

Оценка жизнеспособности эмбрионов млекопитающих и эффективности технологии их криоконсервирования

Л.В. ГОРБУНОВ

Харьковский биотехнологический центр

Estimation of Mammalian Embryos Viability and Efficiency of Their Cryopreservation Technology

GORBUNOV L.V.

Kharkov Biotechnology Centre

Для исключения влияния разнокачественности эмбрионов на уровень оценки эффективности технологии их криоконсервирования применялся относительный показатель изменения жизнеспособности биообъекта – выживаемость. Использование количественного метода статистической обработки для оценки уровня жизнеспособности эмбрионов млекопитающих и определения эффективности технологии их криоконсервирования дало возможность более чем вдвое снизить величину ошибки среднеквадратического отклонения по сравнению с общепринятым методом альтернативного варьирования.

Ключевые слова: жизнеспособность, сохранность, эффективность технологии криоконсервирования, качественный и количественный методы оценки качества эмбрионов.

Для вилучення впливу різноякісності ембріонів на рівень оцінки ефективності технології їх криоконсервування використовувався відносний показник зміни життєздатності біооб'єкту – виживаність. Використання кількісного методу статистичної обробки для оцінки рівня життєздатності ембріонів ссавців і визначення ефективності технології їх криоконсервування дало можливість більш ніж удвічі знизити величину помилки середньоквадратичного відхилення у порівнянні з загальновідомим методом альтернативного варіювання.

Ключові слова: життєздатність, цілість, ефективність технології криоконсервування, якісний і кількісний методи оцінки якості ембріонів.

To exclude the effect of different quality for embryos on the rate of efficiency estimation as for their cryopreservation technology we propose a relative index for bioobject's viability alteration, the survival. Using the quantitative method of statistical evaluation in estimation of mammals' embryos viability rate and determining of the efficiency of their cryopreservation technology allowed to decrease the value of standard deviation error more than twice comparing with a standard method of alternate variation.

Key words: viability, integrity, efficiency of cryopreservation technology, qualitative and quantitative methods of embryo quality estimation.

Наиболее распространенный способ оценки эффективности технологии криоконсервирования эмбрионов млекопитающих основывается на определении уровня сохранности деконсервированного биообъекта. Этот показатель обычно устанавливается по результатам визуальной оценки морфологической целостности бластомеров (повреждение зоны пелюцида, степень зернистости цитоплазмы и т.д.) после оттаивания и культивирования эмбрионов. Жизнеспособными считаются эмбрионы, у которых более 50% бластомеров сохранили морфологическую целостность и только такие эмбрионы пригодны для последующей трансплантации сельскохозяйственным животным [5]. Показатель сохранности зависит от доли эмбрионов отличного качества, присутствующих в выборке. После деконсервирования качество некоторых эмбрионов изменяется с отличного на хорошее, но их всё равно считают сохранившимися. Для постановки метода иногда используют эмбрионы удовлетворительного

The most spread method for estimation of efficiency of mammals embryos cryopreservation technology is based on the determining of integrity value of frozen-thawed object. Usually this index is found basing on the results of a visual observation of blastomeres integrity (damaging of zona pelucida, extent of cytoplasm granulation, etc.) after embryo thawing and cultivation. As viable embryos one considers the cells with more than 50% morphologically integral blastomeres, only these embryos are suitable for further transplantation to farm animals [3]. Integrity index depends on a share of "excellent" quality embryos, being in a sample. After freeze-thawing the quality of some embryos changes from "excellent" to "good" one, but they are considered as integral ones. Sometimes one uses for elaboration of a method the embryos of "satisfactory" quality and considers them as the ones preserving their integrity after freeze-thawing.

It is obvious, that using the various criteria for estimation of frozen-thawed embryos integrity leads

Адрес для корреспонденции: Горбунов Л.В., Харьковский биотехнологический центр, п.Кулинич, Харьковский район, Харьковская область, Украина 62404; тел.: +38 (0572) 95-31-66, факс: +38 (0572) 95-31-66, e-mail: cryo@animal.kharkov.ua.

Address for correspondence: Gorbunov L.V. Kharkiv Biotechnology Centre, Kulinichi, Kharkov Region, Ukraine 62404; tel.: +38 (0572) 953166, fax: +38 (0572) 953166, e-mail: cryo@animal.kharkov.ua.

качества и причисляют их к сохранившимся после криоконсервирования. Очевидно, что применение различных критериев оценки сохранности деконсервированных эмбрионов приводит к искажению оцениваемой технологии криоконсервирования.

Биологическая разнокачественность эмбрионов, обусловленная получением биообъекта от разных видов и пород животных с различными условиями кормления и содержания, может влиять на показатель его сохранности. Применение контрольной группы частично решает данную проблему. Однако это приводит к значительному увеличению количества используемых эмбрионов. Для получения достоверного результата при традиционных качественных методах оценки жизнеспособности необходимо от нескольких десятков до сотен полноценных эмбрионов [3]. Высокая стоимость одного эмбриона (крупного рогатого скота не менее 30 усл.ед.) является существенной проблемой оптимизации технологии криоконсервирования.

Цель данной работы – разработка количественного метода оценки жизнеспособности эмбрионов млекопитающих и эффективности технологии их криоконсервирования, повышающего точность определения этих параметров в 2 и более раза.

Материалы и методы

Криоконсервирование эмбрионов при медленных скоростях проводили в устройстве, основанном на пассивном охлаждении термоблока в горловине сосуда Дьюара, которое позволяет реализовать среднюю скорость замораживания 0,3°C/мин.

В качестве биообъекта использовали эмбрионы крупного рогатого скота и мыши на стадии ранняя морула-расширенная бластоциста. Все манипуляции с биообъектом – поиск, отмывание и подготовку к экспериментам проводили по общепринятым методикам [5]. Жизнеспособность нативных и деконсервированных эмбрионов оценивали по их способности к развитию до следующей стадии в культуре [3].

Результаты и обсуждение

Уменьшить количество эмбрионов (на стадии развития от ранней морулы до расширенной бластоцисты), необходимых для проведения исследования, можно посредством перехода от качественного (5-балльного) метода оценки эмбрионов к количественному (численному) [1].

Жизнеспособность S совокупности нативных, деконсервированных и культивируемых эмбрионов различного качества предложено определять по формуле:

$$S = \sum_{i=1}^k C_i h_i / \sum_{i=1}^k n_i, \quad (1)$$

to a distortion of estimated cryopreservation technology index.

Various biological quality of embryos, resulted from delivery of objects from various animal species with different feeding and maintaining conditions, could affect the value of their integrity. The applying of control group solves this problem partially. However this leads to a considerable increase in the number of embryos used. To obtain the statistically true result with the traditional qualitative methods of viability estimation it is necessary to use several dozens to hundreds of high value embryos [3]. A high cost of one embryo (e.g. for cattle it makes not less than 30 USD) is an considerable problem for optimisation of cryopreservation technology.

The aim of this study is to develop a quantitative method for estimation of mammals embryos viability and efficiency of cryopreservation technology for them, which would increase the accuracy of these parameters determining by two and more times.

Materials and methods

Embryos' cryopreservation was performed at low cooling rates in a device, based on a passive cooling of thermal block in Dewar vessel neck. This device allows to realise an average cooling rate of 0.3°C/min [6].

As a bioobject we used cattle and mice embryos at the stage of early morula-extended blastocyst. All the manipulations with bioobject (searching, washing-out and preparing for experiments) were performed according to standard methods [5]. Viability of native and frozen-thawed embryos was assessed by its ability for development up to the next stage in culture [3].

A decrease in the number of embryos (at the development stage of early morula to extended blastocyst), necessary for conducting the investigations, is possible to reach by means of transition from a qualitative method (5 point scale) of embryos evaluation to a quantitative (numerical) one [1].

Viability, S , of total group of native, frozen-thawed and cultured embryos of various quality is proposed to be determined by the formula:

$$S = \sum_{i=1}^k C_i h_i / \sum_{i=1}^k n_i, \quad (1)$$

where k is the number of embryos' groups of various quality (the excellent, good and satisfactory ones); i is the group number; n_i is the number of native embryos of the quality in each group; h_i is the number of embryos of certain quality after freeze-thawing or culturing (when estimating the integrity of native embryos, $h=n$, and of frozen-thawed or cultured $h \neq n$); C_i is the integrity index (ability to develop) of embryos of the quality, and it is established from the results of a short-term culturing by the following formula:

где k – количество групп эмбрионов различного качества (отличного, хорошего, удовлетворительного); i – номер группы; n_i – количество нативных эмбрионов данного качества в каждой группе; h_i – количество эмбрионов определенного качества после замораживания или культивирования (при оценке сохранности нативных эмбрионов $h=n$, деконсервированных или культивированных $h \neq n$); C_i – показатель сохранности (способности к развитию) эмбрионов заданного качества, устанавливается по результатам краткосрочного культивирования по формуле:

$$C_i = (n_k/n) \cdot 100\%, \quad (2)$$

где n – количество нативных эмбрионов определенного качества; n_k – количество культивируемых эмбрионов (прошедших следующий этап дробления) заданного качества.

Чтобы исключить влияние разнокачественности эмбрионов на уровень оценки эффективности технологии их криоконсервирования и составляющих ее операций, в частности культивирования, рекомендуется применять относительный показатель изменения жизнеспособности биообъекта – выживаемость:

$$W = (S_d/S_n) \cdot 100\%, \quad (3)$$

где S_n и S_d – показатели жизнеспособности нативных и деконсервированных или культивированных эмбрионов, вычисленные по формуле (1).

Очевидно, что показатель сохранности эмбрионов может изменяться в широких пределах, так как зависит от стадии их развития, качества, условий проведения культивирования, вида животного, от которого они получены, и других факторов. По данным [3] для эмбрионов крупного рогатого скота на стадии развития от ранней морулы до расширенной бластоцисты ($n=581$) показатель сохранности составляет: для эмбрионов отличного и хорошего качества – $85,0 \pm 2,0\%$, удовлетворительного – $70,0 \pm 4,9\%$, неудовлетворительного – $30,0 \pm 9,5\%$ и для дегенерированных эмбрионов – $5,0 \pm 1,9\%$ (рисунок). Исходя из наших исследований, максимальное отклонение данного показателя для эмбрионов мыши и крупного рогатого скота может составлять: отличного качества $100 \div 90$, хорошего – $90 \div 80$, удовлетворительного – $80 \div 60$ и неудовлетворительного – $60 \div 20\%$.

Максимальная величина разброса доверительного интервала для эмбрионов отличного, хорошего, удовлетворительного и неудовлетворительного качества (95 ± 5 , 85 ± 5 , 70 ± 10 , $40 \pm 20\%$ соответственно) дает возможность оценить среднюю величину жизнеспособности совокупности эмбрионов, полученных от разных животных и имеющих различное качество и стадию развития. Однако степень ва-

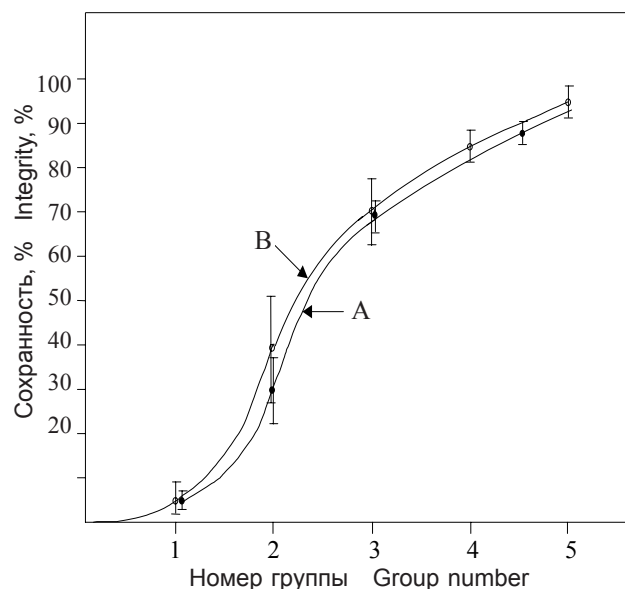
$$C_i = (n_k/n) \cdot 100\%, \quad (2)$$

where n is the number of native embryos of a certain quality; n_k is the number of cultured embryos of the quality (which have passed the next cleavage stage).

To exclude the influence of various quality of embryos to the level of estimation of the efficiency of their cryopreservation technology and its integral parts, in particular, culturing, it is recommended to apply a relative index of bioobject viability alteration, the survival:

$$W = (S_d/S_n) \cdot 100\%, \quad (3)$$

where S_n and S_d are the viability values of native and frozen-thawed or cultivated embryos, calculated by the formula (1). It is obvious, that embryos integrity value may alter within wide limits, since it depends on the stage of their development, quality, culturing conditions, species of donor animals, and other factors. According to the data of the paper [3] the integrity value for cattle embryos at the development stage of early morula to extended blastocyst ($n=581$) made $85.0 \pm 2.0\%$ for embryos of excellent and good quality, $70.0 \pm 4.9\%$ for the ones of satisfactory quality, and 30.0 ± 9.5 for the ones with unsatisfactory quality, and $5.0 \pm 1.9\%$ for degenerated embryos (Figure). Proceeding from our investigations, the maximum deviation of this index for mice and cattle embryos can make $100 \div 90$, $90 \div 80$,



Зависимость показателя сохранности нативных эмбрионов крупного рогатого скота (A) и мыши (B) от их качества: 1 – дегенерирующего; 2 – неудовлетворительного; 3 – удовлетворительного; 4 – хорошего; 5 – отличного.

Dependence of native embryo integrity of cattle (A) and mice (B) on their quality: 1 – degenerating; 2 – unsatisfactory; 3 – satisfactory; 4 – good; 5 – excellent.

риации показателя сохранности, характеризующего жизнеспособность конкретного эмбриона, может влиять на точность оценки относительного и абсолютного показателей жизнеспособности совокупности биообъектов.

Так как относительная величина погрешности вычисления отдельных исследуемых параметров может превышать допустимый уровень (5%), то необходимо уточнить показатель сохранности эмбриона млекопитающего с учетом его стадии развития, качества и вида животного по результатам краткосрочного культивирования. Допустимые величины доверительных интервалов при определении средних показателей исследуемых параметров сохранности, оцененные на различных этапах проведения биотехнологических операций, представлены в табл. 1.

Показатель сохранности совокупности эмбрионов должен быть определен с точностью до 3% для получения достоверного значения жизнеспособности и до 5% – выживаемости. Поскольку именно при таких условиях относительная погрешность вычисления показателей жизнеспособности и выживаемости составляет меньше 5%, то повысить точность визуальной оценки уровня сохранности конкретного эмбриона можно посредством его видеофиксации с последующей оцифровкой видеоизображения и записью на ЭВМ.

Использование количественных показателей жизнеспособности и выживаемости эмбрионов дает возможность применять количественный метод статистической обработки [2], что способствует снижению величины ошибки среднеквадратического отклонения (m) в несколько раз и при получении достоверного результата значительно уменьшает количество эмбрионов, используемых в опыте.

Эффективность различных способов оценки технологии криоконсервирования можно проанализировать на примере замораживания эмбрионов мыши в различных контейнерах в устройстве, основанном на пассивном остывании термоблока в горловине сосуда Дьюара (табл. 2) [6]. Количество эмбрионов отличного, хорошего и удовлетворительного качества в соломинках (пробирках) до замораживания составило 33 (42), 35 (20), 0 (0), после оттаивания – 18 (40), 40 (18), 10 (4), а после культивирования – 15 (37), 36 (16), 17 (9) соответственно.

Таблица 1. Точность оценки показателей сохранности эмбрионов млекопитающих различного качества, необходимая для получения достоверного результата $\alpha \leq 5\%$

Table 1. Accuracy in integrity estimation for mammalian embryos of various quality, which is necessary for obtaining the statistically true result, $\alpha \leq 5\%$

Исследуемый параметр Studied parameter	Допустимая величина оценки сохранности эмбрионов различного качества С, % Admissible value of integrity estimation for embryos of various quality С, %			
	отличного excellent	хорошего good	удовлетвори- тельного satisfactory	неудовлетвори- тельного unsatisfactory
Жизнеспособность Viability	± 4	± 3	± 3	± 2
Выживаемость Survival	± 5	± 5	± 5	± 5

80÷60 and 60÷20 for embryos of excellent, good, satisfactory and unsatisfactory quality, correspondingly.

Maximum value of dispersion of confidence interval for embryos of excellent, good, satisfactory and unsatisfactory quality (95 ± 5 , 85 ± 5 , 70 ± 10 and $40 \pm 20\%$, correspondingly) allows to estimate the average value of viability of total embryos, derived from different animals and being of various quality and development stage. However, the variability extent of viability index, characterising the viability of certain embryo, could affect the accuracy of estimation of relative and absolute value of bioobject viability.

Since the relative value of calculation error of some studied parameters could exceed the admissible value (5%), it is necessary to specify the mammalian embryo integrity index with considering its development stage, quality and animal species according to the results of short-term culturing. Admissible values of confidence intervals when determining the average indices of studied integrity parameters, estimated at various stages of conducted biotechnological operations, are presented in Table 1.

Integrity index of total embryos should be determined with an accuracy of 3% for obtaining of statistically true value of viability, and 5% for survival. Since the relative error of calculation of viability and survival indices made less than 5%, the increase of accuracy of visual estimation of certain embryo integrity is possible with its video recording and further making digital and transforming into a computer record.

The use of quantitative indices of embryo viability and survival allow the applying of a quantitative method of statistical evaluation [2], that promotes the decrease of value of root mean square deviation error (m) by several times and when obtaining the significant result decreases the number of embryos, used in experiment.

Efficiency of different methods for evaluation of cryopreservation technology could be analysed on the example of freezing of mice embryos in various

Таблица 2. Способы оценки эффективности технологии замораживания эмбрионов мыши в соломинке n=68 (в пробирке Уленгута n=62)
Table 2. Efficiency estimation for technology of freezing of mice embryos in straws n=68 (in Uhlenhuth's tubes n=62)

Эмбрионы Embryos	Показатели эффективности технологии замораживания M±m,% Indices of freezing technology efficiency, M±m,%		
	Сохранность Integrity	Жизнеспособность Viability	Выживаемость Survival
Свежеполученные Freshly isolated	100±0,0 (100±0,0)	91,8±0,6 ^c (89,9±0,6 ^d)	— —
Деконсервированные Thawed	93,6±3,1 ^a (85,3±4,3 ^a)	90,5±0,5 ^d (85,4±0,6 ^e)	98,6±0,6 ^k (95,1±0,7 ^h)
Культированные Cultivated	85,5±4,5 ^a (75,0±5,3 ^{a,b})	88,8±1,1 ⁱ (83,5±1,3 ^j)	96,8±0,8 ^m (92,9±0,8 ⁿ)

Примечание: одинаковыми суперскриптами обозначены величины, не имеющие достоверности различия – а:а р>0,1, и разными – имеющие различие с высоким уровнем значимости – с:д р<0,02; i:l, k:h, m:n р<0,01; d:e р<0,001.

Note: the same superscripts are in values without significant differences – а:а р>0.1, and different superscripts are in values with highly significant differences – с:d р<0.02; i:l, k:h, m:n р<0.01; d:e р<0.001.

Показателями оценки способа замораживания эмбрионов в пластиковых соломинках (V=200 мкл) и пробирках Уленгута (V=750 мкл) являлись общепринятый метод вычисления сохранности биообъекта и предлагаемый, основанный на определении жизнеспособности и выживаемости эмбрионов на различных этапах проведения процесса криоконсервирования. Сохранность эмбрионов и ошибку ее среднеквадратического отклонения *m* оценивали качественным методом (альтернативное варьирование) [4]:

$$m = \sqrt{\frac{C(100 - C)}{n}} \quad (4)$$

Ошибка среднеквадратического отклонения (*m*) для оценки среднего показателя (*M*) жизнеспособности и выживаемости вычислялась по общепринятому методу количественного анализа [4]:

$$m = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (M - M_i)^2}{n(n-1)}}, \quad (5)$$

Величины сохранности деконсервированных эмбрионов, замороженных в соломинках (n=68) и пробирках (n=62), оцененные по результатам краткосрочного культивирования, не дают достоверности различия р>0,1 (t_d=1,5). По показателям жизнеспособности и выживаемости для указанных контейнеров получено значимое различие р<0,01 (t_d=3,1 и t_d=3,4 соответственно).

containers and in device, based on the passive cooling of thermal block in Dewar vessel neck (Table 2) [6]. Number of embryos of excellent, good and satisfactory quality in straws (tubes) before freezing made 33 (42), 35 (20), 0 (0), after thawing this made 18 (40), 40 (18), 10 (4), and after culturing the value made 15 (37), 36 (16) and 17 (9), correspondingly.

The indices for estimation of embryos freezing method in plastic straws (V=200 mcl) and Uhlenhuth's tubes (V=750 mcl) were the standard method of bioobject viability estimation and the one proposed by us, based on the determining of viability and survival of embryos on different stages of cryopreservation process. Embryos' viability and its SD error, *m*, was estimated by qualitative method (alternate

variation) [4]:

$$m = \sqrt{\frac{C(100 - C)}{n}} \quad (4)$$

SD error, *m*, for estimation of viability and survival mean value, *M*, was calculated with standard method of quantitative analysis [4].

$$m = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (M - M_i)^2}{n(n-1)}} \quad (5)$$

Integrity values of frozen-thawed embryos, frozen in straws (n=68) and tubes (n=62), estimated on results of a short-term culturing, do not show the significant difference, р>0.1 (t_d=1.5). For viability and survival indices for the mentioned containers we observed the significant difference, р<0.01 (t_d=3.1 and t_d=3.4, correspondingly).

Multiple decrease of SD error value in proposed method of studied indices estimation significantly increases the method sensibility and as a result it allows to diminish the embryos' number, essential for obtaining of statistically true result. The using of relative index of survival neutralises the problem of influence of embryos' various quality on outcome of compared cryopreservation methods. In addition the evaluation of cryopreservation technology in a whole, there is a possibility of revealing its separate stages. Survival of frozen-thawed embryos, found by viability indices ratio before and after culturing, makes 98.2±0.8 and

Многokратное уменьшение величины ошибки среднеквадратического отклонения, полученное при предложенном способе оценки исследуемых показателей, значительно повышает чувствительность метода и, как следствие, позволяет многократно снизить количество эмбрионов, необходимых для получения достоверного результата. Использование относительного показателя выживаемости снимает проблему влияния разнокачественности биообъекта на результат сравниваемых способов криоконсервирования. Помимо оценки уровня технологии криоконсервирования в целом, существует возможность установления эффективности её отдельных этапов. Выживаемость деконсервированных эмбрионов, определенная по соотношению показателей их жизнеспособности до и после культивирования, составляет для соломинок $98,2 \pm 0,8\%$ и пробирок $97,7 \pm 0,9\%$. Относительно близкие показатели выживаемости ($97,6 \pm 2,6\%$) нативных эмбрионов ($n=26$) в культуре свидетельствуют об одинаковом уровне проведения культивирования биообъектов ($t_d=0,4, p>0,32$).

Выводы

Относительный показатель изменения жизнеспособности биообъекта (выживаемость) существенно снижает влияние разнокачественности эмбрионов на уровень оценки эффективности технологии их криоконсервирования.

Использование количественных показателей жизнеспособности и выживаемости эмбрионов способствует снижению величины ошибки среднеквадратического отклонения m в несколько раз и значительно уменьшает количество эмбрионов, используемых в опыте, при условии получения достоверного результата.

97.7 ± 0.9 for straws and tubes, correspondingly. Relatively close results for survival, $97.6 \pm 2.6\%$ of native embryos in culture, testify to a similar performing of bioobject cultivation ($t_d=0.4, p>0.32$).

Conclusions

Relative index of the change in bioobject viability (survival) considerably decreases the effect of different quality of embryos on the estimation rate of cryopreservation technology efficiency.

The use of quantitative indices for viability and survival of embryos contributes to decrease of SD error, m , by several times and significantly diminishes the amount of used in experiment embryos with a precondition of statistically true result.

References

1. Gorbunov L.V., Bugrov O.D., Gorbunova N.I. Method of efficiency estimation for performing the biotechnological operations, associated with cryopreservation of mammals sperm and embryos // *Visnyk Bilotserkiv. Derzh. Agrarnogo Univ.*— 2000.— N14.— P. 178-183.
2. Gorbunov L.V. Quantitative method for estimation of mammals embryos viability // *Visnyk Bilotserkiv. Derzh. Agrarnogo Univ.*— 2001.— N17.— P. 30-34.
3. Kauffold P., Tamm I., Shikhov I. Ya. et al. Estimation of quality of cattle embryos: Instruction manual for embryos transplantation.— Moscow: Agropromizdat, 1990.— 56 p.
4. Lakin B.F. Biometry.— Moscow: Vysshaya shkola, 1990.— 254 p.
5. Mank M. Biology of mammals development.— Moscow: Mir, 1990.— 406 p.
6. *Author's certificate* 1802700A3 ICI A61D19/00 Device for embryos freezing / F.I. Ostashko, N.D. Bezugly, Ye.G. Valigura, L.V. Gorbunov. Filed 29.03.91. Published 15.03.93. Bulletin N10.— P. 178.

Accepted in 14.03.2003

Литература

1. Горбунов Л.В., Бугров О.Д., Горбунова Н.И. Спосіб оцінки ефективності проведення біотехнологічних операцій, які пов'язані з криоконсервацією сперматозоїдів та ембріонів ссавців // *Вісник Білоцерків. держ. аграрного ун-ту.*— Біла Церква.— 2000.— №14.— С. 178-183.
2. Горбунов Л.В. Кількісний спосіб оцінки життєздатності ембріонів ссавців // *Вісник Білоцерків. держ. аграрного ун-ту.*— Біла Церква.— 2001.— №17.— С. 30-34.
3. Кауффольд 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.
4. Лакін Б.Ф. Биометрия.— М.: Высш. школа, 1990.— 254 с.
5. Манк М. Биология развития млекопитающих.— М.: Мир, 1990.— 406 с.
6. А.с. 1802700А3 МКИ А61D 19/00. Установка для замораживания зародышей / Ф.И. Осташко, Н.Д. Безуглый, Е.Г. Валигура, Л.В. Горбунов Заявлено 29.03.91. Опубл. 15.03.93. Бюл.№10.— С. 178.

Поступила 14.03.2003