

Обеспечение условий сопоставимости результатов криоконсервирования эмбрионов млекопитающих

UDC 635.076: 57.043

L.V. GORBUNOV^{1*}, E.A. GORDIENKO²

Providing the Comparability Conditions of Results on Cryopreservation of Mammalian Embryos

Предложена математическая модель оценки начального состояния и эффективности этапов криоконсервирования эмбрионов млекопитающих, обеспечивающая сопоставимость результатов при использовании разных способов замораживания. Показано, что начальная жизнеспособность эмбрионов коровы составляет 70–100% и зависит от физиологического состояния эмбрионов и их донора. Эффективность криоконсервирования эмбрионов мыши и коровы варьирует от 53 до 95%, что обусловлено состоянием зародышей и особенностями применяемых способов. Учёт индивидуальных особенностей биообъекта и способа криоконсервирования (начального состояния и эффективности этапов) обеспечивает достоверность полученных значений $P \geq 0,95$ при уменьшении количества эмбрионов млекопитающих до десяти раз.

Ключевые слова: воспроизводимость, сопоставимость, криоконсервирование, эффективность, эмбрионы млекопитающих.

Запропоновано математичну модель оцінки початкового стану і ефективність етапів криоконсервування ембріонів ссавців, яка забезпечує співставлення результатів при використанні різних способів заморожування. Доведено, що початкова життєздатність ембріонів корови складає 70–100% і залежить від фізіологічного стану ембріонів та їх донора. Ефективність криоконсервування ембріонів миші і корови варіює від 53 до 95%, що обумовлено станом зародків і особливостями вживаних способів. Врахування індивідуальних особливостей біооб'єкта і способу криоконсервування (початкового стану і ефективності етапів) забезпечує вірогідність одержаних значень $P \geq 0,95$ при зменшенні кількості ембріонів ссавців до 10 разів.

Ключові слова: відтворюваність, порівнянність, криоконсервування, ефективність, ембріони ссавців.

There was proposed mathematical model of estimation of initial state and efficiency of cryopreservation of mammalian embryos, providing the comparability of the results when using different methods of freezing. It has been shown that initial viability of bovine embryos makes 70–100% and depends on physiological state of embryos and their donor. Cryopreservation efficiency of murine and bovine embryos varies from 53 to 95%, which is stipulated by the state of embryo and peculiarities of the methods applied. Taking into account of biological object features and the cryopreservation way (initial state and efficiency of stages) provides the statistical significance of the obtained values $P \geq 0.95$ with the decrease in the number of mammalian embryos 10 times.

Key words: reproducibility, comparability, cryopreservation, efficiency, mammal embryos.

Обязательное условие научного исследования – воспроизводимость его результатов. Оценка состояния эмбрионов коровы показывает, что вероятность их развития при культивировании в условиях *in vitro* составляет 49÷97, *in vivo* – 10÷80%, после замораживания-оттаивания – 40÷97%. Причинами высокой вариации результатов являются разное качество эмбрионов, физиологическое состояние животных-доноров и способы криоконсервирования зародышей [2, 5–9]. Применение относительных показателей сохранности и приживляемости эмбрионов коровы, отражающих эффективность этапов их криоконсервирования, обеспечивает повышение воспроизводимости результатов в 1,5–2,5 раза [2, 6].

Без сопоставимости результатов сохранности деконсервированных эмбрионов при разном

The mandatory condition of scientific research is the reproducibility of its results. The estimation of the state of bovine embryos shows that the probability of their development during culturing under conditions *in vitro* makes 49 ± 97, 10 ± 80% *in vivo* and 40 ± 97% after freeze-thawing. High variation of the results is caused by different quality of embryos, physiological state of donor animals and the methods of embryos cryopreservation [2, 5–9]. Application of relative indices of survival and grafting of bovine embryos, reflecting the efficiency of their cryopreservation stages provides a rise in the reproducibility of the results in 1.5–2.5 times [2, 6].

If comparability of the results about survival of post-thaw embryos would be not provided, the differences in physiological states of biological objects as well as in the ways of their cryopreservation would significantly

¹Институт животноводства УААН, г. Харьков

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: п/о Кулинич, Харьковский район, Харьковская область, Украина, 62404; тел.: (+38 057) 740-31-66, электронная почта: lab_cryo@ukr.net

¹Institute of Cattle Breeding of Ukrainian Agrarian Academy of Sciences of Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: PO Kulinichi, Kharkov region, Ukraine 61480; tel.: +380 57 740 3166; e-mail: lab_cryo@ukr.net

физиологическом состоянии биообъекта и способов его криоконсервирования существенно ограничивается возможность определения корреляции между исследуемыми параметрами, построения регрессионных зависимостей и применения методов многофакторного исследования. Для обеспечения сопоставимости результатов исследований необходимо подтверждение жизнеспособности деконсервированных эмбрионов, полученных от высокопродуктивных и проблемных коров-доноров методом культивирования [8], что на 1/3 сокращает затраты на трансплантацию нежизнеспособных эмбрионов.

При использовании общепринятых методов статистического анализа (непарный критерий Стьюдента t_d) с целью получения достоверного результата на уровне $P \geq 0,95$ требуется несколько сот эмбрионов, что приводит к значительным экономическим затратам (стоимость одного эмбриона коровы составляет более 1500 грн [2]) и возникновению этических проблем (необоснованный убой лабораторных животных).

Для многократного сокращения количества эмбрионов важно учитывать качество отдельного эмбриона и особенности применяемых технологических операций [2, 6] на основе методов математического моделирования стохастических процессов [1].

Таким образом, для криоконсервирования эмбрионов млекопитающих применяется множество способов, при этом допускается использование биообъектов разного качества: хорошего и отличного для коровы и овцы, хорошего, отличного и удовлетворительного для мыши, полученных от животных с разным физиологическим состоянием (высоко- и низкопродуктивные сельскохозяйственные животные, физиологически здоровые и проблемные) [5–9]. При низкой воспроизводимости и несопоставимости результатов исследования необходимо определить начальное состояние отдельного эмбриона – учет физиологического состояния.

Цель работы – разработать математическую модель оценки начального состояния эмбрионов млекопитающих и эффективности их криоконсервирования для повышения воспроизводимости результатов и обеспечения их сопоставимости при использовании различных способов замораживания.

Материалы и методы

Сохранность эмбрионов после выполнения j -го этапа криоконсервирования определяли по формуле [1, 5, 9]:

$$S_j = \frac{n_j}{n_0}, \quad (1)$$

limit the possibility of determining the correlation between the studied parameters, plotting of regression dependencies and application of the methods of multi-factor investigation. To provide the comparability of the research results it is necessary to confirm using culturing the viability of post-thaw embryos obtained from highly productive donor cows and unwell animals [8], that would reduce by 1/3 the expenses for transplantation of non-viable embryos.

When using generally accepted methods of statistical analysis (Student's non-paired criterion t_d) the obtaining of statistically significant result at $P \geq 0.95$ requires several hundreds of embryos, that results in significant economic charges (cost of one bovine embryo makes more than 1,500 UAH [2]) and appearance of ethical problems (baseless slaughtering of laboratory animals).

For multiple reduction of the number of embryos it is important to take into account the quality of single embryo and peculiarities of the applied technological operations [2, 6] based on the methods of mathematical modeling of stochastic processes [1].

Thus the cryopreservation of mammalian embryos involves many methods, allowing thereat the use of biological objects of different quality: good and excellent for bovine and sheep embryos; good, excellent and medium for mice, as well as the embryos obtained from animals with different physiological state (highly and low productive agricultural animals, physiologically healthy or unwell ones) [5–9]. If reproducibility is low and the results of the research are non-comparable, an initial state of single embryos (examination of physiological state) should be determined.

The research aim was to develop the mathematical model of estimation of initial state of mammalian embryos and the efficiency of their cryopreservation to increase the reproducibility of the results and providing their comparability when using different methods of freezing.

Materials and methods

The survival of embryos after the j -th stage of cryopreservation was examined using the formula [1, 5, 9]:

$$S_j = \frac{n_j}{n_0}, \quad (1)$$

where n_j is the number of embryos, available for further application after performing the j -th stage; n_0 – total number of embryos in experiment.

To rise the reproducibility of the results of cryobiological studies the probability of the survival of embryos was calculated using the Bayes' formula [1]:

$$S_j = S_0 \prod_{j=1}^3 W_j, \quad (2)$$

где n_j – количество эмбрионов, пригодных для дальнейшего применения после выполнения j -го этапа; n_0 – общее количество эмбрионов в опыте.

Для повышения воспроизводимости результатов криобиологического исследования рассчитывали полную вероятность сохранности эмбрионов по формуле Байеса [1]:

$$S_j = S_0 \prod_{j=1}^3 W_j, \quad (2)$$

где S_0 – начальная сохранность эмбрионов, которая будет определена далее из выражения (6), полученного в ходе исследования; W_j – эффективность j -го этапа процедуры криоконсервирования (культивирование W_k , замораживание-оттаивание W_d , полный цикл криоконсервирования W_{dk}).

Следовательно, состояние эмбрионов зависит от его начальной величины S_0 и условной вероятности W_j изменения показателя сохранности до величины S_j . Физический смысл условной вероятности W_j отражает показатель эффективности заданной технологической операции. Эффективность криоконсервирования эмбриона W_j определяли по выражению (2) как отношение сохранности биообъекта после выполнения заданной операции S_j к её начальной величине.

Сравнительный анализ методов статистической обработки результатов деконсервированных эмбрионов млекопитающих проводили в контрольной и опытной группах. Достоверность различия величин сохранности эмбрионов и эффективность их криоконсервирования рассчитывали для одной пары проб (контроль-опыт) методом альтернативного варьирования t_a , для трех пар – с помощью парных и непарных параметрических, а также непараметрических критериев [1]. Парные критерии Стьюдента t_{Δ} применяли для оценки средней разности между выборками с парносопряженными параметрами, а непарный t_a – с несвязанными. В качестве непараметрических параметров использовали критерии Пирсона χ^2 , Уилкоксона T и U . Полученные показатели сохранности и эффективности выражали в процентах.

Минимальное количество эмбрионов, обеспечивающих достоверное среднее значение $P \geq 0,95$ сохранности (1) и эффективность их криоконсервирования (2), определяли по формуле [3]:

$$N = \left(\frac{t}{P} C_v \right)^2, \quad (3)$$

где t – критерий Стьюдента (для количества эмбрионов $n \geq 30$; $t = 2$ и групп эмбрионов, имеющих

где S_0 is initial integrity of embryos to be determined from the expression (6), derived during the study; W_j is efficiency of the j -th stage of cryopreservation procedure (W_k for culturing, W_d for freeze-thawing, W_{dk} for complete cycle of cryopreservation).

Therefore the state of embryos depends on its initial value S_0 and relative probability W_j of the change of the integrity index to the value S_j . Physical sense of relative probability W_j reflects the index of efficiency of the set technological operation. The efficiency of embryo cryopreservation W_j was found from the expression (2) as the ratio of bioobject integrity after the completing the set operation S_j and its initial value.

The methods of statistical processing of the results for frozen-thawed mammalian embryos were comparatively analyzed for the control and experimental groups. The statistical significance of the differences between survival values of embryos and the efficiency of their cryopreservation were calculated for single pair of the samples (control-experiment) by the method of alternative varying t_a , for three pairs by means of paired and non-paired parametrical as well as non-parametrical criteria [1]. Paired Student's criteria t_{Δ} were applied to assess the average difference between the samplings with pair-conjugated parameters and non-paired criterion t_a was used for non-conjugated parameters. As non-parametrical parameters there were used criteria of Pearson χ^2 , Wilcoxon T and U . The obtained indices of integrity and efficiency were expressed in percents.

Minimal amount of embryos providing the statically significant average value of survival $P \geq 0.95$ (1) and efficiency of their cryopreservation (2) were found with the formula [3]:

$$N = \left(\frac{t}{P} C_v \right)^2, \quad (3)$$

where t is Student's criterion (for the number of embryos $n \geq 30$ t equals to 2, and for groups of embryos with different quality $k = 3$, $t = 4.3$); p is admissible relative error ($p = 5\%$), C_v is variation coefficient, %.

The increasing of reproducibility in experimental results was estimated as the ratio of variation coefficients obtained for the indices of survival (expression (1)), proposed efficiency (expressions (5)–(7)) and viability (expressions (8) and (9)). The decrease in the number of embryos was examined as the square of the ratio value for the variation coefficients to be compared (expression 3).

The analysis of the mathematical model was performed with the experimental data on cryopreservation of bovine embryos, obtained in All-Russian State R&D Institute of Animal Breeding using 'traditional' and 'rapid' protocols, as well as the vitrification method [8].

разное качество $k = 3$; $t = 4,3$); p – допустимая относительная ошибка ($p = 5\%$); C_v – коэффициент вариации, %.

Повышение воспроизводимости результатов эксперимента оценивали как отношение коэффициентов вариации, полученных для показателей сохранности по выражению (1), предлагаемой эффективности – выражениям (5)–(7), и жизнеспособности – выражениям (8) и (9). Уменьшение количества эмбрионов оценивали как квадрат величины отношения сравниваемых коэффициентов вариации (выражение (3)).

Для анализа математической модели использовали экспериментальные данные по криоконсервированию эмбрионов коровы, полученные Всероссийским государственным научно-исследовательским институтом животноводства с использованием “традиционной” и “ускоренной” технологий, а также методом витрификации [8]. “Традиционный” метод заключался в использовании 1,4 М раствора глицерина и охлаждения от 20 до -38°C со скоростью охлаждения 0,3 градуса/мин; “ускоренный” – раствора 1 М глицерина или 1,5 М этиленгликоля и охлаждения от $-5,8$ до -35°C со скоростью 0,3 градуса/мин. При подготовке к витрификации эмбрионы выдерживали при 20°C 10 мин в среде с 15% (объемными) глицерина и 30–60 с в среде с 30% (объемными) глицерина и 30% сахарозы, скорость охлаждения составляла $1,8 \times 10^3$ градусов/мин.

При анализе также использовали собственные данные по криоконсервированию эмбрионов мыши [2]. Все манипуляции с эмбрионами мыши (поиск, вымывание и подготовка к экспериментам) проводили по общепринятым методикам [7]. В качестве криопротектора применяли 1 М раствор глицерина при 10-минутной выдержке в них эмбрионов при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Для выведения криопротектора после размораживания контейнеров использовали раствор сахарозы концентрацией 0,5 М. Эмбрионы замораживали в разработанном нами устройстве, основанном на пассивном охлаждении термоблока в горловине сосудов Дьюара X-34 ($V = 35$ л) [4].

Результаты и обсуждение

Начальную сохранность эмбрионов, в отличие от спермиев, невозможно определить экспериментально, поэтому следует использовать математическое моделирование. Для определения данной величины была решена система из 4-х выражений (2), отражающих сохранность эмбрионов на разных этапах криоконсервирования: после культивирования $S_k = S_0 W_k$; замораживания-оттаивания $S_d = S_0 W_d$; замораживания-оттаивания и последующего культивирования $S_{dk} = S_0 W_{dk}$. Эффективность полного цикла криоконсервирования можно выра-

“Traditional” protocol involves application of 1.4 M glycerol solution, cooling from 20 down to -38°C with cooling rate of 0.3 degree/min; “rapid” protocol utilizes 1 M glycerol or 1.5 M ethylene glycol solutions, cooling from -5.8 down to -35°C with cooling rate of 0.3 degree/min. The embryos were prepared for vitrification by exposure at 20°C during 10 min in medium with 15% (vol/vol) of glycerol and 30–60 sec in medium with 30% (vol/vol) of glycerol and 30% of sucrose, the cooling rate was 1.8×10^3 degrees/min.

Own data on cryopreservation of murine embryos [2] were also used in the analysis. All manipulations with mice embryos (searching, washing-out and preparing to the experiments) were performed according to the standard methods [7]. As cryoprotectants there was applied 1 M glycerol solution, embryos were exposed in the solution during 10 min at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. To remove cryoprotectant after thawing of containers 0.5 M sucrose solution was applied. Embryos were frozen using the device developed in our laboratory, it is based on passive cooling of thermal block in the neck of Dewar vessels X-34 (35 l) [4].

Results and discussion

Initial survival of embryos unlike spermatozoa is impossible to examine experimentally, therefore the mathematical modeling should be used. To determine this value there was solved the system of four expressions (2), reflecting the survival of embryos at different cryopreservation stages: after culturing $S_k = S_0 W_k$; freeze-thawing $S_d = S_0 W_d$; freeze-thawing and following culturing $S_{dk} = S_0 W_{dk}$. Efficiency of a complete cryopreservation cycle may be expressed as $W_{dk} \approx W_d W_k$ from formula (2) describing the probability of survival of frozen-thawed embryos S_{dk} . Analysis of experimental data [2, 6, 8] within the limits of an error of experiments confirms the supposition about independence of the values of arbitrary probabilities of efficiency of culturing W_k and freeze-thawing W_d .

When solving four expressions (2) containing 4 unknowns the following dependencies were obtained:

$$S_o = \frac{S_k S_d}{S_{dk}}, \quad (4)$$

$$W_k = \frac{S_{dk}}{S_d}, \quad (5)$$

$$W_d = \frac{S_{dk}}{S_k}, \quad (6)$$

$$W_{dk} = \frac{S_{dk}^2}{S_k S_d}. \quad (7)$$

To test the presented mathematical model (expressions (2), (5)–(7)) there were used experimentally obtained values of bovine embryos' survival [8] from dif-

зять как $W_{dk} \approx W_d W_k$ из формулы (2), описывающей вероятность сохранности деконсервированного эмбриона S_{dk} . Анализ экспериментальных данных [2, 6, 8] в пределах ошибки опытов подтверждает предположение о независимости величин условных вероятностей эффективности культивирования W_k и замораживания-оттаивания W_d .

Из решения 4-х выражений (2), содержащих 4 неизвестных, получили следующие зависимости:

$$S_o = \frac{S_k S_d}{S_{dk}}, \quad (4)$$

$$W_k = \frac{S_{dk}}{S_d}, \quad (5)$$

$$W_d = \frac{S_{dk}}{S_k}, \quad (6)$$

$$W_{dk} = \frac{S_{dk}^2}{S_k S_d}. \quad (7)$$

С целью апробации представленной математической модели (выражения (2), (5)–(7)) использовали экспериментально полученные значения сохранности эмбрионов коровы [8] от разных доноров на разных этапах криоконсервирования (количество эмбрионов в каждой выборке составляло от 30 до 400 шт.). При подстановке значения сохранности в выражения (2), (5)–(7) были получены расчетные величины начального состояния эмбрионов коровы. Методом наименьших квадратов [1] определяли теоретические значения начального состояния эмбрионов и эффективностей разных способов их криоконсервирования (табл. 1–3). Величина начальной сохранности эмбрионов коровы варьирует от 70 до 100% и зависит от их качества и физиологического состояния донора (табл. 1).

Величина эффективности культивирования также зависит от состояния доноров и качества эмбрионов. Значение эффективности изменяется от 72 до 99% (табл. 2). Сравнительный анализ рассчитанных значений сохранности культивируемых эмбрионов S_k (с разным физиологическим состоянием) и экспериментально полученных данных [8] показал высокую сходимость результатов (рис. 1). При расчёте эффективности криоконсервирования эмбрионов хорошего и отличного качества с использованием разных технологий [8], полученных от коров с различным физиологическим состоянием, установлено изменение сохранности после культивирования от 53 до 95% (табл. 3).

Значения сохранности деконсервированных эмбрионов, полученные от разных животных разными способами замораживания, показали высо-

ферент доноров и различных стадий криоконсервирования (количество эмбрионов в каждой выборке составляло от 30 до 400). После подстановки значений сохранности в выражения (2), (5)–(7) были получены расчетные значения начального состояния эмбрионов коровы. Методом наименьших квадратов [1] определяли теоретические значения начального состояния эмбрионов и эффективностей разных способов их криоконсервирования (табл. 1–3). Значение начальной сохранности эмбрионов коровы варьирует от 70 до 100% и зависит от их качества и физиологического состояния донора (табл. 1).

Значение эффективности культивирования также зависит от состояния доноров и качества эмбрионов. Значение эффективности изменяется от 72 до 99% (табл. 2). Сравнительный анализ рассчитанных значений сохранности культивируемых эмбрионов S_k (с разным физиологическим состоянием) и экспериментально полученных данных [8] показал высокую сходимость результатов (рис. 1). При расчёте эффективности криоконсервирования эмбрионов хорошего и отличного качества с использованием разных технологий [8], полученных от животных с различным физиологическим состоянием, установлено изменение в сохранности после культивирования от 53 до 95% (табл. 3).

Значения сохранности эмбрионов, полученные от разных животных различными способами замораживания, показали высокую сходимость результатов (рис. 1). При расчёте эффективности криоконсервирования эмбрионов хорошего и отличного качества с использованием разных технологий [8], полученных от животных с различным физиологическим состоянием, установлено изменение в сохранности после культивирования от 53 до 95% (табл. 3).

Таблица 1. Расчетные значения начальной сохранности эмбрионов коровы в зависимости от их качества и физиологического состояния доноров
Table 1. Calculated initial survival values of bovine embryos depending on their quality and physiological state of donors

Качество эмбрионов, балл Quality of embryos, points	Сохранность эмбрионов (%), полученных от доноров Survival of embryos (%), obtained from donors		
	Проблемных Unwell	Здоровых с уровнем продуктивности Healthy with productivity level	
		высоким high	средним medium
3	69,4	70,4	92,7
4	75	75,7	98,6
5	78,4	78,8	100

Таблица 2. Расчетные значения эффективности культивирования эмбрионов коровы в зависимости от их качества и физиологического состояния доноров

Физиологическое состояние донора Donor physiological state	Эффективность культивирования <i>in vitro</i> (%) эмбрионов разного качества <i>In vitro</i> culturing efficiency (%) of embryos of different quality		
	отличного excellent	хорошего good	удовл. medium
Средняя продуктивность Medium productivity	99,0	97,2	92,0
Высокая продуктивность High productivity	79,5	76,7	72,0
Проблемные животные Unwell animals	80,5	76,7	72,3

кую сходимость вычисленных по выражениям (5)–(7) и экспериментально полученных результатов [8]. Расхождение расчётных и экспериментальных значений сохранности не превышало 5% (рис. 2), за исключением сохранности эмбрионов, полученных от высокопродуктивных животных и замороженных с низкой скоростью в 1,4 М растворе глицерина. Величина расхождения составила около 8%, что можно объяснить наличием случайных ошибок при проведении эксперимента и неравенством пропорции эмбрионов хорошего и отличного качества.

Таким образом, на основе предложенной модели можно сопоставлять величину эффективности разных способов и этапов криоконсервирования эмбрионов млекопитающих с разным начальным состоянием. Вместе с тем при оценке сохранности эмбрионов осуществляется качественный учёт их состояния для дальнейшего использования. При переходе к количественной оценке (жизнеспособности отдельного эмбриона) можно повысить воспроизводимость результатов исследования.

С целью повышения воспроизводимости экспериментально полученных значений проведен учёт качества отдельного эмбриона после выполнения заданного технологического этапа. Для повышения точности оценки состояния эмбрионов заданного качества применяли формулу средневзвешенной величины [1] их жизнеспособности:

$$V_{ij} = \frac{1}{n_o} \sum_{i=2}^5 V_{oi} n_i, \quad (8)$$

non-equity of the proportion of good and excellent quality embryos.

Thus basing on the proposed model one can compare the efficiency value of different ways and stages of cryopreservation of mammalian embryos with various initial state. Along with this the estimation of the survival of embryos is accompanied by the recording of their quality parameters for further use. When performing the quantitative estimation (viability of single embryo) the reproducibility of the research results can be increased.

With the aim of rising the reproducibility of experimentally obtained values there was examined the quality of an embryo after performing of certain technological stage. To increase the accuracy of estimation of the state of embryos with certain quality there was used the formula of weighted mean of their viability:

$$V_{ij} = \frac{1}{n_o} \sum_{i=2}^5 V_{oi} n_i, \quad (8)$$

where V_{oi} is initial viability of embryo of the i -th quality obtained from the expression (4) for the survival, $i, e.$

Таблица 3. Расчетное значение эффективности разных способов криоконсервирования эмбрионов, полученных от коров с разным физиологическим состоянием

Физиологическое состояние донора Donor physiological state	Эффективность криоконсервирования по различным программам, % Efficiency of cryopreservation according different programmes, %			
	1	2	3	4
Средняя продуктивность Medium productivity	94,4	94,4	94,6	82,3
Высокая продуктивность High productivity	94,8	68,8	71,4	62,3
Проблемные животные Unwell animals	91,7	56,6	62,6	53,1

Примечания: 1 – программа криоконсервирования согласно “традиционной” технологии с 1,4 М глицерина (см. материалы и методы); 2 – “ускоренной” технологии с 1,4 М глицерина; 3 – “ускоренной технологии” с 1,5 М этиленгликоля; 4 – витрификация с 30% глицерина и 0,75 М сахарозы.

Notes: 1 – cryopreservation program according ‘traditional’ protocol with 1.4 M glycerol (see Materials and methods); 2 – ‘rapid’ protocol with 1.4 M glycerol; 3 – ‘rapid’ protocol with 1.5 M ethylene glycol; 4 – vitrification with 30% glycerol and 0.75 M sucrose.

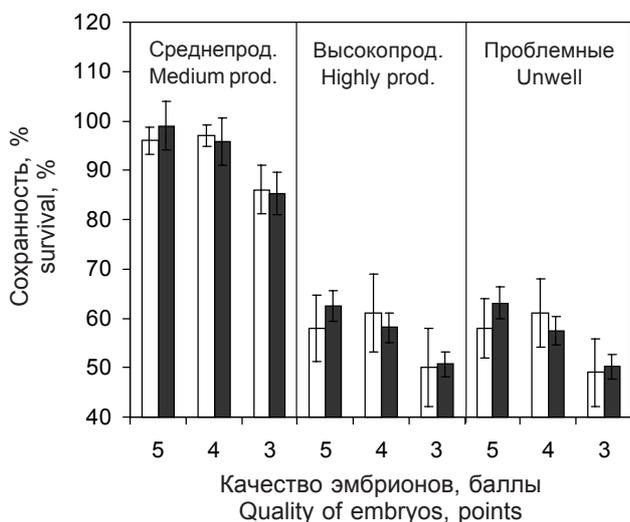


Рис. 1. Значения сохранности эмбрионов различного качества, полученных от коров со средней, высокой продуктивностью и проблемных животных после культивирования в условиях *in vitro*: экспериментальные (□) [8] и расчётные (■) данные (выражения (2), (4)–(7)).

Fig. 1. Values of survival of bovine embryos obtained from animals with medium or high productivity and from unwell animals (points) after culturing *in vitro*. Experimental (□) and calculated (■) data (expressions (2), (4)–(7)).

где V_{0i} – начальная жизнеспособность эмбриона i -го качества, полученного из выражения (4) для сохранности, т. е. $V_{0i} = S_{0i}$; n_i – количество эмбрионов i -го качества: отличное $i = 5$, хорошее $i = 4$, удовлетворительное $i = 3$, неудовлетворительное $i = 2$.

Эффективность криоконсервирования эмбрионов различного качества рассчитывали по аналогии с показателем сохранности (выражения (5)–(7)), жизнеспособность пригодных эмбрионов с разным качеством – по формуле средневзвешенного:

$$V_j = \frac{1}{n_o} \sum_{i=3}^5 V_{ij} n_i. \quad (9)$$

Для определения условий применения существующих критериев достоверности различия жизнеспособности эмбрионов млекопитающих с разным начальным состоянием V_0 (выражение (4)) проведен анализ экспериментально полученных выборок [2] (табл. 4, 5). Эмбрионы мыши криоконсервировали в разных контейнерах для замораживания: контрольные – в пластиковых соломинках, опытные – в стеклянных пробирках Уленгута с последующим культивированием в условиях *in vitro*. Показатели количества и качества эмбрионов до и после эксперимента представлены в табл. 4. Для повышения воспроизводимости результатов эмб-

$V_{0i} = S_{0i}$; n_i is the number of embryos of the i -th quality: excellent $i = 5$, good $i = 4$, medium $i = 3$, poor $i = 2$.

The efficiency of cryopreservation of the embryos of different quality was found in the same way as for the indices of survival (expressions (5)–(7)), viability of admissible embryos with different quality was done using the weighted mean formula:

$$V_j = \frac{1}{n_o} \sum_{i=3}^5 V_{ij} n_i. \quad (9)$$

To determine the applicability of existing criteria of statistical significance of the difference in mammalian embryos viability with various initial state V_0 (expression (4)) the experimentally obtained samplings were analyzed [2] (Tables 4, 5). Murine embryos were cryopreserved in different cryocontainers: the control embryos were frozen in plastic straws, the experimental embryos were treated in Uhlenhuth glass vials, after thawing *in vitro* culturing was carried-out. The indices of quantity and quality of the embryos prior to and after the experiment are presented in Table 4. To raise the reproducibility of the results the embryos were divided into uniform groups as for their initial quality.

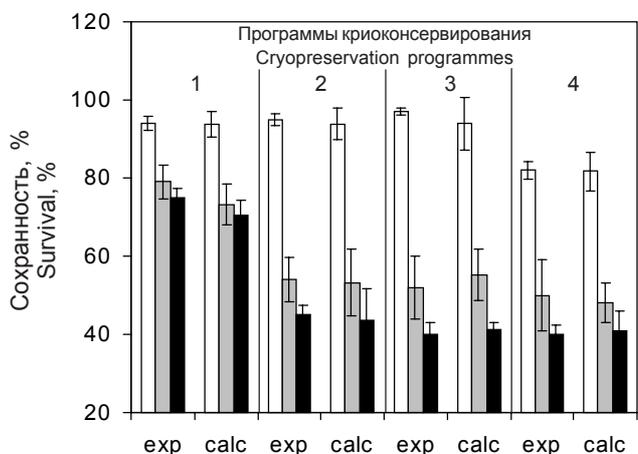


Рис. 2. Сохранность эмбрионов (*exp* – полученная опытным путем, *calc* – рассчитанная, выражения (4)–(7)) полученных от коров со средней (□), высокой (■) продуктивностью и проблемных животных (■), замороженных согласно программам: 1 – “традиционная” технология (см. материалы и методы); 2 – “ускоренная” технология с 1,4 М глицерина; 3 – “ускоренная” технология с 1,5 М этиленгликоля; 4 – витрификация.

Fig. 2. Survival of bovine embryos (*exp* – obtained experimentally, *calc* – calculated, expressions (4)–(7)) obtained from animals with medium (□) or high (■) productivity and from unwell animals (■), frozen-thawed according to the programmes: 1 – ‘traditional’ protocol (see Materials and methods); 2 – ‘rapid’ protocol with 1.4 M glycerol; 3 – ‘rapid’ protocol with 1.5 M ethylene glycol; 4 – vitrification.

рионы были распределены на однородные группы в соответствии с их начальным качеством.

Величину начальной жизнеспособности определяли по выражению (4), показатели жизнеспособности деконсервированных эмбрионов для каждой из групп – по выражению (8), а эффективность криоконсервирования – формуле (7) с заменой величин сохранности на жизнеспособность (табл. 5).

При использовании метода альтернативного варьирования t_a получена достоверность различия $P < 0,95$: для сохранности в опыте $S_1 = 63,9$ и контроле $S_2 = 64,8\%$, $t_a = 0,14$; жизнеспособности $V_1 = 59,7$ и $V_2 = 63,4\%$, $t_a = 0,42$ и эффективности $W_1 = 66,4$ и $W_2 = 71,7\%$, $t_a = 0,78$. Достоверность

The value of initial viability was determined using the expression (4), the indices of viability of frozen-thawed embryos for each of the groups were found from the expression (8), and the cryopreservation efficiency was calculated from the formula (7) with the substitution of the values of survival for viability ones (Table 5).

When using the method of alternative variation t_a there was obtained the statistical significance of the difference $P < 0.95$: for the survival in the experimental group $S_1 = 63.9$ and in the control $S_2 = 64.8\%$, $t_a = 0.14$; for viability $V_1 = 59.7$ and $V_2 = 63.4\%$, $t_a = 0.42$; and for efficiency $W_1 = 66.4$ and $W_2 = 71.7\%$, $t_a = 0.78$. The statistical significance was established for

Таблица 4. Количество и качество эмбрионов мыши до и после криоконсервирования
Table 4. Quantity and quality of murine embryos prior to and after cryopreservation

Качество эмбрионов до эксперимента, балл Quality of embryos before experiment, points	Количество до эксперимента, шт Number prior to experiment		Качество после эксперимента, балл Quality of embryos after experiment, points							
	n_1	n_2	2	3	4	5	2	3	4	5
			n_1				n_2			
3	26	40	10	7	–	–	20	12	–	–
4	27	35	4	11	9	–	4	7	20	–
5	30	33	2	7	10	9	1	5	7	19

Примечание: n_1 и n_2 – количество эмбрионов в контроле и опыте.

Notes: n_1 and n_2 – number of embryos in control and experimental groups, correspondingly.

Таблица 5. Состояние деконсервированных эмбрионов мыши, имеющих разную начальную жизнеспособность
Table 5. State of frozen-thawed mouse embryos with different initial viability

Качество, балл Quality, points	Сохранность, % Survival, %			Жизнеспособность, % Viability, %				Эффективность, % Efficiency, %		
	S_1	S_2	$S_1 - S_2$	V_0	V_1	V_2	$V_1 - V_2$	W_1	W_2	$W_1 - W_2$
3	26,9	30,0	– 3,1	73,0	32,9	37,9	– 5,0	45,1	51,9	– 6,8
4	74,1	77,1	– 3,1	89,0	64,4	69,5	– 5,0	72,4	78,0	– 5,7
5	86,7	93,9	– 7,3	99,0	78,7	88,0	– 9,3	79,5	88,9	– 9,4
M	63,9	64,8	– 4,5	86,8	59,7	63,4	– 6,4	66,4	71,7	– 7,3
$C_v, \%$	49	51	3,7	15	39	40	3,9	27	27	2,6
t	0,14		2,60	–	0,42		3,69*	0,78		5,46*

Примечания: S_1 и S_2 , V_1 и V_2 , W_1 и W_2 – сохранность, жизнеспособность, эффективность эмбрионов в контроле и опыте после криоконсервирования; критерии анализа достоверности различия Стьюдента: непарные для одной пары (контроль–опыт) проб – t_a и парные – t_{Δ} для трех пар; * – $P \geq 0,95$, # – $P \geq 0,99$.

Notes: S_1 and S_2 , V_1 and V_2 , W_1 and W_2 – survival, viability, efficiency of embryos in the control and experiment after cryopreservation; criteria of analysis of statistical significance of the difference (Student's criterion): non-paired for one pair (control-experiment) of the samples – t_a and paired – t_{Δ} for 3 pairs; * – $P \geq 0.95$, # – $P \geq 0.99$

различия установлена для показателей средней разности: $P \geq 0,95$ для жизнеспособности $V_1 - V_2 = -6,4\%$, $t_{\Delta} = 3,69$ и $P \geq 0,99$ для эффективности криоконсервирования $W_1 - W_2 = -7,3\%$, $t_{\Delta} = 5,46$ с применением парного критерия Стьюдента для оценки различия средней разности между выборками. При использовании непараметрических критериев заданная достоверность различия выборок в контроле и опыте не обеспечивается ($P < 0,95$).

Усредненные величины коэффициентов вариации, вычисленные для показателей сохранности, жизнеспособности и эффективности, составили 50; 40; 27%, а их разностей (контроль-опыт) – 3,7; 3,9; 2,6%. Повышение воспроизводимости результатов для показателей жизнеспособности и эффективности по отношению к сохранности составило 1,25 и 1,85 раза, а для их разности средних более чем в 10 раз, что обеспечивает на порядок уменьшение количества используемых эмбрионов при получении достоверного результата ($P \geq 0,95$).

Таким образом, при учёте межгрупповой вариации (разности относительной величины количественной оценки жизнеспособности эмбрионов одинакового качества в сравниваемых группах) в отличие от внутригрупповой (усредненной величины качественных показателей сохранности разного качества эмбрионов) возможны многократное повышение воспроизводимости результатов и сокращение количества биообъектов.

Поскольку в представленном выше способе расчет необходимо осуществлять для каждой группы эмбрионов с одинаковым качеством, а при проведении эксперимента все эмбрионы принято помещать в один контейнер (пробирку Уленгута или пластиковую соломинку), то для удобства работы предложены формулы определения приведенных величин количества n_3^* , n_4^* , n_5^* эмбрионов с заданным качеством:

$$\begin{aligned} n_3^* &\approx n_3 - n_2 - n_1, \\ n_4^* &\approx n_4 + n_5 - n_{05}, \\ n_5^* &= n_5, \end{aligned} \quad (10)$$

где n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 – количество эмбрионов разного качества (дегенерированные, неудовлетворительные, удовлетворительные, хорошие и отличные соответственно) после выполнения заданной технологической операции; n_{03}, n_{04}, n_{05} – начальное количество эмбрионов.

Апробация представленной модели в опытах по приживляемости деконсервированных эмбрионов коровы с отличным и удовлетворительным качеством дала возможность повысить воспроизводимость результатов в 2,5 раза [2].

Таким образом, вариация начального состояния эмбрионов коровы (в диапазоне от 70 до 100%)

the indices of mean difference: $P \geq 0.95$ for viability $V_1 - V_2 = -6.4\%$, $t_{\Delta} = 3.69$ and $P \geq 0.99$ for efficiency of cryopreservation $W_1 - W_2 = -7.3\%$, $t_{\Delta} = 5.46$ using paired Student's criterion to assess the difference of the mean difference between the samplings. Application of non-parametrical criteria does not provide the requested statistical significance of the difference in the samplings of the control and experimental groups ($P < 0.95$).

Averaged values of variation coefficients calculated for the indices of survival, viability and efficiency made 50, 40, 27%, and 2.7, 3.9, 2.6% for their differences (control-experiment). The rise in reproducibility of the results for the indices of viability and efficiency in respect of the survival made 1.25 and 1.85 times and for their differences of the means it was more than 10 times, providing the reduction on the number of the used embryos for obtaining statistically significant result by one order ($P \geq 0.95$).

Thus when taking into account the variation between the groups (differences of relative values of quantitative assessment of the viability for embryos of the similar quality in the groups under comparison) in contrast to the variation within one group (averaged value of qualitative parameters of survival for the embryos with different quality) the multiple rise in the reproducibility of the results and reduction of the number of bioobjects are possible.

Since in the above mentioned method the calculation should be done for each group of embryos with similar quality and during the performance of the experiment all the embryos used to be placed into one container (Uhlenhuth vial or plastic straw) then for the convenience there were proposed the formulas to determine the specific values of the number n_3^* , n_4^* , n_5^* embryos with the set quality:

$$\begin{aligned} n_3^* &\approx n_3 - n_2 - n_1, \\ n_4^* &\approx n_4 + n_5 - n_{05}, \\ n_5^* &= n_5, \end{aligned} \quad (10)$$

where n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 are the numbers of embryos of different quality (degenerated, poor, medium, good and excellent, correspondingly) after performance of the set technological operation; n_{03}, n_{04}, n_{05} are the initial numbers of embryos.

Testing of the proposed model in the experiments on the grafting of frozen-thawed bovine embryos with good and excellent quality provided the increase in reproducibility of the results in 2.5 times [2].

Thus the variation of initial state of bovine embryos (within the range from 70 to 100%) determines the reproducibility of the results of their cryopreservation. Rise in the reproducibility of the results and providing of their compatibility are implemented when using the proposed stochastic model. Using this mathematical

определяет воспроизводимость результатов их криоконсервирования. Повышение воспроизводимости результатов и обеспечение их сопоставимости реализуются при использовании предложенной стохастической модели. С помощью математической модели можно с заданной точностью (5%) определить начальную жизнеспособность эмбрионов животных и эффективность этапов их криоконсервирования. Полагаем, что данный способ применим для анализа жизнеспособности эмбрионов разных видов животных и человека, а также показателей их приживляемости.

Выводы

1. Для повышения воспроизводимости результатов исследования и обеспечения условия их сопоставимости при использовании разных способов замораживания предложена математическая модель оценки начальной жизнеспособности эмбрионов млекопитающих и эффективности этапов их криоконсервирования.

2. Показано, что начальная жизнеспособность эмбрионов коровы в зависимости от их качества (удовлетворительное–отличное) и физиологического состояния донора (здоровые–проблемные животные) может изменяться от 70 до 100%.

3. Эффективность различных способов криоконсервирования эмбрионов мыши и коровы может изменяться от 53 до 95% и зависеть от состояния биообъекта, а также особенностей применяемых технологий.

4. Учёт качества исходного биологического материала и способа его криоконсервирования обеспечивает достоверность полученных значений $P \geq 0,95$ при сокращении количества эмбрионов млекопитающих до десяти раз.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. С. Гланц.– М.: Практика, 1998.– 459 с.
2. Горбунов Л.В., Безуглый Н.Д., Салина А.С. Воспроизводимость результатов криоконсервирования эмбрионов млекопитающих // Биотехнологія.– 2010.– Т. 3, №1.– С. 46–51.
3. Горбунов Л.В. Определение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный научный результат // Агроэкологічний журнал.– 2002.– Вип 1.– С. 69–71.
4. Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов.– Киев: Киевский университет, 2005.– 325 с.
5. Кауфгольд 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.
6. Кот В.С., Горбунов Л.В., Лисина К.Г. Оценка технологии трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота //

model one may determine with the set accuracy (5%) an initial viability of animal embryos and the efficiency of their cryopreservation stages. We believe that this method is applicable to analyze the viability of embryos of human and different animal species as well as the indices of their grafting.

Conclusions

1. To increase the reproducibility of research results and provide the conditions of their compatibility when using different ways of freezing there was proposed the mathematical model for assessment of initial viability of mammalian embryos as well as the efficiency of the stages of their cryopreservation.

2. It has been shown that initial viability of bovine embryos depending on their quality (satisfactory or excellent) and physiological state of a donor (healthy or unwell animals) may vary from 70 to 100%.

3. The efficiency of different cryopreservation methods of murine and bovine embryos may change from 53 to 95% and depend on the state of bioobject as well as peculiarities of the applied technologies.

4. Taking into account of initial biological material and the way of its preservation provides the statistical significance of the resulted values $P \geq 0.95$ with ten times reduction of the number of used mammalian embryos.

References

1. Glanz S. Medical and biological statistics/ Translated from English.– Moscow: Praktika, 1998.– 459 p.
2. Gorbunov L.V., Bezugly M.D., Salina A.S. Reproducibility of the results for cryopreservation of mouse and cattle embryos // Biotekhnologiya.– 2010.– Vol. 3, N1.– P. 46–51.
3. Gornunov L.V. Determination of minimal number of measurements, providing spastically significant scientific result // Agroekologichnyy Zhurnal.– 2002.– Issue 1.– P. 69–71.
4. Gorbunov L.V., Buchatsky L.P. Cryopreservation of sexual cells and embryos.– Kiev: Kiev University, 2005.– 325 p.
5. Kauffold P., Tamm I., Shikhov I.Ya. et al. Estimation of cattle embryos quality: Guidance for works of embryos grafting.– Moscow: Agropromizdat, 1990.– 56 p.
6. Kot V.S., Gorbunov L.V., Lisina K.G. Assessment of transplantation technology of cattle embryos // Collection of scientific papers of Lugansk State Agrarian University.– 2001.– N13.– P. 150–155.
7. Mank M. Biology of mammalian development. Methods.– Moscow: Mir, 1990.– 406 p.
8. Titanova V.A., Nasibov F.N., Khilkevich S.N. et al. Efficiency of technological elements of cryopreservation of embryos obtained from bovine donors with different physiological status // Reports of Russian Academy of Agricultural Sciences.– 2006, N2.– P. 33–35.
9. Shikhov I.Ya., Sergeyev N.I. Morphological estimation of cattle early embryos quality // Arkh. Anat. Gistol. Embriol.– 1981.– Vol. 81, N11.– P. 96–102.

Accepted in 13.10.2010

- Зб. наук. праць Луганського держ. аграр. ун-ту.– 2001.– №13.– С. 150–155.
7. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы.– М.: Мир, 1990.– 406 с.
 8. Титова В.А., Насибов Ф.Н., Хилькевич С.Н. и др. Эффективность технологических элементов криоконсервирования эмбрионов, полученных от коров-доноров с различным физиологическим статусом // Доклады Рос. акад. с.-х. наук.– 2006.– №2.– С. 33–35.
 9. Шихов И.Я., Сергеев Н.И. Морфологическая оценка качества ранних эмбрионов крупного рогатого скота // Арх. анат. гистол. эмбриол.– 1981.– Т. 81, №11.– С. 96–102.

*Поступила 13.10.2010
Рецензент С.Е. Гальченко*