

ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД  
«УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»  
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
Кафедра зоології

КУРТЯК Федір Федорович,  
КУРТЯК Марія Федорівна

## РЕПРОДУКТИВНІ ТЕХНОЛОГІЇ: ЕМБРІОЛОГІЧНІ ІНСТРУКЦІЇ

Навчально-методичний посібник

Ужгород 2023

УДК 314.335.7  
ББК Е693 я7–5  
К 93

**Куртяк Ф. Ф., Куртяк М.Ф.**

К 93 Репродуктивні технології: ембріологічні інструкції / Ф.Ф. Куртяк.,  
М. Ф. Куртяк – Ужгород: Говерла, 2023. – 75 с.

Посібник є авторською розробкою за навчальною дисципліною «Репродуктивні технології» для здобувачів вищої освіти галузі знань 09 Біологія спеціальності 091 Біологія та біохімія предметної освітньої програми «Біологія», що викладається для студентів біологічного факультету Державного вищого навчального закладу «Ужгородський національний університет».

### Рецензенти:

Корчинська Оксана Олександрівна – професор кафедри акушерства та гінекології Державного вищого навчального закладу «Ужгородський національний університет», доктор медичних наук, професор

Мірутенко Владислав Валентинович – завідувач кафедри ентомології та збереження біорізноманіття Державного вищого навчального закладу «Ужгородський національний університет», кандидат біологічних наук, доцент

### Друкується за рішеннями:

Кафедри зоології біологічного факультету Державного вищого навчального закладу «Ужгородський національний університет» (протокол № 20 від 26 червня 2023 року)

Вченої ради біологічного факультету Державного вищого навчального закладу «Ужгородський національний університет» (протокол № 10 від 27 червня 2023 року)

Науково-методичної комісії біологічного факультету Державного вищого навчального закладу «Ужгородський національний університет» (протокол № 5 від 26 червня 2023 року)

© Куртяк Ф. Ф., Куртяк М. Ф. 2023 рік

© ДВНЗ «Ужгородський національний університет», 2023 рік

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
ОПИС НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ.....	7
ПЕРЕДУМОВИ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ .....	8
ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ .....	9
ЗАСОБИ ДІАГНОСТИКИ ТА КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАВЧАННЯ.....	11
ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ .....	14
ІНСТРУМЕНТИ, ОБЛАДНАННЯ ТА ПРОГРАМНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ, ВИКОРИСТАННЯ ЯКИХ ПЕРЕДБАЧАЄ НАВЧАЛЬНА ДИСЦИПЛІНА .....	23
ЕМБРІОЛОГІЧНІ ІНСТРУКЦІЇ.....	24
ЗАГАЛЬНІ ІНСТРУКЦІЇ .....	24
Інструкція щодо миття рук.....	24
Вхід в ембріологічну лабораторію .....	25
Інструкція щодо вимірювання температури та вологості повітря за допомогою гігрометра психрометричного.....	26
Контроль якості .....	28
Інструкція щодо генерального та поточного прибирання ембріологічного блоку .....	30
Інструкція з миття інкубатора.....	30
Інструкція з підготовки ламінарної шафи .....	32
Інструкція щодо верифікації пацієнтів .....	34
Інструкція щодо процедури подвійного засвідчення .....	35
Інструкція щодо відстежуваності .....	36
ЕМБРІОЛОГІЧНІ ІНСТРУКЦІЇ СТОСОВНО ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ (ДРТ).....	41
Інструкція з приготування середовищ та чашок для культивування.....	41
Інструкція з аспірації ооцитів (для ембріологів).....	43
Інструкція з підготовки сперматозоїдів .....	45
Інструкція з запліднення ооцитів методом запліднення in vitro (ЗІВ).....	49
Інструкція по денудації ооцитів.....	50

Інструкція з запліднення ооцитів методом ІКСІ.....	52
Інструкція з перевірки запліднення.....	55
Інструкція з допоміжного хетчінгу.....	57
Інструкція з культивування ооцитів та ембріонів.....	59
ЕМБРІОЛОГІЧНІ ІНСТРУКЦІЇ ДЛЯ РОБОТИ ІЗ КРІОМАТЕРІАЛОМ.....	62
Інструкція з кріоконсервації сперми та тестикулярного біоптату .....	62
Інструкція щодо завантаження транспортних дюарів (Vapour Shippers), що містять абсорбентний матеріал.....	69
РЕКОМЕНДОВАНІ ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ.....	72

## ВСТУП

Навчальна дисципліна «Репродуктивні технології» є складовою циклу професійної підготовки фахівців освітнього рівня «Магістр» за освітньою програмою «Біологія». Дисципліна є вибірковою, й висвітлює методи маніпуляцій зі статевими клітинами, окремі або всі етапи підготовки репродуктивних клітин, процеси запліднення і розвитку ембріонів, що здійснюється в умовах *in vitro*, до переносу їх у порожнину матки.

Дисципліна покликана висвітлити основні питання щодо особливостей основ різних ембріологічних й клітинних прийомів та допоміжних репродуктивних методів; практичного використання репродуктивних методів у різних галузях господарської діяльності людини: в сучасній медицині та ветеринарії, в наукових дослідженнях.

Метою вивчення навчальної дисципліни «Репродуктивні технології» є - сформувати у студентів чітке уявлення про клітинні та ембріологічні основи запліднення *in vitro*, мікрomanipуляцій зі статевими клітинами та ембріонами, про основи культивування та оцінки якості ембріонів, кріоконсервування гамет, ембріонів та тканин гонад; сучасні методи допоміжних репродуктивних технологій та можливості новітніх методів в фундаментальних наукових дослідженнях, в ветеринарії та медицині.

Основними завданнями вивчення дисципліни є: сформувати уявлення про основні закономірності раннього ембріонального розвитку ссавців *in vitro*; про морфо-кінетичні перетворення ембріонів на різних стадіях розвитку в нормі та патологіях; навчити методам та методичним прийомам проведення дослідження статевих клітин *in vitro*, екстракорпорального запліднення, культивування гамет й ембріонів, їх вітрифікації; сформувати навички використання різних типів допоміжних репродуктивних технологій в залежності від патологічних змін на різних етапах.

Відповідно до освітньої програми, вивчення дисципліни сприяє формуванню у здобувачів вищої освіти наступних компетентностей:

### Загальні компетентності

ЗК-01. Здатність працювати у міжнародному контексті.

ЗК-02. Здатність використовувати інформаційні та комунікаційні технології.

ЗК-03. Здатність генерувати нові ідеї (креативність).

ЗК-04. Здатність діяти на основі етичних міркувань (мотивів).

ЗК-05. Здатність розробляти та керувати проектами.

ЗК-06. Здатність проведення досліджень на відповідному рівні.

### Спеціальні (фахові) компетентності

СК-01. Здатність користуватися новітніми досягненнями біології, необхідними для професійної, дослідницької та/або інноваційної діяльності.

СК-02. Здатність формулювати задачі моделювання, створювати моделі об'єктів і процесів на прикладі різних рівнів організації живого із використанням математичних методів й інформаційних технологій.

СК-03. Здатність користуватися сучасними інформаційними технологіями та аналізувати інформацію в галузі біології і на межі предметних галузей.

СК-04. Здатність аналізувати і узагальнювати результати досліджень різних рівнів організації живого, біологічних явищ і процесів.

СК-05. Здатність планувати і виконувати експериментальні роботи з використанням сучасних методів та обладнання.

СК-06. Здатність прогнозувати напрямки розвитку сучасної біології на основі загального аналізу розвитку науки і технологій.

СК-07. Здатність діагностувати стан біологічних систем за результатами дослідження організмів різних рівнів організації

СК-08. Здатність презентувати та обговорювати результати наукових і прикладних досліджень, готувати наукові публікації, брати участь у наукових конференціях та інших заходах.

СК-09. Здатність застосовувати законодавство про авторське право для потреб практичної діяльності.

СК-10. Здатність використовувати результати наукового пошуку в практичній діяльності.

## ОПИС НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

Найменування показників	Розподіл годин за навчальним планом	
	Денна форма навчання	Заочна форма навчання
Кількість кредитів ЄКТС – 4	Рік підготовки:	
Загальна кількість годин – 120	<b>1</b>	<b>1</b>
Кількість модулів – 2	Семестр:	
Тижневих годин для денної форми навчання: 2 аудиторних – 40 самостійної роботи студента – 80	<b>2</b>	<b>2</b>
	Лекції:	
	<b>22</b>	<b>6</b>
	Практичні (семінарські):	
	–	–
Вид підсумкового контролю: залік	Лабораторні:	
	<b>18</b>	<b>6</b>
Форма підсумкового контролю: усна	Самостійна робота:	
	<b>80</b>	<b>108</b>

## ПЕРЕДУМОВИ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

Передумовами вивчення навчальної дисципліни «Репродуктивні технології» є опанування таких навчальних дисциплін (НД) освітньої програми (ОП): ОК 3 Системний аналіз в біології, ОК 5 Сучасна методологія біологічних досліджень з основами інтелектуальної власності, ОК 8 Генетика людини з основами медичної генетики

## ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Відповідно освітньої програми «Репродуктивні технології», вивчення навчальної дисципліни повинно забезпечити досягнення здобувачами вищої освіти таких програмних результатів навчання (ПРН):

Програмні результати навчання	Шифр ПРН
Володіти державною та іноземною мовами на рівні, достатньому для спілкування з професійних питань та презентації результатів власних досліджень.	ПРН-01
Використовувати бібліотеки, інформаційні бази даних, інтернет ресурси для пошуку необхідної інформації.	ПРН-02
Здійснювати злагоджену роботу на результат у колективі з урахуванням суспільних, державних і виробничих інтересів.	ПРН-03
Розв'язувати складні задачі в галузі біології, генерувати та оцінювати ідеї.	ПРН-04
Аналізувати та оцінювати вплив досягнень біології на розвиток суспільства	ПРН-05
Аналізувати біологічні явища та процеси на молекулярному, клітинному, організменному, популяційно-видовому та біосферному рівнях з точки зору фундаментальних загальнонаукових знань, а також за використання спеціальних сучасних методів досліджень.	ПРН-06
Описувати й аналізувати принципи структурно-функціональної організації, механізмів регуляції та адаптації організмів до впливу різних чинників.	ПРН-07
Застосовувати під час проведення досліджень знання особливостей розвитку сучасної біологічної науки, основні методологічні принципи наукового дослідження, методологічний і методичний інструментарій проведення наукових досліджень за спеціалізацією.	ПРН-08
Планувати наукові дослідження, обирати ефективні методи дослідження та їх матеріальне забезпечення.	ПРН-09
Представляти результати наукової роботи письмово (у вигляді звіту, наукових публікацій тощо) та усно (у формі доповідей та захисту звіту) з використанням сучасних технологій, аргументувати свою позицію в науковій дискусії.	ПРН-10
Проводити статистичну обробку, аналіз та узагальнення отриманих експериментальних даних із використанням програмних засобів та сучасних інформаційних технологій.	ПРН-11
Використовувати інноваційні підходи для розв'язання складних задач біології за невизначених умов і вимог.	ПРН-12

Дотримуватися основних правил біологічної етики, біобезпеки, біозахисту, оцінювати ризики застосування новітніх біологічних, біотехнологічних і медико-біологічних методів та технологій, визначати потенційно небезпечні організми чи виробничі процеси, що можуть створювати загрозу виникнення надзвичайних ситуацій.	ПРН-13
Дотримуватись норм академічної доброчесності під час навчання та провадження наукової діяльності, знати основні правові норми щодо захисту інтелектуальної власності.	ПРН-14
Уміти самостійно планувати і виконувати інноваційне завдання та формулювати висновки за його результатами.	ПРН-15
Критично осмислювати теорії, принципи, методи з різних галузей біології для вирішення практичних задач і проблем.	ПРН-16

Очікувані результати навчання, які повинні бути досягнуті здобувачами освіти після опанування навчальної дисципліни «Репродуктивні технології»:

Очікувані результати навчання з дисципліни	Шифр ПРН
Володіти сучасними інформаційними та комунікаційними джерелами для пошуку необхідної інформації для проведення необхідних методичних прийомів маніпуляції зі статевими клітинами та ембріонами.	ПРН-01 ПРН-02
Вміти аналізувати отримані дані та давати оцінку результатам.	ПРН-05
Вміти на основі поглиблених знань закономірностей гаметогенезу та ембріогенезу, застосовуючи спеціальні методи ідентифікації здійснювати моніторинг стадій розвитку гамет та ембріогенезу та проводити оцінку їх якості.	ПРН-06
Вміти обирати адекватні методи для проведення різних типів допоміжних репродуктивних технологій	ПРН-04 ПРН-12
Володіти сучасними інформаційними та комунікаційними джерелами для пошуку необхідної інформації для проведення необхідних методичних прийомів маніпуляції зі статевими клітинами та ембріонами.	ПРН-14 ПРН-16
Знати ембріологічні основи запліднення <i>in vitro</i> , кріоконсервації гамет та ембріонів та моніторингу ембріогенезу ссавців.	ПРН-13
Знати методи, що лежать в основі культивування гамет та ембріонів в умовах <i>in vitro</i>	ПРН-07
Знати теоретичні основи гаметогенезу, запліднення, раннього ембріогенезу та імплантації зародка ссавців.	ПРН-08 ПРН-15
Представляти результати наукового пошуку у формі доповідей з використанням сучасних технологій, коректно вести дискусію, критично оцінювати	ПРН-03 ПРН-09 ПРН-10 ПРН-11

## ЗАСОБИ ДІАГНОСТИКИ ТА КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАВЧАННЯ

### Засоби оцінювання та методи демонстрування результатів навчання

Засобами оцінювання та методами демонстрування результатів навчання з навчальної дисципліни є:

Накопичувальна бально-рейтингова система, що передбачає оцінювання студентів за усі види аудиторної та позааудиторної навчальної діяльності, спрямовані на опанування навчального навантаження з освітньої програми: поточні контроль та оцінювання, поетапний, модульний, підсумковий контроль; екзамени; заліки, презентації, диференційований залік з технологічної лінійної, виробничої та переддипломної практик, курсова робота, кваліфікаційна робота із захистом в ЕК. Проміжкове та підсумкове оцінювання знань відбувається на засадах студентоорієнтованого особистісного підходу з використанням сучасних методик та практик.

Контрольне оцінювання (частково) за Темами 1–15 можливо отримати при участі у конференціях та майстер-класах від професійних тренінгових установ та організацій, конференцій у галузі репродуктивних технологій за наявності підтвердження участі та у випадку авторства чи співавторства у патенті (від 6 до 10 балів в залежності від тематики неформального заходу).

### Форми контролю та критерії оцінювання результатів навчання

**Форми поточного контролю:** поточний контроль здійснюється на кожному практичному занятті з обов'язковим виставленням оцінки. Проводиться комбіноване опитування (тестові завдання, усне опитування). Підсумковий контроль після проведення практичного заняття проводиться у вигляді вирішення ситуаційних задач, завдань, проблемних питань після демонстрації наочності, відео.

**Форма модульного контролю:** проведення модульного контролю (тестові завдання, проблемні питання та контроль практичних навичок),  
Форма підсумкового семестрового контролю: екзамен.

### Розподіл балів, які отримують здобувачі вищої освіти (модуль 1)

Поточне оцінювання та самостійна робота		Модульна контрольна робота	Сума
T1–T6	T7	50	100
По 7 балів (разом – 42)			

T1, T2 ... – теми

### Розподіл балів, які отримують здобувачі вищої освіти (модуль 2)

Поточне оцінювання та самостійна робота		Модульна контрольна робота	Сума
T8–T14	T15	50	100
По 6 балів (разом – 42)			

T1, T2 ... – теми

### Оцінювання окремих видів навчальної роботи з дисципліни

Вид діяльності здобувача вищої освіти	Модуль 1		Модуль 2	
	Кількість	Максимальна кількість балів (сумарна)	Кількість	Максимальна кількість балів (сумарна)
Лабораторні заняття (допуск, виконання та захист)	7	40	8	40
Комп'ютерне тестування при тематичному оцінюванні	1	5	1	5
Презентація	1	5		
Реферат			1	5
Модульна контрольна робота	1	50	1	50
<b>Разом</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>11</b>	<b>100</b>

### Критерії оцінювання модульної контрольної роботи

**Оцінка відмінно (А)** виставляється, коли студент дає абсолютно правильні відповіді на теоретичні питання з викладенням оригінальних висновків, отриманих на основі програмного, додаткового матеріалу та нормативних документів. При виконанні практичного завдання студент застосовує системні знання навчального матеріалу, передбачені навчальною програмою.

**Оцінка добре (В)** виставляється студенту, який повністю розкрив теоретичні питання на основі програмного та додаткового матеріалу. При

виконанні практичних завдань студент застосовує узагальнені знання навчального матеріалу, передбачені навчальною програмою.

**Оцінка добре (C)** виставляється студенту, який повністю розкрив теоретичні питання, а програмний матеріал викладено у відповідності до вимог. Практичні завдання виконані в цілому правильно, але мають місце окремі неточності.

**Оцінка задовільно (D)** виставляється, коли студент розкрив теоретичні питання, проте при викладенні програмного матеріалу допущені окремі помилки. При виконанні практичних завдань студент припускається помилок, за рахунок недостатнього розуміння програмного матеріалу.

**Оцінка задовільно (E)** виставляється, коли студент неповністю розкрив теоретичні питання, відповідь містить суттєві помилки. При виконанні практичних завдань студент припускається значних помилок, а виконання завдань викликає значні труднощі у студента.

**Оцінка незадовільно (FX)** виставляється студенту, який не розкрив теоретичні питання і не може виконати практичні завдання. Як правило такий студент виявляє здатність до викладення думки лише на елементарному рівні.

**Оцінка незадовільно (F)** виставляється студенту, який не виконав навчальну програму або якийсь елемент її складової, має фрагментарні знання, які не дозволяють розкрити теоретичні питання і виконати практичні завдання. Такий студент не може викласти свою думку навіть на елементарному рівні. За результатами контролю знань студентів, дозволяється виставлення екзаменаційної оцінки (без підсумкового іспиту) – «відмінно», «добре», та «задовільно». Студент має право підвищити оцінку, складаючи іспит.

#### Критерії оцінювання підсумкового семестрового контролю

Сума балів за всі види навчальної діяльності	Оцінка ECTS	Оцінка за національною шкалою	
		для екзамену, курсового проекту (роботи), практики	для заліку
90–100	<b>A</b>	відмінно	зараховано
82–89	<b>B</b>	добре	
74–81	<b>C</b>		
64–73	<b>D</b>	задовільно	
60–63	<b>E</b>		
35–59	<b>FX</b>	незадовільно з можливістю повторного складання	не зараховано з можливістю повторного складання
0–34	<b>F</b>	незадовільно з обов'язковим повторним вивченням дисципліни	не зараховано з обов'язковим повторним вивченням дисципліни

## ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

### Анотація навчальної дисципліни

Навчальна дисципліна «Репродуктивні технології» є складовою циклу професійної підготовки фахівців освітнього рівня «Магістр» за освітньою програмою «Біологія». Дисципліна є вибірковою, й висвітлює методи маніпуляцій зі статевими клітинами, окремі або всі етапи підготовки репродуктивних клітин, процеси запліднення і розвитку ембріонів, що здійснюється в умовах *in vitro*, до переносу їх у порожнину матки.

Дисципліна покликана висвітлити основні питання щодо особливостей основ різних ембріологічних й клітинних прийомів та допоміжних репродуктивних методів; практичного використання репродуктивних методів у різних галузях господарської діяльності людини: в сучасній медицині та ветеринарії, в наукових дослідженнях.

### Зміст навчальної дисципліни

**Модуль 1. Історія розвитку допоміжних репродуктивних технологій. Статистика безпліддя у людей в світі, в Україні. Основні причини чоловічого та жіночого безпліддя. Оснащення ембріологічної лабораторії. Міжнародні протоколи ДРТ. Оцінка якості чоловічих статевих клітин. Підготовка сперматозоїдів до запліднення. Методи виявлення фрагментації ДНК сперматозоїдів. Методи отримання жіночих статевих клітин та умови їх культивування. Оцінка якості та зрілості ооцитів. Дозрівання ооцитів *in vitro***

Тема 1. Історія розвитку допоміжних репродуктивних технологій в світі і Україні.

Самостійна робота. Порівняльна характеристика методів допоміжних репродуктивних технологій, що застосовуються в різних країнах світу. Використання ДРТ у ветеринарії для розведення цінних порід та збереження видів.

Тема 2. Статистика безпліддя людей в Україні. Основні фактори, що впливають на жіноче та чоловіче безпліддя. Хромосомні, ендокринні фактори безпліддя.

Самостійна робота. Зовнішні чинники, що впливають на гаметогенез. Запальні захворювання сечо-статевої системи, що приводять до безпліддя. Імунологічний фактор безпліддя. Антимолерів гормон, його значення в оцінці жіночого безпліддя.

Тема 3. Вимоги до оснащення ембріологічної лабораторії. Міжнародні протоколи ДРТ. Умови роботи з пацієнтами та документацією.

Самостійна робота. Законодавчі акти, що регулюють ДРТ в Україні. Стандарт оснащення лабораторії. Особистий захист працівника ембріологічної

лабораторії. Стерильність та дезинфекція. Важливість вимірювання рН, температури, концентрації CO<sub>2</sub>.

Тема 4. Оцінка якості чоловічих статевих клітин. Аналіз спермограми. Морфологічні, молекулярні та біохімічні показники якості сперми та сперматозоїдів.

Самостійна робота. Інвазивні методи отримання сперматозоїдів (PESA, TESA, TESE). Рекомендації ВОЗ по обробці еякуляту.

Тема 5. Методи підготовки сперматозоїдів до ЕКЗ. MAR-тест.

Самостійна робота. Особливості мейозу в сперматогенезі. Клітини сперматогенного ряду. Морфологічні особливості сперматозоїдів. Фрагментація хроматину в сперматозоїдах. Причини її появи та вплив на розвиток ембріону. Методи, що дозволяють оцінити ДНК на фрагментацію.

Тема 6. Методи отримання яйцеклітин та умови їх культивування. Принципи суперовуляції.

Самостійна робота. Гормональні фактори регуляції фолікулогенезу. Типи фолікулів. Контакти між фолікулярними клітинами та ооцитом. Фолікулярні рецептори до ФСГ. Синдром гіперстимульованих яєчників. Склад поживного середовища для культивування ооцитів. Фізичні та хімічні показники культурального середовища.

Тема 7. Основні критерії оцінки якості та зрілості ооцитів. Дозрівання ооцитів in vitro (IVM). Лабораторні фактори, що впливають на якість ооцитів та ембріонів.

Самостійна робота. Будова та властивості ооцит-кумулясного комплексу. Особливості мейозу в оогенезі. Будова Zona pellucida. Хімічний склад цитозолу ооцитів. Полярне тіло, його будова та значення. Будова веретена поділу та його візуалізація.

**Модуль 2. Сучасні методи мікроманіпуляцій при штучному заплідненні. Методика перинуклеарного переносу. Моніторинг якості запліднення та раннього ембріогенезу зародків. Моніторинг передімплантаційного ембріогенезу зародків (5-6 доба розвитку). Допоміжний хетчінг ембріонів. Підготовка ембріонів до передімплантаційної генетичної діагностики. Ембріотрансфер. Імплантація ембріонів. Кріоконсервування ооцитів, сперматозоїдів, ембріонів, тканин яєчок та яєчників. Етичні аспекти ДРТ, донорства, сурматеринства. Юридичні аспекти роботи ембріолога. Клінічні випадки.**

Тема 8. Сучасні методи штучного запліднення: інсемінація, ЕКЗ, ІКСІ. Методи IMSI та PCSI.

Самостійна робота. Капацитация. Активація акросомальної та кортикальної реакцій в нормі та при штучному заплідненні. Особливості штучного запліднення з використанням донорських гамет, розморожених клітин тощо.

Тема 9. Перинуклеарний перенос. Дитина від «трьох батьків».

Самостійна робота. Мітохондріальний геном та мітохондріальні захворювання. Хвороби, що пов'язані з патологіями мітохондрій. Донорство ооцитоплазми.

Тема 10. Моніторинг якості запліднення та раннього ембріогенезу зародків (3 доба розвитку). Критерії оцінки запліднення.

Самостійна робота. Завершення 2 мейотичного поділу ооцитом. Утворення 2 полярного тільця. Синкаріон. Роль центріолей при злитті пронуклеусів. Геномний імпрингінг. Причини зупинки ембріогенезу на 3 добу. Механізм дроблення ембріона. Міжклітинні контакти в бластулі. Тип бластули у ссавців. Морфологічні ознаки якості ембріонів 1-3 доби розвитку. Метод Time-lapse.

Тема 11. Оцінка морфо-кінетичних властивостей ембріона на 5-6 добу розвитку.

Самостійна робота. Компактизація ембріона. Механізм клітинних перетворень, що приводять до утворення бластоцисти. Диференціація бластомерів. Значення бластоцелю для міграції клітин. Критерії відбору ембріонів для кріоконсервації та ембріотрансферу.

Тема 12. Допоміжний хетчінг, його типи. Правила забору біопсійного матеріалу трофектодерми для генетичного дослідження.

Самостійна робота. Структура Zona Pellucida до та після запліднення, її значення в розвитку ембріона та імплантації. Природний хетчінг та його значення. Забір матеріалу для ПГД. Різні типи біопсії ембріона (полярне тіло, бластомер, клітини трофобласту). Кількість клітин для аналізу.

Тема 13. Відбір та критерії відбору ембріонів для трансферу.

Самостійна робота. Імплантація у ссавців. Адгезія, інвазія зародку. Будова ендометрію. Взаємодія зародку з ендометрієм. «Вікно» імплантації. Гормональні зміни у жінки під час імплантації. Патології імплантації (позаматкова вагітність, спонтанні аборти). Фактори, що заважають імплантації (ембріональні, маткові тощо)

Тема 14. Принципи вітрифікації гамет, ембріонів та тканин гонад.

Самостійна робота. Повільна заморозка біоматеріалу. Кріопротектори, їх типи та властивості. Банки сперми, ооцитів та ембріонів. Заморозка гамет для «відкладеного батьківства», при онкологічних захворюваннях пацієнтів тощо.

Тема 15. Етичні аспекти ДРТ.

Самостійна робота. Ризик помилки при роботі з гаметами: втрати, пошкодження. Наслідки трансферу «неякісних» ембріонів.



## Структура навчальної дисципліни

Назви змістових модулів і тем	Кількість годин					
	Форма навчання: денна					
	Усього	у тому числі				
лекції		практичні (семинарські)	лабораторні	індивідуальна робота	самостійна робота	
<b>1-й семестр</b>						
<b>Модуль 1. Історія розвитку допоміжних репродуктивних технологій. Статистика безпліддя у людей в світі, в Україні. Основні причини чоловічого та жіночого безпліддя. Оснащення ембріологічної лабораторії. Міжнародні протоколи ДРТ. Оцінка якості чоловічих статевих клітин. Підготовка сперматозоїдів до запліднення. Методи виявлення фрагментації ДНК сперматозоїдів. Методи отримання жіночих статевих клітин та умови їх культивування. Оцінка якості та зрілості ооцитів. Дозрівання ооцитів in vitro</b>						
Тема 1. Історія розвитку допоміжних репродуктивних технологій в світі і Україні.	3	1				2
Тема 2. Статистика безпліддя людей в Україні. Основні фактори, що впливають на жіноче та чоловіче безпліддя. Хромосомні, ендокринні фактори безпліддя.	7	1				6
Тема 3. Вимоги до оснащення ембріологічної лабораторії. Міжнародні протоколи ДРТ. Умови роботи з пацієнтами та документацією.	8	2				6
Тема 4. Оцінка якості чоловічих статевих клітин. Аналіз спермограми. Морфологічні, молекулярні та біохімічні показники якості сперми та сперматозоїдів.	10	2		2		6
Тема 5. Методи підготовки сперматозоїдів до ЕКЗ. MAR-тест.	10	2		2		6
Тема 6. Методи отримання яйцеклітин та умови їх культивування. Принципи суперовуляції. Склад поживного середовища для культивування ооцитів. Фізичні та хімічні показники культурального середовища.	10	2		2		6
Тема 7. Основні критерії оцінки якості та	10	2		2		6

зрілості ооциті. Дозрівання ооцитів in vitro (IVM). Лабораторні фактори, що впливають на якість ооцитів та ембріонів.						
Модульна контрольна робота						
Разом за модуль	58	12		8		38
<b>Модуль 2. Сучасні методи мікрomanipуляції при штучному заплідненні. Методика перинуклеарного переносу. Моніторинг якості запліднення та раннього ембріогенезу зародків. Моніторинг передімплантаційного ембріогенезу зародків (5-6 доба розвитку). Допоміжний хетчінг ембріонів. Підготовка ембріонів до передімплантаційної генетичної діагностики. Ембріотрансфер. Імплантація ембріонів. Кріоконсервування ооцитів, сперматозоїдів, ембріонів, тканин яєчок та яєчників. Етичні аспекти ДРТ, донорства, сурматеринства. Юридичні аспекти роботи ембріолога. Клінічні випадки.</b>						
Тема 8. Сучасні методи штучного запліднення: інсемінація, ЕКЗ, ІКСІ. Методи IMSI та PCSI.	9	1		2		6
Тема 9. Перинуклеарний перенос. Дитина від «трьох батьків».	3	1				2
Тема 10. Моніторинг якості запліднення та раннього ембріогенезу зародків (3 доба розвитку). Критерії оцінки запліднення.	8	1		1		6
Тема 11. Оцінка морфо-кінетичних властивостей ембріона на 5-6 добу розвитку.	8	1		1		6
Тема 12. Допоміжний хетчінг, його типи. Правила забору біопсійного матеріалу трофктодерми для генетичного дослідження.	7	1		2		4
Тема 13. Відбір та критерії відбору ембріонів для трансферу.	9	1		2		6
Тема 14. Принципи вітрифікації гамет, ембріонів та тканин гонад.	10	2		2		6
Тема 15. Етичні аспекти ДРТ.	8	2				6
Модульна контрольна робота						
Разом за модуль	62	10		10		42
<b>Разом за семестр</b>	<b>120</b>	<b>22</b>		<b>18</b>		<b>80</b>

Назви змістових модулів і тем	Кількість годин				
	Форма навчання: заочна				
	Усього	у тому числі			
лекції		практичні (семінарські)	лабораторні	індивідуальна робота	самостійна робота
<b>1-й семестр</b>					
<b>Модуль 1. Історія розвитку допоміжних репродуктивних технологій. Статистика безпліддя у людей в світі, в Україні. Основні причини чоловічого та жіночого безпліддя. Оснащення ембріологічної лабораторії. Міжнародні протоколи ДРТ. Оцінка якості чоловічих статевих клітин. Підготовка сперматозоїдів до запліднення. Методи виявлення фрагментації ДНК сперматозоїдів. Методи отримання жіночих статевих клітин та умови їх культивування. Оцінка якості та зрілості ооцитів. Дозрівання ооцитів in vitro</b>					
Тема 1. Історія розвитку допоміжних репродуктивних технологій в світі і Україні.	6				6
Тема 2. Статистика безпліддя людей в Україні. Основні фактори, що впливають на жіноче та чоловіче безпліддя. Хромосомні, ендокринні фактори безпліддя.	6				6
Тема 3. Вимоги до оснащення ембріологічної лабораторії. Міжнародні протоколи ДРТ. Умови роботи з пацієнтами та документацією.	8	1	1		6
Тема 4. Оцінка якості чоловічих статевих клітин. Аналіз спермограми. Морфологічні, молекулярні та біохімічні показники якості сперми та сперматозоїдів.	8	1	1		6
Тема 5. Методи підготовки сперматозоїдів до ЕКЗ. MAR-тест.	8				8
Тема 6. Методи отримання яйцеклітин та умови їх культивування. Принципи суперовуляції. Склад поживного середовища для культивування ооцитів. Фізичні та хімічні показники культурального середовища.	8	1	1		6
Тема 7. Основні критерії оцінки якості та зрілості ооцитів. Дозрівання ооцитів in vitro (IVM). Лабораторні фактори, що	8				8

впливають на якість ооцитів та ембріонів.					
Модульна контрольна робота					
Разом за модуль	52	3		3	46
<b>Модуль 2. Сучасні методи мікрomanipуляції при штучному заплідненні. Методика перинуклеарного переносу. Моніторинг якості запліднення та раннього ембріогенезу зародків. Моніторинг передімплантаційного ембріогенезу зародків (5-6 доба розвитку). Допоміжний хетчінг ембріонів. Підготовка ембріонів до передімплантаційної генетичної діагностики. Ембріотрансфер. Імплантація ембріонів. Кріоконсервування ооцитів, сперматозоїдів, ембріонів, тканин яєчок та яєчників. Етичні аспекти ДРТ, донорства, сурматеринства. Юридичні аспекти роботи ембріолога. Клінічні випадки.</b>					
Тема 8. Сучасні методи штучного запліднення: інсемінація, ЕКЗ, ІКСІ. Методи IMSI та PCSI.	12	1		1	10
Тема 9. Перинуклеарний перенос. Дитина від «трьох батьків».	6				6
Тема 10. Моніторинг якості запліднення та раннього ембріогенезу зародків (3 доба розвитку). Критерії оцінки запліднення.	10	1		1	8
Тема 11. Оцінка морфо-кінетичних властивостей ембріона на 5-6 добу розвитку.	6				6
Тема 12. Допоміжний хетчінг, його типи. Правила забору біопсійного матеріалу трофктодерми для генетичного дослідження.	6				6
Тема 13. Відбір та критерії відбору ембріонів для трансферу.	10	1		1	8
Тема 14. Принципи вітрифікації гамет, ембріонів та тканин гонад.	10				10
Тема 15. Етичні аспекти ДРТ.	8				8
Модульна контрольна робота					
Разом за модуль	68	3		3	62
<b>Разом за семестр</b>	<b>120</b>	<b>6</b>		<b>6</b>	<b>108</b>

**Теми практичних (семінарських, лабораторних) занять**

№ з/п	Назва теми	Кількість годин	
		денна	заочна
1	Особистий захист працівника ембріологічної лабораторії. Стерильність та дезинфекція. Міжнародні протоколи ДРТ. Умови роботи з пацієнтами та документацією.	2	2
2	Оцінка якості чоловічих статевих клітин. Аналіз спермограми. Морфологічні, молекулярні та біохімічні показники якості сперми та сперматозоїдів. Методи підготовки сперматозоїдів до ЕКЗ. MAR-тест.	2	
3	Методи отримання яйцеклітин та умови їх культивування. Принципи суперовуляції. Основні критерії оцінки якості та зрілості ооцитів. Дозрівання ооцитів in vitro.	2	
4	Лабораторні фактори, що впливають на якість ооцитів та ембріонів.	2	
5	Сучасні методи штучного запліднення: інсемінація, ЕКЗ, ІКСІ. Методи IMSI та PICSІ.	2	2
6	Моніторинг якості запліднення та раннього ембріогенезу зародків (3 доба розвитку). Критерії оцінки запліднення. Оцінка морфо-кінетичних властивостей ембріона на 5-6 добу розвитку.	2	
7	Допоміжний хетчінг, його типи. Правила забору біопсійного матеріалу трофктодерми для генетичного дослідження.	2	
8	Відбір та критерії відбору ембріонів для трансферу.	2	2
9	Принципи вітрифікації гамет, ембріонів та тканин гонад.	2	
<b>Разом</b>		<b>18</b>	<b>6</b>

#### Самостійна робота

№ з/п	Назва теми	Кількість годин	
		денна	заочна
1	Порівняльна характеристика методів допоміжних репродуктивних технологій, що застосовуються в різних країнах світу. Використання ДРТ у ветеринарії для розведення цінних порід та збереження видів.	4	6
2	Зовнішні чинники, що впливають на гаметогенез. Запальні захворювання сечо-статевої системи, що приводять до безпліддя. Імунологічний фактор безпліддя. Антимюлерів гормон, його значення в	4	6

	оцінці жіночого безпліддя.		
3	Законодавчі акти, що регулюють ДРТ в Україні. Стандарт оснащення лабораторії. Особистий захист працівника ембріологічної лабораторії. Стерильність та дезинфекція. Важливість вимірювання рН, температури, концентрації CO <sub>2</sub> .	6	8
4	Інвазивні методи отримання сперматозоїдів (PESA, TESA, TESE). Рекомендації ВОЗ по обробці еякуляту.	4	6
5	Особливості мейозу в сперматогенезі. Клітини сперматогенного ряду. Морфологічні особливості сперматозоїдів. Фрагментація хроматину в сперматозоїдах. Причини її появи та вплив на розвиток ембріону. Методи, що дозволяють оцінити ДНК на фрагментацію.	6	8
6	Гормональні фактори регуляції фолікулогенезу. Типи фолікулів. Контакти між фолікулярними клітинами та ооцитом. Фолікулярні рецептори до ФСГ. Синдром гіперстимульованих яєчників. Склад поживного середовища для культивування ооцитів. Фізичні та хімічні показники культурального середовища.	6	8
7	Будова та властивості ооцит-кумулюсного комплексу. Особливості мейозу в оогенезі. Будова Zona pellucida. Хімічний склад цитозолу ооцитів. Полярне тіло, його будова та значення. Будова веретена поділу та його візуалізація.	4	6
8	Капацитація. Активація акросомальної та кортикальної реакцій в нормі та при штучному заплідненні. Особливості штучного запліднення з використанням донорських гамет, розморожених клітин тощо.	6	8
9	Мітохондріальний геном та мітохондріальні захворювання. Хвороби, що пов'язані з патологіями мітохондрій. Донорство ооцитоплазми.	6	8
10	Завершення 2 мейотичного поділу ооцитом. Утворення 2 полярного тільця. Синкаріон. Роль центріолей при злитті пронуклеусів. Геномний імпринтінг. Причини зупинки ембріогенезу на 3 добу. Механізм дроблення ембріона. Міжклітинні контакти в бластулі. Тип бластули у ссавців. Морфологічні ознаки якості ембріонів 1-3 доби розвитку. Метод Time-lapse.	6	
11	Компактизація ембріона. Механізм клітинних перетворень, що приводять до утворення бластоцисти. Диференціація бластомерів. Значення	6	8

	бластоцелю для міграції клітин. Критерії відбору ембріонів для кріоконсервації та ембріотрансферу.		
12	Структура Zona Pellucida до та після запліднення, її значення в розвитку ембріона та імплантації. Природний хетчинг та його значення. Забір матеріалу для ПГД. Різні типи біопсії ембріона (полярне тіло, бластомер, клітини трофобласту). Кількість клітин для аналізу.	4	6
13	Імплантація у ссавців. Адгезія, інвазія зародку. Будова ендометрію. Взаємодія зародку з ендометрієм. «Вікно» імплантації. Гормональні зміни у жінки під час імплантації. Патології імплантації (позаматкова вагітність, спонтанні аборти). Фактори, що заважають імплантації (ембріональні, маткові тощо)	6	8
14	Повільна заморозка біоматеріалу. Кріопротектори, їх типи та властивості. Банки сперми, ооцитів та ембріонів. Заморозка гамет для «відкладеного батьківства», при онкологічних захворюваннях пацієнтів тощо.	6	8
15	Ризик помилки при роботі з гаметами: втрати, пошкодження. Наслідки трансферу «неякісних» ембріонів.	6	6
	<b>Разом</b>	<b>80</b>	<b>108</b>

### **ІНСТРУМЕНТИ, ОБЛАДНАННЯ ТА ПРОГРАМНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ, ВИКОРИСТАННЯ ЯКИХ ПЕРЕДБАЧАЄ НАВЧАЛЬНА ДИСЦИПЛІНА**

Технічні засоби. Лекційні заняття будуть проходити у вигляді мультимедійних презентацій. У дистанційному режимі також за допомогою програм електронної комунікації Zoom, Meet. Практичні, семінарські заняття будуть проходити згідно завдань методичних рекомендацій для лабораторних занять, презентацій відео-екскурсій, індивідуальних досліджень тощо.

Обладнання. Обладнана ембріологічна лабораторія. Інкубатори з лупами та поверхнею з підігрівом, ICSI-станція, вортекс, лабораторний посуд, культуральні середовища.

Програмне забезпечення. Платформа e-learn, Microsoft word, Power Point.

## **ЕМБРІОЛОГІЧНІ ІНСТРУКЦІЇ**

### **ЗАГАЛЬНІ ІНСТРУКЦІЇ**

#### **Інструкція щодо миття рук**

Вирішальне значення має забезпечення стерилізованим і дезінфікованим обладнанням, добре вентиляваним та чистим приміщенням і застосування безпечних методів утилізації. Проте, запобігання інфекції буде неефективним, якщо не дотримуватись хорошої особистої гігієни, ефективної методики миття рук і ефективних принципів асептики.

Роль людських рук у перенесенні інфекції при халатному ставленні усвідомили давно і важливість миття рук не можна переоцінити. Мета гігієнічного миття рук – усунути патогенні мікроорганізми, що можуть бути наявними на руках як тимчасові забрудники поверхні. Лікарі, медсестри та інші медичні працівники можуть вимагати це від пацієнтів чи від інших працівників.

Ємності для рідких агентів для миття рук необхідно спорожнити і ретельно помити перед додаванням свіжого розчину – не наповняйте банку до верху, дозволяйте їй промитись під проточною водою.

Шматок мила – не рекомендовано.

Спреї та дезінфектори не можуть замінити ефективне миття рук.

Щітки для нігтів, якщо їх використовують, повинні використовуватись в стерильних умовах і підлягають переробці після першого використання.

Руки завжди необхідно мити ретельно, незалежно від частоти. Мити їх необхідно при вході і виході з лабораторії, коли вони візуально брудні, після відвідування туалету, після видудання носа і чхання у руки, перед і після їди чи приготування їжі і після викидання сміття.

Важливо, щоб у ембріологічній лабораторії мило було чисте, не ароматизоване і бажано без зволожувачів та інших подібних речовин.

Важливо також у медицині не забувати про те, що нігті повинні бути короткими, необхідно також уникати штучних нігтів, перстнів, годинників і браслетів, мити зап'ястя і передпліччя, якщо вони не чисті і забезпечити, щоб рукави були короткі або принаймні заковчені і не намокали під час миття.

#### **Відповідальність**

Ця процедура повинна виконуватись усіма особами, що заходять в ембріологічну лабораторію.

#### **Обладнання, матеріали та інші процедури:**

Умивальник, миючі засоби

#### **Процедура**

- а) Намочіть руки і використайте рідке мило.
- б) Ретельно потріть руки, приділяючи особливу увагу усім ділянкам включно з нігтями та проміжками між пальцями. Потріть руки долонею до долоні, між та навколо пальців, потріть другу сторону руки долонею іншої, потріть пальці кожної руки долонею іншої, помийте кожен великий палець замкнувши його у іншій руці, помийте обидва зап'ястя замикаючи іншою рукою.
- в) Продовжуйте протягом 15 секунд. (Ефект короткого миття рук чистим милом або детергентом – це різке збільшення кількості бактерій (Гарднер і Піл, 1991). Тому це є необхідністю для зменшення кількості бактерій на шкірі).
- г) Промийте добре під проточною водою, щоб змити усе мило.
- д) Витріть і добре висушіть руки використовуючи одноразові паперові рушники. Гігієнічне миття рук необхідно доповнювати, але не замінити одяганням рукавичок, особливо при виконанні рутинних процедур, обробленні ран, чи коли існує ризик контакту із кров'ю або рідинами тіла.

Рукавички необхідно знімати перед тим як доторкнутись до схем, записів, телефону і руки завжди необхідно мити щоб усунути будь-яке забруднення, яке може виникати через пошкодження або дефекти у рукавичці. Їх одягають не лише як бар'єр.

Необхідно також бути обережним при забрудненні неживих об'єктів використаними рукавичками, які можуть забруднити руки – наприклад брудна рукавичка на дверній ручці може пізніше забруднити чисту.

### **Вхід в ембріологічну лабораторію**

Оскільки умови в ембріологічній лабораторії повинні бути ідеальними (див. щоденні процедури в ембріологічній лабораторії), важливо щоб варіації, які можуть вплинути на ці умови, були добре регульованими. Такі варіації включають потенційних забруднюючих агентів, які працівники та відвідувачі можуть вносити в середовище ембріологічної лабораторії. Щоб запобігти цьому, необхідно ретельно контролювати вхід у ембріологічну лабораторію використовуючи наступну процедуру.

Ця процедура повинна виконуватись усіма особами, що заходять у ембріологічну лабораторію.

#### **Обладнання, матеріали та інші необхідні процедури:**

Чистий лабораторний одяг. Взуття для лабораторії. Одноразова шапочка, маска.

#### **Процедура**

Перед тим як увійти в ембріологічну лабораторію, увесь персонал повинен вдягнути зручний одяг, що зберігається у шафі для медичного одягу. Усі інші відвідувачі лабораторії повинні вдягати одноразовий медичний халат, шапочку, маску, а на взуття – бахіли.

Все звичне вбрання необхідно зняти і зберігати у відповідній шафі для верхнього одягу. Лабораторне вбрання носять протягом усього часу перебування в ембріологічній лабораторії і знімають перед виходом із клініки.

Якщо вдягають звичайне взуття, необхідно поверх нього вдягати бахіли кожного разу при вході у ембріологічну лабораторію щоб запобігти забрудненню при вході. Викидати їх необхідно при виході.

### **Інструкція щодо вимірювання температури та вологості повітря за допомогою гігрометра психрометричного**

Інструкція визначає методи безпечної роботи із гігрометром, підготовку його до роботи і порядок роботи, обслуговування гігрометра.

#### **Вимоги щодо безпеки**

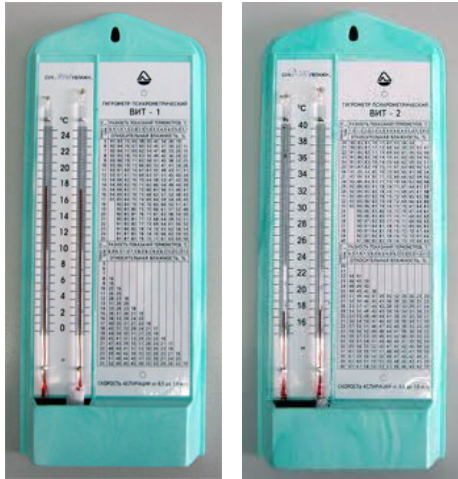
При роботі із гігрометром забороняється:

- при монтажі та експлуатації піддавати гігрометр різким ударам, та падінню;
- протирати шкалу термометра і психрометричну таблицю розчинниками, кислотами та іншими аналогічними рідинами;
- перегрівати термометри гігрометра ВИТ – 1 більше 45 °С, та гігрометра ВИТ – 2 більше 60 °С. При перенагріванні відбувається руйнування резервуара термометрів.

#### **Відповідальність**

Ця процедура виконується відповідальними особами, що пройшли навчання-інструктаж інженера-метролога. Відповідальні особи призначаються наказом керівника по клініці.

#### **Будова та принцип роботи**



1 Гігрометр складається з пластмасової основи до котрої прикріплено два термометра зі шкалою, психрометричну таблицю, скляний випаровувач. Резервуар термометра з надписом «зволожений» зволожується водою за допомогою шифонового гніта.

2 Метод вимірювання відносної вологості гігрометром психрометричним ґрунтується на залежності між вологістю повітря і психрометричною різницею – різницею показів «сухого» і «зволоженого» термометрів, що знаходяться в термодинамічній рівновазі з навколишнім середовищем.

Зняти покази термометрів. За показами «сухого» термометра і різниці показів «сухого» термометра і «зволоженого» визначити відносну вологість повітря по психрометричній таблиці.

#### Підготовка до роботи

1 Заповнити скляний випаровувач дистильованою водою.

2 Встановити скляний випаровувач таким чином, щоб від краю відкритого кінця випаровувача до резервуара термометра була відстань не менше 20 мм, гніт не торкався до стінок відкритого кінця випаровувача.

3 Встановити гігрометр в вертикальному положенні. В місцях встановлення гігрометра не повинно бути джерел вібрації, тепла та холоду, котрі створюють різницю температур між нижнім основним резервуаром і верхнім запасним більше, ніж на 2 °С.

4 Вимірювання відносної вологості гігрометром проводиться тільки після стабілізації показів термометрів гігрометра. Мінімальний час витримки гігрометра при вимірюванні вологості складає 30 хв.

#### Порядок роботи

1 Зніміть покази по «сухому» і «зволоженому» термометрам.

2 Визначте температуру по термометрам. Вирахуйте різницю температур по «сухому» і «зволоженому» термометрам.

3 Визначте відносну вологість повітря по психрометричній таблиці. Значення відносної вологості буде на перетині стрічок температури по «сухому» термометру і різниці температур по «сухому» і «зволоженому» термометрам. При відсутності в таблиці значення по «сухому» термометру, а також різниці температур по «сухому» і «зволоженому» термометрам, округліть значення до найближчого оцифрованого значення.

#### Обслуговування гігрометра

1 Випаровувач завжди повинен бути заповнений дистильованою водою. Воду додавайте вчасно, краще всього за 30 хв. до початку вимірювання вологості.

2 Гніт на резервуарі «зволоженого» термометра повинен бути завжди чистий, м'який і вологий.

3 Перед заміною, зніміть забруднений гніт з резервуара термометра. Протріть резервуар тампоном вати, змоченим теплою водою. Візьміть гніт із комплекту гігрометра. Змочіть гніт дистильованою водою і надіньте на резервуар термометра так, щоб була можливість зав'язати його ниткою над резервуаром. Кінець зав'язаного гніта над резервуаром повинен бути не менше 7 мм. Для виготовлення нового гніта використовуйте бавовняний шифон, відбілений, гладко мальований, технічний або відбілений батист, мерсеризований.

#### Контроль якості

Мета цієї процедури – переконатись, що умови довколишнього середовища, які можуть впливати на умови культивування гамет та ембріонів у ембріологічній лабораторії контролюються на щоденній основі і є правильними та постійними.

Мета культивування *in vitro* – культивування гамет та ембріонів в умовах максимально наближених до умов *in vivo*. Для забезпечення відповідного поживного середовища використовується спеціальне комерційне культуральне середовище, але фізіологічне рН (7.2) і температура (37оС) підтримуються в основному інкубаторами, в яких проводять культивування. Культуральне середовище містить бікарбонатну буферну систему, що використовує газоподібний двоокис вуглецю CO<sub>2</sub> для підтримки рН. Інкубатори встановлюють і калібрують відповідним чином, щоб забезпечити точну концентрацію CO<sub>2</sub> і температурні умови. Але дуже важливо вести моніторинг коливань на постійній основі, щоб переконатись в тому, що не виникають жодні відхилення.

Ембріони і гамети періодично перебувають за межами інкубатора, тому також важливо вести моніторинг температури нагріваючих поверхонь мікроскопів та

ламінарих шаф, щоб переконатись, що вони підтримують необхідну температуру.

Необхідно встановити та перевірити допустимі межі для всіх параметрів. Якщо показники виходять за ці межі, необхідно приймати коригувальні дії.

### **Здоров'я і безпека**

Краплі ртуті з розбитого термометра.

### **Відповідальність**

Ця процедура виконується ЛИШЕ ембріологами.

### **Обладнання, матеріали та інші процедури**

In Control. Інкубатори. Термометри. Робочі станції для ICSI. Ламінарні шафи з підігрівачими поверхнями.

### **Необхідні документи**

Lot checking. Інструкції до «In Control». Лист реєстрації температурного режиму холодильника.

### **Процедура**

Періодично (1 раз на тиждень) необхідно вимірювати температуру різних робочих поверхонь в ембріологічній лабораторії. Зокрема, вимірюється температура підігрівачих поверхонь ламінарних шаф, інвертованих мікроскопів для ICSI. Виміряні показники заносяться у файл Daily control.

Щодня необхідно вимірювати температуру у холодильнику, де зберігаються необхідні середовища та реагенти, і робити відповідні записи у листі реєстрації температурного режиму холодильника.

Використовуючи «In Control», необхідно щодня вимірювати рівень температури та концентрацію CO<sub>2</sub> в усіх інкубаторах. Виміряні показники заносяться у файл Daily control. Щоденно у файл Lot checking заносяться дані про номери лотів матеріалів та середовищ, які були використані в ембріологічній лабораторії.

Що робити у випадку невідповідності.

Якщо при вимірюванні температури або/і концентрації CO<sub>2</sub> їх показники виходять за допустимі межі, необхідно повторити вимірювання. Якщо ці показники й надалі виходять за межі допустимих, необхідно повторити вимірювання годиною пізніше, щоб переконатись у справності обладнання. Якщо і при другому вимірюванні показники недопустимі, потрібно негайно повідомити завідувача відділення та технічного директора. Використовувати таке обладнання не можна.

### **Вимоги до навчання**

Для того, щоб виконувати цю процедуру, персонал повинен бути компетентний у всіх споріднених процедурах. Окрім цього, персонал ембріологічного відділення повинен перечитати і зрозуміти деталі цієї процедури, отримати

відповідне навчання, пройти оцінку, бути вповноваженим керівництвом перед виконанням цієї процедури.

## **Інструкція щодо генерального та поточного прибирання ембріологічного блоку**

В ембріологічній лабораторії необхідно дотримуватись умов чистоти та стерильності. Для цього проводять поточне та генеральне прибирання ембріологічного блоку.

### **Відповідальність**

Ця процедура повинна виконуватись особами, що відповідають за чистоту і порядок

### **Обладнання, матеріали та інші необхідні процедури**

Відро 0,5 %; мильний розчин; швабра; розчин пероксиду водню; бактеріальний випромінювач; 6% розчин пероксиду водню; ганчірка.

### **Процедура**

- Поточне прибирання слід проводити щоденно та використовувати 3% розчин пероксиду водню.

- Генеральне прибирання проводиться один раз на тиждень. День у який буде проводитися прибирання узгоджується завчасно між працівниками ембріологічного відділення та працівниками служби чистоти і порядку. Як правило, день проведення генерального прибирання не є фіксованим, обирається найменш завантажений день тижня. Генеральне прибирання проводиться згідно наступної послідовності:

- Миття стін 0,5 % мильним розчином;
- Протирання стін 6% перексидом водню;
- Вмикання кварцу на 1 годину;
- Промивання стін чистою водою;
- Увімкнення бактеріального випромінювача на 2 години.

По закінченні особа, що проводила прибирання ставить підпис у Листі контролю якості прибирання.

## **Інструкція з миття інкубатора**

Інкубатори мийуть щомісяця (відповідно до графіку миття інкубатора). Миття є необхідним для усунення дрібних, непомічених крапель культурального середовища і для того, щоб звести до мінімуму мікробне (бактерійне/грибкове) зараження, що може підтримуватись завдяки теплоту, вологоту середовищу інкубатора. Таке зараження, якщо воно уже розвинулось, може переходити на

живі системи через циркулююче тепле повітря і має значний негативний вплив на розвиток і потенціал гамет та ембріонів, що культивуються в інкубаторі.

Миття інкубатора необхідно проводити тоді, коли він пустий і є можливість залишити його таким на 24 години після миття. Миття, переважно, проводять наприкінці робочого дня, коли немає потреби відкривати інші інкубатори.

### **Здоров'я і безпека**

Поранення, спричинені падінням полицок. Вдихання випарів алкоголю.

### **Відповідальність**

Ця процедура виконується ЛИШЕ ембріологами.

### **Обладнання, матеріали та інші необхідні процедури**

Інкубатор. 70% спирт. Марлеві серветки. Дистильована вода.

### **Інші необхідні процедури**

Процедура щоденного контролю в лабораторії

### **Інші необхідні документи**

Графік миття інкубаторів

### **Процедура**

Миття інкубаторів з програмованою системою стерилізації.

Миття інкубаторів обов'язково слід проводити у рукавичках.

**Інкубатори, що мають програмовану систему стерилізації шляхом нагрівання до 900 С.** Перед запуском цієї програми вимкніть інкубатор, проте немає необхідності вимикати підвід газу. Такі інкубатори не містять підноса, який можна вийняти, але мають нахилене дно, що формує «колодязь» в основі інкубатора.

Воду необхідно вичерпати з нього у посудину, воду вилити, а інкубатор висушити за допомогою марлевої серветки.

Використовуючи вологі серветки, протріть внутрішні поверхні інкубатора, полицки, внутрішні двері і внутрішню сторону зовнішніх дверей.

Запустіть (згідно інструкції до інкубатора) програму стерилізації.

**Миття інкубаторів без програмованої системи стерилізації.** Протріть поверхню стола 70% спиртом. Вимкніть інкубатор, проте немає необхідності вимикати підвід газу. Вийміть полицки та увесь внутрішній інвентар, і розмістіть їх на столі. Вийміть ємність з водою і вилийте з нього воду. Вмтріть насухо ємність за допомогою серветки і поставте на стіл. Витріть насухо внутрішні поверхні інкубатора за допомогою марлевої серветки.

Використовуючи чисті серветки, просякнуті 70% спиртом, ретельно протріть внутрішні поверхні інкубатора і внутрішню сторону дверей.

Необхідно використовувати достатню кількість спирту, щоб ретельно помити поверхні, проте не можна залишати надлишок спирту на поверхнях.

Залиште дверцята інкубатора відкритими для того щоб провітрити його, поки будете мити інші прилади.

Використовуючи чисті серветки, просякнуті 70% спиртом, протріть повністю усі полицки та ємність з водою, змиваючи увесь видимий бруд і плями.

Знову ж таки, необхідно використовувати достатню кількість спирту, щоб ретельно промити поверхні, але надлишок спирту не повинен залишатись на поверхнях.

Другий раз протираємо усі поверхні 95% розчином спирту.

Дозвольте поверхням висохнути на повітрі повністю протягом кількох хвилин, перед тим як підготувати інкубатор.

Після того як інкубатор буде готовий, залиште дверцята відкритими на 30 хв провітритись перед тим, як наповнити піднос відповідною кількістю дистильованої води.

### **Вмикання інкубаторів.**

Або закрийте двері та увімкніть інкубатор, або за наявності вмикаємо програму «автостарт» згідно інструкції до інкубатора.

Залишіть інкубатори хоча б на 8 годин або на ніч, щоб довести його до потрібної температури та концентрації газу.

Поставте відмітку в Графіку миття інкубаторів, що процедура відбулася.

Пересвідчіться, що в інкубаторі встановились відповідні умови при виконанні щоденних перевірок перед використанням.

### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Окрім цього, ембріологи повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримають дозвіл на виконання цієї процедури.

### **Інструкція з підготовки ламінарної шафи**

Мета цієї процедури - підготувати ламінарну шафу для отримання ооцитів під час ДРТ процедур. При отриманні ооцитів узгоджують усі деталі між операційною сестрою та колективом ембріологічної лабораторії, оскільки здійснювати процедуру отримання яйцеклітин необхідно тоді, коли це призначено лікарем. Таким чином підготовку ламінарної шафи необхідно здійснювати відразу перед процедурою, щоб переконатися у ефективності, чистоті і строгому дотриманні протоколу отримання яйцеклітин. Особливу увагу необхідно приділяти температурі робочих поверхонь, ранішні процедури



контролю якості також необхідно завершити перед підготовкою ламінарної шафи до процедури отримання яйцеклітин.

### **Здоров'я і безпека**

Ризик опіків. Ризик поранень. Ризик біологічних рідин.

### **Відповідальність**

Цю процедуру повинні виконувати ЛИШЕ ембріологи.

### **Обладнання, матеріали та інші необхідні процедури**

Ламінарна шафа. Стерильні капіляри. Штативи для пробірок. Пробірки для фолікулярної рідини. Чашки Петрі (d=100). Рукавички без тальку. Маркер

### **Інші необхідні процедури**

Інструкція по контролю якості. Інструкція по приготуванню середовищ та чашок для культивування

### **Необхідні документи**

ПРТ80 Протокол культивування

### **Процедура**

Після того як завершилися усі ранкові процедури контролю якості, ембріолог може готувати ламінарну шафу для отримання яйцеклітин.

Ембріолог звечора готує: достатню кількість стерильних капілярів; штативи з пробірками (по одному на аспірацію та два додаткових).

Штативи необхідно поставити в інкубатор для підігріву. В одну з пробірок у кожному штативі ембріолог розкапує приблизно 1 мл середовища Flushing Medium (Original) для промивки пункційної голки.

На підігрівачій поверхні ламінарної шафи розміщуємо необхідну кількість чашок Петрі. Додаткові чашки Петрі необхідно розмістити в зоні досяжності, щоб можна було використати при потребі.

Пару рукавичок без тальку необхідно покласти біля ламінарної шафи.

Маркер потрібно мати постійно під рукою для поміток під час процедури.

У випадку проведення використання промивки фолікулів, додатково готуємо 2 шприци по 10 мл Flushing Medium (Original), якщо інше не вказано в програмі.

### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Окрім цього, ембріологи повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримають дозвіл на виконання цієї процедури.

## **Інструкція щодо верифікації пацієнтів**

Встановлення особи пацієнта та верифікація інформації про зразки матеріалу (гамети та ембріони) є найважливішим моментом роботи ембріологічної лабораторії. Розмір збитків, що можуть бути завданими в результаті плутанини в клініці, є неоціненним. В клініці обов'язково щодня мають вживатися заходи, спрямовані на запобігання плутанини з матеріалом. Персонал має мати абсолютне розуміння відповідальності при вчиненні різних процедур та маніпуляцій з людським матеріалом.

Більше того, клініка має бути захищена від зловмисних дій третіх осіб (звинувачення в невідповідному використанні матеріалу та плутанині) чи самих пацієнтів.

Процедури ДРТ в загальному полягають в заборі гамет від подружньої пари на підставі Договору про медичні послуги, яку підписують пацієнти. Зазвичай, ці гамети обробляються в ембріологічній лабораторії і при процедурі інсемінації, вводяться жінці в матку. В інших випадках гамети зливають між собою та утворюють ембріони і здійснюють перенос вже ембріонів жінці в матку. Обробку гамет в ембріологічній лабораторії здійснюють ембріологи, забір ооцитів та перенесення в матку ембріонів – акушер-гінекологи в умовах спеціального обладнаного приміщення (операційної).

При передачі гамет в ембріологічну лабораторію персонал, який здійснює процедуру (лікар, операційна м/с, ембріолог) мають чітко встановити особу пацієнта. Під час забору матеріалу важливо правильно його ідентифікувати та промаркувати, забезпечити можливість відстеження маркування матеріалу на всіх етапах обробки, особливо під час здійснення запліднення. Під час ембріотрансфера чи ВМІ ембріологи і акушер-гінекологи мають ідентифікувати особу пацієнта та перевірити співпадіння з маркуванням матеріалу.

Процедури встановлення особи пацієнта є розширеними та багаторівневими і передбачають їх застосування всіма працівниками клініки. Важливо забезпечити те, щоб кожний працівник, залучений в процесі ідентифікації пацієнтів, розумів свою роботу та знав, що треба робити у випадку допущення/виявлення помилок та був відповідно проінструктований стосовно процедури верифікації.

Ця стандартна процедура верифікації включає етапи встановлення особи пацієнта, маркування зразків та перевірки співпадіння маркування з особою пацієнта. Є певні загальні принципи мінімізації допущення цих помилок і важливо, щоб персонал був з ними ознайомлений:

- Планування роботи клініки.
- Усі процедури клініки плануються через єдине центральне джерело інформації – реєстратуру. Для проведення процедур кожному пацієнту підбирається відповідна година та дата.
- Ефективне внутрішнє спілкування між відділеннями клініки.

- Планування завантаженості операційної та ембріологічної лабораторії.
- Обмежений доступ до ембріологічних записів.
- Стандартизована процедура маркування зразків
- Фізичне розмежування зразків в часі та місці.
- Стандартизована процедура верифікації.
- Верифікація матеріалу з залученням свідка.
- Заздалегідь спланована робота лікарів, медичних сестер та ембріологів (напередодні узгоджено особу пацієнта та процедури, які йому будуть здійснюватися) сприяє мінімізації затрат часу та ризиків допущення помилок.

А також дає можливість визначити (виділити) відповідний час, місце та відповідальний персонал.

#### **Відповідальність**

Ця процедура повинна здійснюватися відповідно навченим персоналом.

#### **Інструкція щодо процедури подвійного засвідчення**

Процедура подвійного засвідчення необхідна для подвійного контролю всіх процедур, що відбуваються в ембріологічному відділенні з метою додаткового контролю правильності виконання процедури та запобіганню будь-якої плутанини матеріалу.

Процедурі подвійного засвідчення підлягають усі етапи роботи, при яких ооцити чи ембріони потрапляють в нову чашку. Процедура повинна виконуватися в обов'язковому порядку для всіх пацієнтів.

#### **Відповідальність**

Виконання процедури здійснює лише ембріолог. Свідком процедури може бути як ембріолог, так і будь-який інший працівник медичного центру.

#### **Обладнання, матеріали та інші необхідні процедури**

Ембріологічні документи

#### **Процедура**

Ембріолог, що проводить процедуру, дістає чашку чи пробірку з інкубатора, читає вголос прізвище, ім'я, дату народження пацієнтки (чи пацієнта) та клінічний номер, що написано на чашці. Свідок звіряє цю інформацію з ембріологічними документами і підтверджує, що ця інформація вірна. Далі свідок зачитує вголос цю інформацію з ембріологічних документів ембріологу, який звіряє прочитане з інформацією на чашці.

Після цього ембріолог і свідок підписують лист засвідчення процедур «Додатковий лист засвідчення» про те, що процедура подвійного засвідчення відбулася. В протоколі також вказується і година проведення процедури.

При цьому, по закінченні процедури свідок перевіряє стару чашку, переконується, що вона дійсно пуста чи містить лише відбракований матеріал та ставить свій підпис і годину, коли відбулося свідчення у протоколі засвідчення викидання чашок «Протокол засвідчення викидання пустих чашок». Цей протокол також підписує ембріолог, що проводив процедуру.

#### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Окрім цього, працівники повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримують дозвіл на виконання цієї процедури.

#### **Інструкція щодо відстежуваності**

Клініки застосовують усі необхідні міри для того, щоб відстежувати роботу з гаметами за допомогою чітких процедур ідентифікації, подвійного засвідчення, заповнення відповідної документації та системи маркування на всіх етапах процесу лікування, а саме:

- донація;
- робота з гаметами;
- обстеження, аналізи;
- кріоконсервація;
- зберігання;
- відправка біоматеріалу в інші установи.

Документи, що стосуються лікування пацієнтів зберігаються в клініках 30 років і передаються в обласний архів.

#### **Здоров'я та безпека**

Згідно законодавства України пацієнти, а також донори, які звертаються у клініку обов'язково обстежуються на наявні інфекційні захворювання. Таким чином усувається небезпека зараження та сплутування біоматеріалу (гамети), який потрапляє в ембріологічну лабораторію.

#### **Відповідальність**

Відповідальність за локалізацію та ідентифікацію біоматеріалу на будь-якому етапі роботи несуть ембріологи. Завідувач ембріологічним відділення є відповідальним за чітко прописану процедуру щодо відстежуваності та ідентифікації біоматеріалу.

#### **Визначення**

**«Відстежуваність»** – можливість локалізації та ідентифікації тканини/клітини на будь-якому етапі роботи від їх отримання, аналізу, зберігання до переносу/передачі пацієнтам чи знищення. Це стосується також донатії. Відстежуваність включає можливість локалізувати та ідентифікувати всі необхідні дані, що мають відношення до матеріалів, середовищ та будь-якої іншої продукції, що вступає в контакт з цими тканинами/клітинами.

**«Моніторинг процесу роботи з тканинами/клітинами»** – це записування будь-яких неочікуваних чи небажаних ефектів, що могли несприятливо вплинути на якість та безпеку тканин/клітин.

### Процедура

- 1) всі пацієнти в клінік отримують унікальний клінічний номер в день їх першої консультації. Номер вказується на всіх документах, результатах аналізів, медичних формах, зокрема й ембріологічних документах. Донори отримують унікальний код, що містить ініціали їх імені та прізвища та чотири цифри, що позначають місяць та рік їхнього народження.
- 2) Медична картка пацієнта (паперова та електронна форми) містить документи, що стосуються процесу лікування. У клініці ведуться електронні журнали та інші документи, що дозволяють ідентифікувати кожного пацієнта, їх тканини/клітини, стадію розвитку ембріонів, інформацію щодо донатії, результат циклів тощо. Журнал містить інформацію щодо всіх циклів запліднення ін вітро, кріоциклів, донатії, що відбуваються в клініці (з того часу як він був запроваджений). Дані, що вносяться у журнал включають: прізвище та ім'я пацієнтки, її клінічний номер, дата народження, номер циклу, препарати стимуляції та його доза, деталі донатії (код та вік донора для кожного реципієнта), кількість фолікулів, отриманих ооцитів, результати запліднення, прізвище лікаря та ембріолога, що проводили певну процедуру, день переносу, хетчінг, дані про перенесені ембріони, про кількість кріоконсервованих, дані про пологи (кількість плодів, стать).
- 3) Записи лотів всієї продукції, що вступає в контакт з тканинами/клітинами підтримуються в електронному журналі. У випадку повідомлення про дефективність середовища чи матеріалу система також дозволяє ідентифікувати всіх пацієнтів, що вступають в контакт з цим середовищем чи матеріалом.
- 4) Внутрішні інструкції описують контроль за кожним процесом, що відбувається в клініці, щоб забезпечити відстежуваність на кожному етапі. Всі ключові етапи відбуваються із залученням свідка.
- 5) Нижче подано опис ключових етапів і опис відстежуваності на кожному етапі.

### А. Ідентифікація особи пацієнта

Номер	Процедура	Деталі, що перевіряються	Необхідність подвійного свідчення
1	Прихід пацієнта в клініку	Запис в електронній програмі та підсвічення кольором, перевіряють працівники реєстратури для того, щоб лікар, медсестра, ембріолог знали про прихід та перебування у клініці пацієнта.	ні
2	Забір сперми	Перед тим як запросити чоловіка в кімнату забору сперми, ембріолог вимовляє прізвище та ім'я пацієнта, пацієнт підтверджує його і видає ембріологу заповнений «Бланк забору біоматеріалу (TESA)». Ембріолог перевіряє документ чи дійсно дані пацієнта співпадають.	ні

### Б. Процедури в операційній та ембріологічній лабораторії:

Номер	Процедура	Деталі, що перевіряються	Необхідність подвійного свідчення
1	Верифікація пацієнтки перед пункцією ооцитів	Перед процедурою пацієнтка знаходиться в операційній називає своє ПІБ ембріологу, що робитиме процедуру. Ембріолог звіряє їх з ембріологічними документами: Протокол культивування (ICSI/IVF).	ні
2	Пункція та денудація ооцитів	На чашці для культивування наноситься маркування: прізвище та ім'я пацієнтки, клінічний номер, дата народження	так – дані вказані на чашці. так – пре денудація та постденудація
3	Підготовка сперми для запліднення	На чашці для забору сперми та на пробірках наноситься маркування: прізвищем та ім'ям пацієнта, клінічний номер, дата народження.	так – на кожному етапі переходу гамет з однієї

			посудини в іншу.
4	Запліднення	Чашки для культивування маркуються прізвищем пацієнтки, клінічним номером та датою народження.  На пробірках (чашках) зі спермою наноситься маркування: прізвище та ім'ям пацієнта, клінічний номер, дата народження. У випадку використання донорської сперми – код донора та дані пацієнтки.	так – preICSI та postICSI, IVF
5	Перевірка запліднення	Запліднені зиготи переносяться в нову чашку для культивування в першу лунку, що містить культуральне середовище. На чашці наноситься маркування: прізвище та ім'я пацієнтки, клінічний номер, та дата народження.	так
6	Ембріотрансфер	Ембріолог звіряє дані на чашці для культивування з ембріологічними документами.	Так
7	Хетчінг	Ембріолог звіряє дані на чашці для культивування з ембріологічними документами.	Так – pre-хетчінг та post-хетчінг
8	Кріоконсервація ембріонів	Ембріони, що підлягають заморожуванню переносяться з чашки для культивування в чашку для заморожування, яка промаркована прізвищем та ім'ям пацієнтки, клінічним номером та датою її народження. На етапі останнього розчину, ембріони набирають в соломки, які маркуються прізвищем та першою літерою імені пацієнтки, клінічним номером, датою кріоконсервації та кількістю ембріонів в соломці. По закінченню заморозки соломки з	Так – при переносі в чашку для заморозки та при наборі в соломки.

		ембріонами переносяться в маркований пенал і переносяться в стакан одного з двоарів.	
9	Розморозка ембріонів	Лікар узгоджує згідно Плану лікування з ембріологом дату розморозки ембріонів певного пацієнта. Ембріолог робить про це запис у щоденнику роботи ембріологів. Чашка для розморозки ембріонів маркується прізвищем та ім'ям пацієнтки, клінічним номером і датою її народження.	так – при переносі ембріонів з соломки в чашку для розморозки і в чашку для культивування.
10	Інсемінація	Чашка для забору сперми та пробірки маркуються прізвищем та ім'ям пацієнта, клінічним номером, датою народження. Якщо інсемінація донорська, пробірки маркуються прізвищем, ім'ям, клінічним номером, датою народження пацієнтки та вказується номер спермодози.	так

#### В. Андрологічні процедури: заморозка сперми/TESA

Номер	Процедура	Деталі, що перевіряються	Необхідність подвійного свідчення
1	Кріоконсервація сперми	Пацієнт здає сперму в чашку, яка маркована прізвищем, ім'ям, клінічним номером пацієнта та датою народження. Ці деталі звіряються з записаними на віалі, в якій буде зберігатися сперма.	так
2	Верифікація пацієнта перед аспіраційною біопсією	Перед процедурою пацієнт, знаходячись в операційній, називає своє прізвище, ім'я, по батькові ембріологу, що робитиме процедуру. Ембріолог звіряє їх із записами в Бланку забору біоматеріалу (TESA).	ні

#### Вимоги до навчання

Ембріологи повинні бути ознайомлені з деталями цієї процедури.

## ЕМБРІОЛОГІЧНІ ІНСТРУКЦІЇ СТОСОВНО ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ (ДРТ)

### Інструкція з приготування середовищ та чашок для культивування

Мета культивування *in vitro* – культивування гамет та ембріонів в умовах максимально наближених до умов *in vivo*. Для забезпечення відповідного поживного середовища використовується спеціальне комерційне культуральне середовище, але фізіологічне рН (7,2 – 7,3) і температура (37°C) підтримуються в основному інкубаторами, в яких проводять культивування. Культуральне середовище містить бікарбонатну буферну систему, що використовує газоподібний двоокис вуглецю CO<sub>2</sub> для підтримки рН. Інкубатори установлюють і калібрують відповідним чином, щоб забезпечити точну концентрацію CO<sub>2</sub> і температурні умови.

Клініка «Плюсмед», в основному, використовує середовища фірми «Origio», які перевірені на стерильність, осмолярність, рН, наявність ендотоксинів, а також протестовані на ембріонах мишей. Середовища містять певні концентрації компонентів, які виявились основними для розвитку людського ембріона, а саме, глюкозу, забуферені сольові розчини, синтетичний замітник сироватки, пеніцилін та інші. Деталі щодо компонентів та вимог зберігання середовищ можна знайти в інструкціях, що включаються в кожний набір середовищ.

### Відповідальність

Ця процедура здійснюється ЛІШЕ ЕМБРІОЛОГАМИ.

### Обладнання, матеріали та інші процедури

Ламінарна шафа. Universal IVF Medium. Стерильні пластикові піпетки. Liquid Paraffin. Стерильні капіляри. ICSI Cumulase. Embryo Assist. Blast Assist. Flushing Medium. ISM1. UTM. Embryo Gen. Sperm Slow. PVP Medium. 4-х луночні чашки. чашки Петрі (d=60). Чашки Петрі (d=35). Чашки для ICSI (d=50)

### Інші необхідні процедури

Інструкція з контролю якості.

### Необхідні документи

Інструкції до середовищ.

### Процедури

Коли відкриваєте новий флакон середовища запишіть номер його лоту у відповідний документ.

4-х луночні чашки для культивування, які використовують для:

- культивування ооцитів після їх отримання;

- інсемінації методом IVF;
- тимчасового культивування денудованих яйцеклітин, що передують ICSI;
- культивування ембріонів до перевірки запліднення.

Для цих процедур чашка для культивування складається з:

4-х луночної чашки (Nunc), в кожній луноці якої міститься по 0,5мл. середовища Universal IVF Medium, вкритого тонким шаром Liquid Paraffin. Між 1 та 3 лунками чашки вноситься 0,5 мл відповідного середовища для зволоження (як правило, Flushing Medium).

4-х луночні чашки для культивування, які використовують для:

- культивування ембріонів після перевірки запліднення до моменту ET;

Для цієї процедури чашка для культивування складається з:

4-х луночної чашки (Nunc), в першій луноці якої міститься по 0,5мл. середовища Embryo Assist чи ISM1, а в другій та четвертій - Blast Assist, які вкриті тонким шаром Liquid Paraffin. Між 1 та 3 лунками чашки вноситься 0,5 мл відповідного середовища для зволоження (як правило, Flushing Medium).

4-х луночні чашки для культивування, які використовують для:

- культивування кріоембріонів, розморожених на стадії зиготи.

Для цієї процедури чашка для культивування складається з:

- 4-х луночної чашки (Nunc), в першій та другій лунках якої міститься по 0,5мл. середовища Universal IVF Medium, в четвертій - Embryo Assist чи ISM1, в третій - Blast Assist, які вкриті тонким шаром Liquid Paraffin. Між 1 та 3 лунками чашки вноситься 0,5 мл відповідного середовища для зволоження (як правило, Flushing Medium).

4-х луночні чашки для культивування, які використовують для:

- культивування кріоембріонів, розморожених на стадії бластоцисти (морули).

Для цієї процедури чашка для культивування складається з:

- 4-х луночної чашки (Nunc), в першій та другій лунках якої міститься по 0,5мл. середовища Universal IVF Medium, в 4-ій - Blast Assist, які вкриті тонким шаром Liquid Paraffin. Між 1 та 3 лунками чашки вноситься 0,5 мл відповідного середовища для зволоження (як правило, Flushing Medium).

Чашки для денудації

Використовують для: очищення яйцеклітин від скупчень кумулюсу перед процедурою ICSI .

Складається з: 4-х луночної чашки (Nunc), що містить 1 велику краплю ICSI Cumulase та 3 великі краплі Universal IVF Medium (приблизно по 80 мкл) вкриті 0,5мл Liquid Paraffin.

Чашки для запліднення методом ICSI

Використовують для: культивування яйцеклітин та сперми протягом процедури ICSI.

Складається з: кришки чашки Петрі (d=35) або чашка для ICSI (d=50), що містить необхідну кількість (залежно від кількості аспірованих ооцитів, але максимально 10) маленьких крапель Universal IVF Medium та 1 велику розтягнуту краплю PVP Medium, вкритих мінеральним маслом.

Приготування: за день перед використанням. Розливаемо середовища на холодній поверхні.

#### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Окрім цього, ембріологи повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримають дозвіл на виконання цієї процедури.

#### **Інструкція з аспірації ооцитів (для ембріологів)**

Аспірація ооцитів – це процедура, під час якої у пацієнтку хірургічним шляхом із зрілих фолікулів яйника отримують ооцити. Фолікули розвиваються внаслідок контрольованої стимуляції яйників і дозрівають при застосуванні екзогенного людського хоріонічного гонадотропіну (ХГЛ). Ін'єкцію ХГЛ роблять за 35–36 годин до процедури аспірації ооцитів з метою отримання зрілих ооцитів з більшої кількості фолікулів.

Ооцити отримують з преовуляторних фолікулів пацієнтки, яка знаходиться під дією загального внутрішньовенного наркозу в маніпуляційній кімнаті, суміжній з ембріологічною лабораторією. Аспірація проводиться аспіраційною голкою під контролем ультразвуку за допомогою вакуумного аспіратора. Фолікулярна рідина попадає в стерильні пробірки у операційній кімнаті, які ставлять у штатив, що знаходиться на столику з підігрівом між операційною та ембріологічною лабораторією. Після чого ембріологи відразу ж переглядають рідину на наявність ооцитів.

#### **Здоров'я та безпека**

Ризик гострих пошкоджень. Ризик біологічних рідин

#### **Відповідальність**

Ця процедура здійснюється ЛИШЕ ембріологами.

#### **Обладнання, матеріали та інші процедури**

Ламінарна шафа. Стерильні капіляри. Столик з підігрівом. Ультразвуковий сканер. Чашки Петрі d=90-100мм. Пробірки. Рукавички без тальку. Маркер. Штатив для пробірок металевий. Flushing Medium чи аналог.

#### **Інші необхідні процедури**

Інструкція по приготуванню середовищ та чашок для культивування. Інструкція по верифікації пацієнтів. Інструкція по процедурі подвійного засвідчення

#### **Необхідні документи**

Додатковий лист засвідчення. Протокол засвідчення викидання пустих чашок. Протокол культивування.

#### **Процедура**

#### **Робота з документами**

#### **В день перед аспірацією**

Медсестра маніпуляційної кімнати на основі Медичної справи пацієнтки вказує в Протокол культивування прізвище, ім'я, дату народження, клінічний номер та дату аспірації, а також результати критичних аналізів обох партнерів. Ембріолог дані пацієнта та деталі лікування (метод запліднення та інше (донація гамет, сурогатне материнство).

Окрім цього, ембріолог готує протоколи Додатковий лист засвідчення, Протокол засвідчення викидання пустих чашок.

#### **В день аспірації**

Коли пацієнтку готують у маніпуляційній кімнаті до проведення аспірації, ембріолог відкриває віконце у ембріологічну лабораторію, медсестра просить пацієнтку назвати свої ім'я та прізвище, перевіряє їх відповідність записам у Протоколі культивування пацієнтки і ставить свій підпис. Ембріолог підтверджує почуте підписом у цьому ж документі. У кінці пункції лікар теж ставить свій підпис, засвідчуючи завершення процедури цієї ж пацієнтки.

#### **Покрокові дії аспірації ооцитів ембріолога**

Коли лікар розпочинає забір ооцитів, одягнуть неопудрені рукавиці (для самозахисту).

Витягнуть чашку для промивки з інкубатора, наповнить її середовищем Flushing Medium (Origio) чи аналог з попередньо приготовленого напередодні ввечері та нагрітого шприца і розмістить її на підігрівачій поверхні ламінарної шафи.

Медсестра пробірки з фолікулярним аспіратом (фолікулярний аспірат повинен займати пів об'єму пробірки) ставить у штатив для пробірок на столик з підігрівом. Ембріолог бере пробірку з штатива так, щоб охопити її всією рукою, відкриває корок і перехилиє виливаючи її вміст у чашку Петрі. Важливо не використовувати кришки з чашок Петрі при отриманні ооцитів.

Відразу дослідіть кожну чашку Петрі «на око», використовуючи мале збільшення мікроскопа на наявність ооцит-кумуляних комплексів (ОКК), які видно, як чіткі, в'язкі, схожі на желатин згустки у фолікулярній рідині.

Якщо ідентифікується ооцит, проговоріть це в маніпуляційну, щоб повідомити лікаря.

Використовуючи стерильний капіляр, перенесіть ОКК в чашку для промивки.

Після першого перегляду, чашку з фолікулярною рідиною слід переглянути ще раз.

Промийте ОКК від дебрису/крові, піпетуючи кілька разів капіляром.

В чашку для промивки поміщаємо не більше 10 ОКК. Якщо ОКК більше – з інкубатора дістаємо нову чашку для промивки.

Чашки для промивки підписуємо клінічним номером.

Зберіть ОКК з мінімальною кількістю середовища з промивної чашки і перенесіть в 4-ох-луночну чашку для культивування.

Запишіть на чашці для культивування ім'я пацієнтки, клінічний номер, дату народження, кількість яйцеклітин та проведіть процедуру подвійного засвідчення.

Поставте 4-ох-лунокову чашку з яйцеклітинами у відповідне відділення інкубатора і запишіть час та кількість яйцеклітин у Протокол культивування.

Ембріолог, зі слів медсестри, заносить у Протокол культивування кількість фолікулів, пропунктованих у кожному яйнику.

Засвідчіть викидання промивної чашки та зазначте це в лабораторному документі Протокол засвідчення викидання пустих чашок. Утилізуйте увесь використаний посуд.

#### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури, персонал повинен бути компетентний і вповноважений для виконання усіх споріднених процедур.

Окрім цього, ембріологи повинні прочитати і зрозуміти деталі цієї процедури, пройти відповідне навчання та бути вповноваженим керівництвом перед виконанням цієї процедури.

#### **Інструкція з підготовки сперматозоїдів**

Для того, щоб сперма була підготовлена для використання під час ДРТ процедур необхідно відмити та відповідно підготувати її, щоб усунути сім'яну рідину та забруднення, які не повинні контактувати з ооцитом і/або порожниною матки.

Основні методики приготування сперми, що використовуються включають метод swim-up та «перерваного» градієнтного розділення. Метод swim-up в основному базується на рухливості сперматозоїдів. Найбільш рухомі, «кращі»

сперматозоїди випливають в нашароване зверху культуральне середовище, звідки їх можна відібрати. Сперматозоїди «гіршої» якості залишаються на дні. Перерваний градієнт розділення є більш спеціалізованим методом та включає в себе центрифугування з використанням окремих шарів спеціальних розчинів, що містять частинки кварцу (окису кремнію), які «пригнічують» сперму. Як правило, тільки рухливі, морфологічно нормальні сперматозоїди здатні проникати між шарами, в результаті утворюються гранули осаду сперми високої якості, яку використовують у роботі.

Найчастіше обидва методи приготування сперми використовуються в комплексі.

#### **Здоров'я та безпека:**

Ризик пошкоджень. Ризик біологічних рідин.

#### **Відповідальність:**

Ця процедура виконується ЛИШЕ ембріологами.

#### **Обладнання, матеріали та інші необхідні процедури**

Мікроскоп. Чашка Петрі d=100. Центрифуга. Стерильні калібровані пластикові піпетки. Вортекс. Конічна пробірка (фалькон). Термостат. Чашка Петрі d=35. Штатив для пробірок.

#### **Інші необхідні процедури**

Інструкція з аналізу сперми. Інструкція по процедурі подвійного свідчення. Інструкція з верифікації пацієнтів

#### **Необхідні документи**

Бланк забору сперми

#### **Процедура**

#### **Приготування сперми для IVF та ICSI**

Зразки сперми чоловіка / партнера.

Зразки сперми чоловіка / партнера для використання при IVF або ICSI зазвичай отримують в клініці у день отримання яйцеклітин, або можуть бути доставлені пацієнтом тільки за попередньою домовленістю.

Якщо зразок отримують в клініці, реєстратор повинен видати чоловіку/партнеру Бланк забору сперми, вказавши на ньому клінічний номер пацієнта. Після того, як пацієнт особисто заповнить бланк, ембріолог звіряє всі дані і проводить пацієнта у кімнату для здачі сперми та дає йому попередньо підписану чашку Петрі (d=100) для здачі зразка. На верхній частині чашки пишемо прізвище та ім'я пацієнта, клінічний номер та дату народження. На нижній частині чашки можна вказати тільки прізвище та ім'я пацієнта.

Кімната обладнана дзвінком. Пацієнта повідомляють про те, що він повинен подзвонити, коли усе буде готово і зачекати у холі клініки.

При отриманні зразка в лабораторії в день забору яйцеклітин, ембріолог повинен підписати бланк забору сперми, підтверджуючи, що ці деталі перевірені з пацієнтом та проставити в бланку час здачі сперми.

Аналіз сперми проводиться перед початком програми ДРТ. В день пункції проводиться лише візуальне оцінювання зразка після його повного розрідження. У випадку дуже поганої якості сперми чоловік/партнер здає сперму додатково ще один раз.

#### **Використання донорської сперми**

Якщо планується використання донорської сперми, характеристики партнера-чоловіка повинні бути узгоджені з лікуючим лікарем за кілька днів (бажано якнайраніше) до дня пункції ооцитів.

Перевірте чи вірно вибрано донорський зразок.

Вийміть відповідну віалу/соломину з банку зберігання та розморозьте її відповідно до інструкції про розморожування та зберігання кріоконсервованої сперми донорів.

- Перевірте двічі, що позначення на віалі/соломинці і код донора вірні.
- Попросіть колегу засвідчити підписуванням листка приготування сперми, що код донора на віалі відповідає коду, записаному на листі підготовки сперми.

Відкорегуйте дані у «Журналі обліку, зберігання та використання сперми пацієнтів» (електронний та паперовий варіанти).

Коли зразок розмерзеться, відріжте інший кінець соломинки і дозвольте зразку витекти, або перенесіть вміст віали за допомогою стерильної піпетки у нову конічну пробірку. На пробірці пишемо прізвище та ім'я пацієнтки, клінічний номер, дату народження та номер дози.

#### **Підготовка сперми**

- Вийміть реагенти Supra Sperm System (Origio) (80% і 55% розчини) чи їх аналоги з холодильника і залиште не менш ніж на 30 хв. перед використанням при кімнатній температурі.
- Використовуючи стерильну піпетку, відберіть відповідний об'єм (зазвичай 0,5мл) 55% розчину і перенесіть на дно стерильної конічної пробірки, позначеної прізвищем, іменем, клінічним номером та датою народження пацієнта.
- Використовуючи таку ж піпетку, відберіть такий самий об'єм 80% розчину і обережно нанесіть під нижній шар у кожній конічній пробірці.
- Переконайтесь, що розрідження сперми відбулося і використовуючи стерильну піпетку, акуратно нанесіть необхідну кількість зразка сперми (залежно від показників сперми) на верхній шар кожного градієнта. Ця процедура вимагає подвійного засвідчення.
- Відцентрифугуйте градієнти при 2000RPM протягом 20 хв.

- Використовуючи піпетки обережно відберіть градієнтні шари, щоб залишити осад на кінці кожної конічної пробірки.

- Додайте до осаду близько 3 мл попередньо нагрітого середовища для відмивки сперматозоїдів Sperm Preparation Medium (Origio) чи аналогу, ресуспендуйте за допомогою вортекса та відцентрифугуйте при 2000RPM протягом 10 хв.

- Відберіть піпеткою супернатант у підписану прізвищем пацієнта чашку Петрі і, при потребі, повторіть етап відмивання ще раз.

- Після відмивання відберіть супернатант максимально близько до осаду, і нашаруйте зверху невеликий об'єм (кілька крапель) Sperm Preparation Medium (Origio) чи аналог.

- Інкубуйте пробірку в інкубаторі протягом не менше 30 хвилин.

- Обережно при потребі відберіть новою стерильною піпеткою супернатант у маленьку чашку Петрі (ідентифікована так само як і пробірка) та оцініть якість приготованого зразка сперми під мікроскопом. Процедура переносу в маленьку чашку Петрі відбувається згідно процедури подвійного засвідчення.

- Кожного разу для роботи використовуємо нові стерильні піпетки.

#### **Приготування сперми для внутрішньо - маткової інсемінації**

Внутрішньо-маткову інсемінацію можна проводити з використанням сперми чоловіка або донорської сперми.

Процедури для забору, засвідчення і аналізу зразків для ВМІ є такими ж як і для IVF та ICSI – див. «Приготування сперми для IVF та ICSI».

Процедура підготовки сперми для ВМІ є такою ж як і для IVF та ICSI.

З метою покращення результату ВМІ, осад, що залишається використовують для проведення внутрішньоматкової інсемінації.

#### **Приготування заморожених зразків донора**

Процедури верифікації, підготовка після зберігання і аналіз донорських зразків для ВМІ є такими ж як для IVF і ICSI – див «Приготування сперми для IVF і ICSI».

Одну віалу донорської сперми зазвичай використовують для однієї спроби ВМІ, метод приготування є таким ж як і приготування нативного зразка сперми.

#### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Окрім цього, ембріологи повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримають дозвіл на виконання цієї процедури.



## **Інструкція з запліднення ооцитів методом запліднення in vitro (ЗІВ)**

Термін “запліднення in vitro”( ЗІВ) означає запліднення в пробірці і застосовується для позначення процедури, при якій жіночі яйцеклітини запліднюються поза жіночим організмом у лабораторії. ЗІВ – це процес, під час якого ооцити, забрані з яйників жінки культивуються з відповідним об’ємом і концентрацією попередньо підготовленої сперми. Використовуючи спеціальне лабораторне обладнання, ми наближуємо цей вид запліднення до природного процесу. Через 16-18 годин культивування (з моменту запліднення) ембріолог оцінює якість запліднених ооцитів (зигот).

Показами для проведення ЗІВ є:

- незначні відхилення в показниках спермограми;
- відсутність аглютинатів сперматозоїдів;
- сумісність партнерів (відсутність антиспермальних антитіл).

### **Здоров’я і безпека**

Ризик гострих пошкоджень. Ризик біологічних рідин.

### **Відповідальність**

Ця процедура здійснюється ЛИШЕ ембріологами.

### **Обладнання, матеріали та інші процедури**

Ламінарна шафа. Стерильні капіляри. Мікропіпетор. Стерильні наконечники. Дозатор.

### **Інші процедури**

Інструкція з приготування середовищ і чашки для культивування. Інструкція подвійного засвідчення.

### **Необхідні документи**

Протокол культивування. Протокол запліднення.

### **Процедура**

Методика проведення процедури ЗІВ складається з наступних етапів:

Процедура ЗІВ проводиться через 2-6 годин після аспірації ооцитів. Ембріолог, що виконує цю процедуру, підраховує концентрацію сперматозоїдів після її приготування (капацитації) та вираховує, який об’єм потрібно додати в лунку з ооцитами. Після цього виймає з інкубатора чашку (35 мм) із зразком попередньо підготовленої сперми пацієнта та неочищені ооцити пацієнтки. Далі відбувається подвійне засвідчення процедури із залученням свідка. Після чого, ембріолог вносить визначений об’єм сперми в 4-ох-луночну чашку в пусту лунку, а потім додає туди ооцити. Запліднення проводять на нагрітій поверхні ламінарної шафи. Сперма додається з такого розрахунку, щоб в чашці для запліднення ми отримали концентрацію сперматозоїдів 60–100 тис./ооцит. Чашку для культивування із ооцитами ставлять в інкубатор для культивування, підписують

наклейку із прізвищем та іменем пацієнтки та наклеюють її на дверку інкубатора навпроти чашки. Ембріолог, що проводив запліднення, оформляє паперовий та електронний Протоколи культивування у яких вноситься вся необхідна інформація про процедуру.

### **Запліднення – корисні моменти.**

– Вираховано, що при додаванні 25 мкл зразка з концентрацією 4 млн/мл сперматозоїдів, вноситься 1 x 10<sup>5</sup> сперматозоїдів.

– Підготовлену сперму з концентрацією більше ніж 4 млн/мл можна розвести до цієї концентрації, і відповідно додати лише 25 мкл у лунку

– 25 мкл є зручним об’ємом для запліднення, оскільки додавання такого об’єму незначно впливає на об’єм культурального середовища в лунці температуру чи рН. Якщо необхідно додавати більш ніж 75 мкл суспензії сперми, необхідно обережно відібрати еквівалентний об’єм культурального середовища з лунки.

### **Ситуації, в яких можна використовувати вищі концентрації:**

– Коли очікується, що можуть бути проблеми з концентрацією сперматозоїдів або такі проблеми були попередньо виявлені, то в таких випадках виконується процедура ІКСІ.

– Коли використовують кріоконсервовану сперму необхідно збільшити концентрацію сперматозоїдів (4 x 10<sup>5</sup>), щоб компенсувати можливі втрати при розморожуванні кріоконсервованої сперми або робити ІКСІ.

### **Вимоги до навчання**

Для того, щоб виконувати цю процедуру, персонал повинен бути компетентний у всіх споріднених процедурах. Окрім цього, персонал ембріологічного відділення повинен перечитати і зрозуміти деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку, бути вповноваженим керівництвом перед виконанням цієї процедури.

## **Інструкція по денудації ооцитів**

Перед процедурою ICSI чи вітрифікацією ооцитів, необхідно очистити ооцити від клітин кумулюсу і корони радіати, щоб створити безперешкодний доступ до ооцита і запобігти забрудненню голки для ін’єкції при ICSI. Цю процедуру називають денудацією - очищенням і проводять дуже обережно, використовуючи ряд дрібніших піпеток у поєднанні з розчином гіалуронідази – фермента, що міститься у акросомі сперматозоїда. При дії гіалуронідази на ооцит протягом короткого періоду часу розриваються зв’язки між кумулюсом і клітинами корони, що надає можливість механічно легко їх усунути.

Важливо пам’ятати, що під час денудації ооцити є досить чутливі, тому потрібно уникати перетримання яйцеклітин у розчині гіалуронідази (це може привести до спонтанної активації) і грубого обходження з яйцеклітинами, щоб не пошкодити їх.

Денудацію необхідно проводити не швидше, ніж через дві години після пункції.

### **Здоров'я і безпека**

Ризик гострих пошкоджень. Ризик біологічного зараження.

### **Відповідальність**

Ця процедура здійснюється ЛИШЕ ембріологами.

### **Обладнання, матеріали та інші процедури**

Ламінарна шафа. Стерильні капіляри. Капіляри для денудації. Чашки для денудації.

### **Інші необхідні процедури**

Інструкція з процедури подвійного засвідчення. Інструкція з приготування середовищ та чашок для культивування.

### **Процедура**

Чашки для денудації необхідно приготувати напередодні ввечері.

Для кожної процедури денудації використовують набір із 2-3 стерильних капілярів, розтягнутих до потрібних діаметрів. Перелік необхідних капілярів наступний: Стерильний капіляр. Стерильний витягнутий капіляр з діаметром кінця 200 мкм (не обов'язково). Стерильний витягнутий капіляр з діаметром кінця 135–140 мкм.

Денудацію проводять на підігрітій поверхні ламінарної шафи. Коли капіляри готові – чашки для денудації і чашку з ооцитами можна виймати з інкубатора і розмішувати в ламінарній шафі, перед тим провівши процедуру подвійного засвідчення.

Комплекси ооцит-кумулюс (ОКК) переносять у розчин гіалуронідази (ICSI Cumulase, Originas) в посудину для денудації капіляром 1.

За допомогою капіляра 1, ОКК обережно піпетують у гіалуронідазі, відділяючи клітини кумулюсу. (Це необхідно робити доти, поки ооцити максимально не очистяться від клітин кумулюсу і не залишаться укритими лише кількома шарами клітин корони). Пам'ятайте, цей етап роботи необхідно проводити максимально швидко (30–60с), щоб запобігти пошкодження яйцеклітини гіалуронідазою.

Використовуючи капіляр 1, всі або частину ооцитів (залежно від їх кількості) переносять в першу з 3 крапель культурального середовища в чашці для денудації і промивають, щоб усунути надлишок гіалуронідази. Іншу частину ооцитів переносять в другу краплю культурального середовища.

Використовуючи капіляри 2 і 3, залишки клітин корони видаляють з поверхні кожного ооцита, обережно піпетуючи їх. Коли ооцити стають чистими, їх необхідно перенести в 3 краплю культурального середовища, промиваючи їх від будь-яких залишків гіалуронідази, отже в останній краплі ви отримаєте очищені

від кумулюсу/клітин корони ооцита. Очищені ооцити переносять в підписану чашку для культивування і залишають в інкубаторі. Перенос в чашку для культивування підлягає процедурі подвійного засвідчення.

Необхідно бути обережним протягом усіх етапів денудації, не піпетувати занадто енергійно, оскільки це може пошкодити ооцити, а також збільшує ризик потрапляння повітряних бульбашок у краплі. Через бульбашки у краплях важко візуалізувати ооцити.

### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Окрім цього, ембріологи повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримають дозвіл на виконання цієї процедури.

## **Інструкція з запліднення ооцитів методом ІКСІ**

Ін'єкція одного спермія в цитоплазму ооцита (ІКСІ від міжнародної назви методу ICSI – Intracytoplasmic Sperm Injection) проводиться за допомогою інвертованого мікроскопа, оснащеного мікрomanipуляторами, з використанням спеціальних мікроінструментів та культуральних середовищ.

Процедура ІКСІ є ідентичною до IVF у тому, що при її виконанні яйцеклітини і сперматозоїди забирають у кожного партнера. Відмінність між процедурами ICSI та IVF – це метод запліднення. При IVF сперматозоїди та яйцеклітини змішують разом у чашці і сперматозоїди запліднюють яйцеклітини «природно». При ІКСІ окремі сперматозоїди захоплюють використовуючи тонку скляну голку і вводять прямо в яйцеклітину, проколюючи її оболонку та цитоплазму.

Використовуючи ІКСІ, оминають природній процес проникнення сперматозоїда у яйцеклітину і тому застосовують цей метод при наявності труднощів, що виникають під час природнього процесу запліднення або запліднення за допомогою IVF.

### **Показами для використання ІКСІ є:**

- Патоспермія;
- Азооспермія (в разі отримання сперматозоїдів за допомогою біопсії яєчок);
- Наявність аглютинатів сперматозоїдів;
- Незадовільне (відсутнє) запліднення ооцитів в попередніх спробах ЗІВ.

Чоловіки, які потрапляють під вищезгадані категорії, мають дуже незначний шанс бути батьками своїх генетичних нащадків. ІКСІ надає реальний шанс цим чоловікам і їх партнерам мати генетично рідну дитину.

### **Здоров'я і безпека**

Ризик гострих пошкоджень. Ризик біологічних рідин.

## **Відповідальність**

Ця процедура здійснюється **ЛИШЕ** ембріологами.

## **Обладнання, матеріали та інші процедури**

Ламінарна шафа. Стерильні піпетки Пастера. Інвертований мікроскоп. Холдінг. Система маніпуляторів. Голка для ін'єкції при ICSI. Чашки для ICSI.

## **Інші необхідні процедури**

Інструкція з приготування середовищ та чашок для культивування. Інструкція з процедури подвійного засвідчення. Інструкція з денудації ооцитів.

## **Необхідні документи**

Протокол культивування. Протокол засвідчення викидання пустих чашок.

## **Процедура**

Методика проведення ІКСІ складається з наступних етапів:

- Підготовка ооцитів;
- Позбавлення руху сперматозоїда шляхом порушення цілісності мембрани хвоста;
- Порушення цілісності зовнішньої цитоплазматичної мембрани ооциту;
- Введення сперматозоїда в цитоплазму ооцита за допомогою скляної мікроголки;
- Культивування та інші етапи, як при ЗІВ.

Ембріолог, що буде проводити процедуру ІКСІ, виймає з інкубатора пробірку із зразком попередньо підготовленої сперми пацієнта та очищені ооцити пацієнтки та чашки для ІКСІ. Всі чашки для ІКСІ повинні бути підписані клінічним номером пацієнтки, пронумеровані і пройти процедуру подвійного засвідчення із залученням свідка. Далі ембріолог вносить за допомогою піпетки Пастера сперму у велику краплю з PVP Medium (Origio) чи аналогу, та ооцити в малі краплі з середовищем Universal IVF Medium (Origio) чи аналогу. Для сперми і ооцитів використовують різні піпетки Пастера. Чашки для ІКСІ та чашку для культивування ембріолог ставить назад у інкубатор.

## **Набір інструментів**

Одну голку для ін'єкції і один холдінг виймають з упакування. Щоразу при відкриванні нової упаковки серійні номери інструментарію заносяться в електронний документ Щоденний контроль.

Перш за все всі гвинти та інжектор необхідно поставити у вихідні положення (на позначку «0»).

Холдінг розміщують в тримачі зліва від мікроскопа. Тримач, який тепер містить піпетку, затискають на маніпуляторі і пересувають за допомогою гвинта, поки кінець піпетки не розміститься у місці найбільшого освітлення мікроскопа.

Холдінг необхідно вирівняти таким чином, щоб кінець піпетки показував «на 3 годину» і підвести так, щоб її кінець розміщувався під кутом 2-3° до горизонтальної лінії.

Голку для ін'єкції встановлюють так само, але з протилежної сторони. Цю голку необхідно встановити горизонтально навпроти піпетки, скеровуючи її у напрямку «на 9 годину»

Будь-яку іншу інформацію стосовно використання мікроманіпулятора і використанню установок можна дізнатися з інструкції до обладнання.

## **Знерухомлення сперми**

Чашку для ІКСІ розміщують на нагрітій підставці мікроскопа. Голку для ін'єкції опускають в краплю зі спермою. Краплю середовища, що містить сперму необхідно встановити в полі зору. Обирають рухливий, нормальної морфології сперматозоїд і знерухомлюють його, перетираючи хвіст за допомогою голки для ін'єкції.

Коли сперматозоїд уже знерухомлений, його зтягують в голку для ІКСІ хвостом уперед. Сперматозоїд втягують в голку для ін'єкції, повертаючи мікро-інжектор попереду мікроскопа проти годинникової стрілки. (Обидва мікро-інжектори працюють за однаковим принципом. Оберти проти годинникової стрілки дозволяють вбирати середовище, оберти за годинниковою стрілкою – виштовхувати його.)

На цьому етапі ставлять в поле зору ооцит, який підлягає ін'єкції.

## **Ін'єкція**

Ооцит перевіряють на зрілість за наявністю або відсутністю першого полярного тільця. Якщо його нема, ооцит незрілий (метафаза I або зародковий пухирець), це занотовують і перевіряють наступні ооцити: незрілі ооцити ін'єкції не підлягають.

Якщо є перше полярне тільце, холдінг опускають і використовують для утримання ооцита таким чином, що полярне тільце розміщується на «6 годину» або «12 годину».

Сперматозоїд підводять до самого краю голки і проколюють ооцит у позиції «на 3 годину».

Голку вводять в центр ооцита, після чого цитоплазму ооцита обережно втягують назад у голку поки оолема ооцита не розірветься. Сперматозоїд і увібрану цитоплазму вводять назад в ооцит, голку для ін'єкції витягають. Ооцит звільняють від піпетки, що утримує його.

Усі деталі ін'єкції записують у Протокол культивування (зрілість ооцита, час ін'єкції, морфологічні зміни ооцита) Процедуру ІКСІ проводять для всіх зрілих ооцитів. Запліднені ооцити переносять у чашки для культивування одночасно зі всіх чашок в лунки № 3 і 4 чашки для культивування із залученням свідка згідно стандартної процедури подвійного засвідчення. Ооцити, які не підлягали

заплідненню (незрілі чи дегенеративні) переносять у лунку №2 чашки для культивування. Чашку для культивування із заплідненими ооцитами ставлять в інкубатор для культивування, підписують наклейку із прізвищем та іменем пацієнтки та наклеюють її на внутрішні скляні двері інкубатора навпроти чашки.

Свідок переглядає чашки для ІКСІ і своїм підписом у «Протоколі засвідчення викидання пустих чашок» засвідчує, що оцити дійсно були перенесені в чашку для культивування.

Ембріолог, що проводив запліднення оформляє паперовий та електронний протоколи культивування, електронний протокол запліднення, вносить кількість фолікулів, загальну кількість ооцитів, кількість зрілих ооцитів та своє прізвище як виконавця процедури.

### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Окрім цього, ембріологи повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримають дозвіл на виконання цієї процедури.

### **Інструкція з перевірки запліднення**

Хоча яйцеклітини культивують разом з сперматозоїдами, немає жодної гарантії, що запліднення відбудеться. Тому перевірка ооцитів на ознаки запліднення є необхідною. Запліднення можна виявити на 12-20 годину після процедури по наявності двох пронуклеусів, що формуються в цитоплазмі ооцита навколо материнських і батьківських хромосом. Як правило, через 24 години після запліднення, мембрани пронуклеусів починають розчинятись, відбувається сингамія (злиття чоловічого і жіночого генетичного матеріалу), що супроводжується першим поділом.

### **Здоров'я та безпека**

Ризик гострих пошкоджень. Ризик біологічного зараження.

### **Відповідальність**

Ця процедура здійснюється ЛИШЕ ембріологами.

### **Обладнання та матеріали**

Ламінарна шафа. Інвертований мікроскоп. Стерильний піпетка Пастера

### **Інші процедури**

Інструкція з приготування середовищ та чашок для культивування. Інструкція з процедури подвійного засвідчення.

### **Необхідні документи**

## **Протокол культивування**

### **Процедура**

На ранок після процедури запліднення (як правило, через 16–18 годин) роблять оцінку запліднення, підраховуючи кількість пронуклеусів в кожній яйцеклітині. Вважають, що в яйцеклітинах, які мають два однакових пронуклеуси, запліднення відбулося нормально і такі яйцеклітини переносять у 4x-луночну чашку для культивування в середовище Embryo Assist чи ISM1 (Origio). Середовище готується напередодні і має стабілізуватись в інкубаторі протягом ночі. Яйцеклітини без пронуклеусів, з одним або більше ніж з двома пронуклеусами вважаються незаплідненими або заплідненими ненормально і тому нежиттєздатними. Їх відбраковують в окрему лунку. При цьому робляться відповідні записи в Протокол культивування. Перенос в чашку для культивування має супроводжуватися процедурою подвійного засвідчення.

Яйцеклітини запліднені методом ІКСІ вже не мають кумулюсу, тому не потребують очистки перед оцінкою запліднення. Проте, оцити, запліднені за допомогою IVF, надалі залишаються в ооцит-кумуляному комплексі, який хоч і розсмоктується під впливом ферментів, що містяться у спермі, підлягає видаленню з метою оцінки запліднення. Видалення кумулюсу необхідно проводити максимально швидко, щоб запобігти змінам температури, рН і осмотичного тиску в культуральному середовищі.

### **Видалення кумулюсу з використанням витягнутої піпетки Пастера**

- 1) Візьміть стерильну піпетку Пастера. Під малим збільшенням мікроскопа перевірте чи ширина піпетки Пастера має відповідні розміри для утримання ембріонів і чи її кінець не має зазубрень.
- 2) Коли піпетка Пастера є готовою, витягніть чашку з яйцеклітинами з інкубатора і поставте на нагріту поверхню ламінарної шафи.
- 3) Спостерігаючи під невеликим збільшенням, обережно піпетуйте кожен ембріон за допомогою піпетки Пастера, поки кумулюс не видалиться і ембріон не буде чітко видно.

### **Оцінка запліднення**

- 1) Під великим збільшенням мікроскопа порахуйте кількість пронуклеусів в кожному ембріоні.
- 2) Запишіть кількість пронуклеусів поряд із відповідним номером яйцеклітини в Протокол культивування. Якщо пронуклеуси не спостерігаються в певній яйцеклітині, перевірте чи є наявне полярне тільце і запишіть це.
- 3) Перенесіть ембріони, що містять 2 пронуклеуси в чашку для культивування в середовище Embryo Assist чи ISM1 (Origio), використовуючи піпетку Пастера і пропишіть на кришці чашки для культивування кількість яйцеклітин. Перенос в чашку для культивування має супроводжуватися процедурою подвійного засвідчення.

4) Поставте чашку в інкубатор і культивуйте протягом ночі.

Якщо запліднення не відбулося, перевірте незапліднені яйцеклітини під мікроскопом на наявність полярних тілець, чи не зв'язався сперматозоїд з зона pellucida і морфологію яйцеклітин. Також перевірте чи пропорція рухливої сперми, що є досі наявна у чашці, незначно пошкоджена (щонайменше 50% сперматозоїдів повинні бути досить рухливими на цьому етапі). Запишіть ці деталі у ПРТ80 Протокол культивування пацієнта.

Коли перевірка запліднення закінчена і результати відомі, запишіть їх у Протокол культивування (електронний та паперовий варіант).

Перевірте коли призначено цим пацієнтам перенесення ембріонів. У випадку якщо запліднення не відбулось, чи у випадку якихось інших проблем, ембріолог про це повідомляє зав. ембріологічним відділенням та лікуючого лікаря.

#### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Окрім цього, ембріологи повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримають дозвіл на виконання цієї процедури.

### **Інструкція з допоміжного хетчінгу**

Допоміжний хетчінг (assisted hatching, АН) - це процедура, в результаті якої зона pellucida (желеподібна мембрана, що оточує ембріон) руйнується механічно, хімічно або за допомогою лазера, щоб легше відбувся вихід («хетчінг») ембріона з його оболонки і, таким чином, підвищилась ймовірність імплантації.

АН проводиться на розморожених ембріонах, оскільки вважається, що в цих випадках відбувається затвердіння зона pellucida і АН відіграє важливу роль в успіху лікування, а також на свіжих ембріонах пацієнток, вік яких перевищує 35 років.

#### **Здоров'я і безпека**

Ризик гострих пошкоджень. Ризик біологічних рідин.

#### **Відповідальність**

Ця процедура виконується лише ембріологом.

#### **Обладнання, матеріали та інші процедури**

Обладнання. Матеріали

Ламінарна шафа. Стерильні витягнуті піпетки Пастера. Інвертований мікроскоп. Піпетка для утримання (холдінг). Система маніпуляторів. Голка для механічного хетчінгу. Чашка для хетчінгу

#### **Інші необхідні процедури**

Інструкція з приготування середовищ та чашок для культивування. Інструкція з верифікації пацієнтів. Інструкція з процедури подвійного засвідчення. Інструкція з запліднення ооцитів методом ICSI.

#### **Необхідні документи**

Протокол культивування. Ембріотрансфер кріоембріонів. Додатковий лист засвідчення. Протокол засвідчення викидання пустих чашок

#### **Процедура**

##### **Підтвердження АН**

АН проводиться на кріоембріонах та свіжих ембріонах вікових пацієнток, як сказано у вступі, на 2–3 день культивування ембріонів. Кількість ембріонів на АН ембріолог узгоджує з лікуючим лікарем, базуючись на Плані лікування пацієнта та на темпах дроблення ембріонів. Після оцінки ембріонів, ембріолог повинен, в першу чергу, пересвідчитись, що пацієнту призначено АН. Ембріони, на яких проведено АН повинні бути відмічені в Протоколі культивування або Ембріотрансфер кріоембріонів.

У випадку пролонгованого культивування ембріонів, ембріони з АН і без нього культивуємо в окремих лунках.

##### **Налаштування мікроінструментів**

Холдінг та голку для механічного хетчінгу (голка механічного розсічення) виймають з упаковки. Позначки, що містять номер партії голки і холдінгу ембріолог вносить в таблицю реєстрації лотів середовищ та інструментів в папці «Щоденний контроль».

На інвертованому мікроскопі з маніпуляторами для ICSI треба поставити по центру всі маніпуляційні ручки.

Холдінг фіксується в лівий тримач мікроскопа і наструюється як і для процедури ICSI горизонтально, в напрямку «3-ої години».

Голка для механічного хетчінгу фіксується в правий тримач мікроскопа. Тримач разом з приєднаною голкою закріплюється у своє місце на маніпуляторі і наструюється таким чином, як голка для ICSI .

Голка для механічного хетчінгу має бути налаштована в горизонтальному положенні так, щоб кінчик голки дивився в напрямку «9-ої години».

##### **Процедура АН**

Ембріони, призначені для хетчінгу переносяться з культуральної чашки в чашку для хетчінгу з використанням стерильної піпетки Пастера.

Чашка для хетчінгу розміщується на столику мікроскопа для ICSI і мікроінструменти опускаються в каплю середовища Universal IVF Medium, Origio, де вже знаходяться ембріони, призначені для хетчінгу .

Холдінг використовується для того, щоб маніпулювати і утримувати ембріон так, щоб було видно площину ембріона і місце, де є проміжок між клітинами (бластомерами) та zona pellucida.

Якщо місце придатне для АН не є одразу помітне, то ембріон можна крутити з використанням голки, поки не буде вибрано місце для проколу.

Коли ембріон знаходиться в зручному положенні, голка для механічного хетчінгу використовується, щоб проколоти оболонку. НЕОБХІДНО БУТИ ДУЖЕ УВАЖНИМ, ЩОБ НЕ ПРОКОЛОТИ І НЕ ПОШКОДИТИ ЖОДЕН З БЛАСТОМЕРІВ.

Голка для механічного хетчінгу тоді рухається до середини і ембріон ніби нанизується на голку.

Холдінг відпускається, залишаючи ембріон приєднаним до голки для механічного хетчінгу.

Тримаючи голку для механічного хетчінгу на місці, холдінгом «перетирається» протягнута ділянка зони, стискаючи її двома мікроінструментами. Врешті, в zona pellucida утворюється щілина, щоб ембріон міг вийти назовні, коли досягне стадії бластоцисти.

Цей процес повторюється для всіх призначених для АН ембріонів. Після АН ембріони переносять в чашку для культивування і поміщають її у відповідний інкубатор.

Все обладнання має використовуватись згідно рекомендацій виробника.

Процедура АН потребує подвійного засвідчення із занесенням часу процедури та підписів виконавця та свідка у «Додатковий лист засвідчення», «Протокол засвідчення викидання пустих чашок».

#### **Вимоги до навчання**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Окрім цього, ембріологи повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримають дозвіл на виконання цієї процедури.

#### **Інструкція з культивування ооцитів та ембріонів**

Мета культивування in vitro – культивування гамет та ембріонів в умовах максимально наближених до умов in vivo. Для забезпечення відповідного поживного середовища використовується спеціальне комерційне культуральне середовище, але фізіологічне рН (7,2 – 7,3) і температура (37°C) підтримуються в основному інкубаторами, в яких проводять культивування. Культуральне середовище містить бікарбонатну буферну систему, що використовує газоподібний двоокис вуглецю CO<sub>2</sub> для підтримки рН. Інкубатори

установлюють і калібрують відповідним чином, щоб забезпечити точну концентрацію CO<sub>2</sub> і температурні умови.

Встановлено, що концентрація O<sub>2</sub> в середовищі культивування має вплив на розвиток ембріонів, особливо на пізніх етапах культивування (4-5 день). Тому для культивування ембріонів на цих етапах бажано використовувати інкубатори, які мають опцію подачі азоту і контролю рівня O<sub>2</sub> в середині камери.

Культивування ембріонів здійснюється ембріологом у стерильному одноразовому посуді у спеціальних середовищах згідно «Інструкції з приготування середовищ та чашок для культивування».

#### **Здоров'я і безпека**

Ризик біологічних рідин.

#### **Відповідальність**

Ця процедура виконується ЛИШЕ ембріологами.

#### **Обладнання, матеріали та інші процедури**

CO<sub>2</sub>-інкубатори. 4-х луночні чашки. Ламінарна шафа. Культуральні середовища. Стереомікроскоп. Стерильні капіляри. Стерильні піпетки.

#### **Інші необхідні процедури**

Інструкція з аспірації ооцитів. Інструкція з перевірки запліднення. Інструкція з приготування середовищ та чашок для культивування.

#### **Необхідні документи**

Протокол культивування (ICSI / IVF). Протокол культивування до 5 дня. Ембріотрансфер кріоембріонів.

#### **Процедура**

Фолікулярну рідину, отриману в результаті пункції фолікулів, переносять до чашки Петрі діаметром 90-100 мм. Аспірат досліджують під стереомікроскопом з 10-50 разовим збільшенням, відшукують ооцити і переносять за допомогою пластикового капіляра в чашку Петрі діаметром 35 мм з середовищем Flushing Medium (для відмивання від фолікулярної рідини та крові). Відмиті ооцити переносимо за допомогою того ж капіляра у 4-х луночну чашку з заздалегідь підготованим середовищем Universal IVF Medium для подальшого культивування. Культивування здійснюється у інкубаторі з температурою 37°C і 5% концентрацією CO<sub>2</sub> в газовому середовищі.

Запліднення ооцитів (після 2-6 годин преінкубації) виконує ембріолог згідно «Інструкції з запліднення ооцитів методом інсемінації (IVF)».

Для запліднення ооцитів можливе застосування методики ICSI, якщо ооцити досягли стадії розвитку МІІ згідно «Інструкції з денудації ооцитів»; «Інструкції з запліднення ооцитів методом ICSI».

Після проведення запліднення клітини знову повертаємо до інкубатора для подальшого культивування.

Перевірка запліднення здійснюється ембріологом згідно «Інструкції з перевірки запліднення». Зиготи переносять до нової 4-х луночної чашки у заздалегідь підготоване середовище Embryo Assist чи ISM1, де відбувається початковий розвиток ембріонів. На 2-гий день культивування ембріони переносять у середовище Blast Assist і ставлять на культивування у інкубатор, який має опцію регулювання рівня кисню у камері, де відбувається подальше культивування. На 4-тий день культивування ембріони переносять у свіже середовище Blast Assist.

Щодня ембріологи спостерігають за розвитком ембріонів. Для цього 4-х луночну чашку з ембріонами виймають з камери інкубатора, ставлять на предметний столик інвертованого мікроскопа, переглядають і фіксують стадію розвитку та якість ембріонів.

#### **Нормальним темпам розвитку відповідає:**

2 день культивування – стадія 2-4 бластомерів;

3 день культивування – стадія 6-8 бластомерів;

4 день культивування – стадія 10-12 бластомерів, компактизації, або морули;

5 день культивування – стадія морули або бластоцисти.

Чим швидші темпи дроблення, тим вищі шанси імплантації таких ембріонів.

#### **Категорії якості ранніх ембріонів (2–3 день культивування):**

A – ембріони не містять фрагментації;

B – ембріони містять незначну фрагментацію (до 10%);

C – у ембріонів виражена фрагментація 10-50%;

D – фрагментація ембріонів складає більше 50%.

#### **Ступені зрілості бластоцист:**

I – рання бластоциста. Бластоцель менше половини об'єму ембріона;

II – бластоцель більше половини об'єму ембріона;

III – повна бластоциста. Бластоцель повністю займає об'єм ембріона;

IV – бластоциста, яка розрослася (експандована). Бластоцель стає більшим і починає тоншати зона пелюцида;

V – трофектодерма починає проникати через зону пелюциду (хетчінг);

VI – бластоциста, що вилупилась, покинула зону пелюциду.

#### **Якість внутрішньоклітинної маси (ВКМ) оцінюється як:**

A – щільна, з великою кількістю клітин;

B – вільніше групування середньої кількості клітин;

C – незначна кількість клітин.

#### **Якість трофектодерми оцінюється як:**

A – багато клітин, які формують трофектодермальний шар;

B – небагато клітин;

C – незначна кількість великих клітин.

Всі дані про перебіг культивування заносяться ембріологом у «Протокол культивування», «Протокол культивування до 5 дня» або у Ембріотрансфер кріоембріонів у випадку кріоциклів (паперовий та електронний варіанти).

При зупинці дроблення ембріонів чи значному відставанні у темпах дроблення ембріолог ставить до відома завідуючого ембріологічним відділенням та лікуючого лікаря.

#### **Вимоги до навчання.**

Для виконання цієї процедури працівники повинні бути компетентні в усіх споріднених процедурах. Вони повинні прочитати і зрозуміти усі деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку і бути уповноваженими керівництвом перед тим як вони отримають дозвіл на виконання цієї процедури.

## **ЕМБРІОЛОГІЧНІ ІНСТРУКЦІЇ ДЛЯ РОБОТИ ІЗ КРІОМАТЕРІАЛОМ**

### **Інструкція з кріоконсервації сперми та тестикулярного біоптату**

Кріоконсервацію сперми (тестикулярного біоптату) проводять з метою подальшого використання в програмі лікування безпліддя за допомогою методів ДРТ. А саме:

– при донації сперми (одиноким жінкам, при абсолютному чоловічому безплідді);

– при зберіганні сперми чоловіка, якому передбачається лікування, що негативно вплине на репродуктивну систему;

– для завчасної кріоконсервації сперми чоловіка, у випадку його відсутності на момент пункції;

– при погіршенні результатів спермограми.

Тестикулярний біоптат кріоконсервують найчастіше у випадку наявності сперматозоїдів при діагностичній аспіраційній біопсії яєчок.

Заморозка сперми і тестикулярного біоптату проводиться з використанням рідкого азоту та середовища Sperm freezing у кріовіалах. В такому стані сперма може зберігатися декілька років.

Кріоконсервована сперма зберігається в спеціально відведених дюарах. Для пацієнтів, в яких виявлено гепатити, сифіліс чи інші інфекційні захворювання відведено окремих дюар.

### **Здоров'я і безпека**

Ризик асфіксії. Ризик опіків.

### **Відповідальність**

Ця процедура виконується ЛИШЕ ембріологами.

### **Обладнання, матеріали та інші необхідні процедури**

Ламінарна шафа. Рідкий азот. Посудина для заморозки з решіткою. Кріопробірка (віала). Кріосховище. Стерильні піпетки. Центрифуга. Розчини для заморожування (Sperm freezing, Origio). Вортекс. Середовище для відмивки (Sperm Preparation). Секундомір. Стерильна конічна пробірка на 15 мл. Металевий тримач

### **Інші необхідні процедури**

Інструкція про розморожування та зберігання кріоконсервованої сперми донорів.

Інструкція з кріоконсервації матеріалу та його збереження

### **Процедура кріоконсервації**

1. Вийміть завчасно середовище для заморозки з холодильника, щоб воно нагрілось до кімнатної температури (мінімум 30 хв.)

2. Підготуйте стерильну конічну пробірку та віалу (кріопробірку). Підпишіть прізвище пацієнта, клінічний номер, дату народження. На віалі ще додатково вкажіть дату заморозки.

3. Відберіть еякулят у конічну пробірку. Додайте в пропорції 1:1 середовище Sperm Preparation, добре перемішайте, відцентрифугуйте 10 хв. при 2000 об/хв. Для тестикулярного біоптату відмивка не потрібна.

4. Після відмивання, відберіть супернатант так, щоб залишився осад об'ємом не більше 1 мл. В пропорції 1:1, перемішуючи за допомогою вортексу, повільно додайте кріопротектор (Sperm freezing). Залиште на 10 хв. при кімнатній температурі. До закінчення 10-ти хвилин перенесіть об'єм пробірки у віалу.

При біопсії ячок матеріалу, як правило, небагато, тому весь об'єм матеріалу перенесіть в конічну пробірку і додайте кріопротектор, так як при кріоконсервації нативної сперми.

5. Приготуйте посудину для заморозки. Налийте азоту, таким чином, щоб його рівень був на 1 см. нижче решітки. По закінченні 10-ти хвилин інкубування сперми із кріопротектором, поставте віалу на решітку і накрийте посудину кришкою для насичення камери паром азоту. Таким чином, віала буде знаходитися в парах азоту і повільно охолоджуватися. Залиште віалу в парах азоту на 30-60 хв. для повного замерзання.

6. Перенесіть віалу у відповідний стакан і дюар для подальшого зберігання.

Заповніть паперові документи:

Протокол кріоконсервації сперми

Журнал зберігання кріоконсервованої сперми

Додаток-нагадування пацієнтам щодо кріоконсервації

### **Вимоги до навчання**

Для того, щоб виконувати цю процедуру, персонал ембріології повинен бути навчений та ознайомлений із застереженнями при роботі з рідким азотом.

Окрім цього, персонал ембріологічного відділення повинен перечитати і зрозуміти деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку, бути вповноваженим керівництвом перед виконанням цієї процедури.

### **Вітрифікація та розморожування ембріонів**

Вітрифікація - це сучасний метод кріоконсервації ембріонів/ооцитів, який прийшов на зміну повільному заморожуванню. Зручність, швидкість і висока ефективність характеризують вітрифікацію. Більше 90% ембріонів, розморожених після вітрифікації не виявляють жодних ознак пошкодження, легко переносять повторну кріоконсервацію. Вітрифікація ооцитів і пізніх бластоцист викликає особливу зацікавленість у зв'язку з складністю заморожування цих об'єктів звичайним способом. Займаючи 15 хвилин робочого часу, вітрифікація дозволяє оптимізувати роботу ембріолога. Для впровадження методу вітрифікації не вимагається спеціальне обладнання.

### **Здоров'я та безпека**

Ризик опіків рідким азотом.

Ризик біологічних рідин.

### **Відповідальність**

Ця процедура виконується ЛИШЕ ембріологами.

### **Обладнання, матеріали та інші необхідні процедури**

стереомікроскоп. Капіляри. Електронний дозатор. Чашка Петрі. Змішувач. Одноразові стерильні наконечники. Пінопластовий контейнер. Пластикова піпетка. Дюар. Рідкий азот

### **Необхідні документи**

Протокол кріоконсервації

### **Процедура**

### **Вітрифікація ембріонів**

Для одного циклу вітрифікації необхідно:



Розчин **4**, розчин **D** (ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИД- розливається тільки в скляні пробірки!) та розчин **C**. \*Розчин **C** : використовується як для вітрифікації, так і для відтаювання.

Всі розчини розливаються невеликими об'ємами в мікропробірки типу «Епендорф» і підписуються маркером **синього кольору**.

Реактиви, необхідні для приготування набору для вітрифікації:

Фосфатний буфер Dulbecco (DPBS) без Ca<sup>2+</sup> і Mg<sup>2+</sup>.

Замінник сироватки (SSS, Irvine).

Етиленгліколь (EG, «Sigma»).

Диметилсульфоксид (DMSO, «Sigma» D2650, 5x5 мл).

Сахароза ACS («Sigma» ).

Антибіотик-антимікотик («Sigma» A7292).

PVP-полівінілпірролідон («Sigma» ).

**Розчин C:** DPBS+20% SSS (або FCS) +10мл/л атибіотика-антимікотика .

Приготування 1L розчину C:

Додайте 200 ml SSS (або FCS) і 10мл/л, атибіотика-антимікотика додати 700 мл DPBS і ретельно змішати. Довести DPBS до 1л, ретельно перемішуючи і профільтрувати.

**Розчин 4:** DPBS+ 20%EG+0.3М сахарози+20%SSS (або FCS) +2.5 % PVP+10мл/л атибіотика-антимікотика.

Приготування 1л розчину 4:

Додайте сахарозу 102.6 г і 25 г PVP до 450 мл DPBS . Використовуючи магнітний змішувач розчинити сахарозу. Після повного розчинення PVP і сахарози, додати 200 мл EG, 200 мл SSS (або FCS) і 10 мл антибіотика-антимікотика. Довести DPBS до 1000 мл, ретельно змішати і профільтрувати.

**Розчин D:** ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИД – готовий до використання, розфасований в ампулах. Розчин D повинен бути в твердому стані при температурі +4°C, якщо він рідкий, то його повертають фірми - виробнику для заміни

**Терміни зберігання розчинів :**

*Короткий:*

При кімнатній температурі - до 3 днів.

*Проміжний:*

При температурі 4°C - до 180 днів.

*Довготривалий:*

При температурі -20°C - до 10 років. При температурі - 20°C всі чотири розчини тверді.

**Необхідне устаткування:**

CO<sub>2</sub> - інкубатор, плата з підігрівом (37°C), вихровий міксер, стереомікроскоп, автоматичний піпетор із стерильними наконечниками, коробка з пінопласту з рідким азотом.

*Підготовка розчинів для вітрифікації:*

Витягти всі три розчини для вітрифікації з морозилки. Розчин **D** залишити нагріватися при кімнатній температурі. Підігріти розчини **C** та **4** до 37°C в інкубаторі протягом 30 хвилин.

Завчасно нагріти пластикову чашку Петрі діаметром 90-100 мм до 37°C. Акуратно змішати розчини на міксері. В окремих мікропробірках ex tempore готуємо розчини 2 і 3:

Розчин № 2: 200 мкл **C** + 100 мкл **4**

Розчин №3: 100 мкл **C** + 200 мкл **4**.

Розчин №5: 170 мкл **4** +30 мкл **DMSO** - змішувати в шейкері протягом 15-20 сек. І зберігати при кімнатній температурі. Готується перед використанням.

В результаті ми маємо 5 розчинів для 5 позицій (див.схему): № 1- розчин **C**, № 2 та 3 готуються з базових розчинів **C** і **4**, №4 – базовий **4**, №5 розчин вітрифікаційний, його можна використовувати протягом 4 год. від часу приготування.

**Етапи вітрифікації :**

Розмістити чашку Петрі на теплій поверхні (37°C), де відбуватимуться

всі подальші маніпуляції по вітрифікації ембріонів. Розграфити нижню поверхню чашки Петрі на 5 секторів.

Зробити краплі ( 50 – 200 мкл в залежності від кількості ембріонів) кожного з розчинів - 1,2,3 і 4 у відповідно пронумеровані ділянки чашки Петрі.

Перенести ембріони з культурального середовища, в 1 краплю ( розчин С) на 20 секунд для адаптації та видалення мінерального масла (якщо воно використовується для культивування).

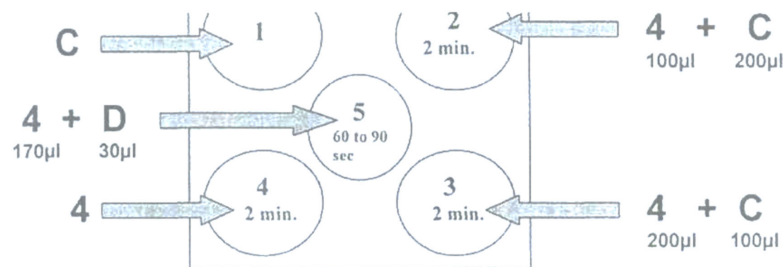
Перенести ембріони в позицію 2( на 2хв.), потім в позицію 3 (на 2хв.) і на завершення - в позицію 4 (на 2хв.).

Негайно після переносу ембріонів у краплю № 4, розміщуємо 2 крапли вітрифікаційного розчину в секторі № 5.

Використовуючи мінімальний об'єм, переносимо ембріони з позиції 4 в першу краплю вітрифікаційного розчину 5. Через 10-15 секунд, знову використовуючи мінімальний об'єм, переносимо ембріони в другу краплю вітрифікаційного розчину у позиції 5.

Через 10 секунд ембріони за допомогою автоматичного піпетора переносимо на зріз стандартної соломки, яку запаковано у соломку більшого діаметра та запаюємо її кінці. На одному кінці соломки має бути розташований груз, щоб утримувати соломку у вертикальному положенні. Повний час знаходження ембріонів у вітрифікаційній суміші не повинен перевищувати 60 - 90 секунд.

Завершується процес вітрифікації в рідкому азоті. При цьому рекомендується використання асептичної технології.



### Відтаювання ембріонів після вітрифікації

Для одного циклу відтаювання необхідно:

Розчин 1, та розчин С.

\*Розчин С : використовується як для вітрифікації, так і для відтаювання

Всі розчини розливаються невеликими об'ємами в мікропробірки типу «Епендорф» і підписуються маркером червоного кольору.

Реактиви, необхідні для приготування набору для відтаювання:

Фосфатний буфер Dulbecco (DPBS) без Ca<sup>2+</sup> і Mg<sup>2+</sup>

Замінник сироватки (SSS, Irvine)

Сахароза ACS («Sigma»).

PVP-полівінілпірролідон («Sigma»).

Антибіотик-антимікотик («Sigma» A7292).

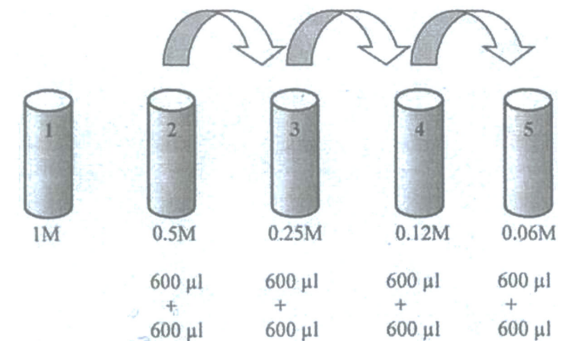
### Приготування набору розчинів для розморожування і видалення кріопротекторів).

Розчин 1: DPBS+20%SSS (або FCS)+ 2.5% PVP+1M сахарози+10мл/л антибіотика-антимікотика.

Приготування ІЛ розчину 1:

Додайте 25 г PVP і 342 г сахарози до 750 мл підігрітого до 40-42°C DPBS і розчиніть з використанням магнітного змішувача. Після повного розчинення PVP і сахарози, охолодіть до кімнатної температури та додайте до цього розчину 200 мл SSS (або FCS) і 10 мл антибіотика-антимікотика. За допомогою DPBS довести об'єм до 1 л і ретельно змішати.

### Діаграма підготовки і використання розчинів для відтаювання.



Витягти розчини для відтаювання з морозилки.

Підігріти розчини до 37°C в інкубаторі протягом 30хв. Ретельно змішати розчини на шейкері. Завчасно нагріти чашку Петрі до 37°C

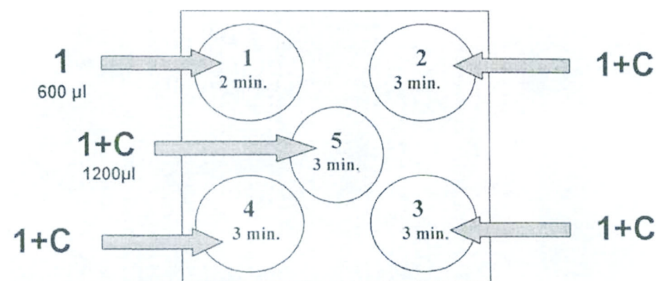
Підготувати розчини для відтаювання згідно діаграми. Певну кількість розчинів 1,2,3,4,5 (600 мкл або 1200мкл) піпеткою розмістити на відповідно пронумеровані ділянки чашки Петрі як показано на діаграмі .

Швидко перенести соломку, на якій знаходяться ембріони з рідкого азоту в мікропробірку типу «Епендорф» з розчином 1.

Через 10-15 секунд витягнути соломку з мікро пробірки і за допомогою аспіратора видути ембріони в розчин 1 в 1 позицію чашки Петрі.

Через 2 хв. перенести ембріони в розчин 2 , 3, 4, і 5 з інтервалом 3 хв.

Потім 3-4 рази відмиваємо ембріони в культуральному середовищі і ставимо в CO<sub>2</sub>-інкубатор для подальшого культивування.



### Вимоги до навчання

Для того, щоб виконувати цю процедуру, персонал ембріологів повинен бути навчений та ознайомлений із застереженнями при роботі з рідким азотом.

Окрім цього, персонал ембріологічного відділення повинен перечитати і зрозуміти деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку, бути вповноваженим керівництвом перед виконанням цієї процедури.

### Інструкція щодо завантаження транспортних дьюарів (Vapour Shippers), що містять абсорбентний матеріал

Транспортні дьюари (Vapour Shippers) є вакуум-ізольованими, надійними контейнерами для транспортування кріобіологічних зразків. Вони містять абсорбентний матеріал просякнутий рідким азотом, що створює фазу пари -190оС для зберігання зразків під час перевезення. Абсорбентний матеріал утримує рідину і запобігає випадковим її розливанням.

Під час транспортування, посудини, що містять рідкий азот відносять до тих, що містять біонебезпечні матеріали. Заповнений транспортний дьюар відносять до таких, що не містять біонебезпечних матеріалів, хоча й підтримує такі ж температурні умови зберігання, як і дьюари з рідким азотом.

Дуже важливо дотримуватись правил безпеки при роботі з рідким азотом чи об'єктами, які вступали в контакт з рідким азотом.

Заповнення дьюарів займає 24 години для досягнення повної абсорбційної здатності.

### Здоров'я і безпека

Асфіксія. Попадання рідкого азоту в очі. Обмороження.

### Відповідальність

Ця процедура виконується ЛІШЕ ембріологами.

Обладнання, матеріали та інші необхідні процедури

Дьюар . Рідкий азот. Малий дьюар з рідким азотом. Воронка. Вага.

### Процедура

Виконується щонайменше за 24 години до часу транспортування (зазвичай напередодні зранку).

Транспортний дьюар заповнюють у добре провітреній кімнаті.

Рекомендується одягати захисні окуляри та кріогенні захисні рукавиці для переливання рідкого азоту в менший дьюар.

Зніміть кришку/корок транспортного дьюару (не вигинайте) та, використовуючи воронку, дуже повільно наповнюйте транспортний дьюар рідким азотом до нижньої видимої частини отвору дьюара. Будьте обережні, щоб не розлити азот через край дьюара, оскільки це може вплинути на вакуумну систему.

Поверніть на місце кришку дьюара та залишіть на годину. Через 1 годину повторіть попередні кроки. Через 3-4 год.(або перед від'їздом увечері) знову повторіть вищезгадані кроки та залиште дьюар на ніч.

За 3-4 години перед використанням (зазвичай зранку в день використання)

Перевірте чи видно рідкий азот на дні дьюара. Рекомендується це робити, одягнувши захисні окуляри та кріогенні рукавички.

Якщо рідкий азот видно на дні металевій корзині, ймовірно, що дьюар заповнений повністю. Переконайтесь у цьому зваживши дьюар. Вага дьюара повинна становити 8,2-8,3 кг.

Якщо рідкого азоту не видно на дні металевій корзині і/або вага є нижчою ніж необхідно, частково заповніть дьюар рідким азотом згідно вищевказаних етапів.

За 1 годину перед використанням

Перевірте чи видно рідкий азот на дні металевій корзині та вагу транспортного дьюара.

Якщо рідкого азоту знову не видно і/або вага дьюара є нижчою ніж потрібно, необхідно ще долити рідкого азоту і залишити дьюар на годину.

Надлишок рідкого азоту необхідно злити перед використанням.

Переконання у тому, що дьюар є заповнений

Перед тим як завантажувати дьюар, переконайтесь, що він є повністю заповнений зваживши його.

### Вимоги до навчання

Для того, щоб виконувати цю процедуру, персонал ембріологів повинен бути навчений та ознайомлений із застереженнями при роботі з рідким азотом.

Окрім цього, персонал ембріологічного відділення повинен перечитати і зрозуміти деталі цієї процедури, отримати відповідне навчання, пройти оцінку, бути вповноваженим керівництвом до виконання цієї процедури.

## РЕКОМЕНДОВАНІ ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ

### Основна література

1. Біологія індивідуального розвитку. Практикум / М.Е. Держинський, Н.В. Скрипник, О.К. Вороніна, Л.М. Пазюк. - К.:ВПЦ «Київський університет», 2014. - 271 с.
2. Інформаційно-статистичний довідник про допоміжні репродуктивні технології в Україні. Міністерство охорони здоров'я України. Розробники: Руденко Н.Г., Руденко О.В., під ред: Заболотько В.М. Київ - 2022.
3. In-Vitro Fertilization, 4th Edition. Elder K., Dale B., Cambridge University Press & Assessment, 2020 - 288p.
4. Handbook of In Vitro Fertilization, 4th Edition. Edited By David K. Gardner, Carlos Simon. CRC Press; - 2017. - 372p.
5. Handbook of New Genetic Diagnostic Technologies in Reproductive Medicine Improving Patient Success Rates and Infant Health. Edited by Carlos Simon and Carmen Rubio. CRC Press Taylor & Francis Group. - 2018. - 179p.
6. Developmental Biology, 11th Edition by Scott F. Gilbert, Michael J. F. Barresi. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press; 2016. - 500 p.
7. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen - 6th ed.- 2021. - 303 p.

### Допоміжна література

1. Габор В., Богданюк А., Мадані С. та ін. Про ооцити та ембріони. 2023. [https://gaborvajta.wixsite.com/gaborvajta/about-1?fbclid=IwAR0Khh6k7ZKXa70dwZ3D1tRuZovjEsMK-8n6pfc-TYS4YpApx\\_RwWuqKto](https://gaborvajta.wixsite.com/gaborvajta/about-1?fbclid=IwAR0Khh6k7ZKXa70dwZ3D1tRuZovjEsMK-8n6pfc-TYS4YpApx_RwWuqKto)
2. Дахно Ф. В. Сучасні репродуктивні технології: досягнення та перспективи розвитку в лікуванні безпліддя // Здоров'я України. - 2015. - № 148.
3. Калиновський В.Є., Пустовалов А.С., Гродзюк, Г.Я., Андрюшина Н.С., Держинський М.Е. Кіспептин-опосередкована регуляція морфофункціонального стану сім'яників щурів за дії наночастинок золота. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. - 2016. - Т.24, № 2. - С. 359-363.
4. Микитенко Д.О., Пилип Л.Я. Методи сучасної предімплантаційної генетичної діагностики. - Здоров'я жінки. - 2014. - №9 (95)
5. Сківка Л.М. Імунологія репродукції. Київ, 2009 - 152 с.
6. Хміль С. В., Хміль М. С. Досягнення та перспективи розвитку сучасних методів допоміжних репродуктивних технологій в лікуванні безпліддя // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. - 2015. - № 4.

7. Куртяк Ф.Ф., Репетило А.О., Куртяк М.Ф., Балюк К. Л. Ембріональна анеуплоїдія у програмах допоміжних репродуктивних технологій як функція віку жінки / Матеріали 77-ї підсумкової конференції професорсько-викладацького складу ДВНЗ «УжНУ». Серія «Біологія». Том I (28 лютого 2023 р.) – Ужгород: ДВНЗ «УжНУ», 2023. – С. 30–31.
8. Куртяк Ф.Ф., Репетило А.О., Керечанин Д.В., Куртяк М.Ф. Оцінка потенціалу чоловічої фертильності / Матеріали 76 підсумкової конференції професорсько-викладацького складу ДВНЗ «УжНУ». Серія «Біологія». Том I (26 лютого 2022 р.) – Ужгород: ДВНЗ «УжНУ», 2022. – С. 32
9. Куртяк Ф.Ф., Репетило А.О., Балюк К.Л., Куртяк М.Ф. Динаміка кількісних показників спермограми при коронавірусному захворюванні (COVID-19) / Матеріали 75 підсумкової конференції професорсько-викладацького складу ДВНЗ «УжНУ». Серія «Біологія». Том I (26 лютого 2021 р.) – Ужгород: ДВНЗ «УжНУ», 2021. – С. 24–25
10. Репетило А.О., Балюк К.Л., Куртяк М.Ф. Вплив часу утримання чоловіків на кількісні показники спермограми та ступінь фрагментації ДНК сперматозоїдів / Матеріали IV Міжнародної конференції молодих учених та студентів «Актуальні проблеми біологічних та агроекологічних досліджень у Карпатському регіоні» (23 травня 2020 року) – Ужгород: ДВНЗ «УжНУ», 2020. – 48 с.
11. Куртяк Ф.Ф., Репетило А.О., Балюк К.Л., Куртяк М.Ф. Вплив віку чоловіків на кількісні показники спермограми та ступінь фрагментації ДНК сперматозоїдів / Матеріали 74 підсумкової конференції професорсько-викладацького складу ДВНЗ «УжНУ». Серія «Біологія» (23 травня 2020 року) – Ужгород: ДВНЗ «УжНУ», 2020. – 24 с.
12. Antimullerian hormone: prediction of cumulative live birth in gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment for in vitro fertilization / O. Hamdine, M. J.C. Eijkemans, E. G.W. Lentjes // *Fertil. Steril.* - 2015. - Vol. 104, Issue 4. - P. 891-898.
13. Barad D H, Albertini D F, Molinari E. IVF outcomes of embryos with abnormal PGT-A biopsy previously refused transfer: a prospective cohort study. *Human Reproduction*, V. 37(6), - 2022, 1194-1206p.
14. Kocur OM, Xie P, Cheung S, et al. Can a sperm selection technique improve embryo ploidy? *Andrology*. 2022;1-8. <https://doi.org/10.1111/andr.13362>
15. Medvedieva N., Stepanova L., Prybytko I., Voronina O., Beregova T., Ostapchenko L. Melanin toxic effects on the embryos // *European Journal of Clinical Investigation*. - 2017. - V. 47, Is.1 - P. 182.
16. The Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Hum Reprod.*

1. <https://www.eshre.eu/>
2. <https://fertilityeurope.eu/>
3. <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/z1697-13>
4. <https://ivfacademyusa.com/video-tutorials>
5. <https://ivfmeeting.com/collections/lectures>