DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-6-4
УДК 591.3:59.085

Оптимизация протокола витрификации ооцитов крупного рогатого скота в триацетатцеллюлозном полем волокне

Романова А.Б.
Romanova A.B.

Романова А.Б., младший научный сотрудник

Корниенко Е.В., научный сотрудник

Маленко Г.П., доктор биологических наук, зав. отделом
ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии и
репродуктивных биотехнологий, Москва

E-mail: romanova1105@gmail.com

Ключевые слова: витрификация, ооцит, триацетатцеллюлозное полое волокно, крупный рогатый скот

Резюме. Применение метода витрификации в триацетатцеллюлозных полых волокнах (hollow fiber vitrification, HFV) при работе с группами ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих способствует стандартизации и упрощению процедур обработки в растворах витрификации/отогревания. Целью данной работы являлась оценка возможности применения метода HFV для криоконсервации дозревших *in vitro* ооцитов КРС и его оптимизации с целью повышения эффективности. Протокол HFV с относительно высокой суммарной концентрацией (15,0% v/v) проникающих криопротекторов в растворе эквilibрации, успешно использовавшийся для криоконсервации 7- и 8-дневных бластоцист крупного рогатого скота (КРС), позволил получить только низкие показатели выживания (38,5%, 10/26), дробления (40,0%, 4/10) и выхода бластоцист (0,0%, 0/10). На эффективность метода могло повлиять недостаточное насыщение ооплазмы криопротекторами в растворе эквilibрации в связи с низким соотношением площади поверхности ооцита КРС к его объему и низкой проницаемостью плазматической мембраны для криопротекторов и воды. Однако при увеличении времени инкубации ооцитов в растворе эквilibрации следовало учитывать возможные негативные последствия длительного воздействия на них высоких концентраций диметилсульфоксида (ДМСО) и этиленгликоля (ЭГ). Снижение суммарной концентрации проникающих криопротекторов до 5,0% с одновременным увеличением времени инкубации до 15 мин. в растворе эквilibрации позволило существенно повысить (хи-квадрат Пирсона, $p < 0,05$) уровень выживания ооцитов (73,6%, 67/91) и получить одну бластоцисту на 7 сутки развития (1,5%, 1/67). Еще одним фактором, влияющим на эффективность метода HFV, могла быть недостаточная дегидратация ооцитов и/или окружающего их в просвете полого волокна раствора после обработки в растворе витрификации. Повышение концентрации непроницающего криопротектора сахарозы до 1,0 М в растворе витрификации в сочетании с вышеописанными модификациями позволило получить высокие показатели выживания (87,5%, 70/80), дробления (57,1%, 40/70) и выхода бластоцист (20,0%, 14/70).

Optimization of triacetate cellulose hollow fiber vitrification protocol for cryopreservation of bovine oocytes

Romanova A.B., junior research fellow

Kornienko E.V., research fellow

Malenko G.P., Ph.D., head of department

Centre of experimental embryology and reproductive biotechnology, Moscow

E-mail: romanova1105@gmail.com

Key words: vitrification, oocyte, triacetate cellulose hollow fibers, bovine

Abstract. Use of hollow fiber vitrification (HFV) for cryopreservation of mammalian oocytes and embryos allows significant simplification and standardization of vitrification/rewarming procedures. The goal of the current work was to evaluate applicability of HFV method for cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocytes and method's optimization. Application of HFV protocol with relatively high total concentration of permeating cryoprotectants (15.0% v/v) in equilibration solution resulted in low survival (38.5%, 10/26), cleavage (40.0%, 4/10) and blastocyst (0.0%, 0/10) rates. Effectiveness of the procedure could have been compromised by insufficient ooplasm saturation with the cryoprotectants in the equilibration solution due to the low surface area/total volume ratio of the oocytes and relatively low plasmatic membrane permeability for water and cryoprotectants. However prolongation of the equilibration could contribute to increase in cytotoxic effect of high concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG). A decrease in total concentration of permeating cryoprotectants to 5.0% with corresponding increase of incubation in the equilibration solution time to 15 min. allowed to obtain significantly higher (Pearson's chi-square, $p < 0.05$) survival rate of the oocytes (73.6%, 67/91) and a single blastocyst on Day 7 (1.5%, 1/67). Another factor affecting method's effectiveness may be insufficient dehydration of oocytes and/or surrounding solution inside of the hollow fiber after their treatment in vitrification solution. Introduction of previously mentioned protocol modifications in addition to an increase of non-permeating cryoprotectant (sucrose) concentration to 1.0 M in vitrification solution allowed to obtain higher survival (87.5%, 70/80), cleavage (57.1%, 40/70) and blastocyst (20.0%, 14/70) rates.

Введение

За последние десятилетия витрификация стала основным методом криоконсервации ооцитов и эмбрионов человека, вытеснив собой медленное замораживание по программе [1,2]. В научной литературе приводится множество протоколов и носителей трубчатого (криосоломинки, вытянутые криосоломинки и стеклянные капилляры) и пористого (решетки для электронной микроскопии, нейлоновые сетки, полусоломинки, Cryoloop, Cryoleaf, Cryotop) типов, используемых для витрификации [3]. Большинство из наиболее эффективных современных протоколов витрификации основаны на принципе охлаждения в минимальном объеме (minimum volume cooling, MVC) [3,4], позволяющем существенно увеличить скорости охлаждения/нагрева образцов и, как следствие, повышающем вероятность витрификации [3]. Данный метод криоконсервации позволяет получить высокие показатели выживаемости при работе с ооцитами и эмбрионами ряда млекопитающих [4]. Однако сложность криоконсервации ооцитов крупного рогатого скота заключается в их высокой чувствительности к криоповреждениям [5] вследствие их морфо-физиологических особенностей (большого размера, низкой проницаемости плазматической мембраны для криопротекторов и

Для цитирования / For citation

Романова, А.Б., Оптимизация протокола витрификации ооцитов крупного рогатого скота в триацетатцеллюлозном полем волокне / Романова А.Б., Корниенко Е.В., Маленко Г.П. // Ветеринария и кормление. – 2019. – № 6. – С.22–24
Romanova, A.B., Optimization of triacetate cellulose hollow fiber vitrification protocol for cryopreservation of bovine oocytes / Romanova A.B., Kornienko E.V., Malenko G.P. // Veterinaria i kormlenie. – 2019. – №6 – P.22–24

воды, низкому соотношению площади поверхности ооцита к его объему, высокому содержанию липидов в ооплазме и др.) [5,6]. Если в случае с полученными *in vitro* (in vitro produced, IVP) эмбрионами удается добиться достаточно высоких показателей выживаемости, дальнейшего развития и приживляемости после витрификации на различных носителях [6,7], то при работе с ооцитами в большинстве случаев результаты экспериментов сильно варьируют и зачастую не достигают показателей, полученных 15-20 лет назад [5]. Одной из задач стоящей на данный момент в области криоконсервации ооцитов КРС является стандартизация процедуры витрификации и получение воспроизводимых результатов [7]. В этой связи перспективным представляется применение метода HFV, предложенного в 2012 году Matsunari et al. для криоконсервации эмбрионов мыши и свиньи. Кроме того, HFV позволяет соблюсти MVC при одновременно витрификации группы эмбрионов [8,9]. В наших предыдущих исследованиях в полых волокнах были успешно витрифицированы IVP эмбрионы КРС в возрасте 7-8 дней [10]. Процедуры витрификации/отогревания были основаны на протоколе, предложенном Kuwayama et al. [11], успешно применяющимся в сочетании с носителем Cryotop для криоконсервации ооцитов и эмбрионов человека [12,13]. В доступной научной литературе данные о витрификации ооцитов млекопитающих, в частности крупного рогатого скота, по методу HFV отсутствуют. Целью исследований являлась оценка возможности применения метода HFV для криоконсервации дозревших *in vitro* ооцитов КРС и его оптимизации с целью повышения эффективности.

Материалы и методы

Объектами исследований были дозревшие *in vitro* ооциты КРС. В работе, кроме оговоренных случаев, были использованы реактивы фирмы "Sigma-Aldrich" (США). Во все рабочие среды и растворы был добавлен гентамицин в количестве 40 мкг/мл. Яичники крупного рогатого скота получали в убойном цехе мясокомбината. Дозревание ооцитов проводили в среде 199 с солями Эрла ("ПанЭко", Россия) с добавлением 0,66 мМ пирувата натрия, 1 мМ L-глутамин, 0,6 мМ L-цистеин, 5 ЕД/мл человеческого хорионического гонадотропина (Московский эндокринный завод, Россия), 5 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона ("ФСГ-супер", ООО "Агробιοмед", Россия), 1 мкг/мл эстрадиола-17β и 10% фетальной сыворотки крови КРС (Clone, США) в CO₂-инкубаторе при температуре 38,5 °C в течение 18 часов. Фракцию подвижных сперматозоидов из криоконсервированного семени быка выделяли по методу swim-up. Совместное инкубирование ооцитов и сперматозоидов проводили в среде TALP-Fert [14]. День постановки на оплодотворение считали нулевым. Полученные зиготы помещали в культуральную среду SOF [14] с заменимыми и незаменимыми аминокислотами и 5% фетальной сыворотки крови КРС. Эмбрионы культивировали в атмосфере с содержанием 5,6% CO₂, 5,7% O₂, 88,7% N₂ в течение 7 дней.

Витрификация и отогревания ооцитов

В качестве носителя для витрификации ооцитов использовали триацетатцеллюлозные полые волокна с внутренним диаметром 200 мкм, толщиной стенок 15 мкм и размером пор 7 нм (Nippro, Япония) в составе разработанного нами устройства [15]. Витрификацию и отогревание ооцитов проводили с применением ранее описанного протокола [10] и его модификаций. В качестве базовой среды для приготовления растворов витрификации/отогревания использовали TLP-HEPES с 20% фетальной сыворотки крови КРС (TH20).

Все растворы использовали при комнатной температуре (25-27 °C), кроме раствора отогревания (39 °C).

Дозревшие *in vitro* ооциты КРС извлекали из среды M199 и освобождали от клеток кумулюса при помощи раствора гиалуронидазы (1,1 мг/мл) и Vortex. Денудированные ооциты витрифицировали группами по 8-16 шт. по одному из трех следующих протоколов. 1) Ооциты дважды отмывали в TH20 в течение 5 мин. и переносили в раствор эквilibрации, содержащий 7,5% (v/v) ЭГ и 7,5% (v/v) ДМСО, аспирировали в отрезок полового волокна и инкубировали в этом растворе, в общей сложности, в течение 5 мин. Затем полое волокно переносили в раствор витрификации, содержащий 15,0% ЭГ, 15,0% ДМСО и 0,5 М сахарозы, инкубировали в течение 1 мин. и погружали в жидкий азот. При отогревании полое волокно с ооцитами извлекали из жидкого азота и немедленно погружали в раствор отогревания, содержащий 0,5 М сахарозы, на 1 мин. Затем волокно последовательно инкубировали в растворе разбавления, содержащем 0,25 М сахарозы, в течение 3 мин. и двух сменах TH20 в течение 5 мин. Ооциты выгружали из волокна в последней смене TH20 (группа 1). 2) Витрификация/отогревание ооцитов было проведено по такой же схеме, но в растворе эквilibрации в три раза снижали концентрацию проникающих криопротекторов (2,5% ЭГ и 2,5% ДМСО) и удлиняли время инкубации до 15 мин. (группа 2). 3) Как и во втором протоколе в растворе эквilibрации снижали концентрацию проникающих криопротекторов и увеличивали время инкубации до 15 мин. Кроме того, в растворе витрификации концентрацию непроникающего криопротектора сахарозы повысили до 1,0 М, а время инкубации снизили до 30 с (группа 3). После окончания процедуры отогревания денудированные ооциты из всех трех экспериментальных групп инкубировали в течение 2 ч в среде M199, после чего помещали в среду TALP-Fert и инкубировали совместно со сперматозоидами в течение 19 ч. После извлечения предполагаемых зигот из среды оплодотворения оценивали уровень выживания по морфологическим признакам, включая целостность плазматической мембраны и блестящей оболочки, равномерность окраски и гранулированность цитоплазмы. В дальнейшей работе использовали только выжившие эмбрионы. Количество продвигшихся эмбрионов подсчитывали через 48 часов после начала оплодотворения. Выход бластоцист оценивали на 7 сутки развития. В качестве контроля использовали денудированные ооциты, не подвергавшиеся витрификации. Все экспериментальные группы содержат не менее 3 повторов. Результаты обработаны с использованием непараметрического критерия хи-квадрат Пирсона ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Витрификация дозревших *in vitro* ооцитов КРС в триацетатцеллюлозных полых волокнах с использованием протокола, успешно применявшегося для криоконсервации 7- и 8-дневных бластоцист и расширенных бластоцист [10], привела к получению крайне низких уровней выживания (38,5%) и дробления (40,0%; табл.1, группа 1). До стадии бластоцисты эмбрионы в данной группе не развивались.

Следует отметить, что этот протокол, предложенный Kuwayama et al. (2005), с небольшими модификациями широко применяется для криоконсервации ооцитов и эмбрионов человека [1,2,12,13]. В случае с ооцитами КРС в различных работах получают как достаточно высокие показатели выхода бластоцист на 7 сутки после оплодотворения *in vitro* (20% и более) [16-18], так и достаточно низкие

Таблица 1. Выживание и развитие эмбрионов, полученных в результате оплодотворения дозревших *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота, витрифицированных с использованием разных протоколов

Table 1. Survival and developmental rates of embryos obtained after fertilization of *in vitro* matured bovine oocytes vitrified using different protocols

Номер группы	Количество ооцитов, n	Выживание, n (%)	Дробление, n (%)*	D7 бластоцисты n (%)*
1	26	10 (38,5) ^a	4 (40,0)	0
2	91	67 (73,6) ^b	32 (47,8)	1 (1,5) ^a
3	80	70 (87,5) ^b	40 (57,1)	14 (20,0) ^b
Контроль	77	77 (100,0) ^c	52 (67,5)	20 (26,0) ^b

^{a,b,c} — значения с различными индексами статистически значимо отличаются друг от друга в рамках одной колонки (хи-квадрат Пирсона, $p < 0,05$) * - % от выживших ооцитов

(менее 10%) [19,20]. Ооцит КРС является исключительно крупной единой клеткой (средний около диаметр 115 мкм без учета блестящей оболочки) [21] в отличие от бластоцист, состоящих из нескольких сотен мелких клеток и полости-бластоцеля. Кроме того, в отличие от морул и бластоцист, плазматические мембраны ооцитов и дробящихся эмбрионов млекопитающих обладают низкой проницаемостью для воды и криопротекторов. Их проникновение через плазматическую мембрану происходит медленно по механизму простой диффузии в связи с отсутствием у ооцитов водных каналов, например, AQP3 [22,23]. Все это может приводить к недостаточному насыщению ооплазмы криопротекторами в процессе относительно кратковременной эквilibрации (5 мин.) и последующему формированию внутриклеточных кристаллов льда при витрификации/отогревании [5]. Однако при увеличении периода эквilibрации возрастает и негативное влияние высоких концентраций проникающих криопротекторов. В то же время, Papis et al. [24] показали, что обработка созревших *in vitro* ооцитов КРС в растворе эквilibрации с 3-5% этиленгликоля в течение 15 минут позволяет получить высокие показатели жизнеспособности ооцитов после отогревания. В наших экспериментах снижение концентрации проникающих криопротекторов в растворе эквilibрации в 3 раза (2,5% ЭГ и 2,5% ДМСО) и увеличение времени экспозиции до 15 мин. позволило существенно повысить (хи-квадрат Пирсона, $p < 0,05$) выживаемость ооцитов (73,63%), а также получить одну бластоцисту на 7 сутки развития после оплодотворения (табл. 1, группа 2).

Ооциты млекопитающих содержат больше воды по сравнению со сравнимыми по размеру преимплантационными эмбрионами [6]. Низкое соотношение площади поверхности ооцита КРС к его объему в сочетании с низкой проницаемостью плазматической мембраны способствует задержке воды в ооплазме при обработке в растворе витрификации и, как и в случае с недостаточным насыщением криопротекторами, к формированию внутриклеточных кристаллов льда. В нашем случае также следует учитывать особенности строения носителя - триацетатцеллюлозного полого волокна. Группа ооцитов или эмбрионов загружается в просвет волокна в растворе эквilibрации. Дальнейшее взаимодействие биологических объектов с растворами витрификации/отогревания идет через пористую (размер пор 7 нм) стенку волокна, толщина которой сопоставима с толщиной блестящей оболочки зрелого ооцита или зиготы КРС. Данный фактор может влиять на динамику перераспределения ряда веществ между внутренним пространством волокна и внешним раствором. При концентрации непроникающего криопротектора сахарозы в растворе витрификации равной 0,5 М недостаточной может оказываться как дегидратация самих ооцитов, так и окружающего их раствора в просвете волокна. Повышение концентрации сахарозы до 1 М (табл. 1, группа 3) позволило несколько повысить показатели выживаемости (87,5%) и дробления (57,1) и существенно увеличить (хи-квадрат Пирсона, $p < 0,05$) выход бластоцист (20,0%) по сравнению с другими экспериментальными группами (табл. 1, группы 1-2). Таким образом, при данной модификации протокола каждый пятый из выживших и оплодотворенных ооцитов достигал стадии бластоцисты на 7 сутки развития, что особенно важно в связи с тем, что именно семидневные IVP бластоцисты КРС преимущественно используются для дальнейшей трансплантации реципиентам [25].

Заключение

Использование триацетатцеллюлозных полых волокон при витрификации созревших *in vitro* ооцитов КРС способствует стандартизации и упрощению процедур обработки. Однако при создании оптимального протокола витрификации следует учитывать особенности физиологии криоконсервируемого объекта и строения носителя. Так протокол, успешно применявшийся для криоконсервации 7- и 8-дневных бластоцист КРС, позволял получить низкие показатели выживаемости (38,5%) и дальнейшего развития. Снижение суммарной концентрации проникающих криопротекторов до 5,0% в растворе эквilibрации позволило существенно повысить уровень выживания ооцитов (73,6%), а повышение концентрации непроникающего криопротектора саха-

розы до 1,0 М в растворе витрификации способствовало развитию 20,0% полученных эмбрионов в возрасте 7 дней до стадии бластоцисты.

Литература / References

1. Al-Azawi T., Tavukcuoglu S., Khaki A. A., Al-Hasani S. Cryopreservation of human oocytes, zygotes, embryos and blastocysts: a comparison study between slow freezing and ultra-rapid (vitrification) methods // Middle East Fertility Society Journal. - 2013. - V. 18. - №. 4. - P. 223-232.
2. Rienzi L., Gracia C., Maggiulli R., LaBarbera A.R., Kaser D.J., Ubaldi F.M., Vanderpoel S., Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance // Hum Reprod Update. - 2017. - V. 23. - № 2. - P. 139-155.
3. Saragustay J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification // Reproduction. - 2011. - V. 141. - №. 1. - P. 1-19.
4. Hamawaki A., Kuwayama M., Hamano S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. Theriogenology 1999;51:165.
5. Papis K., Stachowiak E., Duda A., Ajduk A., Modliński J. A. Bovine oocyte *in vitro* maturation and cryopreservation: mirage or reality // Slovak Journal of. - 2015. - P. 163.
6. Moussa M., Shu J., Zhang X., Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives // Science China Life Sciences. - 2014. - V. 57. - №. 9. - P. 903-914.
7. Inaba Y., Aikawa Y., Hirai T., Hasiyada Y., Yamanouchi T., Misumi K., Ohtake M., Somfai T., Kobayashi S., Saito N., Matova S., Konishi K., Imai K. In-straw Cryoprotectant Dilution for Bovine Embryos Vitrified Using Cryotop // Journal of Reproduction and Development. - 2011. - V. 57. - № 4. - P. 437-443.
8. Arav A., Natan Y. The near future of vitrification of oocytes and embryos: looking into past experience and planning into the future // Transfusion Medicine and Hemotherapy. - 2019. - V. 46. - №. 3. - P. 182-187.
9. Matsunari H., Maehara M., Nakano K., Ikezawa Y., Hagiwara Y., Sasayama N., Nagashima H. Hollow Fiber Vitrification: A Novel Method for Vitrifying Multiple Embryos in a Single Device // Journal of Reproduction and Development. - 2012. - V. 58. - №. 5. - P. 599-608.
10. Malenko G. P., Kornienko E. V., Nesterov, I. I., Kosovsky G. Y. A new simple and reliable vitrification device based on Hollow Fiber Vitrification (HFV) method evaluated using IVP bovine embryos // Animal Reproduction. - 2017. - V. 14. - №. 2. - P. 392-399.
11. Kuwayama M., Vajta G., Ieda S., Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination // Reprod Biomed Online. - 2005. - V. 11. - P. 608-614.
12. Potdar N., Gelbaya T.A., Nardo L.G. Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis // Reproductive BioMedicine Online. - 2014. - V. 29. - P. 159-176.
13. Herrero L., Pareja S., Aragones M., Cobo A., Bronet F., Garcia-Velasco J.A. Oocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study // Reproductive BioMedicine Online. - 2014. - V. 29. - P. 567-572.
14. Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryos, 2nd Ed. CABI Publishing. 2003. Pp. 548, ISBN 0-85199-666-3.
15. Маленко Г.П., Корниенко Е.В., Косовский Г.Ю. Система и устройство (варианты) для криоконсервации группы ооцитов и эмбрионов млекопитающих по методу витрификации при использовании в качестве носителя полого волокна: патент РФ № 2584584. - 2016.
16. Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P. J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos // Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research. - 1998. - V. 51. - №. 1. - P. 53-58.
17. Yashiro I., Tagiri M., Ogawa H., Tashima K., Takashima S., Hara H., Hirabayashi M., Hochi S. High revivability of vitrified-warmed bovine mature oocytes after recovery culture with α -tocopherol // Reproduction. - 2015. - V. 149. - №. 4. - P. 347-355.
18. Ortiz-Escribano N., Smits K., Piepers S., Van den Abbeel E., Woelders H., Van Soom A. Role of cumulus cells during vitrification and fertilization of mature bovine oocytes: effects on survival, fertilization, and blastocyst development // Theriogenology. 2016. V. 86. №2. P. 635-641.
19. Bulgarelli D. L. et al. Reduced competence of immature and mature oocytes vitrified by Cryotop method: assessment by *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation in a bovine model // Zygote. - 2017. - V. 25. - №. 2. - P. 222-230.
20. Paul A. K. et al. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container // Animal Science Journal. - 2018. - V. 89. - №. 2. - P. 307-315.
21. Маленко Г. П., Романова А.Б., Бригида А.В., Корниенко Е.В. Влияние условий эквilibрации на жизнеспособность витрифицированных ооцитов коров // The Agrarian Scientific Journal. - 2018. - №. 12. - С. 33-36.
22. Agca Y. et al. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics // Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research. - 1998. - V. 49. - №. 4. - P. 408-415.
23. Jin M., Fujiwara E., Kakiuchi Y., Okabe M., Satouh Y., Baba S.A., Hirohashi N. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during *in vitro* fertilization // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011. - V. 108. - №12. - P. 4892-4896.
24. Papis K., Shimizu M., Izaike Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine *in vitro* matured oocytes vitrified in droplets // Theriogenology. - 1999. - V. 51. - P. 173.
25. Hasler J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences // Theriogenology - 2014. - V. 81 - P. 152-169.