

# In Vitro Viljatamise Tehnika, Eelised ja Globaalne Vaade

Eesti Põllumajandus-Kaubanduskoja, Eesti  
Tõuloomakasvatajate Ühistu ja Eesti Lihaveisekasvatajate  
Seltsi

Aretuskonverents  
November 7, 2024

Lotte Stroebech,  
DVM, PhD



Kaasrahastanud  
Euroopa Liit



Eesti  
tuleviku heaks

**S**troebeck  
media

# Akadeemiast tööstusesse 3 IVF seotud ettevõtet Taanis

ARTSMedia Denmark

Stroebech Media

Stroebech IVF Universe



**ARTSMedia Denmark**

– Where new life begins

Tooted reproduktiivtehnoloogiate  
jaoks humaanmeditsiinis

**Stroebechmedia**  
Assisted Reproduction Techniques in Animals

IVF lahused loomade  
reproduktiivtehnoloogiate jaoks

**STROEBECH-IVF UNIVERSE**

Aitamaks teid edule on meie kirg!

# Embrüotehnoloogiad : OPU võimas tööriist



Näide: 6 kuulise perioodi jooksul # arv vasikaid ühelt doonor lehmalt

MOET: 6 embrüot/loputus  
2 kuu tagant , 50 % tiinestuvus  
9 vasikat



OPU-IVP: 4 embrüot/OPU  
1 nädal vahet, 50 % tiinestuvus  
48 vasikat



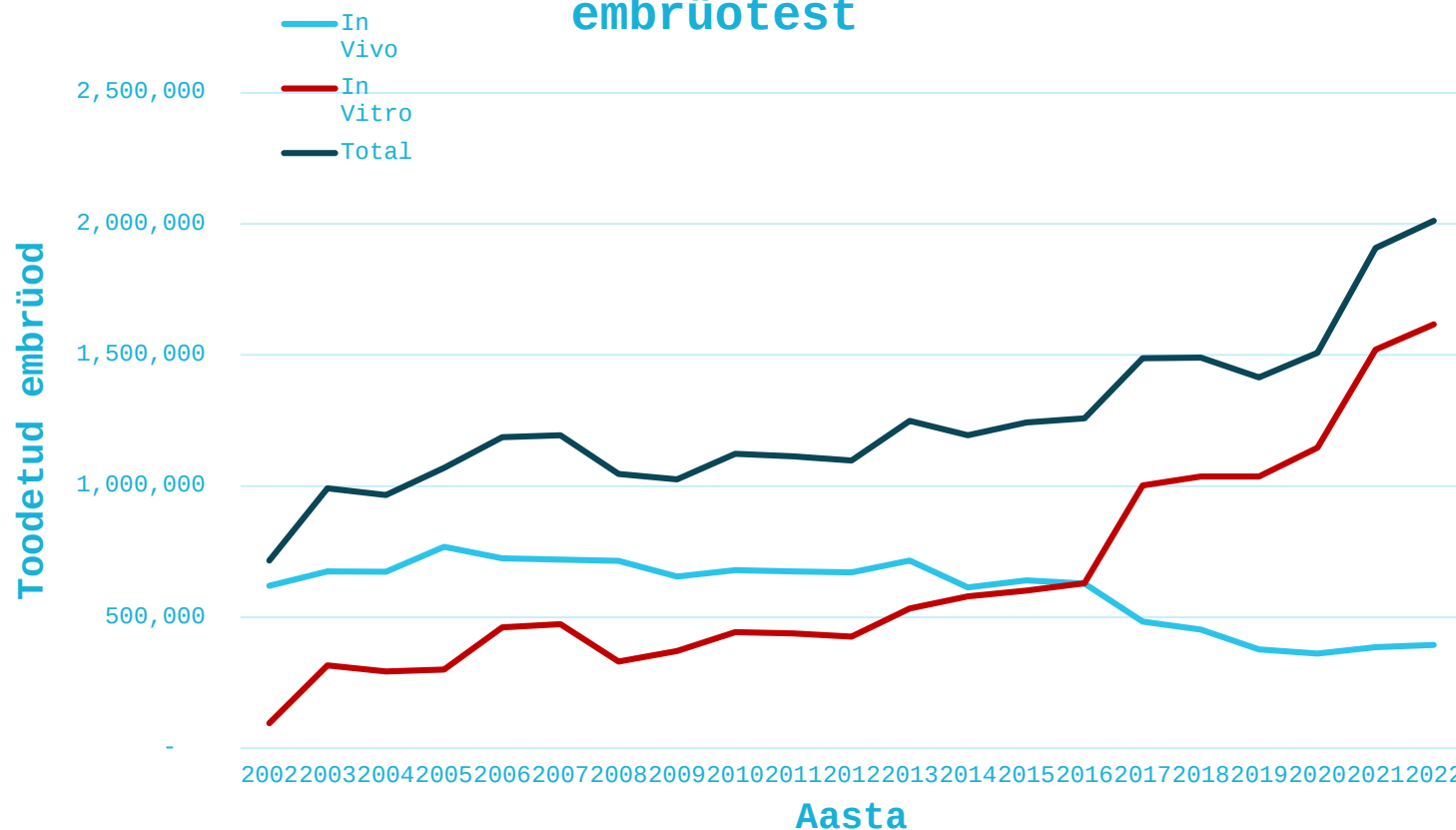
↑ Kanditaatide arv

↓ Põlvkonna vahetus

↑ Paaritamine eliit doonor emastega

## 2022 Embrüote tootmise statistika

### Globaalne arvuline ülevaade *in vivo* saadud vs. *in vitro* toodetud veiste embrütest

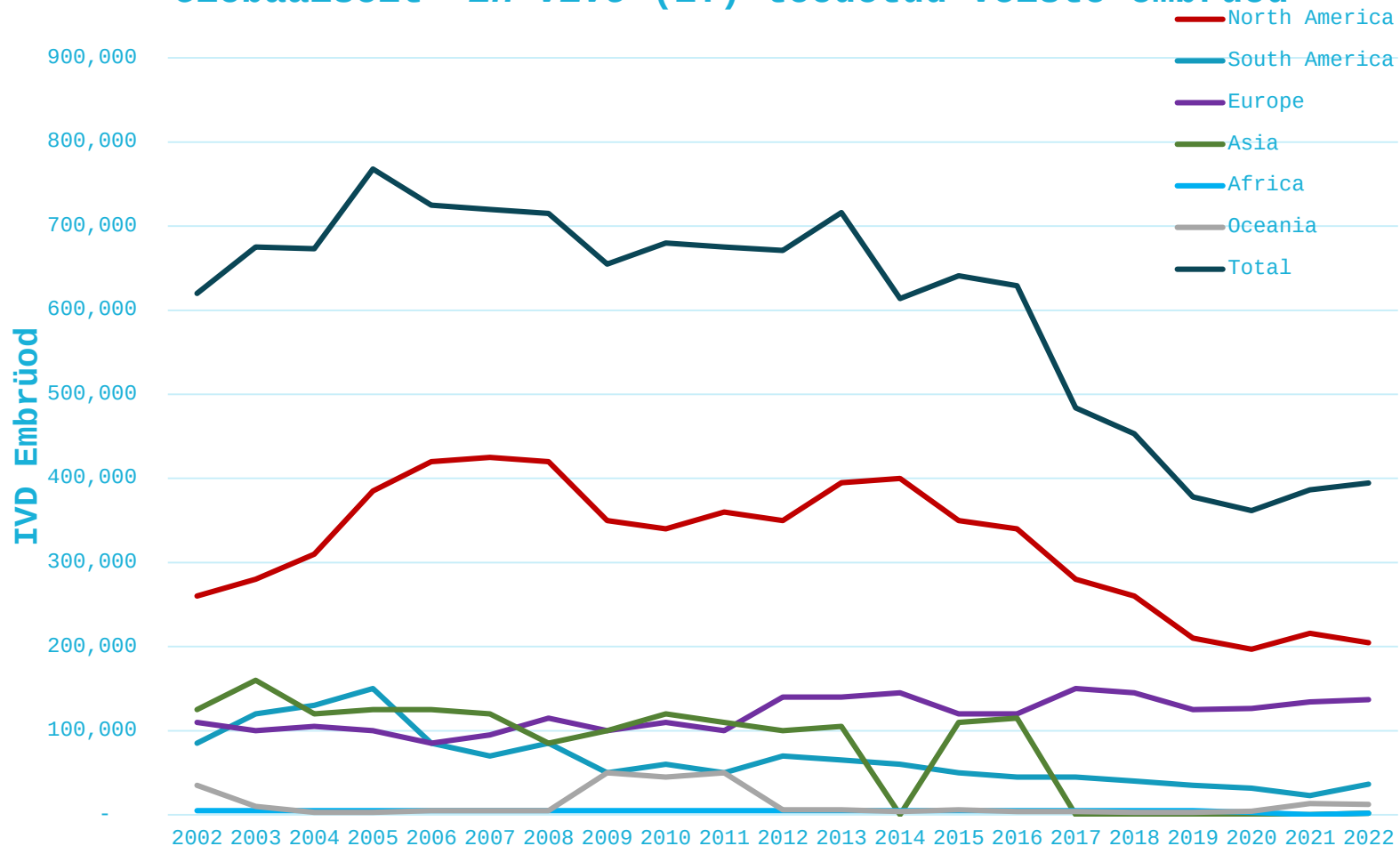


Eelduste kohaselt ainult 17% tegelikust embrüote tootmisest registreeritakse läbi andmekogumis komiteede.



# 2022 Embrüote tootmise statistika

## Globaalselt *in vivo* (ET) toodetud veiste embrüüd



Eelduste kohaselt ainult 17% tegelikust embrüote tootmisest registreeritakse läbi andmekogumis komiteede

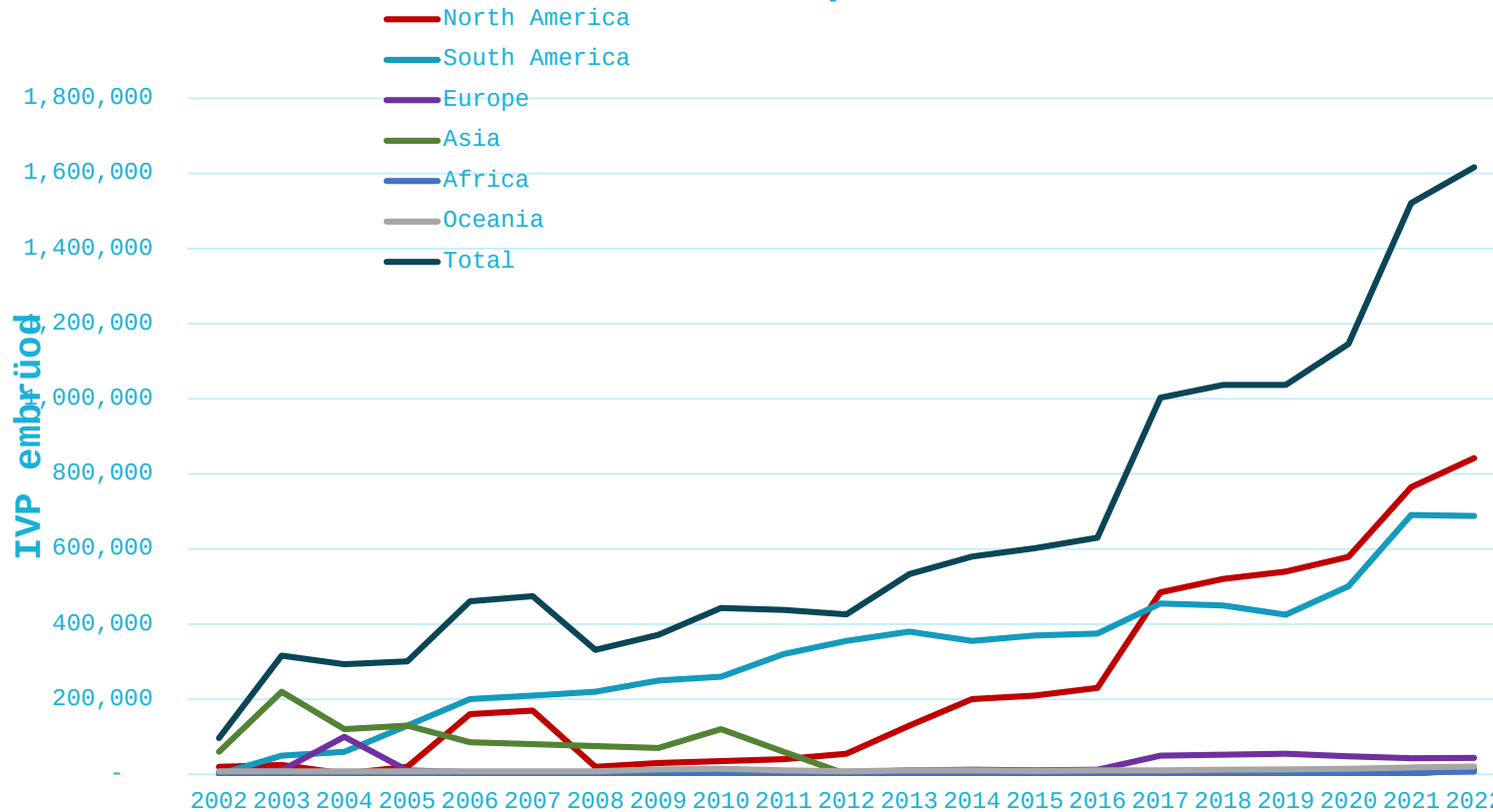


## 2022 Embrüote tootmise statistika

### Veiste *in vitro* toodetud embrüote jaotus mandrite kaupa



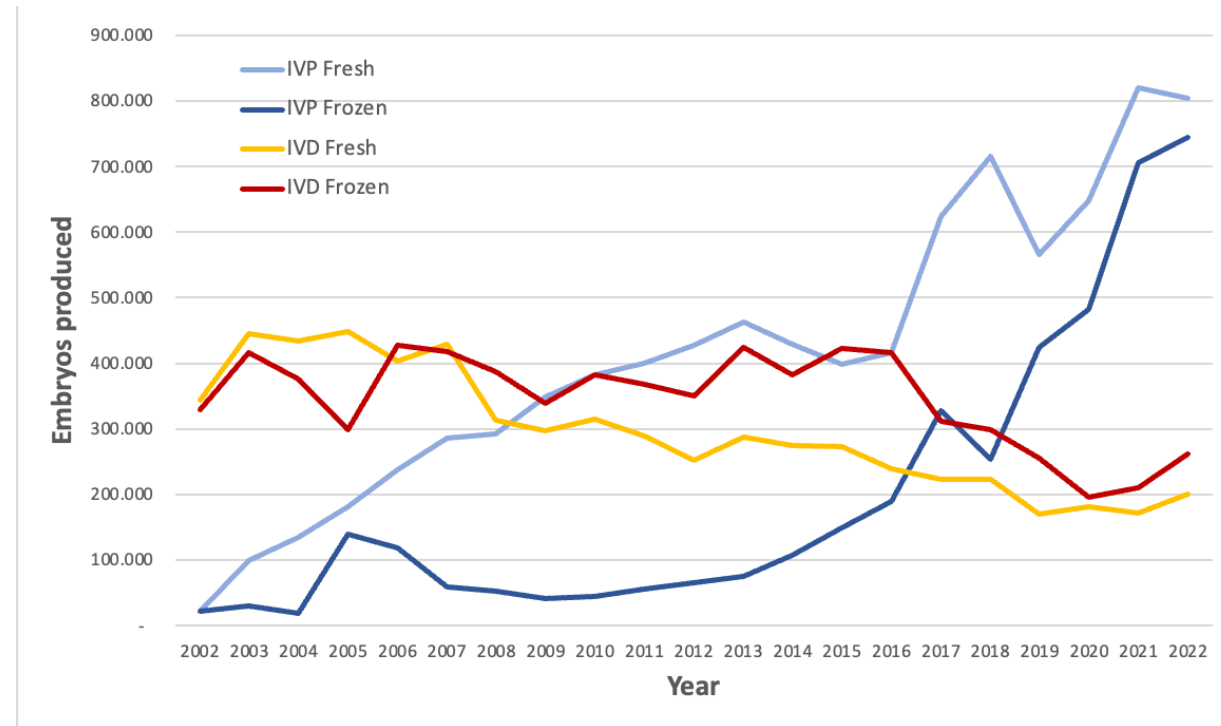
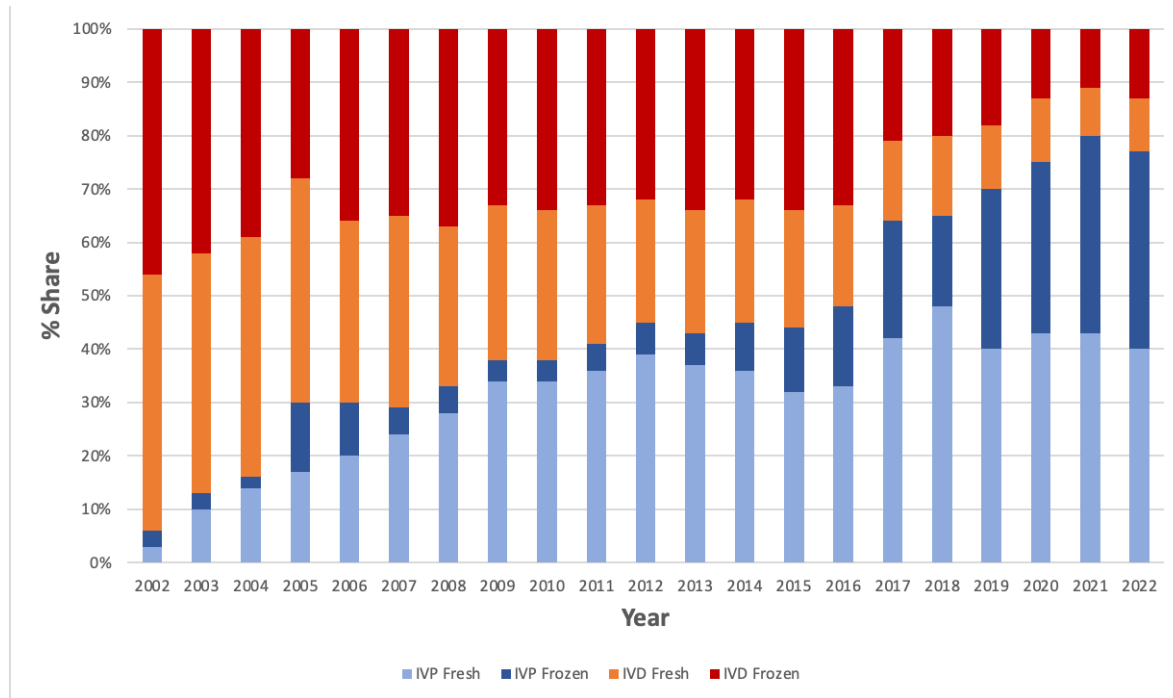
Eelduste kohaselt ainult 17% tegelikust embrüote tootmisest registreeritakse läbi andmekogumis komiteede





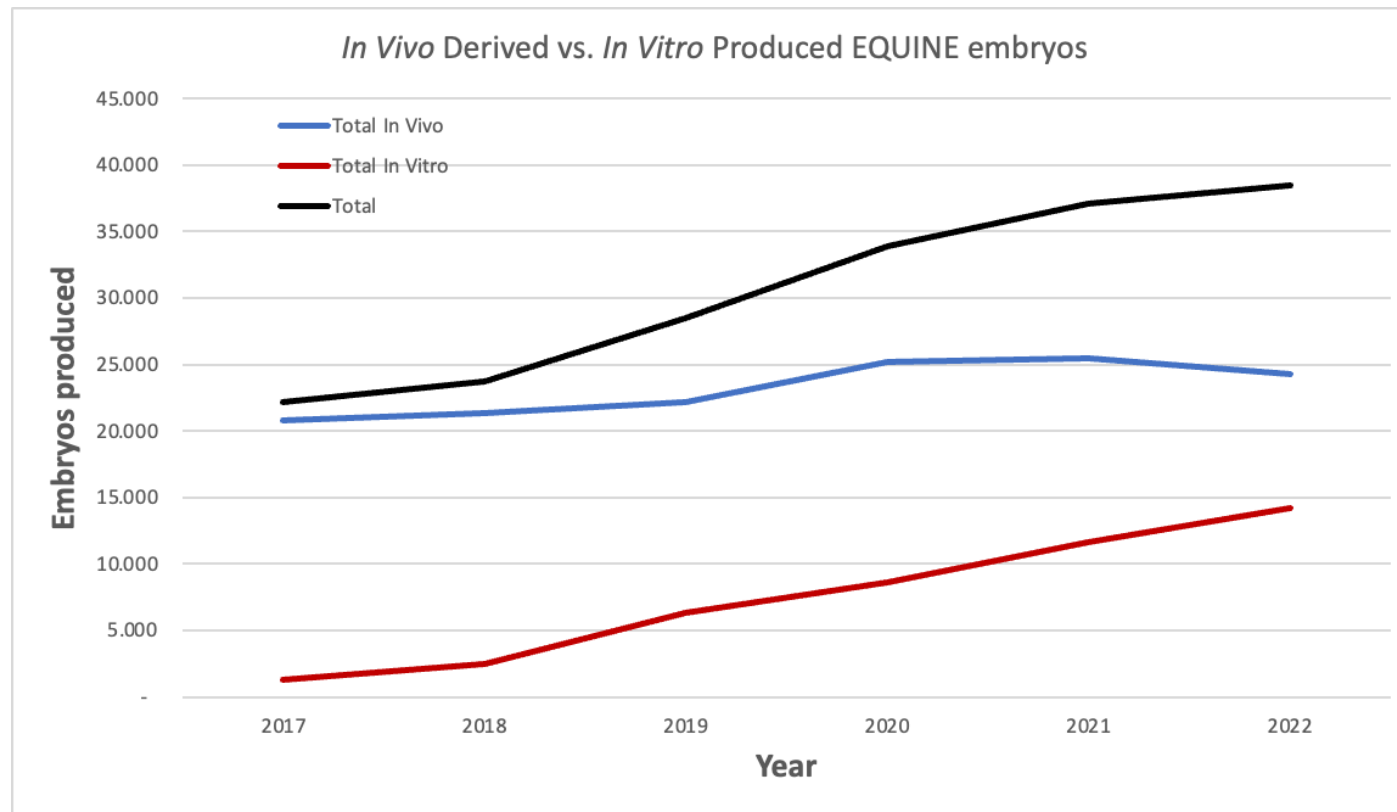


## Värske vs. Külmutatud veistel



## 2022 Embrüote tootmise statistika

Hobuste embrüote globaalne toodang

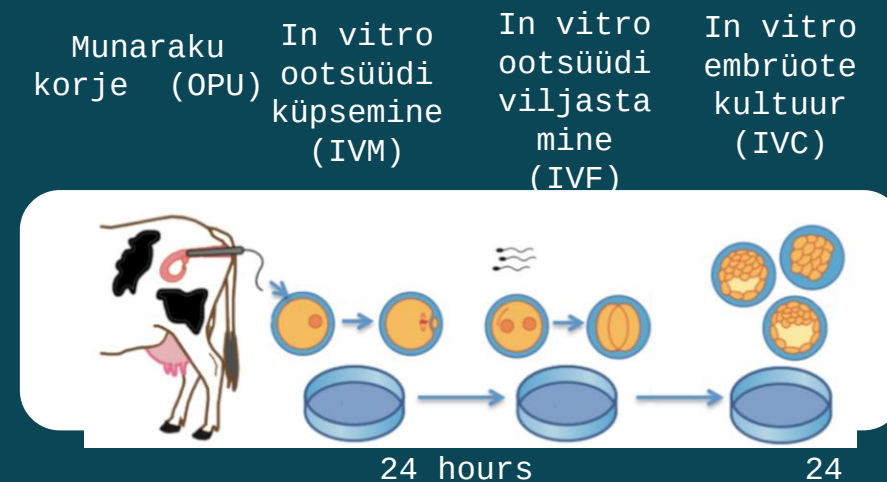




# IVF embrüote loomise sammud

- Labori sisustamine, seadmed , KK ja SP
- Ootsüütide aspireerimine ja küpsemine (IVM)
- Sperma ettevalmistus
- Viljastamine(IVF)
- Kumuluse rakkude eemaldamine ja kultiveerimine (IVC)

## In vitro embrüote tootmine (IVP)



# IVP labori sisseseade



Laminaar tõmbekapp  
Inkubaator: suur või lauapealsed



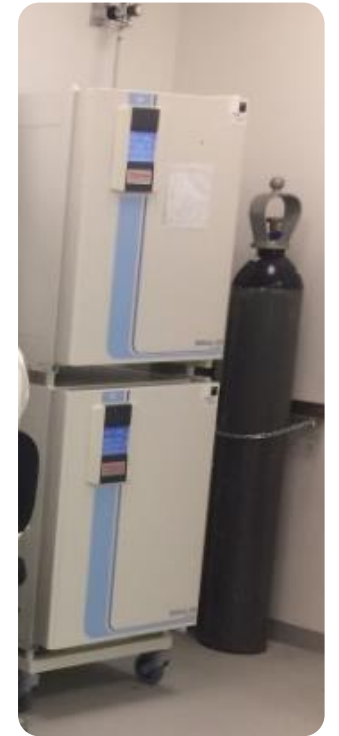
CO<sub>2</sub> inkubaator. Madal hapnikutase on IVC jaoks vajalik Sisseehitatud gaasigisti või eelevalt segatud tri-gaas



Külmik



Tsentrifuug sperma ettevalmistuseks - 328 g



CO<sub>2</sub> inkubaatorid

# SP on tähtsad - gaasi kontsentratsioon ja temperatuur



# Labori varustus ja plastik

- Külmik
- CO<sub>2</sub> ja madala O<sub>2</sub> inkubaatorid
- Soojendusalus
- Laminaar tõmbekapp
- Plokk-soojendid
- 2, 10, 200, 1000 ul pipetid
- Kumuluse rakkude eemaldamise pipetid
- Ootsüütide/embrüote transpordimahutid
- Külmutamine/vitrifikatsioon
- Sperma ja stereo mikroskoop
- Tsentrifuug

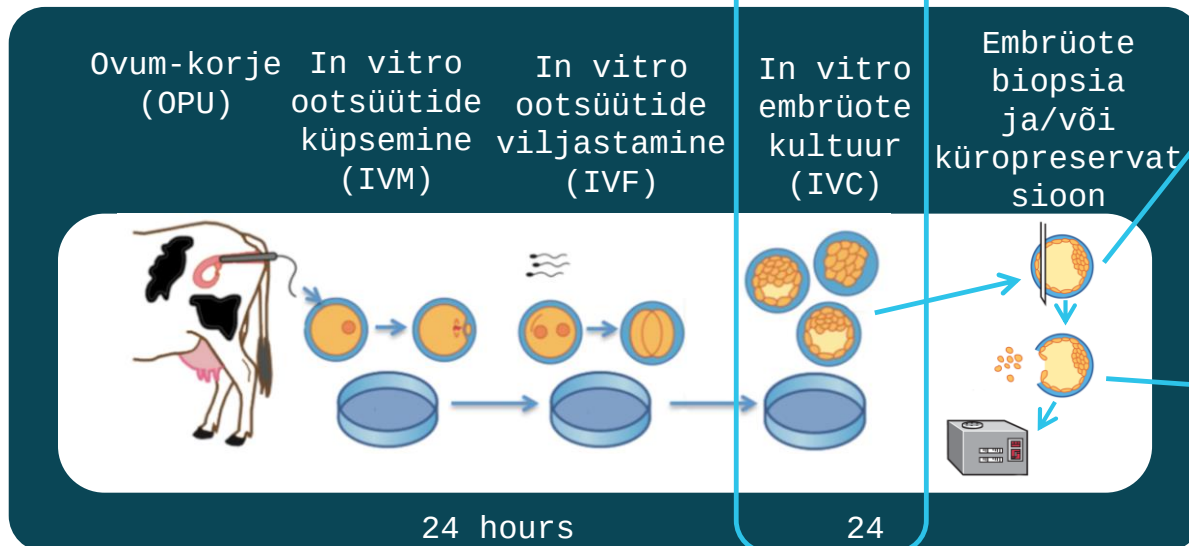
KASUTA AINULT IVF TASEME ÜHEKORDSEID PLASTTOOTEID



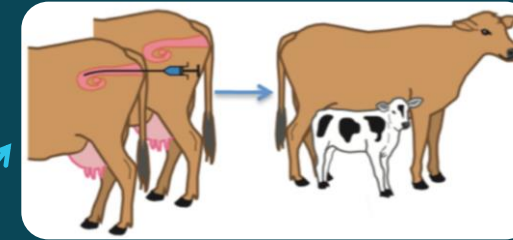


# Küpsemine

## In vitro embrüote tootmine (IVP)



## Embrüote siirdamine



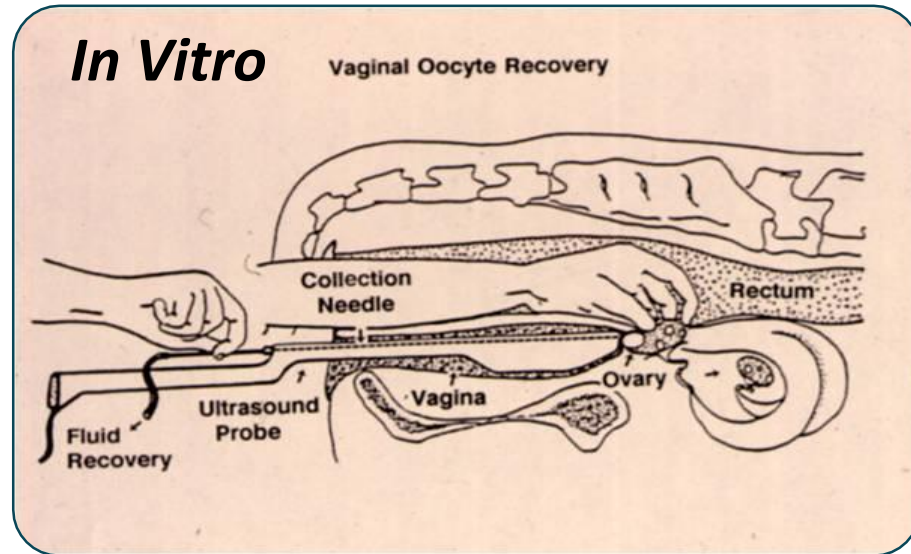
9 months

## SNP-kiip embrüote geneetiline selektsioon

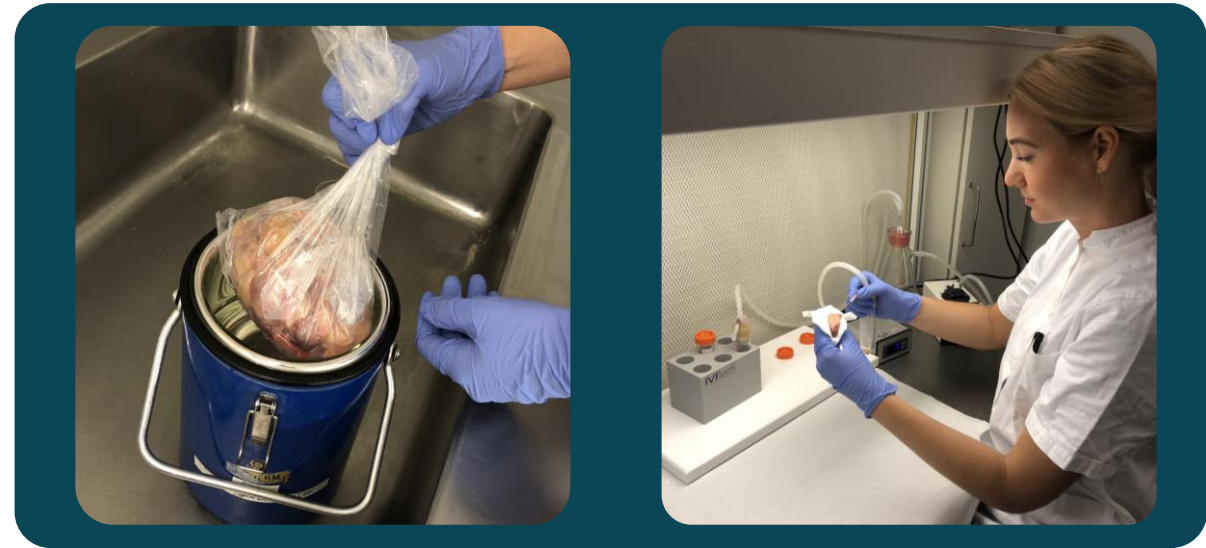


# Ootsüütide aspireerimine IVP

Kaks meetodit ootsüütide saamiseks



Folliikulipunktsioon ultraheli abil (OPU)



Ootsüütide aspireerimine tapamajast pärit munasarjadest



# Lahused munasarjade kogumise päeval

## Päev -1 (IVM) Munasarjade kogumis päev

Hepes puhvertatud pesulahus

Küpsemine, IVM – lahus - CO<sub>2</sub> - ga tasakaalustamine vähemalt 2 tundi enne kasutamist  
või

Hepes-küpsemine, IVM-keskkond küpsemiseks transpordi ajal ei vaja CO<sub>2</sub> tasakaalustamist, ainult soojendamist temperatuurini 38,8°C

OPU lahus munarakkude kogumiseks  
või

0,9% NaCl (soolalahus) tapamajast kogutud munasarjade pesemiseks



Ei mingit õli - PBS ei ole OPU jaoks



# Tapamaja munasarjad



NB Ainult toiduaine tööstuse plastik



Märkida aeg millal munasarjad jõuavad laborisse



Mõõda munasarjade temperatuur transpordil



Pese soolalahusega

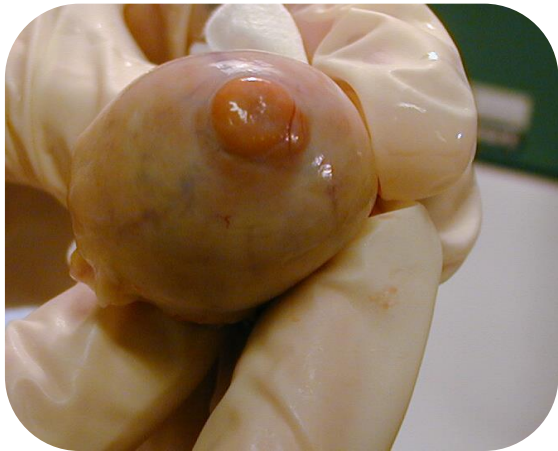


Ideaalis hoitakse temperatuur 30-33 kraadi Celsiust



# Veiste munasarjad tapamajast IVM

## Päev -1

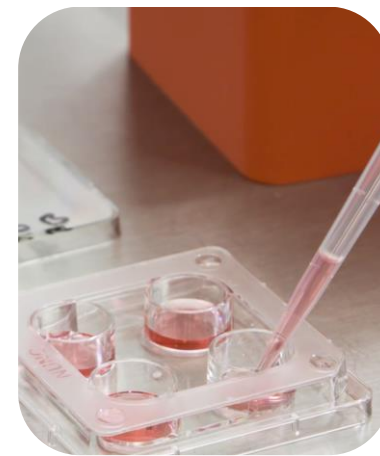
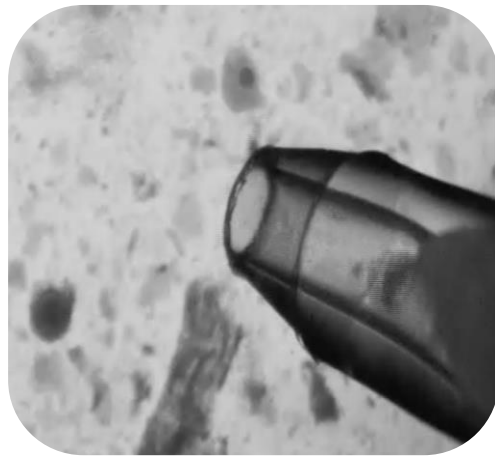
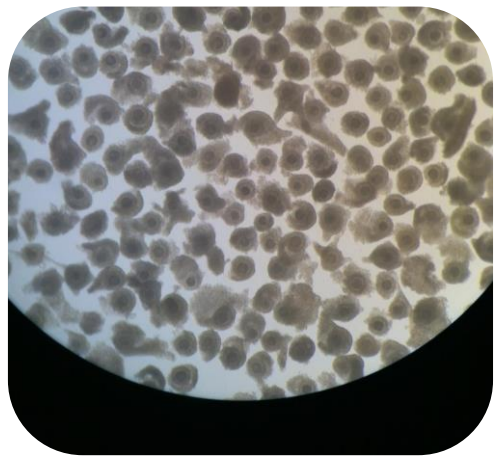


Foliikulid üle 2 mm ja vähem kui 10-15 mm aspireeritakse

Katsutites sisaldub 150  $\mu$ l hepariini  
ja mida hoitakse soojas (30-33 °C)  
Aspireeri, ära viiluta

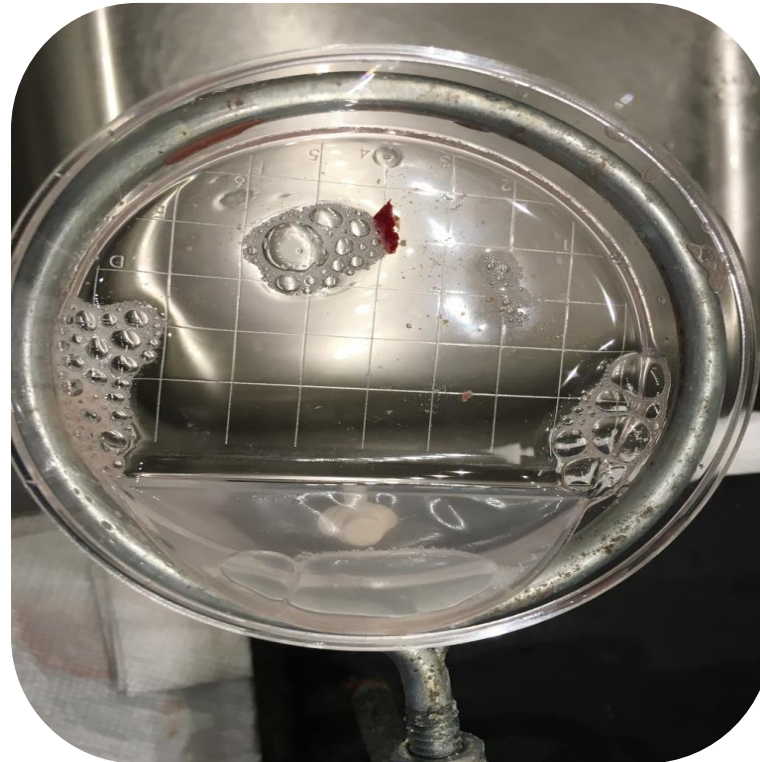
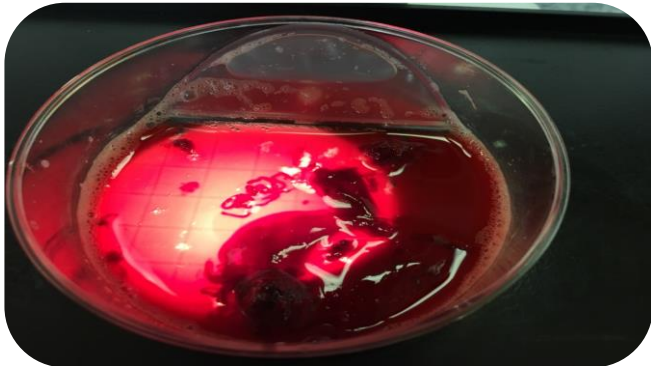
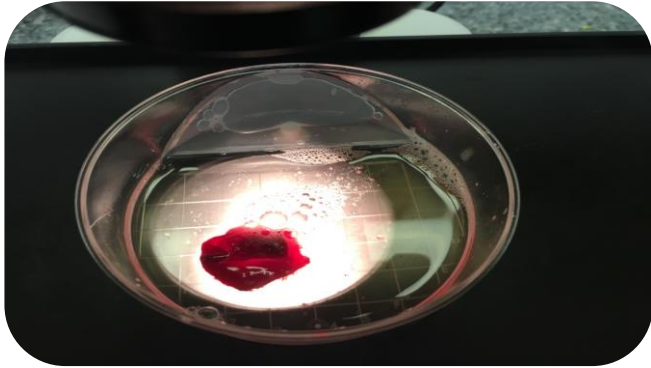


# Ootsüütide loputamine tapamaja munasarjadest



Otsi, pese mitu korda tee viimane loputus kasvulahuses enne viimast ümbertõstmist ja CO2 inkubaatori keskkonda viimist

# Ootsüütide pesu pärast OPU-t



Välgi vere hüübeid

Mõned hoiavad pumpa pidevalt töös

Mõned jätavad selle aspireerimise ajaks seisma

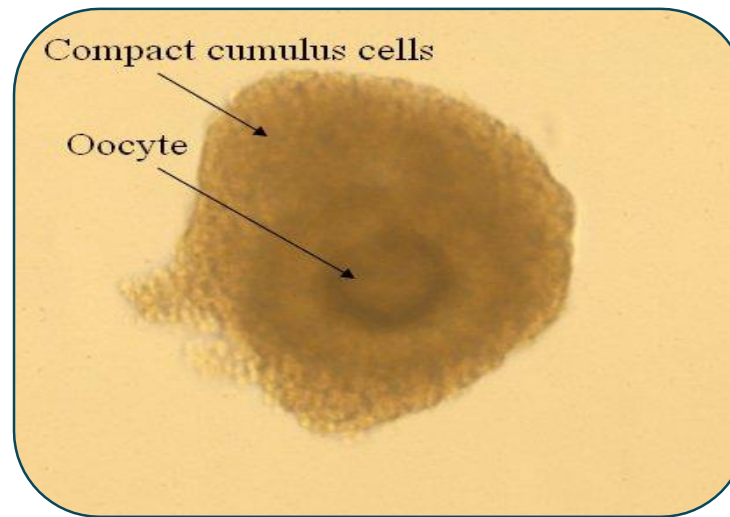
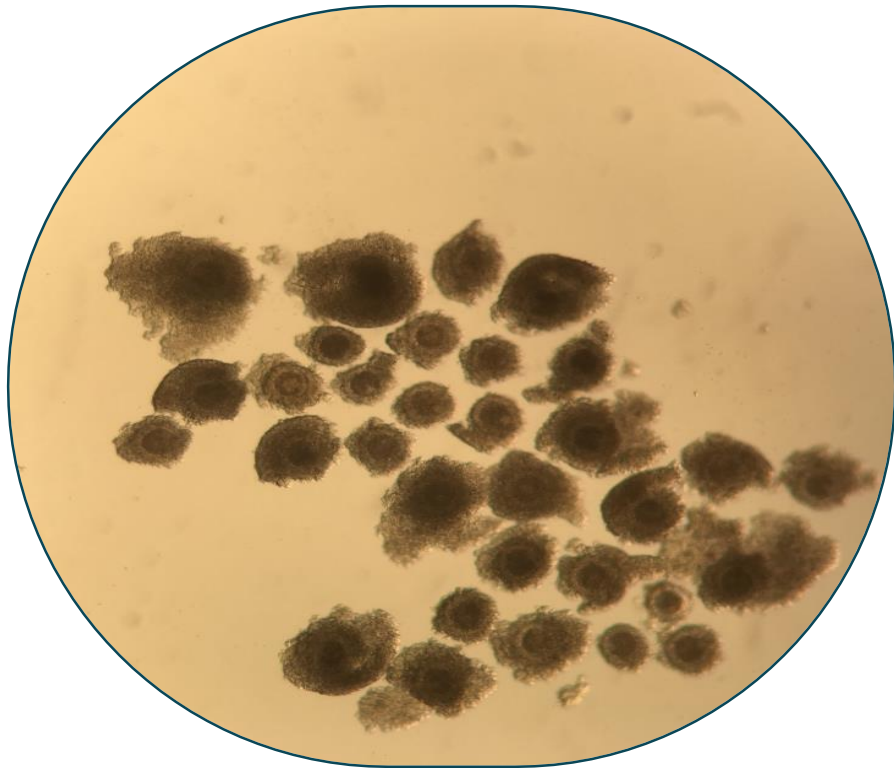
Veendu et filter ei kuivaks ära.

# Ebaküpsed ootsüüdid OPU-st



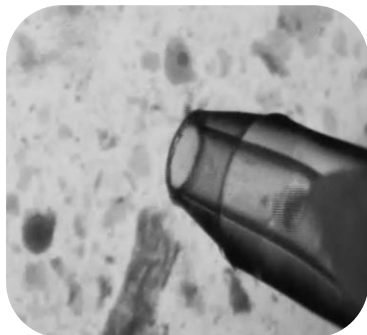
ÄRGE EEMALDAGE KUMULUSE RAKKE

Nad on tähtsad küpsemisel ja viljastamisel

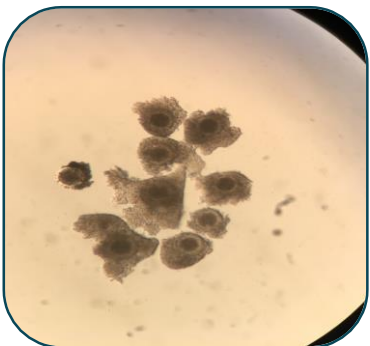




# Ootsüütide otsimine pärast OPU-t



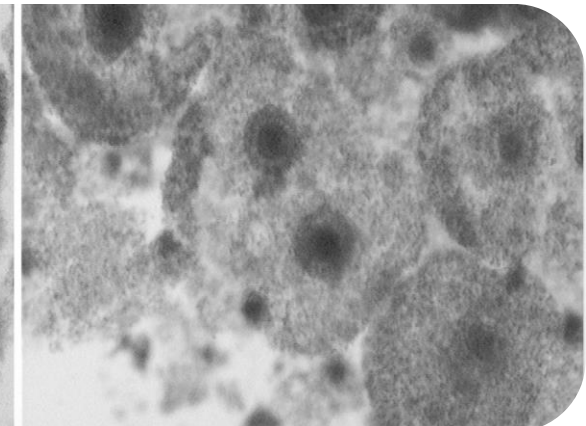
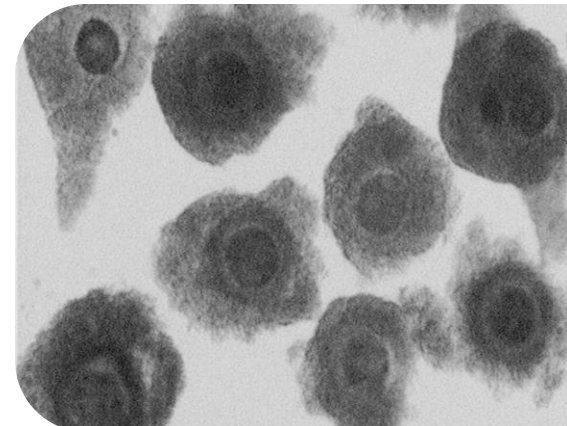
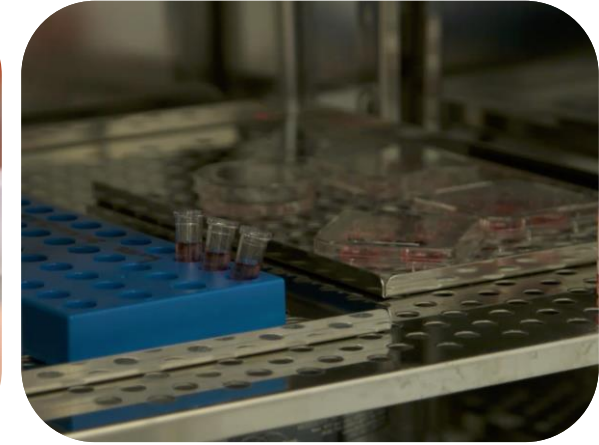
Ootsüütide otsimine, pesu, et kõrvalistest osakestest lahti saada, loputus küpsemislahuses enne küpsemis-viaalidesse panekut



# Ootsüütide küpsetamine

Ootstüütide küpsemiseks on mitmeid võimalusi:

1. Küpsemine transpordikonteineri viaalides kogu küpsemise ajal 20-24 hours
2. Naastes laborisse mõne tunni pärast – eemaldage katseklaasi kaas ja asetage need CO2 inkubaatorisse. Kuigi keskkond on Hepes-puhverdatud, sisaldab see ka bikarbonaati, mis on oluline ootsüütide ja embrüote elujõulisuse tagamiseks. Ärge kunagi liigutage munarakke küpsemise ajal.
3. OPU toimub labori lähedal ja nad küpsevad 4-auguga Petri tassis 500 µl lahuses
4. Pea meeles, et küpsemiskeskkonna puhul ei tohi kunagi kasutada õli, kuna lipofiilsed hormoonid migreeruvad õlisse ja puuduvad seejärel keskkonnas, et ootsüüte küpsetada.



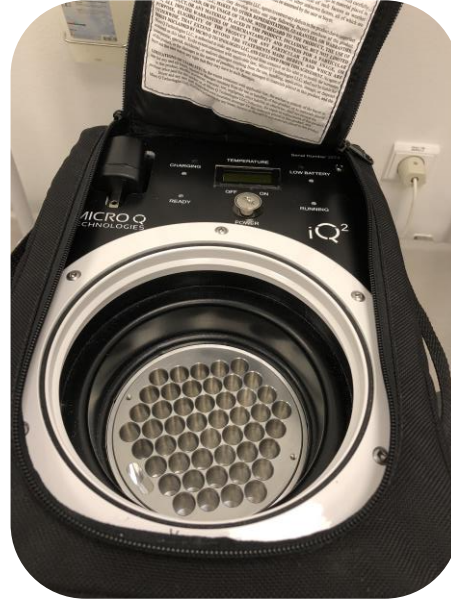
# Ootsüütide/embrüote transport



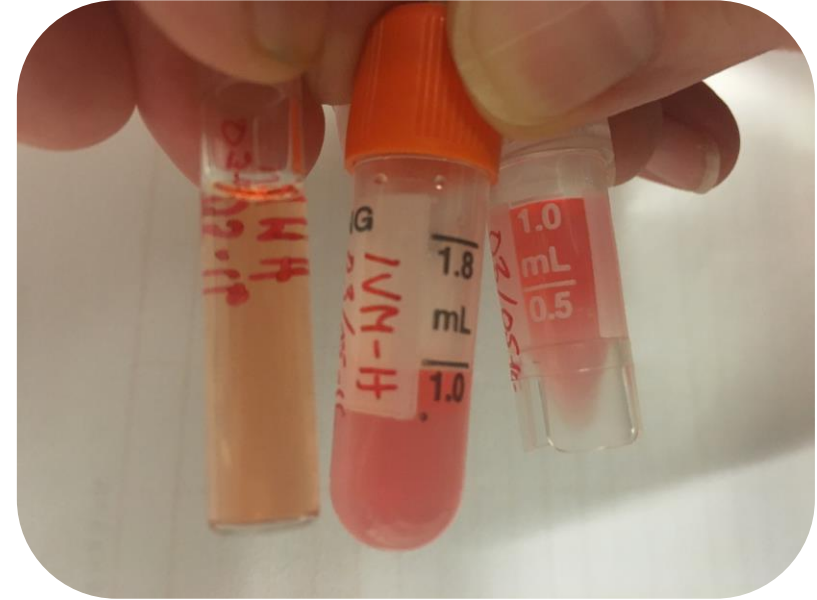
NB Embrüotoksilised  
plastiktorud



Veendu et viaalid ei ole embrüo-toksilised –  
hangi nimekiri sellistest, mis on testitud veiste embrüotega



Tea ja kontrolli temperatuuri transpordimahutis !



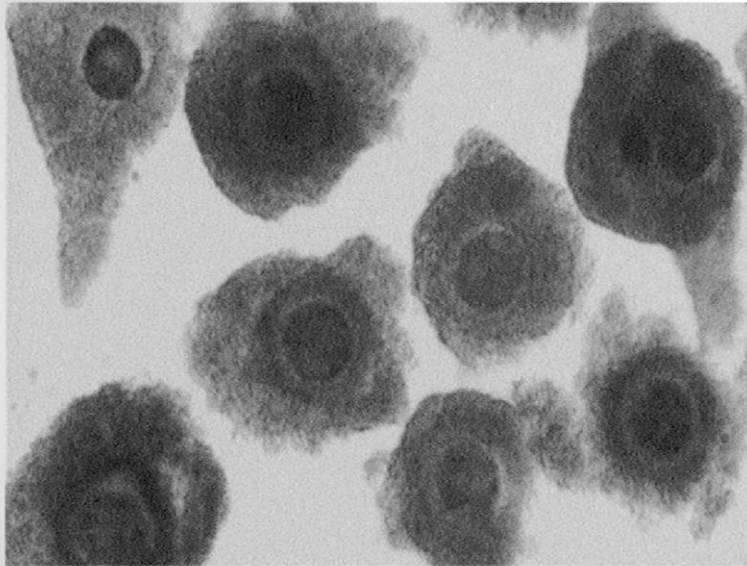
Pea meeles: Kuna keskkond on Hepes-puhverdatud, ei tähenda see, et see ei säilitaks pH-d lõputult, kuna see sisaldab ka bikarbonaati



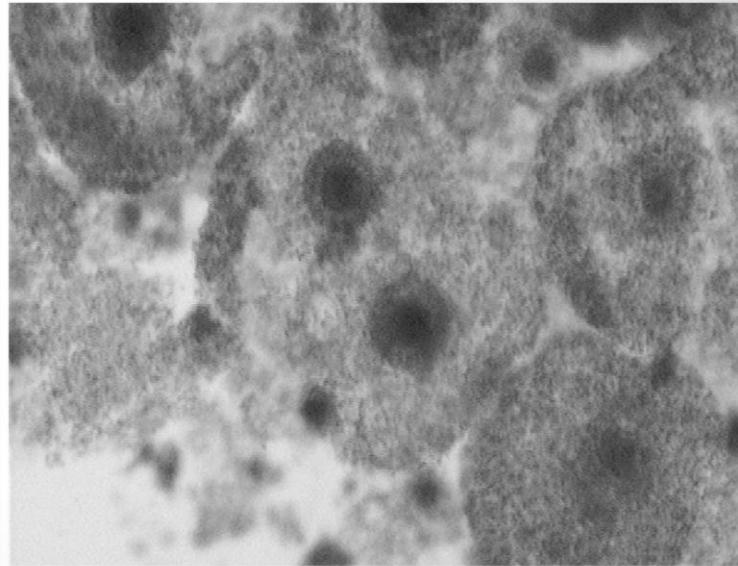
# 20- 24 tundi ootsüütide küpsemist

6 % CO<sub>2</sub> ja atmosfääriõhuga

Immature oocytes pre-IVM:



Cumulus expansion following IVM:



# Sperma ettevalmistus



## Sperma pesu lahus

Sperma pesemiseks tsentrifugimise ajal enne in vitro viljastamist

Labori sisustus, seadmed, KK ja SP

Küpsemine (IVM)  
Ootsüütide aspireerimine ja küpsemine

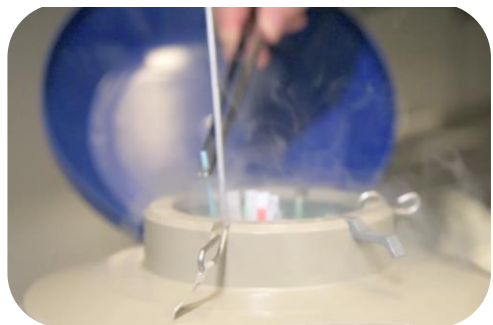
Sperma ettevalmistus

Viljastamine (IVF)

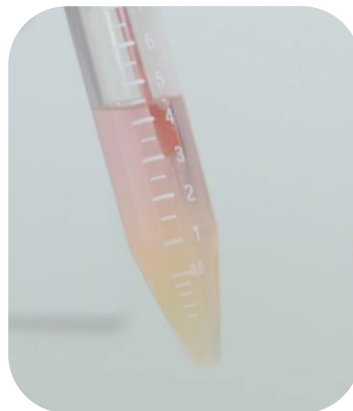
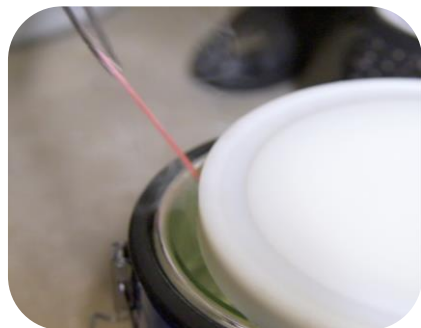
Kumuluse rakkude eemaldamine ja kultuur(IVC)



# Sperma ettevalmistamine



Aseta külmunud sperma kõrs 37 °C sooja vette minimaalselt kaheks minutiks . Oma sobivad anumad .



Tsentrifuugi 5 minutit  
328 x g



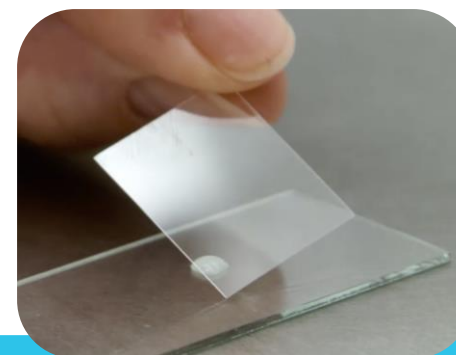
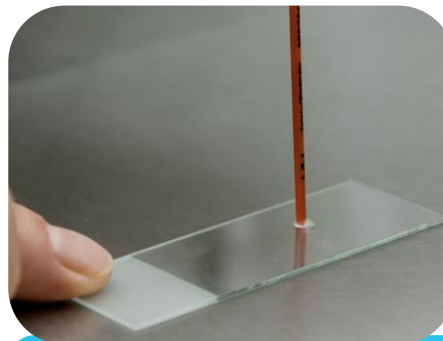
Eemalda supernatant



Lisa värsket lahust



Tsentrifuugi uuest 5 minutit



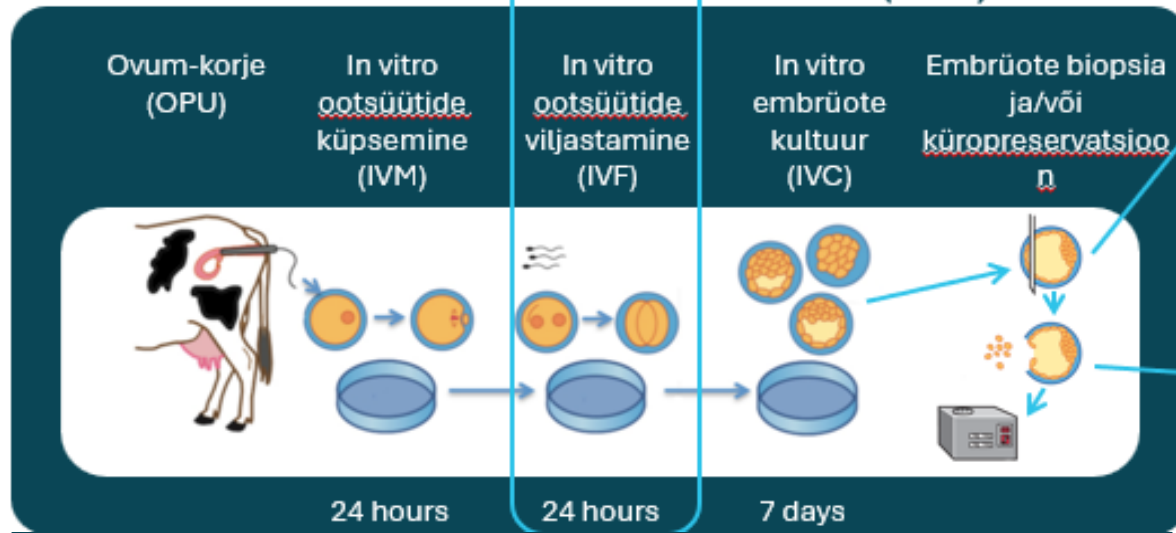
Hinnake liikuvus kohe, samal ajal, kui seemnerakkud on esmakordselt tsentrifugeerimisel



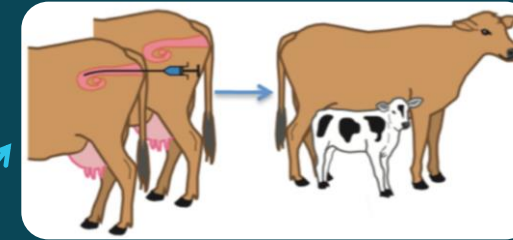


# Viljastamine

## In vitro embrüote tootmine (IVP)



## Embrüote ja tiinuste siirdamine



9 months

## Embrüote SNP-kiip genoom selektsioon



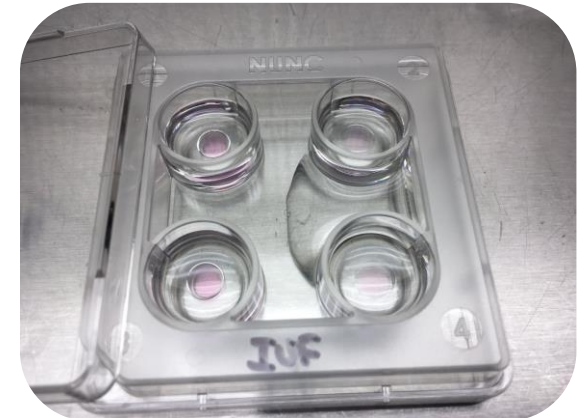
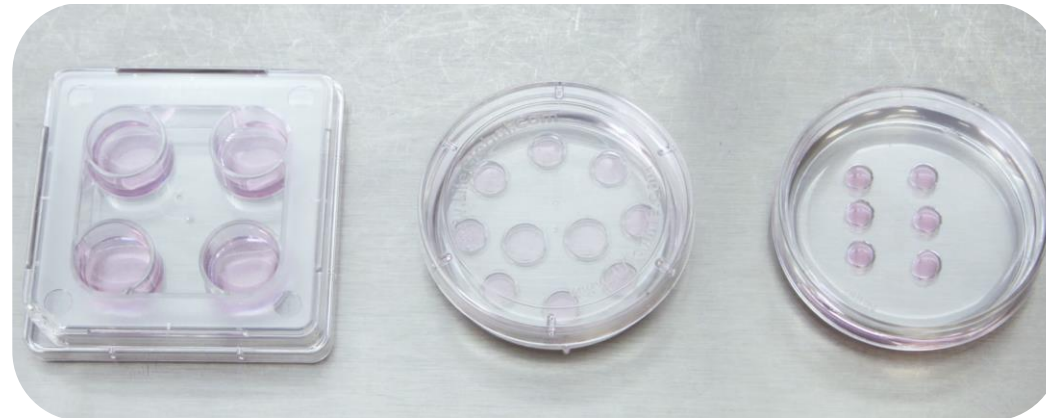
# In Vitro Viljastamine(IVF)

4-auguga  
Petri tass

Ettevalmistatud  
Mikro-tassid

Tilgad asetatud  
35mm Petri tassis

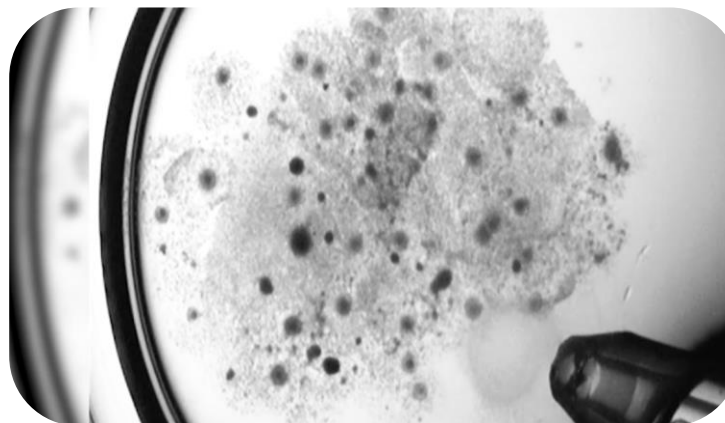
Tilgad  
4-auguga  
Petri tassis



IVF plaatide ettevalmistus

# Arvutatud koguse spermatsuspensiooni lisamine

Lisa arvutatud kogus spermalahust IVF- lahusele koos küpsete ootsüütidega. See on hinnanguliselt 10 ul tilkade kohta ja 50 ul Petri tassile

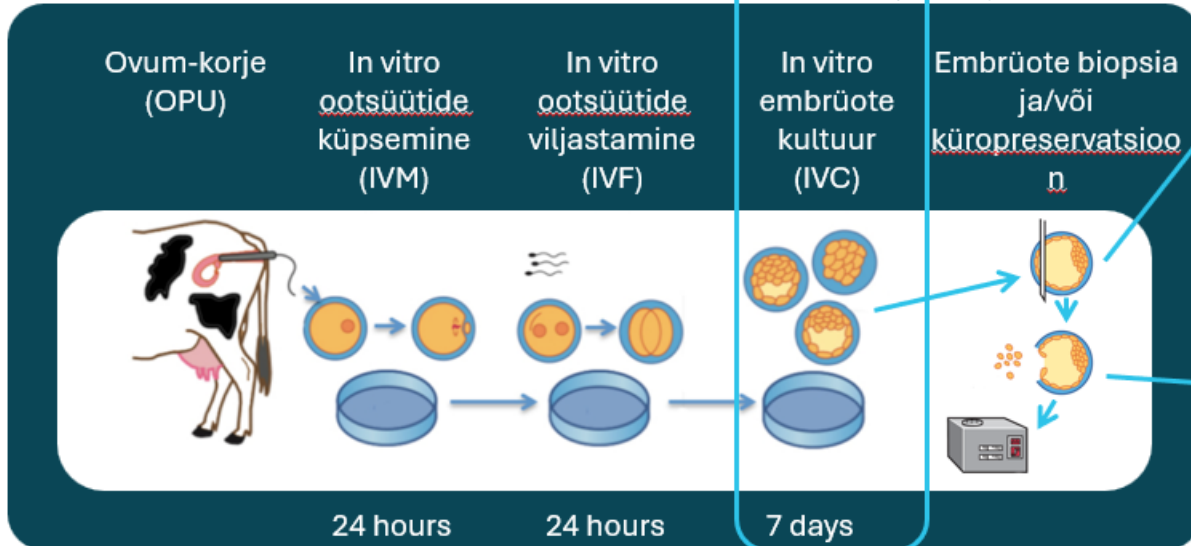


Inkubeeri üleöö 5-6 % CO<sub>2</sub>  
atmosfääriõhus 38.8°C juures

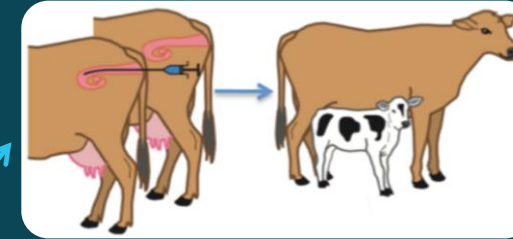
Kui spermide liikuvus oli madal ?

# Kultuur

## In vitro embrüote tootmine (IVP)



## Embrüote ja tiinuste siirdamine



9 months

## Embrüote SNP-kiip genoomseleksioon



# Inkubatsiooni ja kultuuri tingimused

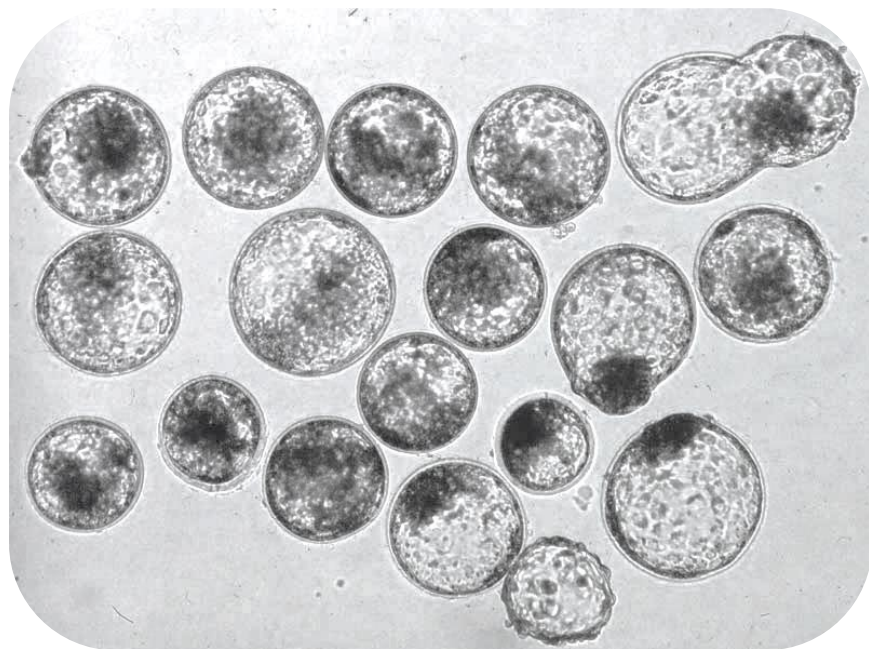
- IVC inkubatsioonitingimused on madala O<sub>2</sub> tasemega
- Kasuta ainult ISO sertifikaadiga tööstuste lahuseid
- Ära tee ise ja ära kasuta seerumit
  - Suure järglase sündroom (LOS)
  - Patogeenide leviku risk
  - Ebähtlased tulemused sõltuvalt seerumi partiist





# Päev 7

## IVF Embrüod



Päeva lõpuks ...



Päris päeva lõpus



Esimesed IVF vasikad sündinud külmutatud embrüotest 2017 aastal Indias



# IVF tuleviku tehnoloogiad

## IVEP (In Vitro embrüote tootmine):

- Eesmärk on toota embrüoid täielikult laboris ilma traditsiooniliste viljastamismeetoditeta
- In vitro gametogenees võimaldab arendada spermat ja munarakke tüvirakkudest, laiendades võimalusi kunstlikuks viljastamiseks

## Geneetiline inseneriteadus ja geenide muutmise tehnoloogiad:

- Geneetika edusammud nagu CRISPR-Cas9, omavad tohutut potentsiaali IVF-i tulemuste parandamiseks.
- Võimaldab paranda geneetilisi kõrvalekaldeid embrüotes ja vähendada pärilike haiguste edasikandumise riski

## Tehisarv (AI) IVF-is:

- AI algoritmid saavad analüüsida suuri andmehulkasid, et aidata embrüote valimisel
- Ennustusmudelid aitavad tuvastada elujõulisemaid embrüoid, mis viib kõrgemate edukuse määrade ja optimaalse ressurside jaotamiseni

## Robotid IVF-is:

- Erinevate laboritegevuste automatiseerimine IVF-is, munaraku ja embrüo kultuuris
- Robotid süsteemid aitavad täpsete ja standardiseeritud protsessidega, vähendades riski ja inimlikku eksimust ja potentsiaalselt parandab tulemusi

Lotte Stroebech,  
DVM, PhD



# Kui saad sellest unistada – saad seda teha !



Täna tähelepanu eest ja aitäh

**Eesti Põllumajandus-Kaubanduskoda**



**Põllumajanduskoda**  
Eesti Põllumajandus-Kaubanduskoda