Сравнение различных сочетаний криопротекторов и методов оттаивания при криоконсервации эмбрионов мышей и крыс

Т.Н. Игонина, Е.Ю. Брусенцев, И.Н. Рожкова, В.А. Напримеров, С.Я. Амстиславский

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Выбор криопротектора, способа оттаивания эмбрионов влияет на эффективность процесса криоконсервации. Способ замораживания и оттаивания эмбрионов, нацеленный на сохранение бластомеров, был подобран на мышах линии ICR. В работе получали эмбрионы мышей линии ICR, а также крыс линий GC и OXYS на стадии дробящихся зародышей на третий день после спаривания и производили их замораживание по стандартной программе в пластиковых соломинах. На мышах ICR сравнивали влияние проникающих (этиленгликоль, глицерин) и не проникающих (сахароза) криопротекторов в их комбинации на выживание эмбрионов после замораживания. В этом же эксперименте сравнивали более быстрый (10 с на водяной бане при 37 °C) и более медленный (40 с при комнатной температуре, затем 40 с на водяной бане при 30 °C) способы оттаивания зародышей. Жизнеспособность эмбрионов мышей и крыс после процедур криоконсервации оценивалась путем их культивирования *in vitro*. Наши данные, полученные на мышах, свидетельствуют о том, что «медленное» оттаивание лучше подходит для выживания эмбрионов, чем «быстрое» оттаивание; добавление сахарозы к основному криопротектору (этиленгликолю или глицерину) улучшает показатели развития эмбрионов *in vitro* после оттаивания, особенно когда криопротектором является глицерин. Именно этот способ замораживания – оттаивания эмбрионов (глицерин с сахарозой в качестве криопротекторов, «медленное» оттаивание) был использован при работе с крысами линий GC и OXYS, при этом 68–83,3 % всех зародышей успешно пережили криоконсервацию, из них 64,7–66,6 % – успешно развивались в культуре.

Ключевые слова: мыши ICR; крысы GC; OXYS; криоконсервация эмбрионов; этиленгликоль; глицерин; сахароза.

A comparison of different cryoprotectant solutions and thawing methods for cryopreservation of embryos of mice and rats

T.N. Igonina, E.Yu. Brusentsev, I.N. Rozhkova, V.A. Naprimerov, S.Ya. Amstislavsky

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The proper choice of cryoprotectant and thawing method affects cryopreservation efficiency. A freezing-thawing method for sparing embryonic cells was evaluated in experiments with ICR mice. Cleavage-stage embryos of ICR mice, GC rats, and OXYS rats were collected on Day 3 of pregnancy and frozen in plastic straws according to a standard protocol. Permeating (ethylene glycol and glycerol) and nonpermeating (sucrose) cryoprotectants and their combinations were compared during the freezing of ICR mouse embryos. With these mice, two thawing methods were compared: rapid (water bath, 10 s, 37 °C) and slow (40 s, room temperature; 40 s, 30 °C). Embryo viability in mice and rats was evaluated by their *in vitro* culturing after thawing. Our data on mice indicate that slow thawing is more suitable for sparing the integrity of embryonic cells; moreover, supplementation of the main cryoprotectant (either ethylene glycol or glycerol) with sucrose is beneficial for subsequent *in vitro* culture, especially in the case of glycerol. This freezing-thawing protocol (with glycerol and sucrose as cryoprotectant agents and slow thawing) was applied to rats of the GC and OXYS strains; the survival rate after cryopreservation was 68–83.3 %, and the rate of *in vitro* development was 64.7–66.6 %.

Key words: ICR mice; GC rats; OXYS rats; embryo cryopreservation; ethylene glycol; glycerol; sucrose.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Игонина Т.Н., Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Сравнение различных сочетаний криопротекторов и методов оттаивания при криоконсервации эмбрионов мышей и крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):378-382. DOI 10.18699/VJ15.047

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Igonina T.N., Brusentsev E.Yu., Rozhkova I.N., Naprimerov V.A., Amstislavsky S.Y. A comparison of different cryoprotectant solutions and thawing methods for cryopreservation of embryos of mice and rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):378-382. DOI 10.18699/VJ15.047

DOI 10.18699/VJ15.047
УДК 573.7:575:591.3
Поступила в редакцию 23.06.2015 г.
Принята к публикации 10.07.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Число линий мышей и крыс за последние десятилетия резко возросло (Abbott, 2004; Lasar et al., 2005). Из-за ограниченности ресурсов и повышенных требований к качеству животных для современных биомедицинских исследований работы по редеривации и криоконсервации эмбрионов мышей и крыс находятся в центре внимания современных генетических центров (Rall et al., 2000; Брусенцев и др., 2011; Амстиславский и др., 2013).

Целостность прозрачной оболочки – *zona pellucida* (ZP) – является важным элементом редеривации (Брусенцев и др., 2011; Рожкова и др., 2012; Амстиславский и др., 2013). ZP должна быть неповрежденной, так как считается, что она выступает в качестве эффективного естественного барьера против вирусных и бактериальных инфекций (Van Soom et al., 2010). Программа редеривации часто основана на сочетании трансплантации и криоконсервации эмбрионов (Morrell, 1999; Амстиславский и др., 2013).

Целью работы был поиск способов замораживания и оттаивания, направленных на максимальную целостность эмбрионов мышей и крыс. В частности, было произведено: 1) сравнение воздействия глицерина (Гли) и этиленгликоля (ЭГ) при замораживании эмбрионов, а также эффектов добавления сахарозы к этим основным криопротекторам; 2) сравнение влияния двух способов оттаивания («быстрого» и «медленного») на жизнеспособность эмбрионов мыши *in vitro;* 3) применение наиболее эффективного протокола по отношению к эмбрионам крыс линий GC и OXYS.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В качестве доноров эмбрионов использовали половозрелых самок мышей линии ICR (возраст 8–10 нед, $n = 54$), а также половозрелых самок крыс линий GC (возраст 10–14 нед, $n = 8$) и OXYS (возраст 10–14 нед, $n = 4$). Для получения эмбрионов самок мышей и крыс спаривали с самцами тех же линий того же возраста. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Все эксперименты на животных были одобрены комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол № 5 от 13.05.2011) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

Получение преимплантационных эмбрионов мышей и крыс

Мыши. У самок мышей линии ICR вызывали суперовуляцию по стандартной схеме, описанной ранее (Амстиславский, 2006). Каждую суперовулирующую самку затем ссаживали на ночь с самцом линии ICR. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности.

Крысы. Самок крыс линий GC и OXYS в состоянии эструса, определенного путем исследования влагалищных мазков, ссаживали на ночь с самцами той же линии. День обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке считали первым днем беременности.

Самок мышей и крыс подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков на третий день беременности. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой EMCARE Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, США), как описано ранее (Амстиславский и др., 2013). Эмбрионы подсчитывали и оценивали с использованием стереомикроскопа Leica S8 APO с увеличением до × 80 (Leica Microsystems, Германия). Качество эмбрионов оценивали с использованием хорошо известных критериев: стадия эмбрионального развития и целостность ZP (Rulicke, Autenried, 1995; Van Soom et al., 2010); число жизнеспособных клеток (Emiliani et al., 2000). Некачественные эмбрионы отбраковывали, эмбрионы хорошего качества промывали в трех каплях той же среды и либо замораживали, как описано ниже, либо использовали свежими как контроль.

Замораживание эмбрионов

В экспериментах с эмбрионами мышей (линии ICR) использовали четыре комбинации криопротекторов: 1,5 М этиленгликоль (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) с добавлением сахарозы или без добавления; 10 % v/v глицерин (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) с добавлением 0,1 М сахарозы (Sigma, США) или без добавления.

В экспериментах с эмбрионами крыс (линии GC и OXYS) применяли лишь один вариант замораживания из описанных выше, а именно: глицерин (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) с добавлением 0,1 М сахарозы (Sigma, США).

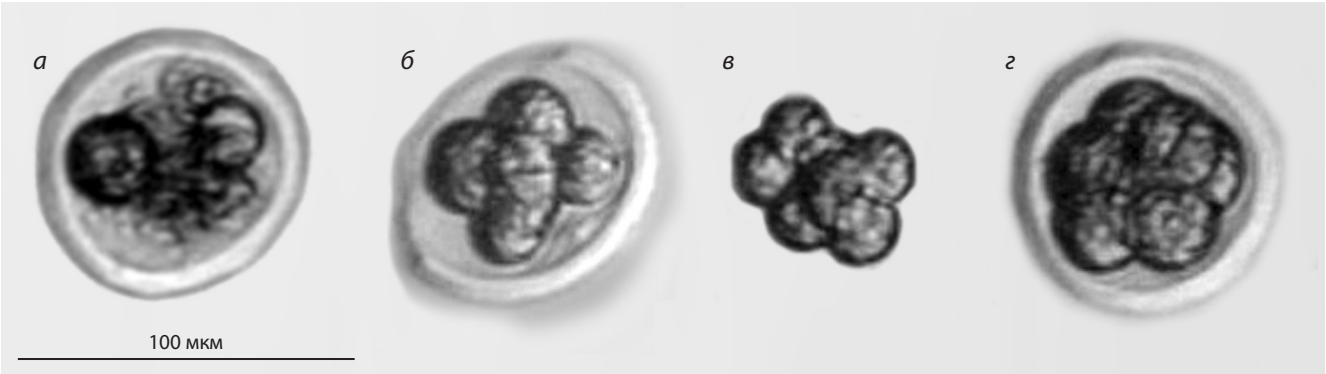
После добавления в раствор соответствующей криопротективной смеси 10–15 эмбрионов помещали в пластиковые соломины вместимостью 0,25 мл (*Cryo Bio System*, Франция), каждая из которых была заполнена тремя порциями криопротектора, разделенными двумя воздушными пузырьками, центральная часть содержала эмбрионы.

Соломины с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL 8800 (CryoLogic, Австралия), охлаждали в соответствии со следующей программой: от 18 °C до –7 °C со скоростью –1 °C/мин; 10 мин при –7 °C; сидинг через 1 мин; от –7 °C до –35 °C со скоростью –0,3 °C/мин; 10 мин при –35 °C – и погружали в жидкий азот при этой температуре.

Оттаивание эмбрионов

По отношению к эмбрионам мышей применяли два способа оттаивания – «медленный» и «быстрый». При «медленном» оттаивании соломины доставали из резервуара с жидким азотом, выдерживали в течение 40 с при комнатной температуре, а затем помещали на 40 с в водяную баню при 30,0 °C. Ранее было показано, что скорость оттаивания с использованием этого метода составляет около 300 °C/мин (Renard, Babinet, 1984). Этот метод был применен к эмбрионам, замороженным с использованием каждого из четырех вариантов криопротекции (этиленгликоль, глицерин, этиленгликоль и сахароза, глицерин и сахароза).

При быстром способе оттаивания соломины выдерживали в течение 10 с на водяной бане при 37 °C. Ранее было продемонстрировано, что скорость оттаивания с ис-



Преимплантационные эмбрионы мышей ICR после замораживания с глицерином (10 %) и оттаивания в течение 10 с при 37 °С.
а – мертвый; *б* – с поврежденной ZP; *в* – полностью лишенный ZP; *г* – успешно переживший криоконсервацию. Масштабная линейка = 100 мкм.

пользованием этого метода составляет около 2 500 °С/мин (Renard, Babinet, 1984). Этот метод был применен лишь по отношению к эмбрионам, замороженным с этиленгликолем или глицерином (без сахарозы).

Для размораживания эмбрионов крыс, предварительно замороженных в присутствии комбинации криопротекторов (глицерина и сахарозы), применяли лишь первый способ.

Отмывание и культивирование эмбрионов

После оттаивания всю жидкость, содержащуюся в соломине, выдавливали на 35 мм чашки Петри (Corning, США). Криопротектор удаляли при помощи промывания размороженных эмбрионов; методы отмывания варьировали в зависимости от того, какой был использован криопротектор.

Эмбрионы, замороженные с этиленгликолем, после их размораживания промывали три раза в свежих каплях (90 мкл, по 6–7 мин в каждой капле) среды Holding Solution (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) при 37 °С.

Для размораживания эмбрионов, замороженных с глицерином, использовали специальную систему, предлагаемую фирмой «Thawing System» (EMCARE, ICPBio Reproduction, США). Эта система представляет собой три раствора с понижающейся концентрацией глицерина. Перенос эмбрионов из одной капли этих растворов в другую осуществляли при 37 °С.

После замораживания эмбрионов с комбинацией криопротекторов (этиленгликоль и сахароза или глицерин и сахароза) содержимое соломины выдавливали на чашку Петри и выдерживали в этой смешанной капле в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем эмбрионы переносили в свежую каплю среды Holding Solution (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) и инкубировали в течение 15 мин при 37 °С.

После удаления криопротектора, как описано выше, эмбрионы, независимо от их качества, последовательно промывали в десяти каплях среды Holding Solution (200 мкл EMCARE, ICPBio Reproduction, США) со сменой стеклянных капилляров для стерильного переноса между каплями и оценивали визуально при помощи микроскопа M205 FA (Leica Microsystems, ×230). Эмбрионы, у которых было разрушено более 25 % бластомеров и/или имелись нарушения прозрачной оболочки, отбраковывали, остальные ставили на культивирование *in vitro*. Эмбрионы мышей переносили в 50 мкл среды M16 (Sigma, США), а эмбрионы крыс – в 50 мкл среды R1ECM (Amstislavsky et al., 2015) и культивировали в течение 48 ч под минеральным маслом (Sigma, США) при 37 °С в 5 %-й CO_2 и влажности 90 % в CO_2-инкубаторе BINDER 150-UL (Германия). Свежие эмбрионы хорошего качества извлекали из мышей-доноров и осуществляли процедуры с ними, как описано выше, но без замораживания – оттаивания; эмбрионы, не подвергавшиеся криоконсервации, использовали в качестве контроля. Жизнеспособность эмбрионов оценивали по их развитию *in vitro*.

Статистический анализ

Все результаты, в том числе процент развивающихся в культуре эмбрионов, представлены в виде Mean ± S.E.M. Результаты воздействия на эмбрионы процедур криоконсервации оценивали по проценту развивающихся в культуре *in vitro* эмбрионов после их оттаивания посредством дисперсионного анализа (ANOVA) и post-hoc сравнений по тесту Ньюмена – Кейлса, а также *t* – критерию Стьюдента. В качестве факторов были взяты: основной криопротектор (этиленгликоль / глицерин), способ оттаивания («медленный» / «быстрый»), добавление сахарозы (присутствие / отсутствие). Результаты при $p < 0{,}05$ считали статистически значимыми. Данные были проанализированы с использованием стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc).

Результаты

После оттаивания эмбрионов мышей при помощи световой микроскопии выявлялись следующие типичные нарушения: наличие в эмбрионе разрушенных бластомеров (рисунок, *а*), повреждения прозрачной оболочки (рисунок, *б*), полное отсутствие прозрачной оболочки (рисунок, *в*). Успешно пережившими криоконсервацию мы считали лишь те эмбрионы, у которых такие повреждения отсутствовали (рисунок, *г*).

Влияние факторов «основной криопротектор» (этиленгликоль / глицерин), «режим оттаивания» («медленное» /

Развитие *in vitro* (M ± SEM) замороженно-оттаянных эмбрионов мышей линии ICR

Группы	Число испытаний (общее число свежих/оттаянных эмбрионов)	Число свежих/ оттаянных эмбрионов	Число бластоцист	Развитие, %
Свежие эмбрионы (контроль)	3 (21)	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	100
Этиленгиколь, «быстрое» оттаивание	5 (80)	16,0 ± 4,0	11,2 ± 2,6	71,2 ± 6,1*
Этиленгликоль, «медленное» оттаивание	2 (28)	14,0 ± 1,0	10,0 ± 2,0	71,0 ± 9,0*
Этиленгликоль и сахароза, «медленное» оттаивание	3 (20)	6,7 ± 0,3	6,0 ± 0,6	90,5 ± 9,5
Глицерин, «быстрое» оттаивание	3 (38)	12,7 ± 1,5	3,3 ± 0,9	25,3 ± 3,9#
Глицерин, «медленное» оттаивание	15 (273)	18,2 ± 2,3	14,7 ± 1,7	82,8 ± 3,4*
Глицерин и сахароза, «медленное» оттаивание	3 (29)	9,7 ± 3,3	9,3 ± 0,3	96,7 ± 3,3

* $p < 0,05$ по сравнению с развитием свежих эмбрионов; # $p < 0,001$ по сравнению с развитием эмбрионов во всех других группах.

«быстрое») и «сахароза» (с сахарозой / без сахарозы) были изучены на эмбрионах мышей стадии 4–8 клеток. Эти результаты приведены в таблице. Статистический анализ, проведенный методом ANOVA, показал, что произошло существенное воздействие факторов «основной криопротектор» ($F_{(1,25)} = 5,25$; $p < 0,05$) и «режим оттаивания» ($F_{(1,25)} = 18,56$; $p < 0,001$) на скорость развития эмбрионов после замораживания/оттаивания. Наблюдалось и взаимодействие между этими факторами ($F_{(1,25)} = 18,82$; $p < 0,001$). Добавление сахарозы к основному криопротектору позволило добиться более высоких темпов развития оттаявших эмбрионов в культуре *in vitro* ($F_{(1,25)} = 5,56$; $p < 0,05$).

В дальнейших исследованиях на крысах был применен лишь один способ замораживания и оттаивания (комбинация глицерина с сахарозой в качестве криопротекторов и «медленное» оттаивание). Из 75 двух- четырехклеточных эмбрионов крыс линии GC, подвергнутых криоконсервации, после оттаивания по визуальным оценкам после исследования при помощи световой микроскопии 51 эмбрион (68 %) соответствовал критериям жизнеспособности и был поставлен на культивирование *in vitro*. Из них 30 эмбрионов (58,8 %) достигали стадии морулы и 3 (5,9 %) – стадии бластоцисты в течение 48 ч культивирования. Таким образом, 64,7 % от общего числа эмбрионов успешно развивались *in vitro*. Из 18 двух- четырехклеточных эмбрионов крыс линии OXYS, подвергнутых криоконсервации, после оттаивания по визуальным оценкам после исследования при помощи световой микроскопии 15 эмбрионов (83,3 %) соответствовали критериям жизнеспособности и были поставлены на культивирование *in vitro*. Из них 8 (53,3 %) достигали стадии морулы и 2 (13,3 %) – стадии бластоцисты в течение 48 ч культивирования. Таким образом, 66,6 % от общего числа эмбрионов крыс линии OXYS, поставленных на культуру после процедур криоконсервации, успешно развивались *in vitro*.

Обсуждение

Результаты культивирования *in vitro* эмбрионов мышей, представленные в данном исследовании, показывают, что при использовании как этиленгликоля, так и глицерина в качестве основного криопротектора добавление сахарозы при работе в режиме «медленного» оттаивания приводит к тому, что процент развивающихся эмбрионов не отличается от такового в контроле. Целостность бластомеров и прозрачной оболочки зародышей является важным условием для успешной редеривации (Van Soom et al., 2010; Брусенцев и др., 2011; Рожкова и др., 2012). Наши результаты, полученные на мышах, показывают, что «медленное» оттаивание и присутствие в криопротективной смеси наряду с основным (проникающим) дополнительного (непроникающего) криопротектора способствует сохранности бластомеров и зародышей в целом. Наше исследование свидетельствует о том, что из всех использованных протоколов именно этот в наибольшей мере является протоколом выбора, если замораживание/оттаивание является частью процесса редеривации.

Более того, выяснилось, что, когда криопротектором является глицерин, сохранение жизнеспособности эмбрионов после процедур криоконсервации в значительной степени зависит от режима оттаивания. Наши данные свидетельствуют о том, что, когда оттаивание происходит «быстро», процент развития в культуре эмбрионов, замороженных с глицерином, оказывается самым низким. В противоположность этому, эмбрионы, замороженные с глицерином, имеют более высокие показатели развития в культуре, когда используется «медленное» оттаивание.

Результаты исследований на крысах линий GC и OXYS подтвердили, что при применении «медленного» оттаивания и добавлении сахарозы к основному криопротектору (в случае с крысами в качестве основного криопротектора мы использовали лишь глицерин) процент эмбрионов, успешно переживших криоконсервацию, был не менее 66 %, из них *in vitro* развивалось не менее 64 %. Имеется лишь несколько работ, в которых описан процесс замораживания эмбрионов крыс программным способом, сходным с тем, что использовался в нашей работе (Rall et al., 2000; Pfaff et al., 2000). Процент успешно переживших криоконсервацию зародышей крыс линий GC и OXYS при использовании оптимального протокола, выбранного на

основании исследований на мышах (глицерин с сахарозой в качестве криопротекторов и «медленное» оттаивание), был сопоставим с таковым в цитируемых работах.

Глицерин и этиленгликоль часто используются в качестве криопротекторов для замораживания эмбрионов мышей и крыс (Morrell, 1999; Emiliani et al., 2000; Pfaff et al., 2000; Rall et al., 2000), однако каждое из этих химических веществ обладает некоторыми индивидуальными свойствами. Следует отметить, что скорость проникновения глицерина в зародышевые клетки ниже, чем у этиленгликоля (Pedro et al., 2005). Результаты нашего теста с культивированием *in vitro* эмбрионов мышей показывают, что эффективность использования этиленгликоля или глицерина в качестве криопротектора сопоставима, но только в тех случаях, когда применяется «медленный» режим оттаивания. Наши результаты хорошо согласуются с результатами других исследований на грызунах (Renard, Babinet, 1984; Ridha, Dukelow, 1985), свидетельствующих о том, что использование глицерина и этиленгликоля требует относительно медленного оттаивания.

Сахароза выступает в качестве осмотического буфера, который уменьшает осмотический шок бластомеров после оттаивания (McWilliams et al., 1995). В соответствии с этим самые высокие показатели развития эмбрионов в культуре наблюдались лишь в тех группах, где к основному криопротектору была добавлена сахароза.

Среда R1ECM была создана специально для культивирования эмбрионов крыс (Miyoshi et al., 1995) и в настоящее время успешно применяется на других видах грызунов (Amstislavsky et al., 2015). В данном исследовании эта среда впервые была успешно применена с целью культивирования *in vitro* дробящихся эмбрионов крыс линий GC и OXYS после их замораживания и оттаивания.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа выполнена на базе вивариев ИЦиГ СО РАН при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ № 15-04-05509. Авторы выражают благодарность Галустян Елене Алексеевне за помощь в работе с эмбрионами мышей и крыс.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Амстиславский С.Я. Эмбриотехнологические подходы к сохранению исчезающих видов млекопитающих. Дис. … д-ра биол. наук. Новосибирск, 2006.

Амстиславский С.Я., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Роговая А.А., Рагаева Д.С., Напримеров В.А., Литвинова Е.А., Плюснина И.Ф., Маркель А.Л. Редеривация путем трансплантации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(1):147-161.

Брусенцев Е.Ю., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Редеривация как способ очистки лабораторных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(1):102-113.

Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Оболочки преимплантационных зародышей млекопитающих как мишень репродуктивных технологий. Онтогенез. 2012;43(5):1-11.

Abbott A. Geneticists prepare for deluge of mutant mice. Nature. 2004; 432:541. DOI: 10.1038/432541a

Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Igonina T., Abramova T., Rozhkova I. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*). Theriogenology. 2015;82:1056-1063. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.013

Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S., Biramanel J., Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Hum. Reprod. 2000;4:905-910. DOI: 10.1093/humrep/15.4.905

Lasar J., Moreno C., Jacob H., Kwitek A. Impact of genomics on research in rats. Genome Res. 2005;15:1717-1728. DOI: 10.1101/gr.3744005

McWilliams R.B., Gibbons W., Leibo S. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. Hum. Reprod. 1995;10:1163-1171. DOI: 10.5.1163

Miyoshi K., Abeydeera L.R., Okuda K., Niwa K. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. J. Reprod. Fertil. 1995;103(1):27-32. DOI: 10.1530/jrf.0.1030027

Morrell J.M. Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice. Lab. Anim. 1999;33:201-206. DOI: 10.1258/002367799780578165

Pedro P.B., Yokoyama E., Zhu S.E., Yoshida N., Valdez D.M. Jr., Tanaka M., Edashige K., Kasai M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. J. Reprod. Dev. 2005;2:235-246. DOI: 10.1262/jrd.16079

Pfaff R.T., Agca Y., Liu J., Woods E.J., Peter A.T., Critser J.K. Cryobiology of rat embryos I: determination of zygote membrane permeability coefficients for water and cryoprotectants, their activation energies, and the development of improved cryopreservation methods. Biol. Reprod. 2000;63:1294-1302. DOI: 10.1095/biolreprod63.5.1294

Rall W.F., Schmidt P.M., Lin X., Brown S.S., Ward A.C., Hansen C.T. Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models. ILAR J. 2000;41:221-227. DOI: 10.1093/ilar.41.4.221

Renard J.P., Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. J. Exp. Zool. 1984;230:443-448. DOI: 10.1002/jez.1402300313

Ridha M.T., Dukelow W.R. The developmental potential of frozen-thawed hamster preimplantation embryos following embryo transfer: viability of slowly frozen embryos following slow and rapid thawing. Anim. Reprod. Sci. 1985;9:253-259. DOI: 10.1016/0378-4320(85)90008-9

Rulicke T., Autenried P. Potential of two-cell mouse embryos to develop to term despite partial damage after cryopreservation. Lab. Anim. 1995;29:320-326. DOI: 10.1258/002367795781088252

Van Soom A., Wrathall A.E., Herrler A., Nauwynck H.J. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? Reprod. Fertil. Dev. 2010;22:21-31. DOI: 10.1071/RD09230