

Інструкція для користувача

Культуральне середовище In Vitro Maturation Kit (IVM Media Kit)

Опис продукту	Кат. номер	Розмір упаковки
Культуральне середовище In Vitro Maturation Media Kit	ART-1600	
Oocyte Washing Medium 1 x 50 mL		1 x 50 мл
Oocyte Maturation Medium 1 x 20 mL		1 x 20 мл
Embryo Maintenance Medium 1 x 5 mL		1 x 5 мл

Опис

Дані середовища для культивування яйцеклітин (ооцитів) in vitro призначені для підготовки ооцитів до використання у допоміжних репродуктивних процедурах.

Компоненти даного комплексу дозволяють здійснити підготовку зібраних незрілих ооцитів, їх культивування (харчування і дозрівання) перед заплідненням, і наступне культивування ембріонів отриманих з них.

Склад комплексу середовищ для дозрівання ооцитів людини in vitro

1 флакон (50 мл) Культуральне середовище Oocyte Washing Medium; 1 флакон (20 мл) Культуральне середовище Oocyte Maturation Medium

1 флакон (5 мл) Культуральне середовище Embryo Maintenance Medium

Умови зберігання і стабільність

1. Ооцит-кумулюсні комплекси (Cumulus-oocyte-complexes, COCs) збирають аспірацією в культуральну пробірку, що містить приблизно 2-3 мл теплового Культурального середовища Quinn's Advantage® Medium with HEPES (кат. номер ART-1023/1024) і добавкою гепарину (мукополісахарид природного походження, 2 МО / мл); це середовище не поставляється в комплекті.

2. Підготовка Культурального середовища Oocyte Washing Medium перед відбором ооцитів.

Культуральне середовище Oocyte Washing Medium має бути приготоване принаймні за 1 годину перед забором ооцитів і зберігатися при температурі 37 ° C.

Короткий опис процедури:

Для кожного пацієнта готуються три чашки Петрі 35x10 мм, кожна з яких містить приблизно 2,0- 2,5 мл Культурального середовища Oocyte Washing Medium під шаром Культурального середовища Sterile Oil for Tissue Culture (кат. номер ART-4008/4009). Якщо для відбору ооцит-кумулюсних комплексів використовується клітинний фільтр (Falcon, Cell Strainer 352350, 70 мкм нейлон, [www.bd.com / labware](http://www.bd.com/labware)), для кожного пацієнта потрібно приготувати також 50 мл колбу, що містить приблизно 25-30 мл Культурального середовища Oocyte Washing Medium і витримувати її в інкубаторі при 37 ° C; якщо в інкубаторі атмосфера з 5% CO₂, переконайтеся що кришка щільно закриває колбу, щоб уникнути шкідливого зсуву pH.

3. Підготовка Культурального середовища Oocyte Maturation Medium

Ооцит-кумулюсні комплекси без 1-го полярного тіла (1PB) інкубуються в культуральній чашці з центральною лункою (Organ Tissue Culture Dish, Falcon, 60x15 мм), що містить 1 мл Культурального середовища Oocyte Maturation Medium з додаванням фолікулостимулюючого гормону (follicle stimulating hormone, FSH) до кінцевої концентрації 75 мМО / мл і лютеїнізуючого гормону (luteinizing hormone, LH) до кінцевої концентрації 75 мМО / мл, що знаходиться в інкубаторі при 37 ° C і в атмосфері з 5% CO₂ і 95% повітря з високою вологістю (або в суміші з трьох газів - 90% N₂, 5% CO₂ 5% O₂ - і 100% вологості). Максимум 10 ооцит-кумулюсних комплексів повинно культивуватися в кожній чашці.

Культуральне середовище Oocyte Maturation Medium повинно бути врівноваженим з по меншій міру 2 години перед відбором ооцитів (на практиці це робиться протягом попереднього дня).

a) Поміщають 10,0 мл Культурального середовища Oocyte Maturation Medium в пробірку;

b) Повністю розчиняють 1 ампулу з 75 МО фолікулостимулюючого гормону (FSH) і 1 ампулу з 75 МО лютеїнізуючого гормону (LH) в (a)

c) Поміщають 9,9 мл свіжого Культурального середовища Oocyte Maturation Medium в іншу пробірку;

d) Відбирають 100 мкл розчину FSH і LH з пробірки (a) і додають до (c)

- е) Підготовлюють 3 культуральних чашки з центральною лункою (Organ Tissue Culture Dishes, 60x15 мм) для кожного пацієнта. У кожній чашці внутрішня лунка містить 1 мл розчину (d) і зовнішня лунка містить 2 мл розчину (d).
- ф) Накривають культуральні чашки з центральною лункою кришкою і поміщують їх в інкубатор.

Детальні інструкції щодо джерел і додавання фолікулостимулюючого гормону (FSH) і лютеїнізуючого гормону (LH) до Культурального середовища Oocyte Maturation Medium дано у публікації "Керівництво з in vitro дозрівання незрілих людських ооцитів ("Handbook on In Vitro Maturation of Immature Human Oocytes"), RC Chian, 2006, що доступна за запитом до Служби підтримки покупців Sage або в найближчому торговому представництві Sage. Джерелами FSH і LH можуть бути: Repronex® від Ferring Inc. (це комбінація FSH і LH), Humegon® від Organon (це комбінація FSH і LH), Follistim® від Organon (це рекомбінантний FSH); Gonal-F® від Serono (це рекомбінантний FSH), і Pregnyl® від Organon (це хоріонічний гонадотропін людини (Human chorionic gonadotropin, hCG), який має таку ж біологічну активність як LH). Інші джерела фармацевтично чистих FSH, LH і hCG також прийнятні.

4. Підготовка сперми

Насіннева рідина може бути зібрана і підготовлена для інсемінації в день збору ооцитів, якщо виходять ооцити з 1-м полярним тілом (1PB). Інакше збір насінної рідини і її приготування слід проводити на наступний день після збору ооцитів. Якщо це можливо, слід отримати свіжий зразок сперми, який потім може бути підготовлений для запліднення (інсемінації).

5. Очищення ооцитів через 24 години після культивування.

Ооцит-кумулюсні комплекси культивуються в Культуральному середовищі Oocyte Maturation Medium від 24 до 48 годин. Через 24 години знаходження в середовищі, все ооцит-кумулюсні комплекси очищають для визначення стану ооцитів. Клітини кумулюса знімають з ооцит-кумулюсних комплексів використовуючи піпетку з тонким отвором відповідного діаметру після 1 хвилини витримування в розчині гіалуронідази (кат. номер ART-4007-A; не поставляється в комплекті). Ооцити з 1PB після очищення піддаються заплідненню за допомогою ЕКЗ або ICSI. Решта ооцитів із зародковою бульбашкою (germinal vesicle) або на стадії метафази I продовжують культивуватися ще 24 години. На цьому етапі немає необхідності міняти Культуральне середовище Oocyte Maturation Medium

6. Через 48 годин після збору очищені ооцити, що залишилися, перевіряються знову і якщо якісь з них мають 1PB, вони негайно запліднюються методами ЕКЗ або ICSI. ICSI рекомендується для інсемінації ооцитів з 1PB тому, що цей метод ймовірно дає більше шансів успішного запліднення, ніж ЕКЗ.

7. Підготовка Культурального середовища Embryo Maintenance Medium

Культуральне середовище Embryo Maintenance Medium має бути приготовлене принаймні за 2-4 години перед процедурою ICSI і витримуватися при 37 ° C в інкубаторі в атмосфері з 5% CO₂ і 95% повітря з високою вологістю (або в суміші з трьох газів - 90% N₂, 5% CO₂ 5% O₂ - і 100% вологості).

Короткий опис процедури:

Готують 20 мкл краплі цього середовища під шаром Культурального середовища Sterile Oil for Tissue Culture (кат. номер ART-4008/4009) в культуральних чашках 35x10 мм. Число чашок для кожного пацієнта буде залежати від числа ооцитів з 1PB, отриманих після їх збору та культивування.

8. Після процедури ICSI, окремий ооцит переноситься в 20 мкл краплю Культурального середовища Embryo Maintenance Medium в чашці і поміщається в інкубатор для культивування.

9. Визначення запліднення

Через 16-18 годин після проведення ICSI, успішність запліднення ооцитів перевіряється під мікроскопом по появі двох окремих проядер (2 PN) і двох полярних тіл. На цьому етапі немає необхідності переносити запліднені ооцити (2 PN ембріони) в інше середовище (чашку) для продовження культивування.

10. Культивування ембріонів

Запліднені ооцити культивують у краплях (20 мкл) Культурального середовища Embryo Maintenance Medium під шаром Культурального середовища Sterile Oil for Tissue Culture (кат. номер ART-4008/4009). Чи культивувати протягом 1 або 2-х додаткових днів залежить від кількості і якості отриманих ембріонів. Якщо потрібно культивування до стадії бластоцисти, ембріони, що почали ділитися, слід перемістити в нову краплю (20 мкл) Культурального середовища Embryo Maintenance Medium під шаром Культурального середовища Sterile Oil for Tissue Culture (кат. номер ART-4008/4009) через 2 дні після процедури ICSI.

Кожна лабораторія повинна провести своє власне визначення які середовища слід використовувати для кожної окремої процедури

Умови зберігання і стабільність

Зберігати запечатані контейнери при температурі 2-8 ° С. Перед використанням нагріти в інкубаторі до 37 ° С. Не заморожувати і не нагрівати до температури вище 39 ° С. Продукт стійкий до закінчення терміну зберігання зазначеного на ярлику

1. Відбирайте необхідний обсяг продукту з використанням асептичних методів. Один флакон містить об'єм середовища, підходящий для однієї процедури.
2. Відібравши будь-який обсяг продукту ніколи не повертайте його в оригінальний флакон. Викиньте залишки продукту.
3. Не використовуйте якщо продукт стає безбарвним, плямистим, каламутним або проявляє будь-які ознаки мікробного забруднення.

Продукт протестований на одноклітинних ембріонах мишей (тест на ембріотоксичність, MEA - mouse embryo assay) з утворенням бластоцист в 80 або більше відсотках випадків. Тест на бактеріальну ендотоксичність, стандартизований Національною фармакопеею США (USP Endotoxin gel clot test) показав концентрацію залишкового матеріалу клітинних стінок грам-негативних бактерій менше 1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) одиниць / мл.

Сертифікат аналізу для цього продукту також доступний.

Застереження та запобіжні заходи

- а) Клінічна вагітність і коефіцієнт народжуваності нижче для циклів ЕКЗ, що використовують ооцити, що дозріли в пробірці (in vitro), порівняно зі звичайними циклами ЕКЗ.
- б) Клінічна вигода від in vitro дозрівання в циклі ЕКЗ обумовлена можливістю зібрати (незрілі) ооцити без або з невеликою гормональною стимуляцією яєчників.
- в) Відносно менша кількість зрілих ооцитів доступно для запліднення після дозрівання in vitro в порівнянні з кількістю ооцитів, отриманим при аспірації після звичайних методів стимуляції яєчників.
- г) In vitro дозрівання ооцитів включає значно менший ризик виникнення синдрому гіперстимуляції яєчників порівняно із звичайним ЕКЗ.

Не використовуйте середовище з ознаками забруднення сторонніми частинками, з відсутністю рожевого кольору або, якщо розчин каламутний. Щоб уникнути проблем з забрудненням слід використовувати асептичні методи і відкидати надлишок продукту, у відповідності з державними та місцевими законами.

Цей продукт містить альбумін, отриманий з людської крові. Увага: всі продукти на основі крові повинні розглядатися як ті, що несуть потенційну інфекцію. Вихідний матеріал, з якого були отримані ці продукти давав негативну відповідь при тестуванні з антитілами вірусу імунодефіциту людини (HIV), вірусу гепатиту В (HBV), вірусу гепатиту С (HCV), Т-лімфотропного людського вірусу типів 1 і 2 (HTLV I / II) і відсутність реакції з антигенами гепатиту В (HBsAg), вірусу гепатиту С (HCV), РНК вірусу імунодефіциту людини (HIV) і сифілісу. Не існує відомих тестових методів, які могли б давати гарантію, що продукти отримані з людської крові не передаватимуть інфекційні агенти.

Донори вихідного матеріалу були перевірені також на відсутність хвороби Крейтцфельдта-Якоба (Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD). Ефективний скринінг донорів і процес виробництва продукту надзвичайно знижують ризик перенесення вірусних інфекцій і хвороби Крейтцфельдта-Якоба.

Теоретичний ризик перенесення CJD також близький до нуля. До цих пір не було зафіксовано жодного випадку перенесення вірусних інфекцій або хвороби Крейтцфельдта-Якоба через альбумін.