

Оценка эффективности технологии криоконсервирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих

Л.В. ГОРБУНОВ, А.С. САЛИНА

Институт животноводства УААН, г. Харьков

К настоящему времени разработано множество способов криоконсервирования различных типов половых клеток и эмбрионов животных. Однако оценка эффективности отдельной технологии в целом и её составляющих этапов затруднена влиянием комплекса неучтённых факторов.

Общепринятый способ оценки выбранной технологии производится при помощи абсолютного показателя – сохранность биоматериала, который вычисляется по изменению количества биообъекта заданного качества до и после замораживания. Очевидно, что на оценку сохранности деконсервированного биообъекта после культивирования оказывают влияние качество биообъекта и особенности выбранных технологий замораживания и культивирования. При таком способе оценки анализ заданной технологии криоконсервирования подобен работе с “черным ящиком”. Методы парных сравнений – “контроль-опыт” [7], применяемые в одном эксперименте, не дают возможности анализировать результаты, полученные в разное время и тем более при использовании разных способов криоконсервирования. Для выполнения многофакторного исследования необходим переход к относительным показателям оценки изменения жизнеспособности исследуемого биообъекта.

Цель работы – разработка способа оценки эффективности существующих технологий криоконсервирования и составляющих их этапов на основе учета относительных показателей изменения жизнеспособности половых клеток и эмбрионов млекопитающих.

Материалы и методы

Для оценки жизнеспособности разнокачественного биообъекта на различных этапах выполнения технологии криоконсервирования применяли следующие формулы [2]:

$$V_j = \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^k H_i \cdot n_{ij} \right) \cdot 100\% ; \quad V_{ij} = H_i \frac{n_{ij}}{n_{ic}} \cdot 100\% ;$$

$$N = \sum_{i=1}^k n_{ic} ,$$

где V_j – общая жизнеспособность биообъекта на j -м этапе криоконсервирования; V_{ij} – жизне-

Адрес для корреспонденции: Горбунов Л.В., Институт животноводства УААН, пос. Кулинич, Харьковский район ; e-mail: cryo@animal.kharkov.ua

способность биообъекта на j -м этапе криоконсервирования i -го качества; N – начальное общее количество биообъекта; n_{ic} – начальное количество биообъекта i -го качества; n_{ij} – количество биообъекта i -го качества на j -м этапе криоконсервирования; k – число различных качественных состояний биообъекта; H_i – вероятность развития нативного биообъекта i -го качества в условиях *in vivo* или *in vitro*.

Для оценки эффективности различных этапов проведения криоконсервирования с учетом исключения разнокачественности биообъекта применяли следующие формулы [2]:

$$W_{j\gamma} = \left(\frac{V_j}{V_\gamma} \right) \cdot 100\% ;$$

$$W_{ij\lambda} = \frac{n_{ij}}{n_{i\gamma}} \cdot \frac{n_{ic\gamma}}{n_{icj}} \cdot 100\% ,$$

где $W_{j\gamma}$ – выживаемость, относительный показатель изменения жизнеспособности биообъекта на j -м этапе криоконсервирования к γ -му этапу; $W_{ij\lambda}$ – выживаемость биообъекта на j -м этапе криоконсервирования i -го качества; $n_{i\gamma}$ – количество биообъекта i -го качества на γ -м этапе криоконсервирования.

Если оценка биообъекта производилась качественным методом с последующим применением соответствующего статистического анализа (метод альтернативного варьирования) [7], то количество групп с разным качеством, $k=2$. При этом биообъект имеет пригодное качество для последующего применения ($i=1$) или непригодное ($i=2$), то есть вероятность дальнейшего развития существует или нет: $H_i \{1; 0\}$. В этом случае численные значения жизнеспособности и выживаемости биообъекта выражаются через показатель сохранности:

$$V_j = S_j = \left(\frac{n_j}{N} \right) \cdot 100\% ;$$

$$W_{j\gamma} = \left(\frac{S_j}{S_\gamma} \right) \cdot 100\% ,$$

где S_j – сохранность объекта на j -м этапе криоконсервирования, n_j – количество биообъекта пригодного качества на j -м этапе криоконсервирования.

Оценка среднеквадратического отклонения для качественного метода определялась при помощи формулы [7]:

$$\sigma_j = \sqrt{M_j(100 - M_j)},$$

$$M_j \{S_j, W_j\},$$

где M_j – вычисленные параметры сохранности или выживаемости биообъекта на различных технологических этапах; s_j – их среднеквадратическое отклонение.

Для количественного метода оценки жизнеспособности биообъекта $k > 2$. Например, $k=5$ при пятибалльной системе оценки жизнеспособности эмбриона крупного рогатого скота: для отличного качества ($i=5$), хорошего ($i=4$), удовлетворительного ($i=3$), неудовлетворительного ($i=2$) и для дегенерированного биообъекта ($i=1$). В таком случае вероятность развития в культуре нативного объекта i -го качества в условиях *in vitro* принимает значения $H_i \{0,95; 0,85; 0,70; 0,30; 0,05\}$ [5] или *in vivo* – $H_i \{0,53; 0,40; 0,22\}$ [6].

Оценка среднеквадратического отклонения для количественного метода статистического анализа определялась при помощи формулы:

$$\sigma_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (M_j - M_{ji})^2}{N - 1}},$$

$$M_j \{V_j, W_j\}.$$

Минимальное количество измерений, обеспечивающее достоверный результат как в одной отдельно взятой выборке n_0 , так и в двух сравниваемых n_Δ , вычисляли при помощи следующих формул:

$$n_0 = (t \cdot C_v / \rho)^2;$$

$$n_\Delta = (t \cdot C_v / \alpha)^2;$$

$$C_v = \frac{\sigma}{M} \cdot 100\%;$$

$$\alpha = \frac{\Delta M}{M} \cdot 100\%,$$

где t – критерий Стьюдента; C_v – коэффициент вариации выборки(ок); ρ – уровень надежности (в нашем случае $\rho=5\%$); α – относительный показатель расхождения средних величин сравниваемых выборок; ΔM – минимальная разность величин сравниваемых выборок, обеспечивающая достоверный результат, $M_j \{S_j, V_j, W_j\}$.

Вычисление показателей выживаемости биообъекта на различных этапах реализации криоконсервирования проводилось с применением специально разработанных прикладных программ. Полученные результаты в виде “профилей” выполнялись при помощи программы “Excel 97” по 5÷6 показателям изменения жизнеспособности биообъекта.

Результаты и обсуждение

Технология криоконсервирования половых клеток и эмбрионов млекопитающих состоит из ряда этапов: насыщение и выведение криопротектора, замораживание и оттаивание, развитие в условиях *in vitro* или *in vivo* нативного и деконсервированного биообъекта.

Для удобства обозначения исследуемого этапа выбранной технологии криоконсервирования вычисленные параметры сохранности, жизнеспособности или выживаемости биообъекта M_j на различных j -м или g -м технологических этапах криоконсервирования имеют разные индексы $j, \gamma \{n, k, d, dk\}$: $j=n$ – соответствует начальной жизнеспособности биообъекта, $j=k$ – нативному биообъекту после культивирования, $j=d$ – после деконсервирования, $i=dk$ – после культивирования деконсервированного биообъекта.

Соответствующие критерии оценки изменения жизнеспособности биообъекта представлены в следующих формулах:

$$W_k = \frac{V_k}{V_n} \cdot 100\%;$$

$$W_d = \frac{V_d}{V_n} \cdot 100\%;$$

$$W_{dk} = \frac{V_{dk}}{V_d} \cdot 100\%,$$

где W_k – выживаемость нативного биообъекта в культуре относительно к свежеполученному. Переход к относительным величинам нейтрализует влияние биологической разнокачественности биообъекта и численно отражает эффективность технологии культивирования; W_d – выживаемость деконсервированного биообъекта относительно к свежеполученному. Характеризует эффективность технологии криоконсервирования без учета дальнейшего развития биообъекта в культуре; W_{dk} – выживаемость деконсервированного биообъекта в культуре относительно к деконсервированному до постановки на культуру. Определяет совместную эффективность технологий криоконсервирования и культивирования с учетом влияния разнокачественности биообъекта.

При оценке показателя выживаемости возникают дополнительные варианты определения эффективности не только последовательных звеньев технологической цепи, когда $\gamma=j-1$, но и разобщенных, когда $\gamma \neq j-1$,

$$W_m = \frac{V_{dk}}{V_k} \cdot 100\% ;$$

$$W_o = \frac{W_{dk}}{W_k} = \frac{V_{dk}}{V_d} \cdot \frac{V_n}{V_k} \cdot 100\% ,$$

где W_m – выживаемость культивированного биообъекта после деконсервирования относительно к нативному культивированному объекту. Характеризует эффективность технологии криоконсервирования при одинаковых условиях проведения культивирования нативного и деконсервированного биообъекта; W_o – общая относительная выживаемость, оцененная как выживаемость деконсервированного объекта, развитого в

культуре, к выживаемости нативного в культуре. Определяет в целом эффективность технологии криоконсервирования при нейтрализации факторов, обусловленных разнокачественностью биообъекта и условиями его культивирования.

Проверить работоспособность предложенных формул для оценки эффективности различных технологий и их составляющих этапов можно на примерах проведенных ранее собственных исследований [3, 4] и по данным [8-17]. Вначале рассмотрим особенности различных технологий замораживания ооцитов млекопитающих и их составляющих этапов на основе представленных “профилей” (рис. 1).

Полученные значения как по абсолютным, так и относительным показателям для всех приведенных случаев имеют различные значения, что обусловлено особенностями используемых технологий криоконсервирования и культивирования. Для численного сравнения полученных значений распределим по возрастающей показа-

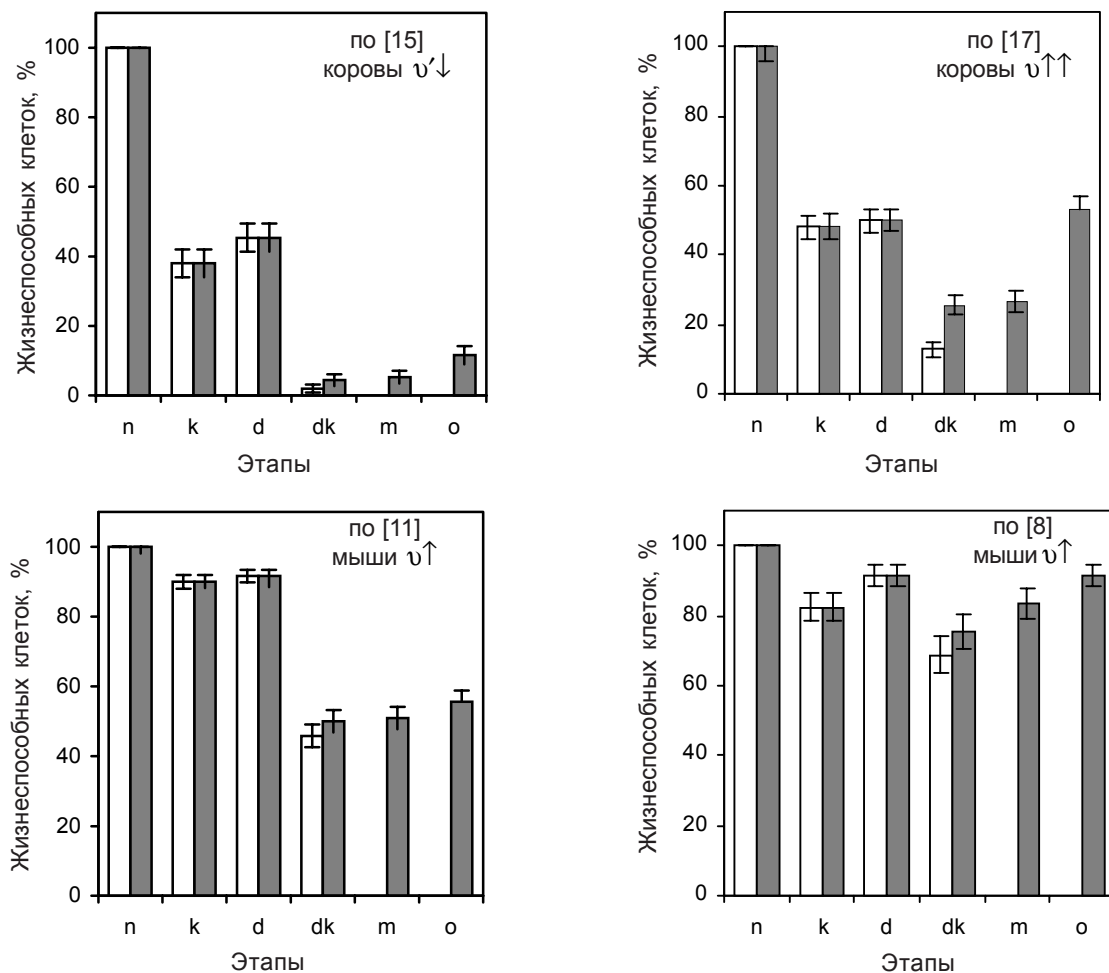


Рис 1. Абсолютные S (□) и относительные W (■) показатели жизнеспособности ооцитов млекопитающих, рассчитанные при помощи качественного метода статистического анализа на различных этапах выполнения криоконсервирования: $v\uparrow\uparrow$ – сверхвысокая скорость замораживания ($v \geq 5 \cdot 10^3$ °C/мин); $v\uparrow$ – высокая скорость замораживания ($v = 2 \cdot 10^3$ °C/мин); $v\downarrow$ – медленная скорость замораживания ($v = 0,3$ °C/мин); $v'\downarrow$ – медленная скорость замораживания ($v = 0,06 \div 10$ °C/мин)

тели сохранности культивированных ооцитов после деконсервирования (табл. 1).

Из представленных значений в табл. 1 видно, что разница между величинами среднеквадратического отклонения s варьирует как для абсолютных, так и относительных показателей от 14,0 до 50,0% в зависимости от выбранного показателя. При переходе к относительным величинам снижается количество биообъекта, необходимого для получения достоверного результата как в одной выборке, так и двух сравниваемых в 1,7÷4,8 раза в зависимости от выбранного параметра.

При анализе различных технологий криоконсервирования эмбрионов млекопитающих, изученных при помощи качественного метода статистического анализа, наблюдается закономерность подобная ооцитам (рис. 2). Представленные способы криоконсервирования имеют различные “профили”, что обусловлено комплексным влиянием различных факторов. Переход от абсолютных показателей оценки жизнеспособности эмбрионов к относительным уменьшает количество используемого биообъекта в 2÷13,1 раза при условии получения достоверного результата (табл. 2).

При переходе от качественного метода оценки жизнеспособности эмбрионов млекопитающих к количественному чувствительность предложенных критериев оценки различных технологических этапов значительно возрастает (рис. 3, табл. 3). Анализ табл. 3 показывает, что достоверность различия результатов, оцененная по критерию Стьюдента (t_d) между абсолютными и относительными показателями сравниваемых технологий, практически не имеет достоверности различия (с уровнем надежности $P=0,95$), тогда как по критерию Фишера (F) почти все сравниваемые технологии имеют достоверное различие результатов. Этот факт свидетельствует о повышении чувствительности предложенного способа за счет нейтрализации вариации разнокачественности биообъекта и факторов, определяющих инди-

Таблица 1. Значения показателей сохранности S и выживаемости W деконсервированных ооцитов млекопитающих, оцененные при помощи качественного метода статистического анализа на различных этапах выполнения криоконсервирования

Показатели эффективности технологии, %											Литературный источник выбранной технологии
Sdk		Wdk			Wm			Wo			
M	s	M	s	k	M	s	k	M	s	k	
2,0	14,0	4,4	20,5	2,3	5,3	22,3	2,7	11,6	32,0	6,4	[15], (коровы, $v\downarrow$)
10,8	31,0	13,0	33,6	1,2	28,4	45,1	3,3	34,3	47,5	4,3	[9], (коровы, $v\downarrow$)
12,8	33,4	25,6	43,7	2,4	26,6	44,2	2,5	53,4	49,9	7,8	[17], (коровы, $v\uparrow\uparrow$)
45,8	49,8	50,0	50,0	1,2	50,9	50,0	1,2	55,6	49,7	1,5	[11], (мыши, $v\uparrow$)
68,8	46,4	75,3	43,1	1,4	83,3	37,3	2,3	91,3	28,2	4,8	[8], (мыши, $v\uparrow$)
69,7	46,0	80,7	39,5	1,8	97,3	16,2	16	113	37,7	3,9	[14], (коровы, $v\uparrow\uparrow$)
\bar{k}			1,7			4,6			4,8		

Примечания: $k=n_s/n_w$ – отношение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный результат как в одной отдельно взятой выборке (n_s), так и в двух сравниваемых (n_w) для сохранности (n_s) и выживаемости (n_w).

видуальные особенности выбранной технологии культивирования клеток.

Следует отметить, что чувствительность метода при сравнении разных способов замораживания, оцениваемая при помощи параметра s , повышается по мере нейтрализации факторов, обусловленных разнокачественностью ооцитов и эмбрионов при переходе от абсолютных показателей жизнеспособности S_{dk} к относительным W_{dk} . Исключение влияния технологии культивирования биообъекта на оценку технологии криоконсервирования ещё в большей степени повышает чувствительность критерия W_m и принимает максимальное значение при оценке общей относительной выживаемости W_o . Количественный учет разнокачественности биообъекта дает возможность значимо увеличить чувствительность метода посредством уменьшения дисперсии и тем самым понизить количество биообъекта необходимого для получения достоверного результата в 9,8÷131 раза.

Как видно из представленной табл. 4, при количественном методе оценки эмбрионов величина среднеквадратического отклонения s увеличивается при переходе от оценки нативного (n) биообъекта к культивированному и деконсервированному (k, d, dk) для абсолютных и относительных показателей (S, V, W) и уменьшается только для относительных показателей по мере нейтрализации вариации факторов разно-

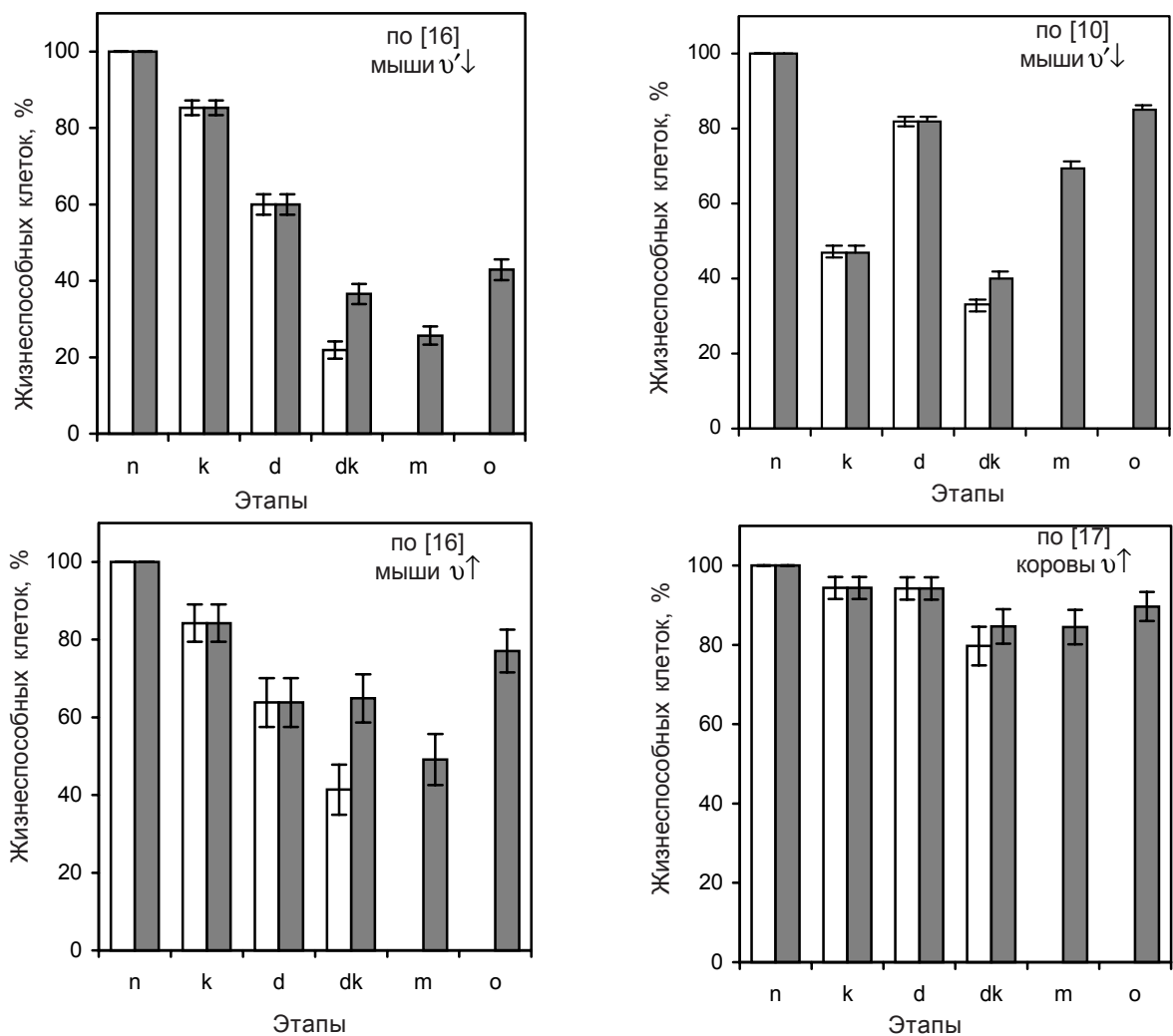


Рис. 2. Абсолютные S (□) и относительные W (■) показатели жизнеспособности эмбрионов млекопитающих на различных этапах выполнения криоконсервирования, рассчитанные при помощи качественного метода статистического анализа (условные обозначения как на рис. 1).

Таблица 2. Значения показателей сохранности S и выживаемости W деконсервированных эмбрионов млекопитающих на различных этапах выполнения криоконсервирования, вычисленные при помощи качественного метода статистического анализа

Показатели эффективности технологии, %											Литературный источник выбранной технологии
Sdk		Wdk			Wm			Wo			
21,9	41,4	36,6	48,2	2,1	25,7	43,7	1,2	42,9	49,5	2,7	
32,8	47,0	40,2	49,0	1,4	69,6	46,0	4,7	85,3	35,4	11,9	[13], (мышь, v'↓)
51,1	50,0	69,7	46,0	2,2	71,9	45,0	2,4	98,0	14,0	47,1	[10], (мышь, v'↓)
54,2	49,8	70,3	45,7	2,0	70,3	45,7	2,0	91,2	28,4	8,7	[17], (мышь, v↑)
68,0	46,6	86,1	34,6	2,9	73,3	44,2	1,3	92,8	25,8	6,1	[11], (мышь, v↑↑)
79,7	40,2	84,6	36,1	1,4	84,5	36,2	1,4	89,7	30,4	2,2	[8], (мышь, v↑)
	46,0	80,7	39,5	1,8	97,3	16,2	16	113	37,7	3,9	[14], (коровы, v↑↑)
\bar{k}			2,0			2,2			13,1		

Примечания: $k = n_s/n_w$ – отношение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный результат как в одной отдельно взятой выборке (n_o), так и в двух сравниваемых (n_Δ) для сохранности (n_s) и выживаемости (n_w).

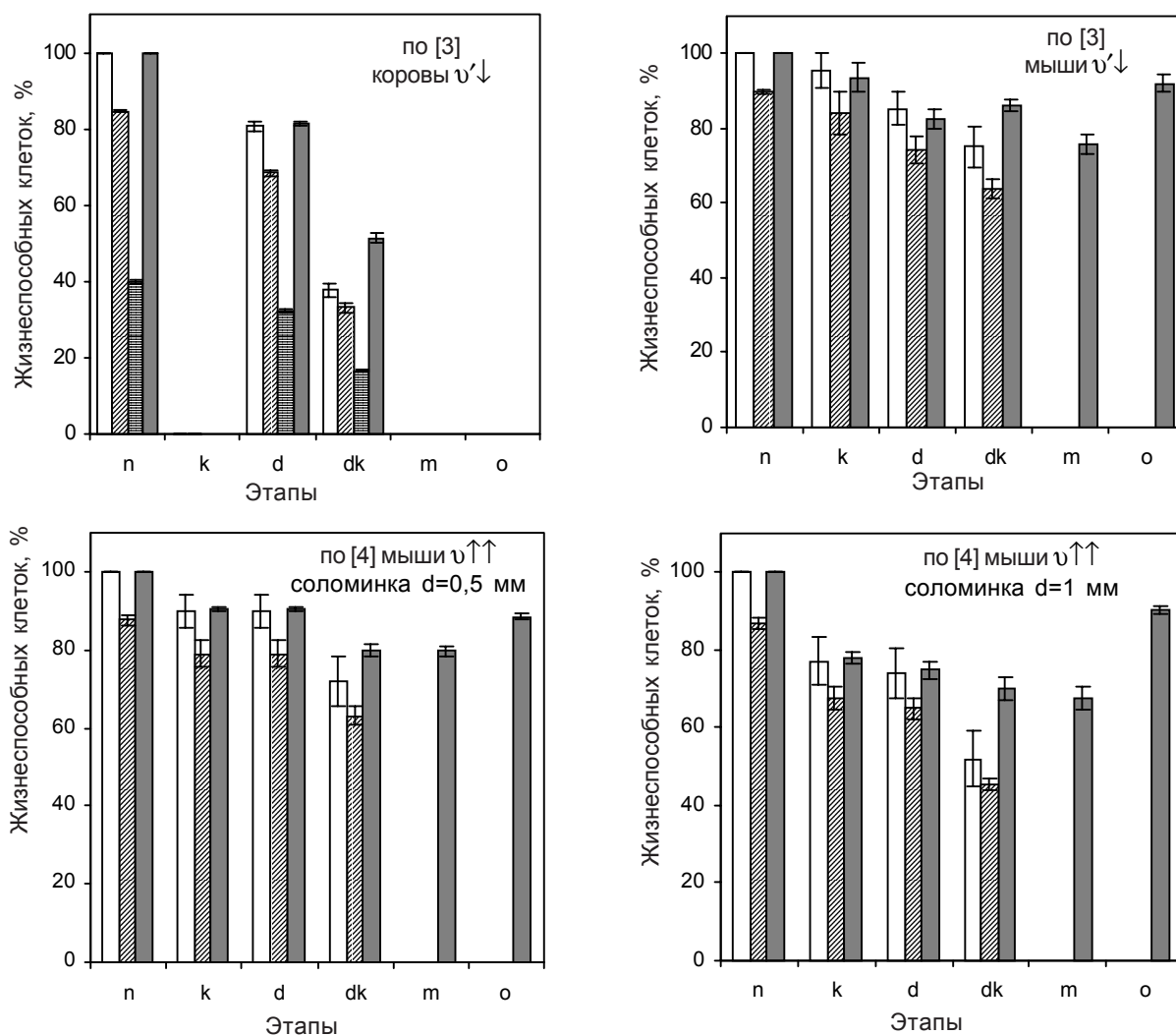


Рис. 3. Абсолютные S (□), V (▨ – *in vitro*, ▤ – *in vivo*) и относительные W (■) показатели жизнеспособности эмбрионов млекопитающих, рассчитанные при помощи количественного метода статистического анализа для различных этапов выполнения криоконсервирования. (условные обозначения как на рис. 1).

Таблица 3. Значения показателей сохранности S и выживаемости W деконсервированных эмбрионов млекопитающих, вычисленные для различных этапов криоконсервирования при помощи количественного метода статистического анализа

Показатели эффективности технологии, %											Литературный источник выбранной технологии
Sdk		Wdk			Wm			Wo			
37,6	48,4	51,3	40,0	2,7	–	–	–	–	–	–	
51,1	50,0	70,0	21,4	10,2	72,4	17,8	15,8	98,6	4,9	384	[3], (коровы, v'↓)
52,0	50,0	70,3	21,0	10,4	67,5	20,4	10,1	90,2	7,6	130	[4], (мыши, v↑)
75,0	43,3	86,1	11,6	18,5	75,8	16,4	7,2	92,0	20,7	6,6	[4], (мыши, v↑↑)
85,5	35,2	90,6	6,4	34,5	91,3	22,9	2,7	98,9	22,3	3,4	[3], (мыши, v'↓, соломинка)
	40,2	84,6	36,1	1,4	84,5	36,2	1,4	89,7	30,4	2,2	[3], (мыши, v'↓, пробирка)
\bar{k}			15,3			9,0				131	

Примечания: $k = n_s / n_w$ – отношение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный результат как в одной отдельно взятой выборке (n_o), так и в двух сравниваемых (n_d) для сохранности (n_s) и выживаемости (n_w).

Таблица 4. Показатели среднеквадратического отклонения σ различных критериев оценки технологии криоконсервирования (S, V, W) и их составляющих этапов (n, d, dk)

Метод статистического анализа	Биообъект	Усредненные величины $\bar{\sigma}, \%$								
		S		V			W			
		d	dk	n	d	dk	d	dk	m	o
Количественный	Эмбрионы	37,5	45,4	8,2	20,9	14,5	17,3	20,5	19,4	13,9

Таблица 5. Численный анализ повышения чувствительности предложенного способа оценки эффективности, существующих технологий криоконсервирования при помощи критерия Фишера

Метод статистического анализа	Биообъект	Показатели эффективности оценки технологии, %			
		$\bar{F}(F_{\min}+F_{\max}), F = \sigma_s^2/\sigma_w^2$			
		$\bar{F}\{Sdk\}$	$\bar{F}\{Wdk\}$	$\bar{F}\{Wm\}$	$\bar{F}\{Wo\}$
Качественный	Ооциты	1	1,3 (1+1,7)	1,6 (1+2,1)	1,8 (1+2,2)
	Эмбрионы	1	1,1 (1+1,2)	1,1 (1+1,2)	2,3 (1,4+3,3)
Количественный	Эмбрионы	1	11,4(1,5+30,2)	5,8(2,4+7,9)	38,3(2,5+103)

качественности биообъекта (m) и технологических отличий культивирования (o).

Учет оценки эффективности предложенного способа технологии криоконсервации производился при помощи критерия Фишера – F [7]. Сопоставление дисперсий σ_s^2 , рассчитанных по общепринятому абсолютному показателю – сохранности S_{dk} и предложенному относительному σ_w^2 – выживаемости W_o , даёт значимое численное отличие в 1,8÷38,3 раза (с уровнем надежности $P \geq 0,99$). Усредненные величины \bar{F} и их предельные отклонения ($F_{\min} \div F_{\max}$), вычисленные для рассмотренных выше способов замораживания ооцитов и эмбрионов млекопитающих, представлены в табл. 5.

Полученные результаты дают подобную закономерность не только при анализе существующих технологий криоконсервирования ооцитов и эмбрионов, но и для суспензий клеток. Создаваемое в настоящее время программное обеспечение апробируется на спермиях животных при значительно большем количестве критериев, отражающих относительные показатели изменения жизнеспособности биообъекта на имеющихся

технологических этапах реализации процесса криоконсервирования.

Таким образом, переход от абсолютных показателей оценки жизнеспособности биообъекта к относительным даёт возможность установить численное различие технологических этапов криоконсервирования и тем самым определить уровень их эффективности. При оценке технологических этапов с использованием относительных величин повышается чувствительность предложенного способа к разнице сравниваемых показателей в несколько раз по отношению к результатам, полученным по абсолютным показателям. Тем самым уменьшается в несколько раз количество биообъекта, необходимого для получения достоверного результата при использовании качественного метода оценки жизнеспособности биообъекта и в десятки раз – для количественного.

Снижение случайной погрешности оценки жизнеспособности биообъекта приемлемо при соответствующем понижении систематической погрешности, что реализуется посредством применения методов его видеофиксации с

последующей оцифровкой изображения на ЭВМ. Наличие банка видеоизображений, а также специализированных программ оценки показателей жизнеспособности биообъекта различного вида, стадии развития и качества повышает эффективность оптимизации выбранной технологии в целом и различных составляющих этапов благодаря построению её “профиля”. Переход к относительным показателям позволяет провести многофакторное исследование посредством комплексного применения методов корреляционного, регрессионного и дисперсионного анализов. Полагаем, что полученные результаты послужат основой для разработки программного обеспечения, позволяющего оптимизировать решение криобиологических задач посредством применения метода “крутого восхождения”, что даст возможность в одном эксперименте изменять несколько параметров.

Выводы

Переход к относительным показателям оценки изменения жизнеспособности ооцитов и эмбрионов млекопитающих повышает эффективность анализа выбранной технологии криоконсервации и её составляющих этапов оцененной по 5÷6 критериям в 1,1÷2,3 раза при использовании качественного и в 11÷38 раз количественного методов статистического анализа.

Литература

1. Горбунов Л.В. Определение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный научный результат // *Агроэкологічний журнал*.– Київ.– 2002.– Вип. 1.– С. 69-71.
2. Горбунов Л.В. Оценка жизнеспособности эмбрионов и эффективности технологии их криоконсервирования // *Пробл. криобиологии*.– 2003.– №4.– С. 35-40.
3. Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов.– Киев, 2005.– 325 с.
4. Горбунов Л.В., Морозова И.А., Безуглый Н.Д. Определение оптимальной концентрации криопротектора, обеспечивающей высокую сохранность эмбрионов мыши, замороженных при сверхвысоких скоростях теплообмена // *Пробл. криобиологии*.– 2000.– №4.– С. 8-14.
5. Кауффельд П., Тамм И., Шихов И.Я. и др. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота: Руководство для работы по пересадке эмбрионов.–М.: Агропромиздат, 1990.– 56 с.
6. Кот В.С. Вплив тривалості та температури зберігання до і після заморожування на приживленність ембріонів великої рогатої худоби: Автореф. дис... канд. с-г. наук.– Харків, 1996.– 25 с.
7. Лакин Б.Ф. Биометрия.– М.: Высшая школа, 1990.– 254 с.
8. de la Pena E.C., Takahashi Y., Atabay A.C., Nagano M. Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol-*raffinose* solution: effects of preexposure to ethylene glycol or *raffinose* on oocyte viability // *Cryobiology*.– 2001.– Vol. 42.– P. 103-111.
9. Fuku E., Kojima T., Shioya Y. et al. In vitro fertilization and development of frozen/thawed bovine oocytes // *Cryobiology*.– 1992.– Vol. 29.– P.485-492
10. Uechi H. Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development // *Hum. Reprod.*– 1999.– Vol. 14, №11.– P. 2827-2832.
11. Nowshari M.A. Effect of cryoprotectant concentration, equilibration time and thawing procedure on survival and development of rapid frozen-thawed mature mouse oocytes // *Theriogenology*.– 1994.– Vol. 42. – P. 1193-1204.
12. Rayos A.A. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose // *Theriogenology*.– 1992.– Vol. 37.– P. 595-603.
13. Emiliani S. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propandiol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts // *Hum. Reprod.*– 2000.– Vol. 15, N4.– P. 905-910.
14. Hochi S. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro -matured bovine oocytes // *Cryobiology*.– 2001.– Vol. 41.– P. 69-73.
15. Suzuki T., Boediono A., Takagi M. et al. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method *in vitro* // *Cryobiology*.– 1996.– Vol.33.– P. 515-523.
16. Tada N. et al. A simple and rapid method for cryopreservation of mouse 2-cell embryos by vitrification: beneficial effect of sucrose and *raffinose* on their cryosurvival rate // *Theriogenology*.– 1993.– Vol. 40.– P. 333-344.
17. Holm V.P., Callesen H. Open pulled straw [OPS] vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos // *Mol. Reprod. Dev.*– 1998.– Vol. 51.– P. 53-58.