаления супернатанта заливали ростовой средой для наращивания прикрепившихся соматических клеток. Состав данной популяции клеток варьировал в зависимости от продолжительности культивирования первоначально полученной клеточной суспензии ткани семенника. Клеточная популяция, образованная в результате наращивания соматических клеток, прикрепившихся к поверхности культуральных флаconов, в первые 4 часа культивирования была представлена в основном фибробластами. Данные клетки имели веретенообразную форму. Наращивание клеток, прикрепившихся к поверхности культуральных флаconов, в последующие 22–24 часа культивирования позволило получить популяцию клеток Сертоли, характеризующихся эпителиоподобной формой. Полученные первичные культуры фибробластов и клеток Сертоли были использованы в качестве фидерных клеток для культивирования сперматогоний.

Было изучено влияние типа фидерного слоя на скорость образования колоний сперматогоний (рис. 3В). Наряду с первичными клетками фибробластов и клеток Сертоли межвидовых гибридов в качестве фидерных слоев использовали первичную культуру фибробластов и клеток Сертоли барана.

Использование разных типов клеток в качестве фидерных слоев предусматривает их предварительную обработку. При этом важно оптимизировать концентрацию митомицина С для эффективной блокировки роста клеток фидерного слоя. Была проведена серия экспериментов по обработке первичных культур фибробластов и клеток Сертоли. С этой целью клетки высевали в культуральные флаconы, по достижении 80% монослоя их обрабатывали

Рис. 3. Культура сперматогенных клеток семенника межвидовых гибридов овец романовской породы и архала: А – колония клеток на поверхности чашки Петри, обработанной желатином (без фидерного слоя); В – колонии клеток на фидерном слое первичных клеток Сертоли гибридных самцов. Колонии сперматогоний показаны стрелкой. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение х 400

Fig. 3. Culture of spermatogenic cells in the testes in interspecific hybrids from sheep of the Romanov breed with argali: A – a colony of cells on the surface of a Petri dish treated with gelatin (without a feeder layer); B – cell colonies on the feeder layer of primary Sertoli cells of hybrid males. An arrow shows the spermatogonia colonies. Phase contrast microscopy. Magnification x 400

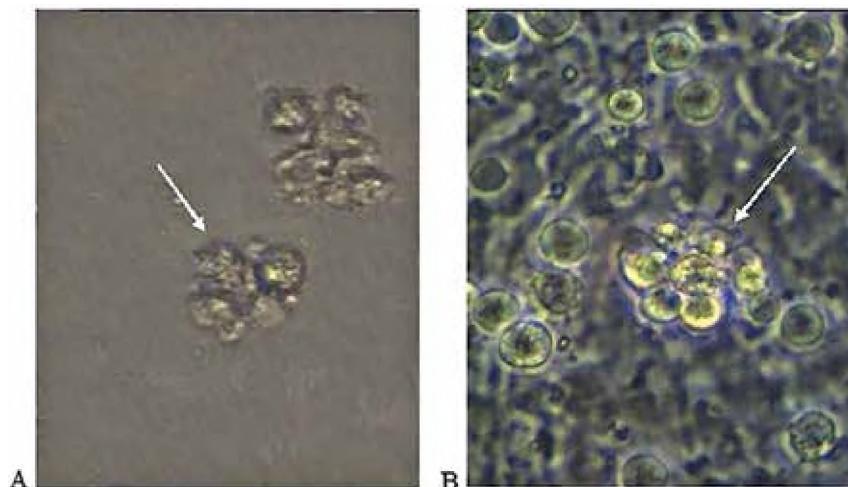
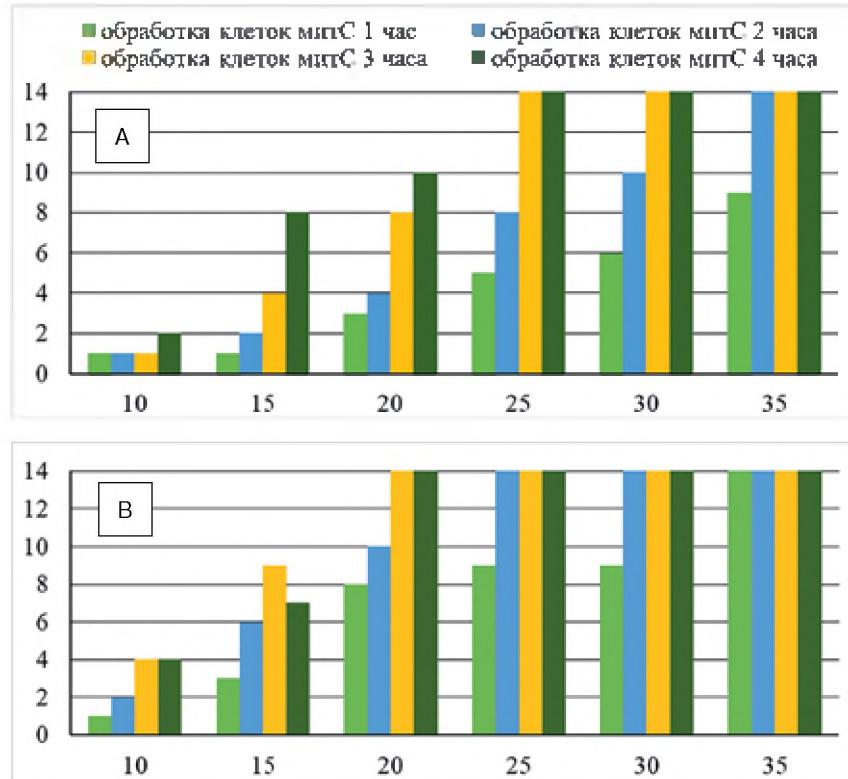


Рис. 4. Эффективность использования митомицина С для блокировки роста первичной культуры соматических клеток семенника самцов межвидовых гибридов овец романовской породы и архала: А – первичная культура клеток Сертоли; В – первичная культура фибробластов семенника. По оси Х – доза митомицина С, мкг/мл; по оси Y – продолжительность формирования полного монослоя фидерных клеток после их обработки митомицином С, день культивирования

Fig. 4. The effectiveness of using mitomycin C to block the growth of the primary culture of somatic cells from the males testes of interspecific hybrids from sheep of the Romanov breed with argali: A – primary culture of Sertoli cells; B – primary culture of testicular fibroblasts. Along the X axis – the dose of mitomycin C, µg/ml; along the Y axis – the duration of the formation a complete monolayer of feeder cells after their treatment with mitomycin C, the day of cultivation



митомицином С в различных концентрациях. Результативность обработки клеток митомицином С оценивали по интенсивности их роста и достижения монослоя в течение 14 дней культивирования (рис. 4). Было установлено, что оптимальными условиями для блокировки роста первичных клеток Сертоли барана являются их обработка митомицином С в концентрации 20 мкг/мл в течение 2 часов. Для эффективной блокировки роста первичных фибробластов ткани семенника барана необходимо использование митомицина С в концентрации 25 мкг/мл в течение 3 часов.

Использование в качестве фидерного слоя первичных фибробластов и клеток Сертоли способствовало сокращению периода формирования колоний сперматогоний по сравнению с их культивированием на чашках Петри, обработанных желатином (табл. 1).

Оптимальные результаты были получены при культивировании сперматогоний на первичных клетках Сертоли: формирование колоний клеток наблюдалось преимущественно на 6-е сутки культивирования. При этом не было установлено видовых различий при использовании культур клеток Сертоли барана и клеток Сертоли межвидовых гибридов домашних овец и архара. С учетом полученных результатов в качестве оптимального фидерного слоя для культивирования сперматогоний следует рассматривать первичные клетки Сертоли.

Выводы / Conclusion

Оптимизированы условия выделения и поддержания культуры сперматогоний межвидовых гибридов овец романовской породы и архара в рамках создания криобанков биологического материала. Установлено, что эффективность выделения сперматогенных клеток, максимально обогащенных сперматогониями, зависит от возраста самцов – доноров биоматериала. На основании гистологических исследований семен-

ников разновозрастных гибридных самцов показано, что для выделения культуры сперматогоний оптимальным является использование семенников, полученных от самцов в возрасте не старше 4 месяцев. В данный возрастной период у гибридных самцов сперматогенные клетки семенников представлены в основном одним типом клеток – сперматогониями. В более позднем возрасте в семенных канальцах наряду со сперматогониями идентифицируются другие типы сперматогенных клеток.

Показана эффективность очистки сперматогоний от других типов клеток посредством их разделения по адгезии. Установлено, что высокая интенсивность роста и формирования колоний сперматогоний наблюдается при их культивировании на фидерном слое, сформированном первичной культурой собственных клеток Сертоли, а также клетками Сертоли барана. В данных условиях прикрепление сперматогоний к клеткам фидерного слоя отмечается на 1–2-й день культивирования, формирование колоний – на 6-й день культивирования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 121052600350-9).

Все авторы несут ответственность за свою работу и представленные данные.

Все авторы внесли равный вклад в эту научную работу.

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

FUNDING

This work was supported financially by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (subject no. 121052600350-9).

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors have made an equal contribution to this scientific work. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

The authors declare no conflict of interest.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Boettcher P.J., Akin O. Current arrangements for national and regional conservation of animal genetic resources. *Animal Genetic Resources*. 2010; (47): 73–83. doi: 10.1017/S2078633610000949
- Сингина Г.Н., Волкова Н.А., Багиров В.А., Зиновьева Н.А. Криобанки соматических клеток как перспективный способ сохранения генетических ресурсов животных (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2014; 6: 3–14. doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.3eng

REFERENCES

- Boettcher P.J., Akin O. Current arrangements for national and regional conservation of animal genetic resources. *Animal Genetic Resources*. 2010; (47): 73–83. doi: 10.1017/S2078633610000949
- Singina G.N., Volkova N.A., Bagirov V.A., Zinovieva N.A. Cryobanking of somatic cells in conservation of animal genetic resources: prospects and successes (review). *Agricultural Biology*. 2014; 6: 3–14. doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.3eng

3. Silversides F.G., Purdy P.H., Blackburn H.D. Comparative costs of programmes to conserve chicken genetic variation based on maintaining living populations or storing cryopreserved material. *Br Poult Sci.* 2012; 53(5). P.599-607 375.
doi: 10.1080/00071668.2012.727383
4. Mara L., Casu S., Carta A., Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci.* 2013; 138(1–2): 25–38.
doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.006
5. Zheng Y., Zhang Y., Qu R., He Y., Tian X., Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: Progress and prospects. *Reproduction.* 2014; 147(3): 65–74.
doi: 10.1530/REP-13-0466
6. Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K., Miki H., Ogura A., Toyokuni S., Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 2003; 69(2): 612–616. doi: 10.1095/biolreprod.103.017012
7. Kanatsu-Shinohara M., Muneto T., Lee J., Takenaka M., Chuma S., Nakatsuji N., Horiuchi T., Shinohara T. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol. Reprod.* 2008; 78(4): 611–617. doi: 10.1095/biolreprod.107.065615
8. Wang X., Chen T., Zhang Ya., Li B., Xu Q., Song C. Isolation and culture of pig spermatogonial stem cells and their in vitro differentiation into neuron-like cells and adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(11): 26333–26346. doi: 10.3390/ijms161125958
9. Park M.H., Park J.E., Kim M.S., Lee K.Y., Park H.J., Yun J.I., Choi J.H., Lee E., Lee S.T. Development of a high-yield technique to isolate spermatogonial stem cells from porcine testes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014; 31(8): 983–991. doi: 10.1007/s10815-014-0271-7
10. Oatley J.M. 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.* 2010; 67: 133–143.
11. Pramod R.K., Mitra A. In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on sertoli cell feeder layer in goat (*Capra hircus*). *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014; 31(8): 993–1001.
doi: 10.1007/s10815-014-0277-1
12. Sisakhtnezhad S., Bahrami A.R., Matin M.M., Dehghani H., Momeni-Moghaddam M., Boozarpour S., Farshchian M., Dastpak M. The molecular signature and spermatogenesis potential of newborn chicken spermatogonial stem cells in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2015; 51: 415–425. doi: 10.1007/s11626-014-9843-1
13. Li B., Wang X.Y., Tian Z., Xiao X.J., Xu Q., Wei C.X., Sun H.C., Chen G.H. Directional differentiation of chicken spermatogonial stem cells in vitro. *Cyotherapy.* 2010; 12(3): 326–331.
doi: 10.3109/14653240903518155
14. Lacerda S.M., Costa G.M., de Franca L.R. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014; 207: 56–65. doi: 10.1016/j.ygcn.2014.06.018
3. Silversides F.G., Purdy P.H., Blackburn H.D. Comparative costs of programmes to conserve chicken genetic variation based on maintaining living populations or storing cryopreserved material. *Br Poult Sci.* 2012; 53(5). 599-607 375.
doi: 10.1080/00071668.2012.727383
4. Mara L., Casu S., Carta A., Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci.* 2013; 138(1–2): 25–38.
doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.006
5. Zheng Y., Zhang Y., Qu R., He Y., Tian X., Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: Progress and prospects. *Reproduction.* 2014; 147(3): 65–74.
doi: 10.1530/REP-13-0466
6. Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K., Miki H., Ogura A., Toyokuni S., Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 2003; 69(2): 612–616. doi: 10.1095/biolreprod.103.017012
7. Kanatsu-Shinohara M., Muneto T., Lee J., Takenaka M., Chuma S., Nakatsuji N., Horiuchi T., Shinohara T. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol. Reprod.* 2008; 78(4): 611–617. doi: 10.1095/biolreprod.107.065615
8. Wang X., Chen T., Zhang Ya., Li B., Xu Q., Song C. Isolation and culture of pig spermatogonial stem cells and their in vitro differentiation into neuron-like cells and adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(11): 26333–26346. doi: 10.3390/ijms161125958
9. Park M.H., Park J.E., Kim M.S., Lee K.Y., Park H.J., Yun J.I., Choi J.H., Lee E., Lee S.T. Development of a high-yield technique to isolate spermatogonial stem cells from porcine testes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014; 31(8): 983–991.
doi: 10.1007/s10815-014-0271-7
10. Oatley J.M. 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.* 2010; 67: 133–143.
11. Pramod R.K., Mitra A. In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on sertoli cell feeder layer in goat (*Capra hircus*). *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014; 31(8): 993–1001.
doi: 10.1007/s10815-014-0277-1
12. Sisakhtnezhad S., Bahrami A.R., Matin M.M., Dehghani H., Momeni-Moghaddam M., Boozarpour S., Farshchian M., Dastpak M. The molecular signature and spermatogenesis potential of newborn chicken spermatogonial stem cells in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2015; 51: 415–425. doi: 10.1007/s11626-014-9843-1
13. Li B., Wang X.Y., Tian Z., Xiao X.J., Xu Q., Wei C.X., Sun H.C., Chen G.H. Directional differentiation of chicken spermatogonial stem cells in vitro. *Cyotherapy.* 2010; 12(3): 326–331.
doi: 10.3109/14653240903518155
14. Lacerda S.M., Costa G.M., de Franca L.R. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014; 207: 56–65. doi: 10.1016/j.ygcn.2014.06.018

ОБ АВТОРАХ:

Людмила Александровна Волкова,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Федеральный исследовательский центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, г.о. Подольск,
п. Дубровицы, 60, Московская обл., 142132,
Российская Федерация
E-mail: ludavolkova@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9407-3686>

Наталья Александровна Волкова,
доктор биологических наук, главный научный сотрудник,
руководитель лаборатории
Федеральный исследовательский центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, г.о. Подольск,
п. Дубровицы, 60, Московская обл., 142132,
Российская Федерация
E-mail: natavolkova@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7191-3550>

ABOUT THE AUTHORS:

Ludmila Alexandrovna Volkova,
Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher
L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry,
60, Dubrovitsy, Moscow region, 142132, Russian Federation,
E-mail: ludavolkova@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9407-3686>

Natalia Alexandrovna Volkova,
Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher,
Head of the Laboratory
L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry,
60, Dubrovitsy, Moscow region, 142132, Russian Federation
E-mail: natavolkova@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7191-3550>