

(EN) Cryoprotectant for the cryopreservation of human cells and tissues for transplantation

(DE) Kryoprotektivum zur Kryokonservierung von menschlichen Zellen und Geweben, die zur Transplantation bestimmt sind

(F) Liquide cryoprotecteur employé pour la cryoconservation des cellules et des tissus humains à visée thérapeutique

(EN) Sterile acc.to EP/USP	Pyrogen-free acc. to EP	Endotoxin-free acc. to EP/USP	Free of mycoplasma acc. to EP
(DE) Steril gem. EP/USP	Pyrogenfrei gem. EP	Endotoxinfrei gem. EP/USP	Frei von Mykoplasmen gem. EP
(F) Stérile selon Ph. Eur./USP	Exempt de pyrogènes selon Ph. Eur.	Exempt d'endotoxines bactériennes selon Ph. Eur./USP	Exempt de mycoplasmes selon Ph. Eur.

(EN) Ingredients:	99.9 % USP Grade DMSO	< 0.1 % water	Density: 1.095 - 1.101 g/cm³	Freezing point: 18.3 °C	MW: 78.13 Da
(DE) Inhaltsstoffe:	99,9 % USP Grade DMSO	< 0,1 % Wasser	Dichte: 1,095 – 1,101 g/cm³	Gefrierpunkt: 18,3 °C	MW: 78,13 U
(F) Ingrédients:	99,9 % USP Grade DMSO	< 0,1 % eau	Densité: 1,095 – 1,101 g/cm³	Point de congélation: 18,3 °C	MW: 78,13 Da



WARNING: Combustible at high temperatures.
ACHTUNG: Bei hohen Temperaturen explosiv.
ATTENTION: Combustible aux températures hautes.

Do not autoclave.
Nicht autoklavieren.
Ne pas passer en autoclave.

Do not use unless solution is clear.
Nur klare Lösung verwenden.
Seulement utiliser la solution claire.
Not for injection.
Nicht injizieren.
Ne pas injecter.



Sterilized through aseptic processing.
 Sterilisiert durch Anwendung aseptischer Verfahrenstechniken.
 Stérilisé par des technologies aseptiques.



30 °C Store at 20 °C - 30 °C.
 Bei 20 °C bis 30 °C lagern.
 Conserver à 20 °C - 30 °C.



Use by date: see product labelling
 Verwendbar bis: siehe Produktetikett
 Employable jusqu'à: regardez l'étiquette de produit



Do not resterilize.
 Nicht erneut sterilisieren.
 Ne pas restériliser.



Do not expose to sunlight.
 Von Sonnenlicht fernhalten.
 Protéger de lumière forte.



Batch code: see product labelling
 Chargennummer: siehe Produktetikett
 Numéro de lot: regardez l'étiquette de produit



Not to be used in case package is damaged.
 Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden.
 Ne pas utiliser en cas d'emballage mutilé



Read usage instructions.
 Gebrauchsanweisung beachten.
 Suivez le mode d'emploi.



WAK-DMSO-10 (10 x 10 ml vial)
 WAK-DMSO-50 (6 x 50 ml vial)
 WAK-DMSO-70 (6 x 70 ml vial)
 WAK-DMSO-10-A-10 (10 x 10 ml ampoule)



Reuse is not allowed.
 (applies to ampoules, REF: WAK-DMSO-10-A-10)
 Nicht zur Wiederverwendung.
 (gilt für Ampullen, REF: WAK-DMSO-10-A-10)



Date of manufacture: see product labelling
 Herstellungsdatum: siehe Produktetikett
 Date de production: regardez l'étiquette de produit

Ne pas réutiliser.
 (s'adresse aux ampoules, REF: WAK-DMSO-10-A-10)



WAK-Chemie Medical GmbH

Siemensstraße 9 D-61449 Steinbach/Ts
 Tel. +49 61 71 / 28 43 0 • Fax +49 61 71 / 69 56 46
 e-mail: info@wak-chemie.com • www.wak-chemie.com



Instructions for use

(EN) CryoSure-DMSO is employed in the course of longterm storage and viability determination of cell and tissue grafts.

DMSO (Dimethyl Sulfoxide) is an intracellular cryoprotective agent which penetrates the cell membrane.

It reduces the osmotic charge of the cells during freezing and thawing and antagonizes the osmotic shock. Furthermore it protects the cells from dehydration and shrinking during freezing and prevents the formation of ice crystals.

CryoSure-DMSO is to be applied as a cryoprotectant for all cells and tissues for which the use of DMSO as a freezing agent is established.

Before transplantation CryoSure-DMSO must be eliminated from the transplant.

The procedures for viability assessment of the cell or tissue graft conducted before freezing respectively after thawing are to be validated by the user.

Each type of cell and tissue constitutes a singular system with specific characteristics regarding the behaviour during freezing and thawing. The freezing process as well as the addition and the removal of DMSO have to be validated by the user for each type of cell and each type of tissue. Amongst other factors for each cell type and each type of tissue the following parameters have to be defined:

- Mode of DMSO-addition to the transplant
- Adequate concentration of DMSO in the ready-to-freeze transplant
- Time of exposure of DMSO to the transplant and the conditions of exposure before freezing
- Freezing rate
- Storage conditions of the transplant in the frozen state
- Thawing mode and the thawing rate
- Time and conditions of exposure to DMSO of the thawed transplant before removal of the DMSO
- Mode of elimination of DMSO from the transplant before transplantation

CryoSure-DMSO may only be applied by qualified personnel who are accustomed to the use of DMSO as a cryoprotectant. Principally the application of CryoSure-DMSO consists of the following steps:

1. Withdrawal of DMSO from the sterile container
2. Addition of DMSO to the cell suspension respectively the tissue
3. Freezing of the transplant
4. Thawing of the transplant
5. Elimination of DMSO from the thawed transplant before transplantation

1. Withdrawal of DMSO from the sterile container:

The necessary amount of DMSO for freezing is taken volumetrically from the sterile container. The opening of the sterile container and the withdrawal of DMSO thereof shall be executed under conditions as to minimize the risk of contamination. Since DMSO is a strong aprotic solvent which solves hydrophobic as well as hydrophilic substances it is imperative to take care only to use

Bedienungsanleitung

(DE) CryoSure-DMSO wird im Rahmen der Langzeitlagerung und Vitalitätsbestimmung von Zell- und Gewebepräparaten eingesetzt.

DMSO (Dimethylsulfoxid) ist ein die Zellmembran penetrierendes und im Zellinnern wirkendes Gefrierschutzmittel. Es vermindert die osmotische Belastung der Zellen während des Einfrierens und Auftauens und wirkt dem osmotischen Schock entgegen.

Weiterhin schützt es die Zellen vor dem Schrumpfen während des Einfrierens und wirkt der Bildung von Eiskristallen entgegen. CryoSure-DMSO kann zum Einfrieren aller Zellen und Gewebe verwendet werden, für die die Anwendung von DMSO als Kryoprotektivum etabliert ist.

Vor der Transplantation muss CryoSure-DMSO aus dem Transplantat entfernt werden.

Die Vitalitätsbestimmungen vor dem Einfrieren respektive nach dem Auftauen sind nach durch den Anwender validierten Methoden durchzuführen.

Jede Zellart und jedes Gewebe stellen ein eigenes System mit spezifischen Eigenschaften hinsichtlich des Einfrierverhaltens dar. Der Einfrierprozess sowie die Zugabe und das Entfernen von DMSO nach dem Auftauen muss für jede Zellpräparation vom Anwender validiert werden. Für jede Art von Zellpräparation und Gewebetyp sind dabei unter anderem durch den Anwender festzulegen:

- Der Zugabemodus von DMSO zum Einfriergut
- Die adäquate Konzentration von DMSO im Einfriergut vor dem Einfrieren
- Die Expositionszeit von DMSO zum Einfriergut und die Expositionsbedingungen vor dem Einfrieren
- Die Einfrierrate
- Die Lagerungsbedingungen im gefrorenen Zustand
- Der Auftaumodus mit Auftaurate
- Die Expositionszeit und die Expositionsbedingungen von DMSO zum aufgetauten Transplantat vor dem Entfernen des DMSO
- Der Modus des Entfernens von DMSO aus dem Transplantat vor Transplantation

CryoSure-DMSO darf nur von Fachpersonal verwendet werden, das mit der Handhabung von DMSO als Kryoprotektivum vertraut ist.

Grundsätzlich gliedert sich die Anwendung von CryoSure-DMSO in folgende Schritte:

1. Entnahme des DMSO aus dem sterilen Behältnis
2. Zugabe des DMSO zu der einzufrierenden Zellsuspension bzw. zu dem einzufrierenden Gewebe
3. Einfrieren des Gefrierguts
4. Auftauen des Gefrierguts
5. Entfernen des DMSO aus dem aufgetauten Transplantat vor der Transplantation

1. Entnahme des DMSO aus dem sterilen Behältnis:

Die für das Einfrieren notwendige Menge

Mode d'emploi

(F) CryoSure-DMSO est appliqué dans le cadre du long stockage et détermination de viabilité des greffons de cellules ou de tissu.

DMSO (Diméthyle Sulfoxyde) est un liquide cryoprotecteur qui pénètre la membrane cellulaire et a son effet cryoprotecteur à l'intérieure de la cellule.

Il réduit le chargement osmotique des cellules pendant la congélation et la décongélation et contrecarre le choc osmotique. En plus il protège les cellules de l'affaissement pendant la congélation et contrecarre la formation des cristaux de glace.

CryoSure-DMSO peut être employé pour toutes cellules et tous tissus humains à visée thérapeutique pour lesquels DMSO est reconnu comme agent cryoprotecteur. Avant la transplantation CryoSure-DMSO doit être éliminé du greffon.

Tous les processus de détermination des nombres de cellules avant la congélation respectivement après la décongélation doivent être validés par l'utilisateur.

Chaque sorte de cellule et chaque sorte de tissu constitue un système singulier avec des propriétés singulières concernant le comportement de congélation. Le processus de congélation aussi que le supplément et l'élimination de DMSO doivent être validés pour chaque préparation de cellules et de tissu par l'utilisateur.

Entre autres l'utilisateur doit établir pour chaque sorte de cellules et de tissu:

- le mode de supplément de DMSO au greffon à congeler
- la concentration adéquate de DMSO dans le greffon à congeler
- la durée d'exposition de DMSO au greffon et les conditions d'exposition au DMSO avant la congélation
- la vélocité de congélation
- les conditions de magasinage dans l'état congelé
- le mode de décongélation
- la durée de l'exposition et les conditions d'exposition du greffon décongelé au DMSO avant l'élimination de DMSO du greffon
- le mode d'élimination de DMSO du greffon avant la transplantation

CryoSure-DMSO doit seulement être utilisé par des spécialistes qui sont entraînés à l'utilisation de DMSO comme agent cryoprotecteur.

En général l'application de CryoSure-DMSO se compose des pas suivants:

1. Prélèvement de DMSO du flacon stérile
2. Supplément de DMSO à la suspension de cellules ou au greffon tissulaire à congeler
3. La congélation du greffon
4. La décongélation du greffon
5. L'élimination de DMSO du greffon décongelé avant la transplantation

1. Prélèvement de DMSO du flacon stérile:

La quantité mandataire de DMSO est prélevée volumétriquement du récipient stérile. L'ouverture du récipient stérile et

materials for withdrawal and transition of DMSO which are DMSO-compatible and to keep the contact time with these materials as short as possible.

2. Addition of DMSO to the cell suspension respectively the tissue:

During addition of DMSO the following factors have to be considered:

Release of heat:

During addition of DMSO to water heat is released. This heat must be dissipated before contact with the cells or tissue in order to avoid negative impact of the heat released. This can be achieved by preparing a cryoprotective solution of DMSO and an appropriate vector solution. The release of heat can be dissipated via an ice bed. Such vector solutions can be for example autologous plasma, plasma-like solutions, cell culture media or such vector solutions which contain other cryoprotectants. The release of heat during DMSO-addition may lead to the reduction of the volume of the aqueous target solution.

Osmotic charge of cells:

DMSO has a high osmolality. Therefore the addition of DMSO to cells or tissue leads to outstream of water from the cell and therefore to the shrinking of the cells until the intracellular and extracellular concentrations of DMSO have equilibrated. The optimal mode of addition is specific for each type of cell and each type of tissue and has to be validated by the user. It has to be taken care that the cells do not shrink over a critical point during the DMSO-addition. Preferably a calibrated syringe pump is to be used for the DMSO-addition.

Cytotoxicity of DMSO:

Prior to freezing respectively after thawing DMSO is potentially cytotoxic. The cytotoxicity of DMSO is dependent on the DMSO-concentration, the time of exposure and the temperature of the cell suspension or the tissue during the exposure. The conditions of DMSO-addition and the conditions of DMSO-exposure to the transplant (e.g. time and temperature) are to be validated and defined by the user for each cell type and type of tissue. The concentration of DMSO in a ready-to-freeze cell suspension is typically between 5 and 10 % v/v. The DMSO-concentration in the solution in which the tissue transplant is placed is typically higher than in the cell suspension, e.g. up to 20 % v/v. The temperature of the ready-to-freeze cell suspension respectively tissue during DMSO-addition should be kept at 2 - 4 °C. The time of DMSO-exposure to the cells respectively the tissue in the unfrozen state should be kept as short as possible. In mononuclear blood cells for example the exposure time should not exceed 15 minutes. In case of tissues a longer exposure is eventually necessary in order to achieve the necessary DMSO concentration throughout the tissue. In such cases the exposure time should not exceed one hour. In case the transplant is processed at higher temperatures than indicated above it has to be taken into

an DMSO wird volumetrisch aus dem sterilen Behälter entnommen. Die Eröffnung des sterilen Behältnisses und die Entnahme des DMSO daraus sollen unter Bedingungen erfolgen, die die Möglichkeit einer Kontamination minimieren. Da DMSO ein starkes aprotisches Lösungsmittel ist und sowohl lipophile wie auch hydrophile Substanzen löst, ist während der Entnahme und der Überleitung von DMSO zum Einfriergut darauf zu achten, möglichst DMSO-kompatible Materialien zu verwenden und die Kontaktzeit mit ihnen so gering wie möglich zu halten. Dies gilt umso mehr, je höher die DMSO-Konzentration ist, mit der die betreffenden Materialien in Kontakt geraten.

2. Zugabe des DMSO zu der einzufrierenden Zellsuspension bzw. zu dem einzufrierenden Gewebe:

Bei der Zugabe von DMSO sind folgende Faktoren zu beachten:

Wärmefreisetzung:

Bei der Zugabe von DMSO zu Wasser wird Wärme frei. Die entstehende Wärme muss vor Kontakt mit den einzufrierenden Zellen bzw. dem einzufrierenden Gewebe abgeführt werden, falls sich diese Wärmebelastung nachteilig auf das Einfriergut auswirkt. Dies kann erreicht werden, indem zunächst eine kryoprotektive Lösung aus DMSO und einer geeigneten Trägerlösung angefertigt wird. Die Wärmeentwicklung kann dabei z. B. über ein Eisbett abgeführt werden.

Solche Trägerlösungen können sein: autologes Plasma, plasmaähnliche Lösungen, Zellkulturmедien oder solche Trägerlösungen, die mehrere Kryoprotektiva enthalten.

Die Wärmefreisetzung bei DMSO-Zugabe kann zu einer Verringerung des Volumens der Zielflüssigkeit führen.

Osmotische Belastung von Zellen:

DMSO ist hyperosmolar. Deswegen führt die Zugabe von DMSO zu Gewebe oder Zellen zunächst zum Ausstrom von Wasser aus den Zellen und somit zum Schrumpfen der Zellen, bis sich die intrazelluläre und extrazelluläre DMSO-Konzentration ausgeglichen haben. Der optimale Zugabemodus ist zell- bzw. gewebespezifisch und ist vom Anwender zu validieren. Dabei ist zu beachten, dass die Zellen nicht über einen kritischen Punkt hinaus schrumpfen. Bevorzugter Weise ist für die DMSO-Zugabe eine kalibrierte Spritzenpumpe zu verwenden.

Zytotoxizität des DMSO:

Vor dem Einfrieren bzw. nach dem Auftauen ist das DMSO potentiell zytotoxisch. Die Zytotoxizität ist abhängig von der DMSO-Konzentration, von der Expositionszeit und von der Temperatur der Zellsuspension oder des Gewebes während der Exposition. Die Bedingungen der DMSO-Zugabe und die Expositionsbedingungen von DMSO zum Einfriergut (z. B. Expositionszeit und -temperatur) sind durch den Anwender für das einzufrierende Zellpräparat bzw. die Gewebeart zu validieren und festzulegen.

Die Konzentration von DMSO in einer

le prélèvement du DMSO doit être effectué sous des conditions qui minimisent la possibilité d'une contamination. Comme DMSO est un solvant aprotique il est impératif de prendre garde à employer des matériaux compatibles avec le DMSO et de tenir la durée de l'exposition du DMSO à ces matériaux le plus court possible, d'autant plus que la concentration du DMSO augmente.

2. Supplément de DMSO au greffon cellulaire ou tissulaire à être congelé:

Au cours du supplément de DMSO les facteurs suivants doivent être observés:

Réchauffement au cours du supplément du DMSO à l'eau:

Au cours du supplément de DMSO à l'eau de la chaleur est dégagée. Cette chaleur doit être évacuée avant d'entrer en contact avec les cellules ou le tissu pour que le réchauffement n'influence pas les cellules ou le tissu négativement. Cela est attendu en ajoutant le DMSO à un diluant approprié dans un récipient à panacher qui se trouve sur un lit de glace par lequel la chaleur est dégagée.

Des tels diluants peuvent être du plasma autologue, des solutions pareilles au plasma, des milieux de culture cellulaire ou des solutions avec plusieurs agents cryoprotecteurs. Le diluant approprié doit être validé par l'utilisateur. Le réchauffement au cours du supplément du DMSO peut mener à une diminution du volume de la solution aqueuse. La solution cryoprotectrice qui résulte est ensuite ajoutée au greffon cellulaire ou tissulaire.

Chargement osmotique pour les cellules pendant le supplément de DMSO:

DMSO a une pression osmotique élevée. Par conséquence pendant le supplément de DMSO aux cellules respectivement au greffon tissulaire de l'eau fuit des cellules et les cellules diminuent jusqu'à ce que les concentrations de DMSO extracellulaire et intracellulaire se soient ajustées. Le mode et la vitesse optimaux de supplément de DMSO sont spécifiques pour chaque type de cellules et de tissu et doivent être validés par l'utilisateur. Le mode de supplément doit être choisi de façon que les cellules ne diminuent pas à travers un degré critique. De préférence une pompe à seringue calibrée est employée pour le supplément.

Cytotoxicité de DMSO:

Avant la congélation respectivement après la décongélation du greffon le DMSO est potentiellement cytotoxique. La cytotoxicité est dépendante de la concentration du DMSO, de la durée de l'exposition et de la température du greffon respectivement de la solution cryoprotectrice pendant l'exposition. Les conditions de l'exposition du DMSO au greffon doivent être validées par l'utilisateur pour chaque type de cellules et de tissu. La concentration de DMSO dans une suspension de cellules prête à congeler se trouve typiquement entre 5 et 10 % v/v. La concentration de DMSO dans la solution dans laquelle le greffon tissulaire est placé résulte typiquement un

consideration that the cytotoxicity of DMSO increases with the temperature.

3. Freezing of the transplant:

The optimum freezing rate is dependent on the cell type and type of tissue and has to be validated and defined by the user. The freezing is to be executed according to a standardized procedure, preferably with a controlled rate freezer.

4. Thawing of the transplant:

The thawing mode and the thawing rate are specific for each cell type and type of tissue and have to be validated and defined by the user.

5. Elimination of DMSO from the thawed transplant before transplantation:

After having finished the thawing process DMSO must be eliminated from the transplant. The elimination process is executed by means of washing and dilution steps employing adequate wash solutions and equipment. The elimination mode is specific to each cell type and type of tissue and has to be validated and defined by the user. Generally the following factors have to be considered:

Osmotic charge of cells:

Contrary to the addition process each washing step initially results in an elevated intracellular DMSO-concentration compared to the extracellular concentration. This leads to an inflow of water into the cell and consequently the cell volume increases until the intracellular and extracellular DMSO-concentrations have equilibrated. The mode of DMSO-elimination is to be chosen in a way so that the cell volume does not increase over a critical point. The optimal elimination mode is specific for each cell type and type of tissue and is to be validated and defined by the user.

Cytotoxicity of DMSO:

Before freezing and after thawing DMSO is potentially cytotoxic. The cytotoxicity is dependent on the DMSO-concentration, the time of exposure and the temperature of the cell suspension or tissue during the DMSO-exposure. Analogously to the conditions before freezing the time of exposure of the transplant to DMSO in the non-frozen state should be kept as short as possible, and the temperature during the elimination of DMSO should be kept between 2 °C and 4 °C. The conditions of DMSO-elimination and the conditions of DMSO-exposure to the thawed transplant (e.g. time and temperature) are to be validated and defined by the user.

6. General directions to the use of CryoSure-DMSO:

• Penetration of DMSO via the skin:

DMSO has the characteristic to penetrate via the human skin and then to act systemically. Furthermore certain alien substances can be carried along across the skin barrier and eventually also act systemically. Therefore it is necessary to wear protective gloves, which are non-permeable to DMSO, during handling of CryoSure-DMSO and to take care that

einzufrierenden Zellsuspension liegt typischer Weise zwischen 5 und 10 % (Volumenprozent). Die DMSO-Konzentration in der Lösung, in die das Gewebetransplantat platziert wird, ist typischer Weise etwas höher als in Zellsuspensionen, nämlich bis zu 20 % (Volumenprozent). Die Temperatur der einzufrierenden Zellsuspension bzw. des einzufrierenden Gewebes während der DMSO-Exposition im ungefrorenen Zustand sollte bei 2 - 4 °C gehalten werden. Die Dauer der Exposition der Zellen bzw. des Gewebes zu DMSO im ungefrorenen Zustand soll so kurz wie möglich gehalten werden. Bei mononukleären Blutzellen beispielsweise sollte sie 15 Minuten nicht überschreiten. Im Fall von Geweben ist eventuell eine längere Expositionszeit notwendig, um die notwendige DMSO-Konzentration im gesamten Gewebe zu erreichen. In solchen Fällen sollte die Expositionsdauer 60 Minuten nicht überschreiten. Für den Fall, dass das Transplantat bei höheren Temperaturen als oben angegeben prozessiert wird, ist zu beachten, dass grundsätzlich die Zytotoxizität von DMSO mit höheren Temperaturen zunimmt.

3. Einfrieren des Gefrierguts:

Die optimale Einfriereschwindigkeit ist abhängig von der Zellart bzw. der Art des Gewebes und muss vom Anwender validiert und festgelegt werden. Das Einfrieren ist nach standardisierten Verfahren vorzugsweise mit einem 'Controlled Rate Freezer' durchzuführen.

4. Auftauen des Gefrierguts:

Der Auftaumodus und die Auftaurate sind ebenfalls spezifisch für jede Zellart und für jede Gewebeart und sind durch den Anwender zu validieren und festzulegen.

5. Entfernen des DMSO aus dem aufgetauten Transplantat vor der Transplantation:

Nach abgeschlossenem Auftauvorgang ist das DMSO vor der Transplantation aus dem Transplantat zu entfernen. Das Entfernen erfolgt durch Verdünnungs- und Waschschrte mit geeigneten Waschlösungen und Geräten. Der Entfernungsmodus ist für jede Zellart und jedes Gewebe vom Anwender zu validieren und festzulegen. Für das Entfernen des DMSO aus dem Transplantat sind unter anderem die folgenden Faktoren zu beachten:

Osmotische Belastung von Zellen:

Gegenläufig zum Zugabeprozess führt der Entfernungsprozess zunächst zu einer gegenüber extrazellulär erhöhten intrazellulären DMSO-Konzentration. Dies führt zu einem Wassereinstrom in die Zelle, so dass sich das Zellvolumen erhöht, bis sich die intra- und extrazelluläre DMSO-Konzentration ausgeglichen haben. Der Entfernungsmodus ist so zu wählen, dass das Volumen der einzelnen Zellen nicht über einen kritischen Punkt zunimmt. Der optimale Entfernungsmodus ist spezifisch für die Zellart und die Gewebeart und ist vom Anwender zu validieren und festzulegen.

peu élevée (jusqu'à 20 % v/v). La température de l'exposition des cellules respectivement du tissu au DMSO avant la congélation respectivement après la décongélation devait être tenue entre 2 - 4 °C. La durée de l'exposition de DMSO aux cellules respectivement au tissu dans l'état non-congelé devait être tenue le plus courte possible. Dans le cas des cellules mononucléaires sanguines par exemple l'exposition ne devait pas dépasser 15 minutes. Dans le cas des greffons tissulaires une exposition plus longue pourrait être nécessaire pour atteindre la concentration nécessaire des agents cryoprotecteurs dans le tissu entier. En dehors de cela la durée de l'exposition ne doit pas dépasser 1 heure. En cas il est nécessaire de procéder le greffon aux températures plus hautes qu'indiqué au dessus, il faut noter qu'en général la cytotoxicité de DMSO augmente avec la température.

3. Congélation du greffon:

La vélocité optimale de la congélation est dépendante du type des cellules respectivement de tissu et des agents cryoprotecteurs employés et doit être validée par l'utilisateur. La congélation doit être accomplie d'après un procédé validé par exemple en employant un rate-freezer.

4. Décongélation du greffon:

Le mode et la vélocité optimaux de décongélation sont aussi dépendants du type de cellule respectivement du tissu et doivent être validés par l'utilisateur.

5. Élimination de DMSO du greffon décongelé avant la transplantation:

Après avoir terminée la décongélation du greffon et avant la transplantation le DMSO doit être éliminé du greffon. Cela est effectué en employant des pas de dilution et de lavage avec des solutions appropriées. Le mode optimal d'élimination du DMSO du greffon doit être validé pour chaque type de cellule et de tissu par l'utilisateur aussi que les solutions de lavage et les appareils employés. En général il faut respecter les facteurs suivants pour l'élimination du DMSO:

Chargement osmotique des cellules:

Contraire au procédé de supplément de DMSO l'élimination de DMSO mène initialement à une concentration élevée du DMSO à l'intérieur des cellules, de l'eau afflue de l'extérieur des cellules et par conséquence le volume des cellules augmente jusqu'à ce que les concentrations de DMSO à l'intérieur et à l'extérieur des cellules se sont ajustées. Le mode d'élimination doit être choisi de façon que le volume des cellules n'augmente pas à travers un degré critique. Le mode optimal d'élimination doit être validé par l'utilisateur.

Cytotoxicité du DMSO:

Avant la congélation respectivement après la décongélation du greffon le DMSO est potentiellement cytotoxique. La cytotoxicité est dépendante de la concentration du DMSO, de la durée de

the DMSO does not get in touch with substances that could be carried via the skin barrier by DMSO and that could consequently have negative effects.

- **Utilization of DMSO-compatible materials:**

Since DMSO is a strong aprotic solvent, it is necessary to take care that during withdrawal from the container and during transition DMSO only comes in contact with materials which are compatible with DMSO and to keep the contact time with such materials as short as possible. The higher the DMSO-concentration materials get in contact with, the shorter the contact time with such materials should be kept.

- **Melting point of DMSO:**

Pure DMSO has its melting point at 18.3 °C. At lower temperatures DMSO solidifies. The change of the aggregate state within the closed sterile container does not affect the product quality. However CryoSure-DMSO should only be applied as a cryoprotectant in the liquid state. In order to regain the liquid state of DMSO CryoSure-DMSO should be kept at 20 - 30 °C until the liquid state is fully reconstituted prior to application.

The procedures for viability assessment of the cell or tissue graft conducted before freezing respectively after thawing are to be validated by the user.

Zytotoxizität des DMSO:

Vor dem Einfrieren bzw. nach dem Auftauen ist das DMSO potentiell zytotoxisch. Die Zytotoxizität ist abhängig von der DMSO-Konzentration, von der Expositionsdauer und von der Temperatur der Zellsuspension oder des Gewebes während der Exposition. Analog zu den Bedingungen vor dem Einfrieren sollte die Expositionsdauer des Transplantats zu DMSO im ungefrorenen Zustand so kurz wie möglich gehalten und die Temperatur während des Entfernens des DMSO zwischen 2 °C und 4 °C gehalten werden. Die Bedingungen der DMSO-Entfernung und die Expositionsbedingungen von DMSO zum aufgetauten Transplantat (z. B. Expositionszeit und -temperatur) sind durch den Anwender zu validieren und festzulegen.

6. Weitere generelle Hinweise zur Verwendung von CryoSure-DMSO:

- **Penetration von DMSO durch die Haut:**

DMSO hat die Eigenschaft, die menschliche Hautbarriere zu überwinden und dann systemisch zu wirken. Außerdem können bestimmte Fremdstoffe, die im DMSO gelöst sind oder die sich auf der Haut befinden, durch DMSO mitgeschleppt werden und dann ebenfalls systemisch wirken. Deswegen ist es notwendig, während der Arbeit mit CryoSure-DMSO DMSO-undurchlässige Handschuhe zu tragen und darauf zu achten, dass das DMSO nicht mit Substanzen in Kontakt gerät, die, falls sie durch DMSO über die Hautbarriere mitgeschleppt werden, negative Auswirkungen haben könnten.

- **Verwendung von DMSO-kompatiblen Materialien:**

Da DMSO ein starkes aprotisches Lösungsmittel ist, ist es notwendig darauf zu achten, dass DMSO nur mit DMSO-kompatiblen Materialien in Kontakt kommt und die Expositionszeit zu diesen Materialien so gering wie möglich zu halten. Dies gilt umso mehr, je höher die Konzentration an DMSO ist, mit denen die Materialien in Kontakt geraten.

- **Schmelzpunkt von DMSO:**

Reines DMSO hat seinen Schmelzpunkt bei 18,3 °C. Bei niedrigeren Temperaturen geht das DMSO in den festen Aggregatzustand über. Die Aggregatzustandsänderung im geschlossenen Behälter beeinträchtigt die Produktqualität nicht. Allerdings ist CryoSure-DMSO nur im flüssigen Zustand als Kryoprotektivum anzuwenden. Um den flüssigen Zustand von DMSO wiederherzustellen, kann das geschlossene Behältnis Temperaturen von 20 – 30 °C ausgesetzt werden, bis das DMSO wieder vollständig in den flüssigen Aggregatzustand übergegangen ist.

Die Vitalitätsbestimmungen vor dem Einfrieren respektive nach dem Auftauen sind nach durch den Anwender validierten Methoden durchzuführen.

l'exposition et de la température du greffon respectivement de la solution cryoprotectrice pendant l'exposition. Par analogie avec les conditions avant la congélation la durée de l'exposition du greffon à DMSO dans l'état non-congelé doit être minimisée et la température pendant l'élimination du DMSO doit être tenue entre 2 - 4 °C. Les conditions de l'exposition du DMSO au greffon après la décongélation et pendant l'élimination de DMSO du greffon doivent être validées par l'utilisateur pour chaque type de cellules et de tissu.

6. Autres indications générales sur la manipulation de CryoSure-DMSO:

- **Pénétration de DMSO à travers la peau:**

DMSO est un solvant aprotique fort qui dissout également des substances hydrophiles aussi que lipophiles. DMSO a la capacité de pénétrer la peau humaine et d'amener des autres substances dissoutes dans le DMSO ou en contact avec la peau. Par conséquence il est impératif d'utiliser des gants imperméables pour le DMSO et de faire attention que le DMSO n'entre pas en contact avec des substances qui pourraient causer des effets négatifs en cas d'être amené par DMSO à travers la peau.

- **Utilisation des matériaux compatibles avec le DMSO:**

Comme DMSO est un solvant aprotique fort il est impératif de prendre garde à employer des matériaux compatibles avec le DMSO et de tenir la durée de l'exposition du DMSO à ces matériaux le plus court possible, d'autant plus que la concentration de DMSO augmente.

- **Point de congélation de DMSO:**

Le point de congélation de DMSO est à 18,3 °C. À partir de cette température et plus bas le DMSO entre dans l'état solide. La solidification de DMSO dans le récipient fermé n'influence pas la qualité du produit. CryoSure-DMSO doit être appliqué seulement dans l'état liquide. Pour reconduire le DMSO dans l'état liquide le flacon fermé ou l'ampoule peut être exposé aux températures entre 20 - 30 °C jusqu'à l'état liquide est complètement regagné.

Tous les processus de détermination de viabilité avant la congélation respectivement après la décongélation doivent être validés par l'utilisateur.