

Влияние замораживания спермы конвекторным способом на выживаемость и оплодотворяющую способность после деконсервирования

Effect of Convector Freezing on Sperm Survival and Fertilizing Ability After Thawing

Изложены результаты исследований по разработке, изучению и практическому использованию портативного криоконвектора для замораживания герметизированных спермодоз. Показана высокая эффективность данной разработки в условиях производства при создании банка замороженной спермы быков в облицованных гранулах.

Ключевые слова: сперма быка, криоконсервирование, криоконвектор.

Подано результати досліджень щодо розробки, вивчення та практичного використання портативного криоконвектора для заморожування герметизованих спермодоз. Показана висока ефективність даної розробки в умовах виробництва при створенні банку замороженої сперми бугаїв в облицюваних гранулах.

Ключові слова: сперма бугая, криоконсервування, криоконвектор.

The research results on the development, studying an practical use of portable cryoconvector for freezing of encapsulated sperm doses have been proposed. A high efficiency of this designing under production conditions when creating frozen bovine sperm in encased granules was shown.

Key-words: bovine sperm, cryopreservation, cryoconvector.

На сохранение морфоструктуры и физиологической полноценности половых клеток при замораживании влияет скорость снижения температуры объекта. По данным [1-8] скорость охлаждения биологической системы “половая клетка – криозащитная среда” должна быть такой, чтобы можно было избежать резких осмотических градиентов, отрицательно влияющих на целостность тонких цитоструктур, создать условия для максимальной дегидратации клетки до начала фазового перехода “вода – лёд” и таким образом предотвратить в ней внутриклеточное льдообразование. Эти условия можно создать для спермиев понижением температуры со скоростью 18-32°C/мин под защитой углевод-глицерин-желточной криопротекторной среды [10, 11].

Анализ закономерностей теплообмена между объектом, который замораживают, и хладагентом показывает, что оптимальные условия для получения наиболее высоких структурно-функциональных показателей качества спермы после её деконсервирования создаются при равномерном взаимодействии хладагента заданной температуры со всей поверхностью каждой спермодозы, что может быть достигнуто внесением разбавленной спермы по 0,1 мл в лунки блока сухого льда, поддерживаю-

The rate of temperature drop of object affects the preservation of morphological structure and physiological integrity of sexual cells during freezing. According to the data reported [1-8] the cooling rate of biological system ‘sexual cell-cryoprotective medium’ should be supposed as capable to avoid sharp changes of osmotic gradients, negatively affecting the integrity of fine cytostructures, to create the conditions for maximum dehydration of cell prior to the beginning of “water-ice” phase transition and thereby to prevent ice formation in it. These conditions may be created for the sperm by temperature reduction with the rate of 18-32°C per minute under protection of “carbohydrate-glycerol-yolk” cryoprotective medium [10, 11].

Analysis of regularities of heat exchange between the object to be frozen and cooling agent shows that optimal conditions for obtaining the highest structural and functional indices of sperm quality after their thawing are established at even interaction of cooling agent of the set temperature with the whole surface of each sperm dose, that may be achieved by introduction of diluted sperm by 0.1 ml into the wells of dry ice block maintaining a constant temperature in the contact with the sperm zone (-79°C) [10, 11]. However these conditions are difficult to be performed when freezing the sperm doses placed into the containers

Институт животноводства УААН, г. Харьков

Institute of Animal Breeding of the Ukrainian Academy of Agricultural Sciences

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. 7-й Гв. Армии, 3, п.о. Кулинич, Харьковская обл., Украина 62404; тел.: +38 (057) 740-33-16, факс: +38 (057) 740-31-79, электронная почта: it_uaan@bk.ru

* To whom correspondence should be addressed: 3, 7 Gv. Armii Street, PO Kulinichi, Kharkov, Ukraine 62404; tel.: +38 (057) 740-33-16, факс: +38 (057) 740-31-79, электронная почта: it_uaan@bk.ru

щего в зоне контакта со спермой постоянную температуру (-79°C) [10, 11]. Однако эти условия трудно выполнять при замораживании спермодоз, сосредоточенных в контейнерах крупными сериями, с использованием в качестве криоагента жидкого азота, поскольку известные способы их замораживания базируются на принципе пассивной конвекции холода [3, 9, 11]. Это приводит к инерционности, дестабилизации режима охлаждения в отдельных спермодозах и ухудшению морфофункциональных свойств спермиев. Отклонение же от оптимальных показателей качества деконсервированной спермы в отдельных спермодозах является причиной выбраковки всей серии глубокозамороженной спермы из-за несоответствия её требованиям стандарта.

Цель работы – оптимизация условий криоконсервирования и разработка эффективного метода и криотехнических средств замораживания спермы быка в облицованных гранулах; повышение выживаемости и оплодотворяющей способности деконсервированной спермы.

Материалы и методы

Для опытов использовали сперму клинически здоровых быков с подвижностью спермиев не ниже 8,0 баллов и концентрацией половых клеток не менее 0,8 млрд в 1 мл эякулята. Сперму от быков получали асептическим способом. Объём эякулята, концентрацию половых клеток, подвижность, выживаемость и оплодотворяющую способность спермиев определяли согласно действующим Госстандартам для нативной и замороженной спермы быков. В качестве криоконсерванта использовали концентрированную долгохранящуюся сахарозо-глицерин-желточную среду №1 (желток 25 мл, сахароза 8,0 г и глицерин 5,0 мл). Непосредственно перед использованием концентрированную среду растворяли дистиллированной водой до объёма 100 мл. Криоконсервант добавляли к сперме в соотношении 1:1. Спустя 3-5 мин экспозиции, повторно разбавляли сперму безжелточной сахарозо-глицерин-цитратной средой (сахароза – 6,0 г, глицерин – 5,0 мл, цитрат натрия – 1,4 г, вода – до 100 мл) Конечная степень разбавления спермы указанными средами составляла 1:10. Разбавленную сперму расфасовывали в полимерные трубки по закрытой системе с последующим автоматическим разделением её на отдельные спермодозы, объёмом 0,25 мл с одновременной их герметизацией [3]. Эквilibрацию спермы проводили при температуре $0-2^{\circ}\text{C}$ в течение 4-х часов.

Для замораживания спермы использовали разработанный нами криоконвектор (рис.1). В рабочем режиме он автоматически создает поток холодного газообразного азота по внутреннему каналу каждого контейнера с герметизированными

by large lots using liquid nitrogen as a cryoagent, since the known ways of their freezing are based on the principle of passive convection of cold [3, 9, 11]. This results in the inertia, destabilization of cooling regimen in some sperm doses and aggravation of morphofunctional properties of spermatozoa. The deviation from optimal indices of the quality of thawed sperm in some sperm doses is the cause of discarding of the whole lot of deeply frozen sperm due to the discrepancy to the standard demands.

The research aim is the optimization of the cryopreservation conditions and development of effective method and cryotechnical means for freezing of bovine sperm and fertilizing ability of thawed sperm.

Materials and methods

For the experiments the sperm of clinically healthy bulls with the motility of spermatozoa not lower than 8.0 points and concentration of sexual cells not less than 0.8 billions per 1ml of ejaculate were used. The sperm from bulls were derived by aseptic way. The ejaculate volume, concentration of sexual cells, motility, survival and fertilizing ability of sperm were studied according to the acting State Standards on native and frozen sperm of bulls. As a cryopreservative the concentrated stored for a long time sucrose-glycerol-yolk medium N1 (25 ml yolk, 8.0 sucrose and 5.0 ml glycerol) was used. Indirectly prior to application the concentrated medium was diluted with distilled water up to the volume of 100 ml. Cryopreservative was added to sperm in the 1:1 ratio. In 3-5 min's exposure the sperm were diluted with yolk-free sucrose-glycerol-citrate medium (6.0 sucrose, 5.0 glycerol, 1.4 sodium citrate, 100 ml water). Final rate of sperm dilution with the media mentioned was 1:10. The diluted sperm was packed into polymer tubes in a closed system with following automated separation of it into separate sperm doses of 0.25 ml volume with simultaneous their sealing [3]. Sperm were equilibrated at $0-2^{\circ}\text{C}$ for 4 hrs.

To freeze the sperm we used specially designed by us cryoconvector (Fig. 1). In the run mode it automatically creates the flux of cold gaseous nitrogen on inner channel of each container with insulated sperm doses thereby providing the equivalent dosed blowing with cold for each sperm dose during freezing.

The device functions as follows. After plunging into liquid nitrogen (2) the container (3) with the desiccator (8) and its insulated connection (as Fig. 1 shows) with vessel neck (1) in the vessel the stormy boiling of liquid nitrogen starts creating an additional pressure over the liquid. Herewith the single way for gaseous nitrogen into an environment is the clearance between the desiccator (8) and outer container wall (3), and inner capacity of the container with insulated sperm doses (5) and calibration orifice (7) regulating its flux rate. Gaseous nitrogen under the pressure

спермодозами, обеспечивая равнозначное дозированное теплоотведение от каждой спермодозы во время замораживания.

Устройство работает следующим образом. После погружения в жидкий азот (2) контейнера (3) с испарителем (8) и герметичного соединения его (как показано на рис. 1) с горловиной сосуда (1) в сосуде начинает бурно кипеть жидкий азот, создавая дополнительное давление над жидкостью. При этом единственным путем для выхода газообразного азота во внешнюю среду являются зазор между испарителем (8) и внешней стенкой контейнера (3), внутренняя ёмкость контейнера с герметизированными спермодозами (5) и калиброванное отверстие (7), которое регулирует скорость его потока. Газообразный азот под давлением перемещается между спермодозами, создавая соответствующие условия для активной конвекции и равномерного теплообмена внутри криоконвектора. Отработанные пары азота с более высокой температурой под давлением кипящего азота удаляются во внешнюю среду сквозь калиброванное отверстие. По мере уравнивания температурного градиента интенсивность парообразования в ёмкости снижается почти до полного прекращения, при этом обеспечивается рациональное использование жидкого азота и максимально повышается коэффициент полезного действия энергии холода.

Для изучения эффективности устройства в действии спермодозы, облицованные пленочной оболочкой, загружали в контейнер с испарителем и замораживали. Скорость снижения температуры регистрировали самописцем с помощью медь-константановых термопар, датчики которых помещали в спермодозы. Размораживали сперму в водяной бане при температуре 40°C через 24 ч после криоконсервирования. При этом изучали зависимость скорости охлаждения спермодоз от места их расположения в контейнере, влияние замораживания на качественные показатели спермы после деконсервирования при разных уровнях загрузки контейнера спермодозами и определяли эффективность устройства по сравнению с замораживанием спермодоз в контейнерах без дополнительной вентиляции холодом. Для определения жизнеспособности спермы использовали следующие показатели: активность, выживаемость при температуре 38°C, абсолютная выживаемость половых клеток.

Все сравнительные исследования спермы проводили на разделённых эякулятах. Оплодотворяющую способность изучали на отобранных группах животных. Деконсервированную сперму вводили интрацервикально ману- или ректоцервикальным методами. Полученные результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента.

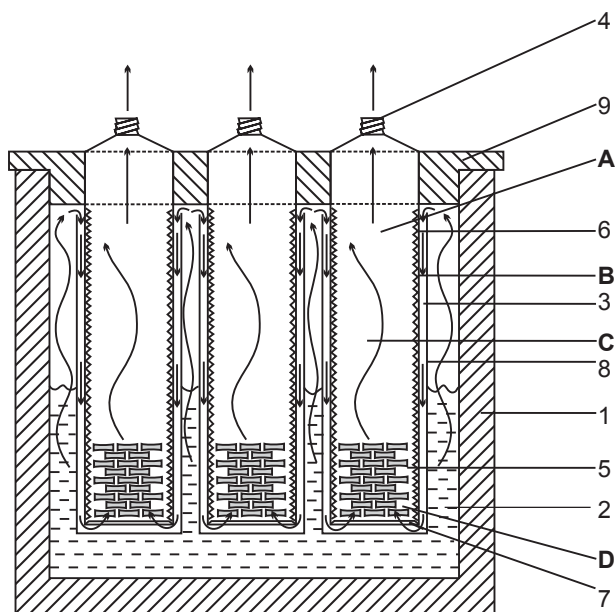


Рис. 1. Принципиальная схема криоконвектора для замораживания спермы: 1 – сосуд; 2 – жидкий азот; 3 – контейнер; 4 – жиклёр; 5 – спермодозы; 6 – гофрированная прокладка; 7 – пористый держатель спермодоз; 8 – цельнометаллический испаритель; 9 – герметичная пробка; А – верхнее расположение спермодоз; В – боковое; С – центральное; D – нижнее.

Fig. 1. Basic diagram of cryoconvector for sperm freezing: 1 – vessel; 2 – liquid nitrogen; 3 – container; 4 – jet; 5 – sperm doses; 6 – corrugated gasket; 7 – porous holder of sperm doses; 8 – solid metal desiccator; 9 – encapsulated stopper; A – upper location of sperm doses; B – side; C – central; D – low.

migrates between sperm doses by creating the corresponding conditions for active convection and even heat exchange inside cryoconvector. Waste nitrogen vapors with higher temperature under the pressure of boiling nitrogen are removed into an environment via calibration orifice. With balancing of temperature gradient the intensity of vapor formation in the vessel reduces quite completely up to ceasing, herewith the efficient use of liquid nitrogen is provided and the efficiency coefficient for cold energy is maximally increased.

To study the functioning device efficiency the sperm doses in polymer coats were placed into the container with desiccator and frozen. The rate of temperature reduction was recorded by self-recording device using copper-constantan thermocouples the gauges of which were placed into sperm doses. The sperm were thawed in water bath at 40°C in 24 hrs after cryopreservation. Herewith the dependency of cooling rates of sperm doses on the site of their location in container, the effect of freezing on qualitative indices of sperm after thawing at different levels of container loading with sperm doses and the device efficiency if compared with freezing of sperm

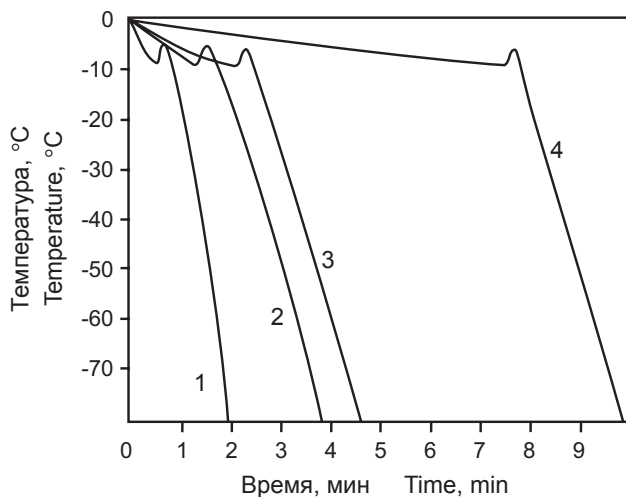


Рис. 2. Зависимость скорости охлаждения спермодоз от их расположения в контейнере: 1 – верхнее; 2 – боковое; 3 – центральное; 4 – нижнее.

Fig. 2. Dependence of cooling rate of sperm doses on their location in the container: 1 – upper, 2 – side, 3 – central, 4 – low.

Результаты и обсуждение

Изучали влияние интенсивности потоков газообразного азота через контейнер со спермодозами на структурно-физиологические показатели качества спермы после её замораживания-оттаивания, используя жиклеры разных диаметров (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мм). Установлено, что наиболее высокие качественные показатели спермы получены при использовании контейнера с жиклером диаметром 1 мм. После замораживания-оттаивания активность спермы составляла 4,2 балла, выживаемость при 38°C – 6,5 ч и показатель абсолютной выживаемости – 14 усл. единиц.

При изучении эффективности криоконвекторного способа определяли зависимость скорости охлаждения спермодоз и качественных показателей спермы от их местоположения в контейнере, влияние разных уровней загрузки контейнера спермодозами на выживаемость деконсервированной спермы и её оплодотворяющую способность.

На рис. 2 показано изменение во времени температуры в отдельных спермодозах, расположенных вдоль оси симметрии контейнера среди остальных спермодоз в его нижней, центральной и верхней зонах.

Анализ графиков снижения температуры в спермодозах, размещенных в разных частях контейнера показал, что падение температуры не зависело от их расположения и протекало со скоростью 18-20°C за первую минуту; 20-25°C – за вторую; 28-32°C – за третью, а в целом температура в спермодозах, размещенных в нижней, центральной, верхней и боковых зонах контейнера, снижалась от 0 до -79°C на протяжении 3-3,5 мин. При этом показатели спермы в исследуемых спермодозах не

дозы в контейнерах с дополнительной вентиляцией холодом были исследованы. Чтобы проверить жизнеспособность спермы, использовались следующие показатели: активность, время выживания при 38°C, и абсолютная выживаемость половых клеток.

Все сравнительные исследования спермы проводились в отдельных эякулятах. Фертилизационная способность была исследована в отдельных группах животных. Оттаявшая сперма вводилась интрацервикально мануальными и ректотрокарными методами. Полученные результаты были статистически обработаны по методу Стьюдента.

Results and discussion

The effect of intensity of gaseous nitrogen fluxes via the container with sperm doses after its freeze-thawing using the jets of various diameters (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mm) on structural and physical indices of sperm quality after their freeze-thawing has been studied. It has been established that the highest qualitative indices of sperm were obtained when using the container with the jet of 1 mm diameter. After freeze-thawing the sperm activity was 4.2 points, survival at 38°C made 6.5 hrs and the index of absolute survival was 14 relative units.

When studying the efficiency of cryoconvector way the dependency of cooling rate of sperm doses and qualitative indices of sperm on their location in the container, effect of different levels of loading of the container with sperm doses on viability of thawed sperm and their fertilizing ability were found.

Fig. 2 shows the change of temperature in time in separate sperm doses located along the axis of container symmetry among other sperm doses in its low, central and upper zones.

Analysis of the diagrams of temperature reduction in sperm doses located in different parts of the container has shown that the temperature fall did not depend on their location and proceeded with the rate of 18-20°C within the first minute; for the second one for 20-25°C; for the third one for 28-32°C and in a whole the temperature in sperm doses located in low, central, upper and side zones of the container reduced from 0 to -79°C for 3-3.5 min. Herewith the sperm indices in the studied sperm doses did not have any deviations and made: 5.1 points on the activity, 8.5 hrs on the viability of sexual cells at 38°C and 28.2 relative units in average (n=10) for the index of absolute survival. The studied parameters of activity, viability and absolute survival of sexual cells in the samples under investigation in all the examined samples depended on the number of sperm doses located for freezing in the containers (50, 100, 150, 200).

Efficiency of proposed cryoconvector method was compared with the one for sperm freezing by a direct plunging into liquid nitrogen of solid metal container filled with insulated sperm doses without their additional ventilation with gaseous nitrogen. Comparative results of these studies are presented in Table 1.

имели отклонений и составляли: по активности – 5,1 балла, по выживаемости половых клеток при 38°C – 8,5 ч и показателю абсолютной выживаемости – 28,8 усл. единиц в среднем (n=10). Изучаемые показатели активности, выживаемости и абсолютной выживаемости половых клеток во всех исследуемых пробах не зависели от количества размещенных для замораживания в контейнерах спермодоз (50, 100, 150, 200).

Эффективность предложенного криоконвекторного способа сравнивали с методом замораживания спермы прямым погружением её непосредственно в жидкий азот цельнометаллического контейнера, заполненного герметизированными спермодозами без их дополнительной вентиляции охлажденным газообразным азотом. Сравнительные результаты этих исследований приведены в табл. 1.

Результаты свидетельствуют, что использование предложенной модели устройства позволяет получить более высокие показатели качества спермы в сравнении с контролем по активности после размораживания на 0,6 баллов, выживаемости при 38°C на 3,9 ч и по показателю абсолютной выживаемости на 5,3 усл. единицы.

Необходимо отметить, что при использовании криоконвекторного метода достигается равномерное охлаждение каждой спермодозы, чем предотвращаются расхождения в показателях качества деконсервированной спермы в пределах одного эякулята. Таким образом, криоконвекторный спо-

Таблица 1. Влияние криоконвекторного метода замораживания герметизированных спермодоз на выживаемость половых клеток после деконсервирования (n=12)

Table 1. Effect of cryoconvector freezing method for sealed sperm doses on survival of sexual cells after freeze-thawing (n=12)

| Варианты исследований Groups | Активность спермы, баллы Sperm activity, | | | Выживаемость спермиев при 38°C, ч Sperm survival at 38°C, hrs | Абсолютная выживаемость усл. ед. Absolute survival, rel. units |
|---------------------------------|---|--|--|--|---|
| | при получении during collecting | до замораживания before freezing – thawing | после замораживания after freezing – thawing | | |
| Опыт Experiment | 8,0±0,1 | 7,2±0,1 | 5,1±0,1 | 12±1,1 | 22,1±1,2 |
| Контроль Control | 8,0±0,1 | 7,2±0,1 | 4,5±0,1 | 8,1±1,0 | 16,8±1,8 |

The results testify to the use of proposed model of the device enables to obtain higher indices of sperm quality in comparison with the control on the activity after thawing by 0.6 points, viability at 38°C by 3.9 hrs and on the index of absolute survival by 5.3 relative units.

It should be noted that when using cryoconvector method an even cooling of each sperm dose is achieved that prevents the divergences in the quality indices of thawed sperm within the limits of one ejaculate. Thus cryoconvector freezing way of insulated sperm doses allowed the improving of the Kharkov technology of sperm cryopreservation of servicing bulls in insulated sperm doses, the increasing of its maintainability and the improving of structural and functional qualities (Table 2).

Conclusions

Application of cryoconvector way of freezing of insulated sperm doses significantly increased the maintainability and effectiveness of cryopreservation of bovine sperm, improved physiological indices of

Таблица 2. Эффективность применения усовершенствованной Харьковской технологии асептического получения, криоконсервирования и использования спермы быков

Table 2. Application efficiency of improved Kharkov technology of aseptic obtaining, cryopreservation and using bulls sperm.

| Годы Years | Количество быков, голов Number of bulls | Количество эякулятов, шт Number of ejaculates, units | Объём эякулята, мл Volume of ejaculate, ml | Количество замороженных спермодоз, шт Number of frozen sperm doses, units | Количество осемененных коров, голов Number of inseminated cows | Количество оплодотворенных коров, % Amount of fertilized cows, % | Количество телят, голов Number of calves | Выход телят на 100 коров, % Yields of calves per 100 cows, % |
|----------------|--|---|---|--|---|---|---|---|
| 2001 | 8 | 1152 | 4,0 | 22087 | 2772 | 93 | 2036 | 73,4 |
| 2002 | 6 | 864 | 4,0 | 16250 | 2603 | 96 | 1982 | 76,1 |
| 2003 | 9 | 1296 | 4,5 | 42363 | 2409 | 95 | 1959 | 81,3 |
| 2004 | 9 | 1296 | 5,0 | 49234 | 2200 | 97 | 2072 | 94,1 |
| 2005 | 8 | 1152 | 4,8 | 42765 | 2377 | 97 | 2216 | 93,2 |
| Итого Total | 40 | 5760 | 4,46 | 172699 | 12361 | 95,6 | 10265 | 83,62 |

соб замораживания герметизированных спермодоз позволил усовершенствовать Харьковскую технологию криоконсервирования спермы быков-производителей в герметизированных спермодозах, повысить её технологичность и улучшить структурно-функциональные качества (табл. 2).

Выводы

Применение криоконвекторного способа замораживания герметизированных спермодоз существенно повысило технологичность и результативность криоконсервирования спермы быков, улучшило физиологические показатели качества спермы при её низкотемпературном консервировании и позволило внедрить данную разработку в широкую производственную практику с положительными результатами.

Установлено, что структурно-функциональные показатели качества спермы при её криоконсервировании не зависят от количества спермодоз и их расположения в разных частях контейнера.

Усовершенствованная технология криоконсервирования спермы быков внедрена на базе племенного хозяйства “Восток” Изюмского района Харьковской области (заготовлено 172699 спермодоз и проведено 12361 осеменение коров и телок).

Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.— Киев: Наук. думка, 1994.— 144 с.
2. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.— Киев, 1978.— 256 с.
3. Осташко Ф.И., Павленко М.П., Кузнецов Г.Н. и др. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей: Метод. рекомендации.— Харьков, 1990.— 47 с.
4. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота.— Киев: Аграрна наука, 1995.— 238 с.
5. Осташко Ф.И., Осташко В.Ф. Температурні градієнти і термодинамічні процеси в біологічних системах.— Харків, 2004.— 40 с.
6. Смирнов И.В. К теории глубокого замораживания спермы // Животноводство.— 1974.— №11.— С. 65-70.
7. Luyet B.J. On the possible biological significance of some physical changes encountered in the cooling and the rewarming of aqueous solutions // Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms: Proceedings.— 1967.— Vol. 2.— P. 1-20.
8. Mazur P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos // Proceedings of the 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.— Madrid, 1980.— Vol. 2.— P. 420.
9. Cassou R. La methode des paillettes en plastique adoptee a la generalization de la coagulation // V Congresso Internazionale per la Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale.— Trento, 1964.— Vol. 6.— P. 450-456.
10. Nagase N., Niwa T. Studies on deep freezing technique for bull semen. Deep freezing of bull semen in tablet form // Jap. J. Anim. Reprod.— 1963.— Vol. 9, N2.— P. 162-168.
11. Simmit L. Ein vollautomatisches Verfahren zur Konfektionierung von Bullensperma in Kunststoffrohren nach der Landshuter Methode // Proceedings of the 7th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.— Munich, 1972.— P. 207-209.

Поступила 04.01.2007

sperm quality during their low-temperature preservation and enabled to introduce into wide practice with positive results.

It has been found that structural and functional indices of sperm quality during their cryopreservation do not depend on the number of sperm doses and their location in different parts of the container.

Improved cryopreservation technology of bovine sperm is introduced at the base of “Vostok” breed livestock farm of Izium district of Kharkov region (where 172,699 sperm doses were procured and 12,361 of cows and heifers were inseminated).

References

1. Gordienko E.A., Pushar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions.— Kiev: Naukova dumka, 1944.— 144 p.
2. Ostashko F.I. Deep freezing and long-term storage of servicing animals' sperm.— Kiev, 1978.— 256 p.
3. Ostashko F.I., Pavlenko M.P., Kuznetsov G.N. et al. Kharkov technology of aseptic obtaining and cryopreservation of servicing bulls. Methodical recommendations.— Kharkov, 1990.— 47 p.
4. Ostashko F.I. Biotechnology of cattle reproduction.— Kiev: Naukova dumka, 1995.— 238p.
5. Ostashko F.I., Ostashko V.F. Temperature gradients and thermodynamical processes in biological systems.— Kharkiv, 2004.— 40p.
6. Smirnov I.V. To the theory of deep freezing of sperm// Zhivotnovodstvo.— 1974.— N11.— P. 65-70.
7. Luyet B.J. On the possible biological significance of some physical changes encountered in the cooling and the rewarming of aqueous solutions // Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms: Proceedings.— 1967.— Vol. 2.— P. 1-20.
8. Mazur P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos // Proceedings of the 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.— Madrid, 1980.— Vol. 2.— P. 420.
9. Cassou R. La methode des paillettes en plastique adoptee a la generalization de la coagulation // V Congresso Internazionale per la Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale.— Trento, 1964.— Vol.6.— P. 450-456.
10. Nagase N., Niwa T. Studies on deep freezing technique for bull semen. Deep freezing of bull semen in tablet form // Jap. J. Anim. Reprod.— 1963.— Vol. 9, N2.— P. 162-168.
11. Simmit L. Ein vollautomatisches Verfahren zur Konfektionierung von Bullensperma in Kunststoffrohren nach der Landshuter Methode // Proceedings of the 7th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.— Munich, 1972.— P. 207-209.

Accepted in 04.01.2007