

MARIANA DE NADAI | SARAH MADANI | ANABELLA MARCONETTO

WEN BIN CHEN | ZOLTÁN MACHÁTY | GÁBOR VAJTA

Про Ооцити та Ембріони

Том 2. Методи



2022 - 2023

Дизайн сторінок, графічний дизайн: Нара Ю, Китай
Ілюстрація титульної сторінки: Агнес Марцалі, Угорщина



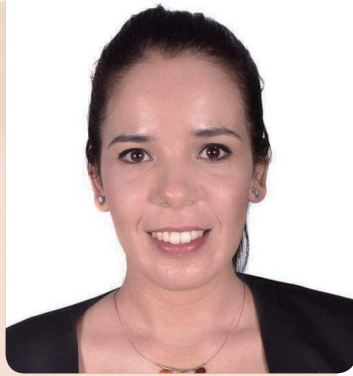
ЗМІСТ

Передмова до Тому 2	4
Розділ I. Створення придатних до трансплантації ембріонів великої рогатої худоби в умовах <i>in vitro</i>	9
1. Отримання яєчників/ооцитів, транспортування в лабораторію (День -1)	9
2. Вилучення ооцитів з яєчників, отриманих на бійні (День -1, продовження)	11
3. Відбір, промивання та дозрівання <i>in vitro</i> (IVM) ооцитів (День -1, продовження)	14
4. Підготовка сперматозоїдів та запліднення <i>in vitro</i> (IVF) (День 0)	16
5. Культитивування <i>in vitro</i> (IVC) ембріонів (День 1 до День 7)	18
Розділ II. Кріоконсервування отриманих <i>in vitro</i> ембріонів великої рогатої худоби	20
1. Вітрифікація: еквілібрація, зневоднення, охолодження та зберігання	22
2. Відігрівання та розведення кріопротектору після вітрифікації методом OPS ембріонів великої рогатої худоби в лабораторії	29
3. Відігрівання ембріонів великої рогатої худоби після вітрифікації методом OPS для прямої трансплантації	32
Додатки	35
1. Визначений чи ні - тема додавання білків	35
2. Рідкий азот та техніка безпеки	36
3. Ефективність і стабільність	36
4. Спеціальні техніки для особливих ситуацій	39
Джерела літератури	41
Подяка	43
Продукти VitaVitro Шеньчжень для ЕКЗ тварин	44

ПЕРЕДМОВА ДО ТОМУ 2

(якщо нудно, пропустіть)

Дві причини надихнули нас на продовження наших спільних зусиль.



Ми отримали багато позитивних відгуків, але при цьому відчували певні докори сумління: ми критикували все і всіх, але практично не дали реальних відповідей на питання “як це зробити”. За кожним приемним коментарем ми підозрювали похитування головою: “ну, розумники, а як щодо того, щоб дати нам щось справді цінне, не просто маленькі примітивні трюки, а методи, протоколи, шляхи, яких слід дотримуватися...?”

Інша причина, яка не стосувалася першого тому, - проблема, відома багатьом, але донедавна майже

всіма ігнорована. Різниця показників ефективності між клініками, що знаходяться в одній і тій же країні, в одному і тому ж регіоні, з однаковим контингентом пацієнтів. Відмінності, які не можна пояснити нічим іншим, окрім недоречних втручань. Жодна інша галузь медицини не може собі дозволити і жодна влада не допустила б чотириразового зниження успішності в одній клініці порівняно з іншими - і ці приголомшливі дані були офіційно опубліковані в країнах головних основоположників ЕКЗ, зі всесвітньо відомими традиціями і суворим регулюванням. А як щодо решти? Випадковий особистий досвід і поодинокі заяви свідчать про таку ж, якщо не гіршу, ситуацію в багатьох країнах світу.

Нам потрібне рішення тут і зараз.

Наша невелика міжнародна команда не може боротися з певними проблемами, включаючи негативні риси комерціалізації (конкуренція, секретність), відсутність прозорості або відсутність юридичних наслідків очевидної неефективності. Ми також не можемо змінити систему освіти та акредитації - хоча ці фактори суттєво впливають на цю прикру ситуацію.

Однак ми можемо використати альтернативну стратегію, яку ми запропонували в Томі 1 для вирішення наукової проблеми: тобто знайти - і полагодити - найслабшу ланку ланцюга.

Аналогія з “ланцюгом” є більш правдоподібною, ніж вважалося. Існуючі шляхи обміну технологіями у сфері допоміжних репродуктивних технологій недосконалі.



- Інструменти, рішення та методики здебільшого впроваджуються в лабораторії дистриб'юторами, які не мають часу, базових знань і володіють лише поверхневою інформацією про продукт.
- На виставках основна увага приділяється каві, їжі, спілкуванню зі старими друзями та сувенірам.
- Лекції можуть викликати інтерес, але не спроможні розкрити технічні деталі.
- Майстер-класи, навіть "практичні", зазвичай переповнені і короткі; у щасливих випадках ви можете зробити якусь провальну спробу виконати техніку один раз; про повторну спробу майже завжди не може бути й мови.
- Посібники та брошури або занадто короткі, і в них відсутня важлива інформація, або занадто довгі, і ніхто не буде читати їх уважно і з належною зосередженістю.
- Навчальні відео зазвичай поверхневі, з однотипною інформацією; немає можливості для зворотного зв'язку і немає часу на деталі.
- Особисті візити до видатної лабораторії - найкращий спосіб навчання, але це привілей небагатьох вчених, яким пощастило.
- Нарешті, ланцюгове навчання один одного - найпоширеніший спосіб обміну технологіями, а також основне джерело їх неправильного застосування, оскільки методика погіршується з кожною наступною ланкою цього навчального ланцюга.



Цим Томом 2 ми робимо інакшу спробу. Ми хочемо запропонувати впорядкований, зрозумілий посібник з набором процедур, включаючи створення ембріонів великої рогатої худоби та їх вітрифікацію для комерційних і дослідницьких цілей, лабораторні питання допоміжних



репродуктивних технологій людини та перенесення ядер соматичних клітин у ссавців не-приматів. Ці розділи можуть слугувати базовим підходом для досягнення поставленої мети з доведеною ефективністю в різних ситуаціях. Також будуть наведені короткі пояснення щодо ключових кроків та шляхів досягнення мети.

Ми знаємо, що наші поради - не єдині способи створення чудових ембріонів та досягнення високих результатів. Але вони прості, недорогі, швидкі та більш ефективні, ніж більшість методів, які зазвичай використовуються. Для їх застосування необхідні деякі базові знання з



лабораторної ембріології. Ці методи можуть бути гарним вибором, якщо ви хочете швидко досягти прогресу, покращивши ваші неефективні та/або незручні системи.

Однак уникайте поширених помилок. По-перше, чітко дотримуйтесь того, що тут описано. Повторюйте процедури тижнями, можливо, місяцями. Практика дуже важлива; кожен маленький крок повинен виконуватися автоматично, як перемикання передач у машині з механічною коробкою - чи це вже застарілий приклад? Не змінюйте нічого після перших двох,

трьох або чотирьох фіаско; наші інструкції правильні, і наші методи добре працюють в різних країнах і на різних континентах. Проблема може полягати у втіленні. Краще одразу звернутися до нас, ніж постійно вносити зміни. Нарешті, уникайте самостійного створення вашої власної версії з різних частин, зібраних з різних протоколів. Лабораторна ембріологія - це не іграшковий конструктор LEGO, а скоріше пазл, де всі елементи мають свої унікальні особливості і можуть не поєднуватися в інших умовах.

Коли ви досягнете необхідної ефективності, у вас все одно буде безліч можливостей покращити систему. Але до цього просто довіртеся нам і повторюйте за нами - або поговоріть з нами (див. нижче).

Усі розділи Тому 2 будуть опубліковані онлайн, з усіма перевагами та можливостями онлайн-публікацій. Ми домовилися, що

- ми надамо відкритий доступ після безкоштовної реєстрації
- метою є динамічний посібник, що постійно вдосконалюється
- всі зареєстровані учасники можуть надсилати ідеї, пропозиції та виправлення
- всі письмові матеріали будуть зібрані, впорядковані за темами і опубліковані
- окремі з них будуть включені до посібника (відбір та включення буде привілеєм авторів, але усі думки завжди будуть враховані)

Деякі додаткові технічні та формальні доповнення:

- у Томі 2 автори початкових версій Тома 1 на різних мовах в рівній мірі беруть участь у створенні розділів і будуть перераховані у всіх виданнях





Датський Інститут Сільськогосподарських наук, де знаходилася нині «покійна» лабораторія – місценодження багатьох ембріологічних технологій

- ми вітаємо Веня Бін Чена, керівника експериментальної лабораторії VitaVitro, в команді, відзначаючи його внесок, переклад китайською мовою та значну допомогу в роботі над Томом 2
- у цьому томі французький переклад замінить колишню арабську версію завдяки нашому найбільш універсальному автору-перекладачу Сарі Мадані
- щоб вирішити проблему, пов'язану з об'ємним завданням і нагальною потребою, ми працюватимемо паралельно над різними частинами і публікуватимемо їх окремо
- LinkedIn, Facebook і Twitter будуть використовуватися ще інтенсивніше, ніж раніше, щоб інформувати вас про публікації, оновлення та основні зміни

Дякуємо за вашу зацікавленість, участь та очікуємо на ваш активний вклад.



VitaVitro, Шеньчжень, Китай, де реалізуються нові ідеї



ЧОГО ВИ МОЖЕТЕ ОЧІКУВАТИ?

-
- з яєчників хорошої якості від 6 до 8 ооцитів, що будуть розвиватися
 - близько 50% бластоцист / отримані ооцити (!) на 7-у добу культивування ембріонів *in vitro*
 - майже 100% виживання та подальший розвиток після кріоконсервування
 - хороші показники вагітності та отелення (здебільшого визначаються поголів'ям реципієнтів та технікою трансплантації)
 - відсутність зниження цих показників після кріоконсервування та прямої трансплантації
 - відсутність помітного збільшення аномалій розвитку або синдрому великого плоду
-

РОЗДІЛ І. СТВОРЕННЯ ПРИДАТНИХ ДО ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В УМОВАХ *IN VITRO*



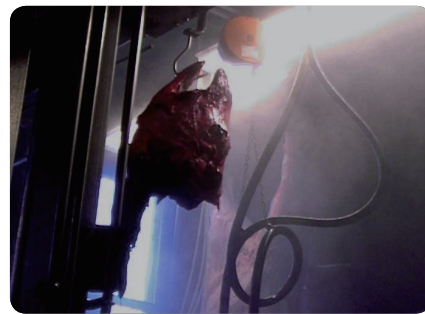
1 Отримання яєчників/ооцитів, транспортування в лабораторію (День -1)

Організація логістики залежить від місцевої ситуації, джерела матеріалів і мети роботи.

1.1 Для яєчників та ооцитів, отриманих з бійні

1.1.1 Добре, якщо в радіусі 100 км, тобто в двох годинах їзди, є бійня великої рогатої худоби, яка регулярно забиває від 15 до 60 корів (менше бажано телиць) на день. Зверніть увагу, що така співпраця завжди є проявом люб'язності з боку бійні. Формування позитивного відношення - одне з найскладніших завдань у ДРТ ВРХ, що вимагає застосування різних методів і творчого підходу.

Яєчники можуть збирати кваліфіковані, надійні (і винагороджені) місцеві працівники або співробітники лабораторії. В обох випадках яєчники з мінімальною кількістю мезоваріальної жирової тканини слід помістити в незаражену пластикову колбу-термос, наполовину заповнену стерильним фізіологічним розчином 25-30°C. Потім ці колби надійно поміщають у просту коробку-холодильник (разом з ножицями, рукавичками, серветками тощо) і перевозять автомобілем до лабораторії - без будь-якого подальшого контролю температури, якщо тільки не виникнуть екстремальні умови під час транспортування. Щоб уникнути будь-якого незворотного пошкодження ооцитів, час від забою до початку аспірації ооцитів не повинен перевищувати 5 - 6 годин, хоча відомі випадки отримання потомства також з ооцитів, аспірованих через 24 години після забою¹.

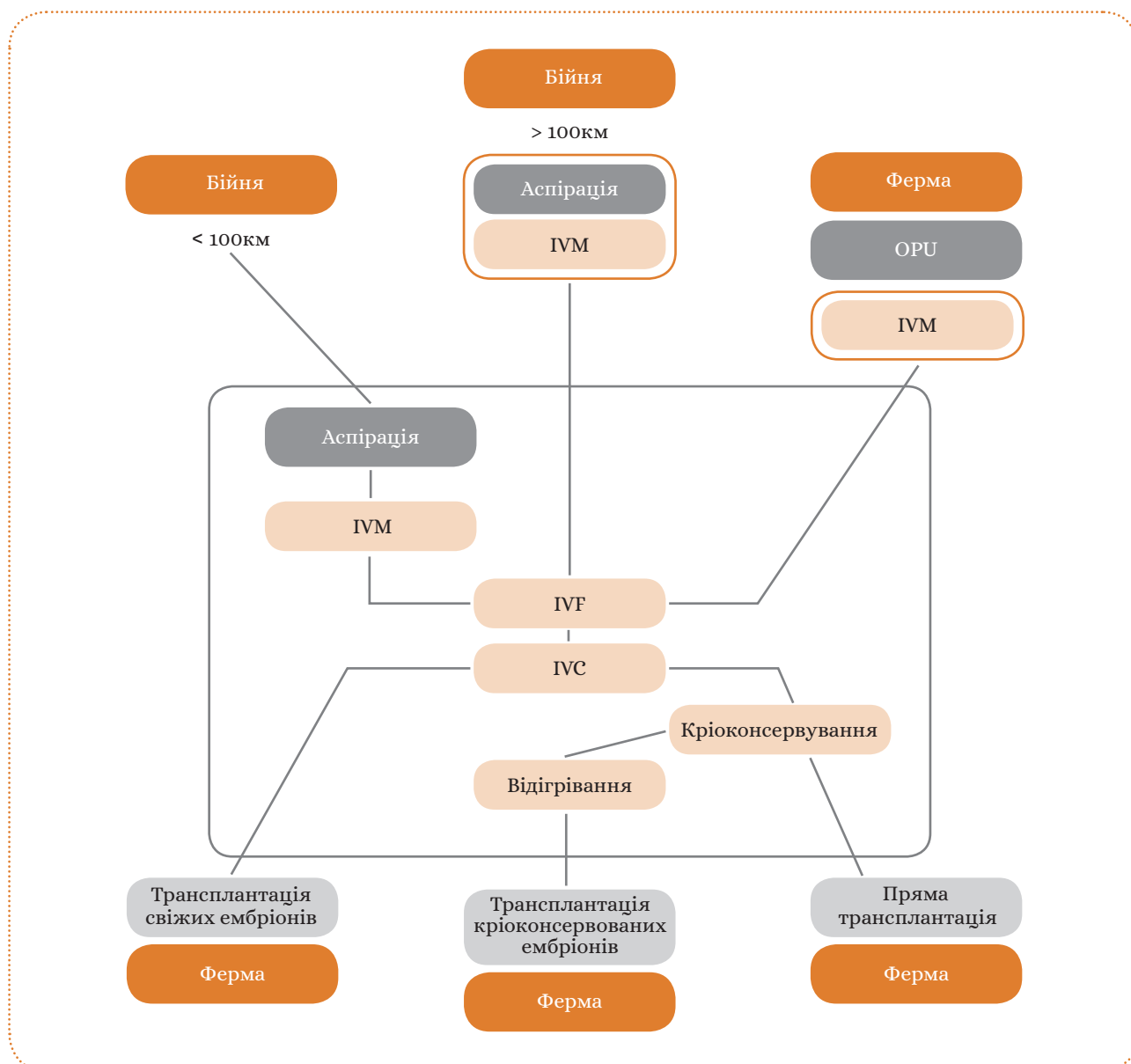


1.1.2 Невдала альтернатива - віддалена бійня - це ускладнює ситуацію, робить її набагато складнішою, набагато дорожчою і, в довгостроковій перспективі, нестабільною. У таких ситуаціях вам слід створити або орендувати приміщення поруч із бійнею: чисте приміщення з найпростішим лабораторним обладнанням, необхідним для аспірації та отримання ооцитів, яке використовується лише 1-2 години на день. Також потрібен кваліфікований персонал, який решту дня буде просто працювати в Інтернеті (рідко) або подорожувати місцевими пам'ятками культури з усіма пов'язаними з цим заходами. Також потрібно вирішити проблему з транспортом. У золоту еру дев'яностих ми могли прийти на місцеву залізничну станцію у віддаленому сільському районі Данії і попросити машиніста локомотива передати попередньо підігріту транспортну коробку нашому колезі на пероні в Копенгагені. Все безкоштовно, заради науки. Однак після 11 вересня все стало менш спокійно, особливо коли мова йшла про авіаперевезення. Хоча в деяких країнах професійні послуги з постачання дозрілих ооцитів *in vitro* також можуть бути доступними, але для більшості дослідницьких лабораторій з їхнім зазвичай обмеженим бюджетом це не варіант.

Оскільки така схема включає отримання ооцитів в лабораторії та транспортування в спеціальних інкубаторах і пробірках, які також використовуються після аспірації яйцеклітин (англ. *ovum pickup*, OPU), подробиці будуть розглянуті в наступному розділі.

1.2 Для аспірації ооцитів (OPU)

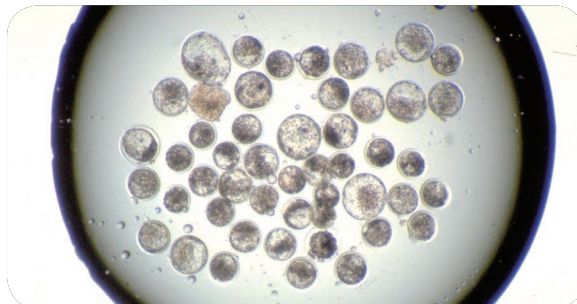
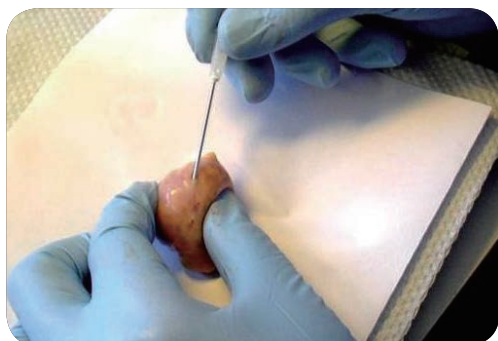
Інший варіант - трансвагінальна аспірація яйцеклітин під контролем ультразвуку *in vivo*. Це поєднання техніки, що використовується в ЕКЗ людини, і результатів роботи на бійні, тобто забір незрілих ооцитів без попередньої гормональної стимуляції. Основна частина роботи виконується кваліфікованим ветеринаром; роль ембріолога полягає в наданні попередньо підігрітих промивних середовищ і пробірок для збору. Переконайтеся, що пробірки зберігаються в підігрітих тримачах, бажано, щоб вони також були теплими під час аспірації в спеціально призначених для цього приладах (як, наприклад, <https://store.agtechinc.com/products/pocket-tube-heater-with-battery-wta>). Подальша робота з отримання ооцитів практично така ж, як і у випадку з людьми та всіма варіантами роботи з великою рогатою худобою, описаними вище. Детальніше див. у наступному розділі.



2 Вилучення ооцитів з яєчників, отриманих на бійні (День -1, продовження)

Існує дві визнані процедури для вилучення ооцитів з яєчників, отриманих на бійні: розтин надгострим хірургічним лезом та аспірація товстою голкою з використанням помірного від'ємного тиску.

Хоча за допомогою розтину яєчників можна зібрати більше ооцитів, ця робота досить трудомістка, вимагає багато часу і розчинів, створює безлад і призводить до отримання ооцитів різної якості. Відповідно, цю процедуру рекомендується застосовувати лише для яєчників померлих цінних корів, де кожен ооцит - унікальний шанс зберегти особливий генетичний матеріал.

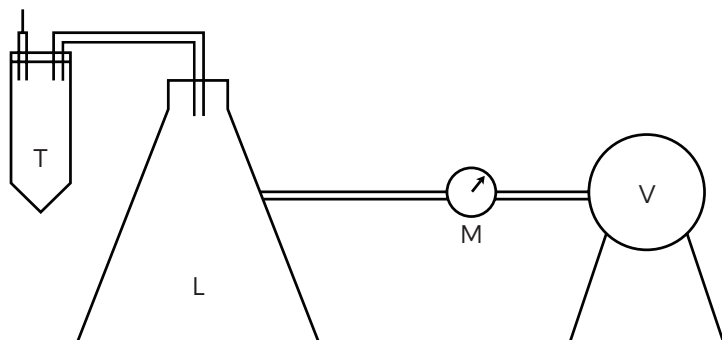


Використовуючи процедуру розтину яєчників, 47 бластоцист 7 доби розвитку, отримані з двох яєчників забитої цінної корови – без гормональної стимуляції

Для масового отримання ооцитів в експериментальних - і потенційно комерційних - цілях аспірація є набагато більш практичним методом. Це швидкий, ефективний і надійний метод, який при правильному використанні дає стабільний результат. У якісних, повноцінно вгодованих тварин 80-90% отриманих ооцитів можуть бути використані для дозрівання і подальшого розвитку.

Аспірація може бути виконана за допомогою простого шприца та голки для підшкірної ін'єкції. Однак це, мабуть, єдина ситуація в ембріологічній лабораторії, коли ми радимо використовувати більш складну техніку - зі зрозумілих причин. Тримати і рухати шприц тією ж рукою, яка повинна створювати належний негативний тиск, майже неможливо. Деякі ооцити будуть без кумулюсного комплексу від раптового агресивного вакууму, в той час як інші залишатимуться у фолікулі, якщо буде застосовано недостатню силу аспірації. На жаль, у більшості лабораторій, що працюють з тваринами, ці факти ігноруються дотепер.

Щоб уникнути розбіжностей і неефективності, можна використовувати складну (і незрівнянно дорожу) вакуумну помпу, розроблену для аспірації яйцеклітин тварин і людей. Однак *набагато дешевша і принаймні не менш ефективна установка* була впроваджена ще 30 років тому в деяких лабораторіях ембріології великої рогатої худоби.



Схематичне зображення запропонованого пристрою для аспірації ооцитів. V: Вакуумна помпа, M: Манометр (необов'язково), L: Велика (500 або 1000 мл) скляна вакуумна колба для уловлювання випадкового переповнення і пом'якшення змін вакууму, викликаних різним опором при введенні голки в яєчник, T: Пробірка для збору ооцитів.

2.1 Що необхідно?

1. Окрема кімната для “брудної” роботи - це є вимогою в деяких країнах і наполегливо рекомендується скрізь. Якщо в лабораторію ембріональної медицини приносити матеріал зі скотобійні, це може серйозно вплинути на якість повітря та порушення умов стерильності. З іншого боку, це окреме приміщення може також використовуватися для інших нестерильних робіт, у тому числі для роботи з репродуктивними органами або лабораторними тваринами.

2. Простий мембранний вакуумний насос без олії, з низьким рівнем шуму і вібрації та постійним вакуумом

Зверніть увагу, будь ласка: високоточні інструменти, такі як перистальтичні насоси, можуть не мати необхідної потужності. Спеціальне лабораторне обладнання може бути дуже дорогим. Вакуумний насос, що працює від водопровідної води, може бути успішно використаний, але для покращення точності ми рекомендуємо дещо дорожчий електричний насос і кілька звичайних лабораторних приладів. Недорогий пристрій може бути цілком придатним і може бути придбаний за 200 доларів США або менше (без комерційного інтересу).

Щоб уникнути вібрації, насос можна розмістити на підлозі лабораторії.

3. Скляна вакуумна колба на 500 або 1000 мл з гумовою пробкою
4. Скляні пробірки для забору крові Vacutainer об'ємом 10 мл з гумовою пробкою
5. 18G (1.2 mm) одноразові голки для підшкірних ін'єкцій
6. Силіконові трубки та з'єднувачі “трубка-голка” що піддаються автоклавуванню
7. Великий нагрівальний столик з металевими нагрівальними блоками для пробірок (ЗОБРАЖЕННЯ БЛОКІВ ДОДАЮТЬСЯ)
8. Великий тупий лабораторний пінцет
9. Паперовий рушник, серветки, рукавички, маски для обличчя (за потреби), захисні окуляри (за потреби)
10. Середовище для аспірації VitaVitro

2



(приклад)

3



4



7



2.2 Термін виконання

Підготовка (включаючи підігрів розчинів)

1 год (ефективна роботи 30 хв)

Аспірація одного яєчника

1 - 2 хв (для досвідчених операторів)

2.3 Підготовка

1. Увімкніть нагрівальний столик і нагрівальні блоки, виставте температуру 30°C
2. Нагрійте необхідну кількість (1 мл/яєчник) аспіраційного середовища в пробірках Vacutainer в нагрівальних блоках. Прогрійте порожні пробірки Vacutainer для аспірації та транспортування в лабораторію
3. Зберіть аспіраційний апарат відповідно до рис. 1 (див. також відео).

Зверніть увагу, будь ласка: для регулювання швидкості аспірації манометрів і регуляторів вакуумного насоса може бути недостатньо, і їх можна використовувати лише для грубого налаштування.

Для точного налаштування зберіть всю установку (включаючи вакуумну ємність) і перевірте співвідношення об'єму та часу аспірації. Приблизний рекомендований об'єм становить 10 мл/30 с.

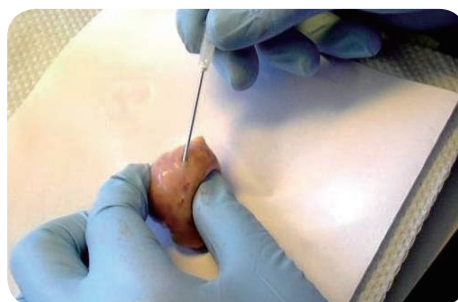
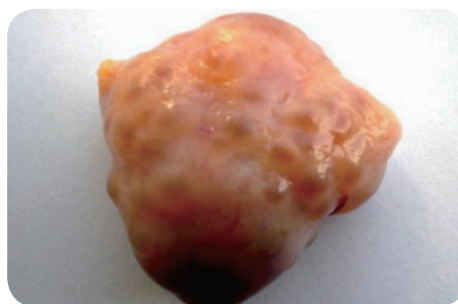
Оптимальне значення може відрізнятися в різних лабораторіях. Якщо ви спостерігаєте низьку кількість ооцитів (менше 6-8 на яєчник), збільште швидкість потоку. Зменште швидкість потоку, якщо більше 10% зібраних ооцитів мають недостатній/пошкоджений шар кумулюсних клітин. Для точного налаштування, введення декількох голок в гумову пробку вакуумної пляшки може бути більш доцільним, ніж регулювання регуляторів насоса. Вставлена голка створює короткочасне замикання і децю зменшує швидкість потоку.

4. Очистіть робочу поверхню розчином 70% етанолу або відповідним лабораторним дезінфікуючим засобом

2.4 Процедура

(див. також відео: <https://vimeo.com/manage/videos/772914189>)

1. Вставте дві голки в пробку пробірки Vacutainer (як на схемі на стор. 8)
одну, щоб просто пройти через пробку та з'єднати з вакуумною колбою
іншу – треба глибоко просунути, для з'єднання з голкою та трубкою, якою аспірувати фолікули
2. Увімкніть насос
3. Почніть з аспірації приблизно 1 мл аспіраційного середовища з попередньо підігрітих пробірок
4. Дістаньте кілька яєчників з колби термоса, покладіть їх на теплу поверхню і накрийте їх вологим паперовим рушником
5. Просушіть один яєчник сухим паперовим рушником
6. Розташувачи отвір голки догори, введіть її в тверду тканину яєчника
УНИКАЙТЕ проколу тонкої оболонки видимого фолікула!
Це може призвести до витікання і втрати вмісту
7. Просуньте голку вперед і увійдіть у видимий фолікул знизу
Після цього просувайте голку вперед і назад, поки фолікул повністю не спадеться
8. Повторіть процедуру з усіма видимими фолікулами таким же чином, використовуючи 2-4 нові точки входу для кожного яєчника.
Ви також можете переміщати кінчик голки наосліп цілими фрагментами, щоб потрапити в фолікули, що розташовані глибоко в тканині яєчника.
Не аспіруйте фолікули розміром більше 6-8 мм в діаметрі



9. Коли це буде виконано для всіх антральних фолікулів, почніть аспірацію нового яєчника
10. Припиніть аспірацію до того, як пробірка заповниться, і переставте пробку з двома голками в нову емність. Закрийте повну пробірку новою пробкою
11. Повторіть кроки 4-10
12. Якщо пошук ооцитів проводить колега в лабораторії, переконайтеся, щоб всі повні пробірки якнайшвидше були доставлені туди в металевому пробіркоутримувачі.
13. Якщо ви працюєте наодинці, зупиніться через 20 хвилин після початку аспірації ооцитів, віднесіть пробірки в лабораторію і почніть пошук ооцитів.

Після завершення відбору та промивання покладіть ооцити в чашку для дозрівання і поставте чашку в інкубатор перед тим, як розпочати наступну серію аспірацій.

Зверніть увагу! Для пунктів 12-13: Важливе, але часто нехтуване правило:

ЖОДЕН ООЦИТ НЕ ПОВИНЕН ПЕРЕБУВАТИ БІЛЬШЕ 45 ХВИЛИН НА СТОЛИКУ, тобто поза фолікулом, але все ще не в інкубаторі! Якщо це означатиме появу логістичної проблеми, треба продумати її вирішення!

Також не забудьте продезінфікувати/очистити зовнішню сторону пробірки Vacutainer з ооцитами перед тим, як принести їх в лабораторію

14. Коли останній яєчник буде готовий, аспіруйте ще трохи аспіраційного середовища, щоб переконатися, що ви отримали всі ооцити, які все ще можуть бути в трубці.

3 Пошук, промивання та дозрівання ооцитів *in vitro* (IVM) (День -1, продовження)

3.1 Що потрібно (на 100 ооцитів)?

1. Базова ембріональна лабораторія, бажано з кімнатною температурою 25°C
2. Інкубатор з 5% CO₂ або 5% CO₂ + 5% O₂ + 90% N₂ (5+5+90%) газовою сумішшю, температурою 38,5°C і максимальною вологістю
3. Бокс з ламінарним повітряним потоком, що вмикається лише під час етапів підготовки
4. Стереомікроскоп з підігрівом столика до 38,5°C
5. Окремий столик з підігрівом до 38,5°C
6. Чотирилункові чашки Nunc
7. Бікарбонатне середовище VitaVitro IVM
8. Парафінова олія VitaVitro Heavy Parafin Oil
9. Одна велика (діаметром 100 мм) пластикова чашка Петрі
лезом (або тонкою голкою) і легким натисканням зробіть тонкі лінії на відстані 1 см одна від одної на зовнішній поверхні дна і зовнішній поверхні кришки (маркери роблять широкі темні лінії, можуть не давати побачити ооцити на них)
10. Дві невеликі (діаметром 33 мм) пластикові чашки Петрі
11. 15 мл аспіраційного середовища
12. Автоматичні піпетки з наконечниками об'ємом 20-200-1000 мкл
13. Одноразові пластикові піпетки Пастера

3.2 Термін виконання

Попереднього дня: приготування чашок:

10 хв

За годину до: нагрівання чашок, середовищ, тощо

1 год (5 хв ефективної роботи)

Весь процес пошуку, промивання та початку дозрівання *in vitro* слід виконати за 20-25 хвилин (тобто протягом 45 хвилин після початку аспірації).

Зверніть, будь ласка, увагу: краще лишити частину ооцитів в осаді, ніж знайти абсолютно всі, але поставити під загрозу їхню здатність до розвитку, оскільки вони занадто довго перебуватимуть у субоптимальних умовах.

Якщо ви не можете дотриматись цього часового проміжку, наступного разу аспіруйте меншу кількість яєчників за один цикл.

3.3 Підготовка

Попереднього дня: приготування чашок для IVМ, чотирилункова чашка з 400 μ L середовища IVМ, покритого 400 μ L парафенової олії (на кожну лунку)

Інкубувати при 38.5°C у 5% CO₂ та атмосферному кисні (або 5+5+90% газова суміш) при максимальній вологості до наступного дня

За годину до початку роботи, помістіть сумарно 15 мл аспіраційного середовища у дві пробірки Vacutainer об'ємом 10 мл у металевий нагрівальний блок на теплому столику, встановіть температуру 38,5°C

3.4 Процедура

(див. також відео: <https://vimeo.com/manage/videos/772914189>)

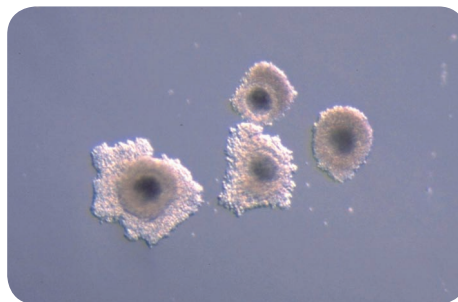
1. Заповніть дві маленькі чашки Петрі аспіраційним середовищем по 3 мл у кожну
2. Пробірки з отриманими ооцитами можна відцентрифугувати протягом 2 хвилин при 500 об/хв (не обов'язково)
3. Видаліть надосадову рідину за допомогою пластикової піпетки Пастера (уникайте перемішування пухкого осаду!) і додайте 1 мл аспіраційного середовища. Обережно перемішайте. Перенесіть суспензію в середину великої чашки Петрі і двічі промийте пробірку 2 мл аспіраційного середовища.
4. Поверніть чашку кілька разів, щоб розрівняти краплю і рівномірно розподілити осад
Дайте чашці постояти близько 2 хвилин, щоб ооцити могли опуститися на дно
5. Помістіть чашку Петрі під мікроскоп і почніть збирати ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) за допомогою піпетки об'ємом 20 мкл

Зверніть, будь ласка, увагу: тривалий і кропіткий пошук і відбір можуть виявитися контрпродуктивними; це може поставити під загрозу якість усіх отриманих ооцитів.

Рекомендується зосереджений і швидкий пошук і відбір ооцитів, спираючись лише на якість кумулюсу (2-3 ущільнених шари кумулюсних клітин навколо).

Цитоплазматичні аномалії, якщо вони не є екстремальними, слід ігнорувати.

5



6. Помістіть отримані ооцити в одну з маленьких чашок Петрі
Коли всі ооцити будуть зібрані в цій чашці, перемістіть їх в іншу маленьку чашку, одночасно підраховуючи їх.
Таким чином, ооцити будуть промиті
7. Після цього ооцити можна перемістити в чотирилунокову чашку із середовищем IVМ.
Помістіть ≤ 25 ОКК в кожен лунку
8. Інкубуйте за умов, описаних вище
9. Тепер можна випити кави та з'їсти десерт (не в приміщенні лабораторії, звісно)
10. Підготуйте все необхідне на завтра (див. нижче)

7



4 Підготовка сперми та запліднення *in vitro* (IVF) (День 0)

4.1 Що потрібно? (на 100 ооцитів)

1. Базова ембріологічна лабораторія, з кімнатною температурою 25°C (!)
2. Інкубатор з 5% CO₂ або 5+5+90% газовою сумішшю, температурою 38,5°C і максимальною вологістю
3. Бокс з ламінарним повітряним потоком
4. Столик з підігрівом до 38,5°C

В день отримання ооцитів

5. Одна чотирилуночна чашка Nunc (4WD)
6. Середовище для запліднення VitaVitro IVF medium
7. Парафінова олія VitaVitro Heavy Paraffin oil
8. Автоматичні піпетки з наконечниками об'ємом 20-200-1000 мкл
9. Середовище для підготовки сперми VitaVitro Sperm Preparation medium
10. Градієнти концентрації для сперми VitaVitro Sperm Gradient medium kit
11. Конічні центрифужні пробірки типу Falcon об'ємом 14 мл з пластиковими кришками

Через 23 год після початку дозрівання

12. Стереомікроскоп зі столиком, який нагрівається до 38,5°C
13. Лабораторна центрифуга з ротором для пробірок об'ємом 15 мл
14. Одноразові пластикові піпетки Пастера
15. Колба-термос з водою, нагрітою до 30-35°C
16. Стерильні ножиці
17. Пінцет
18. Наповнена рідким азотом посудина Дьюара із соломинками кріоконсервованої сперми

4.2 Термін виконання

В день отримання ооцитів

15 хв

Через 23 год після початку дозрівання

90 хв

4.3 Підготовка

В день отримання ооцитів

1. Підготуйте чашку для проведення запліднення: внесіть 400 мкл середовища для запліднення в кожну лунку чотирилункової чашки і покрийте його 400 мкл парафінової олії. Інкубуйте протягом ночі при температурі 38,5°C
2. Помістіть 10 мл середовища для підготовки сперми в пробірку типу Falcon об'ємом 14 мл. Також перенесіть вміст флаконів з розчинами градієнтів Sperm Gradient 55% і Sperm Gradient 90% у дві пробірки Falcon об'ємом 14 мл. Щільно закрийте кришки та інкубуйте пробірки протягом ночі при температурі 38,5°C.

Через 23 год після початку дозрівання

Підготовка не потрібна

4.4 Процедура

1. Вийміть пробірки з градієнтом для сперми з інкубатора. За допомогою одноразової піпетки Пастера наберіть розчину 90% градієнта і внесіть його в іншу пробірку з градієнтом для сперми. Тримавши пробірку під кутом від 30 до 45°, торкніться нижньої стінки кінчиком піпетки трохи вище рівня розчину 55% градієнта, а потім повільно випустіть розчин 90% градієнта. Уникайте утворення бульбашок і перемішування. Два розчини повинні бути розділені дуже тонкою, але видимою лінією

Зверніть, будь ласка, увагу: якщо вам важко вносити 90% Percoll, ви можете додати його в порожню пробірку і нашарувати на нього 55% розчин. Використовуйте метод, який дає більш чітку розмежувальну лінію.

2. Знайдіть соломинку з потрібною спермою і відігрійте її на водяній бані при температурі 30-35°C (по одній соломинці на кожну чотирилункову чашку з середовищем для дозрівання).

Зверніть, будь ласка, увагу: виймаючи соломинку, використовуйте пінцет, а не пальці, щоб уникнути "теплого шоку" для сперматозоїдів.

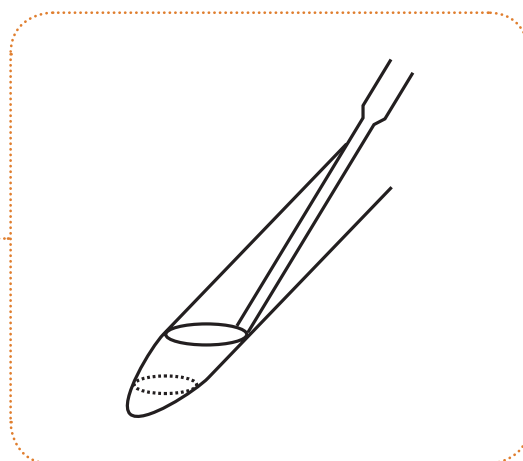
Залиште соломку у воді на кілька секунд

3. Відріжте соломинку з одного кінця і опустіть цей відкритий кінець у пробірку з градієнтом сперми, точно так само, як це було зроблено раніше з піпеткою Пастера. Відріжте інший кінець. Дозвольте вмісту стекти на верхній градієнт. Виділіть якомога більше сперми з соломинки
4. Центрифугуйте пробірку протягом 25 хв при 1500 об/хв при кімнатній температурі
5. Надосадову рідину обережно видаліть одноразовою піпеткою Пастера
6. Додайте 4 мл середовища для підготовки сперми, обережно перемішайте, потім центрифугуйте протягом 10 хвилин при 1100 об/хв
7. Повторіть кроки 5 і 6, але цього разу центрифугуйте при 900 об/хв протягом 10 хв.
8. Під час другого центрифугування, дістаньте з інкубатора чашки для дозрівання (IVM) та запліднення (IVF)

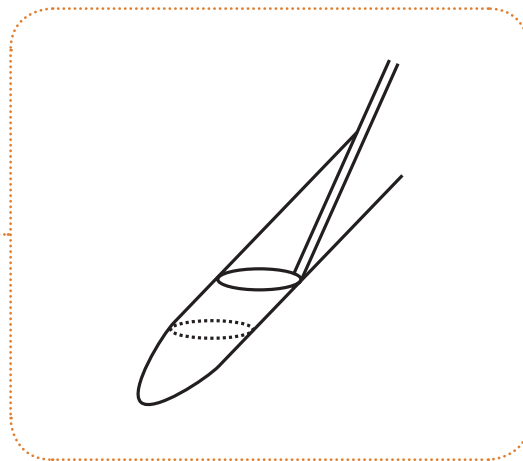
Автоматичною піпеткою на 200 мкл, використовуючи найменшу можливу кількість середовища IVM, зберіть всі ооцити з кожної лунки і перенесіть їх у відповідні лунки IVF.

Зверніть, будь ласка, увагу: НЕ потрібно промивати або відокремлювати певні ооцит-кумулясні комплекси. Виконайте перенесення якомога швидше!

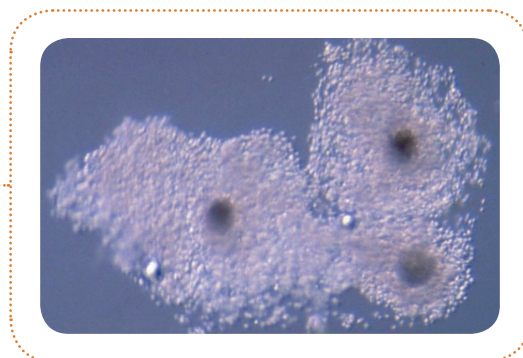
1



3



8



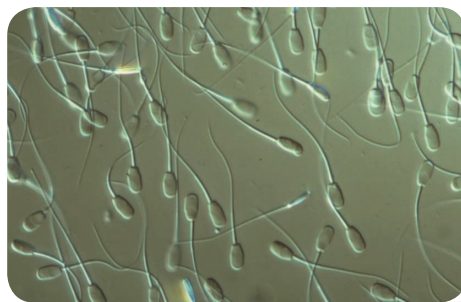
9. Видаліть надосадову рідину з пробірки для підготовки сперми. Додайте 100 мкл середовища для підготовки сперми і ресуспендуйте осад.
10. Додайте по 20 мкл суспензії сперматозоїдів в кожну лунку чашки для запліднення. Інкубуйте протягом 23 годин.

Зверніть, будь ласка, увагу: за винятком особливих ситуацій, немає необхідності в підрахунку та визначенні життєздатності відомої партії сперми. Оптимальна кількість може відрізнятися для різних бутаїв та партій. Однак досвідчені ембріологи можуть

вносити корективи відповідно до вигляду під стереомікроскопом кінцевої суспензії сперматозоїдів. Незначні відмінності в кількості не впливають на результат і не виправдовують трудомістких підрахунків і тестів на життєздатність.

11. Підготуйте все необхідне на завтра (див. нижче)

9



5 Культивування ембріонів in vitro (IVC, День 1 - 7)

5.1 Що потрібно? (на 100 ооцитів)

1. Базова ембріологічна лабораторія, бажано з кімнатною температурою 25°C
2. Інкубатор з 5+5+90% газовою сумішшю, температурою 38,5°C і максимальною вологістю
- Зверніть, будь ласка, увагу:** для культивування ембріонів інкубатор з низьким рівнем кисню є **ОБОВ'ЯЗКОВОЮ** умовою!
3. Бокс з ламінарним потоком повітря, яке вмикається лише під час етапів підготовки
4. Стереомікроскоп з підігрівом столика до 38,5°C
5. Окремий столик з підігрівом до 38,5°C
6. Потужний Vortex, з жорстким гумовим тримачем, здатний витримувати агресивну вібрацію
7. Чотирилункова чашка Nunc
8. Дві маленькі (діаметром 30 мм) пластикові чашки Петрі
9. Конічні центрифужні пробірки типу Falcon об'ємом 14 мл з пластиковими кришками
10. Велика (об'ємом 1,8 або 2 мл) конічна пробірка типу Еппендорф
11. Середовище (однокрокове) VitaVitro IVC з або без FCS (див. Додаток)
12. Парафінова олія VitaVitro Heavy Paraffin oil
13. Середовище VitaVitro TCM-HEPES
14. Автоматичні піпетки з наконечниками об'ємом 20-200-1000 мкл

5.2 Термін виконання

В день запліднення

15 хв

Через 23 год після запліднення

30 хв

5.3 Підготовка

В день запліднення

1. Підготовка чашок для культивування ембріонів: внесіть по 400 мкл середовища IVС у лунки 1 і 2 чотирилункової чашки, а потім покрийте їх 400 мкл парафінової олії. Інкубуйте протягом ночі при 38,5°C
2. Помістіть 7 мл середовища VitaVitro TCM HEPES в пробірку Falcon об'ємом 14 мл, щільно закрийте кришкою і інкубуйте протягом ночі при температурі 38,5°C.

Через 23 год після запліднення

Підготовка не потрібна

5.4 Процедура

1. Додайте 400 мкл середовища TCM HEPES в пробірку типу Еппендорф
2. Додайте 5 мл (!) середовища TCM HEPES в першу маленьку чашку Петрі, залишивши другу порожньою
3. Автоматичною піпеткою на 100 мкл (бажано з одним відбором з усіх чотирьох лунок) відберіть зиготи з чашки для запліднення і помістіть їх у пробірку типу Еппендорф
4. Відкрутіть на Vortex з максимальною швидкістю протягом 2 хв²

Зверніть, будь ласка, увагу: необхідний час залежить від потужності апаратів Vortex.

Результатом має бути відсутність кумулюсних клітин на поверхні ембріонів. В іншому випадку слід повторити/продовжити процедуру вортексингу або додати 1-2 мкл парафінової олії в пробірку типу Еппендорф.

Розсіянні краплі олії можуть допомогти механічно видалити міцно прикріплені клітини кумулюсу.

Будь ласка, зверніть також увагу: виконуючи наступні кроки ЧІТКО, ви зможете виконати роботу дуже швидко - це дуже важливо для досягнення належного результату

5. Автоматичною піпеткою з наконечником на 1000 мкл (відрегульованою на 1000 мкл) відберіть вміст пробірки Еппендорфа і помістіть його в другу (порожню) маленьку чашку Петрі.
6. Відберіть 1000 мкл середовища з першої чашки Петрі, внесіть його в пробірку типу Еппендорф, перемішайте піпеткою, відберіть, внесіть у другу чашку Петрі
7. Повторіть крок 6.
8. Через 10-20 секунд (необхідних для того, щоб ембріони опустилися на дно), обережними круговими рухами покрутіть чашку, щоб зібрати презумптивні зиготи в центрі
9. Перенесіть їх у першу чашку Петрі, бажано одним рухом піпетки з наконечником на 20 мкл. Рівномірно розподіліть їх по всій чашці.
10. Через 10-20 секунд, уникаючи перемішування, зберіть зиготи в центральній третині чашки.

Швидко відберіть 50 зигот і перенесіть їх у першу лунку чашки для культивування ембріонів. Повторіть процес збору і перенесіть решту зигот у другу лунку.

11. Культивуйте до 7 доби без переривання

Зверніть, будь ласка, увагу: НАВІТЬ НАЙКОРОТША ВІЗУАЛЬНА ПЕРЕВІРКА ЕМБРІОНІВ НА 1-6 ДЕНЬ МОЖЕ ЗАШКОДИТИ РОЗВИТКУ!

Для практичних цілей - організація трансплантації ембріонів - ви можете перевірити ембріони на 6-у добу у другій половині дня)

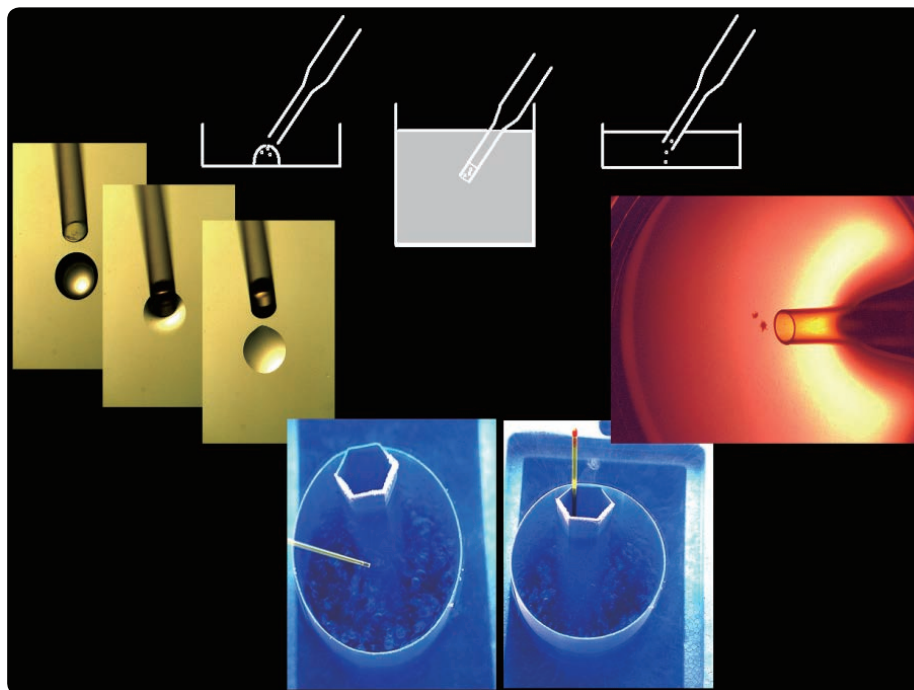
РОЗДІЛ II. КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ОТРИМАНИХ *IN VITRO* ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

У назві розділу ми могли б замінити кріоконсервування на вітрифікацію, оскільки наш розділ не буде присвячений традиційному заморожуванню. На відміну від людського ЕКЗ, вітрифікація була сильним конкурентом традиційного методу заморожування з перших днів розвитку галузі отримання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro*, скажімо, десь з початку 90-х років. На противагу людським ембріонам, ембріони великої рогатої худоби потребують тривалого, семиденного періоду культивування для успішної трансплантації. На початку дев'яностих наші культуральні середовища та методи були недосконалими, що призводило до отримання бластоцист низької якості з темною цитоплазмою через накопичення ліпідів та зниженою здатністю до розвитку. Хоча вагітність і народження були досягнуті, кріотолерантність при традиційному заморожуванні цих ембріонів була нижчою за мінімально необхідний рівень, тому дослідники були змушені знайти альтернативне рішення.

Вітрифікація була обґрунтованою можливістю, оскільки пошкодження від охолодження (пошкодження, що виникають при температурі нижче +14°C; Martino et al., 1996) було особливо шкідливим для цих багатих на ліпідні краплі структур. Відносно високі швидкості охолодження (хоча і далекі від тих, що досягаються сьогодні) допомогли зменшити пошкодження від охолодження і значно покращили подальші результати. Однак застосування вітрифікації, як і всієї процедури ЕКЗ великої рогатої худоби, впродовж десятиліть обмежувалося переважно використанням у лабораторіях. Ця прикра затримка була викликана єдиною практичною - і сумнівною, а точніше помилковою - причиною.

Трансвагінальна аспірація фолікулів яєчників під контролем ультразвуку з подальшим заплідненням *in vitro* (OPU-IVF) у великої рогатої худоби була описаний ще в 1991 році (Pieterse et al., 1991), але широке промислове використання почалося лише через десять років, на рубежі тисячоліть, коли технологія була вдосконалена і пристосована до вимог фермерських господарств. Тим часом завдяки новим середовищам і культивуванню при низькому вмісті кисню, якість ембріонів, отриманих *in vitro*, також значно покращилася. Зрештою, різниця між морфологією ембріонів, отриманих *in vitro* та *in vivo*, була майже повністю відсутня, що призвело до значного зростання показників вагітності/окоту та кріотолерантності. Відповідно, традиційне повільне заморожування знову стало пріоритетним методом, хоча результати все ще були варіабельними; загалом, нижчими за очікування. Як наслідок, приблизно 80% ембріонів у світі трансплантують без кріоконсервування (Ferré et al., 2019) з усіма пов'язаними з цим логістичними проблемами та труднощами трансплантації свіжих ембріонів у промислових масштабах.

Водночас дослідження в галузі вітрифікації також досягли значних успіхів. Спеціально розроблені інструменти-носії дозволили в десятки й сотні разів збільшити швидкість охолодження та відігрівання, практично виключивши травми від холодового впливу, а також радикально знизити концентрацію потенційно шкідливих кріопротекторних розчинів. Після тривалого періоду вагань вітрифікація стала очевидним вибором в ЕКЗ людини, як для кріоконсервування ембріонів, так і ооцитів, обмеживши використання традиційних морозильних апаратів лише чоловічими гаметами.



Цікаво, що в ЕКЗ ВРХ, де перші успіхи були досягнуті завдяки високошвидкісній вітрифікації, цими вдосконаленнями повністю знехтували. Застосування на фермі вимагає простої процедури розморожування-відігрівання і трансплантації, без потреби в лабораторному обладнанні, мікроскопах, посуді та очищеному повітрі. Щоб задовольнити ці вимоги, пряме перенесення після розведення кріопротекторів у соломинці було загальноприйнятим методом при традиційному заморожуванні, але вважалось/вважається, що після вітрифікації це неможливо.

Однак існує проста та ефективна процедура прямої трансплантації після вітрифікації. Принцип був запропонований легендарним вченим-ветераном у галузі репродукції тварин, доктором Кліфтоном Мерфі (Міссурі, США). На основі першого спеціального інструменту для високошвидкісної вітрифікації, відкритої витягнутої соломинки (OPS; Vajta et al., 1998), опис методу був опублікований ще 23 роки тому (Vajta, Murphy, Macháty et al., 1999). Хоча ця процедура неодноразово згадувалася в оглядах, посібниках і лекціях, її застосування обмежувалося дуже вузьким колом науковців і використовувалося здебільшого для трансплантації вручну клонуваних бластоцист без блискучих оболонок. З іншого боку, навіть обмежені результати, досягнуті з цими високочутливими ембріонами, чітко доводять цінність цієї технології.

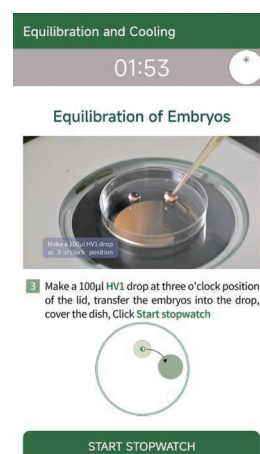
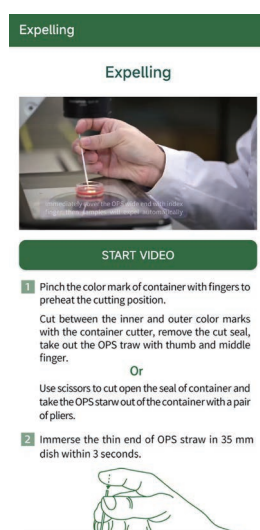
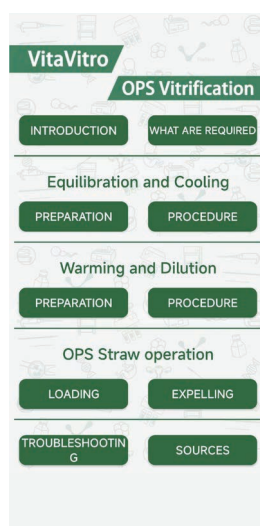
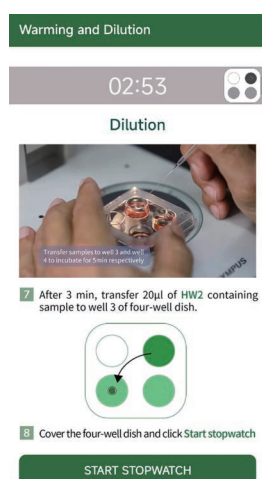
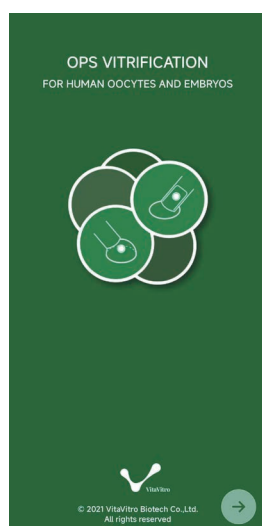
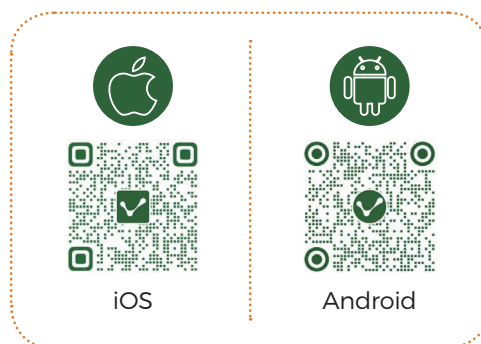
Хоча нещодавно були описані альтернативні способи поєднання вітрифікації з прямою трансплантацією за допомогою різних інструментів, ці методи втрачають або суттєву перевагу високошвидкісного охолодження і нагрівання, або міцність і надійність технології, пов'язаної з OPS.

Цей розділ є ще однією - можливо, останньою - спробою усунути цю полеміку, представити можливості та запропонувати простий, швидкий і практичний ланцюжок методів для широкомасштабного, можливо, промислового застосування вітрифікації ембріонів великої рогатої худоби, вироблених *in vitro*.

1 Вітрифікація: еквілібрація, зневоднення, охолодження та зберігання

Порівняно з ЕКЗ людини, обсяги в ембріології великої рогатої худоби можуть бути значними, тоді як фінансові/людські ресурси є менш доступними. Відповідно, перевага надається простим і коротким процедурам з використанням меншої кількості витратних матеріалів і розчинів. Додатковою вимогою є гнучкість щодо кількості ембріонів, які можна вітрифікувати за один цикл, використовуючи один і той самий інструмент-носії. Ця гнучкість дозволяє використовувати одну і ту ж техніку як для прямої трансплантації одного ембріона на фермі, так і для широкомасштабного зберігання в лабораторних/експериментальних цілях.

Технологія OPS, що використовується для вітрифікації бластоцист людини п'ятої доби розвитку, може бути успішно застосована і для бластоцист великої рогатої худоби, отриманих *in vitro* (коротко, 9-15 хв еквілібрації, 2 x 20 с зневоднення, обидва процеси при 25°C, заповнення носія, охолодження; див. детальну інформацію в застосунку OPS від VitaVtro для телефонів на базі iOS та Android).



Однак альтернативна (фактично, оригінальна) технологія OPS, описана нижче, може запропонувати більше переваг для ембріонів великої рогатої худоби, зберігаючи при цьому всі переваги вітрифікації. Крім того, ця технологія була успішно застосована для всіх стадій розвитку між D3 і D8 без втрат життєздатності та компетентності розвитку.

1.1 Що необхідно?

1. Ембріологічна лабораторія з чистим повітрям та основним обладнанням/інструментами для запліднення великої рогатої худоби *in vitro*.

Стерильні витяжні шафи НЕ потрібні для вітрифікації - якщо вони використовуються, вентилятор повинен бути вимкнений.

Температура в приміщенні не має вирішального значення, оскільки запропонована процедура виконується в теплих умовах.

2. Окремий стіл, що використовується тільки для потреб кріоконсервування, з УСІМА необхідними інструментами, і ТІЛЬКИ тими, що потрібні для кріоконсервування
3. Стереомікроскоп з підігрівом столика і великий плоский столик з підігрівом, обидва встановлені на 39°C
4. Напівпрозорі пластикові контейнери для зберігання, щоб накрити чашку на столику

5. Соломинка VitaVitro Open Pulled Straw (OPS)
6. VitaVitro Container Straw модифікована пластикова соломинка об'ємом 0,5 мл для безконтактного зберігання зразків у рідкому азоті (LN₂). (номер за каталогом DA08001)
- 6a. або пробірки для зберігання VitaVitro OPS з перфорованими стінками та кришками для нестерильного зберігання соломинки OPS (номер за каталогом DA08007)
7. VitaVitro Охолоджувальний Бокс для безпечного охолодження та пакування соломинки в контейнери

Перед використанням продезінфікуйте 70% етанолом, H₂O₂ або лабораторними дезінфікуючими засобами,

розмістіть на окремому столі або підставці, на 15-20 см нижче рівня столу (щоб уникнути випадкового охолодження столу парами LN₂)

з лівого боку стільця (для праворуких ембріологів)

- 7a. або міцну коробку з пінополістиролу (приблизно 25 x 15 x 15 см зі стінками та кришкою завтовшки не менше 3 см)

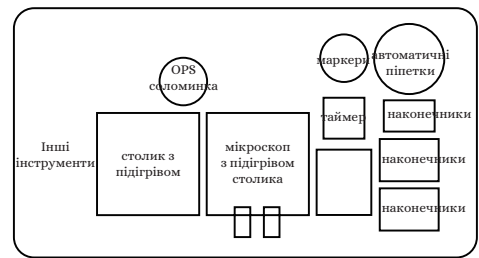
перед використанням продезінфікуйте 70% етанолом, H₂O₂ або лабораторними дезінфікуючими засобами.

Помістіть його на окремий стіл або підставку, на 15-20 см нижче рівня столу (щоб уникнути випадкового охолодження столу парами LN₂)

з лівого боку стільця (для праворуких ембріологів)

8. Пластикові гоблети для зберігання соломинки в LN₂, діаметром 65 та 15 мм відповідно (ваш місцевий постачальник)
9. Набір автоматичних піпеток на 20-200-1000 мкл (вашого улюбленого бренду) зі стерильними наконечниками

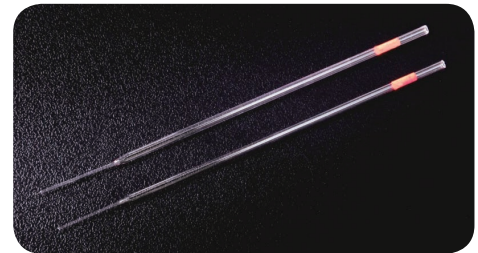
2



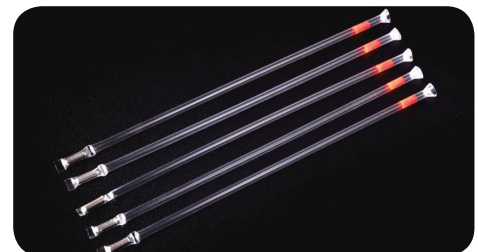
4



5



6



6a



7



10. Піпетка для маніпуляцій/перенесення ембріонів (вашого улюбленого бренду)
11. Чотирилункові чашки (4WD) для вітрифікації та відігрівання (Nunc, Roskilde, Данія)
12. Великий тупий лабораторний пінцет (ваш місцевий постачальник)
13. VitaVitro Термозварювач для соломинок (номер за каталогом VOPS01)
14. Щипці для зачистки дроту (вашого улюбленого бренду)
- 14a. або хірургічні прямі (шовні) ножиці з нержавіючої сталі (ваш місцевий постачальник)
15. VitaVitro Пінцет з малими зубцями з титанового сплаву
16. Таймер (бажано Jadco Electronic Clock-Timer)
17. Маркер з тонким стрижнем, синього та червоного кольорів (бажано набір Thermo Scientific Cryo Marker Pen Set)
18. Папір та ручка для нотаток
19. Набори розчинів для вітрифікації та відігрівання VitaVitro

13



14



15



16



1.2 Термін виконання

Підготовка (включаючи підігрівання чашок та розчинів)

від 30 до 40 хв

Один цикл з однією соломинкою OPS (від 1 до 5 ембріонів/соломинку)

6 хв / соломинку див. 1.4

Паралельний цикл з двома соломинками OPS (від 1 до 5 ембріонів/соломинка)

4 хв / соломинку див. 1.5

1.3 Підготовка

1. Прогрійте холодні пляшки з CHM, CV1, CV2 на нагрітому до 39°C столику під пластиковий контейнер або в інкубаторі боксового типу при 38,5°C протягом 30 хвилин; або на водяній бані при 38,5°C протягом 20 хвилин.
Тим часом покладіть чотирилункову чашку на нагрітий столик і накрийте її іншим пластиковим контейнером

1



2. Додайте CHM to лунки 1 і 2; CV1 до лунки 3; і CV2 до лунки 4

Необхідний об'єм залежить від кількості циклів:

для 1 - 2 соломинок (або 1 - 2 x 2 паралельних циклів)
450 μ l в кожну лунку

для 3 - 6 соломинок (або 2 x 3 - 6 паралельних циклів)
900 μ l в кожну лунку

(для більше ніж 6 соломинок вам необхідно приготувати додаткову чотирилункову чашку)

Не покривайте розчини олією!

Нагрійте чашку ще протягом 5 хвилин на підігрітому столику під пластиковим контейнером

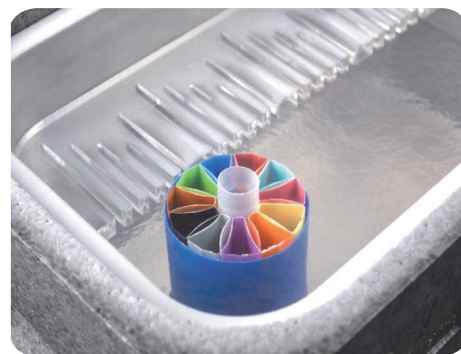
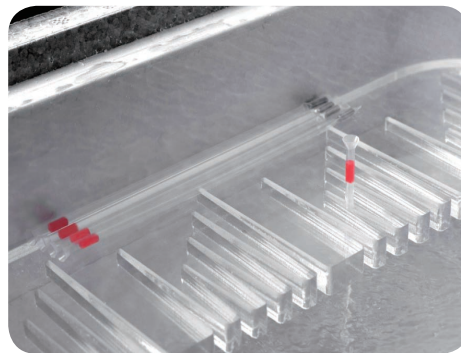
3. Тим часом заповніть охолоджувальний бокс VitaVitro (або коробку з пінополістеролу) рідким азотом (LN_2).

Занурте 65-міліметровий пластиковий стаканчик з кольоровими 15-міліметровими маленькими стаканчиками в охолоджувальний бокс VitaVitro для стерильного зберігання (або з пробірками для зберігання соломинок OPS у пінополістерольну коробку для нестерильного зберігання).

Закрийте кришку посудини для зберігання LN_2

Тримайте посудину для зберігання LN_2 в лабораторії для повторного наповнення

3



1.4 Процедура

(див. також відео: <https://vimeo.com/773294173> (деякі деталі - включаючи охолоджувальний бокс - відрізняються)
Зверніть, будь ласка, увагу: максимальна кількість ембріонів для вітрифікації в одній соломинці OPS залежить від потреб та досвіду оператора. На початковому етапі рекомендується використовувати лише 1 або 2 ембріони.

Еквілібрація та зневоднення є процесами, що залежать від температури. Недостатнє прогрівання розчинів і чашок може негативно вплинути на результати. Використання розчинів при температурі тіла великої рогатої худоби може дозволити радикально скоротити час еквілібрації і зневоднення. Однак при цій температурі випаровування може призвести до підвищення осмоляльності розчинів і пошкодження зразків.

Хоча лише невеликий об'єм CV2 використовується для останнього етапу зневоднення, запропонований великий об'єм розчину підтримує необхідну температуру і осмоляльність. Однак більше шести послідовних циклів (або більше 40 хв робочого часу загалом) можуть призвести до значного випаровування і погіршення результатів.

Зверніть, будь ласка, увагу: для стерильного зберігання в VitaVitro Container Straw: перед вийманням ембріонів з інкубатора покладіть необхідну кількість Container Straw (по одній на кожну соломинку OPS) горизонтально на полицю охолоджувального боксу VitaVitro. Увімкніть термозапаювач.

Зверніть, будь ласка, увагу: цей опис призначений для праворуких людей. Колеги-шульги можуть використовувати дзеркальне відображення описаної схеми.

1. Візьміть всі ембріони, які необхідно вітрифікувати в даній чотирилунковій чашці, і помістіть їх у лунку 1, уникайте перенесення надмірної кількості олії

2. Зачекайте, поки всі ембріони опустяться на дно, потім візьміть їх усіх і помістіть у лунку 2; уникайте перенесення олії.

3. Зробіть краплину об'ємом 20 мкл з розчину CV2 (лунка 4) в нижній правій частині всередині чотирилункової чашки.

Для стерильного зберігання поставте Container Straws вертикально, воронкою догори, в проріз охолоджувального боксу VitaVitro.

4. Перенесіть від 1 до 5 ембріонів у CV1 (лунка 3) з мінімально можливим об'ємом середовища. При зануренні в CV1 спочатку аспіруйте приблизно 10 мкл в піпетку, а потім повільно виштовхуйте ембріони. Намагайтеся тримати їх разом і на дні лунки

Тримайте ембріони разом на дні чашки якомога ближче один до одного. Закрийте кришку і екваїбруйте протягом 3 хв під пластиковим боксом

5. Тримайте соломинку OPS лівою рукою, але не закривайте товстий кінець пальцем.

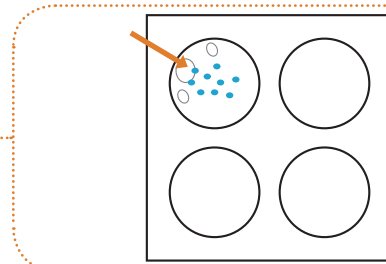
Перенесіть ембріони в якомога меншому об'ємі в краплю CV2 об'ємом 20 мкл.

При зануренні в краплю аспіруйте спочатку приблизно 10 мкл розчину в піпетку, а потім швидко виштовхніть ембріони.

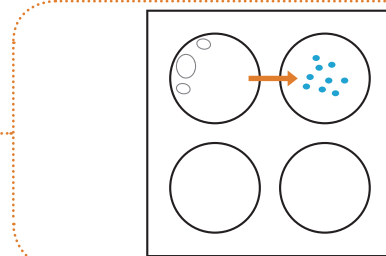
6. Знову аспіруйте ембріони і виштовхніть, повторюйте приблизно 40 с, потім візьміть ембріони в розчині об'ємом 2 мкл і зробіть невелику високу краплю трохи лівіше від центру на дні чотирилункової чашки.

7. Одразу після цього торкніться вузьким кінцем соломинки OPS лівого боку краплі, тримаючи її приблизно під кутом 30° по відношенню до дна. Не закривайте широкий кінець соломинки OPS. На кінці соломинки повинен утворитися циліндр з розчину CV2 висотою приблизно 1 мм, що містить всі ембріони

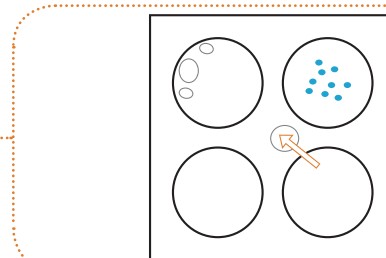
1



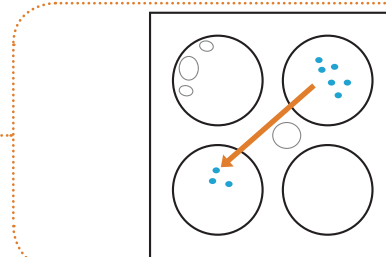
2



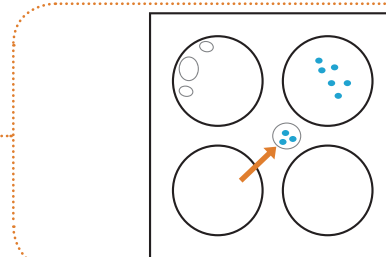
3



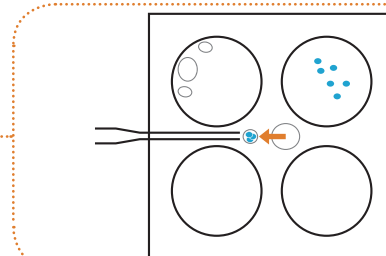
4



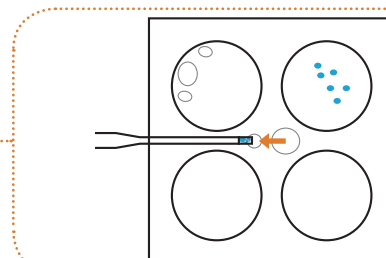
5

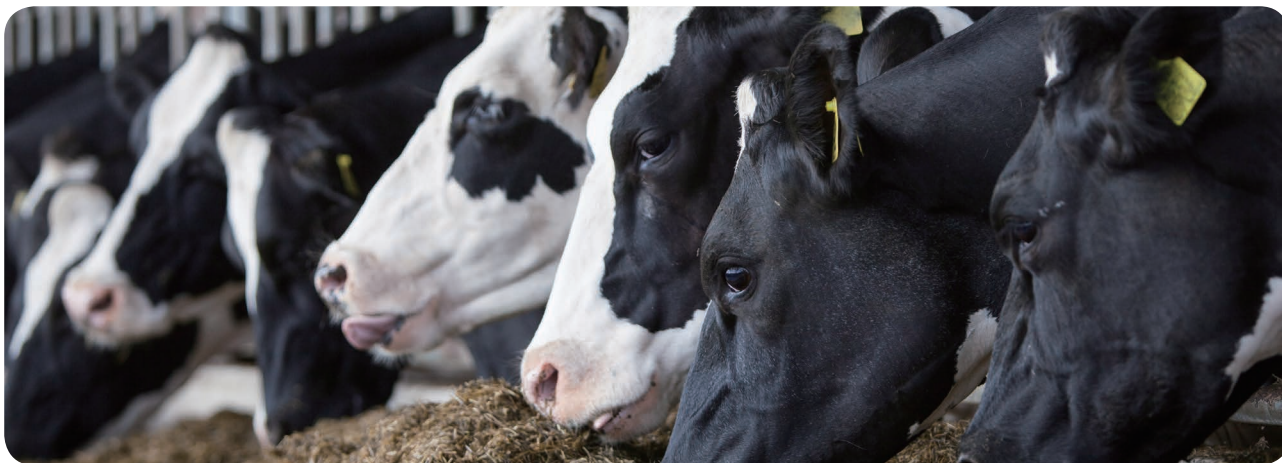


6



7



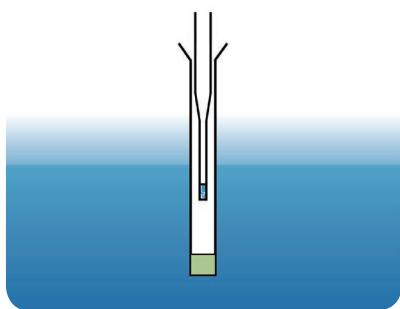
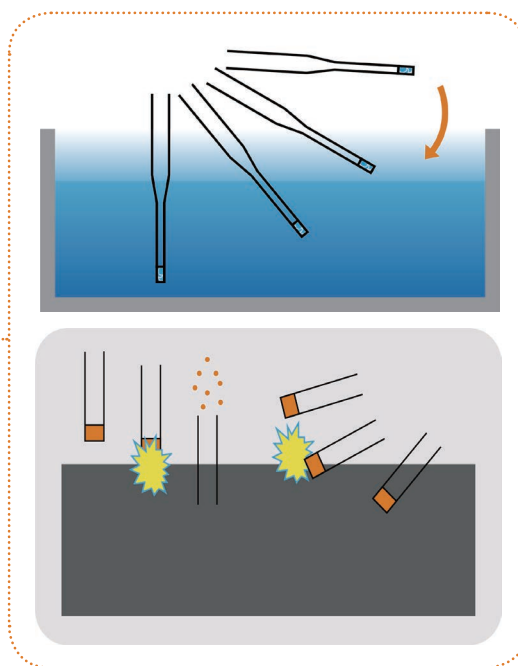


8. Одним швидким і плавним рухом, перевертаючи соломку з горизонтального положення у вертикальне і стрімко проходячи крізь пари азоту, вставте вузький кінець соломинки OPS в рідкий азот.

Зверніть, будь ласка, увагу: якщо ви торкнетеся поверхні у вертикальному положенні, пари рідкого азоту, що утворюється під дією теплої розчину VS2, можуть спричинити вибух розчину і виштовхнути зразки з соломинки.

Також зверніть, будь ласка, увагу: загальний час між перенесенням у краплю об'ємом 20 мкл і зануренням у рідкий азот не повинен перевищувати 1 хв.

9. Через 10 с вставте соломинку OPS або в попередньо охолоджений Container Straw (для стерильного зберігання), після чого термічно запаяйте кінець воронки, або в пробірку для зберігання соломинок OPS, після чого закрийте пробірку перфорованою блакитною кришкою (для нестерильного зберігання)



10. Почніть знову процедуру з перенесення нових ембріонів з лунки 2 до лунки 3

Зверніть, будь ласка, увагу: перед кожним новим циклом вітрифікації змінюйте середовище в краплині об'ємом 20 мкл, використовуючи те саме місце на дні чашки. Натомість, маленьку краплину об'ємом 2 мкл, що використовується для заповнення соломинки, завжди слід робити на новій ділянці дна чашки, щоб уникнути утворення пласкої краплі.

1.5 Прискорена процедура вітрифікації з паралельною еквілібрацією

Зверніть, будь ласка, увагу: цей підхід рекомендується тільки для ембріологів, які мають достатній досвід у вітрифікації методом OPS.

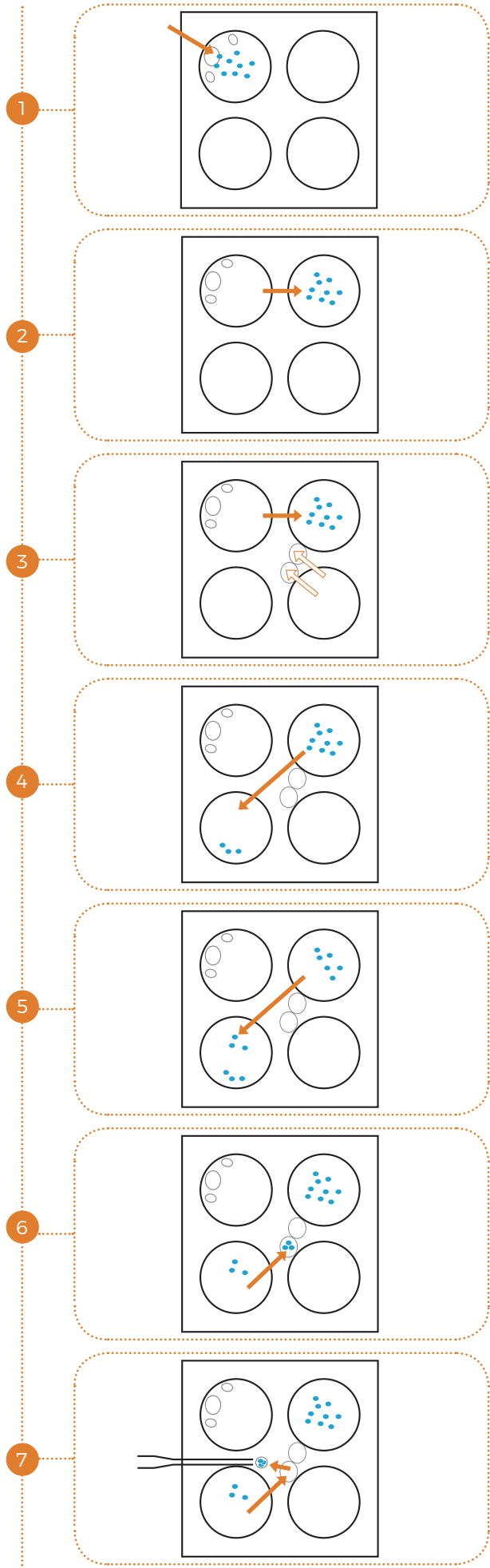
Рекомендується використовувати охолоджувальний бокс VitaVitro та контейнери для соломинок Container Straws.

1. Візьміть всі ембріони, які необхідно вітрифікувати в даній чотирилунковій чашці, і помістіть їх у лунку 1, уникайте перенесення надмірної кількості олії
2. Зачекайте, поки всі ембріони опустяться на дно, потім візьміть їх усіх і помістіть у лунку 2; уникайте перенесення олії.
3. Зробіть дві краплини об'ємом 20 мкл з розчину CV2 (лунка 4) в нижній правій частині всередині чотирилункової чашки.
4. Для стерильного зберігання поставте два Container Straws вертикально, воронкою догори, в два прорізи охолоджувального боксу VitaVitro.
5. Перенесіть від 1 до 5 ембріонів у CV1 (лунка 3) з мінімально можливим об'ємом середовища. При зануренні в CV1 спочатку аспіруйте приблизно 10 мкл в піпетку, а потім повільно виштовхуйте ембріони. Намагайтеся тримати їх разом і на дні лунки, у південному секторі лунки
6. Через дев'яносто секунд після початку еквілібрації першої групи, повторіть процедуру з другою групою, тримайте їх разом і на дні лунки, у північному секторі лунки.

Переконайтеся, що не зміщуєте дві групи

Тримайте соломинку OPS лівою рукою, але не закривайте товстий кінець пальцем.

7. Через три хвилини після початку еквілібрації першої (південної) групи перенесіть ці ембріони в мінімально можливому об'ємі в першу краплину CV2 об'ємом 20 мкл.
8. Після занурення в краплю аспіруйте спочатку приблизно 10 мкл розчину в піпетку, а потім швидко виштовхніть ембріони
9. Занурте солому в рідкий азот: спочатку майже горизонтально, потім одним швидким рухом поверніть соломинку вертикально, стрімко проходячи крізь пари рідкого азоту.



Зверніть, будь ласка, увагу: якщо ви торкнетеся поверхні у вертикальному положенні, пари рідкого азоту, що утворюється під дією теплої розчину VS2, можуть спричинити вибух розчину і виштовхнути зразки з соломинки.

Також зверніть, будь ласка, увагу: загальний час між перенесенням у краплю об'ємом 20 мкл і зануренням у рідкий азот не повинен перевищувати 1 хв.

10. Через 10 с вставте соломинку OPS у вертикально розміщений контейнер для соломинки Container Straw (для стерильного зберігання).

Термічно запаяйте кінець воронки запаювачем.

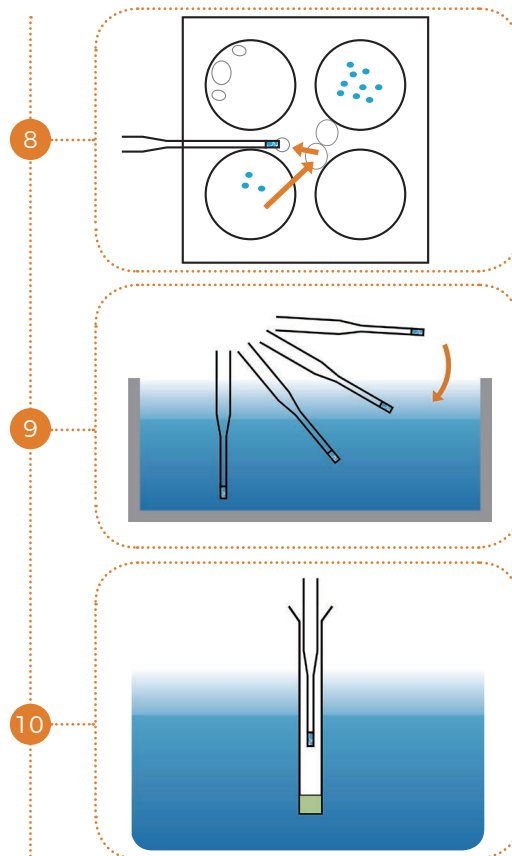
11. Відразу після цього повторіть кроки 5 - 8 з другою групою (лунка 3, північний сектор).

12. Почніть процедуру знову з перенесення нових ембріонів з лунки 2 до лунки 3

Зверніть, будь ласка, увагу: перед кожним новим паралельним циклом вітрифікації змінюйте середовище в краплях об'ємом 20 мкл, використовуючи одне і те ж місце на дні чашки. Натомість, маленьку краплю, що використовується для заповнення соломинки, завжди слід робити на новій ділянці, щоб уникнути утворення пласкої краплини.

Зверніть, будь ласка, увагу: додаткового підвищення ефективності можна досягти, додавши до ланцюга третій і четвертий паралельні цикли - однак, це вимагає спеціальних навичок і уваги.

З іншого боку, якщо під час роботи виникають технічні проблеми, час еквілібрації в CV1 може бути збільшений до 4 або 5 хвилин без істотного впливу на результат.



2 Відігрівання та регідратація вітрифікованих методом OPS ембріонів великої рогатої худоби в лабораторних умовах

2.1 Термін виконання

Підготовка (включно з нагріванням чашок та розчинів)

від 30 до 40 хв

Одна соломинка OPS (від 1 до 5 ембріонів/соломинку)

20 хв

2.2 Підготовка

1. Нагрійте охолоджені флакони з розчинами CW1, CW2 і CHM на нагрітому до 39°C століку, під пластиковим контейнером або в інкубаторі боксового типу при температурі 38,5°C протягом 30 хвилин; або на водяній бані при температурі 38,5°C протягом 20 хвилин.

Тим часом покладіть чотирилункову чашку на нагрітий столик і накрийте її іншою пластиковим контейнером.

2. Додайте розчин CW1 у лунки 1 і 2, розчин CW2 у лунку 3 і CHM - у лунку 4, по 900 мкл в кожен лунку.

Прогрійте чашку ще 5 хвилин на підігрітому століку під пластиковим контейнером.

3. Тим часом заповніть охолоджувальний бокс VitaVitro (або коробку з пінополістиролу) рідким азотом (LN₂); Додайте кольорові пластикові гоблети для зберігання соломинки із вітрифікованими ембріонами. Закрийте кришку.

Зберігайте ємність для зберігання LN₂ в лабораторії для повторного наповнення.

2.3 Процедура

Зверніть, будь ласка, увагу: весь процес відігрівання ідентичний тому, що використовується для ооцитів/ембріонів людини і добре проілюстрований в застосунку OPS (див. QR-код на сторінці).

Єдина відмінність полягає в тому, що вам потрібно нагріти зразок у лункі 1, а не в окремій чашці Петрі.

Оскільки під час цього процесу немає часу слідкувати за послідовними малюнками, ми пропонуємо вам переглянути ці посилання разом з фотографіями нижче,

і попрактикуватися виконувати процедуру перед тим, як почати використовувати її для живого матеріалу.

Зверніть, будь ласка, увагу: під час всієї процедури не тримайте широкий кінець соломинки OPS біля очей. Випаровування LN_2 може виштовхувати мікрокраплі LN_2 і спричинити травму.

1. Помістіть лунку 1 чотирилункової чашки у фокус мікроскопа. Використовуйте мале збільшення, щоб бачити лунку повністю
2. Після стерильного зберігання в контейнерах для соломинки VitaVitro Container обріжте контейнер за допомогою інструменту VitaVitro Straw cutter на 2 см нижче рівня краю товстого кінця соломинки OPS.

Зніміть кришечку з запаяним зрізом і візьміться за широкий кінець соломинки великим і середнім пальцями правої руки

ВУЗЬКИЙ КІНЕЦЬ СОЛОМИНКИ OPS, ЩО МІСТИТЬ ЕМБРІОНИ, ПОВИНЕН ЗАЛИШАТИСЯ НИЖЧЕ РІВНЯ РІДКОГО АЗОТУ !!!

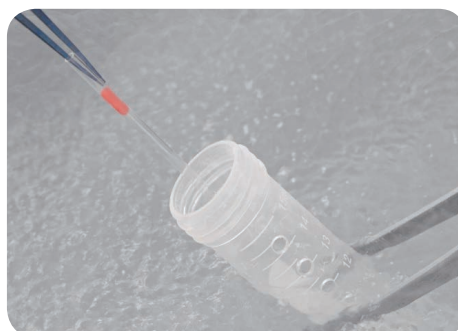
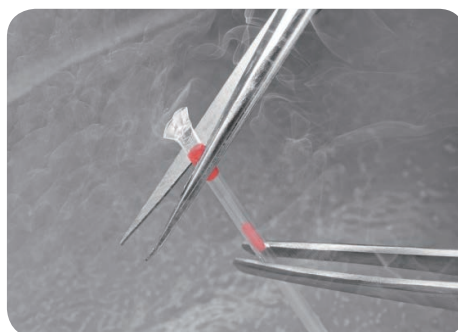
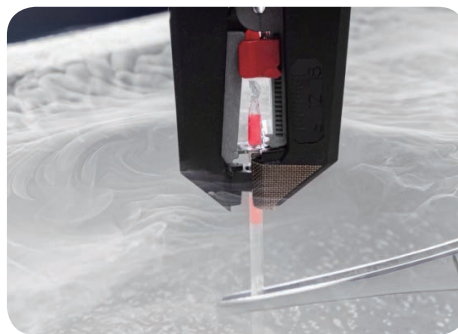
Або ж використовуйте ножиці, щоб перерізати контейнер вище товстого кінця соломинки OPS

Візьміть соломинку OPS пінцетом з малими зубцями і підніміть її так, щоб великим і середнім пальцями правої руки можна було захопити широкий кінець соломинки.

ВУЗЬКИЙ КІНЕЦЬ СОЛОМИНКИ OPS, ЩО МІСТИТЬ ЕМБРІОНИ, ПОВИНЕН ЗАЛИШАТИСЯ НИЖЧЕ РІВНЯ РІДКОГО АЗОТУ !!!

Після нестерильного зберігання в пробірках VitaVitro для зберігання соломинки OPS зніміть ковпачок, візьміть обрану соломинку пінцетом з маленькими зубчиками і підніміть її так, щоб великим і середнім пальцями правої руки можна було захопити широкий кінець соломинки.

ВУЗЬКИЙ КІНЕЦЬ СОЛОМИНКИ OPS, ЩО МІСТИТЬ ЕМБРІОНИ, ПОВИНЕН ЗАЛИШАТИСЯ НИЖЧЕ РІВНЯ РІДКОГО АЗОТУ !!!



2

3. Переконайтеся, що спосіб захоплення соломинки OPS великим і середнім пальцями дозволяє безпечно закрити широкий кінець вказівним пальцем; але НЕ ЗАКРИВАЙТЕ кінець поки що.
4. Після кількох секунд зосередженості підніміть соломинку OPS і почніть рахувати, наближаючись до лунки 1 з середовищем для відігрівання.

Один - два - три - занурюємо - закриваємо. На кожну дію по одній секунді

- на "три", соломинка OPS має бути над розчином CW1. Слідкуйте за нею під мікроскопом
- на "занурюємо", опустіть соломинку OPS в розчин CW1, тримаючи її в майже горизонтальному положенні (таке положення забезпечує кращий візуальний контроль і дозволяє уникнути вибуху спричиненого випаровуванням залишків рідкого азоту)

Ви побачите короточасне часткове затемнення³ стовпчика розчину, потім прояснення, і - в результаті капілярного ефекту - стовпчик почне рухатися вгору

- на "закриваємо", негайно закрийте широкий кінець соломинки вказівним пальцем, і **ТРИМАЙТЕ ЙОГО ЩІЛЬНО ЗАКРИТИМ.**

Збільшення тиску повітря, що нагрівається всередині соломинки OPS, виштовхне стовпчик розчину (разом з ембріонами) назад, і вони плавно витечуть у розчин CW2⁴.

5. Відразу після вилучення перенесіть ембріони в лунку 2, закрийте кришкою і почекайте 5 хв.

Бластоцисти будуть спливати, потім раптово колапсують і опускаються на дно

6. Перенесіть ембріони з великою кількістю розчину (наприклад, 50 мкл) в лунку 3 і почекайте 5 хв.
Якщо клітинна маса утворює невелику кульку з рівними контурами, прогноз хороший
7. Перенесіть ембріони з великою кількістю розчину в лунку 4 і зачекайте 5 хв.
У лунці 4 може розпочатися повторне формування бластоцеля
8. Перенесіть в чашку для культивування

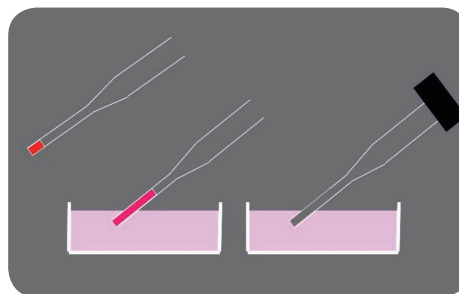
Зверніть, будь ласка, увагу: як згадувалося раніше, ми наполегливо рекомендуємо спочатку потренуватися: зробіть кілька циклів імітації відігрівання-видалення, використовуючи лише розчини, а потім дегенеровані ембріони.

Не забувайте: ви повинні як слід охолодити соломинку OPS (протягом 10-15 хв у рідкому азоті), щоб витіснити вміст разом з повітрям, що нагрівається всередині соломинки.

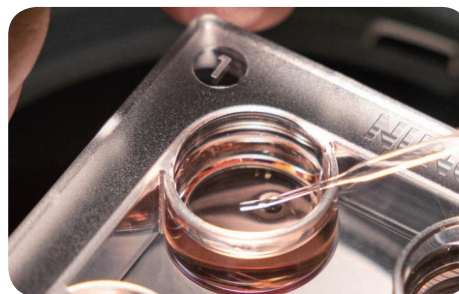
3



4



5



3 Відігрівання ембріонів великої рогатої худоби після вітрифікації методом OPS для прямої трансплантації

3.1 Що необхідно?

1. Соломинка для прямої трансплантації - VitaVitro Direct Transfer (DT) straw
2. Розчини для відігрівання VitaVitro Direct Transfer Warming Solution (DTWS: середовище Holding Medium з 0.2 М сахарози)

Зберігати в холодильнику та нагрівати до 35-39°C в оригінальному флаконі перед використанням

3. Лабораторний скляний термометр (бажано довжиною 300 мм, з діапазоном 0-50°C)
або надійний цифровий термометр із зондом, що можна занурювати у рідину
4. Ізотермічна посуда об'ємом від 400 до 500 мл (наприклад, термос Thermos Thermosafe)

5. Гаряча та холодна вода (бажано стерильна)

6. Стіл або тумба з (бажано) темною поверхнею і стілець, відрегульований до зручного положення.

Ножиці (простерилізовані або продезінфіковані) для відрізання воронкоподібного кінця соломинки для прямої трансплантації DT straw.

7. Автоматична піпетка з наконечниками об'ємом 10-100 мкл

4



3.2 Термін виконання

Підготовка

10 хв

Процедура

1 хв

3.3 Підготовка

1. Проздезінфікуйте внутрішню поверхню посудини, а потім наповніть її водою температурою 39°C до рівня 10 см. Контролюйте та регулюйте температуру протягом всієї процедури.
2. Наповніть соломинку для прямої трансплантації DT straw розчином DTWS, набравши стовпчик середовища висотою приблизно 2,5 - 3 см, потім стовпчик повітря висотою приблизно 1,5 - 2,0 см, потім знову середовище, залишаючи 0,5 см порожнього простору на відкритому (воронкоподібному) кінці. Помістіть соломинку для прямої трансплантації DT straw в посудину відкритим (воронкоподібним) кінцем догори. Нагрійте протягом 5 хвилин.



3.4 Процедура

(див. також коротке відео тут: <https://www.youtube.com/watch?v=L8HW30SHL6c>)

3. Розмістіть соломинку для прямої трансплантації DT straw вертикально перед темною, рівною поверхнею (столом, килимком для миші тощо) для кращої видимості.

Міцно тримайте її, а руку опирайте на край столу. Переконайтеся, що ви бачите кінець воронки під кутом 45 градусів

4. Вийміть соломинку OPS з рідкого азоту*, тримаючи її великим і середнім пальцями. Вказівний палець повинен знаходитися в зручному положенні для закриття товстого кінця (пізніше) Quando a OPS deixar o nitrogênio líquido, inicia-se a contagem:

Коли соломинка OPS опиниться поза рідким азотом, почніть рахувати:

Один - два - три - занурюємо - закриваємо. На кожну дію по одній секунд

Швидко наблизьтеся до воронкоподібного кінця соломинки для прямої трансплантації DT straw

** Для правильного вилучення соломинки з пробірки або контейнера для зберігання див. попередні розділи*

5. На “три”, ви маєте опинитися всередині воронки. Доторкніться до стінки і повільно рухайтесь далі
6. На “занурюємо”, помістіть кінець соломинки OPS у середовище для відігрівання та повністю занурте колонку з ембріонами
7. Менш ніж через 1 с після занурення, ви побачите, як розчин піднімається в соломинку OPS завдяки капілярному ефекту.

Коли ви це побачите, **закрийте** товстий кінець соломинки OPS вказівним пальцем

Міцно тримайте, не відпускайте!

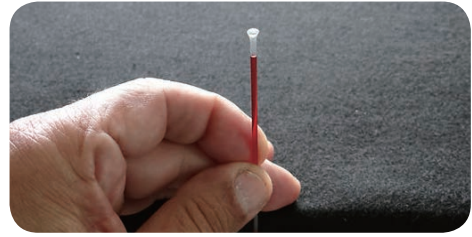
Якщо кінець щільно закритий, то тепле повітря в соломинці OPS повністю витисне розчин з ембріонами в соломинку з розчином для відігрівання

8. Коли повітря досягне кінця соломинки OPS, але до того, як почнуть утворюватися пухирці повітря, повільно підніміть і витягніть соломинку OPS із соломинки для прямої трансплантації DT straw, міцно тримаючи її кінець

Тримайте кінчик соломинки OPS в контакті з внутрішньою стінкою соломинки для прямої трансплантації DT straw, це допоможе видалити весь розчин - і всі ембріони - з соломинки OPS

Відсутність розчину в соломинці OPS означає, що всі ембріони вийшли. Мікроскопічний контроль не потрібний

3



4



5



6



7



8





Зверніть, будь ласка, увагу: якщо розчин залишився в соломинці OPS, ви не можете повторити той самий процес! Не намагайтеся закривати і відкривати кінець соломинки знову і знову. Просто вставте кінчик автоматичної піпетки у відкритий кінець соломинки OPS і обережно виштовхніть середовище у соломинку для відігрівання. Ви також можете промити кінець соломинки OPS, обережно піпетуючи. Це екстрена процедура для початківців, яка дуже рідко потрібна в повсякденній практиці.

Наполегливо рекомендується почати з невеликого тренування, кількох раундів імітації відігрівання-вилучення, використовуючи дегенеровані ембріони. Не забувайте: ви повинні як слід охолодити соломинку OPS (протягом 10-15 хвилин у рідкому азоті), щоб виштовхнути вміст соломинки разом з повітрям, що нагрівається в ній.

3.5 Трансплантація ембріонів

Трансплантацію можна здійснювати відразу після відігрівання або через 15 хвилин. Зберігайте соломинки для прямої трансплантації DT straws теплими протягом періоду очікування, знову помістивши їх у посудину з водою температурою 39°C.

Перед трансплантацією просто відріжте ножицями воронкоподібний кінець соломинки для прямої трансплантації DT straw і вставте соломинку в катетер для трансплантації ембріонів.



ДОДАТКИ

1 Визначено чи ні - питання білкових добавок

З моменту першої спроби культивування ембріонів ссавців *in vitro* головною метою було створення повністю визначеного середовища, без будь-яких невідомих компонентів, щоб усунути розбіжності, уникнути потенційного забруднення і зробити результат більш передбачуваним.

Визначені компоненти, тобто неорганічні макромолекули, можуть забезпечити відповідну фізичну підтримку, наприклад, поверхнево-активні властивості для запобігання адгезії або для оптимізації осмотичного тиску. Однак очищений альбумін містить вітаміни, гормони, біологічно активні ліпіди та ліганди, а також нейтралізує певні токсини, які можуть бути присутніми в середовищі для культивування ембріонів. Ці ефекти збільшують швидкість розвитку як *in vitro*, так і після трансплантації ембріонів. Подальшого покращення можна досягти за допомогою більш складних білкових добавок, наприклад, додавання глобулінів або використання сироватки замість очищених білків.

Щоправда, сироватка в культуральному середовищі сьогодні вважається смертним гріхом - хоча обвинувачення має кволі докази.

Один з аргументів полягає в тому, що сироватка - на відміну від альбуміну - не є компонентом рідини труб або матки. А чи є ЕДТА або полівінілалкоголь природними компонентами?

Інша проблема полягає в тому, що сироватка може викликати аномалії розвитку, які узагальнено називають "синдромом великого потомства". Ще одна поширена байка, як і історія про "токсичний ДМСО" та необхідність оновлювати середовище під час культивування ембріонів. Крім овець, немає жодних доказів того, що сироватка викликає велике потомство в інших ссавців (J. Thompson, особиста інформація). Натомість субклітинні морфологічні зміни пов'язані не з сироваткою, а з її передозуванням. Аналогічно до альбуміну (O'Neill, 2008), традиційних 20% сироватки більш ніж достатньо, щоб забезпечити відмінну підтримку і не викликати жодних негативних побічних ефектів.

Ми наполегливо рекомендуємо не виливати дитину разом з водою з ванночки (ідіома походить від німецького прислів'я "das Kind mit dem Bade ausschütten"). Використовуйте середовище з 5% добавкою FCS, як у середовищі VitaVitro Single Culture.

Або, доклавши трохи більше зусиль, приготуйте і додайте "саморобну" сироватку дорослої корови до безбілкових середовищ.

Сироватки, отримані від дорослої великої рогатої худоби, містять вдвічі більше білка, ніж ембріональні або новонароджені. Сироватка дорослої корови може подвоїти швидкість росту моношарів фібробластів (Vajta et al., 2003) і суттєво покращити розвиток ембріонів великої рогатої худоби (Holm et al., 1999). Ефект не залежить від репродуктивного циклу або віку тварини-донора.

Відмінності між тваринами можуть існувати, але якщо ви знайдете належну корову-донора, її можна буде використовувати протягом усього життя. Відповідно до нашого досвіду, з чотирьох вгодованих, здорових корів принаймні одна дає відмінну сироватку для культивування ембріонів. Тому ми пропонуємо зібрати невелику кількість крові у чотирьох кандидатів, протестувати всі чотири сироватки в трьох послідовних експериментах з культивування ембріонів і використовувати найкращу з них протягом багатьох років. Забір крові у великої рогатої худоби (до одного літра за процедуру) та приготування сироватки є рутинним процесом для ветеринарів та експертів з культури тканин.

(Зверніть увагу - колись модна процедура теплової інактивації насправді не потрібна і може поставити під загрозу корисний ефект, знищивши деякі фактори, що сприяють росту).

Дозвольте навести додатковий, дуже суб'єктивний аргумент. У 21 столітті, коли ми не заклопотані проблемами COVID та арміями-загарбниками, ми боремося проти всього синтетичного. Люди віддають перевагу натуральним лікам, одягу, добривам. Назад до природи. Чи повинні ми позбавляти наші ембріони десятків корисних натуральних продуктів - відомих і невідомих компонентів сироватки - тільки тому, що ми не знаємо точно, що це таке і як воно працює?

Додаткову інформацію та аргументи див. в: Vajta et al., 2008.

2 Рідкий азот та безпека праці

Це делікатне питання, тому ми сховали наші коментарі в Додатку. Однак ми повинні пам'ятати, що, працюючи з рідким азотом в ембріональній лабораторії, ми порушуємо правила безпеки праці. Не звичайну ірраціональну бюрократичну тяганину, а раціональну рекомендацію, яка може вберегти нас від серйозних нещасних випадків. Ми не порушуємо одне-єдине правило. Ми порушуємо майже всі.

Наші пояснення прості. Серйозне дотримання всіх відповідних правил поставило б під загрозу нашу роботу з кріоконсервування. Жодна з чинних процедур вітрифікації (або точного піпетування) не може бути ефективно виконана з використанням необхідних товстих рукавичок. Нам потрібні неозброєні очі для мікроскопів, але захисні окуляри для швидкого охолодження та нагрівання. У нас просто немає часу переодягатися між цими фазами роботи. І так далі.

Ми не уявляємо, як вирішити цей конфлікт, і вдячні владі, яка - чи то ненавмисно, чи то свідомо (з благородною метою) - толерує нашу некеровану поведінку. Однак ми завжди повинні пам'ятати, що граємо з чимось на кшталт вогню. Також ми повинні суворо дотримуватися правил, які не заважають нашій роботі, не ризикують нашими яйцеклітинами та ембріонами та можуть захистити нас від травм і смерті.

Без зайвих дискусій, скопіюймо відповідні речення з Тому 1, оскільки, зважаючи на наш світовий досвід, повторення цих пропозицій ніколи не зайве.

«Приміщення для зберігання посудин Д'юара з рідким азотом (загалом об'єм понад 50 л, на практиці так і є в кожній клінічній ембріологічній лабораторії) обов'язково має бути обладнане безпечною та надійною вентиляцією, а також датчиком низького рівня кисню (з дисплеями як зовні, так і всередині кріосховища), а також оснащене системою сигналізації. У разі низького (менше 18%) рівню кисню обов'язково необхідно використовувати респіратори з подачею кисню, заходячи до кріосховища, навіть коли треба надати термінову допомогу людині, що знаходиться в небезпеці в цьому кріосховищі. Один або два комплекти такого респіраторного обладнання мають бути розміщені поруч із вхідними дверима до кріосховища, адже вони можуть врятувати життя. Відсутність цих запобіжних заходів вже призвела до смертельного нещасного випадку в одній з європейських ембріологічних лабораторій для свійських тварин.

І ще одне, яке також слід згадати тут, що за жодних обставин не можна перевозити рідкий азот у закритому транспортному засобі, тобто жодна людина не повинна їхати в тій самій кабіні, в якій перевозиться рідкий азот.»

3 Ефективність та стабільність

Отримання ембріонів у лабораторії - це складна багатоетапна процедура з незліченною кількістю змінних і багатьма непередбачуваними факторами. Відповідно, результат є непрогнозованим.

Ми пропонуємо дві стратегії для досягнення допустимого рівня передбачуваності. По-перше, розбити багатоетапну процедуру на невеликі частини та оцінити ефективність кожної з них окремо. По-друге, стандартизувати всі фактори, включаючи фізичні, хімічні та біологічні складові, всі процедури та - не в останню чергу - навички та дії операторів.

Всі ці пункти здаються очевидними та зрозумілими, немає потреби їх перераховувати. Ми згодні з цим. Ми не стверджуємо, що відкрили філософський камінь. Але, як показує наш досвід, практичне застосування цих принципів є нечастим і спорадичним. Тому ми пропонуємо провести невеликий самоаналіз, а потім систематично переосмислити лабораторну практику - як дослідницьку, так і рутинну - і, за необхідності, внести деякі зміни.

3.1 Контрольні точки

На щастя, більшість процедур для отримання ембріонів відбувається під стерео- або інвертованим мікроскопом, що дає можливість проводити морфологічну оцінку. Ми пропонуємо використовувати цю можливість систематично на кожному етапі роботи. Хоча деякі моменти вже згадувалися у відповідних параграфах, тут ми перерахуємо їх ще раз і доповнимо іншими потенційно корисними ознаками.

- День -1: Отримання ооцитів для дозрівання
Мінімум 2-3 компактні шари кумулюсних клітин навколо; без суттєвих морфологічних відхилень у вигляді та структурі цитоплазми.
- День 0: Ооцити після дозрівання
Ооцити в одній великій скупченій групі лежать у чашці; однорідно експандований кумулюс; немає відмінностей між ооцит-кумуляусними комплексами.
- День 1, перед використанням vortex
Здавалося б, катастрофічний вигляд ("Пейзаж після битви"), зруйновані комплекси, розкидані на дні чашки; скупчення клітин кумулюсу, прикріплені до дна; кілька сперматозоїдів, що безнадійно повзають по дну
- День 1, після використання vortex
Далека від очікуваної ідеалізованої картини: замість звичного вигляду ооцитів на стадії МІІ (однаковий розмір, заповнення приблизно 90% простору в блискучій оболонці; однорідна коричнева цитоплазма), презумптивні зиготи мають зменшений розмір, заповнення 70-80% простору; темна цитоплазма з можливими світлими ділянками; деякий дизморфізм, в тому числі ниркоподібна форма; і в цілому, якийсь бентежний вигляд. Не хвилюйся, друже - це хороші ознаки; твої зиготи щасливі та активні.
- День 6, після обіду
Приблизно 80-85% діляться, 60-65% компактизованих морул та ранніх бластоцист, включаючи 10-15% бластоцист
- День 7, ранок
50% рівень бластуляції, як мінімум половина з них – експандовані бластоцисти, декілька бластоцист виходять або повністю вийшли з блискучої оболонки
- День 8, ранок
80 - 90% бластоцист мають виходити з блискучої оболонки

Додатковою, дуже корисною, але рідко вживаною можливістю є перевірка альтернативного шляху: партеногенетична активація (ПА). За допомогою правильних хімічних речовин і суворого дотримання протоколу вона дає точно таку ж кількість бластоцист у великій рогатій худоби, як і екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ) з найуспішнішою спермою бугаїв.

Перевага цього підходу полягає в тому, що ви можете виявити причину низької кількості бластоцист за допомогою одного експерименту.

Частота бластуляції/якість на 7 добу культивування

ПА	погана	хороша	погана	хороша
ЕКЗ	погана	погана	хороша	хороша
Проблема	ооцити або культивування	сперма або запліднення	метод ПА	проблем немає!

Якщо експансія кумулюсу була ідеальною, подвійні погані результати майже завжди вказують на проблеми з культивуванням ембріонів. Хороший результат ПА і поганий результат ЕКЗ означає проблему зі спермою або заплідненням; і те, і інше легко визначити та виправити. Якщо неефективним виявився тільки метод ПА, ми рекомендуємо виправити його в наступних тестах. А якщо все добре, то розслабтеся. Проблема вирішилася сама собою (сподіваємося).

Основні морфологічні ознаки успішної процедури були описані для вітрифікації в попередньому розділі. Слід ще раз підкреслити, що - на відміну від людини - повне колапсування бластоцист великої рогатої худоби приблизно через 3-4 хвилини після відігрівання є частиною стратегії їх успішного виживання; це може сприяти швидкому видаленню кріопротекторів з бластоцелю.

Перевірка цих контрольних точок може допомогти налагодити/вдосконалити систему отримання ембріонів і усунути помилки, якщо загальна ефективність буде знижена. Зверніть, будь ласка, увагу, що, як і в більшості біологічних процесів (або в кулінарії), хороші результати можна очікувати лише за умови, що всі попередні кроки були успішними. Запізно докладені зусилля можуть допомогти зменшити шкоду, але не призведуть до бездоганного результату.

3.2 Постійність

Зберігайте все без змін.

Майте великий запас всього. Купуйте товари у надійних компаній, і купуйте великі обсяги з однієї партії - лише максимальну кількість, яку можна використати в межах терміну придатності.

Реєструйте кожну зміну в постачаннях, кожну подію, яка може мати найменший вплив на ембріони. Не лише обов'язкові звіти про нещасні випадки, але й неофіційні, суб'єктивні нотатки про дивний запах або дивний тимчасовий відтінок середовища. Ці нотатки можуть стати надзвичайно цінними для ретроспективного пошуку помилок - кошмарної, але регулярної роботи в ембріологічних лабораторіях.

Спробуйте виконати все, кожну дрібницю точно так, як у попередній успішній програмі ЕКЗ-вітрифікації. Спробуйте, хоча це майже нереально. Неможливо повторити будь-яку роботу з ембріоном точно так само. Люди, які стверджують, що вони можуть це зробити, є легковажними та ігнорують те, що може бути важливим. Справжні ж вчені навпаки, не приховують своїх помилок - навіть несвідомо - а полюють на них, реєструють їх і пам'ятають про них.

Ми чули багато історій про те, як великі відкриття відбувалися завдяки провальним експериментам. Хоча багато з цих байок - колоритні міські легенди, деякі з них все ж можуть бути правдою. Крім того, рано чи пізно - якщо ви зробите (і задокументуєте) достатньо помилок - подібні речі трапляться і з вами. Незалежно від того, чи ви зізнаєтесь у своїй невдачі, чи загорнете випадкову помилку в подарунковий папір яскравої наукової теорії (гіпотезу, яку ви сформулювали заднім числом), ваша помилка може стати найкращою статтею у вашій кар'єрі та віхою у розвитку відповідної дисципліни.

Але все це може статися лише в тому випадку, якщо решта вашого дослідження буде виконана бездоганно. Будь ласка, пам'ятайте: створення порядку і прогресу з хаосу було привілеєм Бога, і навіть він (вона?) зазнав невдачі в деяких деталях.

4 Спеціальні техніки для спеціальних ситуацій

4.1 Лунка лунки (англ. the Well of the Well, WOW) чашка виробника VitaVitro - групове vs. індивідуальне культивування

(див. також відео: <https://vimeo.com/632766530?from=outrio-local>)

Групове культивування ембріонів доімплантаційної стадії розвитку багатьох видів ссавців, включаючи велику рогату худобу, значно покращує розвиток *in vitro*. З іншого боку, невелика кількість ооцитів/зигот після аспірації у великої рогатої худоби (або стимуляції при допоміжній репродукції у людини) може поставити під загрозу розвиток.

Культивування в мікролунках пропонує розв'язання цієї проблеми. Фактори, що виділяються ембріоном, не розбавляються, а накопичуються навколо поверхні ембріона і підтримують його розвиток: паракринні фактори замінюються аутокринними. Мікролунки також дозволяють ембріону створювати і підтримувати своє оптимальне фізико-хімічне мікросередовище, подібне до віртуального простору маткових труб.

Однак більшість доступних чашок з мікролунками не підходять для цих цілей, оскільки вони були створені для таймлапс досліджень: їхній розмір занадто великий, і вони мають плоске дно для оптичної чіткості.



Чашка WOW від VitaVitro пропонує рішення для обох випадків, з мікролунками різних розмірів і форм, для таймлапс дослідження та для оптимального індивідуального культивування ембріонів. Для другого варіанту є чашки з конічними лунками з круглим дном, в яких культивуються ембріони в об'ємі 0, 0₂ мкл. При цьому приблизно 50% поверхні ембріона знаходиться близько до стінок лунки, що дозволяє накопичувати виділені важкі ліганди, в той час як легкі продукти метаболізму, зокрема аміак, можуть підійматися і розбавлятися в краплі об'ємом 50 мкл.

Завдяки використанню цієї системи якості і потенціал розвитку ембріонів, що культивуються індивідуально, є такими ж, як і у великих групах. Система також дозволяє проводити ідентифікацію та спостереження протягом усього періоду культивування. Не потрібно змінювати середовище або будь-яке інше втручання протягом усього періоду культивування.

Чашки слід підготувати за день до використання. Нагрійте чашки, середовище та олію до 39°C. Додайте 50 мкл культурального середовища VitaVitro Single Culture в кожне кільце, включаючи ті, що не містять WOW. Накрийте їх з мл важкої олії VitaVitro. Проконтролюйте мікролунки під стереомікроскопом. Бульбашки можуть утворитися в деяких з них (приблизно 10%), але їх можна легко видалити за допомогою мікрокапіляра. Інкубуйте чашку протягом ночі при 39°C в газовій суміші 5 + 5 + 90 і максимальній вологості.

Ембріони слід швидко промити в порожніх краплях, а потім перенести ближче до WOW. За допомогою плавного піпетування або за допомогою підштовхування кожен ембріон повинен бути поміщений в окрему лунку. Під час перенесення в інкубатор слід уникати механічних ударів по чашці. Також слід обережно відкривати та закривати дверцята інкубатора протягом усього періоду культивування. Умови культивування повинні бути такими ж, як описано вище.

При вилученні ембріонів на 7-у добу ми рекомендуємо обережне вимивання, а не аспірацію. Через конічну форму експандовані бластоцисти можуть спонтанно випливати з лунок, починаючи з 7-ої доби в другій половині дня.

Див. більш детально: Vajta et al. 2000; Madani et al. 2022.

4.2 Чашка Humdish від VitaVitro - опис та інструкція з використання

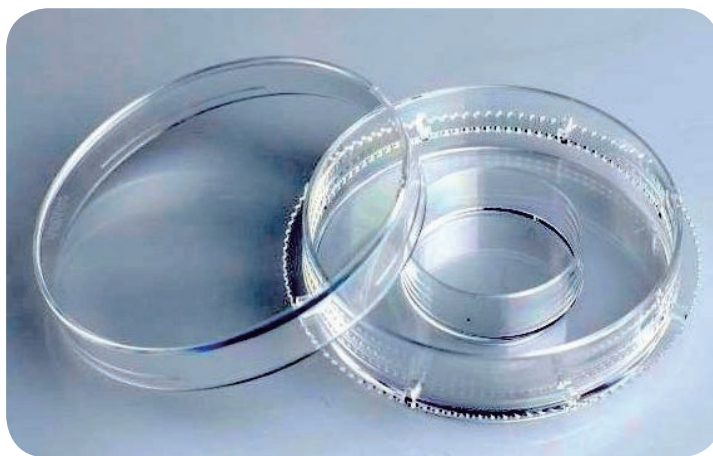
(див. також відео: <https://vimeo.com/manage/videos/773675929>)

VitaVitro Humdish - це спеціально розроблена стерильна пластикова чашка, призначена для передімплантаційного культивування ембріонів ссавців, особливо - але не винятково - для сухих інкубаторів або інкубаторів з нестабільним, неконтрольованим рівнем вологості.

Унікальні параметри чашки VitaVitro Humdish забезпечують вологість >95-98% з 0-ої (або 1-ої) до 7-ої доби (0-а доба: день запліднення або ICSI) як у сухих, так і в (номінально або фактично) вологих інкубаторах.

Той факт, що чашка сама забезпечує вологість, гарантує найвищу стабільність, запобігаючи будь-якому підвищенню осмоляльності протягом усього періоду культивування.

Крім того, велика кількість води, що зберігається в зовнішньому кільці, також запобігає коливанням температури під час відчинення дверей інкубатора або можливого (але не рекомендованого) тимчасового виймання чашок з інкубатора для візуального контролю ембріонів.



Відповідно, VitaVitro Humdish забезпечує оптимальні умови для безперервного культивування в одному середовищі для розвитку одноклітинних ембріонів до стадії бластоцисти.

VitaVitro® Humdish можна використовувати в будь-якому комерційному інкубаторі, який може вміщувати стандартні чашки діаметром 60 мм, включаючи сухі або “вологі” планшетні інкубатори з верхнім завантаженням, інкубатори боксового типу або різні нові комбінації цих пристроїв.

Інструкція з використання

Порада: нагрійте Humdish до 37-38°C і використовуйте олію та воду кімнатної температури. Готуйте чашку для культивування на теплому столику з температурою 37°C, щоб уникнути конденсації парів на кришці.

1. Відповідно до фактичної потреби, зробіть кілька крапель у внутрішній частині Humdish. Ми пропонуємо будь-який об'єм від 5 до 20 мкл. Покрийте краплі 3 мл мінеральної олії.

Щоб уникнути можливого збільшення осмоляльності під час приготування крапель, ви можете використовувати метод “додавання в краплю”: відразу після покриття крапель олією видаліть 80-90% об'єму краплини і замініть його новим середовищем. Використовуйте олію кімнатної температури.

2. Додайте воду

Додайте 12 мл ультрачистої стерильної води у зовнішнє кільце. Уникайте потрапляння води у внутрішнє кільце.

3. Врівноваження

Помістіть VitaVitro Humdish в інкубатор з температурою 37°C⁵, 5% CO₂, 5% O₂ і 90% N₂ і (бажано, щоб уникнути випаровування перед використанням) максимальною вологістю. Інкубуйте протягом ночі.

4. Перенесення ембріонів у VitaVitro Humdish

Після дворазового промивання в краплі з середовищем для культивування перенесіть ембріони у свіжу краплю та культивуйте їх до необхідної стадії. Humdish забезпечує оптимальні умови для безперервного культивування в одному середовищі до стадії бластоцисти.

Інструкція з використання

Попередження: кришка з датчиком, що постачається в комплекті, НЕ ПРИЗНАЧЕНА ДЛЯ МОНІТОРИНГУ чашок, що містять ембріони!

Мета цього додаткового інструменту - протестувати та довести ефективність VitaVitro Humdish для створення і підтримки високого рівня вологості протягом усього періоду культивування у вашому інкубаторі.

Якщо у вас є сумніви щодо необхідності та ефективності використання VitaVitro Humdish у ваших інкубаторах, ми пропонуємо вам зробити два простих вимірювання за допомогою чашок

- з центральною зоною, заповненою краплями та олією, як описано вище, та
- з водою або без води у зовнішньому кільці, відповідно.

Помістіть підключений до мережі пристрій для контролю за межами інкубатора і відстежуйте параметри протягом усього періоду (5, 6 або 7 днів) вашого звичайного культивування ембріонів.

Якщо ви не виявили різниці у значеннях вологості між двома вимірами, то чашки VitaVitro Humdish не потрібні у вашій лабораторії.

Див. більш детально: Chen et al., 2021.

ДЖЕРЕЛА ЛІТЕРАТУРИ:

Chen WB, Machaty Z, Marconetto A, Parmegiani L, Vajta G.

A Simple and Efficient Solution to Eliminate Evaporation in Mammalian Embryo Cultures.

Cell Reprogram. 2021 Oct;23(5):316-318. doi: 10.1089/cell.2021.0061.

Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ.

Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods.

Animal. 2020 May;14(5):991-1004. doi: 10.1017/S1751731119002775.

Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H.

High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins.

Theriogenology. 1999 Sep;52(4):683-700. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00162-4.

O'Neill C.

Review: The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development.

Hum Reprod Update. 2008 May-Jun;14(3):275-88. doi: 10.1093/humupd/dmn002.

Pieterse MC, Vos PL, Kruip TA, Wurth YA, van Beneden TH, Willemse AH, Taverne MA.

Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes.

Theriogenology. 1991 Apr;35(4):857-62. doi: 10.1016/0093-691X(91)90426-e.

Madani S, Machaty Z, Vajta G.

An Alternative Way to Improve Mammalian Embryo Development In Vitro: Culture of Zona Pellucida-Free Embryos.

Cell Reprogram. 2022 Jun;24(3):111-117. doi: 10.1089/cell.2022.0012.

Martino A, Pollard JW, Leibo SP.

Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence.

Mol Reprod Dev. 1996 Dec;45(4):503-12. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<503::AID-MRD13>3.0.CO;2-X.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H.

Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.
Mol Reprod Dev. 1998 Sep;51(1):53-8. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V.

Vajta G, Murphy CN, Macháty Z, Prather RS, Greve T, Callesen H.

In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the open-pulled straw method.
Vet Rec. 1999 Feb 13;144(7):180-1. doi: 10.1136/vr.144.7.180.

Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H.

New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system.
Mol Reprod Dev. 2000 Mar;55(3):256-64. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<256::AID-MRD3>3.0.CO;2-7.

Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H.

Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro.
Biol Reprod. 2003 Feb;68(2):571-8. doi: 10.1095/biolreprod.102.008771.

Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J.

Embryo culture: can we perform better than nature?
Reprod Biomed Online. 2010 Apr;20(4):453-69. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.12.018.

Vajta G, Parmegiani L, Machaty Z, Chen WB, Yakovenko S.

Back to the future: optimised microwell culture of individual human preimplantation stage embryos.
J Assist Reprod Genet. 2021 Oct;38(10):2563-2574. doi: 10.1007/s10815-021-02167-4.



¹ Якщо тривалого транспортування не уникнути, зниження температури до 20 або навіть 10°C під час тривалого транспортування може допомогти мінімізувати пошкодження.

² Хоча більшість лабораторій проводять денудацію за допомогою піпетування, ми пропонуємо вам, на перший погляд, жорстокий метод з використанням Vortex. Можливо, він не має аналогів в природних умовах (за винятком велосипедних перегонів на дуже поганій дорозі без шин), проте завдає менше шкоди, ніж піпетування; видалає всі кумулюючі клітини за короткий проміжок часу, а також вважається стимулом для активації. Судячи з нашого досвіду, зиготи це просто обожнюють.

³ Безпечне проміжне утворення кристалів льоду в розчині, але не в самих зразках. Однак:

- якщо воно покриває всю колонку, ви занадто повільно рахували - занурювали

- з іншого боку, занадто швидке занурення може призвести до утворення в стовпчику невеликих бульбашок (видимих під мікроскопом протягом доли секунди), які можуть спричинити механічне (руйнування) пошкодження зразка.

⁴ у дуже нечастих випадках, коли розчин залишається в соломинці (в результаті неправильного виконання процедури), ви можете сприяти його витіканню, вставивши кінчик автоматичної піпетки на 20 мкл в широкий кінець соломинки OPS, і повільно видавити вміст. Це екстрена процедура для початківців, яка дуже рідко потрібна в повсякденній практиці.

⁵ температура інкубації та період культивування можуть відрізнятися для різних видів тварин

ПОДЯКА ТА ЗАКЛЮЧНІ СЛОВА

Автори висловлюють щирю подяку всім, хто підтримав цю роботу фотографіями, даними, пропозиціями, критикою чи просто терпимістю. Ми просимо вибачення у наших родин за час, який ми відібрали у інших - потенційно більш продуктивних і корисних - занять.

Як і в Томі 1, ми висловлюємо особливу подяку за натхнення, постійну підтримку та сприяння пані Дженні Лін, генеральному директору VitaVitro BioTech Co, Ltd. (Шеньчжень, Китай), та всій компанії. Деякі з представлених інновацій та всі комерційні реалізації стали плодами нашої унікальної співпраці протягом останніх восьми років. Ми дуже вдячні всім співробітникам Ембріологічної лабораторії Датського Інституту Сільськогосподарських наук (Фолум, Юлланд, Данія) за видатні досягнення у створенні багатьох методів, описаних у цій главі.

Ми дякуємо креативному та високоефективному дизайнеру пані Нарі Ю. Ми також висловлюємо особливу подяку доктору Жизель Гамарра та інж. Сержу Лаказу, Auriva Biotechnologies, Денген, Франція; доктору Морне де ла Рей і доктору Роберту Тредвелу, Embryo Plus, Бритс, Південна Африка, за зображення, пов'язані з роботою з тваринами.

Насамкінець, ми також дякуємо вам за те, що ви дочитали цей розділ до кінця. Ми сподіваємося, що він буде корисним для вашої майбутньої дослідницької або комерційної діяльності.

Том 2 матиме продовження в інших розділах, присвячених репродуктивним технологіям людини, перенесенню ядер соматичних клітин тварин та іншим питанням. Також будуть доступні версії різними мовами, включаючи китайську, іспанську, португальську, французьку, українську та інші.

Сподіваємося, що наша комунікація буде двосторонньою. Ми будемо раді пропозиціям, коментарям та виправленням. Для отримання цієї версії англійською мовою, будь ласка, зв'яжіться з Габором Вайтою через електронну пошту gabor.vajta@hotmail.com. Листи будуть відредаговані і додані на веб-сторінку. У разі необхідності ми також внесемо відповідні зміни в основний текст.

Перераховані нижче продукти можна замовити, зв'язавшись з

VitaVitro Biotech Co. Ltd., Шеньчжень, Китай,

Тел: +86 755 84 51 18 13

Ел. пошта: tech@vitavitro.com

Веб-сторінка: www.vitavitro.com



За більш детальною інформацією, технічною підтримкою, потенційною співпрацею та виїзними практичними семінарами, будь ласка, звертайтеся до Габора Вайта, RVT Australia, Кернс, Австралія.

Ел. пошта: gabor.vajta@hotmail.com

Веб-сторінка: <https://gaborvajta.wixsite.com/rvt-australia>



ПРОДУКТИ ВИРОБНИКА VITAVITRO ШЕНЬЧЖЕНЬ ДЛЯ ЕКЗ ТВАРИН

Інформація для замовлення

Назва продукту	Характеристика	Номер за каталогом	Термін придатності	Види
Набір для вітрифікації	CHM: 2 x 4.8 mL; CV1: 1 x 4.8 mL; CV2: 1 x 4.8 mL	DA01001	6 місяців	  
Набір для відігрівання	CW1: 2 x 4.8 mL; CW2: 1 x 4.8 mL; CHM: 1 x 4.8 mL	DA02001	6 місяців	  
Середовище для прямої трансплантації	4 x 4.8 mL	DA13001	6 місяців	
Соломинки OPS та супутні пристрої	OPS + Container straw (1+1)	DA08001	2 роки	  
	OPS + Container straw +DT straw(1+1+1)	DA08002		
	OPS (5)	DA08003		
	OPS (10)	DA08004		
	DT straws (5)	DA08005		
	DT straws (10)	DA08006		
	Storage tube for OPS	DA08007		
Середовище для аспірації	125 mL	DA04001	6 місяців	 
	250 mL	DA04002		
	500 mL	DA04003		
ТСМ-HEPES з 2% сироватки	60 mL	DA05001	3 місяці	 
Середовище для трансплантації (з 20% сироватки)	4 x 4.8 mL	DA14001	3 місяці	 
IVM-Bicarbonate середовище для дозрівання ооцитів	4 x 4.8 mL	DA07001	3 місяці	 
IVM-HEPES середовище для дозрівання ооцитів	4 x 4.8 mL	DA07002	3 місяці	 
Середовище для підготовки сперматозоїдів	30 mL	DA10001	6 місяців	 
Набір градієнтів для сперматозоїдів	Sperm Gradient (55%) 30 mL Sperm Gradient (90%) 30 mL	DA10002	6 місяців	 
IVF середовище для ЕКЗ	30 mL	DA06001	3 місяці	 
IVC Single однокрокове середовище для культивування	4 x 4.8 mL	DA03001	3 місяці	 
Парафінова олія важка	60 mL	DA09001	2 роки	 
Humidish чашка	10шт/уп	DA11010	3 роки	
WOW чашка	10шт/уп	DA12010	3 роки	
Охолоджувальний бокс	1 набір	VOPS04	Н/З	