

Международные новости в области ИО от Минитюб

Sperm Notes®

Аспирация ооцитов из фолликулов яичников живых животных (OPU-технология)
и производство эмбрионов КРС in vitro

Стр. 2-4

AndroVision® - Оптимальная система для проведения качественного
и количественного анализа спермы быка

Стр. 5

Криоконсервация спермы быка; оптимизация процессов замораживания
с целью минимизации криповреждений

Стр. 6-7

QuickLock Ergo – уникальный дизайн среди инструментов
для искусственного осеменения

Стр. 8

Новости Minitube: Minitube открывает новый логистический центр

Стр. 8

Minitube International AG
Hauptstrasse 41
84184 Tiefenbach – Germany
Telefon: +49 (0) 8709 9229 0
Fax: +49 (0) 8709 9229 39
E-Mail: minitube@minitube.de



Аспирация ооцитов из фолликулов яичников живых животных (OPU-технология) и производство эмбрионов КРС in vitro

Dr. Eva Held, Minitüb GmbH

Рост потребности в применении OPU-технологии

Использование OPU-технологии с последующим производством эмбрионов in vitro (OPU-IVP) в значительной мере продиктовано потребностью отрасли племенного животноводства в постоянном содействии генетическому совершенствованию при разведении КРС молочных и мясных пород, в частности с началом применения сексированного семени. Это направление приобрело еще большую важность после внедрения геномной селекции. Можно аспирировать ооциты у очень молодых телок и брать биоптаты из эмбрионов, произведенных in-vitro. В целях увеличения числа получаемых эмбрионов и потомства на одного донора необходимы успешные программы OPU-IVP, что в дальнейшем позволит повысить интенсивность селекции для последующих поколений.

Сочетание геномной оценки с использованием сексированной спермы у молодых телок может также являться стратегией минимизации времени, необходимого для создания замены элитным особям женского пола. Число элитных кандидатов увеличивается за счет повторных вымываний в ходе программ пересадки эмбрионов, полученных в результате инициирования множественной овуляции и использования процедуры «захвата яйцеклетки». Основным преимуществом применения геномной селекции в сочетании с технологиями ассистированной репродукции является уменьшение интервала между поколениями, что может дать удвоение темпов генетических улучшений по сравнению с обычными системами тестирования потомства (обзор проведен Ponsart C. 2013).

Недавно были описаны некоторые преимущества программ OPU-IVF относительно обычной трансплантации эмбрионов:

- Проведение процедуры OPU (сбор ооцитов) дважды в неделю в течение нескольких недель
 - Возможность получения ооцитов от стельных доноров в течение первого триместра стельности
 - Получение до 50 живорожденных телок от одного донора в год
 - Разделение ооцитов, полученных от одного донора, на несколько групп, которые могут быть оплодотворены спермой различных быков
 - Более эффективное использование редкой, дорогой или сексированной спермы
 - Уменьшение интервала между поколениями благодаря возможности получения ооцитов от неполовозрелых телок
- (обзор проведен A.M. van Wagendonk-de Leeuw 2006)

История и развитие технологии OPU

Аспирация фолликулов КРС под контролем ультразвука с последующим выделением ооцитов была впервые предложена в 1986 году в Дании Callesen H. et al. Первая успешная процедура OPU для КРС была проведена в 1992 году датской исследовательской группой, возглавляемой Pieterse M.C. et al., с применением используемых для женщин процедур трансвагинального УЗ-сканирования. Оригинальная процедура OPU не требует обработки животного стимулирующими гормональными препаратами и обычно проводится дважды в неделю, что позволяет получить максимальное количество ооцитов, поскольку доминантный фолликул не развивается, если все видимые фолликулы аспирируются в ходе процедуры OPU.

При большинстве процедур сбора раз в неделю, развитие доминантного

фолликула происходит в ходе последующего сбора. Это приводит к регрессии и дегенерации второстепенных фолликулов (обзор проведен Qi M. 2013). В течение двух последних десятилетий исследование OPU сфокусировалось на применении гормонов. Преимущества стимулирования суперовуляции перед проведением OPU кажутся очевидными: можно получить больше фолликулов и больше ооцитов, что приведет в результате к производству большего числа эмбрионов. Было показано, что среднее число аспирированных фолликулов, собранных ооцитов и развивающихся эмбрионов при проведении процедуры OPU с предварительной обработкой животных ФСГ, было значительно выше чем их число, получаемое в ходе проводимых раз в неделю процедур OPU без предварительной стимуляции – в пересчете на одного донора и одну процедуру (Chaubal SA. et al. 2009).

Оборудование и процедура

Если говорить о процедуре OPU в целом, она проводится с использованием ультразвукового зонда, оборудованного пункционной иглой-насадкой для проникновения через стенку влагалища и аспирации содержимого каждого фолликула в яичнике животного. Фолликулярная жидкость, содержащая ооциты, аспирируется через предварительно подогретую вакуумную систему.

Держатель зонда с ультразвуковым датчиком помещают во влагалище и располагают перед шейкой матки (рис. 1). Одну руку вводят в прямую кишку животного и манипулируют яичником относительно передней части влагалища в непосредственной близости от шейки матки. Теперь фолликулы можно визуализировать на экране ультразвукового устройства. Другой рукой в вагину продвигают держатель зонда, и по мере выдвигания иглы вперед она проводится через стенку влагалища и направляется в фолликулы, заполненные фолликулярной жидкостью (рис. 2). Аспирация ооцитов выполняется при помощи вакуумного насоса (рис. 3).

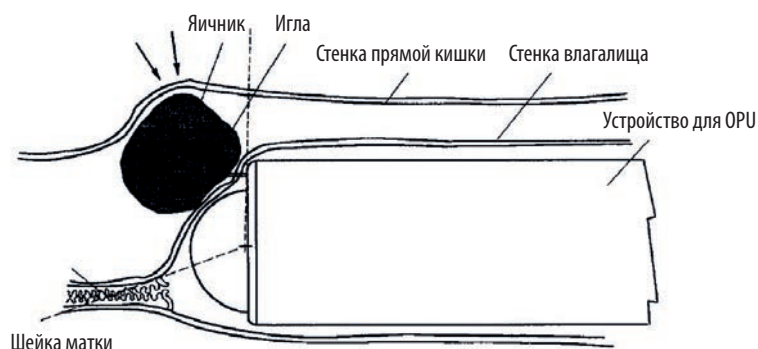


Рис. 1: Pieterse M.C. 1992

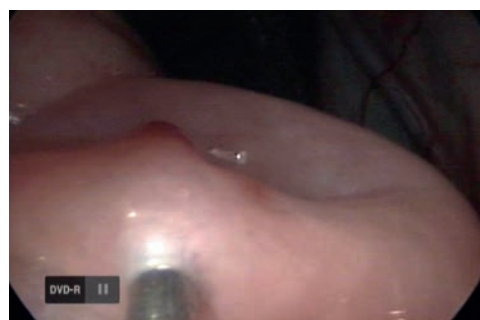


Рис. 2: Besenfelder U. and Hoelker M., не опубликовано

Поскольку возраст телок, отбираемых для процедуры ОРУ, неуклонно снижается, компания Minitube разработала новый держатель зонда, отличающийся тонкостью и легкостью конструкции, чтобы он мог отвечать требованиям в плане работы с более мелкими животными. Кроме того, держатель зонда от Minitube и игольный блок специально предназначены для работы с короткими иглами, что дает ряд преимуществ, таких как недорогая и простая замена, легкость манипуляций и небольшой мертвый объем. Эти преимущества делают ненужным повторное использование игл, тем самым помогая свести к минимуму риск перекрестного загрязнения при использовании игл для обработки животных (рис. 4).

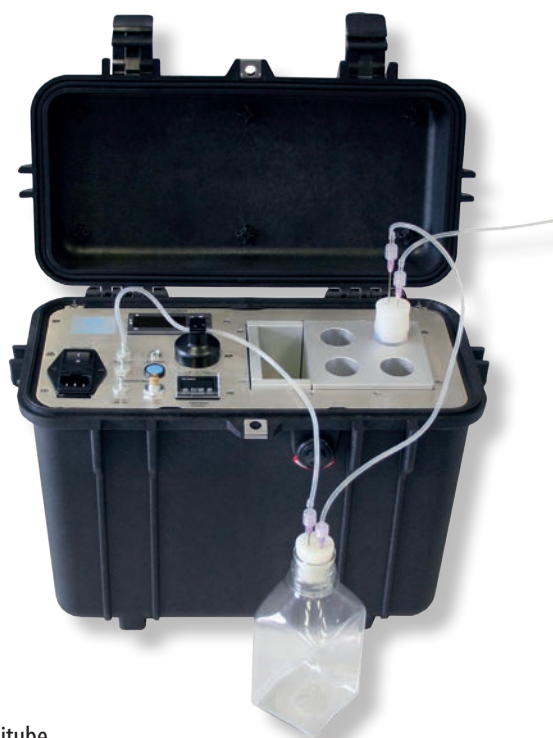


Рис. 3: Minitube

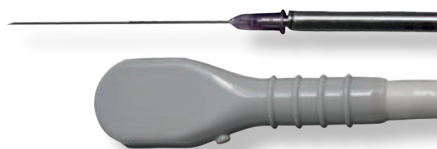


Рис. 4: Minitube

Процедуры in vitro после получения яйцеклеток методом ОРУ

Основными этапами производства эмбрионов in vitro являются:

- Выбор ооцитов
- Созревание ооцитов in vitro
- Капацитация спермиев in vitro
- Оплодотворение in vitro
- Культивирование эмбрионов in vitro

Выбор ооцитов:

Ооциты, используемые для производства эмбрионов in vitro, должны иметь гомогенную цитоплазму и не менее трех слоев клеток кумулюса, плотно прилегающего к зоне пеллюцида. На рис. 5А показан ооцит с плотным слоем клеток кумулюса, что соответствует в плане оценки качества „1“. Ооцит с оценкой качества „2“ показан на рис. 5В. У него почти гомогенная цитоплазма и около трех слоев клеток кумулюса. На рис. 5С показан ооцит без кумулюса, что в плане оценки качества соответствует „3“.

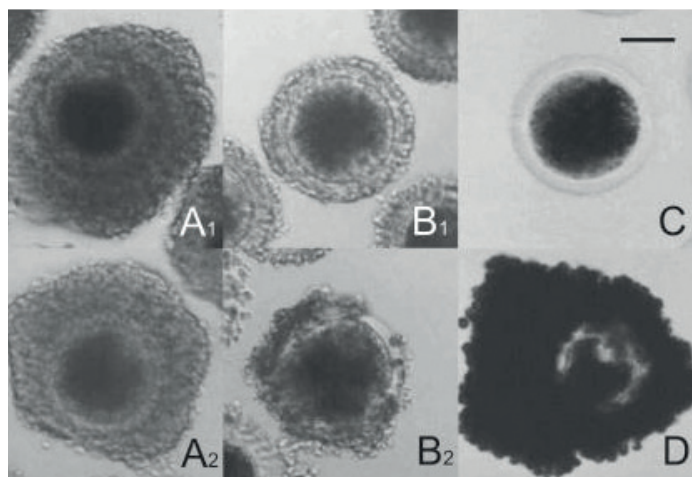


Рис. 5: Alvarez GM. 2009

Прежде чем станет возможным оплодотворение, должно произойти созревание ядра и цитоплазмы ооцита. Созревание ядра – это процесс, происходящий в период возобновления мейоза. Он инициирует разрыв зародышевого пузырька (GVBD), расхождение гомологичных хромосом и выделение первого полярного тельца (Grondahl С. 2008) (рис. 6). Кроме того, клетки кумулюса расширяются в ответ на гонадотропную стимуляцию, воздействие факторов роста, стероидов и некоторых других факторов, секретируемых ооцитом в период созревания (Viscione et al, 1990) (рис. 7).

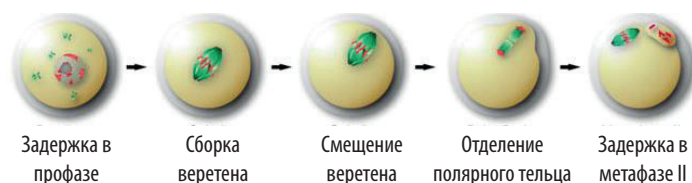


Рис. 6: M. Schuh, Nature: Мейоз ооцитов у млекопитающих

Оптимальная окружающая среда исключительно важна для максимизации числа зрелых ооцитов спустя 22 часа, и ее можно определить следующим образом: 38.5°C, 5 % CO2, максимально возможная влажность и культуральные среды, удовлетворяющие потребности клеток в плане оптимального питания и гормонов.

Оптимальная окружающая среда исключительно важна для максимизации числа зрелых ооцитов спустя 22 часа, и ее можно определить следующим образом: 38.5°C, 5 % CO2, максимально возможная влажность и культуральные среды, удовлетворяющие потребности клеток в плане оптимального питания и гормонов.

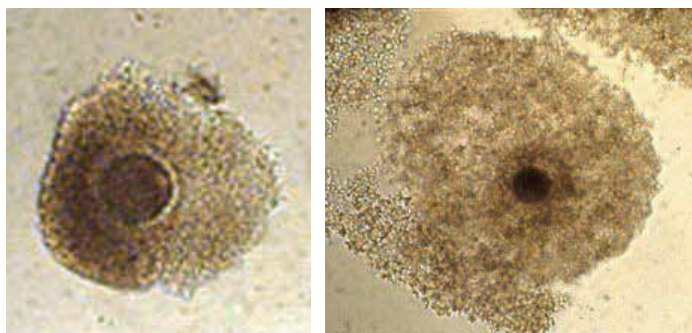


Рис. 7: Университет Висконсина

После созревания ооциты готовы к оплодотворению. Чтобы подготовить сперму для оплодотворения ооцитов *in vitro* (IVF), необходимо провести процедуру так называемого метода «swim-up» (всплывание активной фракции спермы). В природе капацитация происходит во время прохождения спермиев по яйцеводу, и подобные условия необходимо симитировать *in vitro*, чтобы подготовить спермии к акросомной реакции, происходящей во время оплодотворения. Кроме того, во время этапа всплывания (swim up) жизнеспособные спермии отделяются от мертвых и от нежелательных остатков разбавителя спермы.

Слияние ооцита и спермия представляет собой очень сложный процесс, требующий наличия компетентных ооцитов и спермиев, а также оптимальных условий для культивирования. Обычно совместно культивируют от 5 до 50 ооцитов и 105 спермиев в каплях 50 – 400 мкл среды для оплодотворения. Помимо питательных субстанций такая среда содержит также активаторы для спермиев, такие как эpineфрин или кофеин. Фактически оплодотворение занимает 6 - 18 часов и требует поддержания постоянной температуры 38,5°C при концентрации атмосферного CO₂ - 5 %.

Наконец, предположительные зиготы культивируют в определенной культуральной среде в течение семи дней. В 1994 году Gardner et al. разработали синтетическую среду SOF (синтетическая среда яйцеводов) с добавлением BSA (бычий сывороточный альбумин) и незаменимых и заменимых аминокислот. Эта среда обеспечивала относительно постоянную динамику развития эмбрионов. Однако данная среда не имеет четко определенного состава в силу неопределенной природы и варибельности BSA. Поэтому одной из основных задач современных исследований является разработка культуральных систем, не содержащих белков животного происхождения (обзор выполнен Thompson and Peterson, 2000).

В течение периода культивирования эмбрионы проходят несколько стадий деления дроблением (рис. 9), пока на 7-й день не достигнут стадии бластоцисты (рис. 10).



Рис. 9: Rizos D. Не опубликовано

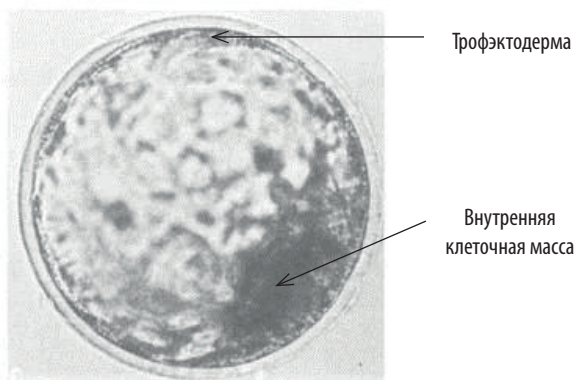


Рис. 10: George E. Seidel, Jr, FAO 1991

Поскольку не все аспирированные ооциты компетентны к развитию, выход бластоцист при производстве *in vitro* ограничивается 25 - 35 %.

Градация эмбрионов по их качеству для трансплантации

До проведения пересадки эмбрионов (ET) необходимо отобрать пригодные для трансплантации эмбрионы на базе их морфологических признаков. В соответствии с Руководством IETS следует строго придерживаться нижеприведенной классификации бластоцист:

Классификация	Номенклатура	Определение
I	Отлично или хорошо	Эмбрион симметричной сферической формы с отдельными бластомерами (клетками), однородными по размеру, цвету и плотности. Такой эмбрион соответствует ожидаемой стадии развития. Возможно относительно небольшое количество отклонений, и по меньшей мере 85 % клеточного материала должно быть интактным; клеточная масса жизнеспособна. Оценка должна основываться на процентном содержании эмбриональных клеток, представленным материалом, экструдированным в перивителлиновое пространство. Зона пеллюцида должна быть гладкой и не иметь вогнутых или плоских поверхностей, которые могут привести к прилипанию эмбриона к чашке Петри или соломинке.
II	Удовлетворительно	Умеренные отклонения от нормы в плане общей формы клеточной массы эмбриона или размера, цвета и плотности отдельных клеток. Не менее 50 % клеточного материала должно быть интактным; клеточная масса эмбриона жизнеспособна.
III	Низкое качество	Существенные отклонения от нормы в плане общей формы клеточной массы эмбриона или размера, цвета и плотности отдельных клеток. Не менее 25 % клеточного материала должно быть интактным, клеточная масса эмбриона жизнеспособна.
IV	Мертвые или дегенеративные	Дегенеративные эмбрионы, ооциты или одноклеточные эмбрионы: не жизнеспособны.

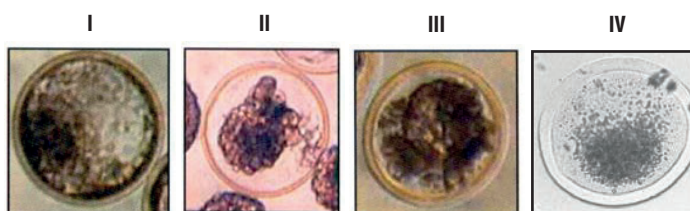


Рис. 11: IETS

Ссылки:

Ponsart C, Le Bourhis D, Knijn H, Fritz S, Guyader-Joly C, Otter T, Lacaze S, Charreaux F, Schibler L, Dupassieux D, Mullaart E. "Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle." *Reprod. Fert. Dev.* 2013;26(1):12-21; Van Wagtenonck-de Leeuw AM. "Ovum pick-up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status." *Theriogenology.* 2006 Mar 15;65(5):914-25; Callesen H, Greve T, Christensen F. "Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes." *Theriogenology* 1987 27: 217; Pieterse MC, Vos PLAM, Kruij TAM, Wurth YA, van Beneden TH. "Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes." *Theriogenology* 1991 35: 857-862; Qi M, Yao Y, Ma H, Wang J, Zhao X. "Transvaginal Ultrasoundguided Ovum Pick-up (OPU) in Cattle." *J Biomim Biomater Tissue Eng.* 2013 18:118; Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PE, Riesen JW, Tian X, Yang X. "Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows." *Theriogenology.* 2006 May;65(8):1631-48; Grøndahl C. "Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of in vitro maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS." *Dan Med Bull.* 2008 Feb;55(1):1-16; Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. "Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis." *Biol. Reprod.* 1990 Oct;43(4):543-7; Gardner DK. "Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support." *Cell Biol. Int.* 1994 Dec;18(12):1163-79; Thompson JG, Peterson AJ. "Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences." *Hum. Reprod.* 2000 Dec;15 Suppl. 5:59-67.

AndroVision® - Оптимальная система для проведения качественного и количественного анализа спермы быка

Petra Eisenschink, Minitüb GmbH

Как только сперма собрана, сразу же начинается необратимый процесс старения спермиев. Поэтому работать нужно настолько быстро и эффективно, насколько это возможно. AndroVision® является идеальной системой для быстрого, точного и объективного определения концентрации спермы и исходной подвижности спермиев.



Рис. 1: AndroVision®, модульная система для анализа спермы быка.

Разработанная с учетом охвата всех аспектов анализа спермы, AndroVision® представляет собой также гибкую систему с возможностью простой адаптации. В дополнение к классическому анализу CASA предоставляется также полная линейка более продвинутых тестов для оценки функциональных свойств спермы, включая анализ жизнеспособности спермиев и целостности акросом. В ближайшее время будут также доступны тесты для контроля мембранного потенциала митохондрий и целостности ДНК.

Обладая уникальной способностью проводить оценку 1000 и более клеток в поле, AndroVision® позволяет выполнять беспрецедентно быстрый и точный анализ спермы. Идентифицируется каждый отдельный спермий, и сразу после анализа можно запросить детальную информацию. Пользовательский интерфейс с его логичным дизайном очень прост в понимании и использовании. Чтобы запустить программу оценки, достаточно всего лишь нескольких щелчков мышью, что позволяет поддерживать непрерывность рабочего процесса.

Кроме того, AndroVision® дает возможность точно идентифицировать головки спермиев и эффективно дифференцировать спермий от других мелких частиц в эякуляте. Это является значительным преимуществом при анализе разбавленной спермы, когда используются разбавители, содержащие яичный желток или молоко (рис.2).

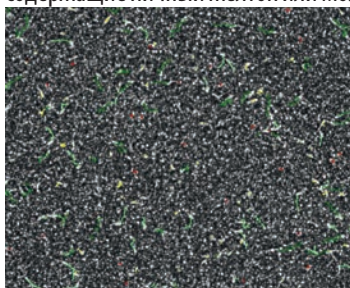


Рис. 2: Сперма быка с разбавителем на основе молока

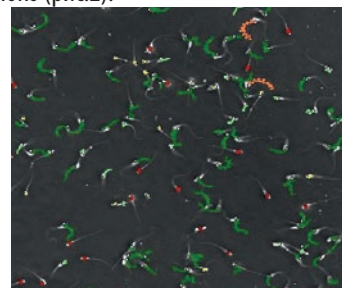


Рис. 3: Сперма быка с разбавителем AndroMed®

Оценка подвижности спермиев включает три параметра:

- Процентное соотношение подвижных спермиев
- Характеристики движения и
- Скорость движения

Оценка жизнеспособности спермиев доступна как часть программного модуля Подвижность и Концентрация. Это означает, что после подготовки двух образцов – и использования красителя, напр., Hoechst 33342/PI, на одном из них – Вы получаете возможность переключаться между двумя названными модулями во время проведения измерений. Затем результат оценки жизнеспособности выводится вместе с соответствующими данными анализа эякулята. Результаты хранятся в одной записи (рис. 4, 5).

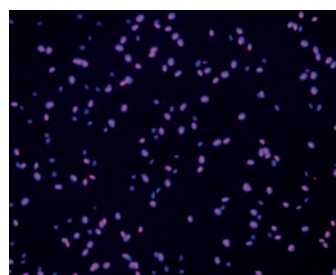


Рис. 4: Окрашивание для оценки жизнеспособности: Hoechst 33342/PI

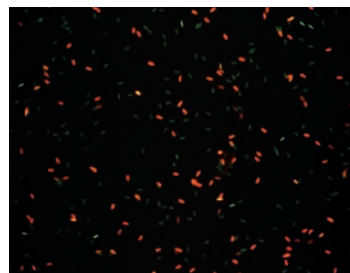


Fig. 5: Viability stain with SYBR/PI

Интерактивный программный модуль Морфология и Морфометрия помогает пользователю в проведении полного и тщательного анализа морфологических аномалий спермы. Программа идентифицирует спермий в окрашенных и неокрашенных образцах и анализирует каждую отдельную клетку: Морфометрия (по Крюгеру) определяет длину и ширину головки спермия, форму головки и асимметрию средней части каждого отдельного анализируемого спермия. Спермий классифицируют в соответствии с большим диапазоном морфологических аномалий. Программа Классификации представляет собой самообучающуюся систему, либо можно задать автоматическую дифференциацию между интактными и аномальными головками. Стандартными подклассами аномалий для ручного отбора являются:

- Дефект акросомы
- Отделенная головка
- Асимметрия средней части
- Согнутый хвост
- Скрученный хвост
- Проксимальная капля
- Дистальная капля
- Клеточный «мусор»

Успешно решая сложные задачи, связанные с компьютеризованным анализом спермы быка в лаборатории или на производственной линии, программа AndroVision® показала себя как прекрасный инструмент для выполнения как количественного, так и качественного анализа спермы быка.

Криоконсервация спермы быка; оптимизация процессов замораживания с целью минимизации криповреждений

Dr. Eva Held, Minitüb GmbH

Влияние криоконсервации на сперматозоиды

Физические и физиологические процессы

Криоконсервация сперматозоидов неизбежно снижает жизнеспособность и фертильность спермиев в результате повреждений, возникающих на клеточном уровне. Поэтому необходимы понимание и оптимизация процесса замораживания в целях сведения к минимуму риска названных повреждений. Хотя на этот счет существует несколько гипотез, внутренние молекулярные механизмы, отвечающие за снижение оплодотворяющей способности во время хранения спермы *in vitro*, остаются неясными. Процедуры охлаждения и замораживания обуславливают ряд физических изменений во внешнем окружении клеточной суспензии, таких как передвижение жидкости и растворенных веществ (Vishwanath V. 2000).

Три основных фактора, индуцирующих криповреждение любой клетки, это: осмотический стресс/дегидратация, окислительный стресс и формирование внутриклеточных кристаллов льда. Чтобы сохранить жизнеспособность во время замораживания, спермии должны пережить ряд осмотических и окислительных процессов, приводящих к изменениям. Помимо негативного влияния изменений, связанных с осмотическими процессами, формированием кристаллов льда внутри и вне клеток и продукции активных форм кислорода, процесс замораживания оказывает также негативное воздействие на подвижность, изменение липидной фазы, целостность мембран, функции митохондрий, целостность ДНК, клеточную сигнализацию и метаболизм. Возникающие условия могут привести к апоптотической и некротической гибели клеток (обзор выполнен Meyers S.A. 2012 AAAA Proceedings).

Одной из наиболее важных причин повреждения и гибели клеточных структур при замораживании является формирование кристаллов льда внутри и вне замораживаемых клеток. Первоначально снижение температуры приводит к замораживанию среды между клетками. Внеклеточная среда замерзает при температуре от -5°C до -10°C , в зависимости от концентрации электролитов. В противоположность этому, внутриклеточные жидкости и компоненты в данном диапазоне температур не замерзают, а переохлаждаются. Формирование льда вне клеток приводит к повышению местной концентрации электролитов, что сказывается на диффузии внутриклеточной жидкости, а это ведет к дегидратации межклеточного пространства и сжатию клеток (Mazur P. 1984). Кроме того, при замораживании в спермиях отмечаются признаки продвинутой капацитации после оттаивания, даже если эти спермии перед процедурой замораживания находились лишь в начале процесса капацитации (Medeiros et al. 2002).

Этапы охлаждения

Критические аспекты

Обычно протокол замораживания подразделяется на три фазы: охлаждение с $+5^{\circ}\text{C}$ до -5°C , инициация формирования микрокристаллов льда, называемая также «кристаллизацией», и охлаждение с -5°C до -130°C .

Перед процессом замораживания эякулят следует охладить до $+5^{\circ}\text{C}$ и эквilibрировать его при данной температуре. Несколько исследований, проведенных в последние десятилетия, показали, что этап охлаждения разбавленного эякулята с $+30^{\circ}\text{C}$ до $+4^{\circ}\text{C}$ имеет решающее значение для сохранения подвижности и жизнеспособности спермиев после оттаивания (Robbins et al. 1976, Woelders et al. 1998). Зависящие от температуры структурные изменения плазматических мембран наблюдались, в частности, в диапазоне температур между $+20^{\circ}\text{C}$ и $+15^{\circ}\text{C}$ (Hammerstedt et al. 1990).

Еще в 1957 году в исследованиях были отмечены самые высокие показатели оплодотворения после этапа эквilibрации в течение 12 часов с $+30^{\circ}\text{C}$ до $+5^{\circ}\text{C}$ (Graham et al. 1957).

В 1976 году Ennen et al. сопоставили периоды в диапазоне между 2 и 18 часами эквilibрации. Наиболее высокая подвижность после оттаивания наблюдалась для диапазона 4 - 10 часов. Дальнейшие эксперименты показали, что период эквilibрации продолжительностью 18 часов обеспечивает лучшие результаты, чем 4-часовой период, в отношении сохранения подвижности спермиев быка после оттаивания при использовании разбавителя на основе молока (Foote R.H. et al. 2002).

Охлаждение клеток до точки их замерзания и ниже не обязательно приводит к замораживанию образцов в равновесной точке замерзания, когда речь идет о переохлаждении, образовании внутриклеточного льда и дегидратации клеток.

При температурах в пределах -5°C и -10°C происходит образование кристаллов льда в межклеточной жидкости, в то время как внутриклеточная жидкость остается переохлажденной. Для поддержания химического равновесия между внутриклеточными и внеклеточными жидкостями клетки дегидратируют. Во время этого критического периода большое значение имеет скорость охлаждения: охлаждение должно выполняться достаточно медленно для того, чтобы клетки успели в должной степени дегидратировать, однако достаточно быстро для того, чтобы заморозилась оставшаяся межклеточная жидкость, прежде чем клетки начнут испытывать гиперосмотический стресс в результате дегидратации (Medeiros et al. 2002).

Следовательно, криповреждение клеток развивается в тех случаях, когда скорость охлаждения либо слишком медленная, либо слишком быстрая. При слишком медленной скорости охлаждения криповреждение вызывается в основном из-за эффекта раствора, к примеру, за счет воздействия гиперконцентрированных растворов электролитов на внутриклеточную структуру и значительное обезвоживание клеток. При быстрой скорости охлаждения криповреждение вызывается в основном недостаточной дегидратацией и образованием внутриклеточных кристаллов льда (Mazur et al. 1972) (Рис. 1).

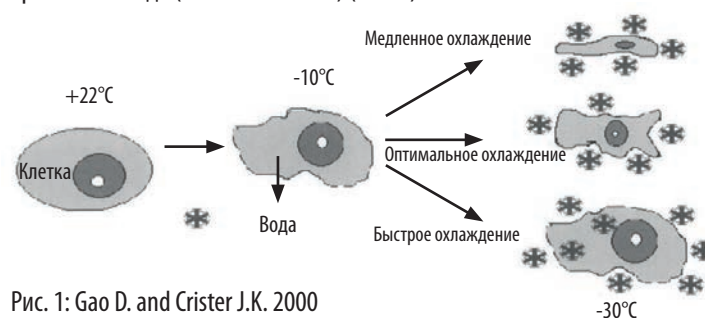


Рис. 1: Gao D. and Crister J.K. 2000

В начале замораживания в образце происходят энтальпические изменения. Поскольку внутренняя энергия жидкости выше, чем упорядоченной твердой фазы, то при выбросе так называемого скрытого кристаллизационного тепла происходит повышение температуры. Такой выброс скрытого кристаллизационного тепла наблюдается в форме резкого подъема температуры, за которым следует формирование так называемой температурной площадки (плато) на кривой замораживания, пока это скрытое тепло кристаллизации не будет отведено от образца. Некоторые исследования показали, что длительное существование плато на кривой замораживания губительно сказывается на выживаемости спермиев, т.о. снижение продолжительности периода постоянной температуры на кривой замораживания положительно сказывается на оплодотворяющей способности спермиев быка (Parkinson and Whitefield 1987).

Оптимизация скорости охлаждения

Mazur et al. 1972, предположили, что оптимальной скоростью охлаждения оказывается та, которая является максимально быстрой для того, чтобы избежать повреждающего эффекта раствора, однако достаточно медленной для того, чтобы клетки смогли в должной степени дегидратировать во избежание формирования внутриклеточного льда. Такие конкурирующие процессы имеют характерную кривую в виде перевернутой буквы "U" (скорость охлаждения против выживания) (Рис. 2).



Рис. 2: Muldrew K. et al. 2004

Данный график показывает, что при медленных скоростях охлаждения эффекты действия раствора являются преобладающими факторами, провоцирующими криповреждения. При быстрых скоростях охлаждения криповреждение в основном обуславливается формированием внутриклеточных кристаллов льда. Сочетание двух этих эффектов подразумевает, что будет отмечена кривая выживаемости в форме перевернутой буквы "U" и оптимальная скорость охлаждения, которая сводит к минимуму как эффекты воздействия раствора, так и формирование внутриклеточного льда.

Принцип действия TurboFreezer

Из вышеизложенного становится очевидным, что контроль нуклеации и обеспечение температурной компенсации выброса скрытого кристаллизационного тепла положительно сказывается на выживаемости спермиев после оттаивания. Поэтому желательно использовать морозильное оборудование с контролируемой скоростью замораживания. Температурная компенсация обеспечивается за счет автоматического снижения температуры в камере, что инициирует нуклеацию и впоследствии компенсирует выброс скрытого кристаллизационного тепла.

Также доказан положительный эффект возможности избежать переохлаждения различной степени в соломинках замораживаемой партии путем произвольного индуцирования замораживания в точке, когда образцы охладились на несколько градусов ниже их равновесной точки замерзания. Несмотря на то, что данный задокументированный факт хорошо известен уже на протяжении нескольких десятилетий, большинство процессов замораживания соломинок со спермой с контролируемой скоростью, используемых сегодня в условиях коммерческих организаций, не в состоянии обеспечить однородную скорость охлаждения для всех соломинок, замораживаемых в одном конкретном цикле. Причина обусловлена в основном неопределенным и широким диапазоном температур в морозильной камере и недостаточно мощным форсированием охлаждения при выбросе скрытого кристаллизационного тепла.

TurboFreezer разработан с учетом названных критических факторов: четыре горизонтально расположенных вентилятора обеспечивают мощный поток паров азота, который продувается горизонтально через полки с соломинками. Заранее заданная скорость потока паров в сочетании с точно

контролируемой температурой обеспечивают равномерную структуру охлаждения и замораживания всей партии соломинок. Такая отличительная и уникальная способность TurboFreezer мгновенно удалять скрытое тепло кристаллизации по мере его выброса обеспечивает в результате очень короткую продолжительность периода постоянной температуры (плато) на кривой замораживания. Ни один другой морозильник не обеспечивает такую возможность. TurboFreezer может восстановить температуру во всех соломинках всей замораживаемой партии менее чем за 1 минуту. В TurboFreezer более однородные условия создаются за менее продолжительный срок, чем в обычных морозильниках (Рис. 3).

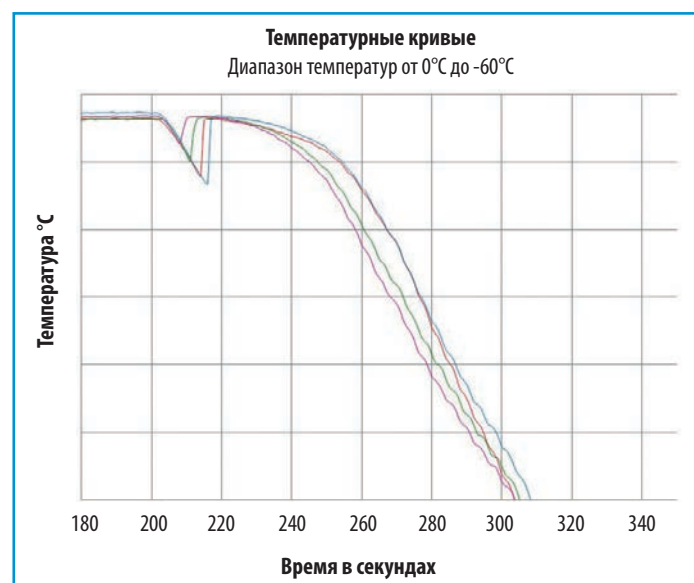


Рис. 3: Фаза кристаллизации и плато в TurboFreezer

В ближайшее время будут опубликованы обнадеживающие результаты проводимых полевых испытаний, изучающих корреляцию между замораживанием спермы быка с использованием TurboFreezer и его влиянием на фертильность.

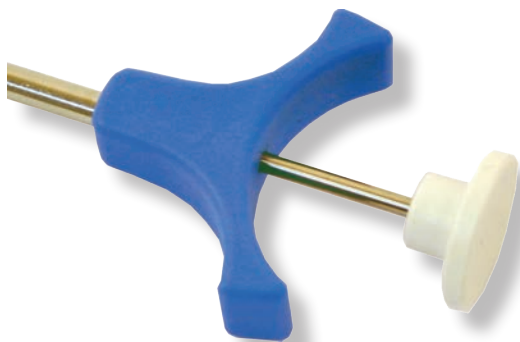
References:

- Vishwanath V, Shannon P "Storage of bovine semen in liquid and frozen state." Anim Reprod Sci. 2000;62 (1-3):23-53;
- Meyers SA "Cryostorage and oxidative stress in mammalian spermatozoa" AAAA Proceedings 2012; Mazur P "Freezing of living cells: mechanisms and implications." Am J Physiol. 1984 Sep;247 (3 Pt 1):C125-42; Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. "Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?" Theriogenology 2002 Jan 1;57 (1):327-44;
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J Androl. 1990 Jan-Feb;11 (1):73-88; Graham EF, Erikson WE, Bayley ND (1957): "Effect of glycerol equilibration on frozen bovine spermatozoa." J Dairy Sci 40, 510-515; Ennen BD, Berndtson WE, Mortimer RG und Pickett BW (1976) "Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in 0.25-ml straws." J. Anim. Sci. 43, 651-6; Foote RH, Kaproth MT: "Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility." J Dairy Sci. 2002 Feb;85 (2):453-6; Robbins RK, Saacke RG, Chandler PT. "Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws." J Anim Sci. 1976 Jan;42 (1):145-54; Woelders H, Matthijs A, Engel B. "Effects 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 Sep;35 (2):93-105; Mazur P, Leibo SP, Chu EH: "A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese tissue-culture cells." Exp Cell Res 1972; 71: 345-55; Parkinson TJ and Whitefield CH "Optimization of freezing conditions of bovine spermatozoa." Theriogenology 1987, 27: 781-797; Muldrew K, Acker JP, Elliott JAW, McGann LE (2004): "The water to ice transition: implications for living cells." CRC Press 2004 p. 67-108

QuickLock Ergo – уникальный дизайн среди инструментов для искусственного осеменения

На рынке имеется большой выбор инструментов для искусственного осеменения. В основном они отличаются только внешним видом своих ручек.

Уникальный дизайн Quicklock Ergo выделяет его среди аналогичных приспособлений. В дополнение к тому, что ручка эргономичной формы позволяет технику оптимизировать рабочую процедуру, QuickLock Ergo также очень компактен. Это преимущество становится особенно очевидным, когда несколько Ergo нужно загрузить в нагреватель для QuickLock.

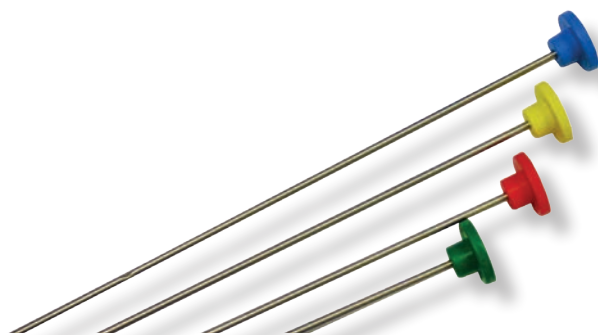


По сравнению с инструментами обычного дизайна, QuickLock Ergo гладкий и маневренный.

На инструмент легко натягивается чехол. Два выступа для фиксации обеспечивают надежное удержание, что исключает необходимость в наличии дополнительного зажимного кольца!



Поставляются мандрены пяти различных цветов, что дает возможность четко различать инструменты для искусственного осеменения, «заряженные» спермой различных быков.



Новости Minitube: Minitube открывает новый логистический центр

Принимая во внимание быстрое развитие в последние годы, компания Minitube открыла новый логистический центр на своих производственных площадях в коммерческой зоне Asper в Тифенбахе, Германия.

С момента строительства склада и производственного здания 'Asper I' в 1998 году число сотрудников компании увеличилось более чем вдвое, а продажи выросли в 2,4 раза. „Поэтому для дальнейшего развития компании был необходим новый 'Asper II', и правительство Нижней Баварии любезно согласилось финансировать его, поскольку одной из целей строительства проекта являлись защита и создание новых рабочих мест,“ отметил д-р Кристиан Зиммет, генеральный директор Minitube.

При объеме инвестиций около 4,6 млн. евро Minitube создала с помощью региональных строительных компаний комплексный высокостеллажный склад площадью 1.000 м², рассчитанный на 2.260 паллетомест и стоящий на уровне самых современных требований.

Склад внушительной высоты (12 м) обеспечивает пропускную способность, которая более чем в два раза превышает предыдущую, и располагает специальной холодильной камерой для чувствительных к температуре фармацевтических препаратов, с более чем 100 мест для



хранения. Asper II оснащен фотоэлектрической системой, расположенной на южном и западном фасадах, с 429 солнечными панелями номинальной мощностью 100.345 кВт/пик на площади 721 м².