

# VitriFreeze ES™

# VitriThaw ES™

Наборы универсальных сред для витрификации и оттаивания эмбрионов человека на стадиях зиготы, дробления, бластоцисты



Стерилизовано с помощью стерилизующей фильтрации.

Документ №: FP09 I46 02 R01 D.7

Обновление: 04.03.2019 г.

---

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

VitriFreeze ES™ и VitriThaw ES™ (VitriFreeze/Thaw ES™) представляют собой наборы готовых к использованию сред для витрификации и оттаивания эмбрионов человека. Набор сред и протокол для витрификации на ранней стадии (Early stage) предназначен для использования с эмбрионами человека на стадиях от 2PN до бластоцист.

*Только для профессионального использования.*

---

## ВВЕДЕНИЕ

Витрификация – это процедура криоконсервации, при которой жидкий раствор переходит в аморфное твердое состояние без образования кристаллической структуры (Rall and Fahy 1985). Эта методика может быть более благоприятной, чем медленное охлаждение (Stehlik 2005).

Сверхбыстрая витрификация зигот и эмбрионов с использованием «открытых» систем, таких как «Hemi-Straw» и «VitriPlug», допускающих прямой контакт с жидким азотом, обеспечила большое количество рождений здоровых детей (Vanderzwalmen, 2003).

В соответствии с Европейским законодательством в области требований к безопасности медицинских устройств для криоконсервации человеческих клеток, были разработаны герметично закрытые (асептические) контейнеры, которые позволяют избежать прямого контакта эмбриона с жидким азотом при замораживании и длительном хранении. С этой целью были разработаны системы HSV (High Security Vitrification kit, Cryo Bio System) и VitriSafe Plug (MTG) (Vanderzwalmen, 2009). Оба носителя состоят из внутренней соломинки с желобком, в котором размещают небольшой объем криопротекторной среды с одним или двумя эмбрионами. Далее внутренняя соломинка помещается во внешнюю, защитную соломинку, которая запечатывается до погружения в жидкий азот.

Тем не менее, из-за термоизоляции скорость охлаждения в таких системах снижена по сравнению с «открытыми» системами хранения. В связи с этим требуется, чтобы большее количество криопротектора проникло в клетки для гарантированного сохранения внутриклеточного состояния.

Набор сред VitriFreeze ES™ разработан таким образом, чтобы достаточное количество криопротектора могло проникать в эмбрион на разных стадиях его развития. Во время оттаивания набор сред VitriThaw ES™ обеспечивает постепенное удаление криопротекторов.

---

## СОСТАВ

VitriFreeze/Thaw ES™ представляют собой основанные на ДМСО/этиленгликоле витрификационные среды, содержащие также фосфатно-солевой буфер, сахарозу, фикоилл и человеческий сывороточный альбумин (10-20 г/л). Среда VitriFreeze/Thaw ES™ не содержит антибиотиков.

## **МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР**

---

**Набор VitriFreeze ES™ (каталожный номер VF\_KIT1\_ES)** содержит по 1 флакону каждой из следующих сред:

- 5 мл среды для предварительной инкубации VitriFreeze ES™ - Pre-incubation medium («VPI»)
- 1 мл среды для замораживания VitriFreeze ES™ - Freezing medium 1 (5% ДМСО – 5% этиленгликоля) («VF1»)
- 1 мл среды для замораживания VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 (10% ДМСО – 10% этиленгликоля) («VF2»)
- 1 мл среды для замораживания VitriFreeze ES™ - Freezing medium 3 (20% ДМСО – 20% этиленгликоля) («VF3»)

**Набор VitriThaw ES™ (каталожный номер VT\_KIT1\_ES)** содержит по 1 флакону каждой из следующих сред:

- 5 мл среды для оттаивания VitriThaw ES™ - Thawing medium 1 («VT1»)
- 3,2 мл среды для оттаивания VitriThaw ES™ - Thawing medium 2 («VT2»)
- 1 мл. среды для оттаивания VitriThaw ES™ - Thawing medium 3 («VT3»)
- 1 мл среды для оттаивания VitriThaw ES™ - Thawing medium 4 («VT4»)
- 1 мл среды для оттаивания VitriThaw ES™ - Thawing medium 5 («VT5»)

Среды должны использоваться в показанном выше порядке (в наборе флаконы могут лежать в ином порядке); поставляемого объема сред хватает приблизительно на 3-4 процедуры.

## **МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР**

---

- Чашки с лунками
- Сосуд для замораживания с жидким азотом
- Водяная баня, способная поддерживать температуру 37 °С
- Дозирующие пипетки
- Щипцы
- Носители для витрификации (HSV, VitriSafe)
- Ламинарный шкаф (класса 5 ISO)
- Микроскоп
- Таймер лабораторный

## **VITRIFREEZE ES / VITRITHAW ES И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ**

---

Среды VitriFreeze/Thaw ES™ могут использоваться в комбинации со средами GAIN™ medium и FertiCult™ (Flushing medium, IVF medium) до замораживания и после оттаивания.

## **СПЕЦИФИКАЦИЯ ПРОДУКТА**

---

- Химический состав
- pH: 7,20–7,40
- Осмоляльность
  - среда для предварительной инкубации VPI: 270–295 mOsm/kg  
(при выпуске: 270–290 mOsm/kg)
  - VT2: 805–865 mOsm/kg  
(при выпуске: 805–850 mOsm/kg)
  - VT3: 535–565 mOsm/kg
  - VT4: 405–435 mOsm/kg
  - VT5: 270–295 mOsm/kg  
(при выпуске: 270–290 mOsm/kg)
- Стерильность: Стерильно (SAL 10<sup>-3</sup>)
- Бактериальные эндотоксины: < 0,25 ЕЭ/мл
- Тест на эмбрионах мышей (бластоцисты после 96 ч): ≥ 80%

- Используются исходные материалы качества Евр. Фарм. или Фарм. США, где применимо
- Сертификат анализа и паспорт безопасности: по запросу

## **ПРОВЕРКА ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ**

- Не используйте продукт, если он стал замутненным или проявляет любые признаки микробиологического загрязнения;
- Не используйте продукт, если защитный колпачок (защитная пленка) снят или поврежден при доставке продукта.
- Среда VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 может содержать небольшие преципитаты солей, которые не влияют на эффективность/безопасность продукта.

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ХРАНЕНИЮ**

- Хранить при температуре 2–8 °С;
- Не замораживать перед использованием;
- Хранить в защищенном от света месте;
- Продукты могут быть безопасно использованы в течение 7 дней после вскрытия, при соблюдении условий стерильности и хранения при температуре 2–8 °С;
- Не использовать после истечения срока годности.
- Продукт стабилен после транспортировки (максимум 5 суток) при повышенных температурах ( $\leq 37$  °С).

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Стандартные меры профилактики инфекций, возникающих от использования медицинских изделий, приготовленных из крови или плазмы человека, включают выбор доноров, скрининг индивидуального донорского материала и пулов плазмы на специфические маркеры инфекций, и включение эффективных этапов производства для инактивации/удаления вирусов. Несмотря на это, при использовании медицинских изделий, приготовленных из крови или плазмы человека, вероятность передачи инфекционных агентов не может быть полностью исключена. Это также относится к неизвестным или появляющимся вирусам и другим патогенам. Отчеты о доказанной передаче вирусов с помощью альбумина, произведенного в соответствии со спецификациями Европейской Фармакопеи с помощью установленных процессов, отсутствуют. Таким образом, работайте со всеми образцами так, как если бы они могли передавать ВИЧ или гепатит.

Всегда надевайте защитную одежду при работе с образцами. Всегда работайте со строгим соблюдением условий гигиены во избежание возможной контаминации (напр., с использованием ламинарного шкафа класса ISO 5).

Использовать только для целевого применения. Долгосрочная безопасность витрификации эмбрионов в отношении детей, рожденных с применением данной процедуры, не установлена.

## **МЕТОД**

Перед применением удостоверьтесь, что все среды хорошо перемешаны. Внимательно прочитайте все нижеизложенные этапы процедур витрификации/оттаивания перед началом работы.

### **Предварительные этапы**

- На одной подготовленной чашке с витрификационными средами можно провести до 5 циклов витрификации (для одного и того же пациента). Не используйте одни и те же среды для разных пациентов!
- Вскройте необходимое количество носителей для витрификации, принимая во внимание, что 1 носитель может удерживать 1-2 эмбриона (проверьте инструкции по применению устройства, которое вы используете). Удобно разложите составные части носителей на рабочей поверхности для упрощения их дальнейшего использования в процедуре.

- Процедура замораживания: В 4-луночной чашке заполните лунки соответственно (сокращенные названия сред расшифрованы выше):

VPI: 250-300 мкл

VF1: 250-300 мкл

VF2: 250-300 мкл

VF3: 250-300 мкл

- Процедура размораживания: В 6-луночной чашке заполните лунки соответственно (сокращенные названия сред расшифрованы выше):

VT1: 500-800 мкл (с закрытым носителем для витрификации)

Разведение 1:1 VT1 и VT2: 250-300 мкл (с закрытым носителем для витрификации)

VT2: 250-300 мкл (с закрытым носителем для витрификации)

VT2: 500-800 мкл (с открытым носителем для витрификации)

VT3: 250-300 мкл

VT4: 250-300 мкл

VT5: 250-300 мкл

### **Протокол замораживания с использованием закрытого (асептического) носителя**

Нагрейте все среды набора до комнатной температуры (20-25 °С) до их использования.

Перенесите эмбрионы последовательно в каждую из следующих сред по схеме:

<b>Стадия развития</b>	<b>VPI, время выдержива- ния</b>	<b>VF1, время выдерживания</b>	<b>VF2, время выдержи- вания</b>	<b>VF3, время выдержи- вания</b>
<b>Зигота – 2- клеточная стадия</b>	2 минуты	5-10 минут	4-5 минут	40-60 секунд
<b>4-8-клеточная стадия</b>	2 минуты	5-7 минут	4 минуты	40-60 секунд
<b>Морула</b>	2 минуты	5-7 минут	4 минуты	40-60 секунд
<b>Ранние бластоцисты</b>	2 минуты	5-7 минут	4 минуты	40-60 секунд
<b>Расширенные бластоцисты</b>	2 минуты	5-10 минут	4 минуты	40-60 секунд

**Примечание:** полный процесс помещения эмбриона в среду для замораживания VitriFreeze ES™ Freezing medium 3, помещения эмбриона в носитель для витрификации, помещение носителя во внешнюю соломинку (если применимо) и ее запечатывание не должен занять более 60 секунд перед погружением носителя в жидкий азот. Если весь процесс занял более 60 секунд, отметьте это и впоследствии проанализируйте полученные результаты.

### **Протокол замораживания с использованием открытого носителя**

Нагрейте все среды набора до комнатной температуры (20-25 °С) до их использования.

Перенесите эмбрионы последовательно в каждую из следующих сред по схеме:

<b>Стадия развития</b>	<b>VPI, время выдержива- ния</b>	<b>VF1, время выдерживания</b>	<b>VF2, время выдержи- вания</b>	<b>VF3, время выдержи- вания</b>
<b>Зигота – 2- клеточная стадия</b>	2 минуты	2 минуты	3 минуты	30-40 секунд
<b>4-8-клеточная стадия</b>	2 минуты	2 минуты	3 минуты	30-40 секунд
<b>Морула</b>	2 минуты	2 минуты	3 минуты	30-40 секунд
<b>Ранние</b>	2 минуты	2 минуты	3 минуты	30-40 секунд

<b>бластоцисты</b>				
<b>Расширенные бластоцисты*</b>	2 минуты	2 минуты	4 минуты	30-40 секунд

\* Если используется искусственное редуцирование (Vanderzwalmen et al, 2002, Son et al., 2003).

**Примечание:** полный процесс помещения эмбриона в среду для замораживания VitriFreeze ES™ Freezing medium 3, помещения эмбриона в носитель для витрификации, помещения носителя во внешнюю соломинку (если применимо) и ее запечатывания не должен занять более 60 секунд перед погружением носителя в жидкий азот. Если весь процесс занял более 60 секунд, отметьте это и впоследствии проанализируйте полученные результаты.

#### **Протокол оттаивания с использованием закрытого носителя**

Нагрейте все среды набора до комнатной температуры (20-25 °С) до их использования. Альтернативно, среда VitriFreeze ES™ Thawing medium 1 может быть нагрета до 37 °С.

<b>Стадия развития</b>	<b>VT1</b>	<b>Смесь VT1/VT2*</b>	<b>VT2</b>	<b>VT3</b>	<b>VT4</b>	<b>VT5</b>
<b>Зигота – 2-клеточная стадия</b>	1 минута	1 минута	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	Промывайте в течение 1-2 минут до переноса эмбрионов в культуральную среду
<b>4-8-клеточная стадия</b>	1-1,5 минуты	1-1,5 минуты	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
<b>Морула</b>	1-1,5 минуты	1-1,5 минуты	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
<b>Ранние бластоцисты</b>	1-1,5 минуты	1-1,5 минуты	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
<b>Расширенные бластоцисты</b>	1-1,5 минуты	1-1,5 минуты	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	

\* смешайте одну часть среды VT1 и одну часть среды VT2.

#### **Протокол оттаивания с использованием открытого носителя**

Нагрейте все среды набора до комнатной температуры (20-25 °С) до их использования. Альтернативно, среда VitriFreeze ES™ Thawing medium 2 может быть нагрета до 37 °С.

<b>Стадия развития</b>	<b>VT2</b>	<b>VT3</b>	<b>VT4</b>	<b>VT5</b>
<b>Зигота – 2-клеточная стадия</b>	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	Промывайте в течение 1-2 минут до переноса эмбрионов в культуральную среду
<b>4-8-клеточная стадия</b>	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
<b>Морула</b>	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
<b>Ранние бластоцисты</b>	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
<b>Расширенные бластоцисты</b>	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	

#### **БИБЛИОГРАФИЯ**

1. Rall W. et Fahy G. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification, Nature, 313, 573
2. Stehlik E., Stehlik J., Katayama K., et al. (2005) Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. RBMonline, 11, 53-7
3. Son W.Y., Yoon S.H., Yoon H.J., Lee S.M. and Lim J.H. (2003) Pregnancy outcome following transfer of human blastocyst vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele, Hum. Reprod., 18, 137-139

4. Vanderzwalmen P., Ectors F., Grobet L. et al. (2009) Development of an aseptic vitrification technique: application to blastocysts originating from infertile patients, egg donors and after in vitro maturation. RBMOnline, 19, 700-7
5. Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C.H., Standaert V., Bollen N., van Roosendaal E., Vandervorst M., Schoysman R. and Zech H. (2003) Vitrification of human blastocyst with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. Hum. Reprod., 18(7), 1504-11
6. Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C.H., Standaert V., van Roosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zech H., Mukaida T., Takahash K. and Schoysman R. (2002) Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effects of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification, Hum. Reprod., 17, 744-751
7. Ebner T., Vanderzwalmen P., Wirleitner B. (2015). Atlas of vitrified blastocyst in human Assisted reproduction. Cambridge University Press
8. Kaartinen, N., et al. (2016) The freezing method of cleavage stage embryos has no impact on the weight of the newborns. J Assist Reprod Genet, 33(3), 393-399

**ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:**

FertiPro N.V.

Industriepark Noord 32

8730 Беернем – Бельгия

Тел. +32 (0)50 79 18 05

Факс +32 (0)50 79 17 99

Веб-сайт: [www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)

Электронная почта: [info@fertipro.com](mailto:info@fertipro.com)

