

# МЕТОД CRYOTES

[Повне керівництво для забезпечення 100% виживання ооцитів і ембріонів]





**Вітрифікація ооцитів і ембріонів** - це метод криоконсервації, при якому спеціально підготовлені ооцити та ембріони опускаються в рідкий азот. Заморожування відбувається так швидко, що кристали льоду не встигають утворитися, в результаті матеріал не пошкоджується. Розморожування також відбувається з максимально можливою швидкістю, ооцити і ембріони виживають зі 100% ефективністю.

Доктор Масашіге Куваяма винайшов **Метод вітрифікації на криотопах** в 2000 році. З тих пір його метод використовувався більше 500000 раз по всьому світу в більш ніж 1200 клініках сорока країн з незмінно чудовими результатами. Доктор Куваяма заснував перший в світі банк людських ооцитів і отримав першу дитину на вітрифікованих ембріонах в Японії в 2002 та в США в 2003 р.

На цей час метод **був значно вдосконалений**, поліпшені розчини і створений новий дизайн вітрифікаційних планшетів і планшетів для розморожування. В результаті метод КріоТех (CryoTechVitrification) придбав найвищу ефективність і простий протокол використання. Після практичного навчання з досвідченим інструктором будь-який ембріолог може досягти **100% виживання ооцитів, ембріонів і бластоцистів після вітрифікації і найвищого відсотка вагітності**.

*Наша мета - забезпечити всіх пацієнтів у всьому світі надійним 100-відсотковим показником виживання за допомогою найефективнішого у світі методу вітрифікації.*



## **Зміст**

<b>1 • Заморозка</b>	• • • C • 4
Набір для вітрифікації ооцитів і ембріонів, Cryo Tech Lab 101	• • • C • 4
Набір розчинів для вітрифікації ооцитів і ембріонів 110	• • • C • 4
Чашки для вітрифікації VP	• • • C • 5
КРІОТЕК (CR)	• • • C • 5
<b>2 • Розморожування</b>	• • • C • 6
Набір для розморожування ооцитів і ембріонів після вітрифікації, Cryo Tech Lab 102	• • • C • 6
Набір розчинів для розморожування ооцитів і ембріонів після вітрифікації 205	• • • C • 6
Чашки для разморозки WP	• • • C • 6
<b>3 • Основні можливості</b>	• • • C • 7
Збільшення мікроскопа	• • • C • 7
Положення ооцита/ембріона під час аспірації	• • • C • 7
<b>4 • Протокол вітрифікації</b>	• • • C • 8
Матеріали	• • • C • 8
Підготовка до вітрифікації	• • • C • 8
[КРОК 1] Вирівнювання через ES	• • • C • 9
[КРОК 2] Вирівнювання через VS1	• • • C • 12
[КРОК 3] Усадка через VS2	• • • C • 14
[КРОК 3] Розміщення ооцита/ембріона	• • • C • 15
[КРОК 3] Надшвидке замороження	• • • C • 15
<b>5 • Протокол для нагрівання</b>	• • • C • 17
Матеріали	• • • C • 17
Підготовка до нагрівання	• • • C • 17
[КРОК 4] Нагрівання через TS	• • • C • 18
[КРОК 5] Розчинення через DS	• • • C • 20
[КРОК 5] Розчинення через WS1	• • • C • 21
[КРОК 6] Промивання через WS2	• • • C • 22

## 1. Заморозка

### Набір для вітрифікації ооцитів і ембріонів, Cryo Tech Lab 101

Набір для вітрифікації ооцитів і ембріонів використовується для підготовки до заморожування (вітрифікації) та зберігання заморожених яйцеклітин і ембріонів людини. Вітрифікація - це надшвидкий метод заморожування без утворення льоду, який забезпечує кращу виживаність клітин після розморожування. В процесі вітрифікації під дією осмосу відбувається заміщення води всередині клітини на спеціальні речовини-кріопротектори (диметилсульфоксид, етиленгліколь). Вітрифікація підходить для ооцитів (яйцеклітин), бластоцистів та ембріонів на стадії розподілу. Застосовується в наукових біологічних лабораторіях, в клініках з лікування безпліддя.

#### Набір складається з:

- Розчини - ES 1x1.0 мл,
- VS 2x1.0 мл.
- Криотек - 4 шт.
- Планшет вітрифікаційний - 3 шт

Всі розчини призначені для одноразового використання.

Один набір дозволяє заморозити до 12 ооцитів або ембріонів.

#### Склад розчинів:

- NEPES (4- (2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфоновою кислотою) в основному культуральному середовищі M-199 (розчин амінокислот, неорганічних солей, вітамінів);
- Феноловий червоний
- Диметилсульфоксид
- Трегалоза, очищена від ендотоксинів
- Гідроксипропілцелюлоза



Кожен Набір для вітрифікації ооцитів і ембріонів пройшов тест на стерильність UPS, ендотоксичність за методом LAL, ембріотоксичність на ембріонах миші.

Пробірки слід зберігати при температурі 2-8 °C не довше дати зазначеної на етикетці. Термін зберігання - 12 місяців від дати виробництва.

### Набір розчинів для вітрифікації ооцитів і ембріонів 110

Розчини для заморожування (вітрифікації) використовуються для підготовки до заморожування (вітрифікації) і зберігання заморожених яйцеклітин і ембріонів людини. Вітрифікація - це надшвидкий метод заморожування без утворення льоду, який забезпечує кращу виживаність клітин після розморожування. В процесі вітрифікації під дією осмосу відбувається заміщення води всередині клітини на спеціальні речовини-кріопротектори (диметилсульфоксид, етиленгліколь). Вітрифікація підходить для ооцитів (яйцеклітин), бластоцистів та ембріонів на стадії розподілу. Застосовується в наукових біологічних лабораторіях, в клініках з лікування безпліддя.

#### В складі:

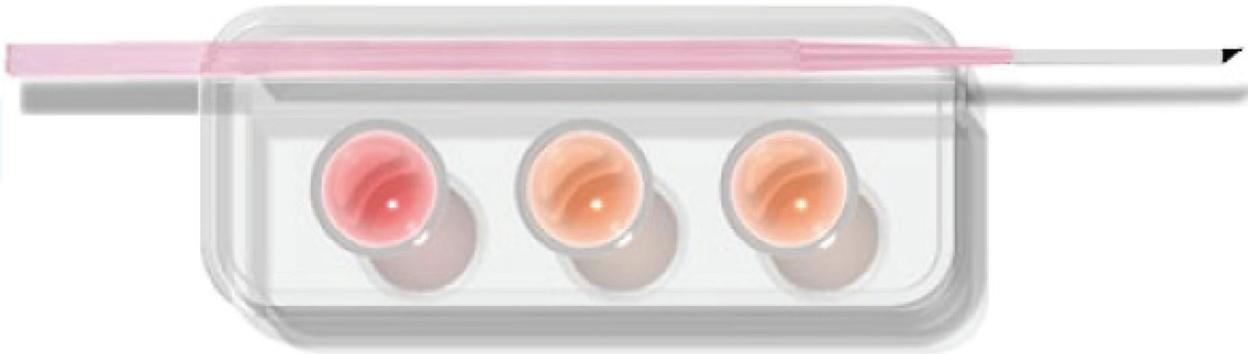
- Вирівнюючого розчину (ES): дві пробірки по 1,8 мл
- Розчину для заморожування (VS): чотири пробірки по 1,8 мл

Всі розчини призначені для одноразового використання.

Пробірки слід зберігати при температурі 2-8 °C не довше дати зазначеної на етикетці. Термін зберігання - 12 місяців від дати виробництва.

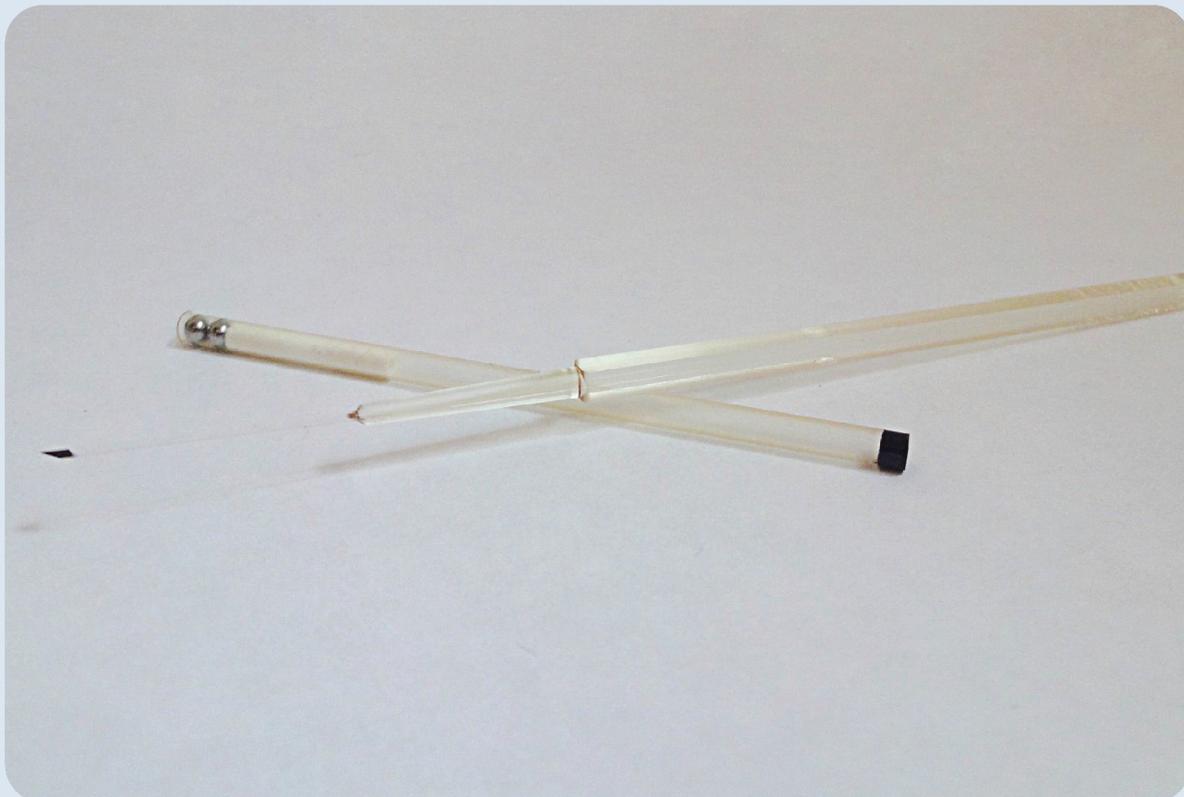


## Чашки для вітрифікації VP



## КРИОТЕК (CR)

Кріотек представляє собою маленький пластиковий брусок рукоятки, на кінці якого є тонкий пластиковий язичок, який може закриватися пластиковим ковпачком. Кріотек призначений для заморожування (вітрифікації в рідкому азоті і подальшого зберігання яйцеклітин і ембріонів людини. Спеціально підготовлені за допомогою речовин - кріопротекторів ооцити або ембріони поміщаються на «язичок». Кріотек і потім погружається в рідкий азот і щільно закривається ковпачком. Поставляється в упаковці по 10 штук, кожен Кріотек упакований індивідуально. Присутні 5 кольорів носіїв (білий, синій, жовтий, зелений, рожевий).



## 2. Розморожування

### Набір для розморожування ооцитів і ембріонів після вітрифікації, Cryo Tech Lab 102

Набір для розморожування ооцитів і ембріонів після вітрифікації використовується для розморожування (відтавання) заморожених яйцеклітин і ембріонів людини. Розморожування - це процес зворотний вітрифікації. Збереження спеціальних умов в процесі розморожування призводить до більшої виживаності клітинних культур. Набір для розморожування ооцитів і ембріонів після вітрифікації підходить для відновлення після глибокої заморозки ооцитів (яйцеклітин), бластоцистів та ембріонів на стадії розподілу. Застосовується в наукових біологічних лабораторіях, в клініках з лікування безпліддя.

#### Набір складається з:

- Розчини - TS 1x1.8 мл,
- DS 1x0.5 мл, WS 1x1.0 мл.
- Планшет для розморожування -1 шт.

Всі розчини призначені для одноразового використання. Один набір дозволяє розморозити до 6 ооцитів або ембріонів.

#### Склад розчинів:

- HEPES (4- (2-гідроксиетил) -1-піперазинетансульфонової кислота) в основному культуральному середовищі M-199 (розчин амінокислот, неорганічних солей, вітамінів);
- Трегалоза, очищена від ендотоксинів
- Гідроксипропілцелюлоза
- Феноловий червоний



### Набір розчинів для розморожування ооцитів і ембріонів після вітрифікації 205

Розчини для розморожування (відтавання) використовуються для розморожування (відтавання) заморожених яйцеклітин і ембріонів людини. Розморожування - це процес зворотний вітрифікації. Збереження спеціальних умов в процесі розморожування призводить до більшої виживаності клітинних культур. Набір для розморожування підходить для відновлення після глибокої заморозки ооцитів (яйцеклітин), бластоцистів та ембріонів на стадії розподілу. Застосовується в наукових біологічних лабораторіях, в клініках з лікування безпліддя.

#### Складається з:

- Розчину для відтавання (TS): 5 пробірок x 1.8 мл;
- Розчину для розведення (DS): 1 пробірка x 1,8 мл;
- Розчину для промивання (WS): 2 пробірки x 1,8 мл.

Всі розчини призначені для одноразового використання. Пробірки слід зберігати при температурі 2-8 ° C не довше дати зазначеної на етикетці. Термін зберігання - 12 місяців від дати виробництва.



### Чашки для разморозки WP



### 3. Основні можливості

#### [Збільшення мікроскопа]

Мікроскоп, що використовується в методі Cryotec, має лише два рівні збільшення для простоти використання.

**Мале збільшення:** Для маніпулювання ооцитом/ембріоном (x12-15).

- Це збільшення дозволяє легко переглядати весь ооцит/ембріон відразу.

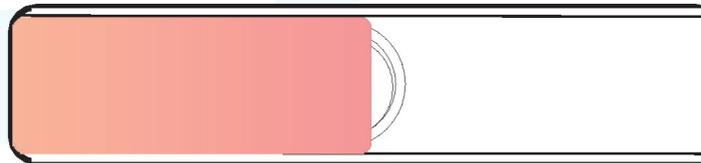
**Велике збільшення:** Для спостереження за ооцитом/ембріоном (x45-55).

- Це максимальне збільшення дозволяє детально перевірити ділянки.

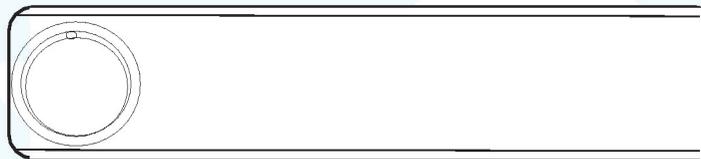
#### [Положення ооцита/ембріона під час аспірації]

Використовуючи протоколи методу Cryotec, існує тільки три позиції ооцита/ембріона, з якими ви повинні бути знайомі.

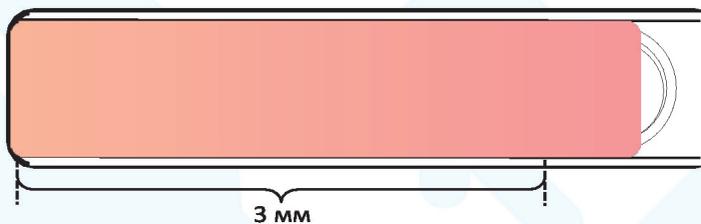
- ① Аспірація невеликої кількості розчину (приблизно вдвічі більше діаметра ооцита) після ооцита/ембріона (стандартна процедура).



- ② Розміщення самого ооцита/ембріона на кінчику піпетки (рівновага через вітрифікацію).

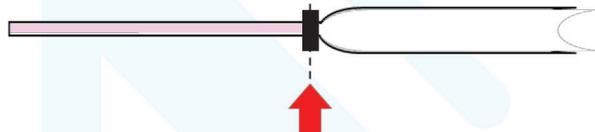


- ③ Аспірація 3мм розчину після ооцита/ембріона (розведення через TS і DS).



#### **Порада!**

Всі дії, пов'язані з піпеткою і ооцитом/ембріоном, можуть бути значно полегшені за допомогою капілярної дії (природного явища) для всмоктування 1 мм розчину в піпетку попередньо. Для того, щоб спростити процедуру, ви можете зробити позначку на піпетці, щоб вказати поріг, на якому закінчується капілярна дія.



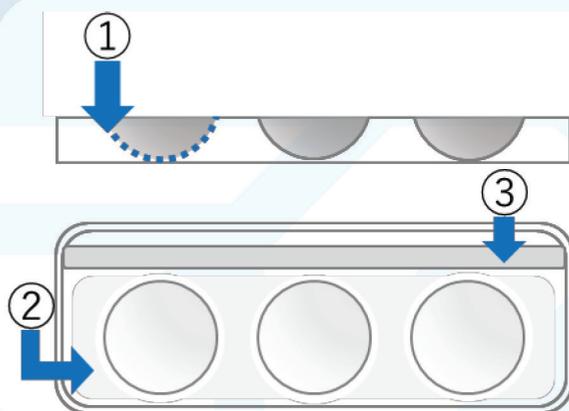
## 4. Протокол вітрифікації

### Призначення криоконсервації за допомогою вітрифікації

Використання криоконсервації за допомогою вітрифікації запобігає будь-якій зміні або погіршенню якості ооцита/ембріона, гарантуючи, що він зберігає той самий стан, в якому він перебував до заморожування.

### 【Матеріали】

- **Комплект для вітрифікації Cryotech® 101**
  - Розчин для рівноваги (ES): 1,0 мл/флакон×1
  - Розчин для вітрифікації (VS): 1,0 мл/флакон×2
  - 4 кріотеки
  - 3 пластини для вітрифікації з 3 лунками кожна (і кришкою)
- Мікроскоп (вимкнення після виключення стадії нагрівання)
- Таймер (з функцією відліку)
- Пінцет
- Ножиці
- Мікропіпетка (-300 мкл)
- Піпетка Пастера (з отвором)
- Охолоджуючий апарат



### Характеристика пластин для вітрифікації

Пластина для вітрифікації, спеціально розроблена для використання з методом Cryotec, має 1) округлені лунки, 2) простір для внесення розчину, і 3) паз для надійного зберігання Cryotec (переносного пристрою).

Оскільки кожна лунка є напівсферичною, вони створюють менші «сліпі плями» через тіні в мікроскопі. Це значно ускладнює втрату ооциту/ембріона.

### 【Підготовка вітрифікації】

1. Підтримуйте кімнатну температуру між 25 °C і 27 °C.
2. Зберігайте флакони ES та VS при кімнатній температурі ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ : 25-27°C) протягом принаймні 1 години безпосередньо перед проведенням цього протоколу.
 

**(ПЕРЕВІРТЕ: перевірте флакони, оглядаючи візуально та дотиком пальцями, перш ніж використовувати їх, щоб підтвердити наявність будь-яких відхилень, таких як незвичайні забарвлення або вищі/нижчі температури)**
3. Підготуйте піпетку Пастера з внутрішнім діаметром, який відповідає діаметру ооцита/ембріона, що підлягає вітрифікації:
  - Для ооцитів/ембріонів, 140-150 мкм.
  - Для бластоцист, 160-220 мкм.
4. У випадку, якщо діаметр бластоцист, що підлягають вітрифікації, перевищує 220 мкм, виконайте наступний процес попередньої усадки:
  - Опустіть бластоцист в гіпертонічний розчин (DS:WS = 2:3), поки він не досягне потрібного розміру. Це найбільш ефективний і неінвазивний метод скорочення.

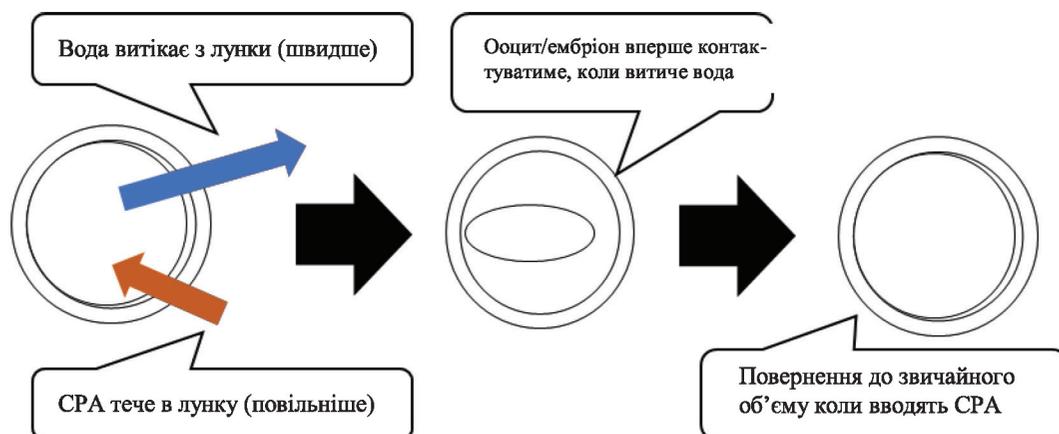
## [КРОК 1]

### Вирівнювання через ES (8-15 хвилин: При кімнатній температурі)

Метою цього кроку є введення криозахисної речовини (CPA) у внутрішню клітину, успішне завершення якого свідчить про повне відновлення обсягу клітини.

#### Механізм усадки і відновлення клітин

Оскільки внутрішня частина клітини є культуральним середовищем (з осмотичним тиском приблизно 300), а позаклітинне простір заповнюється ES (з осмотичним тиском приблизно 2400), вода в клітині витікає з неї за рахунок цього розриву між внутрішньо- і позаклітинним осмотичним тиском. У той же час, оскільки CPA можуть проникати в клітинну мембрану, вони надходять у клітину. Оскільки внутрішньо- та позаклітинний осмотичний тиск природно намагаються вирівняти, ці реакції відбуваються одночасно. Однак швидкість, з якою вода витікає з клітини, трохи більша, ніж швидкість протікання CPA в клітину. Це означає, що ооцит/ембріон спочатку контрагуватиме, коли вода витече, а потім повернеться до початкового об'єму, коли введуть CPA.



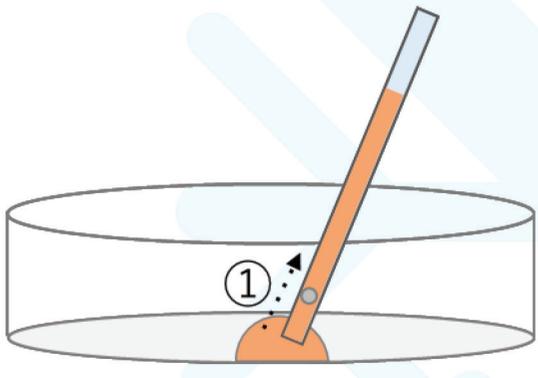
	Малюнок	Процедура
1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Заповніть лунку пластини для вітрифікації з 300-мкл ES при кімнатній температурі (①).</li> <li>2. Заповніть кожну іншу лунку з 300 мкл VS при кімнатній температурі (② і ③).</li> </ol>

#### **ПЕРЕВІРТЕ: Уникайте утворення бульбашок під час дозування.**

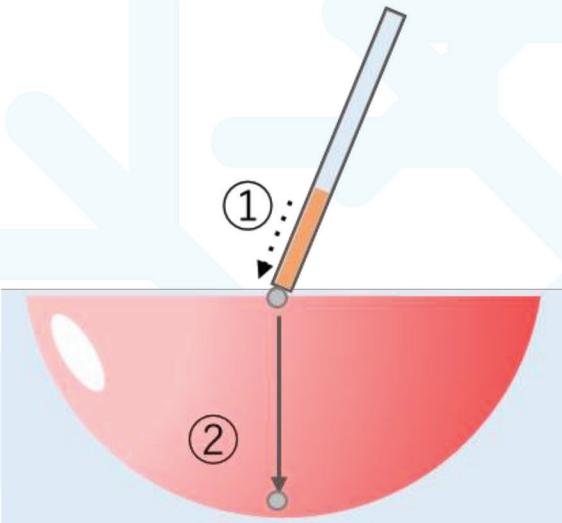
Прикріпіть мікросхему до мікропіпетки 300 мкл. Аспіруйте 300 мкл розчину в піпетку і введіть його повністю. Потім всмоктуйте розчин у піпетку і повільно виділяйте його. Це дозволить уникнути непотрібного утворення бульбашок.

#### **ПЕРЕВІРТЕ: Якщо утворюються бульбашки, залишіть розчин на певний час.**

Якщо в розчині утворюються бульбашки, вони зникнуть, якщо ви просто залишите його нерухомим на певний час. Не намагайтеся забрати бульбашки мікропіпеткою, оскільки це змінить кількість розчину в лунці.

2	 <p style="text-align: center;">Чашка для культивування</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Перевірте і позначте деталі ооцита/ембріона з великим збільшенням, приділяючи особливу увагу розміру вітеллінового шару щодо перивітеллінового простору (ооциту) або порожнини бластоцисти (бластоцисти), щоб підтвердити, що ооцит/ембріон повністю відновив свій початковий об'єм при вирівнюванні.</li> <li>2. Аспіруйте ооцит/ембріон у кінчик піпетки Пастера разом з невеликою кількістю культурального середовища (приблизно розміром 2 ооцит). (1).</li> </ol>
---	--	--

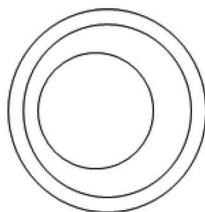
**ПЕРЕВІРТЕ:** Зауважимо, що як тільки ооцит/ембріон поміщений в ES, його об'єм почне негайно скорочуватися.

3	 <p style="text-align: center;">ES</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Покладіть ооцит/ембріон і культуральне середовище, яке ви аспірували в крок 1-2-2 на поверхню ES, безпосередньо в центрі (1).</li> <li>2. Використовуйте таймер, щоб почати відлік.</li> <li>3. Ооцит/ембріон почне стискатися і опускатися на дно лунки (це має відбуватися протягом 30 секунд) (2). Протягом 90 секунд ооцит/ембріон повинен досягти найменшого розміру.</li> <li>4. Продовжуйте чекати і спостерігайте, як ооцит/ембріон повністю відновлює свій початковий об'єм.</li> </ol>
---	--	--

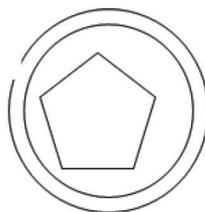
### Оцінка якості ооцитів/ембріонів на основі форми при усадці

Ви можете оцінити якість ооцита/ембріона за допомогою проникності мембрани клітини. Високоякісний ооцит/ембріон зберігатиме свою сферичну форму при усадці (позиція А). Якщо має місце зміна проникності мембрани, формуються нерівномірні кінці (позиція В), а при зменшенні якості відображається надзвичайно нерівномірні кінці (позиція С). Зверніть увагу, що ці оцінки не впливають на виживаність; однак, оскільки це являє собою якість самого ооцита/ембріона, це може вказувати на різницю у фертильності, на розвиток плода або на вагітність на більш пізній стадії.

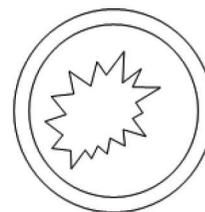
Позиція А



Позиція В



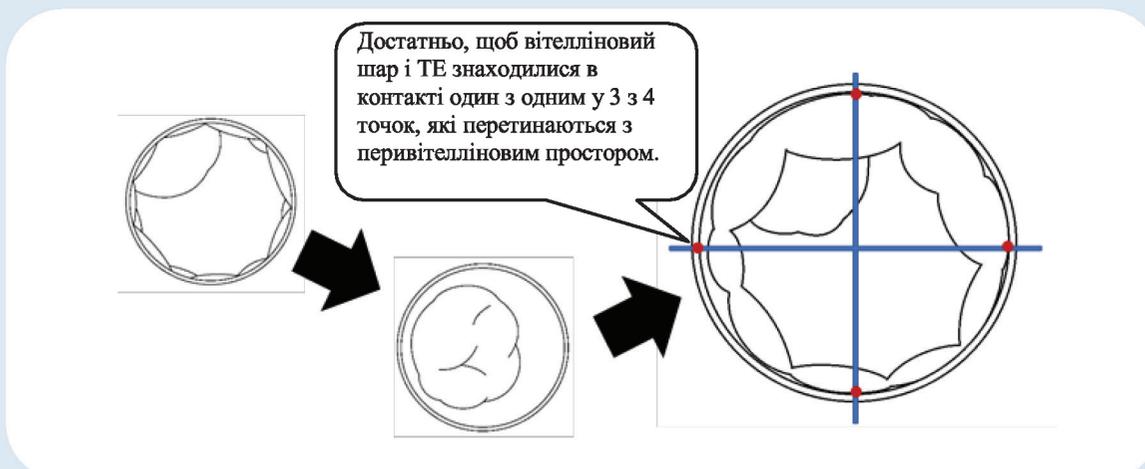
Позиція С



4		<ol style="list-style-type: none"> <li>Очікуючи, щоб ооцит/ембріон відновили свій об'єм, вийміть соломинку з Cryotec з упаковки і приготуйте Cryotec. Заповніть інформацію ооцита/ембріону на зворотному боці (навпроти логотипу) і помістіть Cryotec у паз на пластині для вітрифікації, переконавшись, що логотип повернуто вгору (①).</li> <li>Підготуйте свіжий рідкий азот у холодильнику.</li> <li>Після того, як ооцит/ембріон повністю повернувся до початкового розміру, урівноваження ES завершено.</li> </ol>
---	--	--

### Визначення завершення вирівнювання

Якщо відновлення об'єму не може бути підтверджено, або якщо ви не впевнені у своєму висновку про повне відновлення, максимальний час завершення вирівнювання ES є наступним: Ооцити і бластоцисти (160 мкм - 220 мкм у діаметрі) – 15 хвилин; 4-8 ембріонів клітинної стадії – 12 хвилин. Було остаточно визначено, що достатня рівновага відбувається через 15 або 12 хвилин відповідно.

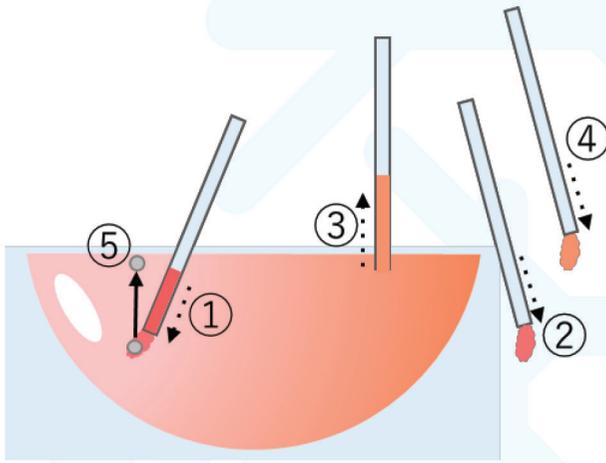


Іноді може бути важко визначити, чи був об'єм бластоцист повністю відновлений через порожнину бластоцист. Тому, у разі бластоцист, перевірте контакт між вітелліновим шаром і ТЕ, як показано на малюнку вище, і визначте відновлення відповідно. Розглядаючи бластоцисту зверху, уявіть собі хрест, накладений по всій клітині; якщо вітелліновий шар і ТЕ контактують один з одним у 3 з 4 точок, які перетинаються з перивітелліновим простором, бластоцист достатньо відновлений.

5		<ol style="list-style-type: none"> <li>Аспіруйте ооцит/ембріон з невеликою кількістю ES (розмір 2 ооцитів) (①).</li> </ol>
---	--	--

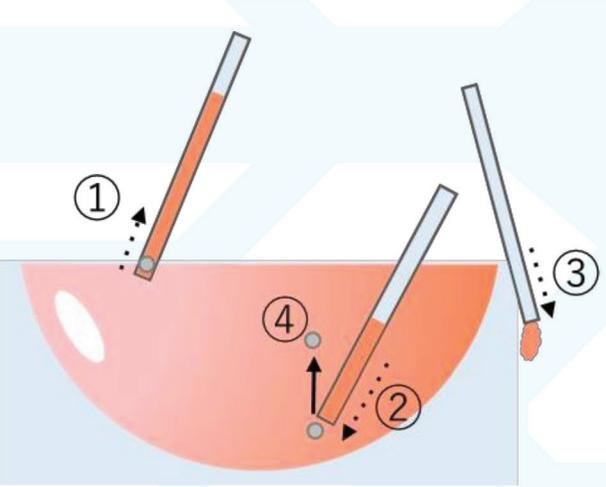
**[КРОК 2]****Вирівнювання через VS1 (30-60 секунд)**

Метою VS1 є замінити всі позаклітинні ES на VS. Цей крок завершується, коли щільності клітини і VS1 рівні.

	Малюнок	Процедура
1	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Покладіть ооцит/ембріон в середину VS1 (①).</li> <li>2. Виведіть всю залишкову ES всередині піпетки в паз лунки (②).</li> <li>3. Аспіруйте свіжий VS1 з краю лунки (③) і швидко виведіть його (④).</li> <li>4. Ооцит/ембріон швидко спливає на поверхню VS1 (⑤). (Не забудьте негайно зосередитися на поверхні VS1, як тільки ви помістите ооцит/ембріон.)</li> </ol>

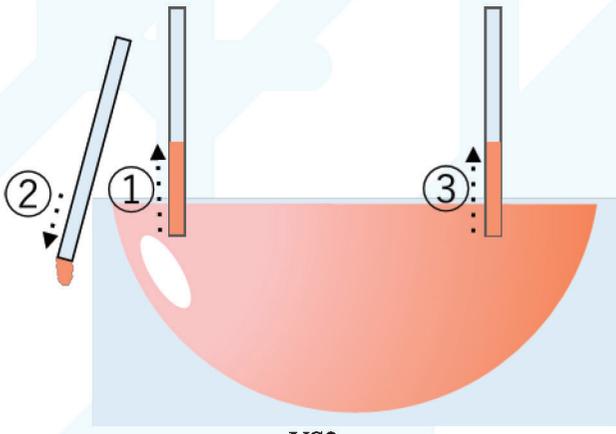
**ПЕРЕВІРТЕ:**

Оскільки вивільнений ооцит/ембріон швидко спливає на поверхню, фокус вашого мікроскопа повинен бути встановлений на поверхню рідини, що дозволяє підтвердити присутність ооцита/ембріона.

2	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Аспіруйте свіжий VS1 з краю лунки, потім аспіруйте ооцит/ембріон у кінчик піпетки (①).</li> <li>2. Покладіть ооцит/ембріон на дно лунки VS1 (②). (Обов'язково внесіть ТІЛЬКИ ооцит/ембріон.)</li> <li>3. Виведіть весь залишок VS1 всередині піпетки в паз лунки (③).</li> <li>4. Ооцит/ембріон повинен повільно плавати до середньої ділянки і повністю зупинитися. Це підтверджує завершення вирівнювання VS1 (④).</li> </ol>
---	--	---

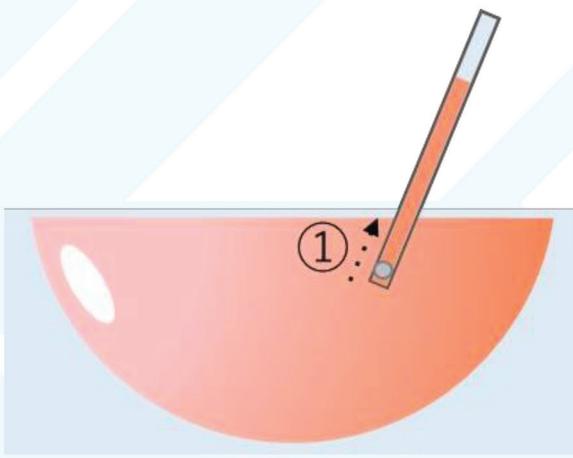
**ПЕРЕВІРТЕ:**

Використовуйте велике збільшення на мікроскопі, щоб підтвердити, що ооцит/ембріон повністю зупинився в середині розчину. Переконайтеся, що ооцит/ембріон залишається у полі зору протягом тривалого часу, підтверджуючи, що він зупинився.

<p>3</p>	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Аспіруйте і заберіть свіжий VS2 з краю лунки VS2 (① і ②).</li> <li>2. Аспіруйте свіжий VS2 ще раз з краю лунки VS2 (③)</li> </ol>
----------	--	---

**ПЕРЕВІРТЕ:**

Метою аспірації свіжого VS2 перед аспірацією ооцита/ембріона з VS1 є запобігання приведення VS1 у VS2.

<p>4</p>	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Аспіруйте ооцит/ембріон у VS1 у кінчик піпетки (①).</li> </ol>
----------	---	--

## [КРОК 3]

### Усадка через VS2 (10-20 секунд)

Метою VS2 є підтвердження того, що ES було повністю замінено на VS. Це підтверджується двома способами:

- 1) Ооцит/ембріон повністю зменшується, і 2) навколо ооцита/ембріона немає помутніння. (Це означає, що ES не залишається там.)

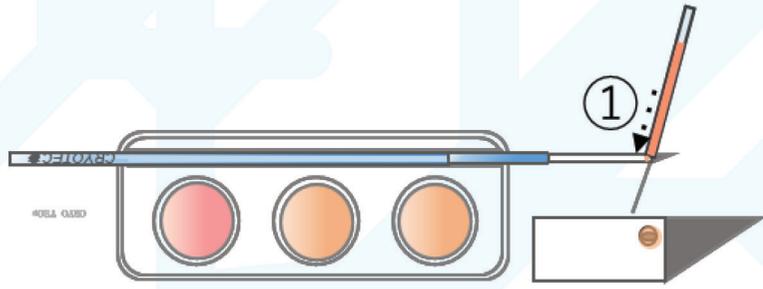
	Малюнок	Процедура
1	<p>VS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Помістіть ооцит/ембріон у середній відділ VS2 (①).</li> </ol>
2	<p>VS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Виведіть весь залишився VS1 всередині піпетки в паз лунки (①), і аспіруйте/виведіть свіжий VS2 з краю лунки (② і ③).</li> <li>2. Знову аспіруйте свіжий VS2 (④).</li> <li>3. Перемішуйте розчин навколо ооцита/ембріона, щоб спостерігати його з різних кутів, щоб підтвердити повну усадку (⑤).</li> </ol>

#### ПЕРЕВІРТЕ:

Якщо ви можете спостерігати, як ооцит/ембріон рухається природним шляхом, то немає необхідності його перемішувати.

3	<p>VS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Аспіруйте ооцит/ембріон у кінчик піпетки (①).</li> </ol>
---	------------	--

## Розміщення ооцита/ембріона

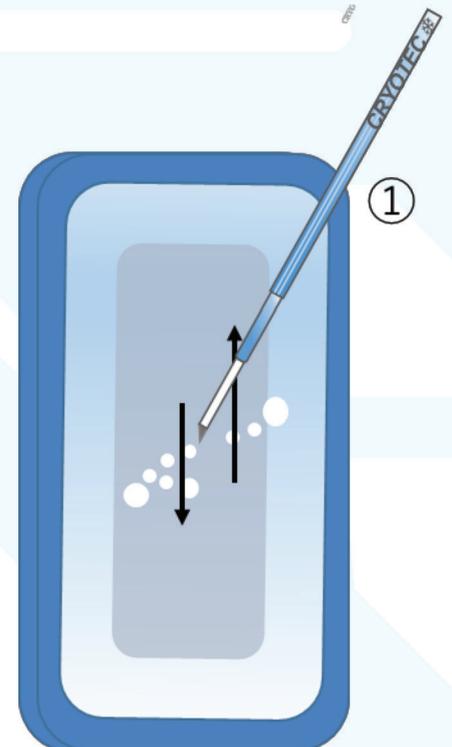
4		<p>1. Поставте ооцит/ембріон разом з невеликою кількістю VS2 біля маркера (чорний трикутник) на листку Cryotec (①).</p>
---	--	---

**ПЕРЕВІРТЕ: 1 ооцит = 1 крапля. НЕ ЗМЕНШУЙТЕ розмір краплі.**

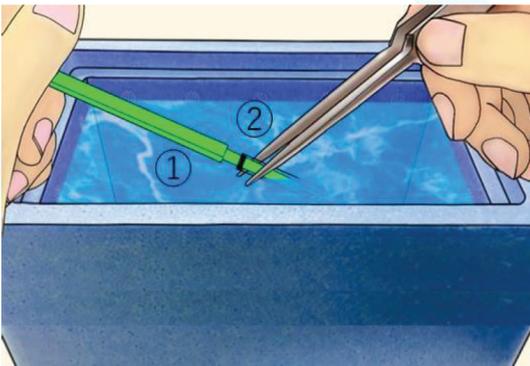
### Не намагайтеся зменшити розмір краплі

Традиційні методи намагаються звести до мінімуму розмір краплі для збільшення швидкості охолодження. Однак, оскільки заморожувальний реагент, який використовується в методі Cryotech, має більш високу вітрифікаційну здатність, ніж ці традиційні методи, немає необхідності робити це. При спробі зменшити краплю можна застосувати тиск на ооцит/ембріон через поверхневий натяг. Це може пошкодити ооцит/ембріон або викликати його прилипання до листка, що ускладнює виведення під час розморожування. Це також може збільшити час, необхідний для TS, що може пошкодити ооцит/ембріон. Наш метод НЕ вимагає зменшувати краплі для повторення. Якщо крапля дуже велика, або якщо дві або більше ооцитів/ембріонів поміщені в одну краплю, просто повторно аспіруйте її назад у піпетку і зробіть нову краплю в іншому місці на листку.

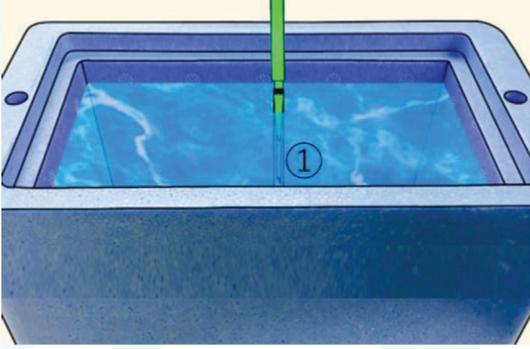
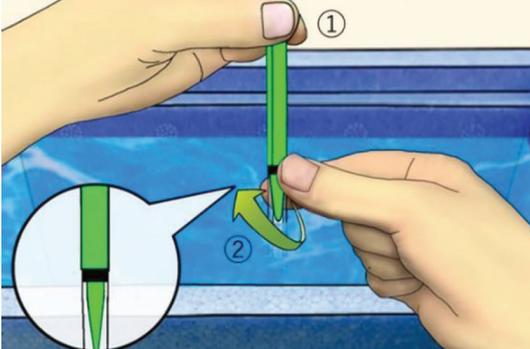
## Надшвидке заморожування

5	 <p>Рідкий азот (LN<sub>2</sub>)</p>	<p>1. Після підтвердження присутності ооцита/ембріона в краплі на листку, негайно помістіть Cryotec в рідкий азот і обережно струсіть його, поки не з'являться бульбашки. Це підвищить швидкість охолодження (надшвидке охолодження) (①).</p>
---	---	---

## Прикріплення ковпачка

	Малюнок	Процедура
1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>Тримайте листок у рідкому азоті (①).</u></li> </ol>
2		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Помістіть ковпачок в рідкий азот. Переконавшись, що в ковпачку не залишилося жодних бульбашок, обережно покладіть ковпачок у Cryotec (переконайтеся, що він знаходиться під поверхнею рідкого азоту).</li> <li>2. <u>Тримайте кінчик листка в рідкому азоті (①) і використовуйте пінцет, щоб він був ближче до верхньої частини (чорна позначка) ковпачка (②).</u></li> </ol>

**ПЕРЕВІРТЕ: НЕ ПІДНІМАЙТЕ** середню частину кришки за допомогою пінцета.

3		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Після використання пінцета для встановлення ковпачка, поставте Cryotec вертикально (①).</li> </ol>
4		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Продовжуючи тримати кінчик листка в рідкому азоті (①), підніміть Cryotec частково в повітря, потім міцно підніміть і затягніть ковпачок пальцями (②).</li> </ol>

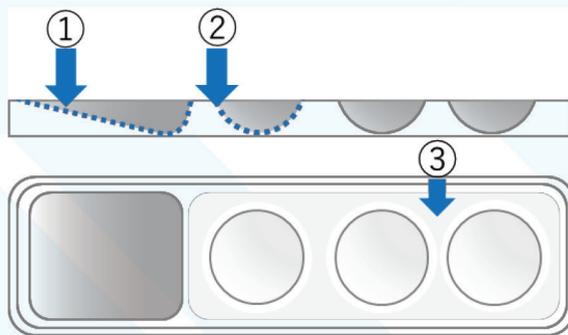
## 5. Протокол нагрівання

### Температури при ризику формування кристалів льоду

Процес розморожування є найбільш імовірною стадією, на якій можуть утворюватися кристали льоду. Навіть при збільшенні швидкості охолодження під час вітрифікації, кристали льоду можуть все ще формуватися, якщо швидкість нагрівання занадто низька. Надзвичайно важливо швидко рухатися від  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$ , що є діапазоном, в якому, швидше за все, утворюються кристали льоду.

### [Матеріали]

- **Комплект для нагрівання Cryotech® 102**
  - Розморожуючий розчин (TS) 1,8 мл/флакон×1
  - Розчинний розчин (DS) 0,5 мл/флакон×1
  - Розчин для промивання (WS) 1,0 мл/флакон×1
  - 1 пластина для нагрівання з 4 лунками
- **Мікроскоп (вимкнення після виключення стадії нагрівання)**
- **Таймер (з функцією відліку)**
- **Пінцет**
- **Ножиці**
- **Мікропіпетка (300 мкл)**
- **Піпетка Пастера (з отвором)**
- **Охолоджуючий апарат**



### Характеристики спеціальної розморожувальної пластини

Наша пластина для нагрівання, призначена виключно для використання з методом Cryotec, має ① прямокутні лунки, нахилені для використання TS. Вона також включає ② напівсферичні лунки та ③ простір для витіснення розчину, подібний до нашої пластини для вітрифікації. Нахил лунки TS призначений для забезпечення стабільного розміщення листка Cryotec. Напівсферичні лунки спрощують виготовлення рідкого шару розчину при розрідженні і дають можливість замінити слабкий осмотичний тиск.

### [Підготовка до нагрівання]

1. Використовуйте інкубатор для нагрівання пластин і флаконів TS (з закритими кришками) до  $37^{\circ}\text{C}$  принаймні за 2 години до початку процесу розморожування (прийнятне нагрівання протягом ночі). Під час використання інкубатора  $\text{CO}_2$  переконайтеся, що кришки флакона TS повністю закріплені перед нагріванням (як зазначено вище, прийнятне нагрівання протягом ночі).
2. Зберігайте DS і WS при кімнатній температурі ( $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ :  $25-27^{\circ}\text{C}$ ) протягом принаймні 2 годин до розмороження.
3. Підготуйте рідкий азот у охолоджуючому апараті. Вийміть Cryotec з резервуара з рідким азотом і помістіть його в охолоджуючий апарат. Зніміть кришку і помістіть Cryotec в рідкий азот, навпроти внутрішньої стінки охолоджуючого апарату.

## [КРОК 4]

### Нагрівання через TS (1 хвилина)

	Малюнок	Процедура
1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Перевірте, що пластина для нагрівання досягла 37°C, витягніть її з інкубатора і помістіть 300 мкл кімнатної температури DS у другу лунку (першу круглу лунку) (1).</li> </ol>

#### ПЕРЕВІРТЕ:

Щоб забезпечити максимальну температуру 37°C, найкраще було б, щоб усі розчини кімнатної температури були розміщені безпосередньо перед тим, як вони будуть потрібні (оскільки вони знижували б загальну температуру пластини для нагрівання). Однак, оскільки цей крок займає всього 1 хвилину, для цього не вистачає часу, тому DS розраховується заздалегідь.

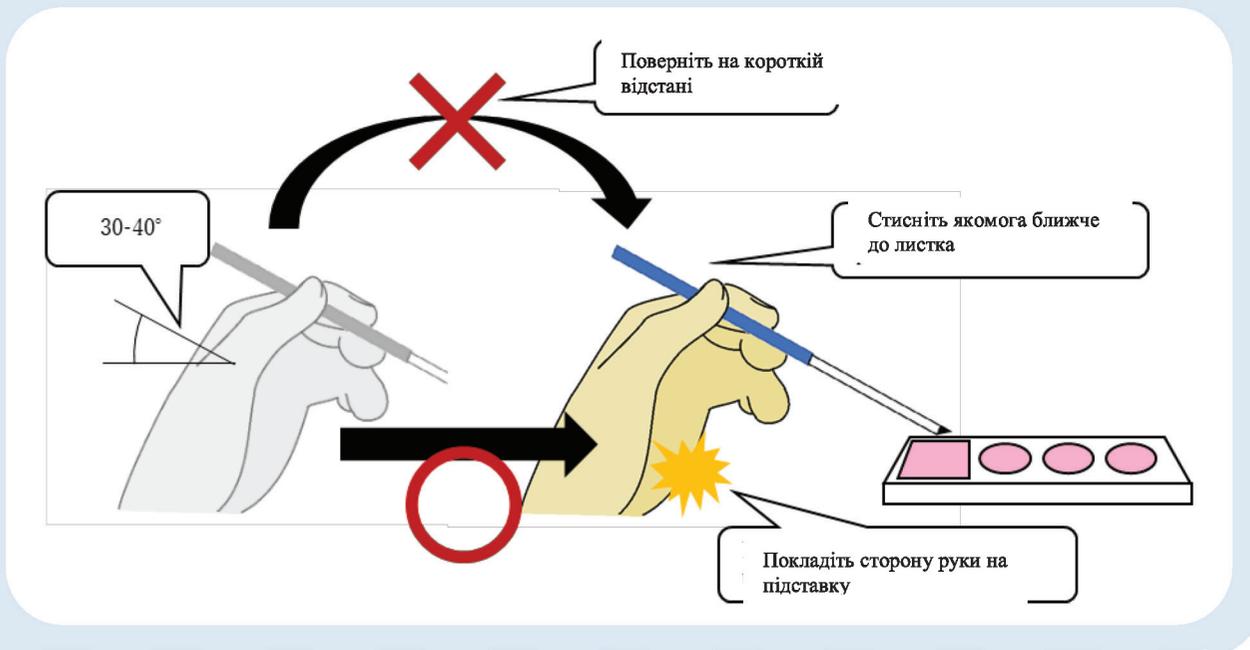
2		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Вийміть з інкубатора флакон TS (1,8 мл), попередньо нагрітий до 37 °C, і вилийте всю суміш у лунку TS (прямокутна лунка) (2).</li> <li>2. Встановіть фокус мікроскопа на дно лунки TS (зокрема, положення, де листок Cryotec залишатиметься при вставленні; пунктирна лінія зліва) (3).</li> </ol>
3		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Негайно вставте Cryotec з рідкого азоту в TS (протягом 1 секунди) (1).</li> <li>2. Запустіть таймер і зупиніться на <b>1 хвилину</b> без переміщення Cryotec.</li> <li>3. Ооцит / ембріон починає плавати природньо віддалено від листка Cryotec під час нагрівання (2).</li> </ol>

#### ПЕРЕВІРТЕ: Будьте впевнені, щоб він був нерухомий повну хвилину!

Опустіть Cryotec в TS і залиште нерухомим протягом повної хвилини. Якщо перемістити його, то це може порушити температурний баланс усього розчину через надзвичайно низьку температуру Cryotec. Крім того, якщо ооцит/ембріон відчепився від листка, будь-яке переміщення може витіснити його і випустити з уваги. Якщо ви не можете бачити ооцит/ембріон на листку Cryotec, будьте терплячі і не намагайтеся перемістити листок.

### Поради щодо вставки Cryotec у лунку TS

Підготуйте піпетку за допомогою правої руки і тримайте Cryotec у лівій руці, будучи максимально наближені до листка. негайно вставте його під кутом від 30 до 40°, використовуючи криву лунки TS, щоб провести вас. Це може призвести до несвідомого руху руки, тому важливо докласти зусиль, щоб перемістити руку в коротку, пряму лінію. Ви також можете покласти сторону руки на підставку, яка буде тримати її у стабільному положенні, коли ви вставите Cryotec. Переконайтеся, що ви швидко переставите руку з рідкого азоту на підставку мікроскопа, а потім обережно вставте листок Cryotec у лунку TS. Пересуньте якомога швидше між рідким азотом і TS, використовуючи криву TS, щоб уникнути утворення будь-яких бульбашок на листку. Якщо утворюються бульбашки на листку, це може ускладнити пошук ооцита/ембріона, або ооцит/ембріон може прилипнути до бульбашки і рухатися всередині розчину. Будь ласка, будьте обережні.



## [КРОК 5]

### Розчинення через DS (3 хвилини)

	Малюнок	Процедура
1		<ol style="list-style-type: none"> <li>Залиште Cryotec нерухомим протягом 1 повної хвилини, потім повільно витягніть його з TS (①).</li> <li>Аспіруйте ооцит/ембріон у TS, потім повільно аспіруйте 3мм TS у піпетку протягом 3 секунд (②).</li> </ol>

#### ПЕРЕВІРТЕ:

Якщо ооцит/ембріон все ще не відділився від листка після повної хвилини, помістіть піпетку Пастера під нього і застосуйте легкий тиск, щоб відділити його. Будьте впевнені, що не вступаєте в прямий контакт з ооцитом/ембріоном.

#### ПЕРЕВІРТЕ: Якщо ооцит/ембріон зникає

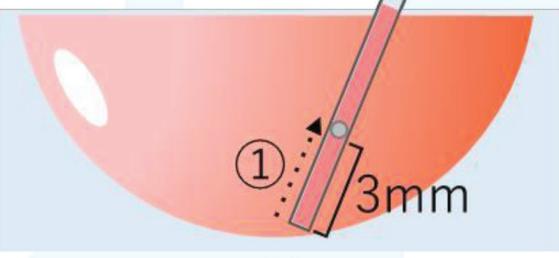
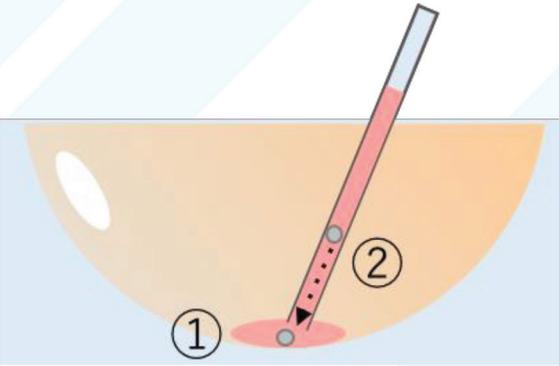
Якщо ви успішно помістили ооцит/ембріон на листок Cryotec під час процесу вітрифікації, ооцит/ембріон знаходиться в TS лунці. Наш розчин TS має мінімальну токсичність, тому у вас буде час терпляче шукати ооцит/ембріон.

#### ПЕРЕВІРТЕ:

Ви можете виміряти 3 мм за допомогою індикатора на кришці пластини для нагрівання..

2		<ol style="list-style-type: none"> <li>Вставте кінчик піпетки в центр дна лунки DS і повільно витягніть TS протягом 3 секунд, щоб сформувати шар TS на дні (①).</li> <li>Обережно помістіть ооцит/ембріон на дно шару TS (②).</li> <li>Після запуску таймера вимкніть світло мікроскопа і залиште його протягом 3 хвилин.</li> </ol>
3		<ol style="list-style-type: none"> <li>Чекаючи ті 3</li> <li>3.</li> <li>4. хвилини, помістіть 300 мкл WS в лунки WS1 і WS2 (① і ②).</li> </ol>

## Розчинення через WS (5 хвилин)

	Малюнок	Процедура
1	 <p style="text-align: center;">DS</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Аспіруйте ооцит/ембріон в DS, потім повільно аспіруйте 3 мм DS в піпетку протягом 3 секунд (①).</li> </ol>
2	 <p style="text-align: center;">WS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Вставте кінчик піпетки в нижній центр лунки WS1 і повільно витягніть DS протягом 3 секунд, щоб утворити шар DS на дні (①).</li> <li>2. Обережно помістіть ооцит/ембріон на дно шару DS (②).</li> <li>3. Після запуску таймера, використовуйте велике збільшення, щоб ретельно оглянути та запам'ятати детальну форму ооцита/ембріона. Вимкніть світло мікроскопа і залиште протягом 5 хвилин.</li> <li>4. Через 5 хвилин порівняйте поточну форму ооцита/ембріона з попередньою формою, яку ви запам'ятали. Якщо ви можете підтвердити, що об'єм ооцита/ембріона повністю відновився або близький до нього, це вказує на те, що він ще живий.</li> </ol>

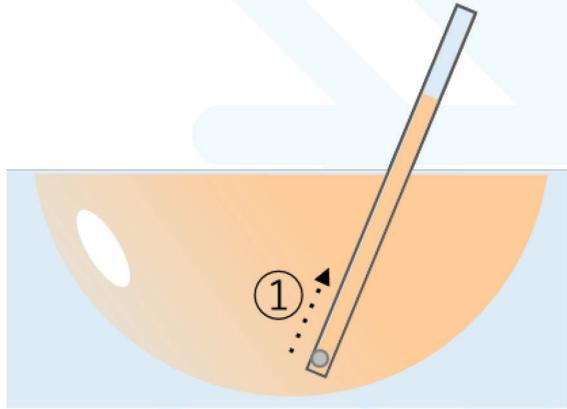
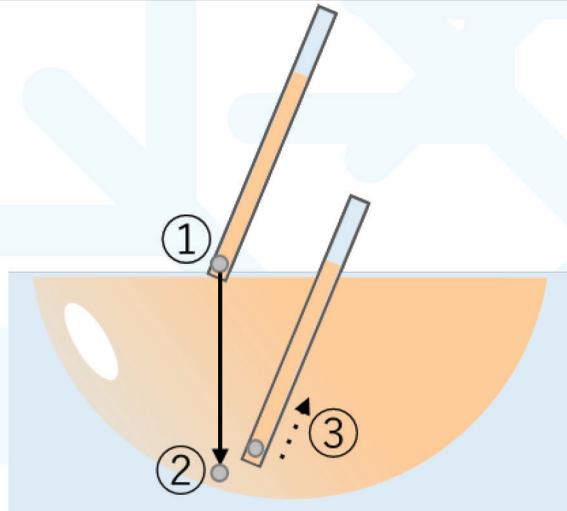
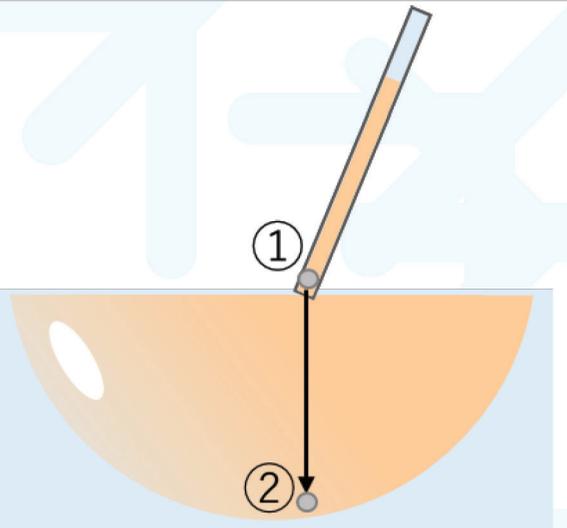
**ПЕРЕВІРТЕ:**

Під час цього кроку важливо підтвердити, чи було пошкоджено ооцит/ембріон під час процесу вітрифікації/розмороження. Ооцит/ембріон, який вижив, проходить нормальну мембранну реакцію і подальше відновлення об'єму.

Реакція на цій стадії обумовлена конденсацією: ооцит/ембріон стає ізотонічним, оскільки потрапляє в WS (300) з DS (900). Іншими словами, в той час як об'єм повністю інтактного ооцита/ембріона повністю відновиться, ооциту/ембріону нижчої якості потрібно більше часу для цього. У випадку мертвого або пошкодженого ооцита/ембріона звичайна мембранна реакція взагалі не відбудеться. Таким чином, ви не побачите ніяких змін у об'ємі. У разі бластоцисти, як тільки порожнина бластоцисти починає формуватися/відкриватися, або порожнина бластоцисти повністю реформована, можна вважати, що вона вижила. Загалом, було показано, що ембріони людини, ймовірно, стануть дітьми, якщо виживатиме більше 30% бластомерів:

- Для 2-клітинної стадії зародка, 1 бластомер
- Для 4-клітинної стадії ембріона, 2 бластомери
- Для 8-клітинної стадії ембріона, 3 бластомери

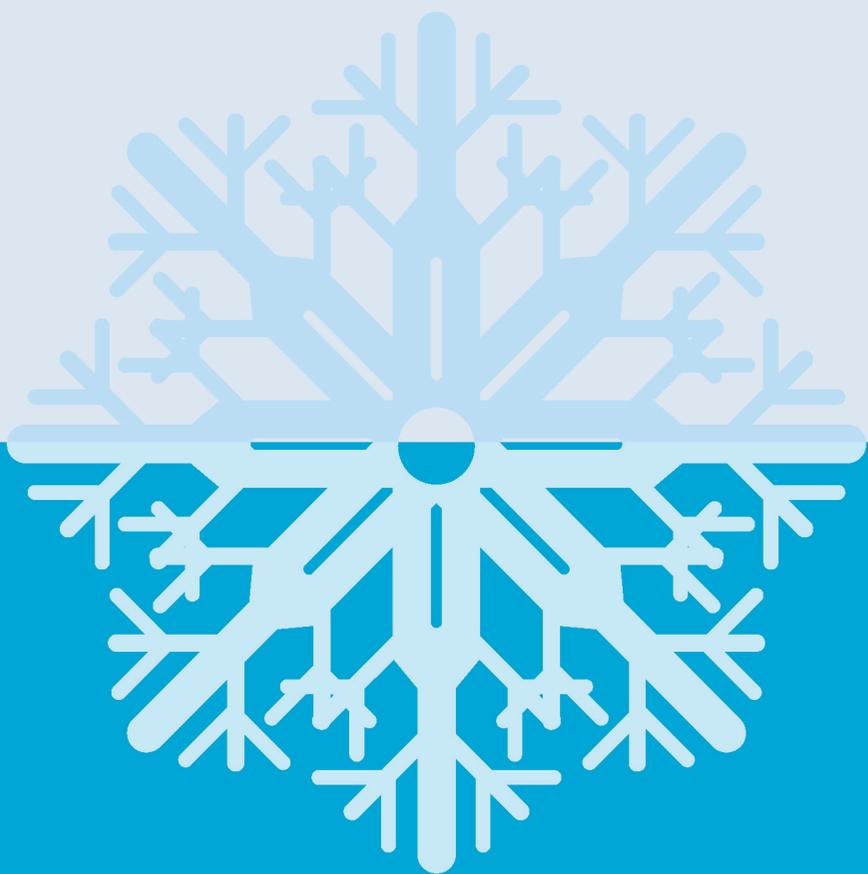
## Промивання через WS2 (1 хвилина)

	Малюнок	Процедура
1	 <p style="text-align: center;">WS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Аспіруйте невелику кількість WS1 і ооцит/ембріон у піпетку (①).</li> </ol>
2	 <p style="text-align: center;">WS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Помістіть ооцит/ембріон на ліву бічну поверхню лунки WS2 (①).</li> <li>2. Ооцит/ембріон повільно опускається до дна лунки (②).</li> <li>3. Після того, як ооцит/ембріон досягає дна лунки, аспіруйте невелику кількість WS2 і ооцит/ембріон у піпетку (③).</li> </ol>
3	 <p style="text-align: center;">WS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Помістіть ооцит/ембріон на праву бічну поверхню лунки WS2 (①).</li> <li>2. Ооцит/ембріон повільно знову опуститься на дно лунки (②).</li> <li>3. Після того, як ооцит/ембріон досягає дна лунки, крок промивання завершиться.</li> <li>4. Перенесіть ооцит/ембріон у культуральну посудину для виконання культивування до трансплантації ICSI або ембріонів.</li> </ol>

### **ПЕРЕВІРТЕ:**

Рекомендується культивувати ооцит протягом 2 годин для ICSI та бластоцисту протягом принаймні 1 години до перенесення ембріонів.





**"ArtMedical LLC"**  
Mob.: (096) 933 03 33  
[artmedical.ivf@gmail.com](mailto:artmedical.ivf@gmail.com)  
[www.artmedical.com.ua](http://www.artmedical.com.ua)