

## Повышение воспроизводимости результатов исследования криоконсервирования биообъекта

UDC 635.076: 57.043

L.V. GORBUNOV

## Increase in Reproducibility of Research Results of Bioobject Cryopreservation

С помощью предложенной математической модели определены условия повышения воспроизводимости результатов криобиологического исследования. Показано, что повышение воспроизводимости результатов исследования обеспечивается при учете начального состояния биологического материала и эффективности его использования. Применение данной математической модели повышает воспроизводимость результатов исследования до 5 раз, что дает возможность получить достоверный результат при уменьшении количества биологического материала до 25 раз. Апробация предложенной модели показала, что учет начального состояния спермиев быка и карпа, эмбрионов мыши повышает воспроизводимость результатов в среднем в 1,5 раза, что дает возможность сравнивать результаты, полученные в разных опытах.

**Ключевые слова:** воспроизводимость, математическая модель, криоконсервирование, эффективность, спермии быка и карпа, эмбрионы мыши.

На основі запропонованої математичної моделі визначено умови підвищення відтворюваності результатів криобіологічного дослідження. Показано, що підвищення відтворюваності результатів дослідження забезпечується при врахуванні початкового стану біологічного матеріалу і ефективності його використання. Застосування даної математичної моделі підвищує відтворюваність результатів дослідження до 5 разів, що надає можливість одержати достовірний результат при зменшенні кількості біологічного матеріалу до 25 разів. Апробація запропонованої моделі показала, що врахування початкового стану спермій бугая і коропа, ембріонів миші підвищує відтворюваність результатів в середньому в 1,5 рази, що надає можливість порівнювати результати, одержані в різних дослідах.

**Ключові слова:** відтворюваність, математична модель, криоконсервування, ефективність, спермії бугая і коропа, ембріони миші.

Conditions of reproducibility increase for cryobiological research results were examined with the proposed mathematical model. It has been shown that increase of reproducibility of research results is provided with taking into account the initial state of biological material and the efficiency of its using. Application of this mathematical model increases the reproducibility of research results up to 5 times that provides the obtaining significant result when reducing the biological material number to 25 times. Testing of the suggested model showed, that taking into account of initial state of bovine and carp spermatozoa and murine embryos increased reproducibility of results in average in 1.5 times, allowing the comparison of the results of various experiments.

**Key words:** reproducibility, mathematical model, cryopreservation, efficiency, bovine and carp spermatozoa, murine embryos.

Необходимое условие научного исследования – воспроизводимость его результатов. Анализ опыта работы Института высоких статистических технологий и эконометрики МГТУ им. Н.Э. Баумана показал, что причиной низкой эффективности проведения эксперимента является применение устаревших и частично ошибочных статистических технологий [9]. Экономический эффект от использования статистического контроля в промышленности США составляет 0,8% от валового национального продукта (20 млрд долларов в год), что существенно больше, чем от любого иного экономико-математического метода.

При использовании несовершенных статистических технологий в криобиологических исследованиях невозможны учет начального состояния

The requirement to scientific research is reproducibility of its results. Analysis of the experience of the Institute of High Technologies and Econometrics of N.E. Bauman Moscow State Technical University (MSTU) showed that the reason of low efficiency of performed experiment was the usage of outdated and partially incorrect statistical technologies [9]. Economical effect of using statistical control in the USA industry makes 0.8% of gross national product (20 billion dollars annually) that is significantly higher than any other economical-mathematical method.

When using imperfect statistical technologies in cryobiological researches a scientist could not take into account an initial state of bioobject and efficiency determination of its cryopreservation stages, and that is the reason of low reproducibility of experimental re-

Институт животноводства УААН, г. Харьков

Institute of Cattle Breeding of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov

\* Адрес для корреспонденции: п/в Кулинич, Харьковский район, Харьковская область, Украина, 62404; тел.: (+38 057) 740-31-66, электронная почта: lab\_cryo@ukr.net

\* Address for correspondence: PO Kulinichi, Kharkov region, Ukraine 61480; tel.: +380 57 740 3166; e-mail: lab\_cryo@ukr.net

биообъекта и определение эффективности этапов его криоконсервирования, что является причиной низкой воспроизводимости результатов опытов [3–6]. Сохранность нативных спермиев и эмбрионов в разных опытах может изменяться в пределах нескольких десятков процентов [4–6]. Это ограничивает возможность применения методов многофакторного исследования при работе со спермиями и эмбрионами.

Общепринятые параметрические ( $t$ ) и непараметрические ( $\chi^2$ ) критерии анализа полученных результатов основаны на усреднении показателей сохранности биообъекта, оцененного до и после эксперимента [1, 7]. Недостатком данных методов является большое количество проб (эякулятов или эмбрионов  $n \geq 30$ ) в каждой выборке, что связано с ранговым распределением значений сохранности биообъекта (оценка в баллах). Следствиями усреднения рангового распределения показателей сохранности биообъекта являются большой расход биологического материала для получения достоверного результата и сложность сравнения результатов отдельных опытов.

Таким образом, низкая воспроизводимость результатов отдельных опытов затрудняет сопоставимость данных всего эксперимента. С помощью общепринятых способов парного сравнения результатов сохранности биообъекта (в опыте и контроле) невозможно определить эффективность процедуры его криоконсервирования и отдельных её этапов (культивирование, применение криопротектора и режима замораживания-оттаивания). Для сопоставления результатов, полученных в разных опытах, при малом количестве проб ( $n \leq 30$ ) необходимо создать математическую модель, обеспечивающую учет индивидуальных особенностей биообъекта и оценку эффективности выбранного способа его криоконсервирования.

Цель работы – разработать математическую модель, повышающую воспроизводимость результатов криобиологического исследования, и определить условия, обеспечивающие уменьшение количества используемого биообъекта.

### Материалы и методы

Сохранность биообъекта, оцененную на  $i$ -м этапе криоконсервирования, определяли из выражения:

$$S_i = \frac{n_i}{n_0}, \quad (1)$$

где  $n_i$  – количество пригодного к дальнейшему использованию биообъекта, оцененного на  $i$ -м этапе криоконсервирования;  $n_0$  – общее количество биообъекта.

Integrity of native spermatozoa and embryos in different experiments could vary within the range of several tens of percent [4–6]. It limits the possibility of multifactor research methods' application when working with spermatozoa and embryos.

Conventional parametric ( $t$ ) and non-parametric ( $\chi^2$ ) criteria of analysis of the obtained results are based on averaging the integrity indices for the bioobject, estimated prior to and after the experiment [1, 7]. A huge number of the samples (either ejaculates or embryos  $n \geq 30$ ) in each sampling, associated with the rank distribution of the bioobject integrity values (estimation in points) is disadvantage of these methods. A high expenditure of biological material for obtaining a significant result and difficulty of its comparison in different experiments are the results of rank distribution averaging of the bioobject integrity indices.

Thus, low reproducibility of the results of different experiments makes difficult a comparability of the whole experiment data. It is impossible to determine the efficiency of cryopreservation and its single stages (culturing, exposure in cryoprotectant and utilized freeze-thawing protocol) for the results of bioobject integrity (in the experiment and control) using conventional paired comparison methods. It is necessary to develop a mathematical model, providing consideration of the individual peculiarities of bioobject and estimation of efficiency of chosen cryopreservation method to compare the results, obtained in different experiments with a little number of the samples ( $n \leq 30$ ).

The research aim was to develop the mathematical model, increasing the reproducibility of the results of cryobiological research and to establish the conditions, providing the reduction of the used bioobject's amount.

### Materials and methods

Integrity of bioobject, evaluated at  $i$ -th cryopreservation stage was determined by the formula:

$$S_i = \frac{n_i}{n_0}, \quad (1)$$

where  $n_i$  is amount of bioobject, suitable for further use, evaluated at  $i$ -th stage of cryopreservation;  $n_0$  is total amount of bioobject.

Integrity of bioobject is the value of general probability, which may be presented as the product of conditional probabilities of consequently related events according to the Bayes' formula [1,7]:

$$S_i = S_c \prod_{i=1}^3 W_i, \quad (2)$$

where  $S_c$  is initial integrity of bioobject, *i. e.* ratio of number  $n_c$  of suitable native bioobject to total number  $n_0$  ( $S_c = n_c/n_0$ );  $W_i$  is efficiency of  $i$ -th stage of cryopreservation:

Сохранность биообъекта является величиной общей вероятности, которая может быть представлена как произведение условных вероятностей последовательно связанных событий в соответствии с формулой Байеса [1, 7]:

$$S_i = S_c \prod_{i=1}^3 W_i, \quad (2)$$

где  $S_c$  – начальная сохранность биообъекта, т. е. отношение количества пригодного нативного биообъекта  $n_c$  к общему числу  $n_0$  ( $S_c = n_c/n_0$ );  $W_i$  – эффективность  $i$ -го этапа процедуры криоконсервирования: культивирования  $W_k$ , применения криопротектора  $W_p$ , замораживания-оттаивания  $W_z$ , полного цикла криоконсервирования  $W_d$ .

Сохранность биообъекта определяли на следующих этапах: культивирование ( $S_k = S_c W_k$ ); обработка криопротектором и культивирование ( $S_t = S_c W_t W_k$ ); замораживание-оттаивание и культивирование ( $S_d = S_c W_p W_z W_k = S_c W_d$ ). Следовательно, из выражения (2) можно определить эффективность  $i$ -го этапа криоконсервирования через отношение показателей сохранности биообъекта на заданном и предшествующем этапах:

$$W_i = \frac{S_i}{S_{i-1}}. \quad (3)$$

Оценивали показатель эффективности на этапах: культивирования  $W_k = S_k/S_c$ ; применения криопротектора  $W_t = S_t/S_k$ ; замораживания-оттаивания  $W_z = S_d/S_t$ ; полного цикла криоконсервирования  $W_d = S_d/S_c = W_t W_z W_k$ .

Среднеквадратическое отклонение рассчитывали по методу альтернативного варьирования [1, 7]:

$$\sigma = \sqrt{P(1-P)}, \quad (4)$$

где  $P$  – вероятность сохранности (1) или эффективность криоконсервирования биообъекта (3).

Воспроизводимость результатов эксперимента оценивали при помощи коэффициента вариации:

$$C_v = \frac{\sigma}{P} \cdot 100\%. \quad (5)$$

Повышение воспроизводимости результатов эксперимента определяли как отношение величин коэффициентов вариации, полученных для показателя сохранности и эффективности криоконсервирования биообъекта:

$$z = \frac{C_{vS}}{C_{vW}}. \quad (6)$$

$W_k$  of culturing,  $W_t$  of cryoprotectant use,  $W_z$  of freeze-thawing,  $W_d$  of complete cycle of cryopreservation.

Integrity of bioobject was determined at the following stages: culturing ( $S_k = S_c W_k$ ); treatment with cryoprotectant and culturing ( $S_t = S_c W_t W_k$ ); freeze-thawing and culturing ( $S_d = S_c W_p W_z W_k = S_c W_d$ ). Therefore the efficiency of  $i$ -th stage of cryopreservation could be determined from the formula (2) through relation of the indices of bioobject integrity at given and previous stages:

$$W_i = \frac{S_i}{S_{i-1}}. \quad (3)$$

Index of efficiency was estimated for the following stages:  $W_k = S_k/S_c$  for culturing;  $W_t = S_t/S_k$  for cryoprotectant application;  $W_z = S_d/S_t$  for freeze-thawing;  $W_d = S_d/S_c = W_t W_z W_k$  for complete cycle of cryopreservation.

Root-mean-square deviations were evaluated by the method of alternative variation [1, 7]:

$$\sigma = \sqrt{P(1-P)}, \quad (4)$$

where  $P$  is probability of integrity (1) or efficiency of bioobject cryopreservation (3).

Reproducibility of experimental results was estimated with variation coefficient:

$$C_v = \frac{\sigma}{P} \cdot 100\%. \quad (5)$$

Increase of experimental results' reproducibility was determined as the ratio of values of variation coefficients, obtained for integrity and efficiency of bioobject cryopreservation:

$$z = \frac{C_{vS}}{C_{vW}}. \quad (6)$$

Minimal amount of bioobject, providing significant mean value of the indices of integrity and efficiency of cryopreservation, was determined according to [2, 3]:

$$n = \left( \frac{t}{p} C_v \right)^2, \quad (7)$$

where  $t$  is Student's criterion (at  $n > 30$   $t = 2$ );  $p$  is admissible relative error ( $p = 5\%$ )

Decrease in bioobject's amount was estimated as the ratio of minimum number of bioobjects, providing the significance of its integrity estimation, to cryopreservation efficiency ( $h = n_s/n_w$ ). During substitution by (7) and reduction of the values of admissible relative error  $p$  and Student's  $t$  criterion with further replacement for (6) we obtain:

$$h = z^2. \quad (8)$$

Минимальное количество биообъекта, обеспечивающего достоверное среднее значение показателей сохранности и эффективности криоконсервирования, определяли по [2, 3]:

$$n = \left( \frac{t}{p} C_v \right)^2, \quad (7)$$

где  $t$  – критерий Стьюдента (при  $n > 30$   $t = 2$ );  $p$  – допустимая относительная ошибка ( $p = 5\%$ ).

Уменьшение количества биообъекта оценивали как отношение минимального числа биообъекта, обеспечивающего достоверное значение оценки его сохранности, к эффективности криоконсервирования ( $h = n_s/n_w$ ). При подстановке (7) и сокращении значений допустимой относительной ошибки  $p$  и критерия Стьюдента  $t$  с последующей заменой на (6) получаем:

$$h = z^2. \quad (8)$$

Предложенную математическую модель проверяли на основе полученных результатов криоконсервирования спермиев быка, карпа и эмбрионов мыши [3–6]. В каждом отдельном опыте изменяли только один технологический параметр в соответствии с [1, 7]. Защитную среду для криоконсервирования спермы карпа готовили по методике Л.И. Цветковой [11], а быка – по методике Ф.И. Осташко [10]. Все манипуляции с эмбрионами мыши – выделение и подготовка к экспериментам проводили по общепринятым методикам [8]. В качестве криопротектора применяли раствор 1 М глицерина. Эмбрионы инкубировали в данном растворе при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. После замораживания-отогрева криопротектор отмывали с помощью раствора 0,5 М сахарозы. Замораживание спермиев и эмбрионов осуществлялось в разработанных нами устройствах, основанных на пассивном охлаждении термоблока в горловине сосудов Дьюара X-34 ( $V = 35$  л) и X-5 ( $V = 5$  л) [3].

Экспериментально полученные значения среднеквадратического отклонения эффективности  $i$ -го этапа криоконсервирования биообъекта рассчитывали по [1, 7]:

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k (W_i - W_{ji})^2}{n-1}}, \quad (9)$$

где  $W_{ji}$  – эффективность криоконсервирования  $j$ -го эмбриона (или спермодозы для спермиев), вычисленная как отношение показателей сохранности  $j$ -го биообъекта на  $i$ -м  $S_{ji}$  и предшествующем  $S_{i-1}$  этапах криоконсервирования;  $n$  – общее количество эмбрионов (спермодоз).

The suggested mathematical model was examined on the base of the obtained results of bovine, carp spermatozoa and murine embryos' cryopreservation [3–6]. In each particular experiment just one technologic parameter was changed according to [1, 7]. Protective medium for cryopreservation of carp sperm was prepared according to L.I. Tsvetkova [11], for bovine sperm the method of F.I. Ostashko [10] was used. All manipulations with murine embryos such as obtaining and preparing to the experiments were carried-out according to the standard methods [8]. As cryoprotectant 1M glycerol solution was used. Embryos were incubated in cryoprotectant solution at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  during 10 min. Cryoprotectant was washed-out after freeze-thawing using the 0.5 M sucrose solution. The spermatozoa and embryos were frozen-thawed in developed by us devices, which are based on passive cooling of thermoblock in the neck of Dewar vessels X-34 (35 l) and X-5 (5 l).

The experimentally obtained values of root-mean-square deviation of efficiency of bioobject  $i$ -th cryopreservation stage were evaluated [1, 7]:

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k (W_i - W_{ji})^2}{n-1}}, \quad (9)$$

where  $W_{ji}$  is efficiency of  $j$ -th embryo cryopreservation (or dose for spermatozoa) calculated as the ratio of  $j$ -th bioobject's integrity assessed at the  $i$ -th cryopreservation stage  $S_{ji}$  and the previous stage  $S_{j-1}$ ;  $n$  is total number of embryos (sperm doses).

Integrity  $S_{ji}$  was determined as the ratio of  $n_{ji}$ , the number of admissible  $j$ -th bioobject at  $i$ -th stage to  $n_{j0}$ , the initial number of  $j$ -th bioobject.

For reduction of root-mean-square deviation value (9) the current values of integrity  $W_{ji}$  of  $j$ -th bioobject, assessed at the  $i$ -th stage of cryopreservation,  $W_p$  were averaged. This operation eliminates systemic errors of experiments by transition from indirect measurements to direct ones [1, 7].

## Results and discussion

The mathematical model, based on the Bayes' formula (2) and (3), was developed for determination of the conditions of increase for cryobiological research results' reproducibility. For testing of the suggested mathematical model the expressions (4–8) were used. Efficiency indices were calculated by substitution of virtual values of integrity of the bioobject, assessed at different stages of cryopreservation: 80% after obtaining, 70% after culturing, 60% after cryoprotectant application and culturing, 50% after freeze-thawing and culturing (Table 1). Variation coefficients made 50, 65, 82 and 100%, correspondingly. Obtained efficiency indices for culturing made 88%, equilibration in cryopro-



Сохранность  $S_{ji}$  определяли как отношение количества пригодного  $j$ -го биообъекта на  $i$ -м этапе  $n_{ji}$  к начальному количеству  $j$ -го биообъекта  $n_{j0}$ .

Для уменьшения величины среднеквадратического отклонения (9) усредняли текущие значения  $W_{ji}$  относительной сохранности  $j$ -го биообъекта, оцененного на  $i$ -м этапе криоконсервирования  $W_i$ . Данная операция устраняет систематические ошибки опытов посредством перехода от косвенных измерений к прямым [1, 7].

### Результаты и обсуждение

Для определения условий повышения воспроизводимости результатов криобиологического исследования создана математическая модель, основой которой являются формулы Байеса (2) и (3). Для апробации предложенной математической модели применяли выражения (4–8). Показатели эффективности рассчитывали посредством подстановки виртуальных значений сохранности биообъекта, оцененного на разных этапах криоконсервирования: после получения – 80%, культивирования – 70%, применения криопротектора и культивирования – 60%, процедур замораживания-оттаивания и культивирования – 50% (табл. 1). Коэффициенты вариации составили 50, 65, 82 и 100% соответственно. Получены показатели эффективности для этапов: культивирования – 88%, эквilibрации в криопротекторе – 86%, замораживания-оттаивания – 83%, полного цикла криоконсервирования – 63%. При этом коэффициенты вариации снижаются до 38, 41, 45 и 77% соответственно.

Применение относительных показателей (3) для оценки эффективности составляющих этапов криоконсервирования повышает воспроизводимость результатов эксперимента в 1,3–2,2 раза, что дает возможность получения достоверных данных при уменьшении количества используемого биообъекта в 1,7–5 раз (табл. 1).

Для определения условий повышения воспроизводимости результатов криоконсервирования биообъекта в зависимости от его начального состояния и эффективности выбранного этапа(ов) криоконсервирования необходимо рассчитать

tectant did 86%, freeze-thawing did 83% and complete cycle of cryopreservation did 63%. Herewith the variation coefficients decrease down to 38, 41, 45 and 77%, correspondingly.

Use of relative indices (3) for evaluation of cryopreservation stages' efficiency increases the reproducibility of experimental results in 1.3–2.2 times, enabling to obtain significant data during reduction of the used bioobject's amount in 1.7–5 times (Table 1).

To determine the conditions of bioobject cryopreservation results' reproducibility increase in dependence on its initial state and efficiency of the selected stage(s) of cryopreservation it is necessary to calculate the complete cycle of cryopreservation (1–8). The obtained results show that considering the efficiency of bioobject cryopreservation stage(s) increases the reproducibility of the study results in 1.1–4.9 times in the case if bioobject integrity decreases from 90 down to 30% (Table 2). It enables the obtaining of significant result even after reducing the amount number of bioobject in 1.2–24 times [2]. Increasing the reproducibility of the results has been found when analyzing the final stage of technological chain after decreasing of biological object integrity (Tables 1 and 2).

For testing the suggested model the comparative analysis of the calculated by (2) and (3) values and empirically obtained from (1) data of cryopreservation of various biological material (bovine and carp spermatozoa and murine embryos) was carried out (Table 3). Analysis of experimentally obtained data showed that efficiency of two-step cooling of carp spermatozoa

**Таблица 1.** Уменьшение количества используемого биообъекта посредством повышения воспроизводимости результатов криобиологического эксперимента

**Table 1.** Reduction of used bioobject's amount by reproducibility increase of cryobiological experimental results

Этапы криоконсервирования биообъекта Bioobject cryopreservation stages	Сохранность, % Integrity, %			Эффективность, % Efficiency, %			z	h
	S	$C_s$	$n_s$	W	$C_w$	$n_w$		
Получение Obtaining	80	50	400	–	–	–	–	–
Культивирование Culturing	70	65	686	88	38	229	1,73	3,00
Эквilibрация Equilibration	60	82	1067	86	41	267	2,00	4,00
Замораживание Freezing	50	100	1600	83	45	320	2,24	5,00
Криоконсервирование Cryopreservation				63	77	960	1,29	1,67

**Примечание:**  $S, W$  – средние значения;  $C_s, C_w$  – коэффициенты вариации;  $n_s, n_w$  – минимальное количество биообъекта, обеспечивающее уровень надежности среднего значения  $P = 0,95$ ;  $z$  – кратность повышения воспроизводимости результатов (6);  $h$  – коэффициент сокращения количества биообъекта (8).

**Note:**  $S, W$  are mean values;  $C_s, C_w$  are coefficients of variation;  $n_s, n_w$  are minimum numbers of bioobject, providing reliability level of mean value  $P = 0.95$ ;  $z$  – increase multiplicity for reproducibility of results (6);  $h$  – coefficient of bioobject's amount reduction (8).

полный цикл криоконсервирования (1–8). Полученные результаты показывают, что учет эффективности составляющих этапа(ов) криоконсервирования биообъекта при снижении его сохранности от 90 до 30% повышает воспроизводимость результатов исследования в 1,1–4,9 раза (табл. 2). Это дает возможность получить достоверный результат при уменьшении количества биообъекта в 1,2–24 раза [2]. Повышение воспроизводимости результатов установлено при анализе завершающих этапов технологической цепи вследствие снижения сохранности биологического объекта (табл. 1, 2).

Для проверки предложенной модели проведен сравнительный анализ расчетных значений по (2) и (3) и эмпирически полученных данных по (1) после криоконсервирования различных типов биологического материала: спермиев быка, карпа, эмбрионов мыши (табл. 3). Анализ экспериментально полученных данных показал, что эффективность двухступенчатого охлаждения спермиев карпа достигает 58, а быка – 70%, что обеспечивает сохранность 45 и 52% соответственно [3, 4]. Показатели эффективности применения криопротектора составляют 92–94% и режимов замораживания–оттаивания – 77–89%. Более высокое значение эффективности криоконсервирования получено для эмбрионов мыши – 93%, на этапах применения криопротектора – 87%, режима замораживания – 100%, при которых уровень сохранности составил 80% [5, 6].

Установлено влияние вариации начального состояния спермиев карпа на разброс показателей их сохранности, оцененных на этапе инкубации с криопротектором (51–67%) и после деконсервирования (35–52%). В результате применения показателя эффективности криоконсервирования данный разброс уменьшился более чем в 2 раза относительно сохранности и составил 68–78 и 46–51% соответственно для каждого этапа [4].

Показано, что разные способы криоконсервирования спермиев карпа и вариация их различного начального состояния дают практически одинаково-

**Таблица 2.** Повышение воспроизводимости результатов эксперимента в зависимости от начальной сохранности биообъекта и эффективности выбранного этапа(ов) криоконсервирования

**Table 2.** Increase of reproducibility of experimental results depending on initial integrity of bioobject and efficiency of chosen cryopreservation stage(s)

Эффективность этапа(ов) криоконсервирования, % Efficiency of cryopreservation stage(-s), %	Повышение воспроизводимости, усл. ед. Increase in reproducibility, arbitrary units							
	Начальная сохранность биообъекта, % Initial integrity of bioobjects, %							
	30	40	50	60	70	80	90	100
10	1,90	1,63	1,45	1,32	1,21	1,13	1,06	1,00
20	1,98	1,70	1,50	1,35	1,24	1,15	1,07	1,00
30	2,08	1,77	1,56	1,40	1,27	1,16	1,08	1,00
40	2,21	1,87	1,63	1,45	1,31	1,19	1,09	1,00
50	2,38	2,00	1,73	1,53	1,36	1,22	1,11	1,00
60	2,61	2,18	1,87	1,63	1,44	1,27	1,13	1,00
70	2,96	2,45	2,08	1,80	1,56	1,35	1,17	1,00
80	3,56	2,92	2,45	2,08	1,77	1,50	1,25	1,00
90	4,93	4,00	3,32	2,77	2,3	1,87	1,45	1,00
100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

**Примечание:** см. табл. 1.

**Note:** see Table 1.

achieved 58 and bovine done 70%, that provided integrity of 45 and 52%, correspondingly [3, 4]. Efficiency of cryoprotectant application made 92–94% and freeze-thawing regimens did 77–89%. Higher efficiency value was obtained for murine embryos, 93%; for the stages of cryoprotectant application it made 87% and for freezing regimen it was 100%, where the integrity level was 80% [5, 6].

It has been established that the effect of variation of carp spermatozoa initial state on the dispersion of their integrity indices, assessed at the stage of incubation in cryoprotectant, was 51–67% and after freeze-thawing it was 35–52%. After application of cryopreservation efficiency index this dispersion decreased twice for integrity and made 68–78 and 46–51%, correspondingly, for each stage [4].

It has been shown that different methods of carp spermatozoa cryopreservation and variation of their initial state provide almost the same dispersion of integrity indices, 35–53 and 35–52%, correspondingly. When estimating the efficiency of cryopreservation the dispersion of the values made 44–67% for different methods of freezing spermatozoa, derived from one ejaculate. When using different ejaculates and one method of freezing the dispersion made 53–65% (initial motility of spermatozoa varied from 60 to 90%).

вый разброс показателей сохранности 35–53 и 35–52% соответственно. При оценке эффективности криоконсервирования разброс значений составляет 44–67% для разных способов замораживания спермиев, полученных из одного эякулята. При использовании разных эякулятов и одного способа замораживания разброс составил 53–65% (начальная подвижность спермиев варьировала от 60 до 90%). При почти одинаковой начальной подвижности спермиев быка 70–80% и разных способах криоконсервирования разброс показателей их сохранности составил 13–52%, а эффективности – 20–70%.

Переход к показателям эффективности дает возможность в 2 раза уменьшить влияние качества (от удовлетворительного до отличного) эмбрионов мыши на оценку этапов выбранного способа криоконсервирования: инкубация с криопротектором – 77–95%, режим охлаждения-отогрева – 73–93%. Состояние эмбрионов оценивали по морфологическим показателям и развитию в культуре *in vitro* [5, 6]. При вариации начального состояния эмбрионов мыши (от удовлетворительного до отличного) разброс сохранности деконсервированного объекта составил 31–80%, что в 1,4 раза больше (см. табл. 2), чем расхождение сохранности – 52–86%, обусловленное выбором способа криоконсервирования. При использовании показателей эффективности криоконсервирования биообъекта разброс уменьшился в 1,6 раза относительно сохранности и составил 64–83 и 63–93% соответственно.

Для исследования вариации показателей сохранности и эффективности проанализированы величины их коэффициентов вариации (табл. 3). В результате сопоставления коэффициентов вариации (6) установлено увеличение в 1,2–3,8 раза воспроизводимости результатов опытов при использовании показателей эффективности (3) относительно сохранности (1). Такое расхождение полученных величин объясняется влиянием разного начального состояния биообъекта, с одной стороны, и особенностями последовательно применяемых методов криоконсервирования, с другой, на состояние исследуемой системы криоконсервирования.

Выявлена следующая закономерность: чем больше разброс сохранности, тем выше чувствительность показателя эффективности к оценке состояния анализируемого способа криоконсервирования. Различное начальное состояние эмбрионов дает более высокие показатели коэффициентов вариации, оцененные по сохранности (50–149%) и эффективности (38–46%), чем выбор способа криоконсервирования

Use of quite similar initial motility of bovine spermatozoa 70–80% and different methods of cryopreservation provides the range of their integrity indices of 13–52%, and efficiency of 20–70%.

The transition to the efficiency indices enables the double decrease of murine embryo quality influence (from satisfactory to excellent) on the estimation of chosen cryopreservation protocol stages: application of cryoprotectant gave 77–95% and cooling-thawing regimen does 73–93%. State of embryos was assessed by morphological indices and *in vitro* development [5, 6]. When varying the initial state of murine embryos (from satisfactory to excellent) the dispersion of frozen-thawed object integrity made 31–80% which is in 1.4 times (see Table 2) higher than the integrity dispersion of 52–86% due to selection of cryopreservation method. When using the indices of bioobject cryopreservation efficiency the dispersion decreased in 1.6 times as for integrity and made 64–83 and 63–93%, correspondingly.

For study of integrity and efficiency indices' variation the values of its variation coefficients were analyzed (Table 3). After the correlation of variation coefficients (6) the increase of experimental results' reproducibility in 1.2–3.8 times was established when using the efficiency indices (3) relative to integrity (1). This difference of the obtained values is explained by the effect of different initial states of bioobject on the one hand, and peculiarities of sequentially applied cryopreservation methods on the state of cryopreservation studied system, on another hand.

The following regularity was found: the higher is integrity variation, the higher is the sensitivity of efficiency index to the estimation of analyzed cryopreser-

**Таблица 3.** Воспроизводимость сохранности биообъекта (*S*) и эффективности его криоконсервирования (*W*), обусловленная выбором технологии (различным начальным состоянием)  
**Table 3.** Reproducibility of integrity of *S* bioobject and *W* efficiency of its cryopreservation, due to the technology selected (various initial state)

Биообъект Bioobject	Разброс показателей $M_{\min} + M_{\max}$ , $M \{S, W, C\}$ , % Dispersion of indices $M_{\min} + M_{\max}$ , $M \{S, W, C\}$ , %				
	<i>S</i>	$C_s$	<i>W</i>	$C_w$	$z = C_s / C_w$
Спермий карпа Carp sperm	35+53 (35+52)	94+137 (96+136)	44+67 (53+65)	70+113 (73+94)	1,2+1,3 (1,3+1,5)
Спермий быка Bovine sperm	13+52	96+258	20+70	66+200	1,3+1,5
Эмбрионы мыши Murine embryos	52+86 (31+80)	40+96 (50+149)	63+93 (64+83)	30+36 (38+46)	1,3+2,7 (1,3+3,2)

**Примечание:** см. табл. 1.

**Note:** see Table 1.



(40–96 и 30–36% соответственно). Влияние различного качества эмбрионов мыши на вариацию сохранности биообъекта в 1,3–3,2 раза больше, чем выбор способа криоконсервирования.

Таким образом, применение в качестве инструмента научного исследования методов математического моделирования повышает воспроизводимость результатов криобиологического эксперимента. Данная модель позволяет определить эффективность выбранного способа криоконсервирования и его составляющих этапов. Показано, что на оценку сохранности спермиев и эмбрионов животных оказывают влияние начальное состояние биообъекта и особенности этапов выбранного способа криоконсервирования. Низкая воспроизводимость результатов сохранности деконсервированных спермиев и эмбрионов животных, а также отсутствие возможности их сопоставления при использовании разных методов проведения эксперимента обусловили необходимость применения предложенных критериев оценки эффективности разных этапов криоконсервирования. При переходе к показателям эффективности повышается воспроизводимость опытов в среднем в 1,5 раза, что обеспечивает условие сопоставимости результатов, полученных в разных опытах. Поэтому учет состояния биообъекта и выбранного способа криоконсервирования посредством описанной модели может быть основой многофакторного исследования механизмов криоповреждения объекта с целью дальнейшего повышения эффективности криоконсервирования спермиев и эмбрионов животных.

### Выводы

1. Повышение воспроизводимости результатов исследования обеспечивается учетом начального состояния биологического материала и эффективности этапов его криоконсервирования.

2. Применение предложенной математической модели повышает воспроизводимость результатов исследования до 5 раз, что дает возможность получить достоверный результат при снижении расхода биологического материала до 25 раз.

3. Экспериментальная проверка предложенной модели показала высокую сходимость полученных результатов. Переход к предложенным показателям оценки эффективности криоконсервирования спермиев быка и карпа, эмбрионов мыши повышает воспроизводимость результатов в среднем в 1,5 раза, что дает возможность сопоставлять результаты, полученные в разных опытах.

### Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика.– М.: Практика, 1998.– 459 с.

vation method state. Different initial state of embryos provides higher indices of variation coefficients during estimation of integrity (50–149%) and efficiency (38–46%) if compared with the effect of chosen cryopreservation method (40–96 and 30–36%, correspondingly). Effect of various quality of murine embryos on variation of bioobject's integrity is 1.3–3.2 times higher than effect of cryopreservation method selection.

Thus, application of the methods of mathematical modeling as the scientific research tool increases the reproducibility of the results of cryobiological experiment. This model enables to determine the efficiency of the selected method of cryopreservation and its particular stages. It has been shown that initial state of bioobject and peculiarities of stages of the selected cryopreservation method affect the estimation of integrity of animal spermatozoa and embryos. Low reproducibility of the integrity results of frozen-thawed animal spermatozoa and embryos and also the absence of possibility of their correlation when using different methods of carrying-out the experiment stipulated the necessity of application of the suggested criteria of efficiency estimation for various cryopreservation stages. When transit to the efficiency indices the experimental reproducibility increases in average in 1.5 times providing condition of correlation of the results, obtained in different experiments. Therefore, taking into account the bioobject's state and the selected method of cryopreservation by means of described model may be the base of multifactor research of the mechanisms of bioobject's cryodamage for the further increase of efficiency of animal spermatozoa and embryos cryopreservation .

### Conclusions

1. Taking into account the initial condition of biological material and efficiency of its cryopreservation stages provides an increased reproducibility of the research results.

2. Using the suggested mathematical model increases the reproducibility of results up to 5 times, enabling to obtain significant result when reducing the usage of biological material to 25 times.

3. Experimental test of the suggested model showed a high convergence of the obtained results. Transition to the suggested indices for estimating the efficiency of bovine, carp spermatozoa and murine embryos' cryopreservation increase reproducibility of results in average in 1.5 times, enabling the correlation of the results obtained in various experiments.

### References

1. Glants S. Medical-biological statistics.– Moscow: Praktika, 1998.– 459 p.



2. Горбунов Л.В. Определение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный научный результат // *Агроэкологический журнал*.– 2002.– Вип. 1.– С. 69–71.
3. Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов.– Киев, 2005.– 325 с.
4. Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П. Вплив різної якості еякуляту на оцінку ефективності реалізації складових етапів криоконсервування спермій коропа // *Рибне господарство*.– 2007.– Вип. 1.– С. 32–35.
5. Горбунов Л.В., Саліна А.С. Вплив різної якості ембріонів мишей на оцінку способу криоконсервування // *НТБ ІБТ УААН*.– 2007.– Вип. 8, №1, 2.– С. 283–287.
6. Горбунов Л.В., Саліна А.С. Оценка эффективности составляющих этапов способа криоконсервирования эмбрионов млекопитающих // *Наук. вісник Націон. аграр. ун-ту*.– 2007.– Вип. 114.– С. 57–64.
7. Лакін Б.Ф. Биометрия.– М.: Высш. шк., 1990.– 254 с.
8. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы.– М.: Мир, 1990.– 406 с.
9. Орлов А.И. Высокие статистические технологии // *Заводская лаборатория*.– 2003.– Т. 69, №11.– С. 55–60.
10. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота.– Киев: Наук. думка, 1995.– 195 с.
11. Цветкова Л.И., Савушкина С.И., Титарева Л.Н. и др. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа лососевых и осетровых видов рыб.– М., 1997.– 11 с.
2. Gorbunov L.V. Examining minimal number of measurings, providing significant scientific result // *Agroekologichnyy zhurnal*.– 2002.– Issue 1.– P. 69–71.
3. Gorbunov L.V., Buchatskiy L.P. Cryopreservation of sexual cells and embryos.– Kiev, 2005.– 325 p.
4. Gorbunov L.V., Buchatskiy L.P. Effect of different ejaculate quality on implementation efficiency estimation of the cryopreservation comprising stages for carp spermatozoa // *Rybne Gospodarstvo*.– 2007.– Issue 1.– P. 32–35.
5. Gorbunov L.V., Salina A.S. Effect of different quality of murine embryos on estimation of cryopreservation method// *Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Breeding Biology of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences*.– 2007.– Issue 8, N1, 2.– P. 283–287.
6. Gorbunov L.V., Salina A.S. Efficiency estimation of the comprising stages of cryopreservation method for mammalian embryos // *Nauk. Visnyk of National Agrarian University*.– 2007.– Issue 114.– P. 57–64.
7. Lakin B.F. Biometriya.– Moscow: Vysshaya shkola, 1990.– 254 p.
8. Monk M. Mammalian development. A practical approach.– Oxford: IRL Press, 1987.– 335 p.
9. Orlov A.I. High statistical technologies // *Zavodskaya Laboratoriya*.– 2003.– Vol. 69, N11.– P. 55–60.
10. Ostashko F.I. Cattle reproduction biotechnology.– Kiev: Naukova Dumka, 1995.– 195 p.
11. Tsvetkova L.I., Savushkina S.I., Titareva L.N. et al. Methodical manual on cryopreservation of carp, salmon and sturgeon spermatozoa.– Moscow, 1997.– 11 p.

*Поступила 16.11.2009  
Рецензент А.И. Осецкий*

*Accepted in 16.11.2009*