



# THE CRYOTEC METHOD





## Оглавление

1. Основная информация .....	4
Увеличение микроскопа .....	4
Положение ооцита / эмбриона во время аспирации .....	4
2. Протокол витрификации .....	5
Необходимые материалы .....	5
Подготовка к витрификации .....	5
[Шаг 1] Уравновешивание в ES .....	6
[Шаг 2] Уравновешивание в VS1 .....	9
[Шаг 3] Дегидратация ооцита/эмбриона в VS2 .....	11
[Шаг 3] Процесс помещения ооцита/эмбриона на поверхность криотека .....	12
[Шаг 3] Сверхбыстрое замораживание .....	12
3. Протокол разморозки .....	14
Необходимые материалы .....	14
Подготовка к разморозке .....	15
[Шаг 4] Оттаивание в TS .....	15
[Шаг 5] Разбавление в DS .....	17
[Шаг 5] Разбавление в WS1 .....	18
[Шаг 6] Отмывка в WS2 .....	19

## 1. Основная информация

### Увеличение микроскопа

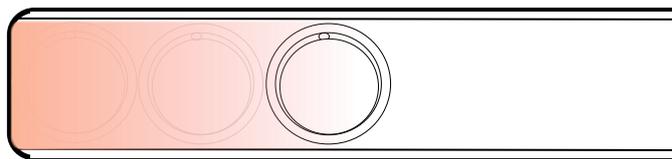
**Малое увеличение:** Для манипуляций с ооцитами / эмбрионами (x12-15).  
 - Это увеличение позволяет просматривать целиком весь ооцит/эмбрион.

**Большое увеличение:** Для наблюдения за ооцитами / эмбрионами (x45-55).  
 - Это максимальное увеличение позволяет рассмотреть объект наблюдения в деталях.

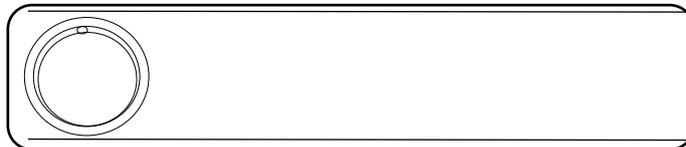
### Положение ооцита / эмбриона во время аспирации

Во время использования протокола, необходимо набирать ооцит/эмбрион в стриппер согласно приведенным ниже примерам.

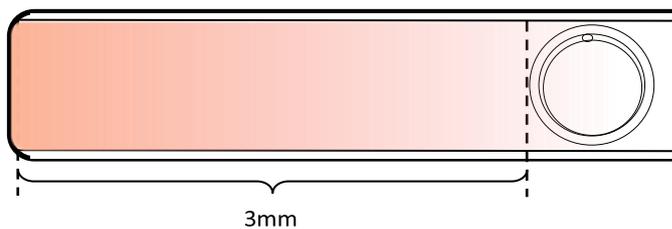
- ① Аспирация небольшого количества раствора (примерно два диаметра ооцита) после ооцита / эмбриона (стандартная процедура).



- ② Размещение ооцита / эмбриона на кончике стриппера (витрификация).

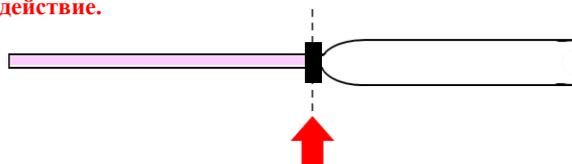


- ③ Аспирация 3 мм раствора после ооцита / эмбриона (разбавление в DS и WS при разморозке).



#### Совет!

Для облегчения процедуры аспирации ооцитов/эмбрионов при помощи стриппера, за счет снятия капиллярного действия, наберите 1мм раствора в стриппер заранее. Так же вы можете сделать пометку на стриппере в месте, где заканчивается капиллярное действие.



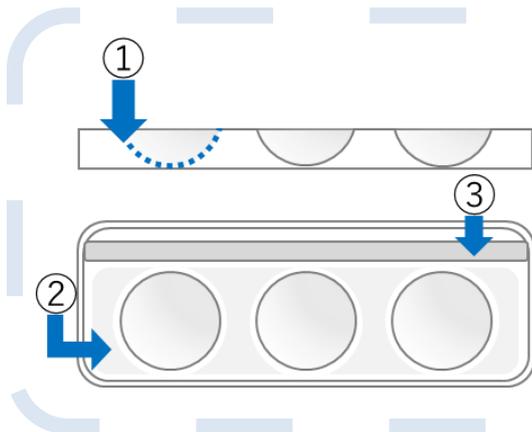
## 2. Протокол витрификации

### Преимущество метода витрификации

Использование криоконсервации с помощью метода витрификации предотвращает любые изменения или ухудшение качества ооцита / эмбриона, гарантируя, что он сохраняет то же состояние, в котором находился до замораживания

### Необходимые материалы

- Набор для витрификации Cryotech® Vitrification Kit 101
- Уравновешивающий раствор (ES): 1,0 мл / флакон × 1
- Витрификационный раствор (VS): 1,0 мл / флакон × 2
- 4 Криотека
- 3 планшета Vitri-plates с 3 лунками каждый (и крышкой)
- Микроскоп (с отключенным нагревом) ▪ Таймер (с функцией отсчета времени) ▪ Пинцет ▪ Ножницы ▪ Микропипетка (300 мкл) ▪ Пипетка Пастера (с мундштуком) или Стриппер (с капиллярами) ▪ Охлаждающая ёмкость для жидкого азота



### Характеристики планшета Vitri Plate

Планшет имеет:

- ① полусферическое дно лунок
- ② межлуночное пространство для сброса раствора из стриппера во время промывки
- ③ канавку для надежного удерживания криотека

Поскольку каждая лунка является полусферической, то она с меньшей вероятностью создаст «слепые зоны» из-за теней в микроскопе. Это минимизирует шанс потери ооцита / эмбриона.

### Подготовка к витрификации

1. Поддерживайте комнатную температуру от 25 до 27 °C.
2. Подождите, пока выравнивающий раствор (ES) и раствор для замораживания (VS) нагреются до комнатной температуры (25-27°C) в течение минимум 1 часа.

**(Осмотрите флаконы ES и VS на наличие каких-либо отклонений, таких как необычная окраска и/или температура растворов)**

3. Подготовьте стриппер с внутренним диаметром: 140-150 мкм для ооцитов/эмбрионов, 160-220 мкм для бластоцист
4. Если диаметр бластоцисты, подлежащей витрификации, превышает 220 мкм, проведите следующий процесс коллапсирования (процесс сжатия бластоцели): погрузите бластоцисту в гипертонический раствор (DS: WS = 2: 3), пока он не достигнет нужного размера. Это наиболее эффективный и неинвазивный метод.

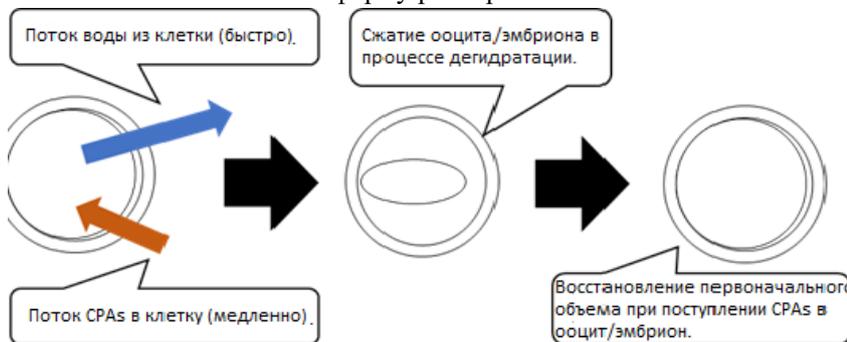
## [Шаг 1] Уравновешивание в ES

(8 -15 минут при комнатной температуре)

Криоконсервация методом витрификации предотвращает любые изменения или ухудшение качества ооцита / эмбриона и гарантирует сохранение его в том же состоянии, в котором он находился до замораживания.

Механизм сжатия и восстановления первоначального размера клеток.

Осмотическое давление в клетке примерно равняется 300 mOsm/kg, а в растворе ES - 2400 mOsm/kg. Исходя из этого, после помещения эмбриона/ооцита в раствор, вода будет стремиться покинуть клетку. Так, из-за разницы между внутриклеточным и внеклеточным осмотическим давлением, начнется процесс дегидратации. В это время CPAs проникают в клетку. Обе реакции происходят одновременно, поскольку внутри- и внеклеточное осмотическое давление выравниваются. Однако скорость, с которой вода покидает клетку, намного быстрее, чем скорость потока CPAs, поступающих в неё. Поэтому ооцит/эмбрион сначала быстро сжимается, а затем восстанавливает свою форму/размер.



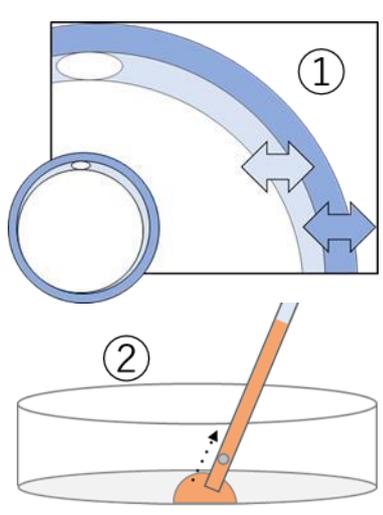
<b>1</b>		<p>1). Внесите в первую лунку трехлуночного планшета Vitri Plate 300 мкл раствора ES ①. После заполнения первой лунки раствором ES поменяйте наконечник дозатора на новый.</p> <p>2). Внесите во вторую и третью лунки трехлуночного планшета Vitri Plate по 300 мкл раствора VS ② and ③.</p>
----------	--	---

### Внимание: Избегайте образования пузырей

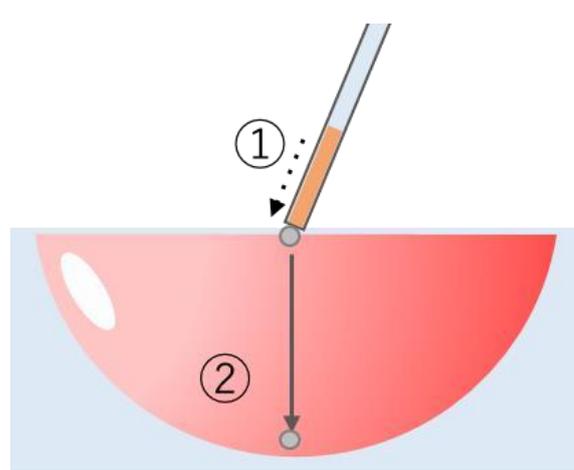
Все растворы медленно перемешиваем, однократно переворачивая закрытую вials. Перед раскапыванием плавно аспирируем, избегая образование пузырей.

### Внимание: Если пузыри образовались.

Если **пузыри образовались** в лунке, они исчезнут, если вы просто оставите их на некоторое время. **Не удаляйте пузыри** с помощью микропипетки, так как это изменит объем раствора в лунке.

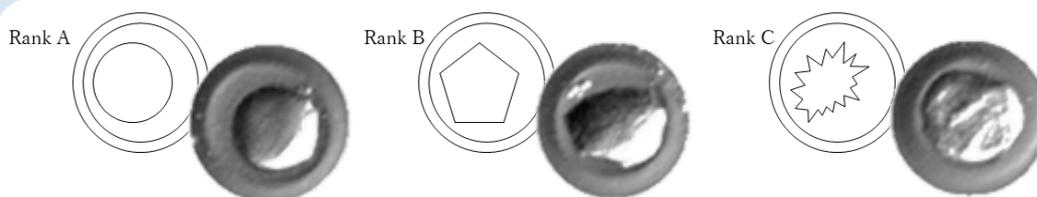
2	 <p>Культуральная чашка</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Осмотрите и запомните внешний вид ооцита/эмбриона при большом увеличении, обращая особое внимание на размер zona pellucida относительно перивителлинового пространства (в ооцитах) или полости (в бластоцистах), чтобы подтвердить, что ооцит/эмбрион полностью восстановил свой первоначальный объем во время уравнивания ①. · (①)</li> <li>2. Аспирируйте ооцит/эмбрион из культуральной среды, оставляя между кончиком стриппера расстояние, равное примерно двум диаметрам ооцита/эмбриона ②</li> </ol>
---	--	---

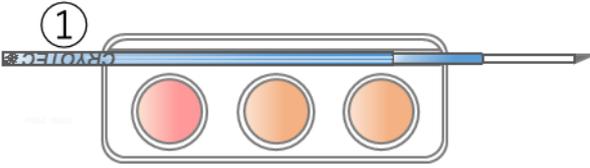
**Внимание:** Ооцит/эмбрион начнет самопроизвольно сжиматься и опускаться на дно сразу после помещения в ES. Если сжатие отсутствует, яйцеклетка/эмбрион нежизнеспособны.

3	 <p>ES</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Поместите ооцит/эмбрион на поверхность выравнивающего раствора ES, строго по центру лунки ①.</li> <li>2. Запустите таймер..</li> <li>3. Ооцит/эмбрион начнет самопроизвольно сжиматься и опускаться на дно ② (первые 30 секунд). Через 90 секунд ооцит/эмбрион максимально сожмется</li> <li>4. Продолжайте наблюдать за объектом витрификации пока он полностью не восстановит свой первоначальный объем.</li> </ol>
---	--	---

### Оценка ооцита/эмбриона после сжатия в растворе ES

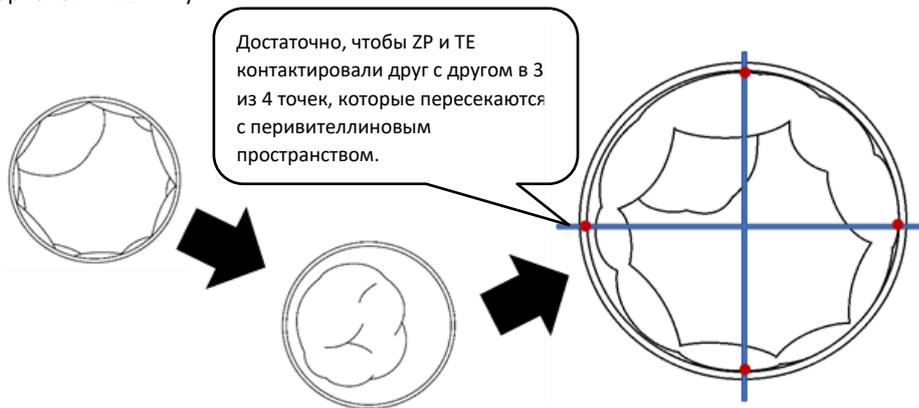
Вы можете оценить качество ооцита/эмбриона по проницаемости мембраны его клетки/клеток. Ооцит / эмбрион высокого качества сохранит свою сферическую форму при сжатии (rank A). Если проницаемость мембраны изменится, то будет образовываться неровный край (rank B). Если качество ниже среднего, то края приобретут несимметричную форму (rank C). Обратите внимание, что оценка не влияет на выживаемость при разморозке; но может коррелировать с pregnancy rate.



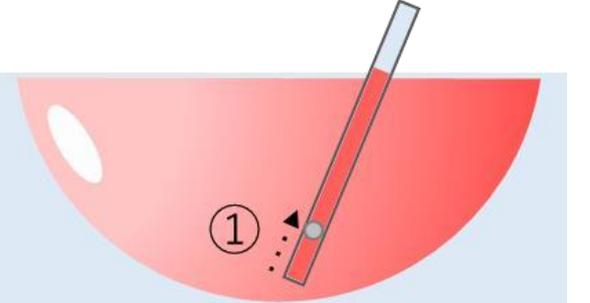
4		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. В ожидании, пока ооцит/эмбрион восстановит свой объем, достаньте соломинку, содержащую криотек. Заполните информацию о ооците / эмбрионе на обратной стороне криотека (напротив логотипа) и поместите криотек в углубление в планшете, следя за тем, чтобы логотип был обращен вверх. (1).</li> <li>2. Наполните ёмкость для охлаждения жидким азотом.</li> <li>3. Если ооцит/эмбрион полностью восстановил свой первоначальный объем – процесс эквипирации в ES завершен.</li> </ol>
---	---	---

### Определение завершения уравнивания эмбрионов на стадии бластоцисты

Если ооцит/эмбрион не полностью восстановил свой объем, ориентируйтесь на время экспозиции. Максимальное время завершения уравнивания в ES следующие: для ооцитов и бластоцист (160-220мкм.) –15 минут, для 4-8 клеточных эмбрионов – 12 минут.



Если определение полного восстановления бластоцисты затруднительно, необходимо использовать следующий метод. Мысленно проведите две прямые линии, перпендикулярные друг другу с точкой пересечения в центре эмбриона/ооцита. Если ZP(zona pellucida) и TE(трофектодерма) находятся в контакте друг с другом в 3 из 4 точек, которые пересекаются с данными линиями, то бластоциста достаточно восстановилась.

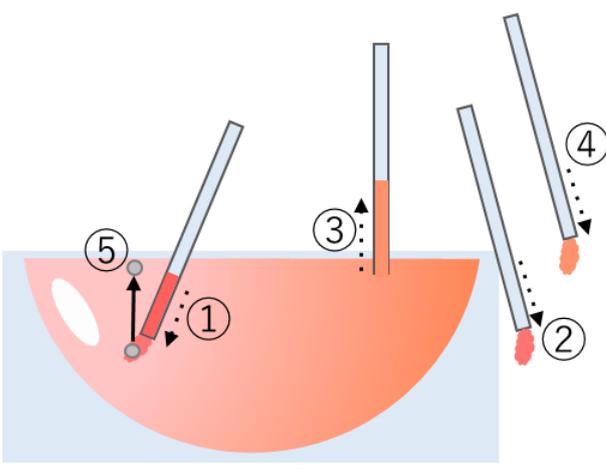
5		<p>5.1.) Аспирируйте ооцит/эмбрион в небольшом объеме раствора ES (оставляя между кончиком стриппера расстояние, равное примерно двум диаметрам ооцита/эмбриона) (1).</p>
---	---	---

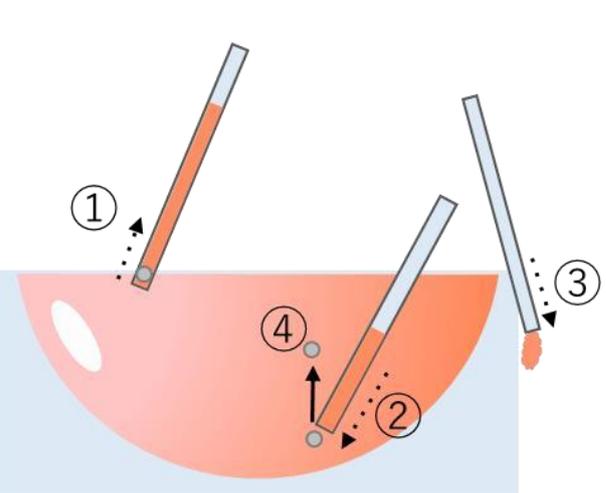
## 2

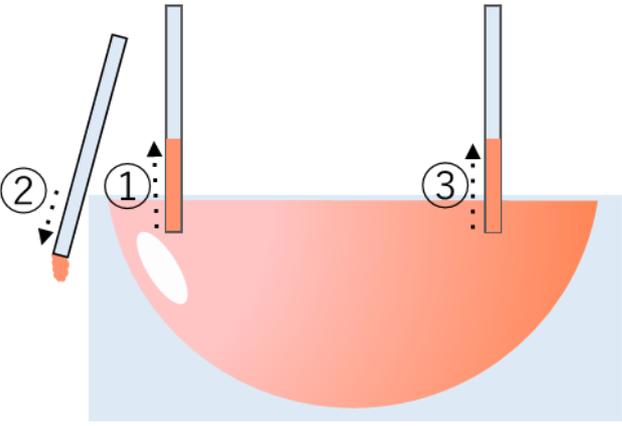
**[Шаг 2] Уравновешивание в VS1**

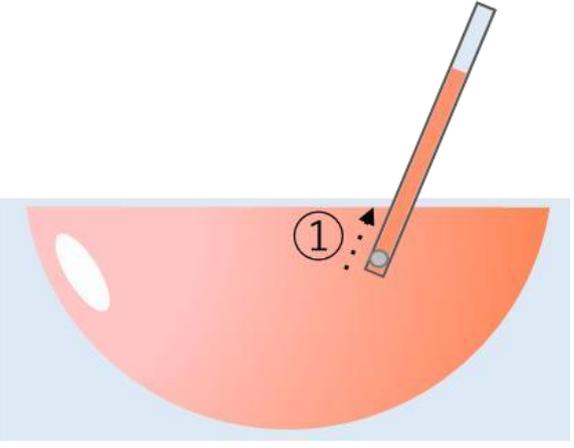
(30 - 60 секунд)

Цель этого шага состоит в том, чтобы произошло замещение внутриклеточного ES на VS.

1	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.1. Поместите ооцит/эмбрион на среднюю глубину левой стороны лунки VS1 (1).</li> <li>1.2. Выпустите остатки раствора ES из стриппера в межлуночное пространство для сброса раствора в планшете (2).</li> <li>1.3. Наберите свежий раствор VS с края поверхности лунки VS 1 (3), выпустите раствор в межлуночное пространство для сброса (4).</li> <li>1.4. Поскольку ооцит/эмбрион быстро всплывет на поверхность (5), фокус вашего микроскопа должен быть установлен на поверхности среды, что позволит вам увидеть объект.</li> </ol>
---	--	---

2	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>2.1. Аспирируйте свежий VS1 от края лунки, затем наберите ооцит/эмбрион в кончик пипетки (1).</li> <li>2.2. Поместите ооцит/эмбрион в нижнюю часть правой стороны лунки VS1 (2).</li> <li>2.3. Извлеките все оставшиеся VS1 из стриппера в межлуночное пространство для сброса раствора в планшете (3).</li> <li>2.4. Ооцит/эмбрион будет медленно всплывать, пока не остановится на средней глубине лунки (4). Повторите шаги 2.1., 2.2, пока ооцит/эмбрион не перестанет всплывать (будет оставаться на дне или в середине лунки).</li> </ol> <p><b>Внимание!</b> Для того, чтобы убедиться в остановке ооцита/эмбриона в среде, необходимо использовать более высокое увеличение. Если ооцит/эмбрион остается в фокусе, то он уравновесился.</p>
---	--	--

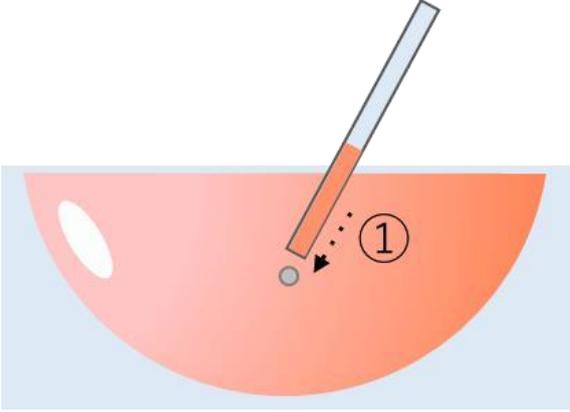
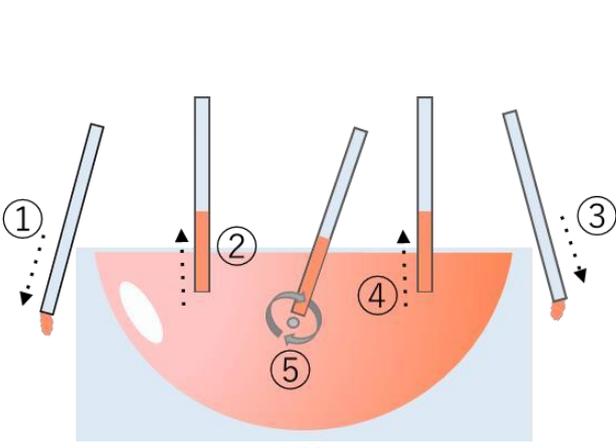
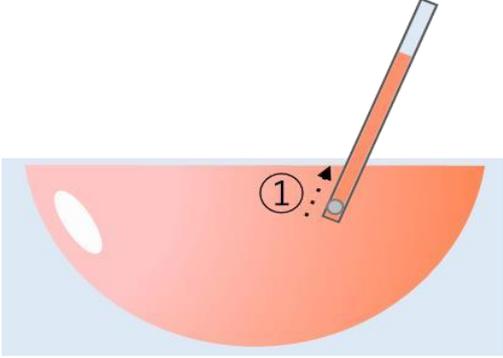
3	 <p>VS2</p>	<p>3.1. Аспирируйте и извлеките свежий <b>VS2</b> в межлуночное пространство для сброса раствора в планшете ① и ②</p> <p>3.2. Аспирируйте свежий <b>VS2</b> еще раз от края лунки ③</p> <p>Цель аспирации свежего <b>VS2</b> перед аспирацией ооцита / эмбриона из <b>VS1</b> состоит в том, чтобы предотвратить попадание <b>VS1</b> в <b>VS2</b>.</p>
---	--	---

4	 <p>VS1</p>	<p>4.1. Аспирируйте ооцит / эмбрион из <b>VS1</b> в кончике пипетки ①.</p>
---	---	--

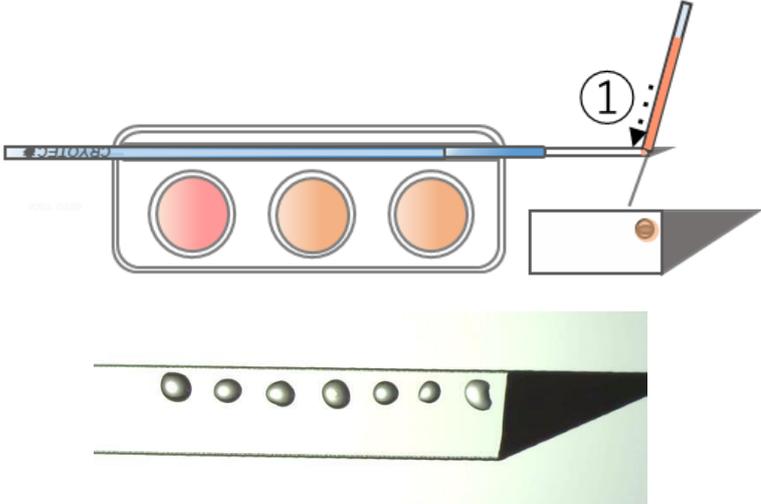
## STEP 3

**[Шаг 3] Дегидратация ооцита/эмбриона в VS2 (10-20 секунд)**

Цель помещения в лунку VS2 - подтвердить, что ES полностью заместился на VS.

1	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<p>1. Поместите ооцит/эмбрион на среднюю глубину лунки VS2 ①.</p>
2	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<p>2.2. Выпустите остатки раствора VS1 из стриппера в межлуночное пространство для сброса раствора в планшете ①.</p> <p>2.3. Аспирируйте свежий раствор VS2 с края лунки ②, выпустите раствор в межлуночное пространство для сброса ③.</p> <p>2.4. Аспирируйте свежую порцию VS2 ④.</p> <p>2.5. Выпустите раствор VS2 из стриппера в лунку и сделайте несколько вращающих движений стриппером вокруг объекта, чтобы убедиться, что объект полностью сжался ⑤.</p> <p><b>Внимание:</b> Если вы уверены, что ооцит/эмбрион полностью сжался, наблюдая в микроскоп, пункт 2.5. можно не выполнять.</p>
3	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<p>3.1. Аспирируйте ооцит/эмбрион, стараясь набрать объект в самом кончике стриппера ①.</p>

### [Шаг 3] Процесс помещения ооцита/эмбриона на поверхность криотека

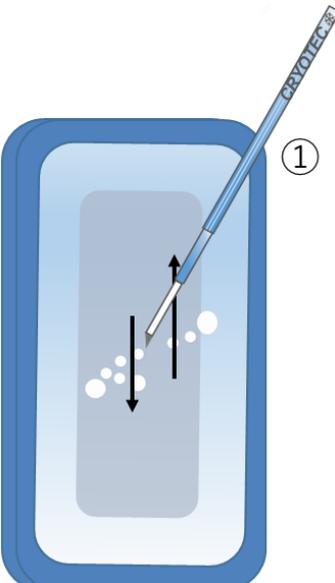
4		<p>1. Поместите ооцит/эмбрион в небольшом объеме VS2 на поверхность криотека рядом с кончиком около черной метки (по одному ооциту/эмбриону на каплю раствора). Излишнюю жидкость можно выпустить небольшими каплями перед эмбрионом/ооцитом(①).</p>
---	---	--

**СНЕК:** 1 ооцит= 1 капля. Не пытайтесь уменьшать объем капель.

#### Внимание! Не пытайтесь уменьшить размер капли!

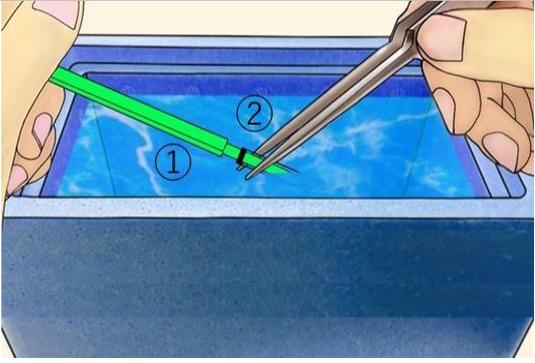
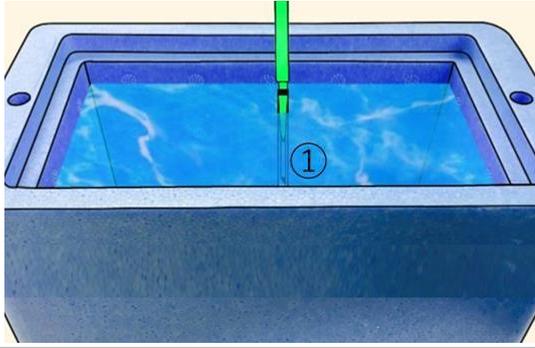
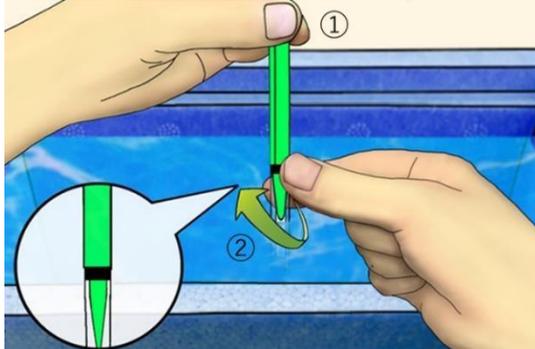
Пытаясь минимизировать объем капли, вы можете оказать давление на ооцит/эмбрион из-за поверхностного натяжения. Это может повредить ооцит/эмбрион или привести к прилипанию к поверхности криотека, что затруднит его удаление во время разморозки. Это также может увеличить время экспозиции в TS, что может негативно сказаться на объекте разморозки. Если капля слишком велика или если два ооцита/эмбриона помещены в одну каплю, просто повторно аспирируйте объект обратно в стриппер и сделайте новую каплю в другом месте.

### [Шаг 3] Сверхбыстрое замораживание

5	 <p style="text-align: center;">Жидкий азот(Liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>))</p>	<p>1. После подтверждения присутствия ооцита/эмбриона в капле на поверхности криотека сразу же погрузите криотек вертикально в жидкий азот. Сделайте несколько вращающих движений криотеком, пока азот не перестанет кипеть. Это повысит скорость охлаждения (сверхбыстрое охлаждение) (①).</p>
---	--	---

## STEP 3

## Процесс надевания колпачка

	Figure	Procedure
1		1. Держите поверхность криотека с замороженными объектами строго в азоте (①).
2		1. Удерживая колпачок криотека при помощи пинцета, опустите его в жидкий азот. Через несколько секунд убедитесь, что в колпачке не осталось пузырьков, затем аккуратно наденьте колпачок на криотек (①) (следите, чтобы он оставался под поверхностью жидкого азота, используйте черную метку в качестве ориентира) (②).
3		1. Чтобы надеть колпачок плотно, поставьте Cryotec вертикально (①).
4		1. Продолжая удерживать кончик криотека с витрифицированным объектом в жидком азоте (①), частично поднимите Cryotec в воздух, затем плотно закрутите крышку пальцами (②).

**Внимание!** Не удерживайте колпачок пинцетом за среднюю часть, так как он может сломаться.

### 3. Протокол разморозки

Процесс разморозки является наиболее вероятной стадией, на которой могут образовываться кристаллы льда, если скорость нагревания низкая. Чрезвычайно важно быстро пройти температурный диапазон от -80 до -20 °С, в котором формирование кристаллов льда наиболее вероятно.

#### Необходимые материалы

- Cryotech® Warming Kit 102

- Раствор для оттаивания (TS) 1,8 мл / флакон × 1
- Раствор для разбавления (DS) 0,5 мл / флакон × 1
- Раствор для промывки (WS) 1,0 мл / флакон × 1
- 1 четырех-луночный планшет для разморозки Warm plate

Микроскоп (с отключенным нагревом) ▪

Таймер (с функцией отсчета времени) ▪

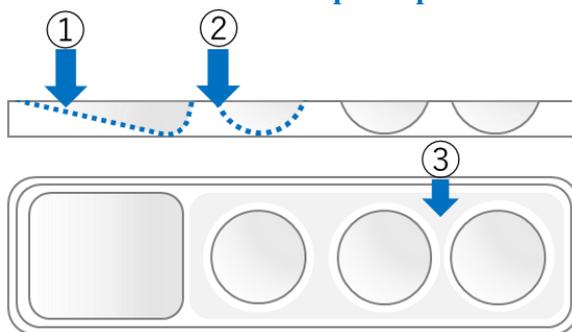
Пинцет ▪

Микропипетка (300 мкл) ▪

Стриппер (с капиллярами) ▪

Охлаждающая ёмкость для жидкого азота

#### Характеристика планшета для разморозки



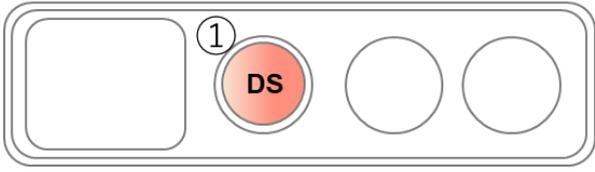
Планшет для разморозки имеет: прямоугольную лунку со скошенным дном, три круглые лунки с полусферическим дном и межлуночное пространство для сброса среды из стриппера ③. Лунка ① для раствора TS, спроектирована таким образом, чтобы обеспечить устойчивое размещение криотека с эмбрионом/ооцитом в ней. Форма дна круглых лунок ② позволяет произвести плавное изменение осмотической плотности внесенного на дно лунки раствора.

## Подготовка к разморозке

1. Используйте инкубатор, чтобы нагреть планшет и флакон TS (с закрытой крышкой) до 37 °C, не менее чем за 2 часа до процедуры размораживания (допустимо нагревание в течение ночи). При использовании CO<sub>2</sub>-инкубатора, убедитесь, что крышка флакона TS плотно закрыта, прежде чем нагревать его в инкубаторе (допустимо нагревание в течение ночи).
2. Нагрейте DS и WS до комнатной температуры (26 ± 1 °C: 25-27C) не менее за 2 часов до процедуры размораживания.
3. Подготовьте переносной контейнер с жидким азотом. Переместите криотек из Дьюара с жидким азотом в переносной контейнер. При помощи пинцета снимите колпачок с криотека, избегая контакта криотека с воздухом. Поставьте криотек вертикально у внутренней стенки контейнера.

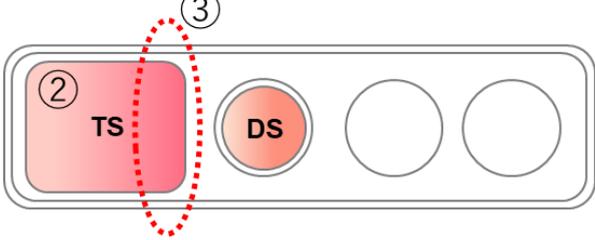
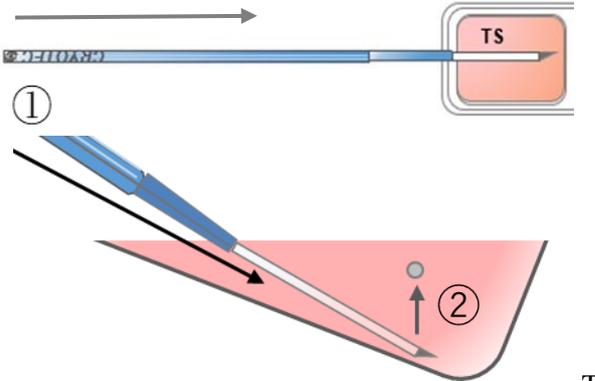
## [Шаг 4] Оттаивание в TS

(1 minute)

1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Убедитесь, что температура четырехлуночного планшета достигла 37 °C, достаньте его из инкубатора, откройте и внесите 300 мкл DS (раствор комнатной температуры) во вторую лунку (первую круглую лунку) (①).</li> </ol>
---	---	--

### Внимание:

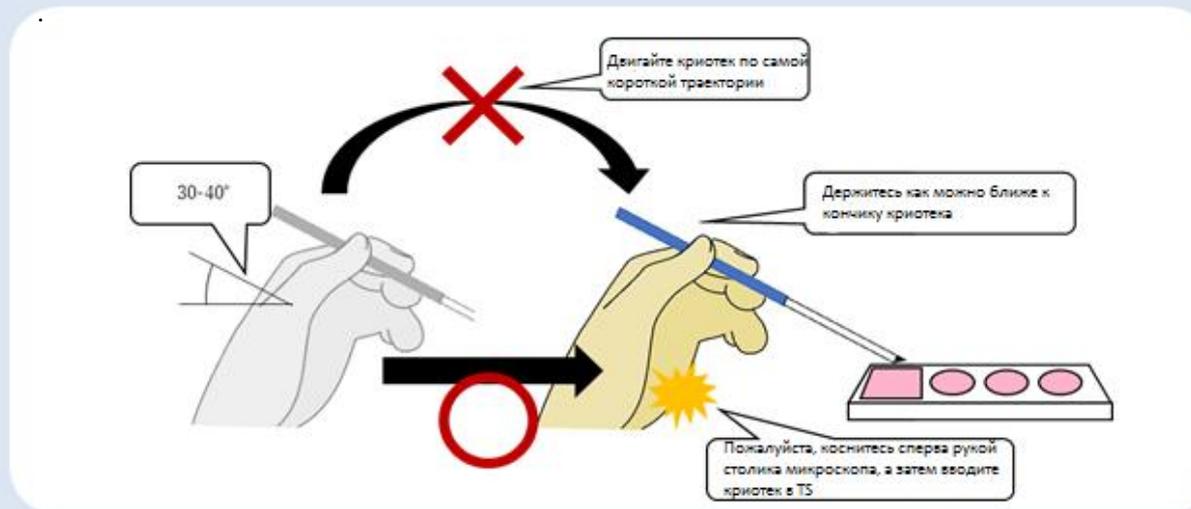
Чтобы обеспечить максимальную температуру планшета 37 °C, было бы наиболее эффективно вносить все растворы в планшет непосредственно перед тем, как они потребуются (так как они снижают температуру планшета). Однако, поскольку шаг оттаивания занимает всего 1 минуту, допускается внести DS в лунку заранее.

2		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Достаньте флакон с TS (1,8 мл), который был предварительно нагрет до 37 °C из инкубатора, и заполните раствором прямоугольную лунку (②).</li> <li>Установите фокус микроскопа на дно лунки TS (на область, в которой будет находиться пластина криотека с объектом разморозки (пунктирная линия слева)) (③).</li> </ol>
3		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Быстро (в течение 1 секунды) поместите кончик криотека с объектом в лунку с раствором TS (①).</li> <li>2. Засеките 1 минуту на секундомере и не двигайте криотеком в растворе TS</li> <li>3. Ооцит/эмбрион постепенно переместится с криотека в раствор (②).</li> </ol>

**Внимание:** погрузите криотек в TS и оставьте его в растворе на 1 минуту неподвижно. Если вы переместите криотек, температурный баланс всего раствора из-за чрезвычайно низкой температуры криотека может измениться. Кроме того, если ооцит / эмбрион оттаял (отсоединился) от поверхности криотека, любое движение может сместить его и привести к потере его из поля зрения. Если вы не видите ооцит / эмбрион на поверхности криотека, сохраняйте спокойствие и не пытайтесь перемещать криотек.

## Как правильно поместить криотек в лунку с TS

Подготовьте и установите стриппер около правой руки. Удерживайте криотек в левой руке как можно ближе к поверхности, содержащей витрифицированный объект. Быстрым движением переместите криотек из азота в раствор TS под углом 30 - 40 ° вдоль поверхности дна прямоугольной лунки с TS, чтобы избежать образования пузырьков. Если на поверхности криотека с объектом оттаивания образуются пузырьки воздуха, это может затруднить поиск ооцита / эмбриона, он может прилипнуть к пузырьку и переместиться в растворе. Для удобства проведения данной манипуляции вы можете сначала быстрым движением переместить руку с криотеком из азота на поверхность столика микроскопа, а затем аккуратно ввести криотек в раствор TS. Скорость манипуляции очень важна! Пожалуйста, соблюдайте все необходимые меры предосторожности.

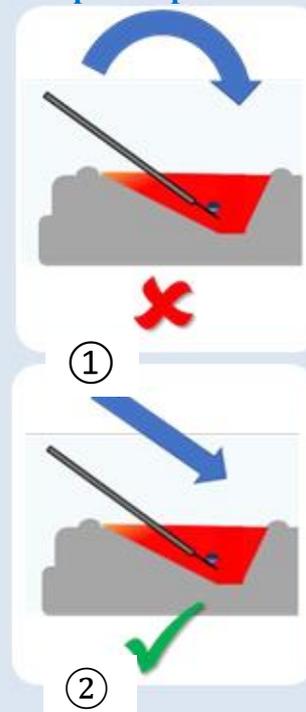


## Образование пузырьков после помещения криотека в раствор TS

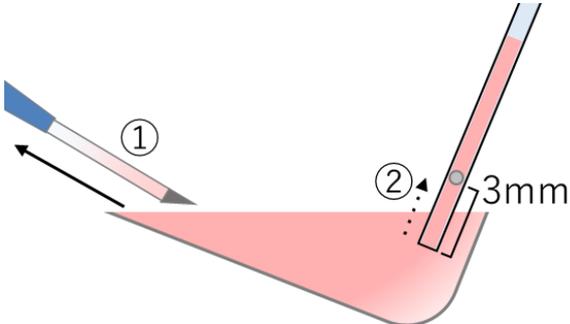
Если ввести криотек в лунку с TS перпендикулярно поверхности раствора, тем самым увеличивая площадь поверхности криотека, контактирующую с воздухом, это может привести к попаданию воздуха внутрь TS и образованию пузырьков. Чтобы избежать этого, необходимо изменить траекторию движения при введении криотека в TS: пожалуйста, вводите криотек диагональным движением, вдоль наклоненной поверхности дна лунки.

Если вы ввели криотек в раствор неправильно ①: перпендикулярно поверхности и пузырьки воздуха все же образовались, ооцит / эмбрион прикрепился к пузырькам и уплыл из поля зрения. В этом случае, ищите объект на поверхности TS в мелкой части лунки, так как капиллярное действие привлечет пузырьки (с ооцитом / эмбрионом) к ближайшей стенке.

Чтобы не допустить образования пузырьков, введите криотек по диагонали, избегая попадания воздуха в TS ②. И, пожалуйста, не забудьте следить за объектом оттаивания в течение одной минуты после введения криотека в TS, чтобы не потерять его из поля зрения!



**[Шаг 5] Разбавление в DS****(3 минуты)**

1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Оставьте криотек в растворе TS на 1 минуту, затем медленно извлеките его из лунки (①).</li> <li>2. Аспирируйте ооцит/эмбрион вместе с 3 мм раствора TS с помощью стриппера (②).</li> </ol>
---	---	--

**Внимание:**

Если по истечении 1 минуты ооцит / эмбрион не отделился от поверхности криотека, поместите кончик стриппера около объекта размораживания и мягко надавите на криотек, не касаясь стриппером ооцита/эмбриона.

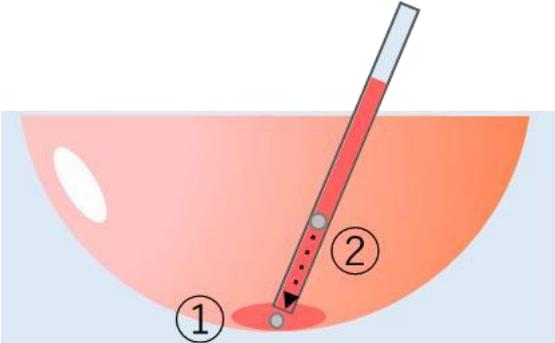
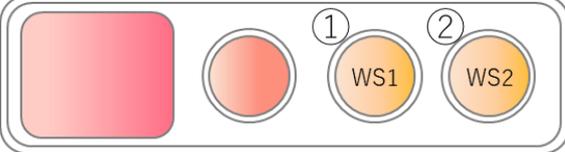
**Внимание:**

Если ооцит / эмбрион исчез из поля зрения

Если ооцит / эмбрион был помещен на криотек в процессе витрификации, он должен находиться в лунке с TS. Раствор TS, представленный в наборе, обладает минимальной токсичностью, поэтому у вас будет время для поиска ооцита / эмбриона.

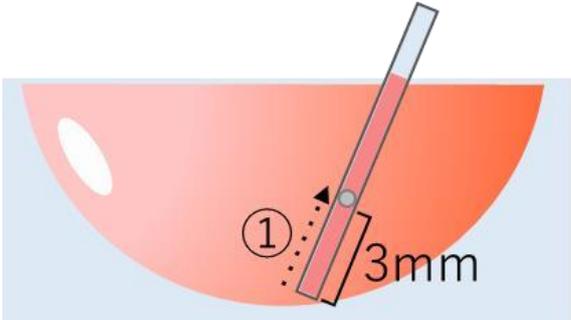
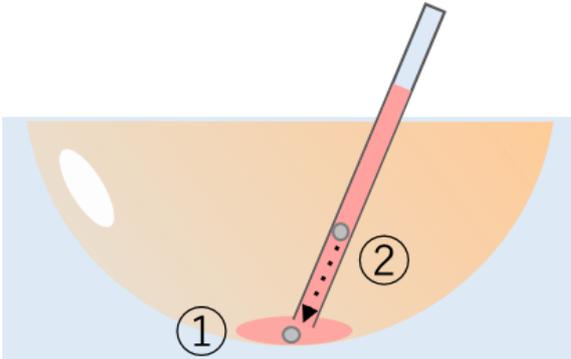
**Совет!**

Вы можете проконтролировать количество набранной среды в стриппер (длина столба жидкости = 3 мм), используя метку на крышке планшета для размораживания. Приложите стриппера к метке таким образом, чтобы кончик стриппера был с одной стороны метки, а ооцит / эмбрион - с другой. Пространство между краями метки должно быть полностью заполнено средой.

2		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Выпустите раствор TS (3 мм) из стриппера на дно в центр лунки, содержащей DS, чтобы сформировать слой TS внизу (①).</li> <li>2. Аккуратно поместите ооцит / эмбрион на дно лунки в слой TS (②).</li> <li>3. Выключите свет микроскопа и включите таймер (время ожидания 3 минуты).</li> </ol>
3		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. В это время (3 минуты) внесите по 300 мкл раствор WS в лунки планшета WS1 and WS2 (① и ②).</li> </ol>

## 5

**[Шаг 5] Разбавление в WS1****(5 минут)**

1	 <p style="text-align: center;">DS</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Аспирируйте ооцит/эмбрион вместе с 3 мм раствора DS с помощью стриппера (①).</li> </ol>
2	 <p style="text-align: center;">WS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Выпустите раствор DS из стриппера на дно в центр лунки, содержащей WS, чтобы сформировать слой DS внизу (①).</li> <li>2. Аккуратно поместите ооцит / эмбрион на дно лунки в слой DS (②).</li> <li>3. Используйте большое увеличение, чтобы тщательно изучить и запомнить форму ооцита / эмбриона. Выключите свет микроскопа и подождите 5 минут.</li> <li>4. Через 5 минут сравните текущую форму ооцита / эмбриона с предыдущей формой, которую вы запомнили. Если вы можете подтвердить, что объем ооцита / эмбриона полностью восстановлен или близок к нему, это означает, что он жизнеспособен.</li> </ol>

**Внимание!**

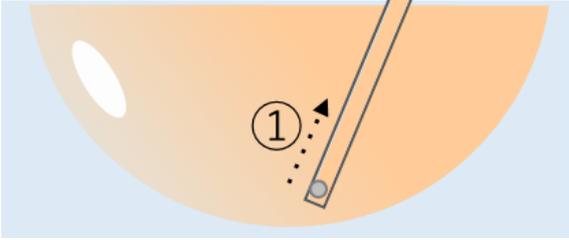
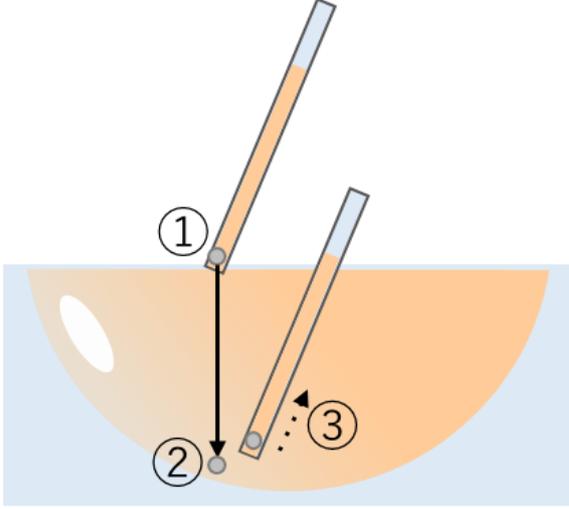
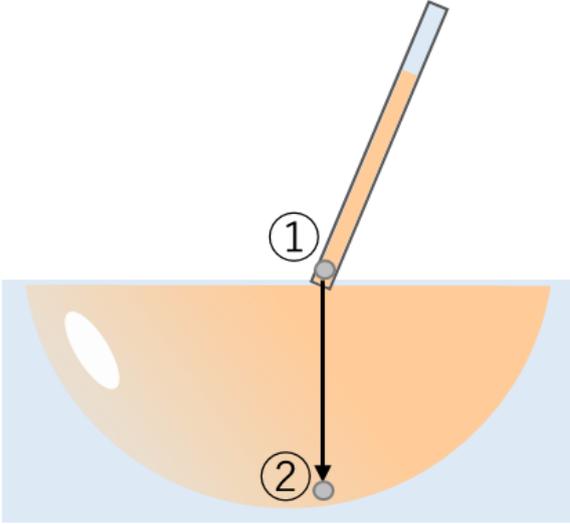
На этом этапе важно подтвердить, был ли ооцит / эмбрион поврежден во время процесса витрификации / разморозки. Интактный ооцит / эмбрион имеет нормальную мембранную реакцию и полностью восстанавливает свой объем.

Реакция на этой стадии обусловлена процессом дегидратации: ооцит / эмбрион становится изотоническим по мере того, как он проходит процесс уравнивания в WS (300 mOsm/kg) из DS (900 mOsm/kg). Другими словами, объем интактного ооцита / эмбриона полностью восстановится быстрее чем объем ооцита / эмбриона более низкого качества. В случае поврежденного ооцита / эмбриона нормальная мембранная реакция вообще не будет наблюдаться. Таким образом, вы не увидите никаких изменений в объеме размораживаемого объекта. В случае бластоцист, когда полость бластоцисты начинает формироваться / расширяться или полость бластоцисты полностью расширена можно считать, что процесс размораживания успешно завершен. В целом показано, что перенос эмбрионов, имеющих более 30 % интактных бластомеров, может привести к рождению детей:

- для эмбриона с 2 клетками, 1 бластомер
- для эмбриона с 4 клетками, 2 бластомера
- для эмбриона с 8 клетками, 3 бластомера

## 6

**[Шаг 6] Отмывка в WS2****(1 минута)**

1	 <p style="text-align: center;">WS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Аспирируйте ооцит/эмбрион в небольшом количестве раствора WS1 с помощью стриппера (①).</li> </ol>
2	 <p style="text-align: center;">WS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Поместите ооцит / эмбрион на поверхность раствора WS2 в левой части лунки (①).</li> <li>2. Ооцит / эмбрион будет медленно опускаться на дно лунки (②).</li> <li>3. После того, как ооцит / эмбрион достигнет дна лунки, аспирируйте его в небольшом количестве раствора WS2 (③).</li> </ol>
3	 <p style="text-align: center;">WS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Поместите ооцит / эмбрион на поверхность раствора WS2 в правой части лунки (①).</li> <li>2. Ооцит / эмбрион будет медленно опускаться на дно лунки еще раз (②)</li> <li>3. Как только ооцит / эмбрион достигает дна лунки, этап отмывки завершен.</li> <li>4. Переместите объект в чашку для последующего культивирования до ICSI ооцита / переноса эмбриона.</li> </ol>

**Внимание: Мы рекомендуем культивировать ооцит в течение 2 часов для ИКСИ и бластоцисты в течение не менее 1 часа до переноса эмбрионов.**