

Применение репродуктивных технологий и создание криобанка генетических ресурсов лабораторных животных

С.Я. Амстиславский¹, Е.Ю. Брусенцев¹, Т.О. Абрамова¹, Д.С. Рагаева¹, И.Н. Рожкова¹, Т.Н. Игонина¹, Е.А. Кизилова¹, В.А. Напримеров¹, Н.Ю. Феоктистова²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

Современные криобанки генетических ресурсов лабораторных животных основаны на замораживании преимплантационных эмбрионов и семени. Криобанки создают и используют в сочетании с современными репродуктивными технологиями, такими как редеривация, культивирование *in vitro* и трансплантация эмбрионов. В ИЦиГ СО РАН 13 линий мышей и крыс редеривированы, создан криобанк, в котором хранятся 32 линии мышей и крыс. Проведены успешные эксперименты по переводу в криобанк других лабораторных животных, помимо мышей и крыс. Были криоконсервированы эмбрионы двух видов хомячков рода *Phodopus* (джунгарского и Кэмпбелла); их жизнеспособность была подтверждена успешным развитием после размораживания в условиях *in vitro* и *in vivo* (рождение потомства после трансплантации реципиенту). Было продемонстрировано стимулирующее влияние гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора при культивировании преимплантационных зародышей этих двух видов мохноногих хомячков. Кроме того, семя хомячков джунгарского (*Phodopus sungorus*) и Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*), котов домашнего (*Felis catus*) и амурского (*Prionailurus bengalensis euptilurus*), а также красной рыси (*Lynx rufus*) было заморожено и криоконсервировано. Исследования с применением методов флуоресцентной окраски SYBR Green/PI и последующей конфокальной микроскопии показали, что более 40 % замороженного семени амурского кота сохраняет жизнеспособность в процессе криоконсервации. Таким образом, впервые была продемонстрирована возможность успешного замораживания семени дикого представителя семейства кошачьих *Prionailurus bengalensis euptilurus*. В статье дан обзор этих работ, а также обсуждаются перспективы развития криобанка и применения репродуктивных технологий для сохранения различных лабораторных видов млекопитающих.

Ключевые слова: криобанк генетических ресурсов; эмбрионы; семя; мыши; крысы; хомячки; кошачьи.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Абрамова Т.О., Рагаева Д.С., Рожкова И.Н., Игонина Т.Н., Кизилова Е.А., Напримеров В.А., Феоктистова Н.Ю. Применение репродуктивных технологий и создание криобанка генетических ресурсов лабораторных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):367-371. DOI 10.18699/VJ15.045

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Amstislavsky S.Ya., Brusentsev E.Yu., Abramova T.O., Ragaeva D.S., Rozhkova I.N., Igonina T.N., Kizilova E.A., Naprimerov V.A., Feoktistoiva N.Yu. Applying reproductive technologies and genome resource banking to laboratory animals. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):367-371. DOI 10.18699/VJ15.045

DOI 10.18699/VJ15.045

УДК 575:591.3:592.599

Поступила в редакцию 22.06.2015 г.

Принята к публикации 10.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Applying reproductive technologies and genome resource banking to laboratory animals

S.Ya. Amstislavsky¹, E.Yu. Brusentsev¹, T.O. Abramova¹, D.S. Ragaeva¹, I.N. Rozhkova¹, T.N. Igonina¹, E.A. Kizilova¹, V.A. Naprimerov¹, N.Yu. Feoktistoiva²

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The Genome Resource Bank (GRB) is a repository of frozen biological material, including semen and embryos. Cryobanking is used in combination with modern reproductive technologies such as rederivation, *in vitro* culture and embryo transfer. Thirteen mouse and rat strains have been re-derived and 32 are kept frozen in the cryostorage at the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. Some other laboratory animal species have been cryopreserved as well. Embryos of two hamster species (Djungarian and Campbell's) in the genus *Phodopus* were cryopreserved and the viability of thawed embryos was proved by their successful development *in vitro* and *in vivo* (by transfer to a recipient). A positive effect of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was demonstrated with both these *Phodopus* species. Furthermore, semen of Djungarian (*Phodopus sungorus*) and Campbell's (*Phodopus campbelli*) hamsters, domestic cat (*Felis catus*), amur cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) and bobcat (*Lynx rufus*) was frozen and cryopreserved. Double staining by SYBR Green/PI and subsequent confocal microscopy demonstrated that more than 40 % of amur cat semen retained viability after cryopreservation. This is the world's first reported successful freezing of semen of this wild felid (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). This article reviews the results and discusses prospects of using reproductive technologies for conservation of laboratory species.

Key words: cryobanking genetic resources; embryos; semen; mice; rats; hamsters; felids.

Несмотря на то что уже успешно заморожены эмбрионы и гаметы нескольких десятков видов млекопитающих (Fickel et al., 2007; Saragusty, Arav, 2011), а их криоконсервация стала рутинной практикой работы с наиболее общедоступными видами лабораторных животных, мышами и крысами (Rall et al., 2000; Landel, 2005; Yoshiki, 2009), до сих пор не существует единого универсального протокола замораживания и оттаивания эмбрионов даже для мышей. Методики замораживания эмбрионов, семени и ооцитов для крыс разработаны существенно слабее, чем для мышей (Mazur et al, 2008). Соответственно, в мире имеются лишь единичные криобанки генетических ресурсов крыс (Agca, 2012). По отношению ко многим видам млекопитающих, в том числе и некоторым видам лабораторных грызунов, способы замораживания эмбрионов и/или семени пока находятся лишь в стадии разработки и требуют тщательного изучения биологии конкретного вида (Амстиславский и др., 2015). В наибольшей мере это относится к диким и исчезающим видам млекопитающих, в частности к большинству видов семейства кошачьих (Amstislavsky et al., 2012).

Цель данной статьи – общий обзор направлений исследований в области создания криобанков разных видов млекопитающих, проводимых сектором криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН. Конкретными задачами являются: 1) общий обзор работы, проведенной в ИЦиГ СО РАН по созданию криобанка эмбрионов мышей и крыс; 2) анализ текущего состояния исследований по созданию криобанков эмбрионов и семени других лабораторных животных, помимо мышей и крыс, на примере проведенного нами цикла экспериментов с хомячками джунгарским и Кэмпбелла; 3) анализ текущего состояния исследований по сохранению видов кошачьих путем замораживания семени.

Лабораторные мыши и крысы

Криобанки позволяют оптимизировать работу современных вивариев. В криобанке, созданном при ИЦиГ СО РАН, хранятся в замороженном состоянии эмбрионы 32 линий мышей и крыс. При помощи криобанка и репродуктивных технологий в ИЦиГ СО РАН удалось получить потомство и редеривировать, то есть перевести из конвенционального в SPF-статус (*specific pathogen free*), 7 линий/сублиний крыс, а также 5 линий и 1 мутантный сток мышей (таблица). В ходе проделанной работы решались практические задачи пополнения коллекции SPF-вивария уникальными линиями, а также совершенствовалась сама технология. Кроме того, исследовались научные аспекты криобиологии и репродуктивной биологии (Брусенцев и др., 2014; Амстиславский и др., 2015).

Хомячки рода *Phodopus*

Помимо мышей и крыс, объектами криоконсервации в качестве лабораторных животных, пригодных для биомедицинских исследований, становятся другие млекопитающие. Однако по отношению ко многим видам животных, в том числе редко используемым или экзотическим, технология криоконсервации эмбрионов и/или семени все еще не создана. В ИЦиГ СО РАН ведутся работы и в этом направлении.

Список линий, сублиний и стоков мышей и крыс, переведенных в SPF-статус посредством репродуктивных технологий или архивированных в криобанке в ИЦиГ СО РАН

Название	Статус
Крысы	
ISIAH/lcgn* (a)	Редеривирована
ISIAH/lcgn (c)	Редеривирована
GK/lcgn	Редеривирована
OXYs	Редеривирована
Tame rats	Редеривирована
WAG	Редеривирована
Wistar	Редеривирована
Мыши	
ICR	Редеривирована
WR/y	Помещена в криобанк
YT	Помещена в криобанк
PT	Помещена в криобанк
SCID/SHO-Prkdcscid	Редеривирована
C57BL/6J-A ^y	Редеривирована
129S2/SvPasCrl	Помещена в криобанк
MAO-1/lcgn (гомозиготные)	Помещена в криобанк
HT1AC/lcgn	Помещена в криобанк
GM-3/lcgn	Помещена в криобанк
GM-83/lcgn	Помещена в криобанк
HT1AA/lcgn	Помещена в криобанк
ASC/lcgn	Помещена в криобанк
GM-9/lcgn	Помещена в криобанк
OG-2/lcgn	Помещена в криобанк
GM-20/lcgn	Помещена в криобанк
GM-11/lcgn	Помещена в криобанк
B6-1473G/lcgn	Редеривирована
NodSCID/CB17-Prkdcscid/Ncr	Помещена в криобанк
BALB/c	Помещена в криобанк
C57BL/6Kaiso(102)	Помещена в криобанк
C57BL/MUC2(103)	Помещена в криобанк
CD-1	Помещена в криобанк
B6-1473C/lcgn	Редеривирована
HT1AN/lcgn	Редеривирована
GKSF-78/lcgn	Помещена в криобанк
MAO-1/lcgn (гетерозиготные)	Помещена в криобанк
DBA/2RccHsd	Помещена в криобанк
CBA/Lac	Помещена в криобанк
C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J	Помещена в криобанк

* lcgn означает, что линия получена в ИЦиГ СО РАН.

Хомячки рода *Phodopus* являются востребованными лабораторными моделями (Феоктистова, 2008). Хомячок Кэмпбелла является предпочтительной моделью в исследованиях, направленных на изучение заботы о потомстве и отцовского поведения (Феоктистова, 2008). Джунгарский хомячок является предпочтительным видом для исследования циркадных и сезонных адаптаций, эффектов фотопериодизма (Steinlechner et al., 2002; Gregg, Wynne-Edwards, 2006).

Развитие преимплантационных эмбрионов у джунгарского хомячка (Nieder, Caprio, 1990) и хомячка Кэмпбелла (Erb, Wynne-Edwards, 1993) изучено, но до сих пор репродуктивные технологии по отношению к этим видам не применяли, за исключением единичной попытки культивирования *in vitro* морул и ранних бластоцист джунгарского хомячка (Nieder, Caprio, 1990). Что касается семени, то в литературе отсутствуют какие-либо сообщения о замораживании семени хомячков рода *Phodopus*.

Впервые в мировой практике нам удалось успешно заморозить эмбрионы двух видов хомячков из рода *Phodopus*, а именно: хомячков джунгарского (*P. sungorus*) (Brusentsev et al., 2015) и Кэмпбелла (*P. campbelli*) (Amstislavsky et al., 2015). Впервые продемонстрирована возможность успешного культивирования ранних стадий развития эмбрионов *in vitro* хомячков джунгарского (Brusentsev et al., 2015) и Кэмпбелла (*P. campbelli*) (Amstislavsky et al., 2015). Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что среда R1ЕСМ является более подходящей, чем НЕСМ, для культивирования *in vitro* эмбрионов этих видов хомячков (Amstislavsky et al., 2015; Brusentsev et al., 2015), несмотря на то что первая была разработана специально для крыс (Miyoshi et al., 1995), а последняя – для золотистых хомячков (Schini, Bavister, 1988).

В наших исследованиях показано существенное ускорение развития *in vitro* дробящихся эмбрионов хомячков Кэмпбелла и джунгарского после процедур замораживания–оттаивания путем воздействия на них гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (Amstislavsky et al., 2015; Brusentsev et al., 2015). Доза этого фактора (2 нг/мл) была выбрана на основании изучения литературы по воздействию GM-CSF на развитие эмбрионов мышей, крыс и сирийских хомячков (Robertson et al., 2001; Elaimi et al., 2012) и собственных пилотных экспериментов. Этот фактор роста именно в данной дозе активно начали применять в клиниках ЭКО для повышения эффективности репродуктивных технологий по отношению к человеку (Ziebe et al., 2013). Именно в выбранной дозе GM-CSF в условиях культивирования *in vitro* достоверно повышает образование бластоцист (Brusentsev et al., 2015) и увеличивает в них число бластомеров (Amstislavsky et al., 2015) при культивировании эмбрионов хомячков рода *Phodopus*. Следует отметить, что индекс фрагментации был наименьшим тогда, когда в среду культивирования добавляли GM-CSF (Amstislavsky et al., 2015).

Криоконсервация семени лабораторных животных является важным звеном при создании современных криобанков генетических ресурсов (Amstislavsky и др., 2015). Хотя в настоящее время заморожено семя нескольких десятков видов млекопитающих, до сих пор отсутству-

ют публикации по замораживанию семени хомячков рода *Phodopus*. В наших исследованиях на хомячках джунгарском и Кэмпбелла было проведено сравнение нескольких протоколов замораживания и продемонстрирована возможность успешной криоконсервации эпидидимального семени этих видов с использованием разбавителя семени CaniPlus Chill с глицерином и яичным желтком в качестве криопротектора (данные пока не опубликованы).

В связи с ограниченностью ресурсов и высокими стандартами при разведении и содержании животных для биомедицинских исследований существует потребность создания криобанков лабораторных животных других таксонов, помимо мышей и крыс (Agca, 2012). Таким образом, разработка комплекса репродуктивных технологий по отношению к хомячкам джунгарскому и Кэмпбелла может оптимизировать их содержание и облегчить обмен генетическим материалом между различными лабораториями. С другой стороны, изучение особенностей репродуктивной биологии хомячков рода *Phodopus* и специфики применения технологий криоконсервации эмбрионов и гамет этих видов является важным для решения проблемы сохранения генетических ресурсов Cricetidae в целом.

Домашние и дикие виды кошачьих (Felidae)

В настоящее время насчитывается 37 видов кошачьих, из них 36 видов являются исчезающими (либо включают в себя исчезающие подвиды) (Амстиславский, Анфиногенова, 2010). Кошек иногда применяют в качестве лабораторных животных (Agca, 2012). Благодаря сходству генома кошачьих с геномом человека (Driscoll et al., 2009) и похожим клиническим проявлениями некоторых заболеваний у человека и кошки, последняя незаменима для проведения некоторых медицинских исследований (Griffin, Baker, 2002). Таким образом, разработка репродуктивных технологий по отношению к кошачьим имеет значение и для сохранения исчезающих видов, и для медико-биологических исследований. Однако работа с исчезающими видами кошачьих сопряжена с определенными сложностями, в частности с тератоспермией (Pukazhenthil et al., 2006).

В наших предварительных исследованиях было проведено сравнение нескольких протоколов замораживания семени на домашней кошке (Абрамова и др., 2014). В 2013 г. совместно с группой кандидата биологических наук С.В. Найдено из Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова (ИПЭЭ) РАН мы получили, заморозили и поместили в криохранилище семя амурского (дальневосточного) лесного кота (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). Исследования с применением методов флюоресцентной окраски SYBR Green/PI и последующей конфокальной микроскопии показали, что более 40 % замороженного семени сохраняет жизнеспособность в процессе криоконсервации. Таким образом, впервые была продемонстрирована возможность успешного замораживания семени *Prionailurus bengalensis euptilurus*, который внесен в Красную книгу Приморского края. В 2015 г. список видов был расширен: получено и заморожено семя не только от амурских и домашних котов, но и от самцов красной рыси (*Lynx rufus*).

В наших исследованиях также сделана первая успешная попытка получения дробящихся эмбрионов домашней кошки после ЭКО и последующего культивирования *in vitro* (Абрамова и др., 2014; Амстиславский и др., 2014). Конечной целью данного исследования является получение межвидовых гибридов кошачьих посредством репродуктивных технологий. Как показано нами ранее, межвидовые гибриды могут быть успешно использованы для разработки технологии сохранения исчезающих видов (Amstislavsky et al., 2004; 2006).

На основании проделанной работы можно сделать следующие заключения:

1. Существующие репродуктивные технологии (криоконсервация, культивирование и трансплантация эмбрионов) были применены к лабораторным мышам и крысам, главным образом уникальным линиям, полученным в ИЦиГ СО РАН; создан криобанк генетических ресурсов этих линий и проведена работа по программе редеривации.

2. Впоследствии репродуктивные технологии были усовершенствованы и применены по отношению к другим ценным лабораторным моделям, таким как хомячки рода *Phodopus* и таким представителям семейства кошачьих, как домашняя кошка, амурский (дальневосточный) лесной кот и красная рысь.

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 № 15-04-03258. Авторы выражают благодарность сотрудникам ИПЭиЭ им. А.Н. Северцова РАН: Е.В. Павловой, М.Н. Ерофеевой и С.В. Найдено за помощь в получении семени амурского лесного кота и красной рыси и за предоставленную возможность работы с этими видами кошачьих.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Абрамова Т.О., Кизилова Е.А., Масленникова С.О., Рожкова И.Н., Байбородин С.И., Брусенцев Е.Ю., Найдено С.В., Амстиславский С.Я. Криоконсервация семени кошачьих. Биофизика живой клетки. 2014;10:17-19.

Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Окотруб К.А., Рожкова И.Н. Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных. Онтогенез. 2015; 46(2): 67-81.

Амстиславский С.Я., Абрамова Т.О., Брусенцев Е.Ю., Кизилова Е.А. Криоконсервация и сохранение биоразнообразия. Природа. 2014;9:24-33.

Амстиславский С.Я., Анфиногенова Я.Д. Зверь, приручивший человека. Химия и жизнь – XXI век. 2010;5:28-33.

Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Амстиславский С.Я. Традиционные и современные подходы к культивированию преимплантационных эмбрионов *in vitro*. Онтогенез. 2014;45(2):73-88.

Феоктистова Н.Ю. Хомячки *Phodopus*. Систематика, филогеография, экология, физиология, поведение, химическая коммуникация. М., 2008.

Agca Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals. Theriogenology. 2012;78:1653-1665. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.08.012

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;83:1056-1063. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.013

Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.C. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora. Reprod. Dom. Anim. 2012;47:164-175. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01886.x

Amstislavsky S., Kizilova E., Ternovskaya Y., Zudova G., Lindeberg H., Aalto J., Valtonen M. Embryo development and embryo transfer in the European mink (*Mustela lutreola*), an endangered mustelid species. Reprod. Fert. Dev. 2006;18:459-467. DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/RD05135>

Amstislavsky S., Aalto J., Järvinen M., Lindeberg H., Valtonen M., Zudova G., Ternovskaya Y. Transfer of European mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients. Theriogenology. 2004;62:458-467. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2003.10.011

Brusentsev E.Yu., Igonina T.N., Abramova T.O., Igonina T., Naprimеров V., Feoktistova N., Amstislavsky S. Cryopreservation, *in vitro* culture and transfer of preimplantation embryos in Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). Reprod. Dom. Anim. 2015;50:677-683. DOI: 10.1111/rda.12564

Driscoll C.A., Clutton-Brock J., Kitchener A.C., O'Brien S.J. The taming of the cat. Genetic and archaeological findings hint that wildcats became housecats earlier – and in a different place – than previously thought. Sci. Am. 2009;300:68-75.

Elaimi A., Gardner K., Kistnareddy K., Harper J. The effect of GM-CSF on development and aneuploidy in murine blastocysts. Hum. Reprod. 2012;27:1590-1595. DOI: 10.1093/humrep/des108

Erb G.E., Wynne-Edwards K.E. Preimplantation endocrinology in the Djungarian hamster (*Phodopus campbelli*): progesterone, estrogen, corpora lutea, and embryonic development. Biol. Reprod. 1993;49: 822-830. DOI: 10.1095/biolreprod49.4.822

Fickel J., Wagener A., Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. Eur. J. Wildl. Res. 2007;53: 81-89.

Gregg J.K., Wynne-Edwards K.E. In uniparental *Phodopus sungorus*, new mothers, and fathers present during the birth of their offspring, are the only hamsters that readily consume fresh placenta. Dev. Psychobiol. 2006;48:528-536. DOI: 10.1002/dev.20174

Griffin B., Baker H.J. Domestic cats as laboratory animals. Laboratory Animal Medicine. N.Y.: Acad. Press, 2002.

Landel C.P. Archiving mouse strains by cryopreservation. Lab. Anim. 2005;34:50-57.

Mazur P., Leibo S.P., Seidel G.E.Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. Biol. Reprod. 2008;78:2-12. DOI: 10.1095/biolreprod.107.064113

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. Fert. 1995;103:27-32. DOI: 10.1530/jrf.0.1030027

Nieder G.L., Caprio T.L. Early embryo development in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). Mol. Reprod. Dev. 1990;27:224-229.

Pukazhenthil B.S., Neubauer K., Jewgenow K., Howard J., Wildt D.E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. Theriogenology. 2006;66:112-121. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.020

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 redetermination of rat and mouse models. ILAR J. 2000;41:221-227. DOI: 10.1093/ilar.41.4.221

- Robertson S.A., Sjöblom C., Jasper M.J., Norman R.J., Seamark R.F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 2001;64:1206-1215. DOI: 10.1095/biolreprod.64.4.1206
- Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction.* 2011; 141:1-19. DOI: 10.1530/REP-10-0236
- Schini S.A., Bavister B.D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.* 1988;39:1183-1192. DOI: 10.1095/biolreprod39.5.1183
- Steinlechner S., Stieglitz A., Ruf T. Djungarian hamsters: a species with a labile circadian pacemaker? Arrhythmicity under a light-dark cycle induced by short light pulses. *J. Biol. Rhythms.* 2002;17:248-258. DOI: 10.1177/074873040201700308
- Yoshiki A., Ike F., Mekada K., Kitaura Y., Nakata H., Hiraiwa N., Mochida K., Ijuin M., Kadota M., Murakami A., Ogura A., Abe K., Moriwaki K., Obata Y. The mouse resources at the RIKEN BioResource center. *Exp. Anim.* 2009;58:85-96. DOI: <http://doi.org/10.1538/expanim.58.85>
- Ziebe S., Loft A., Povlsen B.B., Erb K., Agerholm I., Aasted M., Gabrielsen A., Hnida C., Zobel D.P., Munding B., Bendz S.H., Robertson S.A. **A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for *in vitro* fertilization.** *Fertil. Steril.* 2013;99:1600-1609. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.043