

Кріоконсервування сперми гусаків у пластикових соломинкахС.В. Бичко¹, О.Б. АРТЕМЕНКО¹, О.В. ТЕРЕШЕНКО¹, Т.П. ЛІННІК²¹Інститут птахівництва УААН, с. Борки, Харківська обл.²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків**Gander Sperm Cryopreservation in Plastic Straws**S.V. BYCHKO¹, O.B. ARTEMENKO¹, O.V. TERESHCHENKO¹, T.P. LINNIK²¹Institute for Poultry Research of the Ukrainian Academy
of Agrarian Sciences, Borki, Kharkov Region²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Визначено основні температурні зони кріпошкоджень сперматозоїдів та оптимальний режим охолодження сперми гусаків від 0 до -196°C в пластикових соломинках. Показано, що на початковому етапі заморожування до -10°C сперму доцільно охолоджувати зі швидкістю $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, від -10 до -90°C швидкість необхідно збільшувати до $50^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, а від -90 до -196°C вона повинна становити $15^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Морфологічна цілісність статевих клітин гусаків при заморожуванні за запропонованим режимом вища на 10-15% у порівнянні зі стандартною, розробленою в Інституті птахівництва УААН.

Ключові слова: сперма гусаків, режим охолодження, пластикові соломинки, цілісність сперматозоїдів.

Определены основные температурные зоны криповреждений сперматозоидов и оптимальный режим охлаждения спермы гусаков от 0 до -196°C в пластиковых соломинках. Показано, что на начальном этапе замораживания до -10°C сперму целесообразно охлаждать со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, от -10 до -90°C скорость необходимо увеличить до $50^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а от -90 до -196°C она должна быть $15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Морфологическая сохранность половых клеток гусаков при замораживании по предлагаемому режиму выше на 10-15% в сравнении со стандартным, разработанным в Институте птицеводства УААН.

Ключевые слова: сперма гусаков, режим охлаждения, пластиковые соломинки, целостность сперматозоидов.

The authors determined the major zones of spermatozoa injuries during cryopreservation and the optimum rates for gander semen cooling at 0 to -196°C in plastic straws. At the initial stage of freezing down to -10°C the semen cooling was shown to be reasonable with the rate of $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ at further cooling -10 to -90°C , and -90 to -196°C with the cooling rate of $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Morphological integrity of gander sex cells when freezing according to the method proposed was found to be 10-15% higher comparing to the standard one elaborated at the Institute for Poultry Research.

Key-words: gander sperm, cooling regimen, plastic straws, spermatozoa integrity.

Кріоконсервування сперми птиці є одним із шляхів збереження генофонду, а також способів, які застосовуються в селекції при використанні якісних і продуктивних плідників. Важливим етапом низькотемпературного зберігання сперми птиці, в тому числі гусаків, є режим її охолодження від субнульових температур до -196°C . Під час кріоконсервування сперми та інших біологічних об'єктів встановлено, що кожна система має специфічний оптимальний режим охолодження, відхилення від якого призводить до зниження її життєздатності [14].

Пошкодження при повільному режимі охолодження пов'язують з підвищенням концентрації внутрішньоклітинних і позаклітинних солей, механічним напруженням, яке виникає внаслідок збездволення клітин [5, 12], з дестабілізацією мембран та протеїнів при низькому водному потенціалі [9].

Адреса для кореспонденції: Ліннік Т.П., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 772-20-07, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Poultry sperm cryopreservation is known to be one of the steps to preserve the gene fund, which is also the way used in selection for a high quality and productive sires. Cooling regimen of semen from subzero temperatures down to -196°C is an important step for poultry semen low temperature storage, also of ganders. During cryopreservation of semen and other biological objects every system is established to have its specific optimum cooling regimen not keeping to which causes the spermatozoa viability reduction [14].

Injuries appeared during slow cooling regimen are related to the concentration increase of intracellular and subcellular salts, mechanical tension caused by cell dehydration [5, 12] with destabilization of membranes and proteins at low aqueous potential [9].

Cell dehydration at a rapid cooling regimen may be insufficient to prevent an intercellular crystallization [10]. One considers it to be the cause for spermatozoa damaging.

Address for correspondence: Linnik T.P., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 7722007, fax: +380 57 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

При швидкому режимі охолодження дегідратація клітин може бути недостатньою для того щоб запобігти внутрішньоклітинному кристалоутворенню [10]. Вважається, що це є причиною пошкоджень сперматозоїдів при цьому режимі.

Muldrew та McGann [11] стверджують, що основним фактором кріопшкодження є швидкий вихід води з клітин, а не внутрішньоклітинне утворення льоду. При цьому пошкодження можуть бути наслідком того, що клітини раптово змінюють розмір, форму та ультраструктуру завдяки швидкому збезводненню.

Щоб уникнути небажаної загибелі статевих клітин під час кріоконсервування сперми гусаків, було запропоновано охолоджувати її в металевих кюветках [2] та у необлицьованих гранулах [6] від 0 до -98°C зі швидкістю $50^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, потім до -196°C зі швидкістю $8-15^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Tselutin та співавтори [14] наносили сперму у вигляді крапель на охолоджену до -180°C фторопластову пластину і занурювали її у рідкий азот.

Що стосується контейнерів для консервування сперми, то заморожування статевих клітин у гранулах не є найкращим варіантом, оскільки немає можливості маркувати зразки сперми індивідуально, до того ж вони можуть бути інфіковані в азоті під час зберігання. Деякі автори надають перевагу традиційним ампулам [8]. Але найкращими вважаються все ж таки пластикові соломинки, бо вони більш економічні, добре маркуються, не розтрощуються, займають невелику площу в кріобанку та зручні для транспортування [8]. Отже, метою наших досліджень є вдосконалення технології кріоконсервування сперми гусаків, використовуючи для її розфасування пластикові соломинки. Для цього необхідно визначити цілісність сперматозоїдів гусаків у залежності від швидкості охолодження сперми, температурні зони пошкоджень статевих клітин і шляхи уникнення кріопшкоджень.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на гусаках великої білої породи віком 24 міс. Сперму одержували методом абдомінального масажу. Для досліджень використовували суміш еякулятів кількох гусаків. Свіжо-одержану сперму охолоджували до $0...4^{\circ}\text{C}$ протягом 35-40 хв [3] і розбавляли кріозахисним середовищем Б-26 тієї ж температури у співвідношенні 1:1. Склад середовища (г): гліцин – 1,4, маніт – 0,8, лактоза – 3,0, глутамат натрію – 0,2, цитрат калію – 0,2, ацетат магнію – 0,08, кріопротектор N,N-диметилформамід (ДМФ) та 1,2-пропандіол (1,2-ПД) у співвідношенні 1:2 до кінцевої концентрації 6%, дистильована вода – до 100 мл [4]. Використовували реактиви марки “ХЧ”,

Muldrew and McGann [11] consider a rapid water release out of cells as the major negative cryopreservation factor, but not an intracellular ice formation. In this case the damages may be the result of a sudden change in cell sizes, shapes and ultrastructure due to a rapid dehydration.

To avoid the unfavorable sex cell death during gander sperm cryopreservation there was proposed to cool it in metal tubes [2] as well as in uncoated granules [6] under the temperature of 0 to -98°C and the rate of $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$, followed by -196°C with the rate of $8-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Tselutin and co-authors [14] put sperm drop-wise on a cooled down to -180°C fluoroplast and immersed it into liquid nitrogen.

As for the containers for sperm preservation, sex cell freezing in granules is thought to be not the best one for there is no possibility to mark the semen samples individually, and they might be infected in nitrogen during storage. Some authors therefore prefer to use traditional ampoules [8], although plastic straws are thought to be perfect as they are more economic, easily labeled, do not break, require a small area in cryobank and are convenient for transportation [8]. The aim of our investigation is therefore the improvement of cryopreservation technology for gander semen, using plastic straws for the packaging. To achieve this it is essential to detect the integrity of gander spermatozoa depending on the cooling rate of sperm and determine the temperature zones of sex cell damage and the ways for avoiding the cryodamages.

Materials and methods

Experiments were accomplished in big white ganders aged 24 months. Semen was obtained by abdominal massage. The mixture of ejaculates from several ganders was used. Freshly obtained sperm was cooled down to $0...4^{\circ}\text{C}$ for 35-40min [3] and diluted with B-26 cryoprotective medium of the same temperature in 1:1 ratio. The medium composition was as follows (g): glycine 1.4, manite 0.8, lactose 3.0, sodium glutamate 0.2, potassium citrate 0.2, magnum acetate 0.08, cryoprotectant N, N- dimethyl formamide (DMF) and 1,2-propane diol (1,2PD) in the ratio of 1:2 and final concentration of 6%, distilled water up to 100 ml [4]. We used “chemically pure” reagents, cryoprotectants were additionally purified using vacuum distillation [7]. The medium osmolality made 282 mOsmol/kg, pH=7.0. Diluted sperm was packed into 0.25 sm³ plastic straws. Time of sperm equilibration in a cryoprotective medium with cryoprotectant prior to freezing was not more than 5min, it was cooled down to -196°C in liquid nitrogen vapors using a laboratory device, as the control we used the traditional technique for gander sperm cryopreservation [1]. Sperm was frozen-thawed in water bath at 40°C up to a complete

криопротектори були додатково очищені за методом вакуумної перегонки [7]. Осмотичність середовища 282 мОсмоль/кг, рН 7,0. Розбавлену сперму розфасовували в пластикові соломинки об'ємом 0,25 см³. Час еквілібрації сперми в криозахисному середовищі з криопротектором до заморожування – не більше 5 хв, охолоджували до –196°C в парах рідкого азоту на лабораторній установці, для контролю застосовували загально-відому технологію криоконсервування сперми гусаків [1]. Розморожували сперму на водяній бані при 40°C до повного зникнення кристалічної фази. Для вдосконалення режимів охолодження сперми гусаків застосували різні лінійні швидкості за аналогією з технологією заморожування сперми півнів [7]. Швидкості охолодження становили 5, 10, 20, 40, 50°C/хв. Контроль температури здійснювали за допомогою мідь-константанової термопари, зануреної в пластикові соломинки. Для кожної серії досліду заморожували декілька зразків. У процесі охолодження при досягненні температур –5, –10, –15, –20, –30, –40, –50, –60, –70, –80, –90, –196°C з пластини заморожувача знімали по одній соломинці і негайно розморожували. Цілісність сперматозоїдів визначали за методом диференційного фарбування статевих клітин сумішшю родаміну С та малахітового зеленого. Статистичну обробку результатів проводили за методикою Фішера-Стьюдента.

Результати та обговорення

На першому етапі було визначено основні температурні зони крипошкоджень сперматозоїдів гусаків. Аналіз результатів охолодження сперми від 0...4°C до початку кристалізації позаклітинного середовища показує, що збільшення швидкості процесу приводить до зростання кількості сперматозоїдів з пошкодженими акросомами і голівками (P<0,001). Вірогідно, прискорення швидкості викликає дестабілізацію структури мембран клітин, і це спричинює більш інтенсивне морфологічне пошкодження сперматозоїдів, ніж збільшення часу їх взаємодії з розчином криопротектора до повного замерзання суспензії клітин. Встановлено, що при охолодженні сперми зі швидкістю 5°C/хв нижче –5...–10°C кількість цілих клітин знижується від 92 до 54-61% (P<0,05) (рис. 1, 2). Під час охолодження зі швидкістю 10°C/хв критична зона лежить в межах –15...–30°C, при цьому пошкоджуються 25-30% сперматозоїдів (P<0,05), при швидкостях 20, 40°C/хв було відмічено, що мембрани голівок сперматозоїдів більш вразливі, ніж акросоми: цілісність мембран різко зменшується на 37% після 40°C під час охолодження зі швидкістю 20°C/хв (P<0,001) і на 11% після –30°C під час заморожування зі швидкістю 40°C/хв (P<0,05) (рис. 1). При застосуванні швидкості 50°C/хв мембрани голівок

crystal phase disappearance. To improve the cooling regimens for gander sperm there were used different linear rates similarly to the fowl sperm freezing technique [7]. Cooling rates made 5, 10, 20, 40, 50°C/min. Temperature control was accomplished using copper-constantan thermocouple immersed into plastic straw.

For each of the experimental series there were frozen a few of them. During cooling along with reaching the temperatures of –5, –10, –15, –20, –30, –40, –50, –60, –70, –80, –90, –196°C we removed one plastic straw after another and froze it immediately. Spermatozoa integrity was determined using the method of differential sex cells staining with the mixture of rodamine C and malachite green. Statistical processing of the results was done by Fisher-Student's method

Results and discussion

At the first stage there were found the major temperature zones of gander sperm cryodamages. Analyses of sperm cooling results 0 to 4°C prior to the crystallization beginning of extracellular medium demonstrated the rise of the process rate to increase the amount of spermatozoa with damaged acrosomes and heads (P<0.001). The rate increase might result in the destabilization of cell membrane structure, that causes the more intense morphological damage of spermatozoa than increase of their interaction time with the cryoprotectant solution up to a complete freezing of cell suspension. We established that during sperm cooling with the rate of 5°C/min lower than –5...–10°C the amount of whole cells decreased from 92 to 54-61% (P<0.05) (Figs.1, 2). During cooling with the rate of 10°C/min the critical zone is within –15...–30°C with the damage of 25-30% of spermatozoa (P<0.05), at the rates of 20, 40°C/min the membranes of spermatozoa heads were noted to be more susceptible to cryodamages than acrosomes: membrane integrity sharply decreased by 37% after –40°C during cooling with 20°C/min (P<0.001) and by 11% after –30°C while freezing with the rate of 40°C/min (P<0.05) (Fig. 1). When using the rate of 50°C/min membranes of the heads were noted to be gradually damaged already having reached –50°C (P<0.001) (Fig. 1), and acrosomes to keep their integrity down to –90°C (no significant difference found) (Fig. 2). Further sperm cooling with such a rate results in the death of about 50% of spermatozoa. Therefore after –90°C it is reasonable to use the rate decrease for sperm cooling down to 8-15°C/min.

At the 2nd step we improved the technology for low temperature preservation of gander sperm. The work [8] shows the transition period, that is sperm transition from a liquid state into a solid one (within the range of –5 to –15°C) to be the most critical moment

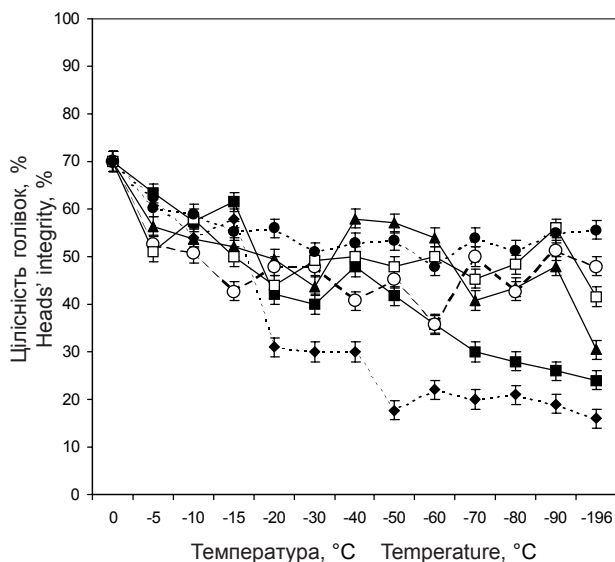


Рис. 1. Залежність цілісності голівок сперматозоїдів гусаків від швидкості охолодження, °C/хв: ◆ – 5; ■ – 10; ▲ – 20; ○ – 40; □ – 50; ● – 5 до –10°C, 50 до –90°C, 15 до –196°C.

Fig. 1. Dependence of gander spermatozoa heads' integrity on the cooling rate, °C/min: ◆ – 5; ■ – 10; ▲ – 20; ○ – 40; □ – 50; ● – 5 down to –10°C, 50 down to –90°C, 15 down to –196°C.

поступово починають пошкоджуватись вже після –50°C ($P < 0,001$) (рис.1), а акросоми зберігають свою цілісність до –90°C (достовірної різниці не виявлено) (рис.2). Подальше охолодження сперми з такою швидкістю приводить до загибелі майже 50% сперматозоїдів. Тому після –90°C доцільно використовувати зниження швидкості охолодження сперми до 8-15°C/хв [1].

На другому етапі було вдосконалено технологію низькотемпературного консервування сперми гусаків. З [8] відомо, що найбільш критичним моментом при заморожуванні є перехідний період, тобто перехід сперми з рідкого в твердий стан (між –5 і –15°C). Найкращі результати при заморожуванні сперми півнів було отримано під час проходження фазового переходу вода-лід при повільному режимі охолодження (1-8°C/хв) і при прискоренні режиму після –15°C [7,13]. Це пояснюється тим, що повільний режим охолодження від 5 до –10°C дозволяє клітинам втратити певну кількість води, що приводить до зменшення об'єму клітин. Якщо охолоджувати сперму при такому режимі до нижчих температур, об'єм клітини зменшується нижче допустимого мінімуму і вони втрачають здатність до поглинання води під час відтавання. При застосуванні більш швидкого режиму охолодження відразу після виходу води зменшення розмірів клітин не перевищує критичний мінімум, і вони відновлюють свій об'єм при розморожуванні сперми.

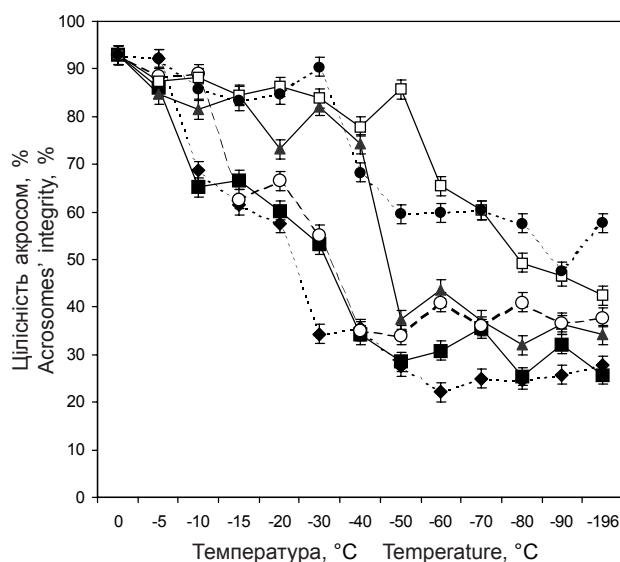


Рис. 2. Залежність цілісності акросом сперматозоїдів гусаків від швидкості охолодження, °C/хв: ◆ – 5; ■ – 10; ▲ – 20; ○ – 40; □ – 50; ● – 5 до –10°C, 50 до –90°C, 15 до –196°C.

Fig. 2. Dependence of gander spermatozoa acrosomes integrity on the cooling rate, °C/min: ◆ – 5; ■ – 10; ▲ – 20; ○ – 40; □ – 50; ● – 5 down to –10°C, 50 down to –90°C, 15 down to –196°C.

while freezing. The best results while fowl sperm freezing were achieved during the water-ice phase transition with a slow cooling regimen (1-8°C/min) and while accelerating the regimen after –15°C [7, 13]. This could be explained by the fact that slow cooling regimen 5 to –10°C enables the cells to lose a certain amount of water, this results in the lessening of cell volume. If we cool sperm down to lower temperatures using such a regimen, cell volume decreases lower than the acceptable minimum and the cells lose their capability to absorb water during thawing. When using a more rapid cooling regimen immediately after water release, the decrease of cell size does not exceed the critical minimum and cells recover their volume during sperm thawing.

We completed the efficacy analysis of both cryopreservation methods for gander sperm: the standard way [1] and the experimental one. The first one foresees the cooling of diluted and packed sperm from 0 to –98°C with the rate of 50°C/min and from –98 to –196°C with the rate of 8-15°C/min [1]. According to the experimental method freezing from 0°C down to the crystallization start occurs with the rate of 5°C, following the crystallization down to –90°C at 50°C/min and from –90°C down to –196°C with the rate 15°C/min. Similarly obtained results prove the integrity of heads and acrosomes in spermatozoa to be 16.3 and 9.7% higher ($P < 0.01$), correspondingly during spermatozoa freezing using the experimental method (Fig. 3).

Було проведено аналіз ефективності двох методик кріоконсервування сперми гусаків – стандартної [1] та експериментальної. Перша передбачає охолодження розбавленої та розфасованої сперми від 0 до -98°C зі швидкістю $50^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, і від -98 до -196°C зі швидкістю $8-15^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ [1]. За експериментальною методикою заморожування від 0°C до початку кристалізації проходить зі швидкістю $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, після кристалізації до -90°C – зі швидкістю $50^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, і від -90 до -196°C – зі швидкістю $15^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Отримані результати свідчать, що цілісність голівок та акросом сперматозоїдів вища на 16,3 і 9,7% ($P < 0,01$) відповідно при заморожуванні сперми за експериментальною методикою (рис.3).

Висновки

У результаті досліджень щодо вдосконалення технології кріоконсервування сперми гусаків у пластикових соломинках ми прийшли до висновку, що заморожування сперми може бути успішним при врахуванні критичних температурних зон, характерних для кожної швидкості охолодження. Охолодження статевих клітин до початку кристалізації слід проводити при повільних швидкостях ($5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$), після температури початку кристалізації до -90°C швидкість необхідно збільшити до $50^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, а потім її доцільно знизити до $15^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Такий режим заморожування сперми гусаків дозволяє отримати досить високий відсоток морфологічно цілих клітин (64%) після відтавання.

Література

1. Андреев В.И. Разработка и совершенствование способа кріоконсервации спермы водоплавающих птиц: Дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1983.– 122 с.
2. Андреев В.И., Сахацкий Н.И., Осташко Ф.И. Использование этиленгликоля и диметилформамида в качестве криопротекторов при замораживании спермы гусаків // Птицеводство.– 1984.– №37.– С. 53-55.
3. Бичко С.В. Вплив температури розбавлення сперми гусаків на фізіологічний стан сперміїв // НТБ Ін-ту тваринництва УААН.– 2003.– №84.– С.20-23.
4. Бичко С.В., Артеменко О.Б., Терещенко О.В. Кріоконсервування сперми гусаків під захистом диметилформаміду і діолів: Матеріали IV Укр. конф. по птахівництву з міжнародною участю // Птахівництво.– Харків, 2003.– Вип. 53.– С. 27-32.
5. Кріоконсервирование клеточных суспензий // Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
6. Сахацкий Н.И., Андреев В.И., Артеменко А.Б. Эффективная технология низкотемпературной консервации спермы гусаків // Материали II Всесоюзной конф. "Механизмы криоповреждений и криозащиты биологических объектов": Тез. докладов.– Харьков, 1984.– С. 249.
7. Терещенко А.В. Сохранность сперматозоидов петухов в зависимости от условий кріоконсервирования: Дис... канд. биол. наук.– Борки, 1988.– 164 с.

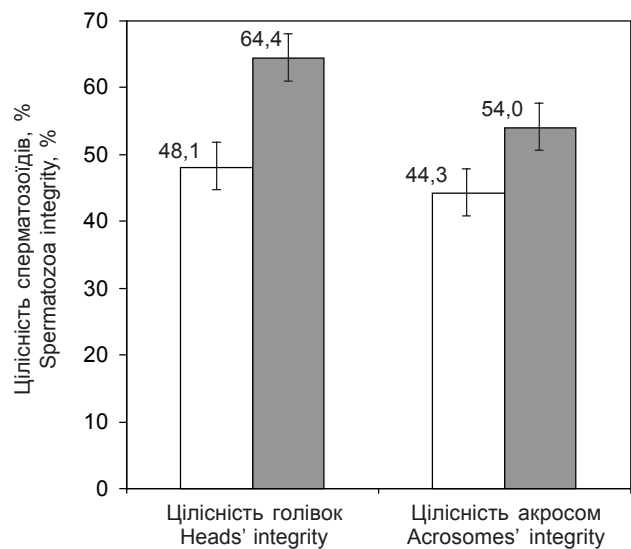


Рис. 3. Цілісність сперматозоїдів гусаків у залежності від режиму охолодження: □ – стандартний режим; ■ – експериментальний режим.

Fig. 3. Integrity of gander spermatozoa depending upon the cooling regimen: □ – standard regimen; ■ – experimental regimen.

Conclusions

As a result of investigations on the technology improvement for gander sperm cryopreservation in plastic straws we concluded that the sperm freezing to be successful when taking into account the critical temperature zones characteristic for each of the cooling rates. Sex cell cooling prior to the crystallization start should be performed at slow rates ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), after the crystallization start temperature down to -90°C , the rate must be increased up to $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ followed by its reduction to $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Such a freezing regimen for gander sperm enables us to get quite a high percent of morphologically whole cells (64%) following thawing.

References

1. Andreev V.I. Elaboration and advancing the ways for waterfowl sperm cryopreservation: Thesis for candidate's degree obtaining (biology).– Kharkov, 1983.– 122 p.
2. Andreev V.I., Sakhatsky N.I., Ostashko F.I. Use of ethylene glycol and dimethylformamide as cryoprotectants when freezing gander sperm // Ptitsevodstvo.– 1984.– N37.– P. 53-55.
3. Bychko S.V. Effect of the dilution temperature of gander sperm on physiological state of spermatozoa // Research and Technical Library of the Institute for poultry raising of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences.– 2003.– N84.– P. 20-23.
4. Bychko S.V., Artemenko O.B., Tereschenko O.V. Cryopreservation of gander sperm under the protection of dimethylformamide and diols: Materials of the IVth Ukrainian Conference on poultry raising with an international participation // Ptahivnytstvo.– Kharkiv, 2003.– N53.– P. 27-32.
5. Cryopreservation of cell suspensions // Ed. by Tsutsaeva A.A.– Kiev: Naukova dumka, 1983.– 240 p.

8. *Bellagamba F., Cerolini S., Cavalchini L.G.* Cryopreservation of poultry semen: a review // *World's Poultry Sci. Journal.*– 1993.– Vol.49.– P.157-166.
 9. *Carpenter J.F., Crowe J.H.* The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes // *Cryobiology.*– 1988.– Vol.25.– P. 244-255.
 10. *Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H.Y.* A two-factor hypothesis of freezing injury // *Exp. Cell Res.*– 1972.– Vol.71.– P. 345-355.
 11. *Muldrew K., McGann L.E.* The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing // *Cryobiology.*– 1993.– Vol.30– P. 620.
 12. *Ozkavukcu S., Erdemli E.* Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects // *J. of Ankara Medical School.*– 2003.– Vol. 24.– №4.– P. 187-196.
 13. *Sexton T.J.* Optimal rates for cooling chicken semen from +5 to –196°C // *Poultry Sci.*– 1980.– Vol.59.– P. 2765-2770.
 14. *Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T.* Cryopreservation of poultry semen // *Brit. Poultry Sc.*– 1995.– Vol. 36.– P. 586-590.
 15. *Woelders H., Matthijs A., Engel B.* Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing // *Cryobiology.*– 1997.– N35.– P. 93-105.
-
6. *Sakhatsky N.I., Andreev V.I., Artemenko A.B.* Effective technology for low temperature preservation of gander sperm // *Proceedings of the 2nd All-Union conference "Mechanisms of cryodamages and cryoprotection of biological objects".*– Kharkov, 1984.– P. 249.
 7. *Tereschenko A.V.* Integrity of fowl spermatozoa depending on the cryopreservation conditions: Thesis of the candidate of *biol. sciences.*– Borki, 1988.– 164 p.
 8. *Bellagamba F., Cerolini S., Cavalchini L.G.* Cryopreservation of poultry semen: a review // *World's Poultry Sci. Journal.*– 1993.– Vol.49.– P.157-166.
 9. *Carpenter J.F., Crowe J.H.* The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes // *Cryobiology.*– 1988.– Vol.25.– P. 244-255.
 10. *Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H.Y.* A two-factor hypothesis of freezing injury // *Exp. Cell Res.*– 1972.– Vol.71.– P. 345-355.
 11. *Muldrew K., McGann L.E.* The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing // *Cryobiology.*– 1993.– Vol.30– P. 620.
 12. *Ozkavukcu S., Erdemli E.* Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects // *J. of Ankara Medical School.*– 2003.– V. 24.– №4.– P. 187-196.
 13. *Sexton T.J.* Optimal rates for cooling chicken semen from +5 to –196°C // *Poultry Sci.*– 1980.– Vol.59.– P. 2765-2770.
 14. *Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T.* Cryopreservation of poultry semen // *Brit. Poultry Sc.*– 1995.– Vol. 36.– P. 586-590.
 15. *Woelders H., Matthijs A., Engel B.* Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing // *Cryobiology.*– 1997.– N35.– P. 93-105.

Надійшла 14.06.2004

Accepted in 14.06.2004