

Kryokonzervace embryí

doc. Ing. Michal Jeřeta, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika, LF MU a FN Brno

Vitrifikace

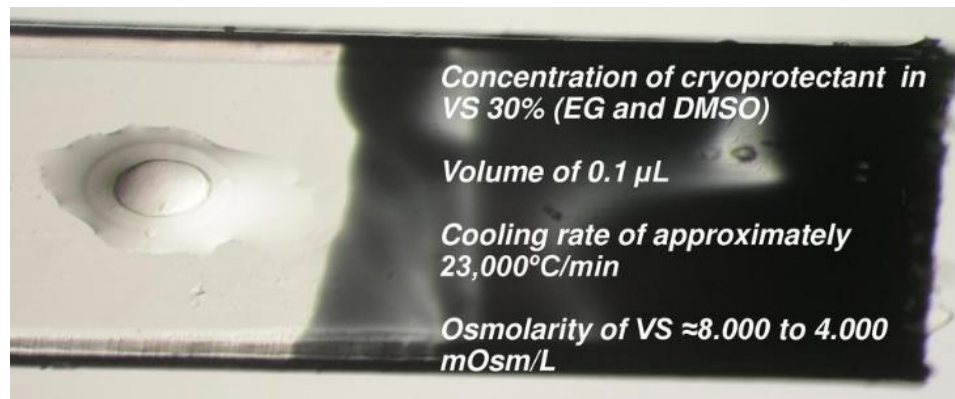
vitrifikační média reagují s intra i extra celulární vodou
snižují bod mrazu
vytěsněním vody zabrání tvorbě krystalů

roztok ztuhne tak rychle, že molekuly nemají dostatek času na to, aby se přestavěly do krystalické podoby

velice rychlé zmrazení cca 23 000 °C/min (od +25 °C do -196 °C)

sirupovitý roztok se mění v **amorfní led**

vysoké koncentrace kryoprotektiv okolo 4M penetrující a 0,5 M nepenetrující – silně hypertonické prostředí



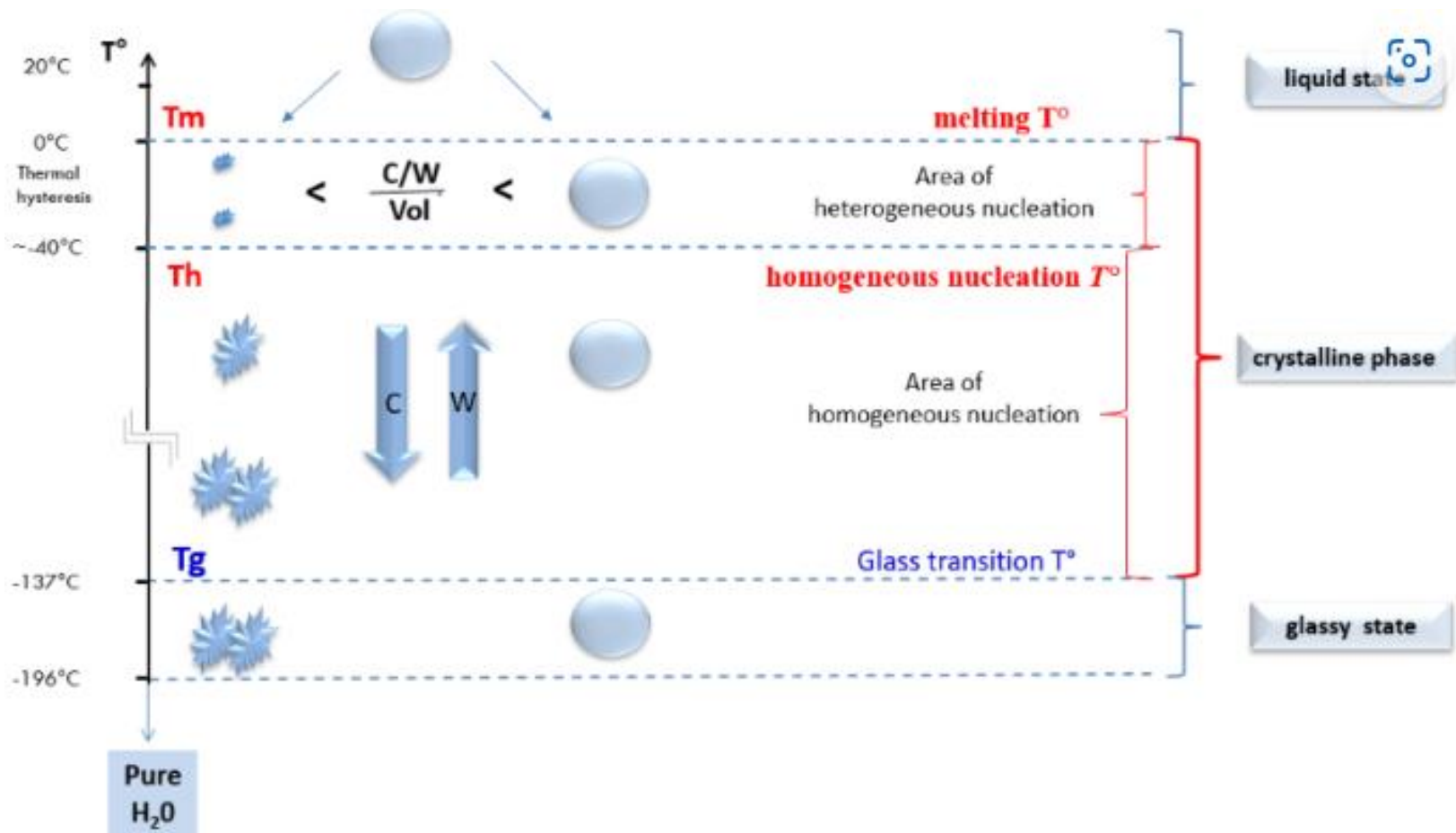
Vitrifikace

- problém vitrifikace je dosažení a udržení podmínek uvnitř i vně buněk, které zaručují **amorfní stav po celou dobu** ochlazování i během procesu zmrazování
- tohoto stavu je dosaženo, když jsou rozpuštěné látky **dostatečně koncentrované** nebo když je chlazení dostatečně **rychlé**, aby zvýšená viskozita inhibovala nukleaci a zabránila růstu ledových krystalů
- když se koncentrace CPA zvyšuje, T_g stoupá ($T_g = -135\text{ °C}$ pro čistou vodu, $< -135\text{ °C}$ pro roztoky CPA) a amplituda tranzitu mezi T_m a T_g se zkracuje
- čím rychleji je tento teplotní rozsah překročen tím nižší je pravděpodobnost vzniku ledových krystalů

Vitrifikace

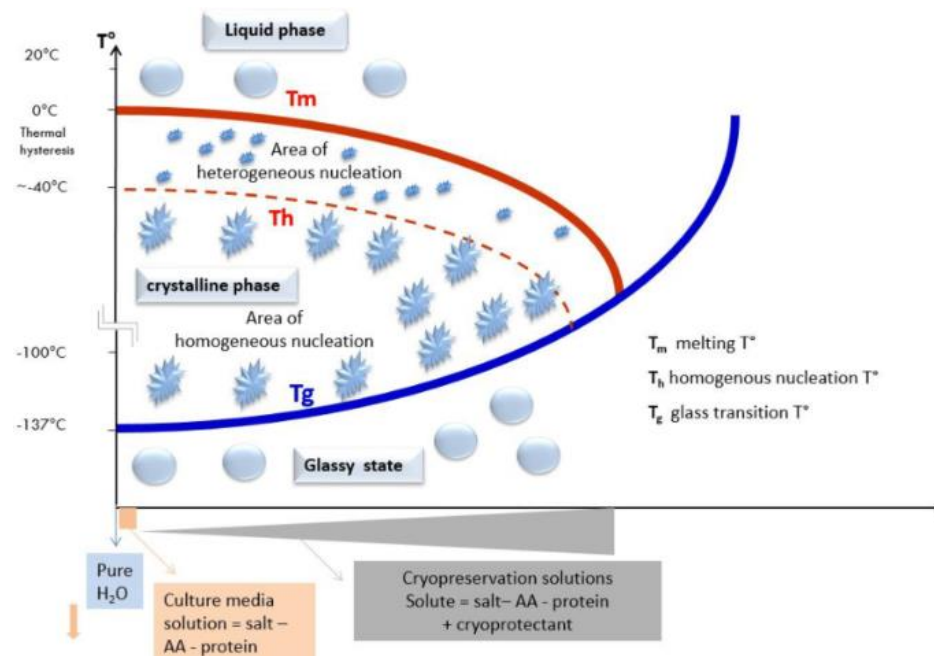
- T_g u vody je –137 °C
 - musí ale být ochlazení rychlejší než 100 000 °C/min
 - zabrání to nukleaci krystalů při přechodu mezi T_m a T_g
 - pod T_g je moc pomalý pohyb molekul a nedojde ke krystalizaci
 - záleží na rychlosti ochlazování a objemu kapaliny
-
- přidání kryoprotektiv zvyšuje viskozitu
 - CPA pronikají do buňky, částečně nahrazují vodu a zpomalují pohyb molekul vody, to vede ke:
 - 1) zpomalení nukleace krystalů
 - 2) redukce růstu krystalů
 - 3) omezení velikosti krystalů mezi T_m a T_g

Vitrifikace - voda



T_m - teplota tání, T_h – teplota vzniku homogenních jader T_g – teplota zesklivatění

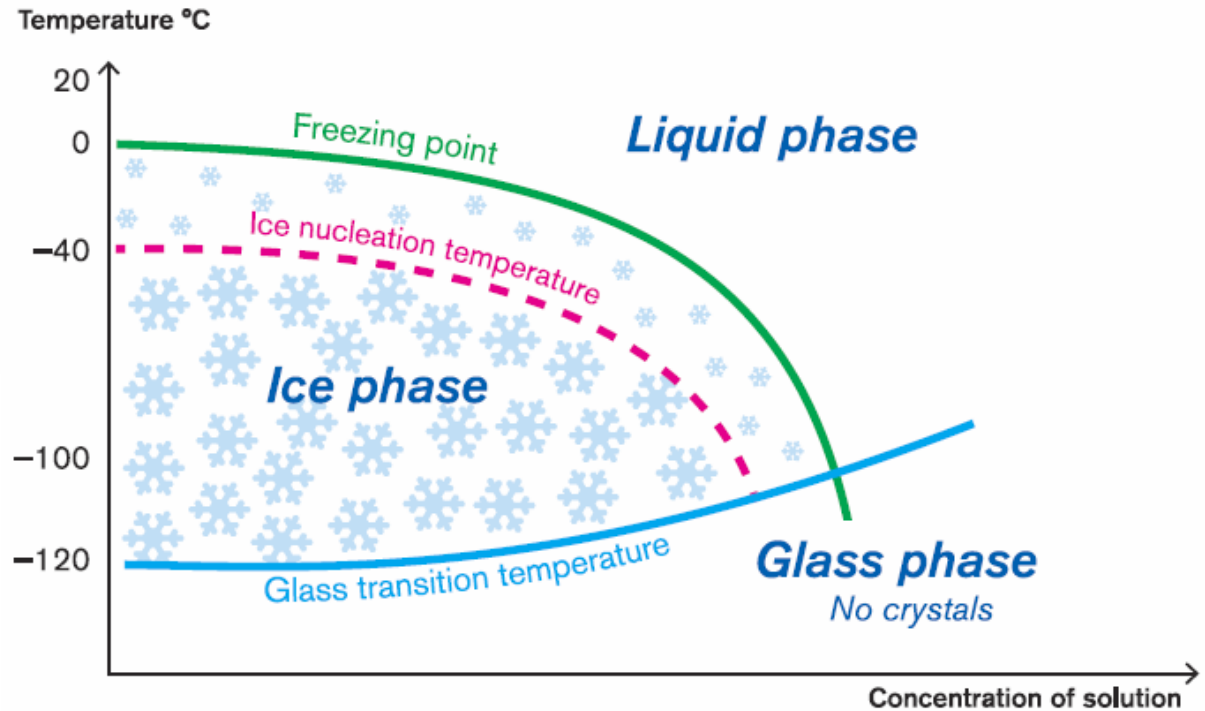
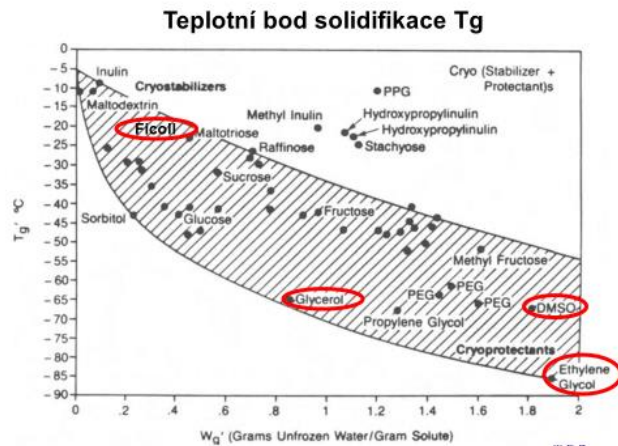
Vitrifikace



Přidání CPA mění T_m , T_h i T_g – velmi vysoká koncentrace ale buňky poškozuje v závislosti na době expozice

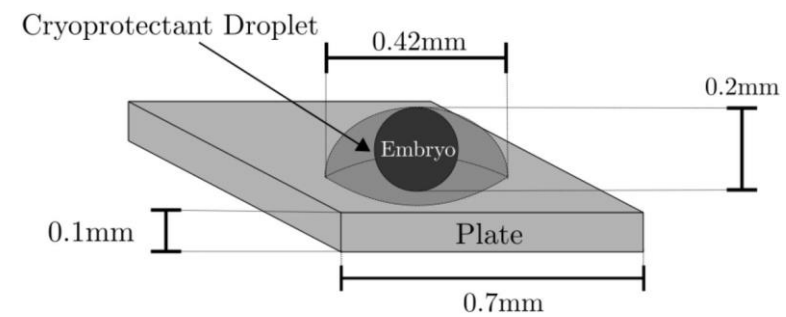
- nad T_g jsou roztoky buď podchlazené, nebo ve stavu krystalické pevné látky
- pod T_g se podchlazený roztok může přímo transformovat z kapalného stavu do stavu zvaného skelná pevná látka nebo amorfní led
- krystalická pevná voda vytvořená při teplotě nad T_g zůstane krystalická i při ochlazení pod T_g
- aby se dosáhlo skelného pevného stavu, musí být T_m na T_g předán bez tvorby krystalů

Vitrifikace



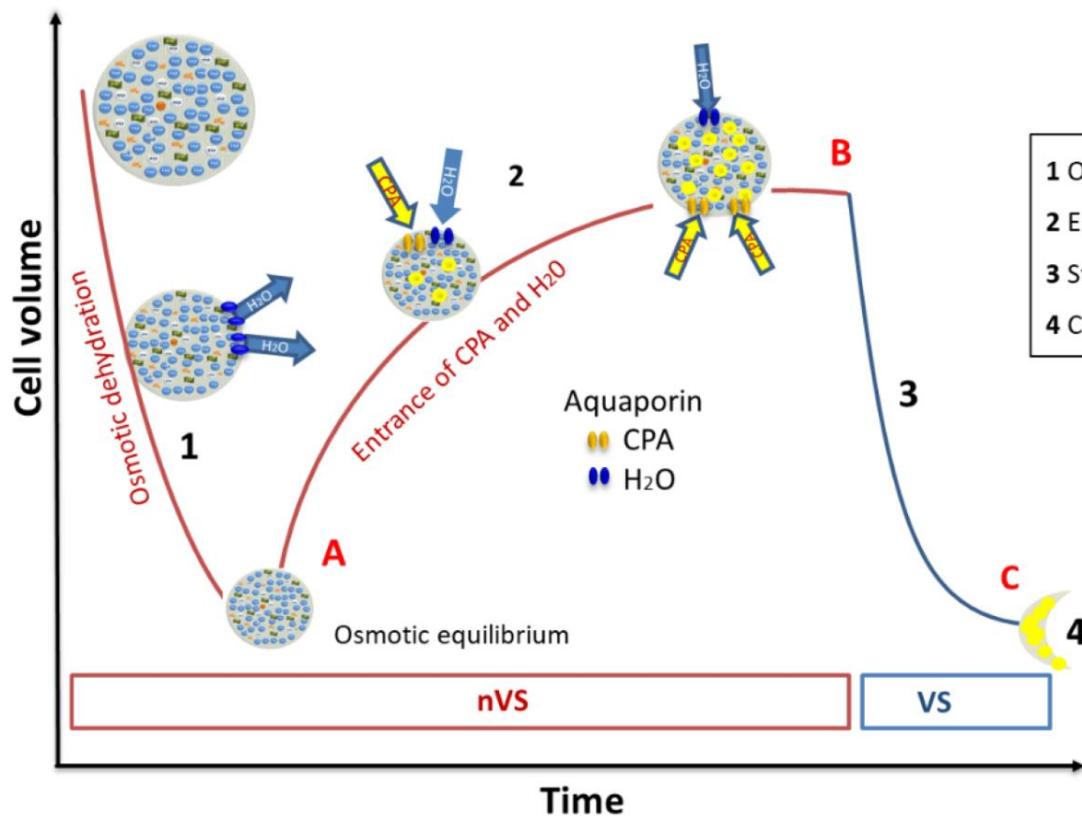
- je velice důležité správně načasovat poměr koncentrace kryoprotektiv a dobu expozice, tak aby došlo k dostatečnému prosycení vzorku, ale bez poškození buněk vlastní přítomností kryoprotektiv

Vitrifikace

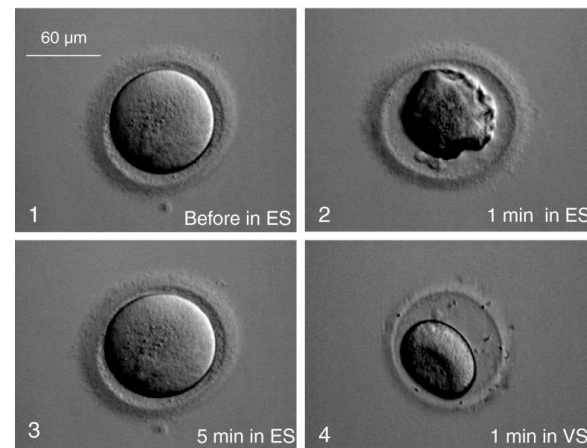


- klíčem k úspěchu při dosahování "skleněného" stavu v extra- a intracelulárním kompartmentu stanovení optimální rovnováhy mezi následujícími třemi faktory:
 - 1) rychlost ochlazování a ohřívání (2000 °C/min až 20 000 °C/min; v některých systémech dokonce 1000 °C/min–100 000 °C/min)
 - 2) optimální viskozita rozpuštěné látky
 - 3) objem kapky vitrifikačního roztoku

- Dvoufázová reakce buňky v přítomnosti nevitřifikujícího roztoku CPA (nVS) a vitřifikujícího roztoku CPA (VS). Jsou zobrazeny změny v objemu buněk a molekulární změny (modré tečky molekuly vody, zelené a červené tečky buněčné makromolekuly, žluté tečky CPA). Během inkubace embryí s nVS dochází k dehydrataci buněk - voda vytéká akvaporinovými kanály (1). Po dosažení osmotické rovnováhy (A) je vstup CPA a v menší míře následuje H₂O (2). To je charakterizováno malým nárůstem objemu (B). Ve VS dochází k silné dehydrataci (3), což vede k vyšší koncentraci CPA v buňce (4) a silnému snížení objemu buněk (C).



- 1 Outflow of H₂O (dehydration)
- 2 Entrance of CPA and H₂O
- 3 Strong collapsing and dehydration
- 4 Concentration of CPA



Vitrification Protocols

Different protocols have been proposed:

- A) 15% EG + 15% DMSO + 0.5M sucrose
- B) 15% EG + 15% PrOH + 0.5M sucrose
- C) 7.5% EG + 7.5% DMSO + 12% SSS
- D) 5.5M EG + 1M sucrose

Carriers:

- A) Open devices
- B) Closed devices

Different types:

- | | |
|-----------------------------|---|
| Open Pulled Straw | <i>Vajta et al, 1998</i> |
| CryoLoop | <i>Lane et al, 1999</i> |
| Hemi-Straw | <i>Andervoost et al, 2001</i> |
| Cryotop | <i>Kuwayama et al, 2005</i> |
| Cryoleaf | <i>Chian et al, 2009</i> |
| Cryolock | <i>Bernal et al, 2009</i> |
| Vitri-inga | <i>Almodin et al, 2010</i> |
| Plastic-blade | <i>Sugiyama et al, 2010</i> |
| Straw-in-straw | <i>Kuleshova and Shaw, 2000</i>
<i>Isachenko et al, 2005</i> |
| Single-straw closed systems | |
| CryoTip | <i>Kuwayama et al, 2005</i> |
| Cryopette | <i>Keskintepe et al, 2009</i> |

Srovnání metod

Tab. 21.1 Srovnání vitrifikace a pomalého mrazení

	Vitrifikace	Pomalé mrazení
Rychlost mrazení	> 2 000 °C/min - uzavřený systém > 10 000 °C/min - otevřený systém	cca 0,3 °C/min
Celkový čas mrazení	< 10 min	> 3 h
Přístrojové vybavení	ano	ne
Zručnost embryologa	vyšší	nižší
Konečný objem vzorku	0,1-2 µl	200-500 µl
Konečná koncentrace kryoprotektiv	> 4 mol/l	1,5 mol/l
Krystalizace vzorku	ne	ano
Přímý kontakt s LN2	ne - uzavřený systém ano - otevřený systém	ne
Mechanické poškození	nízké riziko	vysoké riziko
Cytotoxicita	vysoké riziko	nízké riziko
Přežívání rozmrazených oocytů	vyšší	nižší
Přežívání rozmrazených embryí	srovnatelné	srovnatelné
Přežívání rozmrazených blastocyt	vyšší	nižší
Přežívání rozmrazených spermií	srovnatelné	srovnatelné

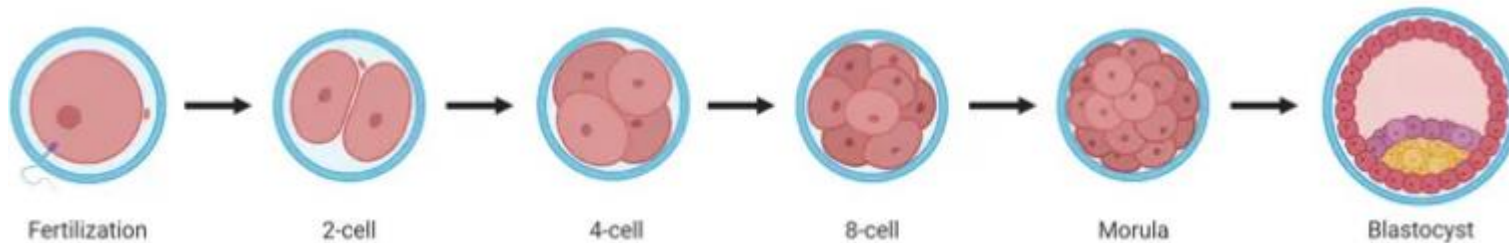
	Slow freezing	Vitrification
Damage due to ice formation	yes	no
Speed of freezing	0.3°C/min.	23,000°C/min.
Amount of cryoprotectant	low	high
Cell survival	low	high
Procedure	simple	complex

Vitrifikace různých stádií

Vytvoření standardního vitrifikačního protokolu pro všechna embryonální stádia není reálné, protože embrya se liší:

- různý poměr povrch/objem
- rozdílný cooling rate mezi zygoty, dělícími se embryi a blastocystami
- různá citlivost na mražení mezi různými stadii

Optimálním stádiem na mražení jsou blastocysty – jednotný protokol



Kryokonzervace PN stádií

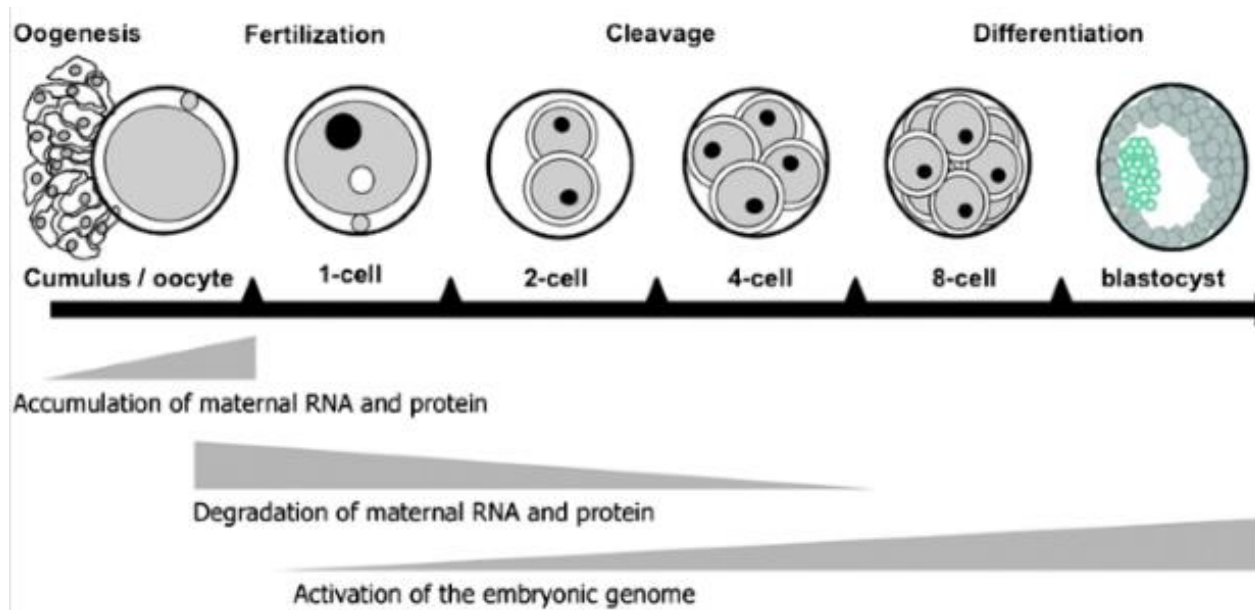
- vitrifikace je efektivnější než pomalé mražení
- kombinace vysoké hladiny kryoprotektiv a velké rychlosti zamražení
- méně efektivní přístup
- skoro se nepoužívá
- v minulosti problémy s kultivací do stádia blastocyst

!!předchází etickým problémům s časným embryem!!



Kryokonzervace časných embryí

- co je optimální stádium pro vitrifikaci je sporné
- v minulosti často transfery druhý den a tedy i vitrifikace 2. den
- při pomalém mražení často mražení druhý den
- nevýhoda je že je to před aktivací embryonálního genomu – embryo nemusí být schopné se vyvíjet do stádia blastocysty



Vitrifikace blastocyst

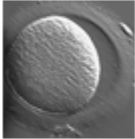

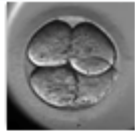
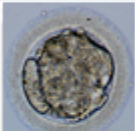

Oproti ostatním stádiím mají:





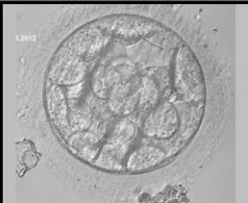


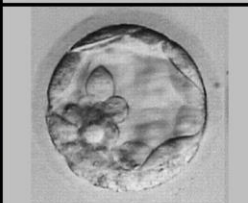
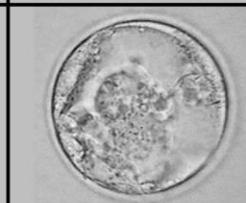
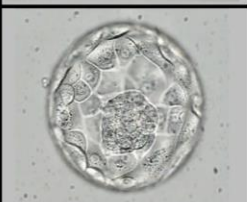

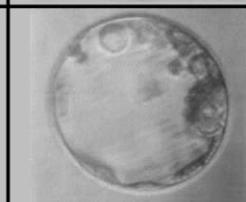
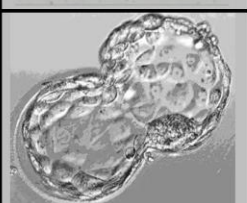

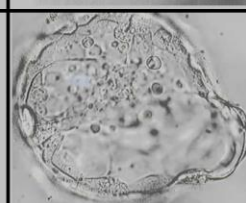
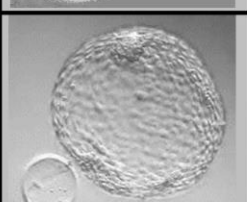
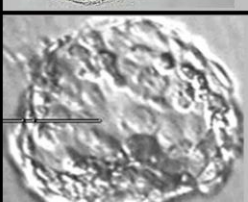
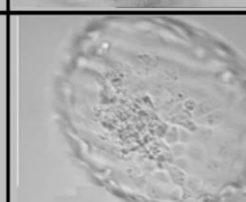
- 1) více buněk a snadněji kompenzují kryopoškození
- 2) blastomery jsou menší a snadněji do nich pronikají kryoprotektiva
- 3) bez spolehlivě fungujícího mražení blastocyst nemá smysl dělat prodlouženou kultivaci embryí



Embryo grading

Embryo Weekly Planner

Day 0	Egg retrieval and insemination	
Day 1	Fertilization check	
Day 1-3	Cleavage stage Day 2 (4 cells); Day 3 (8 cells)	
Day 4	Morula stage	
Day 5+	Blastocyst stage	

Inner Cell Mass (ICM)	A Numerous and tightly packed	B Several and loosely packed cells	C Few cells
Trophectoderm (TE)	A Many tightly packed cells organised into epithelium	B Several cells organised into loose epithelium	C Few cells
Morula			
Early Blastocyst			
Blastocyst			
Expanded Blastocyst			
Hatching Blastocyst			
Fully Hatched Blastocyst			

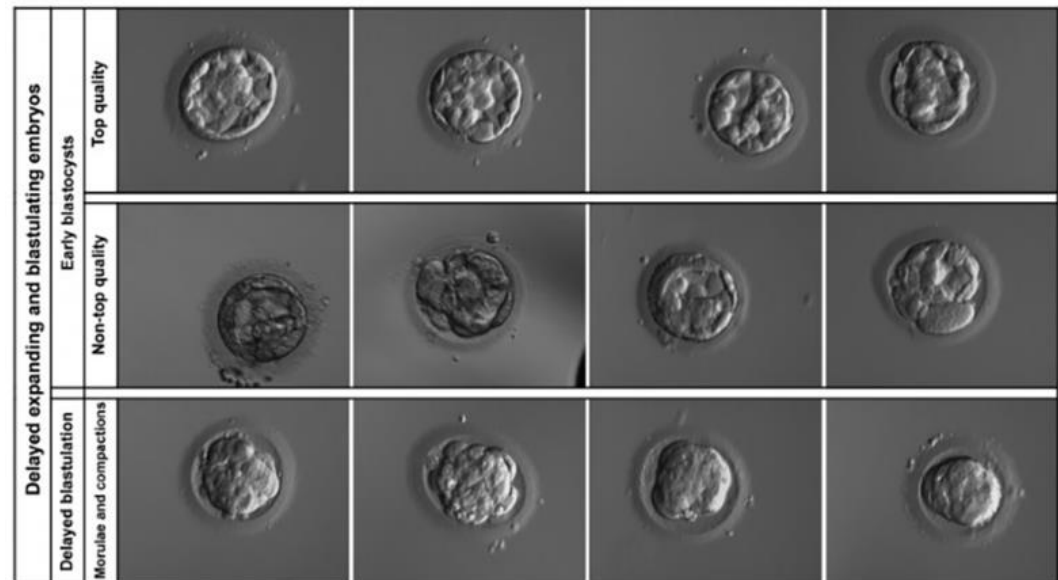
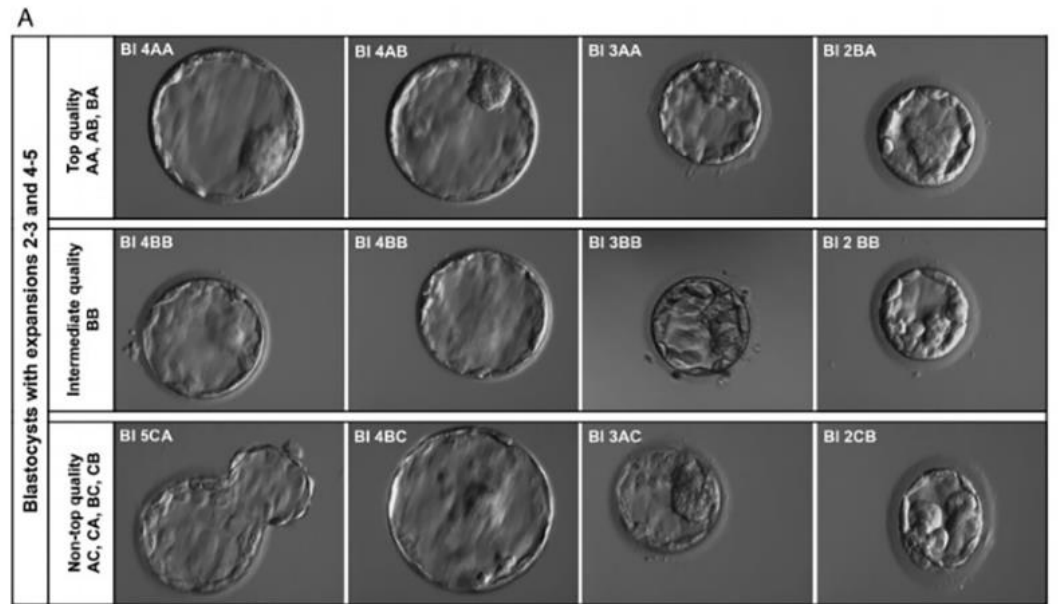
Embryo grading

Důležité je vybrat kvalitní embryo na embryotransfer, všechna ostatní dobrá jsou vitrifikována.

Nemrazí se:

- 1) embrya zastavená ve vývoji
- 2) embrya lytická či s vysokým podílem fragmentací
- 3) embrya s velice špatnou morfologií

- A – many cells, form a single layer;
- B – few cells, form free epithelium;
- C – very few large cells.

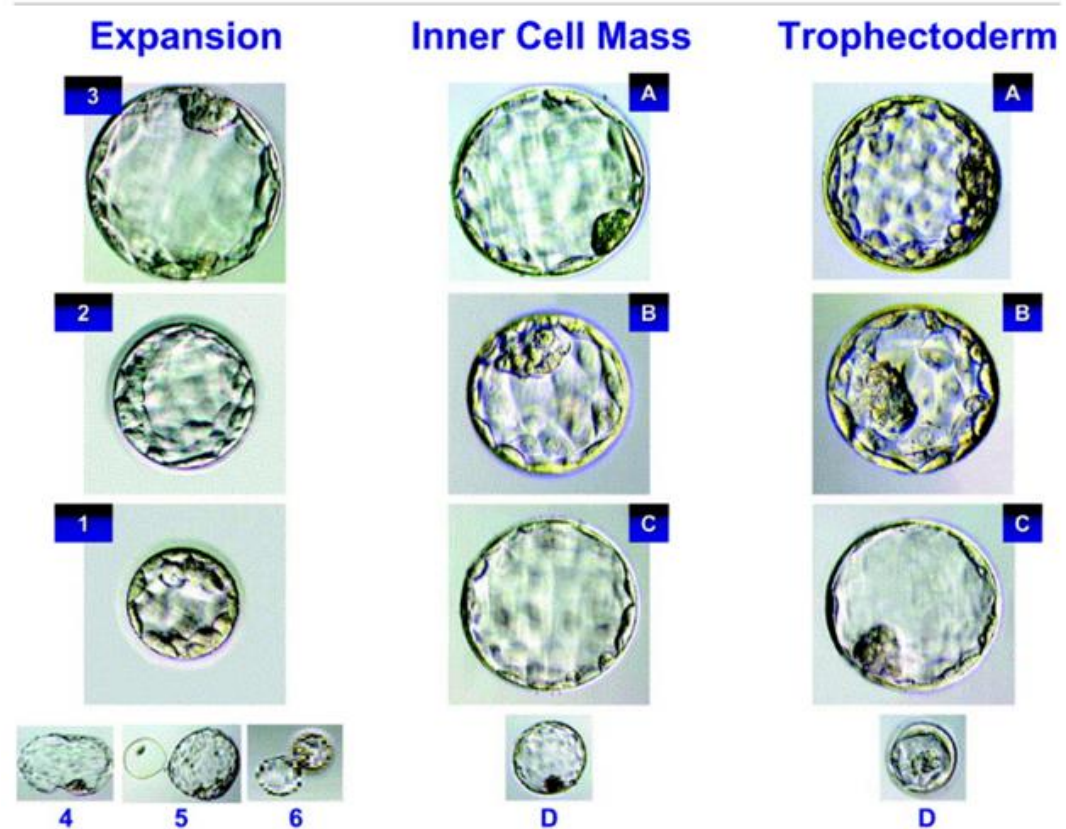


Blastocysts are initially graded numerically, from 1 to 6 (this can be performed under a dissecting microscope):

1. Early blastocyst: the blastocoele occupies less than half the volume of the embryo.
2. Blastocyst: the blastocoele occupies half the volume of the embryo or more.
3. Full blastocyst: the blastocoele completely fills the embryo, but the zona has not thinned.
4. Expanded blastocyst: the volume of the blastocoele is larger than that of the embryo, and the zona is thinning.
5. Hatching blastocyst: the trophoctoderm has started to herniate through the zona.
6. Hatched blastocyst: the blastocyst has completely escaped from the zona.

The morphology of the ICM and trophoctoderm are then assessed under an inverted microscope:

ICM	Trophoctoderm
A. Tightly packed, many cells,	A. Many cells forming a cohesive epithelium
B. Loosely grouped, several cells	B. Few cells forming a loose epithelium
C. Very few cells	C. Very few large cells



Jednání s pacienty – kryo embryí

- centrum která nabízí kryokonzervaci embryí si musí být vědom logistických, právních, morálních a etických problémů, které mohou nastat
- oba partneři musí podepsat komplexní formuláře souhlasu s kryokonzervací
- v případě rozvodu nebo rozchodu, či smrti jednoho z nich nemohou být embrya použita
- kryokonzervované vzorky nelze skladovat po neomezenou dobu a musí být jasnou politikou kliniky, že záznamy jsou správné udržovány, s pravidelnými audity úložiště banky
- všechny páry s kryokonzervovanými embryi ve skladu musí být kontaktovány každoročně, možnosti:

1. pokračujte ve skladování
2. přenosu zmrazeného embrya.
3. darujte svá embrya pro výzkumné projekty (schváleno etickou komisí)
4. darujte svá zmrazená embrya jiným neplodným párům
5. nechte embrya rozmrazit a zlikvidovat .

Vitrifikace 5. nebo 6. den?

- dlouhodobě lepší jsou výsledky s vitrifikací 5. den
- den 6 starší, větší blastocel má vliv na ztrátu vody a pronikání kryoprotektiv
- snazší uměle vyvolaný kolaps u D5 než u D6 embryí



Day 5/6
Hatching Blastocyst



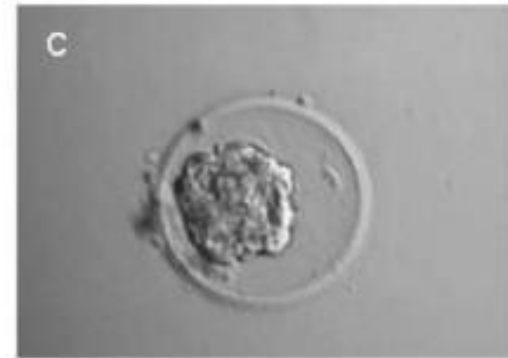
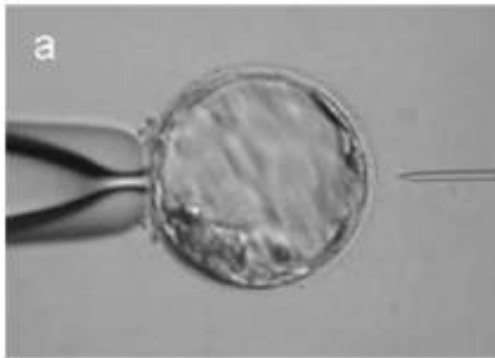
Day 5/6
Hatching Blastocyst



Day 6
Fully Hatched Blastocyst

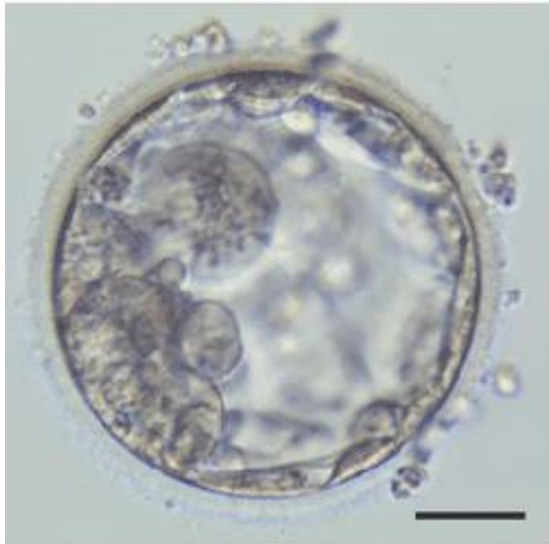
Artificial collapse (AC)

- v letech 2003 a 2004 bylo prezentována lepší efektivita vitrifikace lidských blastocyst pokud se před vitrifikací udělá kolaps blastocyst
- nejprve mechanický kolaps pomocí ostré jehly, později mnohem efektivnější kolaps pomocí laseru
- opakovaně zjištěna vyšší efektivita transferů, ale i vyšší implantační a clinical pregnancy rate



Embryo shrinking

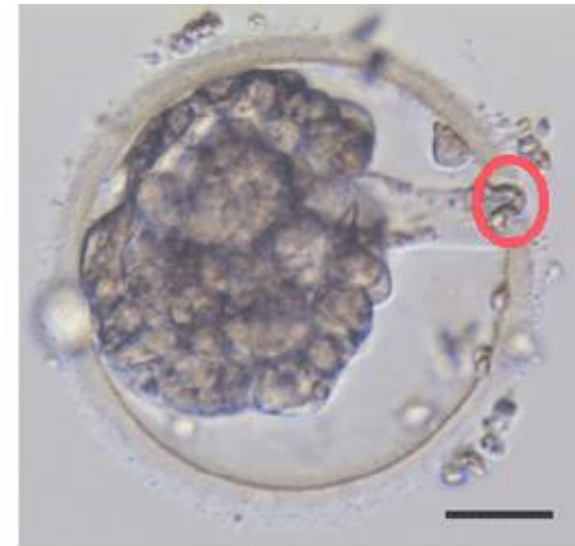
- přežití blastocyst a klinické těhotenství byly signifikantně vyšší u kolapsu než u kontrolní skupiny
- míra implantace a míra živě narozených dětí však byly v obou skupinách podobné.
- metaanalýza naznačuje, že umělé smrštění před vitrifikací blastocysty zlepšuje přežití a míru klinického těhotenství, ale ne implantaci nebo počet živě narozených dětí



a)



b)



c)

Vývoj metod vitrifikace

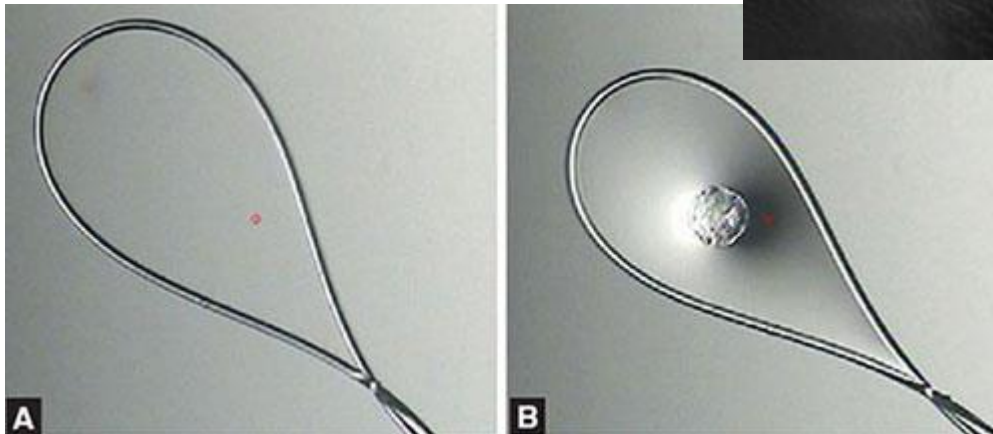
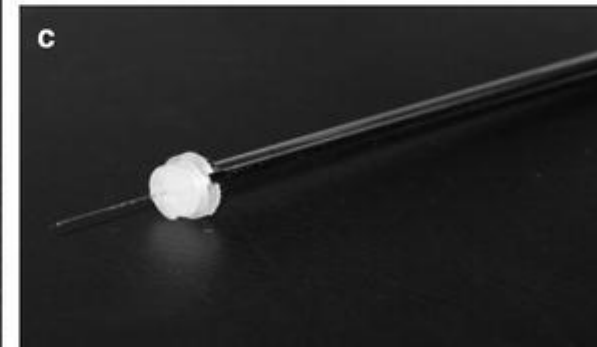
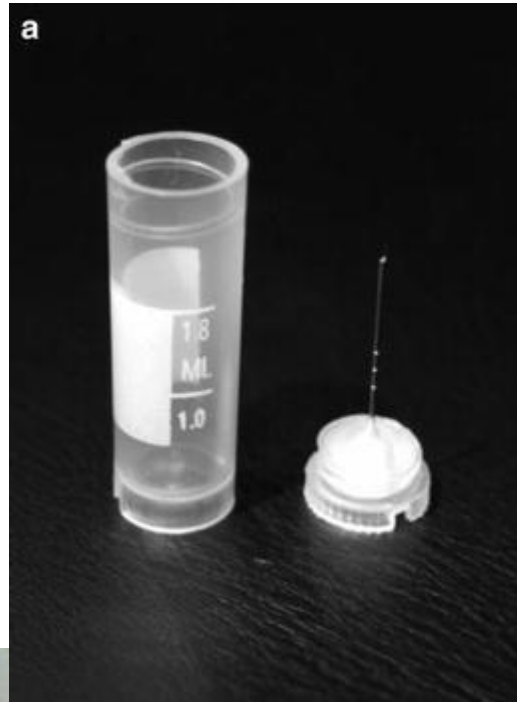
Table 23.1 Various vitrification techniques in embryology

System	Reference
Direct dropping into liquid nitrogen	Landa and Tepla (72)
Electron microscopic grids	Martino et al. (24)
Open pulled straw	Vajta et al. (79)
Glass micropipettes	Kong et al. (166)
Super-finely pulled open pulled straw	Isachenko et al. (167)
Gel-loading tips	Tominaga and Hamada (168)
Sterile stripper tip	Kuleshova and Lopata (121)
Flexipet denuding pipette	Liebermann et al. (169)
Fine-diameter plastic micropipette	Cremades et al. (170)
100- μ L pipetting tip	Hredzak et al. (171)
Closed pulled straw	Chen et al. (172)
Sealed open pulled straws	Lopez-Bejar and Lopez-Gatius (173)
Cryotip	Kuwayama et al. (67)
Cryoloop	Lane et al. (87)
Nylon mesh	Matsumoto et al. (93)
Minimum drop size	Arav (174)
Minimum volume cooling	Hamawaki et al. (95)
Hemi-straw system	Vanderzwalmen et al. (96)
Cryotop	Kuwayama et al. (66)
VitMaster	Arav et al. (81)
Solid surface vitrification	Dinnyes et al. (109)

Source: Reprinted from Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(6): 779–96 (175), with permission from Reproductive Healthcare Ltd.

Metody

- Cryoloop
- Open systém
- 20000C/min
- 1ul



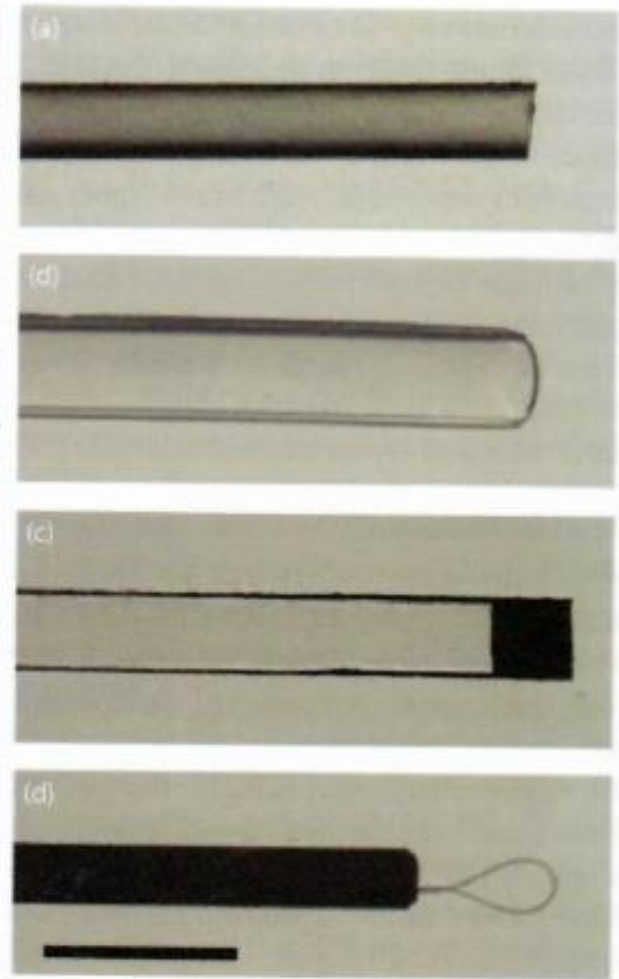
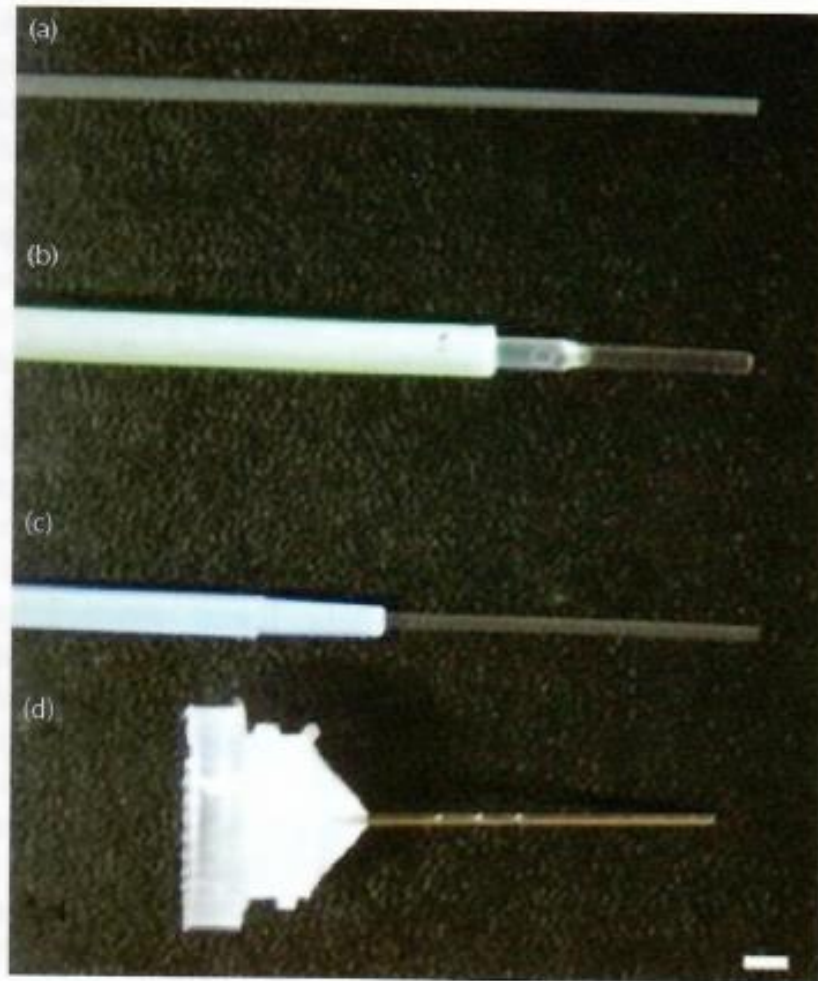


Figure 23.1 Examples for commercially available tools used as carriers for high-speed vitrification. (a) Open pulled straw (Minitüb, Landshut, Germany); (b) McGill Cryoleaf (MediCult, Jyllinge, Denmark); (c) Cryotop (Kitazato, Tokyo, Japan); (d) Cryoloop (Hampton Research, Aliso Viejo, CA). Bars represent 2 mm.

Typy pejet a jejich cooling rate



DEVICE	VOLUME	COOLING RATE
CRYOLOOP	>1 μ l	20.000 $^{\circ}$ C/min
HEMI-SATRAW	>1 μ l	>20.000 $^{\circ}$ C/min
CRYOLEAF	>1 μ l	23.000 $^{\circ}$ C/min
VITRI-INGA	1 μ l	20.000 $^{\circ}$ C/min
CVM-RING	>1 μ l	10.000 $^{\circ}$ C/min
VITRISAFE	>1 μ l	1.300 $^{\circ}$ C/min
HSS	0.5 μ l	2.000 $^{\circ}$ C/min
0.25 ML STRAW	25 μ l	2.500 $^{\circ}$ C/min
OPS	1 μ l	16.700 $^{\circ}$ C/min
CRYOTOP	0.1 μ l	23.000 $^{\circ}$ C/min
CRYOTIP	1 μ l	12.000 $^{\circ}$ C/min
RAPID-I	0.5 μ l	1.200 $^{\circ}$ C/min
CRYOPETTE	1.2 μ l	23.700 $^{\circ}$ C/min
ULTRAVIT	0.2 μ l	250.000 $^{\circ}$ C/min

Metody

- Vitrolife
- aseptické, uzavřený systém
- 1200 °C/min
- 0,5 ul
- Rapid-i



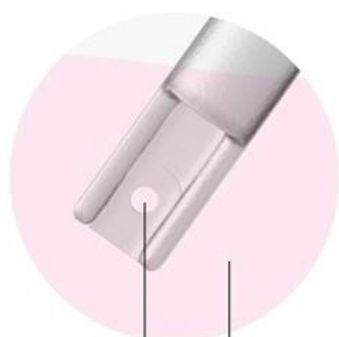
Effective vitrification



Pre-cooled
straw

Consistent
volume

Instant warming



Easy to
locate

Speed where
it's needed



Protokol Vitrolife

RapidVit™ Blast obsahuje tři přípravky pro vitifikaci lidských embryí ve stádiu blastocysty. Přípravky jsou pufrovány MOPS. Obsahují gentamicin, který působí jako antibakteriální přípravek, a lidský sérový albumin.

Vitri 1™ Blast neobsahuje žádná kryoprotektiva.

Vitri 2™ Blast obsahuje kryoprotektiva etylenglykol a propandiol.

Vitri 3™ Blast obsahuje kryoprotektiva etylenglykol, propandiol a ficoll.

Pro použití po ohřevu na teplotu +37 °C.



Pokyny pro uchovávání a stabilita

Uchovávejte v temnu při teplotě od +2 do +8 °C.

RapidVit™ Blast je stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku lékovky a v certifikátu analýzy pro jednotlivé šarže.

Lékovky s přípravkem se nesmějí po otevření skladovat. Po dokončení zákroku zbytky přípravku zlikvidujte.



Protokol Vitrolife

Umístěte 0,5-1 ml každého z následujících přípravků do samostatných jamek 4jamkové destičky a ohřejte na teplotu 37 °C:

- Vitri 1™ Blast
- Vitri 2™ Blast
- Vitri 3™ Blast

Veškerá manipulace s blastocystami se provádí při teplotě 37 °C (na vyhřívané ploténce).



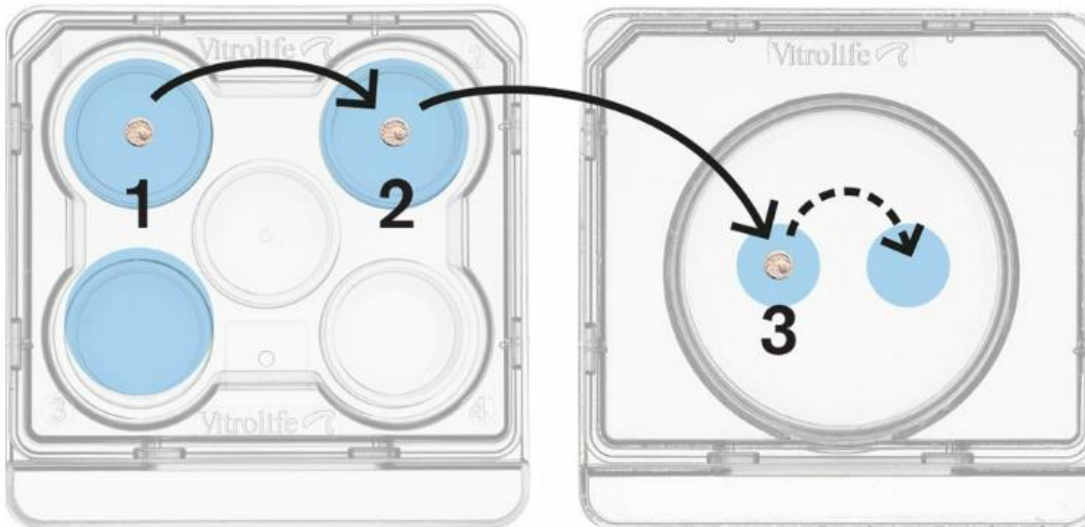
Přeneste blastocysty z kultivačního média do přípravku Vitri 1™ Blast a ponechte blastocysty v tomto roztoku po dobu nejméně **5 min., ale nejdéle 20 minut.**

Přemístěte příslušný počet blastocyst do přípravku Vitri 2™ Blast. Blastocysty zůstanou v tomto roztoku po **dobu 2 min**. Blastocysty mají tendenci stoupat k hladině a pokud se tak stane, shromážděte je a přemístěte na dno destičky.

Připravte nosič k použití.

Jakmile zbývají do konce 2 minuty, naneste 20µl kapku přípravku Vitri 3™ Blast na netoxický povrch, nejlépe kultivační destičku. Malá kapka přípravku Vitri 3™ Blast umožňuje jednoduché umístění na nosič.

Poznámka: 20µl kapku lze použít pouze jednou.



Protokol Vitrolife

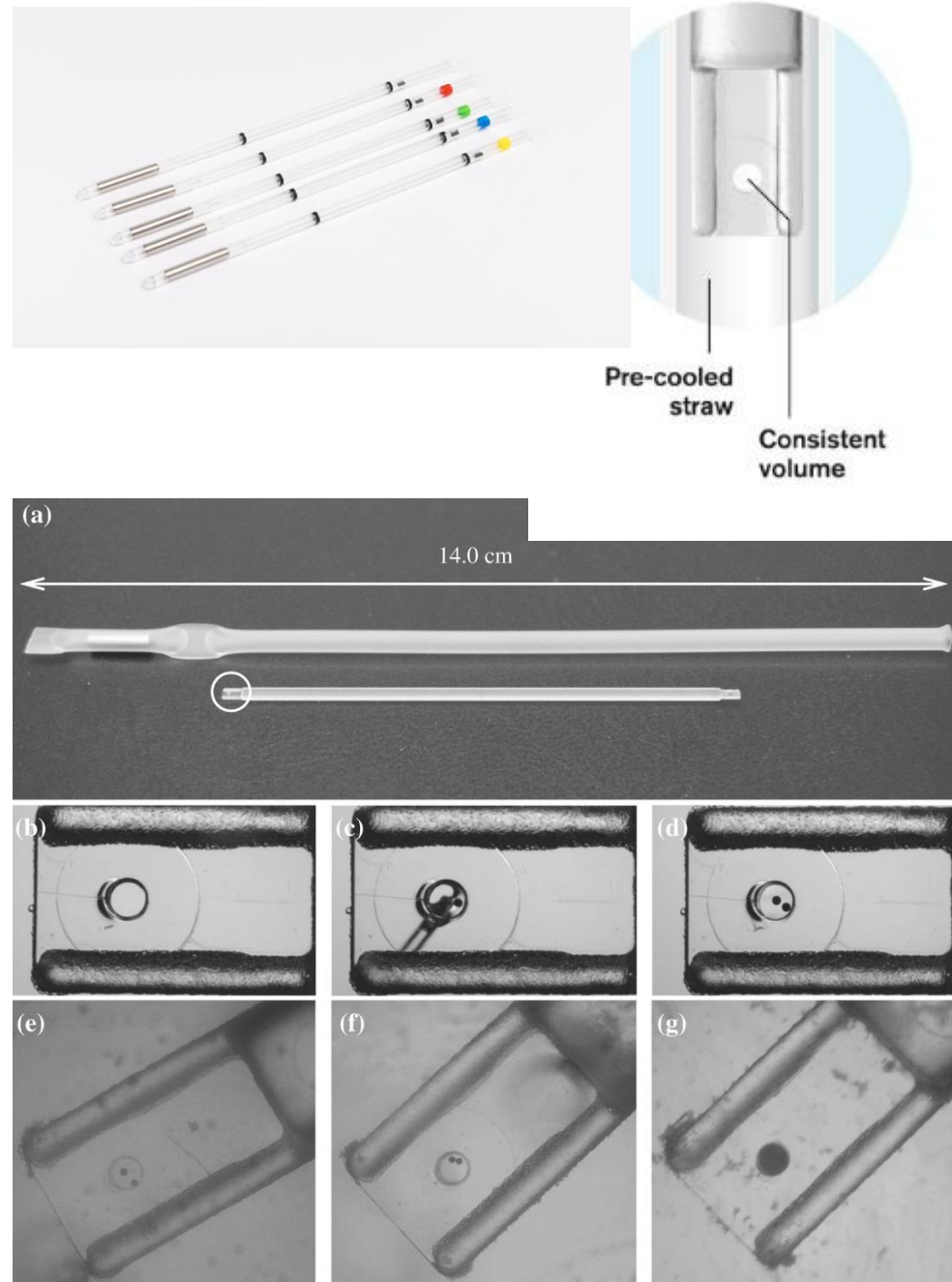
Jakmile zbývá 10 sekund, začněte shromažďovat blastocysty. Přeneste blastocysty v co nejmenším objemu přípravku Vitri 2™ Blast, aby nedošlo ke zředění kapky.

Přeneste blastocysty do 20µl kapky přípravku Vitri 3™ Blast a ponechte je v tomto roztoku po dobu **45 sekund**. S blastocystami v roztoku Vitri 3™ Blast zamíchejte pipetou. Jakmile zbývá 5-10 sekund shromážděte blastocysty a umístěte je na nosič.

Poznámka: Celková doba mezi přenosem blastocyst do kapky a vitrifikací blastocyst nesmí být delší než 45 sekund.

Neprodleně vitrifikujte blastocysty podle pokynů pro nosič.

[How to vitrify blastocysts](#)
[\(youtube.com\)](#)



Protokol Vitrolife cleave

Umístěte 0,5-1 ml každého z následujících roztoků do samostatných jamek a ohřejte na teplotu 37 °C:

- Vitri 1™ Cleave
- Vitri 2™ Cleave
- Vitri 3™ Cleave



Veškerá manipulace s embryi se provádí při teplotě 37 °C (na vyhřívané ploténce).

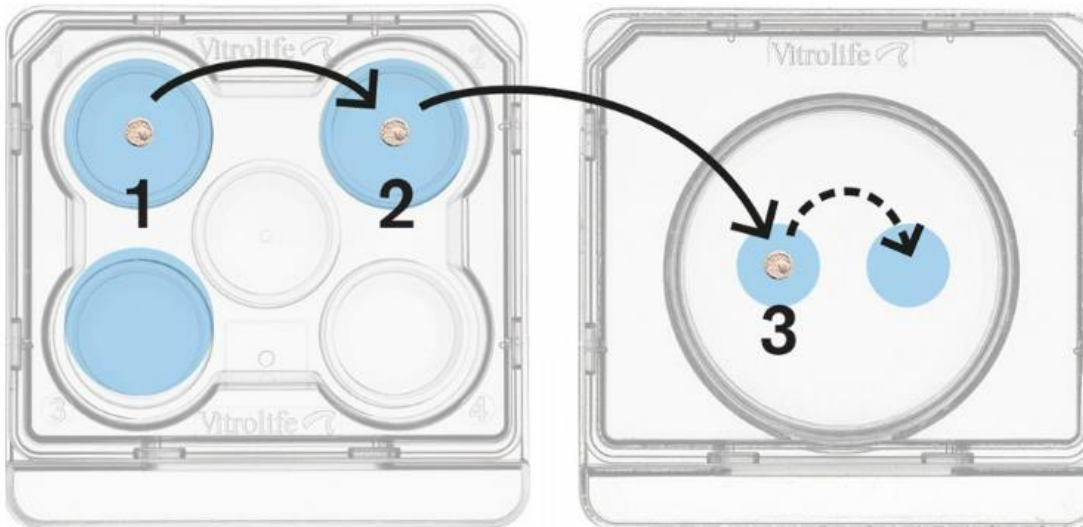
Přeneste embrya z kulturačního média do přípravku Vitri 1™ Cleave a ponechte embrya v tomto roztoku po dobu nejméně 5 min., ale nejdéle 10 minut.

Přemístěte příslušný počet embryí do přípravku Vitri 2™ Cleave. Embrya zůstanou v tomto roztoku po dobu 2 min. Embrya mají tendenci stoupat k hladině a pokud se tak stane, shromážděte je a přemístěte na dno destičky.

Připravte nosič k použití.

Jakmile zbývá 30 sekund, naneste 20μl kapku přípravku Vitri 3™ Cleave na netoxický povrch, nejlépe kulturační destičku. Tento postup umožňuje jednoduché umístění na nosič.

Přeneste embrya do 20μl kapky přípravku Vitri 3™ Cleave a ponechte je v tomto roztoku po dobu 30 sekund. Pro dosažení řádné expozice embryi účinkům roztoku Vitri 3™ Cleave, asi dvakrát až třikrát embrya v kapce přemístěte.



Protokol Vitrolife thawing

RapidWarm™ Blast obsahuje tři roztoky pro rozmrazení vitrifikovaných lidských embryí ve stádiu blastocysty. Roztoky jsou pufovány MOPS. Obsahují gentamicin, který působí jako antibakteriální přípravek, a lidský sérový albumin.

Warm 1™ Blast obsahuje kryoprotektivum sacharózu.

Warm 2™ Blast obsahuje kryoprotektivum sacharózu.

Warm 3™ Blast neobsahuje žádná kryoprotektiva.

Pro použití po ohřevu na teplotu +37 °C.



Rozmrazení:

Umístěte 0,5-1 ml každého z následujících přípravků do samostatných jamek 4jamkové destičky a ohřejte na teplotu 37 °C:

- Warm 1™ Blast
- Warm 2™ Blast
- Warm 3™ Blast

Veškerá manipulace s blastocystami se provádí při teplotě 37 °C (na vyhřívané ploténce).



Protokol Vitrolife thawing

Vyjměte nosič s vitrifikovanými blastocystami ze skladovací kryonádoby. Postupujte podle pokynů pro rozmrazení používaných pro konkrétní nosič.

Okamžitě po rozmrazení přemístěte blastocysty do přípravku Warm 1™ Blast.

Nechte blastocysty uvolnit se z nosiče a klesnout ke dnu. Ponechte v tomto stavu po dobu 2 min.

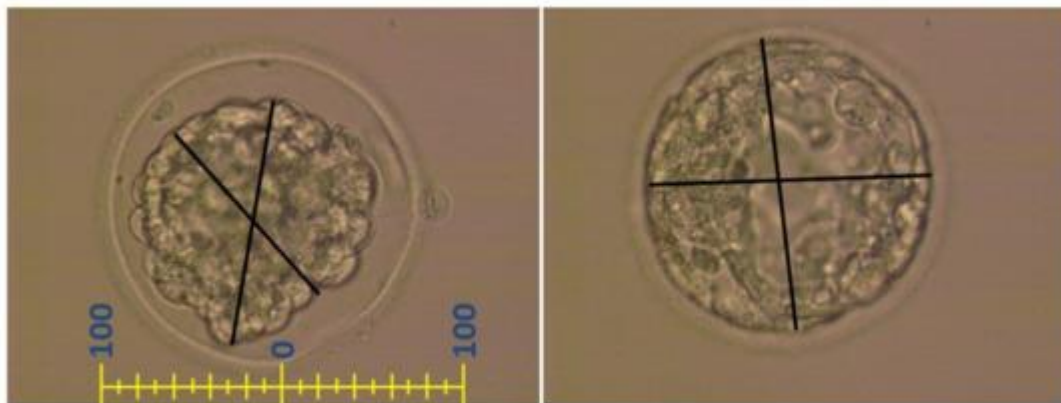
Přeneste blastocysty do přípravku Warm 2™ Blast a ponechte je v tomto roztoku po dobu 3 min.

Přeneste blastocysty do přípravku Warm 3™ Blast a ponechte je v tomto roztoku po dobu 5-10 min.

Několikrát propláchněte blastocysty kultivačním médiem v souladu s běžnými laboratorními postupy. Vitrolife doporučuje pro tento zázrak používat přípravek G-2™ nebo EmbryoGlue®.



Instant warming



T=0

T=2hr

Protokol Vitrolife Warm cleave

Přípravek RapidWarm™ Cleave obsahuje čtyři roztoky pro rozmrazení embryí ve stádiu dělení vitrifikovaných 3. den. Roztoky jsou pufrovány MOPS. Obsahují gentamicin, který působí jako antibakteriální přípravek, a lidský sérový albumin.

Warm 1™ Cleave obsahuje jako kryoprotektivum sacharózu.

Warm 2™ Cleave obsahuje jako kryoprotektivum sacharózu.

Warm 2™ Cleave obsahuje jako kryoprotektivum sacharózu.

Warm 3™ Cleave neobsahuje žádná kryoprotektiva.



Rychle umístěte vitrifikovaná embrya do přípravku Warm 1™ Cleave.

Nechte embrya, aby se přemístila z prostoru zařízení na jeho dno. Ponechte v tomto stavu po dobu **10-30 sekund**.

Přenešte embrya do přípravku Warm 2™ Cleave a ponechte je v tomto roztoku po dobu **1 minuty**.

Přenešte embrya do přípravku Warm 3™ Cleave a ponechte je v tomto roztoku po dobu **2 minuty**.

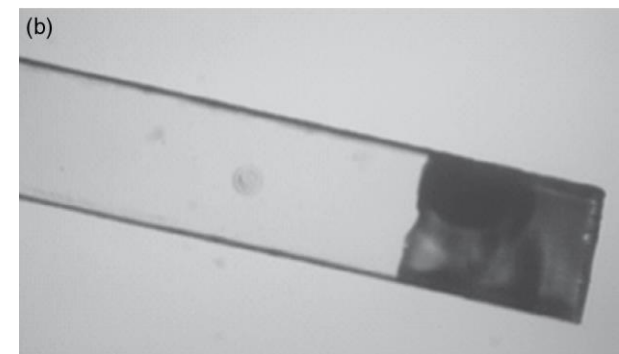
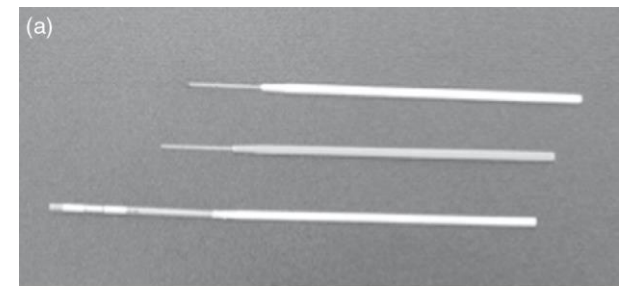
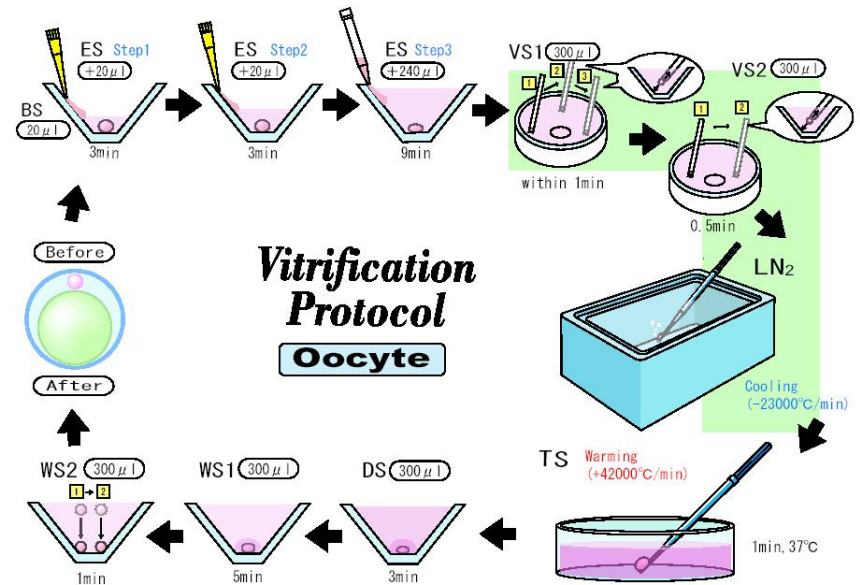
Přenešte embrya do přípravku Warm 4™ Cleave a ponechte je v tomto roztoku po dobu **5 minut**.

Několikrát embrya propláchněte kultivačním médiem v souladu s běžnými laboratorními postupy.



Metody

- Kitazato
- Cryotop/Cryoleaf 0,1 μ l
- Cooling rate 23000 $^{\circ}$ C/min
- Open/closed system
- Složení: EG, DMSO, trehalóza, hydroxypropylceluloza



Protokol Kitazato

Preparation for Vitrification

VT601 KITAZATO VITRIFICATION SOLUTIONS

12 months shelf life



- 0 Vial 1.5 mL of BS (Basic Solution)
- 1 Vial 1.5 mL of ES (Equilibration Solution)
- 2 Vials 1.5 mL of VS (Vitrification Solution)

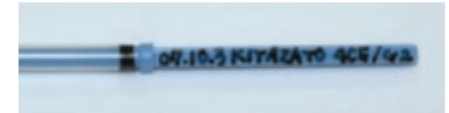
The Repro Plate is a conic-shaped well dish, exclusively designed to follow The Cryotop® Method with comfort. The Repro Plate has high transparency and also offers two slots to support the Cryotop®, allowing those who wish to carry out loading specimens statically.



1. Bring BS, ES and VS to room temperature (25-27°C).

2. Write necessary information about a patient on the handle/straw cap of Cryotop (See Figure 2-1). You can also label them.

Figure 2-1

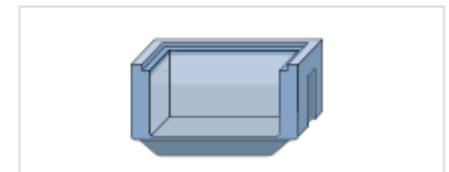


3.

[Cryotop]

Fill 90% of Cooling Rack with fresh liquid nitrogen.

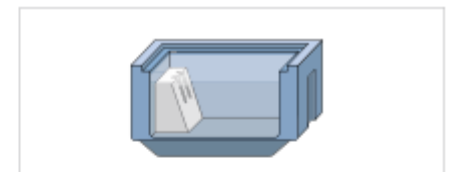
Figure 2-2



[Cryotop SC for closed system]

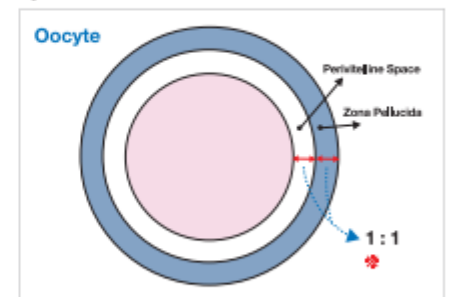
Place Aluminum Block in Cooling Rack SC from the beginning. Then fill with fresh liquid nitrogen until it covers the top of the Aluminum Block (See Figure 2-3).

Figure 2-3



4. Remove the culture dish containing Oocyte or Embryo from the incubator. Check the quality of the Oocyte or the Embryo well with pasteur pipette under the microscope (See Figure 2-4).

Figure 2-4



❖ Compare the width of perivitelline space with thickness of zona pellucida and record it (Ex.1:1). It makes easy to know the completing of the equilibration after immersing in ES.

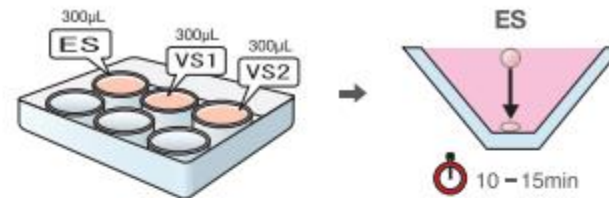
For Oocyte Vitrification, take the cumulus cells off.

Ekvilibrace embryí

1. Nakapejte každých 300 l ES do první jamky, VS do druhé a třetí jamky destičku Repro pomocí pipety.
2. Krok 1: Přeneste Embryo do TOP centra ES z kultivační misky. Začne se spontánně zmenšovat a postupně se vrací původní velikost absorbováním roztoku ES (do 15 minut).

KITAZATO®

Embryo Equilibration



Recommendation

2PN , 4-cell or 8-cell: 10 - 12min
Morula or Blastocyst: 12 - 15min

Embryo Equilibration 1

Write **ES**, **VS1** and **VS2** on the lid of Repro Plate. Gently invert each vial of **ES** and **VS** twice to mix contents. Drop each solution 300µL on the plate using micro pipette (See Figure 3-3). Immediately put the lid on the Repro Plate.

Embryo Equilibration 2

Aspirate the Embryo at the tip of the pasteur pipette (See Figure 3-4). Put the Embryo with minimal volume of medium to the **TOP** center of **ES**.

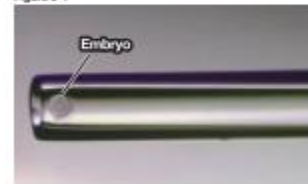
Embryo Equilibration 3 - For 10 - 15minutes

Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps. The Embryo free-falls within 30 seconds. It spontaneously begins to shrink and then gradually returns to its original size with infiltrating **ES**, which indicates that the Equilibration is complete.

Figure 3-3



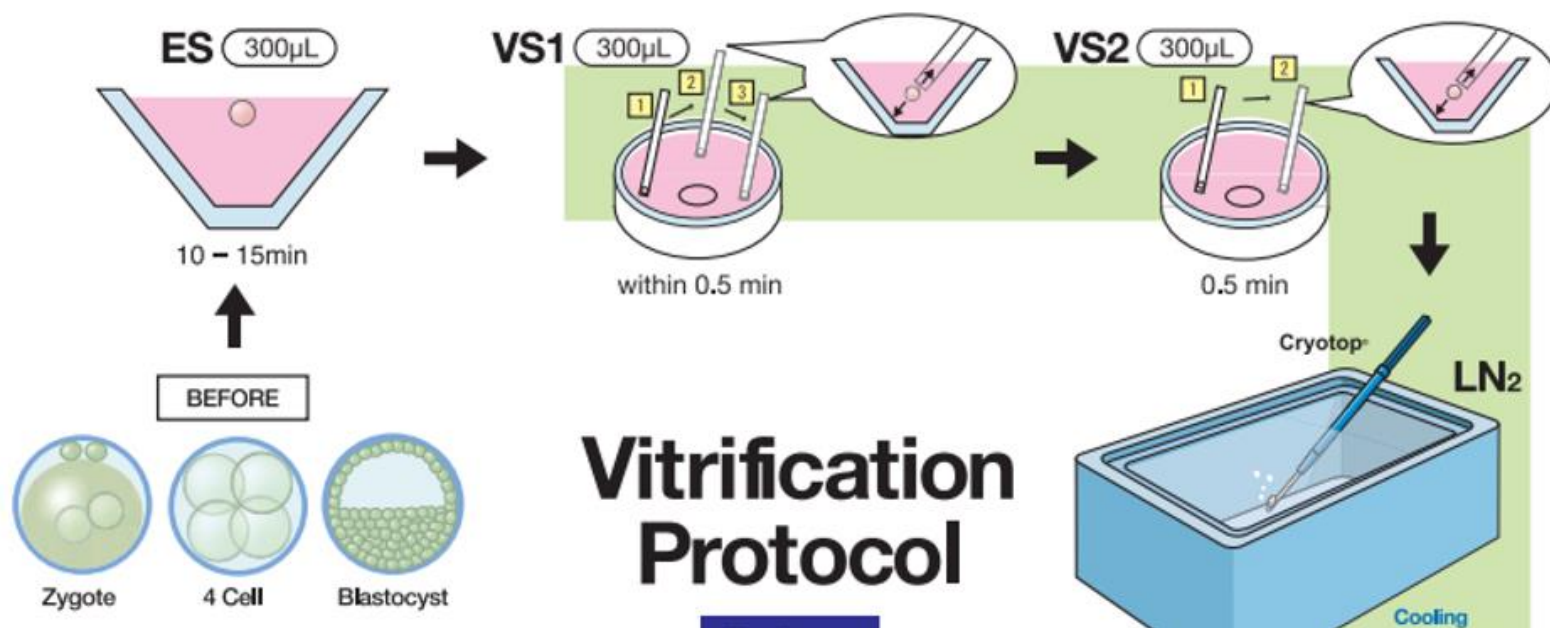
Figure 3-4



Vitrifikace

Upozornění: Měly by být provedeny následující kroky od 1 do 9 mezi 60 a 90 sekundami.

1. Aspirujte oocyt (MII) / embryo z ES špičkou pipety.
2. Step 2: Přeneste oocyt (MII) / embryo do TOP centra VS druhá jamka.
3. Vpichujte oocyty (MII) / embryo pipetou a vyfoukněte je. Opakovat tento proces třikrát, změna pozice ve VS druhé jamky.
4. Přeneste oocyt (MII) / embryo do VS třetí jamky
5. Změňte polohu oocytu (MII) / embrya ve VS třetí jamky s pipetou.
6. Vložte oocyt (MII) / embryo do černé čáry na kryotopu.
7. Vytvořte planární kapičky.
8. Ujistěte se, zda je oocyt (MII) / embryo na kryotopu s minimum objem VS třetí jamky (méně než 0,1 l) pod mikroskopem.
9. Okamžitě přelijte kryotop do tekutého dusíku.
10. Vložte kryotop do hůlky a uložte jej do skladovací nádrže.

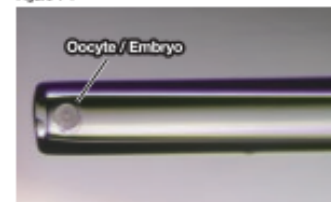




Vitrification 5

Aspirate the shrunk Oocyte (Embryo) in **VS2** at the tip of the pasteur pipette (See Figure 4-4). Place the Oocyte (Embryo) by the black mark of Cryotop sheet with minimal volume (less than 0.1 μ L) of **VS2** (See Figure 4-5a and 4-5b). For more than 2 Oocytes (Embryos), make 1 droplet for each (See Figure 4-6a and 4-6b).

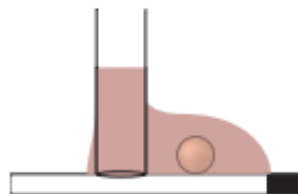
Figure 4-4



Removal of the excess VS on the sheet

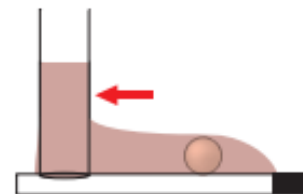
After putting Oocytes (Embryos) on the Cryotop sheet, the excess VS should be removed by aspirating using pipette.

Step 1



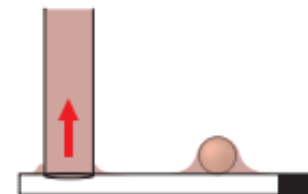
Put the top of the pipette on the bottom end of the big VS drop.

Step 2



Slide the pipette horizontally to outside, and make the VS drop lower.

Step 3



Aspirate the excess VS, and minimize the VS drop (not aspirating oocyte).

Figure 4-5a

Good example



Make a planar droplet by the black mark of Cryotop sheet.

Figure 4-5b

Bad example



Make a steric droplet by the black mark of Cryotop sheet. The volume of VS2 is too much.

Figure 4-6a

Good example

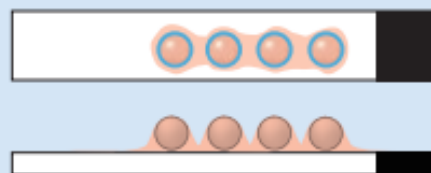
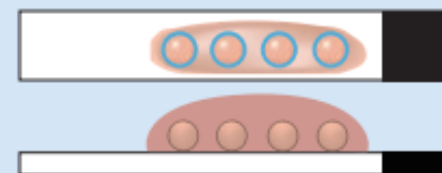


Figure 4-6b

Bad example

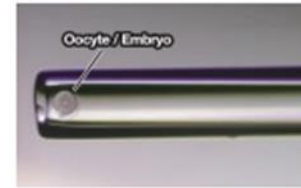


Vitrification

Vitrification 1

After the completion of Equilibration, aspirate the Oocyte (Embryo) in **ES** at the tip of pasteur pipette (See Figure 4-1). Transfer the Oocyte (Embryo) to the **surface** center of **VS1** with minimal volume of **ES**. Blow only the Oocyte (Embryo) out to **VS1**. To avoid getting the remaining **ES** in the pasteur pipette into the **VS1**, blow out the **ES** to the outside of the well. Aspirate fresh **VS1** and blow it out again to the outside of the well. Aspirate fresh **VS1** into the pasteur pipette.

Figure 4-1



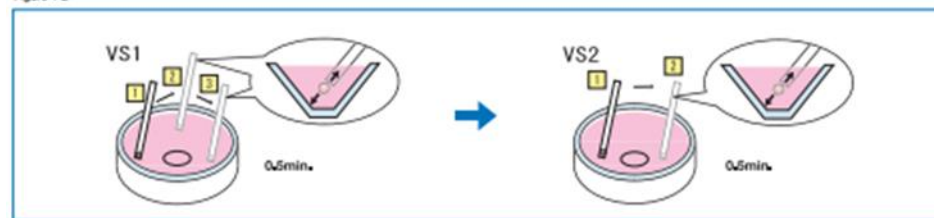
Vitrification 2 - Within 0.5 minute

Aspirate the Oocyte (Embryo) in **VS1** with the pasteur pipette and blow it out to **VS1**. Quickly stir five times around the Oocyte (Embryo). Repeat the aspirating, blowing out and stirring three times changing the positions in **VS1** (See Figure 4-2). Displace the outer solution of the Oocyte (Embryo) to **VS1** completely until the remaining **ES** visually disappears.

Vitrification 3 - Within 0.5 minute

Blow out the remaining **VS1** in the pasteur pipette to the outside of the well. Aspirate fresh **VS2** into the pasteur pipette, and then aspirate the Oocyte (Embryo) in **VS1** at the tip of the pipette. Transfer the Oocyte (Embryo) to **VS2** with minimal volume of **VS1**. Stir around the Oocyte (Embryo) changing positions twice with the pasteur pipette in **VS2** (See Figure 4-2). This step is completed when the outer Oocyte (Embryo) is displaced to **VS** perfectly and the flat shrinking in cause of dehydration is observed.

Figure 4-2

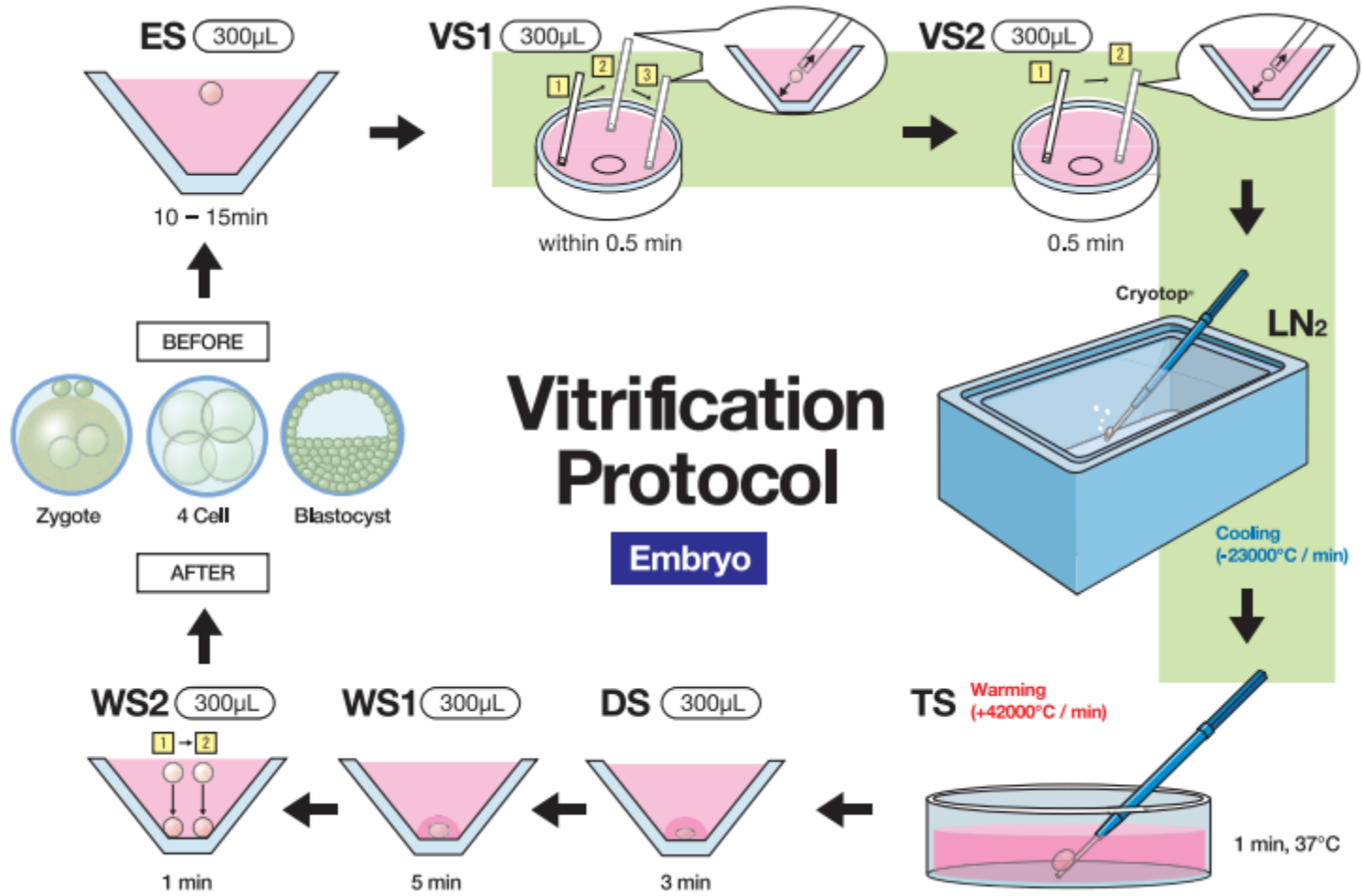


Vitrification 4

Place the Cryotop under a microscope (Logo should be up) and adjust the focus on the black mark of the Cryotop sheet (See Figure 4-3).

Figure 4-3



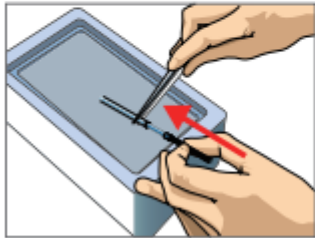


Cryotop® – Open System
Vitrification 6-A



Plunge the Cryotop directly into liquid nitrogen. Hold the straw cap with tweezers and insert the Cryotop from sheet end in liquid nitrogen. Then fit the Cryotop with the straw cap by hands screwing tightly in the air (See Figure 4-7).

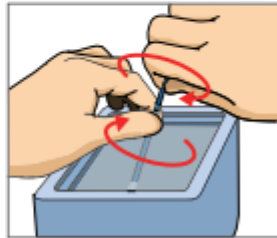
Figure 4-7



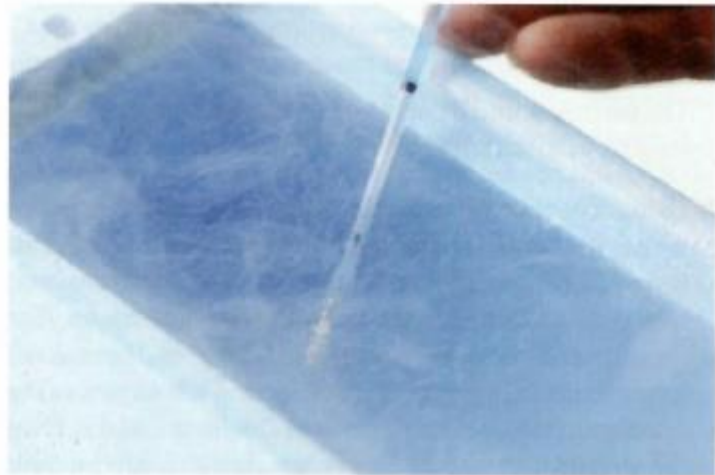
Hold the straw cap with tweezers and insert the Cryotop into it.



Hold the straw cap with fingers and fit it.



Twist it and make sure if the straw cap fits tightly to the Cryotop.



(VLPO011c)

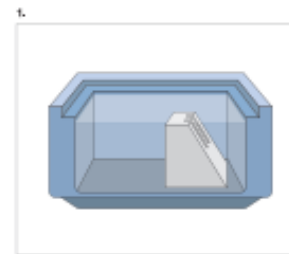
Figure 21.7 Vitrified oocytes on Cryotop in liquid nitrogen with tightly closed cover cap.

Vitrification 6-B

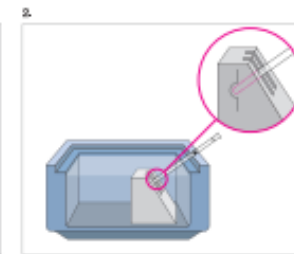


Without direct contact with liquid nitrogen, insert the CryotopSC into the straw cap pre-set at the Aluminum Block. Then seal the straw cap (See Figure 4-8).

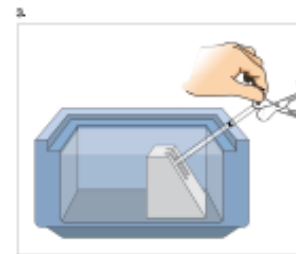
Figure 4-8



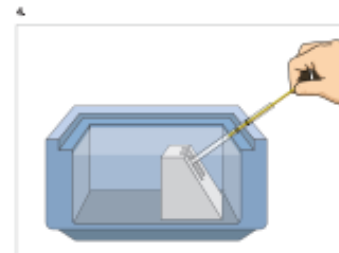
1. Preliminarily, fill liquid nitrogen above the surface of the Aluminum Block in the Cooling Rack and leave it until boiling stops. (About 5 min.)



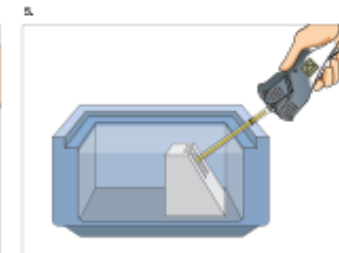
2. Stand the straw cap.



3. Cut the upper black marking point on the straw cap with the Straw Cutter.



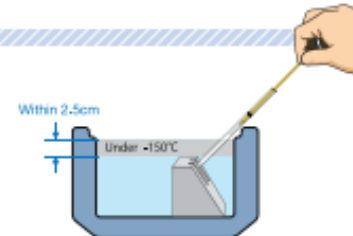
4. Insert the CryotopSC in the straw cap.



5. Seal the upper part of the straw cap with the Sealer.

POINT

Lean the upper part of the straw cap against the Cooling Rack. This positioning avoids influence of cool air from liquid nitrogen.



Thawing Kitazato

Složení:

- HEPES
- Trehalóza
- Hydroxypropylceluloza
- gentamicin



1. Warm **TS** vial (sealed) with a Petri Dish in an incubator to 37°C(>1.5hours).

2. Bring **DS** and **WS** to room temperature (25~27°C).

3. Retrieve the cane which has the specific Cryotop, quickly immerse the cane in a Cooling Rack filled with fresh liquid nitrogen. Retrieve the specific Cryotop from the cane in the liquid nitrogen. Check the information about the patient on the label of Cryotop.



4. Write **DS**, **WS1** and **WS2** on the lid of a Repro Plate. Gently invert each vial of **DS** and **WS** twice to mix contents. Drop 300µL each for **DS**, **WS1** and **WS2** on the Repro Plate with micro pipette. Place it on the microscope stage and lid it.

Remove **TS** vial and the Petri Dish from the incubator and place the Petri Dish on the microscope stage. Gently invert the vial of **TS** twice to mix contents and pour the full contents into the Petri Dish (See Figure 2-1).

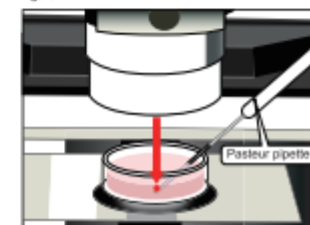
Figure 2-1



5. Adjust the focus of the microscope to the Petri Dish with **TS**.

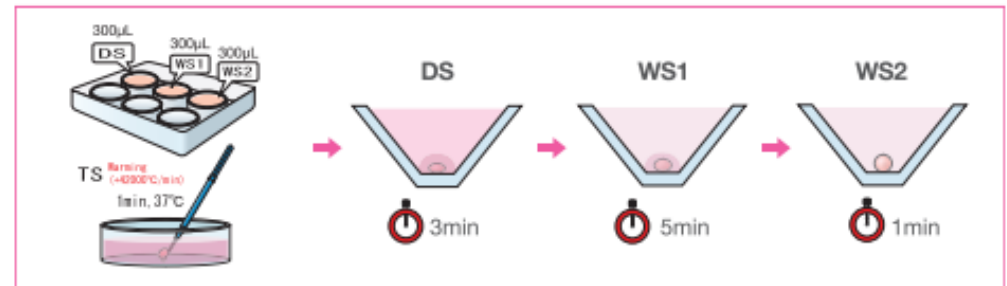
Use pasteur pipette in order to focus easily on the center of the Petri Dish (See Figure 2-2).

Figure 2-2



Thawing Kitazato

Cryotop® - Open System



Příprava • V teplé lahvičce s TS (uzavřená) Petriho miskou v inkubátoru při 37 ° C (1.5 hodin). • Nalijte celý obsah TS do Petriho misky. • Ohřejte DS a WS na pokojovou teplotu (doporučeno 23-27 ° C). • Vstříkejte každých 300 l DS do první jamky, WS do druhé a třetí jamky Repro Plate s pipetou. Upozornění: Jako manipulační nástroj používejte sterilizovanou pipetu s vhodným vnitřním průměrem pro oocyty nebo embrya. Doporučené vnitřní průměry jsou: 180 um pro oocyty (MII), 180 um pro embrya v zárodečném stadiu a 250 um pro embrya štěpení nebo blastocysty.

Rozmrazování Krok 1: Cryotopový proužek rychle ponořte úplně do TS. Odejít to po dobu 1 minuty. Krok 2: Pipetou jemně aspirujte oocyt (MII) / embryo umístěte jej na BOTTOM DS. Nechte to 3 minuty. Krok 3: 1. Pipetujte oocyt (MII) / embryo pipetou a opatrně jej vložte na BOTTOM WS druhé jamky. Nechte to 5 minut. 2. Pipetou napipetujte oocyt (MII) / embryo, jemně jej vložte vrchol WS třetí studny. Poté, co oocyt (MII) / embryo klesne na v dolní části WS třetí jamky, opakujte tento postup ještě jednou. 3. Přeneste oocyt (MII) / embryo do kultivační misky obsahující vhodné kultivační médium. Inkubujte oocyt (MII) / embryo do a 37 ° C inkubátor pro dokončení regenerace. Upozornění 1: Doporučuje se inkubovat oocyty (MII) a embrya 2 hodiny. Upozornění 2: Omyjte embrya a inkubujte embrya pro zotavení v vhodná média, aby se zabránilo WS třetí studny přenesené v těle pacienta.

Thawing 1

Carefully twist and remove the straw cap from the Cryotop in liquid nitrogen (See Figure 3-1). Prop it against the corner of the Cooling Rack.

Thawing 2

Be ready to use pasteur pipette keeping the Cryotop in liquid nitrogen. Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps.

Thawing 3 - For 1 minute

Quickly immerse Cryotop sheet into TS on the microscope stage. It should be within 1 second (See figure 3-2). Find the Oocyte (Embryo) adjusting the focus on the black mark of the Cryotop sheet. 1 minute after immersing into TS, gently aspirate the Oocyte (Embryo) with the pasteur pipette after dispensing it from the sheet. Aspirate the Oocyte (Embryo) even if it does not dispense from the sheet. Also, aspirate TS until the Oocyte (Embryo) reaches 2mm from the tip of the pasteur pipette (See Figure 3-3).

Figure 3-1



Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps.

Figure 3-2

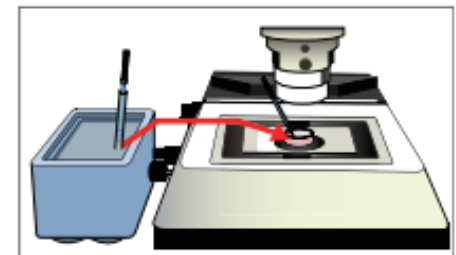
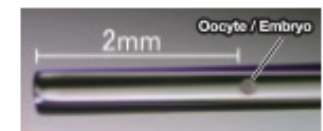


Figure 3-3

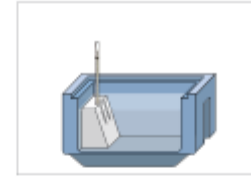


Twahing kitazato

Cryotop® SC Closed System.

Thawing 1

Stand the CryotopSC on the Aluminum Block.

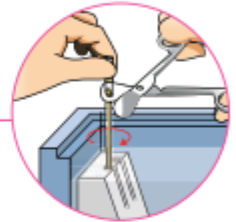
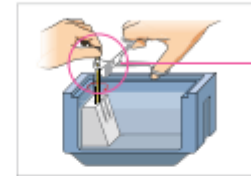


Thawing 2

Cut the marking point with Straw Cutter.

Put the cutting blade at the black marking point.

Turn the straw cap slowly to cut.



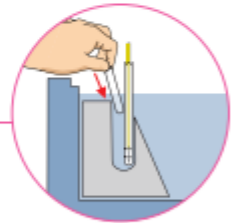
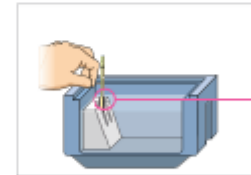
Thawing 3

Be ready to use pasteur pipette keeping the CryotopSC in liquid nitrogen. Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps.

Thawing 4

Insert the cut piece of the straw cap into the space between the CryotopSC and the Aluminum Block.

This is to take out the CryotopSC easier.



Thawing 5 – For 1 minute

Quickly immerse the CryotopSC sheet into **TS** on the microscope stage by transferring it linearly. It should be within 1 second (See Figure 3-4). Find the Oocyte (Embryo) adjusting the focus on the black mark of the Cryotop sheet. 1 minute after immersing into **TS**, gently aspirate the Oocyte (Embryo) with the pasteur pipette after dispensing it from the sheet. Aspirate the Oocyte (Embryo) even if it does not dispense from the sheet. Also, aspirate **TS** until the Oocyte (Embryo) reaches 2mm from the tip of the pasteur pipette (See Figure 3-5).

Figure 3-4

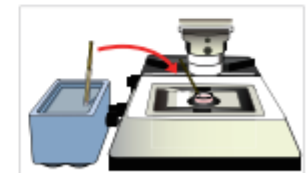
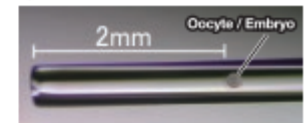


Figure 3-5



[Cryotop Embryo Vitrification Animation \(youtube.com\)](https://www.youtube.com)

[Kitazato Vitrification Method - Kitazato IVF \(kitazato-ivf.com\)](http://kitazato-ivf.com)

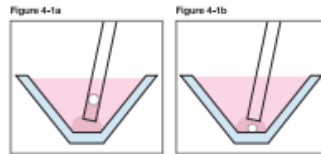
Thawing

PART 4

Dilution

Dilution - For 3 minutes

Blow out only **TS** in the pasteur pipette into the **BOTTOM** center of **DS** slowly (See Figure 4-1a), then gently place the Oocyte (Embryo) on the bottom of the **TS** layer (See Figure 4-1b). Leave it for 3 minutes. This is for mostly gradual displacement from **TS** to **DS**.



PART 5

Washing

Washing 1 - For 5 minutes

3 minutes later, after immersing into **DS**, gently aspirate the Oocyte (Embryo) in **DS** with the pasteur pipette. Also, aspirate **DS** until the Oocyte (Embryo) reaches 2mm from the tip of the pasteur pipette (See Figure 5-1).

Figure 5-1



Blow out only **DS** in the pasteur pipette into the **BOTTOM** center of **WS1** slowly (See Figure 5-2a), then gently place the Oocyte (Embryo) on the bottom there (See Figure 5-2b). Leave it for 5 minutes. This is also for mostly gradual displacement from **DS** to **WS1**.

Figure 5-2a

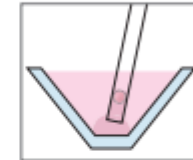
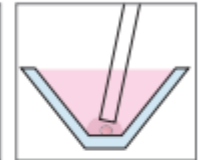


Figure 5-2b



Washing 2 - For 1 minute

5 minutes later, after immersing into **WS1**, aspirate the Oocyte (Embryo) with minimal volume of **WS1** with pasteur pipette (See Figure 5-3) and transfer it to the **TOP** center of **WS2**. After the Oocyte (Embryo) free-falls to the bottom of **WS2**, do the same work again in **WS2** (See Figure 5-4).

Figure 5-3

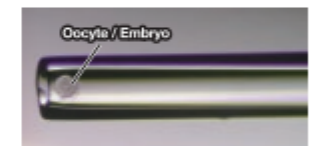
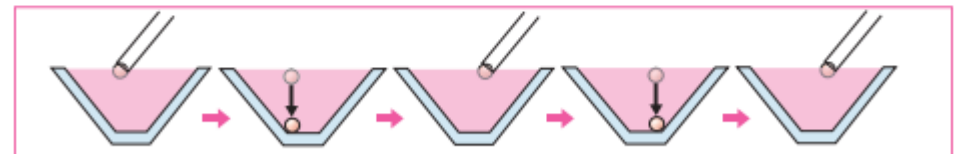


Figure 5-4



Washing 3

Transfer the Oocyte (Embryo) to a culture dish containing the appropriate culture medium. Incubate the Oocyte (Embryo) in a 37°C incubator to complete recovery.

Completion of recovery : Oocyte (Embryo) for 2 hours for recommendation.

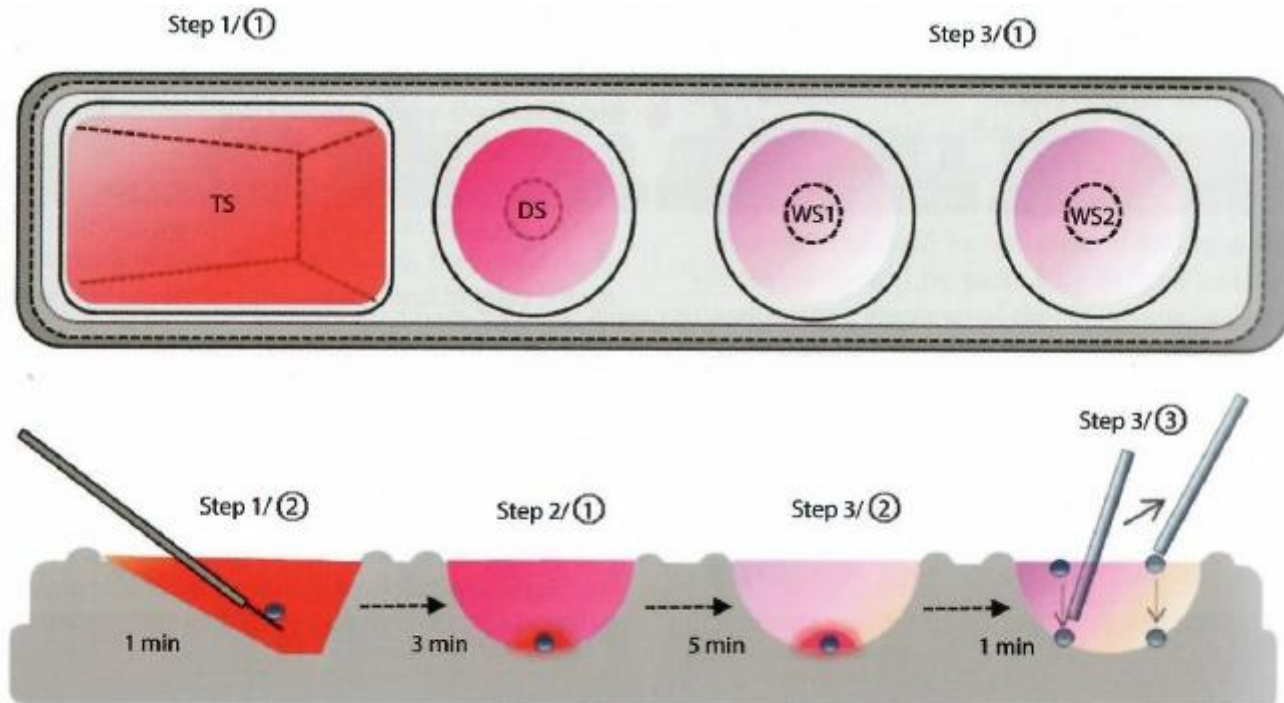
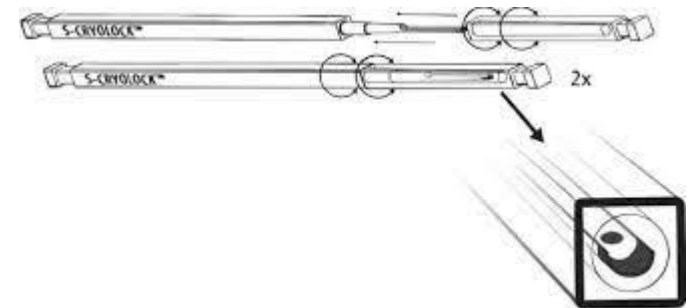


Figure 21.8 Warming plate and warming procedure of the Cryotec method. *Abbreviations:* DS, dilution solution; TS, thawing solution; WS1, washing solution 1; WS2, washing solution 2.

Metody

- Cryolock
- 23 000 °C/min
- Sage (Cooper)
- Open systém
- 2ul



A. Metoda mikrokapek



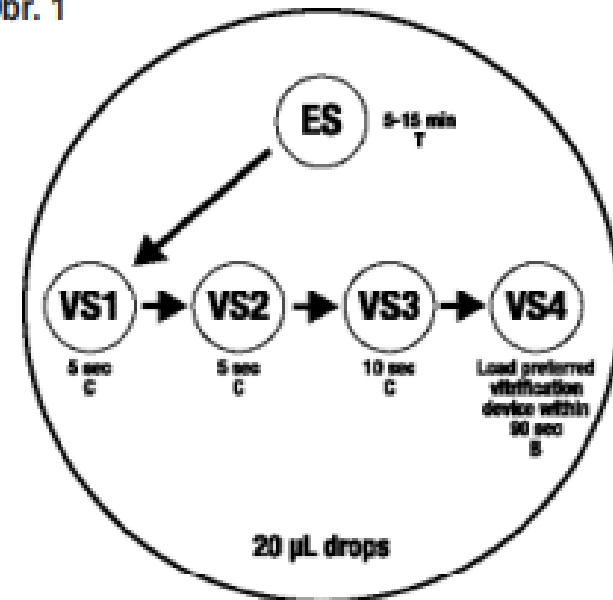
Před použitím několikrát opatrně obraťte ampulky s roztoky ES a VS, abyste zajistili dobré promíchání obsahu.

Opatrně přemístěte embryo (embrya) (ne více než dvě v jedné proceduře) s minimálním množstvím kultivačního média do horní části kapky ES, a spusťte časovač. Nechte blastocysty, aby v průběhu volného pádu v kapce ES po dobu 5 až 15 minut dosáhly rovnovážného stavu. Embryo (embrya) se zmenší a potom postupně znovu rozšíří do své původní velikosti, což bude naznačovat, že dosažení rovnovážného stavu je kompletní.

V průběhu stavu vyrovnávání v ES připravte 4 x 20 µl kapky roztoku VS, jak je ukázáno na obr. 1.

Následující kroky musí být provedeny za 90–110 sekund.

Obr. 1



LEGENDA:

ES=Equilibration Solution (vyrovnávací roztok)

VS=Vitrification Solution (vitrifikační roztok)

➔ = přenos embrya do další kapky

T = horní část kapky

C = střed kapky

B = spodní část kapky

A. Metoda mikrokapek

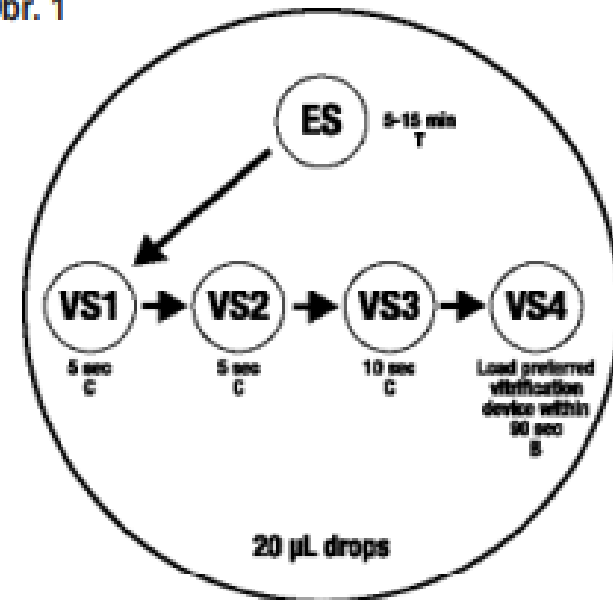
Po dosažení rovnovážného stavu v roztoku ES natáhněte část roztoku ES do přenosové pipety a na 5 sekund přeneste embryo (embrya) s minimálním objemem z kapky roztoku ES do středu první kapky roztoku VS (VS1). Na dobu 5 sekund rychle přeneste embryo (embrya) z první kapky roztoku VS do středu druhé kapky roztoku VS (VS2). Následně na dobu 10 sekund přeneste embryo (embrya) z VS2 do středu třetí kapky roztoku VS (VS3). Nakonec přeneste embryo (embrya) z VS3 do spodní části čtvrté kapky roztoku VS (VS4).

U procesu vitifikace postupujte podle pokynů uvedených pro nosič, který chcete použít. Z kapky VS4 opatrně přeneste embryo (embrya) v < 1 μ l roztoku VS do vitrifikačního zařízení, které chcete použít, postupujte podle pokynů uvedených v návodu k použití pro nosič, který chcete použít.

Nezapomeňte: Doba mezi prvním umístěním embrya (embryí) do roztoku VS (VS1) a ponořením do kapalného dusíku by neměla přesáhnout dobu, kterou jste pro tento postup stanovili jako optimální, zcela jistě by neměla být delší než 110 sekund (viz



Obr. 1



LEGENDA:

ES= Equilibration Solution (vyrovnávací roztok)

VS= Vitrification Solution (vitřifikační roztok)

→ = přenos embrya do další kapky

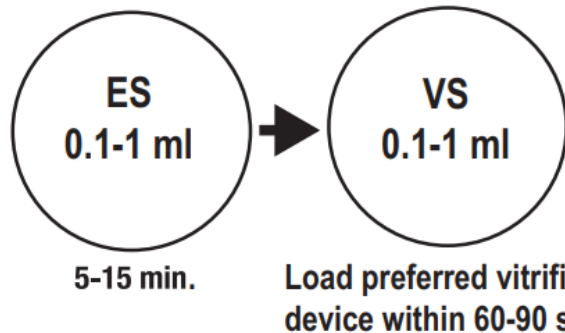
T = horní část kapky

C = střed kapky

B = spodní část kapky

B – Metoda 4well misky

Připravte vícejamkovou destičku kápnutím 1 ml roztoku ES do jamky 1 a 1 ml roztoku VS do jamky 2 (viz níže uvedený obr. 2). Vyndejte kultivační misku s embryem (embryi) z inkubátoru a zkontrolujte kvalitu embryí. Kdykoli je to možné, používejte pro vitifikaci pouze nejvyšší rozšířená embrya.

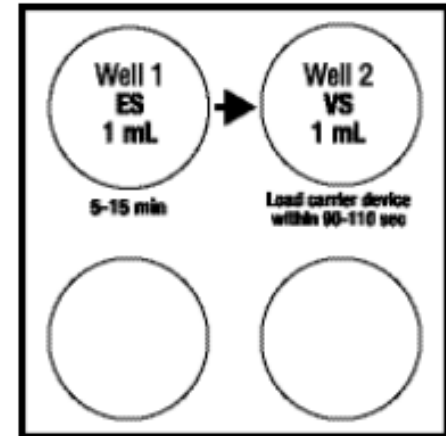


KEY:
 ES= Equilibration Solution
 VS= Vitrification Solution
 → = Transfer to next well

Opatrně přemístěte embryo (embrya) (ne více než dvě v jedné proceduře) s minimálním množstvím kultivačního média do horní části jamky 1 obsahující roztok ES, a spusťte časovač. Nechte embryo (embrya), aby v průběhu volného pádu v roztoku ES po dobu 5 až 15 minut dosáhly rovnovážného stavu. Embryo (embrya) se zmenší a potom postupně znovu rozšíří do své původní velikosti, což bude naznačovat, že dosažení rovnovážného stavu je kompletní.

Po dosažení rovnovážného stavu v roztoku ES natáhněte část roztoku ES do přenosové pipety a přeneste embryo (embrya) s minimálním objemem z jamky s roztokem ES do středu jamky s roztokem VS.

Embryo (embrya) v roztoku VS mírným kroužením trvajícím 20-30 sekund promíchejte, aby se s roztokem VS řádně spojilo. U procesu vitifikace postupujte podle pokynů uvedených pro nosič, který chcete použít. Opatrně přeneste blastocystu (blastocysty) v < 1 µl roztoku VS do vitrificačního zařízení, které chcete použít, postupujte podle pokynů uvedených v návodu k použití pro nosič, který chcete použít.



LEGENDA:
 ES=Equilibration Solution (vyrovňovací roztok)
 VS=Vitrification Solution (vitřifikační roztok)
 → = přenos embrya do další jamky

Zygote, embryo and blastocyst protocol



A. Metoda mikrokapek warming

Popis produktu	REF číslo
1,0 M Sucrose Warming Solution	ART-8030-A
0,5 M Sucrose Warming Solution	ART-8030-B
MOPS Solution	ART-8030-C

Proces zahřívání a ředění musí probíhat při 35–37 °C. Pro následující postupy použijte vyhřívaný stolek mikroskopu. V průběhu inkubace v zahřívacím roztoku minimalizujte vystavení vzorků světlu. Před použitím roztoky vytemperujte na teplotu 35–37 °C.

Připravte obrácené víčko Petriho misky aseptickým kápnutím jedné 20 µl kapky roztoku 1M WS a dvou 20 µl kapek roztoku 0,5M WS (viz obr. 1 vpravo). Tři 20 µl kapky roztoku MS budou připraveny později v kroku 12.

Postupujte podle pokynů k použití přiložených k nosiči týkajících se okamžitého (do 2 sekund) ponoření nosiče do kapky roztoku 1M WS poté, co byl vytažen ze svého ochranného obalu. Embryo (embrya) vyplave z nosiče do roztoku 1M WS. Embryo (embrya) v roztoku nechte po dobu jedné minuty. Embryo (embrya) se zmenší a vyplave do vrchní části kapky.

Do přenosové pipety natáhněte část roztoku 0,5M WS a na dobu 2 minut přeneste embryo (embrya) z kapky roztoku 1M WS s minimálním objemem do spodní části první kapky roztoku 0,5M WS. Následně na dobu 2 minut přeneste embryo (embrya) do spodní části druhé kapky roztoku 0,5M WS.

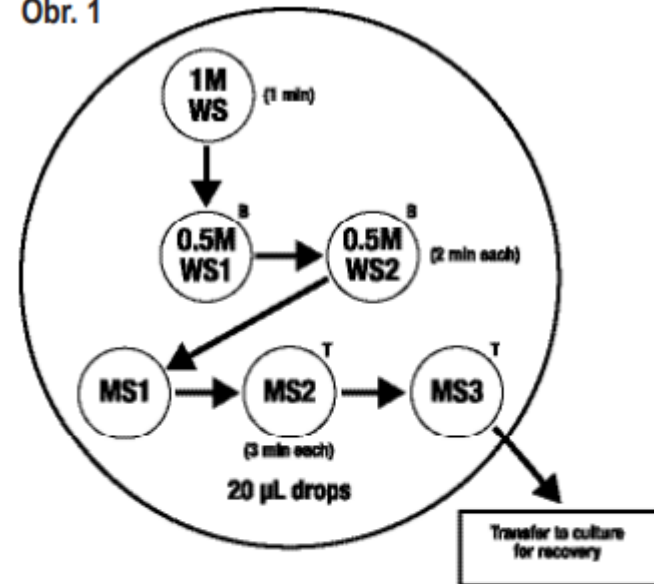
Na dobu 3 minut přeneste embryo (embrya) do spodní části první kapky roztoku MS (MS1).

Následně na dobu 3 minut přeneste embryo (embrya) do horní části druhé kapky roztoku MS (MS2).

Na dobu 3 minut přeneste embryo (embrya) do horní části třetí kapky roztoku MS (MS3). Nakonec přeneste embryo (embrya) do misky s médiem, které bylo předem uve-



Obr. 1



LEGENDA:

1M WS = 1 M Sucrose Warming Solution

0.5M WS = 0,5 M Sucrose Warming Solution

MS = MOPS Solution

➔ = přenos embrya do další kapky

T = horní část kapky

B = spodní část kapky

A. Metoda 4well warming

Popis produktu	REF číslo
1,0 M Sucrose Warming Solution	ART-8030-A
0,5 M Sucrose Warming Solution	ART-8030-B
MOPS Solution	ART-8030-C

Postupujte podle pokynů k použití příložených k nosiči týkajících se okamžitého (do 2 sekund) ponoření nosiče do jamky 1 obsahující roztok 1M WS poté, co byl vytažen ze svého ochranného obalu. Embryo (embrya) vyplave z nosiče do roztoku 1M WS.

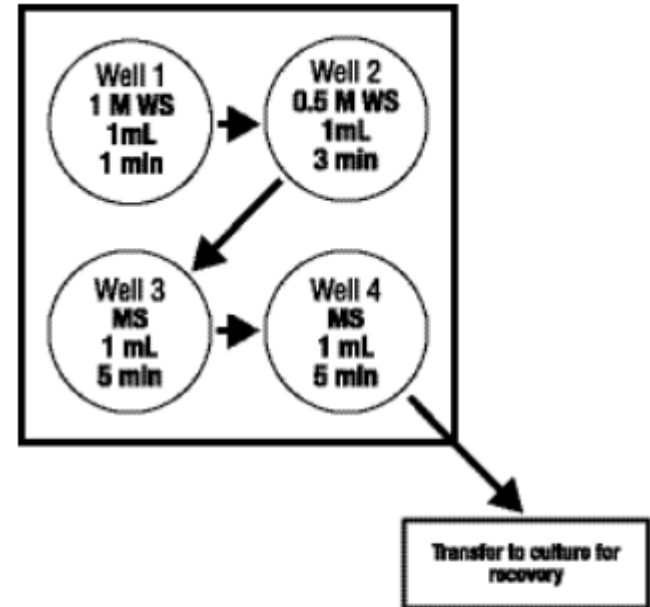
Embryo (embrya) v roztoku nechte po dobu **jedné minuty**. Embryo (embrya) se zmenší a vyplave do vrchní části jamky.

Do přenosové pipety natáhněte část roztoku 0,5M WS a na dobu **3 minut** přeneste embryo (embrya) z jamky 1 do jamky 2 obsahující 1 ml roztoku 0.5M WS.

Následně na dobu **5 minut** přeneste embryo (embrya) do horní části jamky 3 obsahující 1 ml roztoku MS.

Potom na dobu **5 minut** přeneste embryo (embrya) do horní části jamky 4 obsahující 1 ml roztoku MS.

Nakonec přeneste embryo (embrya) do misky s médiem, které bylo předem uvedené do rovnovážného stavu a inkubujte v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 3–4 hodin, aby před další manipulací a/ nebo přenosem došlo k dalšímu obnovení.



LEGENDA:

1M WS = 1 M Sucrose Warming Solution

0.5M WS = 0,5 M Sucrose Warming Solution

MS = MOPS Solution

➔ = přenos embrya do další jamky



Transfer to preferred culture media for recovery

Manuálně náročná procedura – pozor na warming

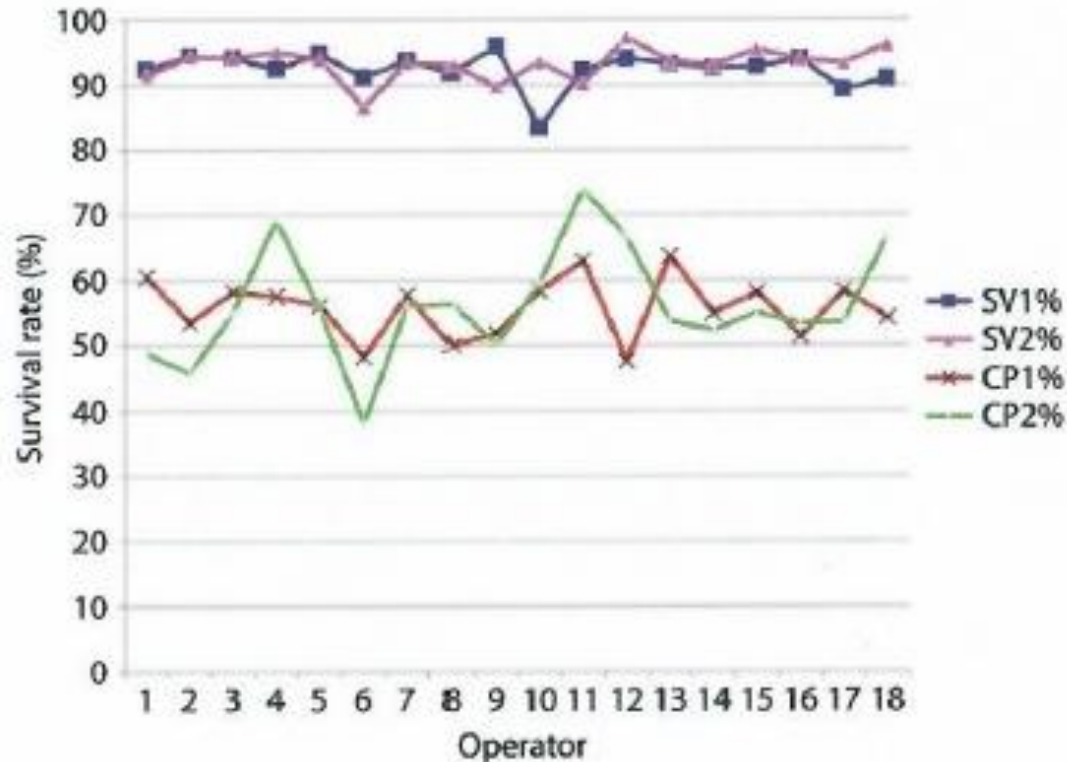


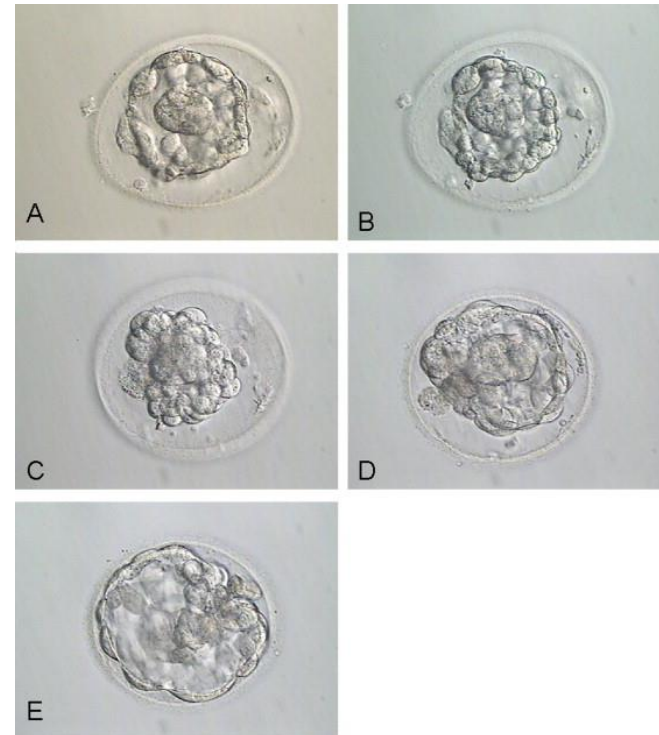
Figure 24.8 Survival and clinical outcomes according to the operator. *Abbreviations:* SV1% and CP1%, survival and clinical pregnancy rates for the person doing the vitrification procedure. SV2% and CP2%, survival and clinical pregnancy rates for the person doing the warming procedure.

Kryoembryotransfer

- elective ET – pouze jedno embryo transferováno všechna další dobrá jsou vitrifikována
- po rozmražení je vhodné přesvědčit se zda embryo přežilo mražení
- viditelná reexpanze je důkazem viability po mražení

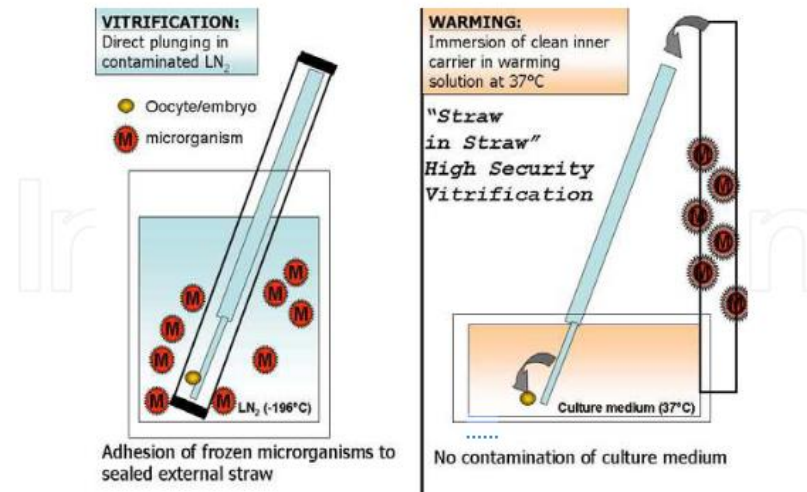
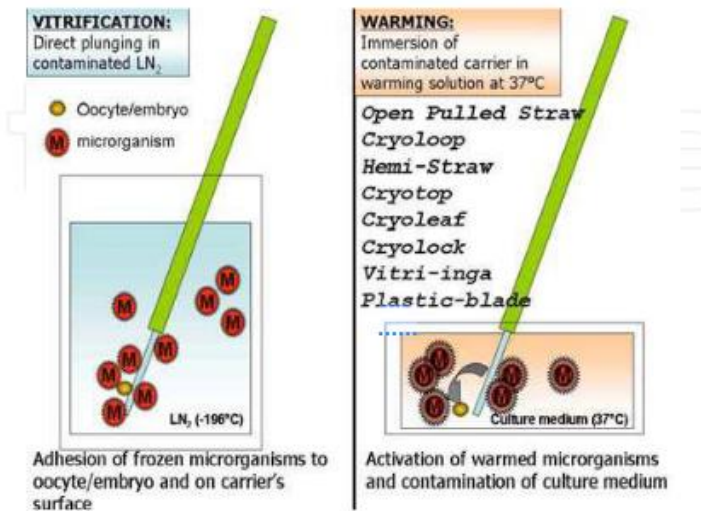
Morfologické změny zmražených blastocyst po rozmražení a post-rozmražené kultuře.

- (A) zmrazená blastocysta ihned po rozmražení
- (B) blastocysta se začíná zmenšovat v 0,5 mol/l sacharózy
- (C) blastocysta se po další dehydrataci po dobu 10 minut pevně zmenšila v 0,2 mol/l sacharózy
- (D) blastocysta se začíná znovu expandovat po 1 hodině kultivace in vitro
- (E) blastocysta s >50% reexpanzí blastokély po 2 hodinách in vitro kultivace před ET
Původní zvětšení $\times 400$.



Open x closed system

- otevřený systém je efektivnější – u vitrifikace oocytů významné
- hrozí kontaminace vzorku patogeny v dusíku
- uzavřený systém nulové riziko kontaminace
- horší manipulace
- horší výsledky po rozmražení



Open-closed system

Table 6.1 A Review of the Main Open and Closed Vitrification Devices

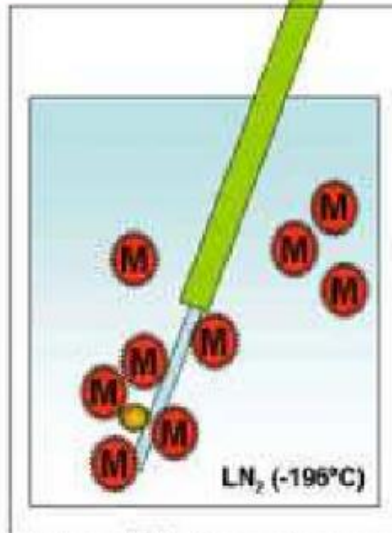
Device		Volume (μL)	Cooling rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Warming rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
<i>Open devices</i>				
Cryotop	Flat strip	<0.1	23,000	>25,000
Hemi-straw	Small gutter	0.3	>20,000	>25,000
Cryoloop	Nylon loop	<0.1	>20,000	>25,000
Cryoleaf	Flat strip	1	23,000	>25,000
Cryolock	Flat strip	1	>20,000	>25,000
Vitri-inga	Hole	1	20,000	>25,000
Open pulled straw	Mini-straw	1	16,700	<20,000
Fiber plug	Hook	>1	10,000	>25,000
<i>Closed devices</i>				
0.25-ml. straw	Straw	25–100	<2500	–1300
Vitrisafe	Small gutter	0.3	1300	>25,000
HSV	Small gutter	0.5	2000	>25,000
Rapid-i	Hole	0.05	1200	>25,000
Cryotip	Mini-straw	1	12,000	<20,000
Cryopette	Mini-straw	1	23,700	<20,000
Ultravit	Quartz glass microcapillary	0.5	Unpublished	Unpublished

Riziko kontaminace – otevřený systém

VITRIFICATION:

Direct plunging in contaminated LN₂

- Oocyte/embryo
- M microorganism



Adhesion of frozen microorganisms to oocyte/embryo and on carrier's surface

WARMING:

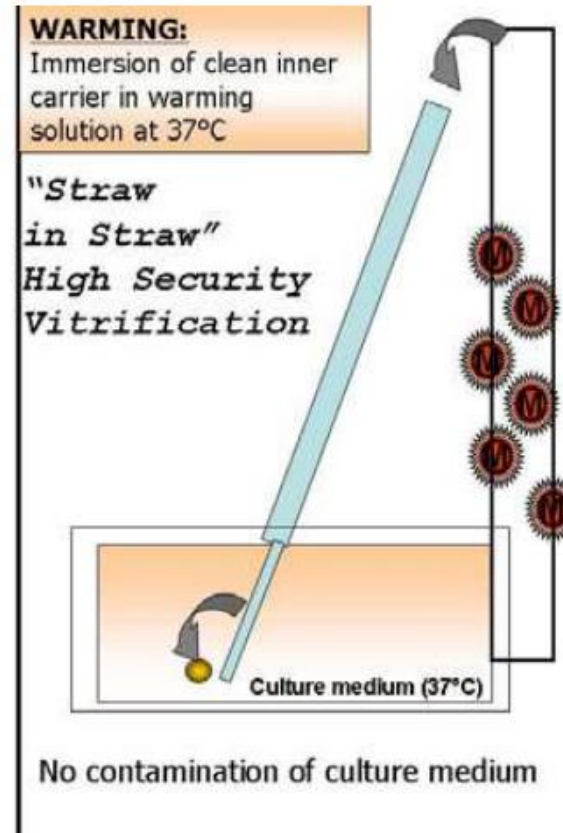
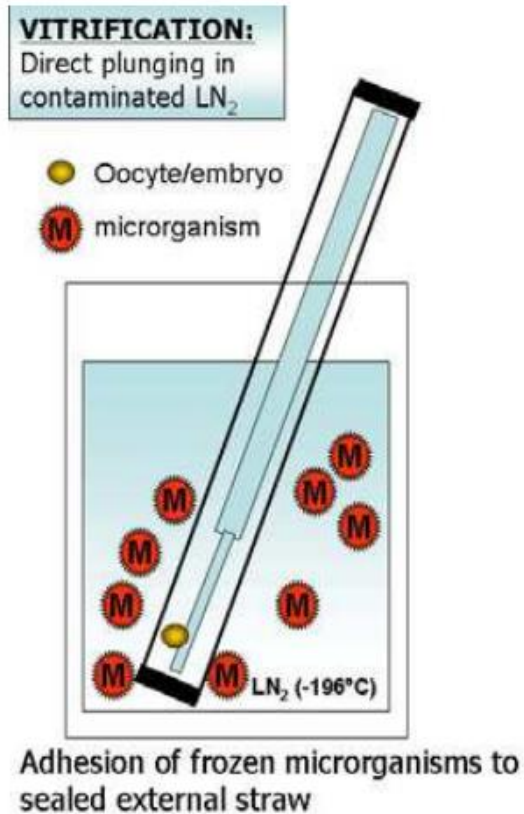
Immersion of contaminated carrier in warming solution at 37°C

Open Pulled Straw
Cryoloop
Hemi-Straw
Cryotop
Cryoleaf
Cryolock
Vitri-inga
Plastic-blade



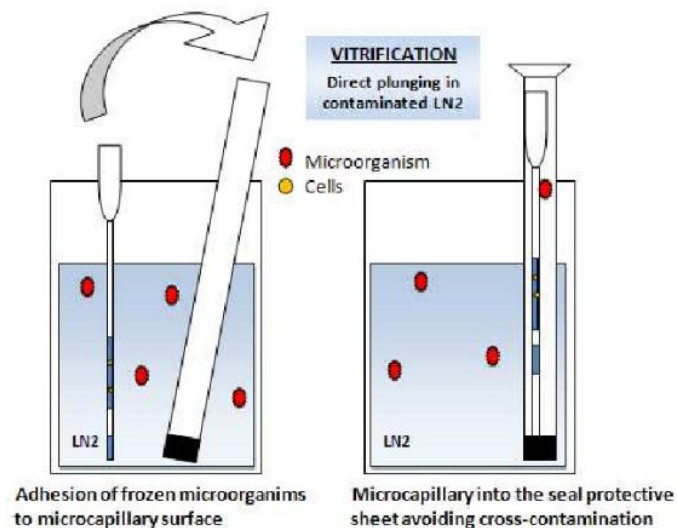
Activation of warmed microorganisms and contamination of culture medium

Riziko kontaminace – uzavřený systém



Semi-closed system

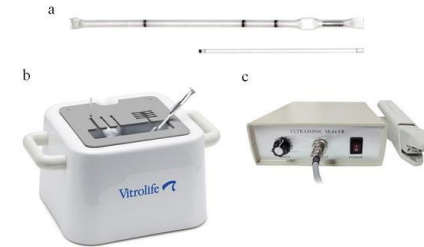
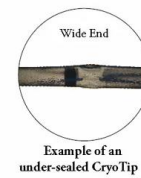
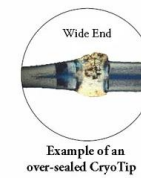
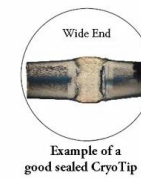
- teoreticky každý closed systém může být semi-closed systém
- zamražení přímo v dusíku, tedy s vysokým cooling rate, ale skladování individuálně v uzavřených zatavených pejetách
- minimalizace křížové kontaminace mezi vzorky, ale nelze vyloučit kontaminaci vzorku patogeny v tekutém dusíku



Riziko kontaminace I.

- kryokonzervace může, ale nemusí snížit životaschopnost patogenů v kapalném dusíku
- kapalný dusík ale i plynný dusík (!) mohou působit jako vektor a mohou přenášet patogeny mezi vzorky
 - odběr spermatu není sterilní zákrok
 - oocyty jsou během odběru kontaminovány krví
 - nádoby jsou nevhodně utěsněné nebo uzavřené nehermetickými metodami
 - vnější povrch slávek a kryozkumavek je vždy kontaminován
 - skladovací nástroje (kanystry, držáky, peany) nejsou sterilizovány
 - získaný sterilní LN₂ obvykle není přepravován za aseptických podmínek, a proto jej nelze považovat za sterilní
 - kontaminované vzorky (spermie, oocyty) nelze zcela dekontaminovat
 - ve většině IVF laboratoří nejsou Dewarovy nádoby pravidelně dekontaminovány.

Riziko kontaminace II.



- jediná bezpečná metoda uzavření je tepelné svařování
- tepelné svařování je náročný postup a výsledek závisí na mnoha faktorech, včetně materiálu, tloušťky stěny a průměru slámky, teploty, síly tlaku a délky ohřevu - nedostatečné či rozsáhlé tavení může mít za následek netěsnosti
- v kapalném dusíku se vyskytují patogeny a spory plísní
- nůžky pro stříhání slámek jsou nesterilní
- nádoby na dolévání nejsou sterilní
- všichni pacienti bez výsledku serologií jsou uloženi v karanténě
- je nutné oddělovat všechny infekční pacienty od pacientů serologicky negativních – samostatné uložení



Riziko kontaminace III.

- **nebyl zaregistrován žádný** případ přenosu patogenu mezi vzorky v asistované reprodukci
- **nebyla hlášena žádná infekce** připisovaná přenosu během kryokonzervace reprodukčních buněk
- **nebyl hlášen žádný přenos infekce** v důsledku IVF u lidí ani u zvířat
- neexistují žádné důkazy o tom, že by reprodukční vzorky, včetně spermií, vajíček nebo embryí, **mohly zadržovat jakékoli patogeny** přenášené krví v době, kdy jsou kryokonzervovány

Vysvětlení: prahová úroveň potřebná ke způsobení klinické infekce je v ženské reprodukční soustavě vysoká (pravděpodobně jako přirozená ochrana proti infekčním agens, které se hojně vyskytují ve spermatu), postupy promývání a ředění v ART ředí infekční agens tak, že již jej nelze považovat za patogenní

Riziko kontaminace IV.



– Vitrolife



Používejte nosiče legálně dostupné na trhu a určené pro vitifikaci lidských blastocyst pro zajištění dostatečných rychlostí ochlazování a ohřevu.

– Kitazato



citlivý na toto antibiotikum. POZNÁMKA: Dlouhodobá bezpečnost vitrifikační techniky a maximální skladovatelnost v tekutém dusíku nebyla stanovena a není známa.

An experimental study using the Cryotop open device demonstrated that 45 % of samples became contaminated after just 10 seconds of contact with contaminated liquid nitrogen (Criado et al., 2011). In the same study, no

– SAGE



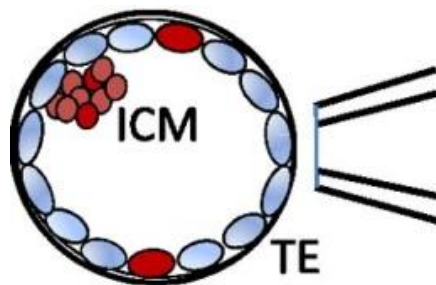
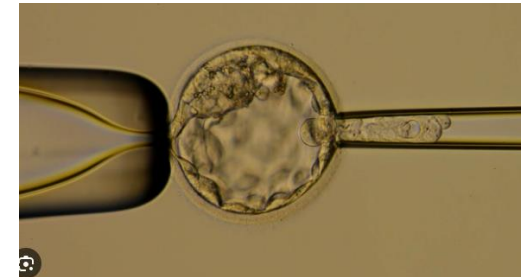
Pozor: Používejte legálně prodávaná úložná zařízení určená pro použití u vitifikace embryí. Používejte uzavřené úložné systémy, aby se **zabránilo potenciálnímu riziku virové kontaminace, nepoužívejte otevřené úložné systémy, ve kterých vzorek přichází do přímého kontaktu s kapalným dusíkem. Rychlost chlazení úložného zařízení musí být mezi 1 800 až 20 000 °C/ minutu (Camus et al., 2006).**

System sledování teploty v kryonádobách

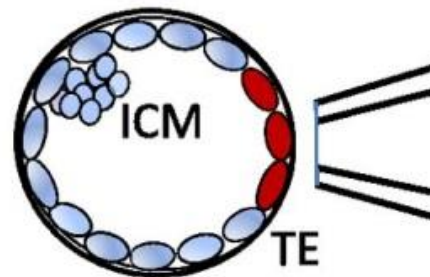


Mosaicismus - rebiopsie

- velké množství mozaicistních embryí
- odběr trofektodermu – vyšší výskyt mozaicismu
- někdy nutná rebiopsie
- rozmražení, rebiopsie a následně druhá vitrifikace



False Negative



False Positive

Legend

- Euploid TE cell
- Aneuploid TE cell
- Euploid ICM cell
- Aneuploid ICM cell

Embryo revitrifikace

- používaný nástroj nezbytný pro PGT revitrifikace
- dříve nemyslitelné, dnes úspěšnost stejná jako jedna vitrifikace
- blastocysty biptované a vitrifikované dvakrát měly horší klinické výsledky ve srovnání s blastocystami vitrifikovanými jednou
- pacientky s PGD by měly být poučeny, že provedení druhé biopsie a vitrifikace, kdy se nepodaří získat výsledek z počáteční biopsie, sníží pravděpodobnost otěhotnění.
- existují však studie, které tvrdí že revitrifikace nemá vliv na live birth rate



Hormesis – hormetický efekt

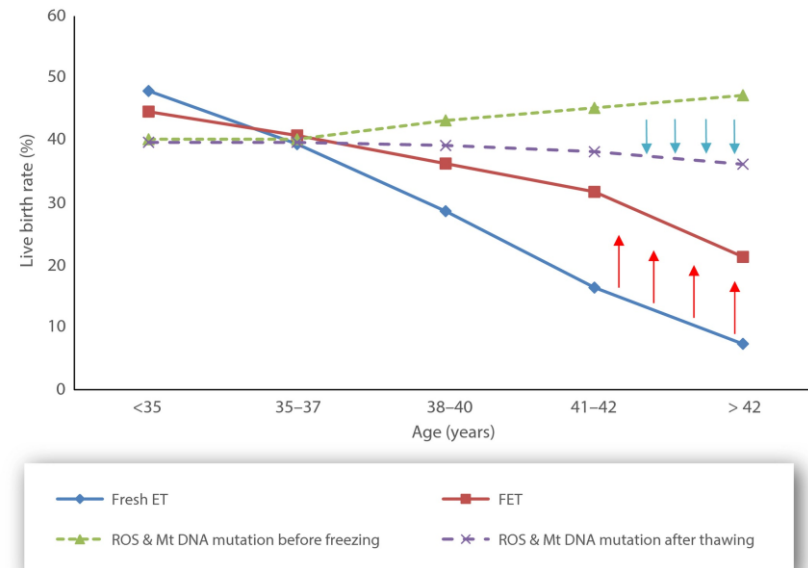


- úspěšná kryokonzervace embryí výrazně zvýšila šance na úspěšný výsledek IVF
- existuje také teorie, která popisuje "léčebný" efekt zmrazení embrya, což může vysvětlovat vyšší úspěšnost přenosu zmrazených embryí ve srovnání s transferem čerstvých embryí "Teorie o embryo-kryo léčbě" : zmrazení a rozmrazení by mohlo aktivovat endogenní mechanismy přežití a opravy u preimplantačních embryí - proces rozmrazování vyvolává nízkou úroveň stresu, což vede k hormezi
- řízený stres by mohl vést k opravě **poškození mitochondrií a chybnému skládání proteinů**
- vysvětlení vyšší úspěšnosti KET ve srovnání s čerstvým ET u žen v pokročilém reprodukčním věku

Hormesis

- po rozmrazení dochází ke **zvýšené mitochondriální aktivitě**, která je podobná fyziologickým procesům probíhajícím v trofektodermálních buňkách.
- skokový **nárůst spotřeby kyslíku** po zmrazení a rozmrazení má pravděpodobně pozitivní vliv na zahájení implantace embrya.
- "kryo-ošetření embrya" má dvě hlavní složky
- v důsledku zmrazení nebo rozmrazení embryí dochází ke snížení hladin reaktivních forem kyslíku (ROS), dochází k detoxikaci buněk a snižuje se množství mutované mtDNA

dalším mechanismem vlivu je rychlé zotavení (skokový efekt) mitochondriální aktivity v trofektodermálních buňkách blastocysty, která je součástí fyziologického procesu implantace



MUNI
MED

Děkuji Vám za pozornost !

