

# 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

The logo for Stroebech media, featuring a large, stylized blue letter 'S' followed by the text 'troebech' in a dark blue sans-serif font and 'media' in a lighter blue sans-serif font below it.

Stroebech  
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  
kirk!

# 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**

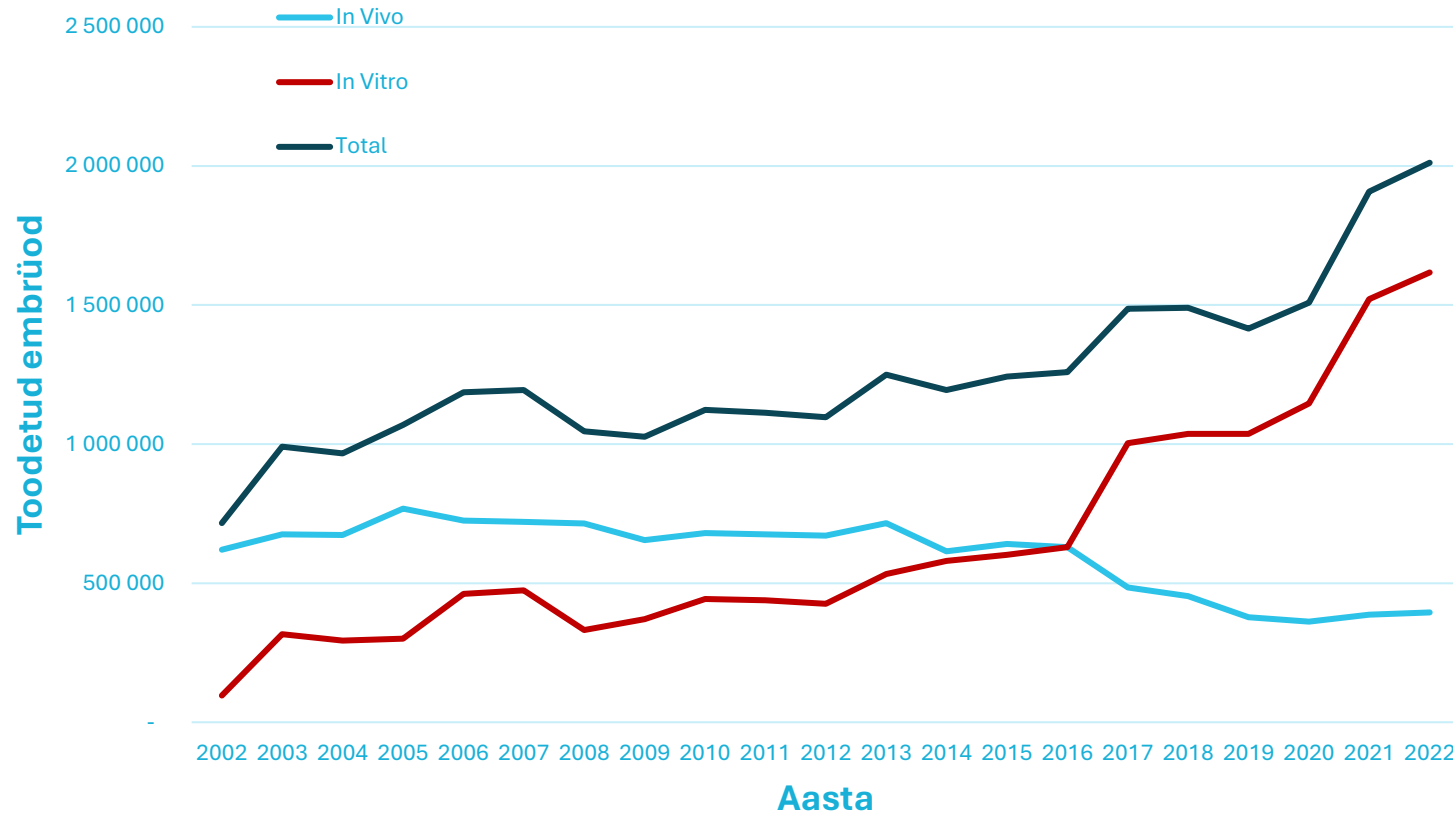


## 2022 Embrüote tootmise statistika

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



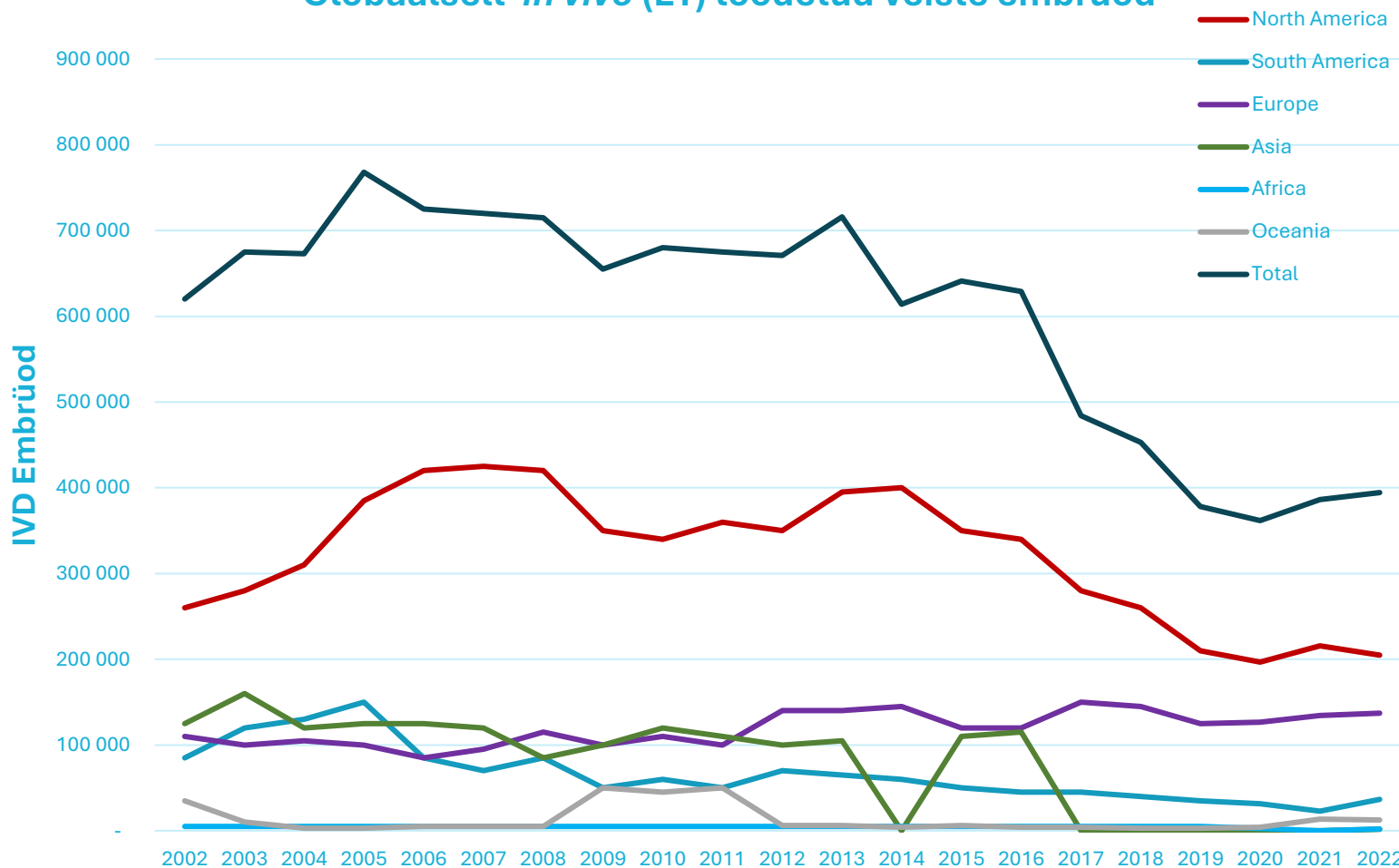
Eelduste kohaselt ainult 17% tegelikust embrüote tootmisest registreeritakse läbi andme- kogumis komiteede.





# 2022 Embrüote tootmise statistika

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



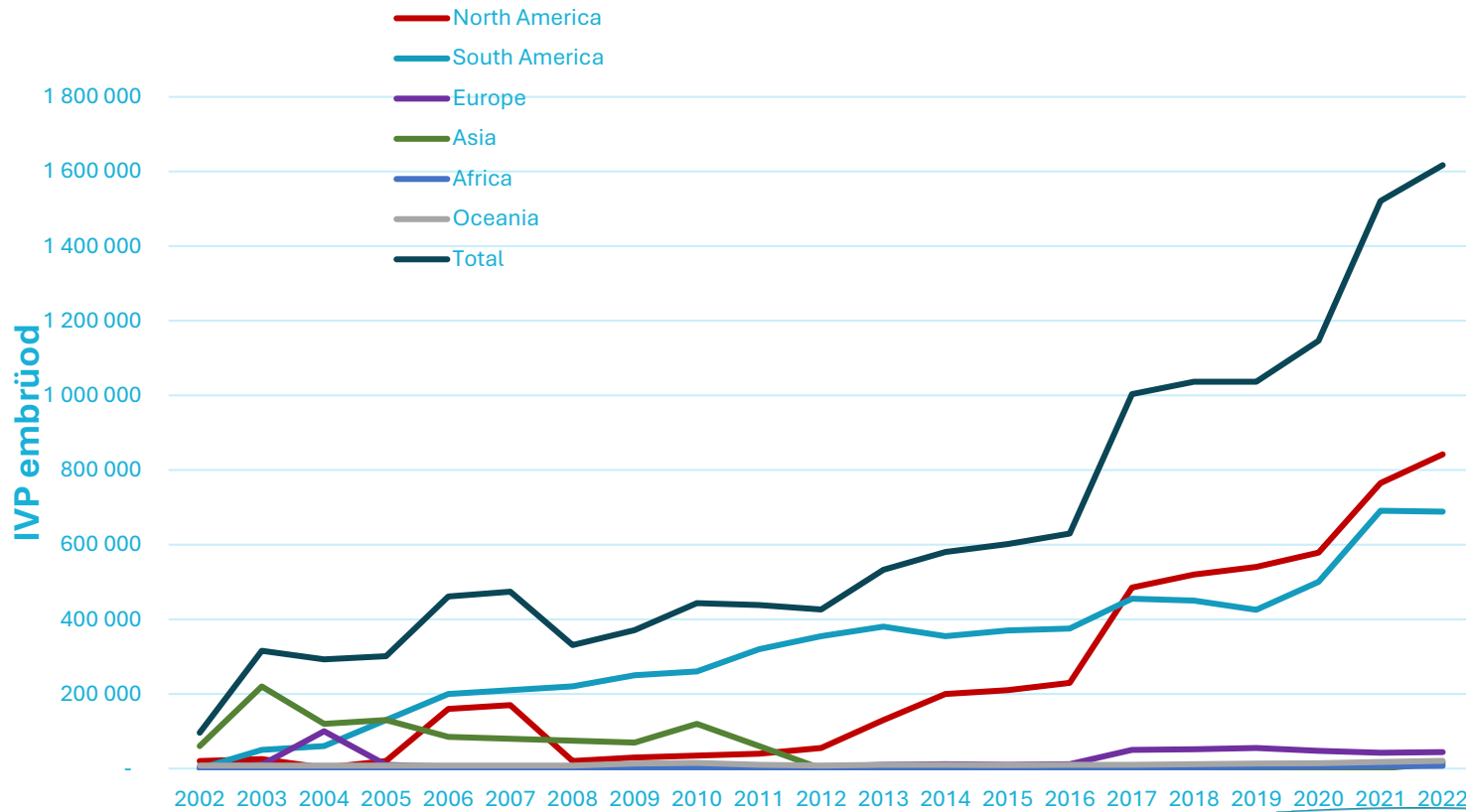
Eelduste kohaselt ainult 17% tegelikust embrüote tootmisest registreeritakse läbi andme- kogumis komiteede

Lotte Stroebech  
DVM PhD

Eelduste kohaselt ainult 17% tegelikust embrüote tootmisest registreeritakse läbi andme- kogumis komiteede

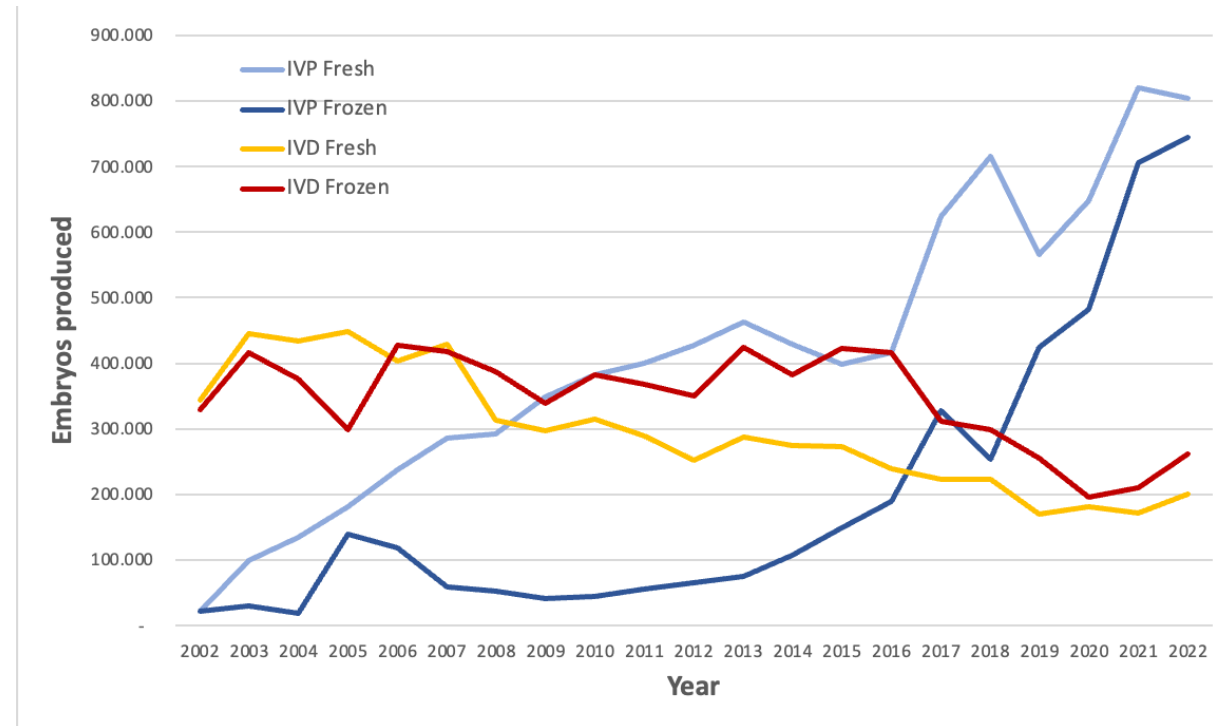
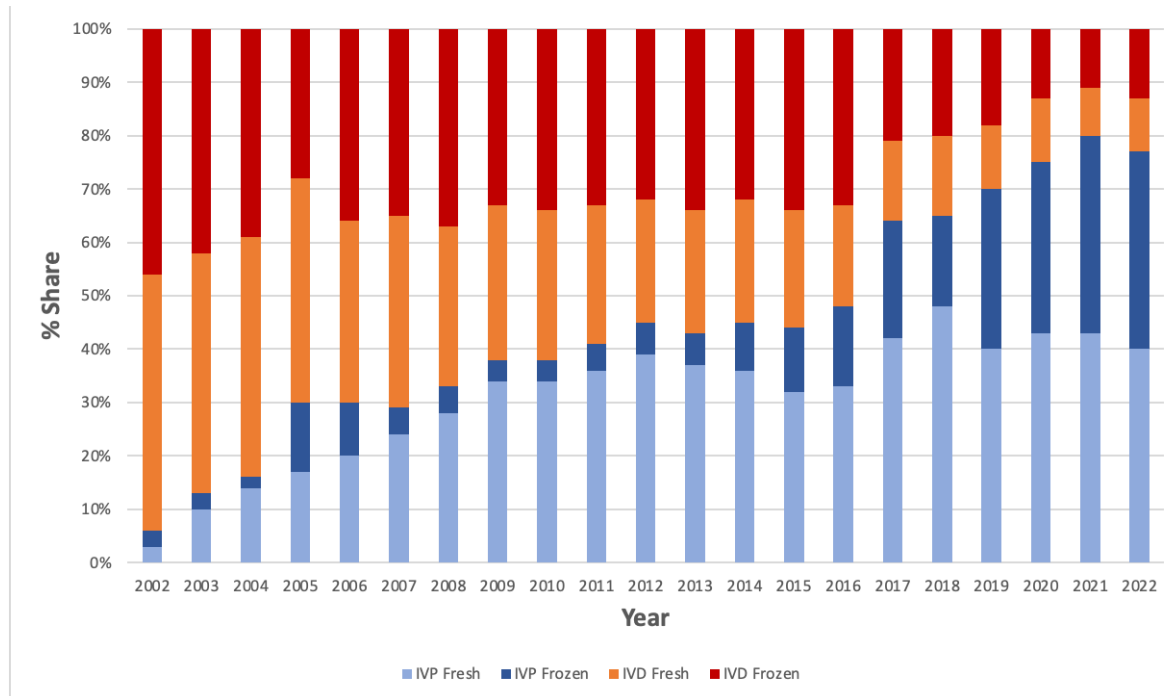
## 2022 Embrüote tootmise statistika

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



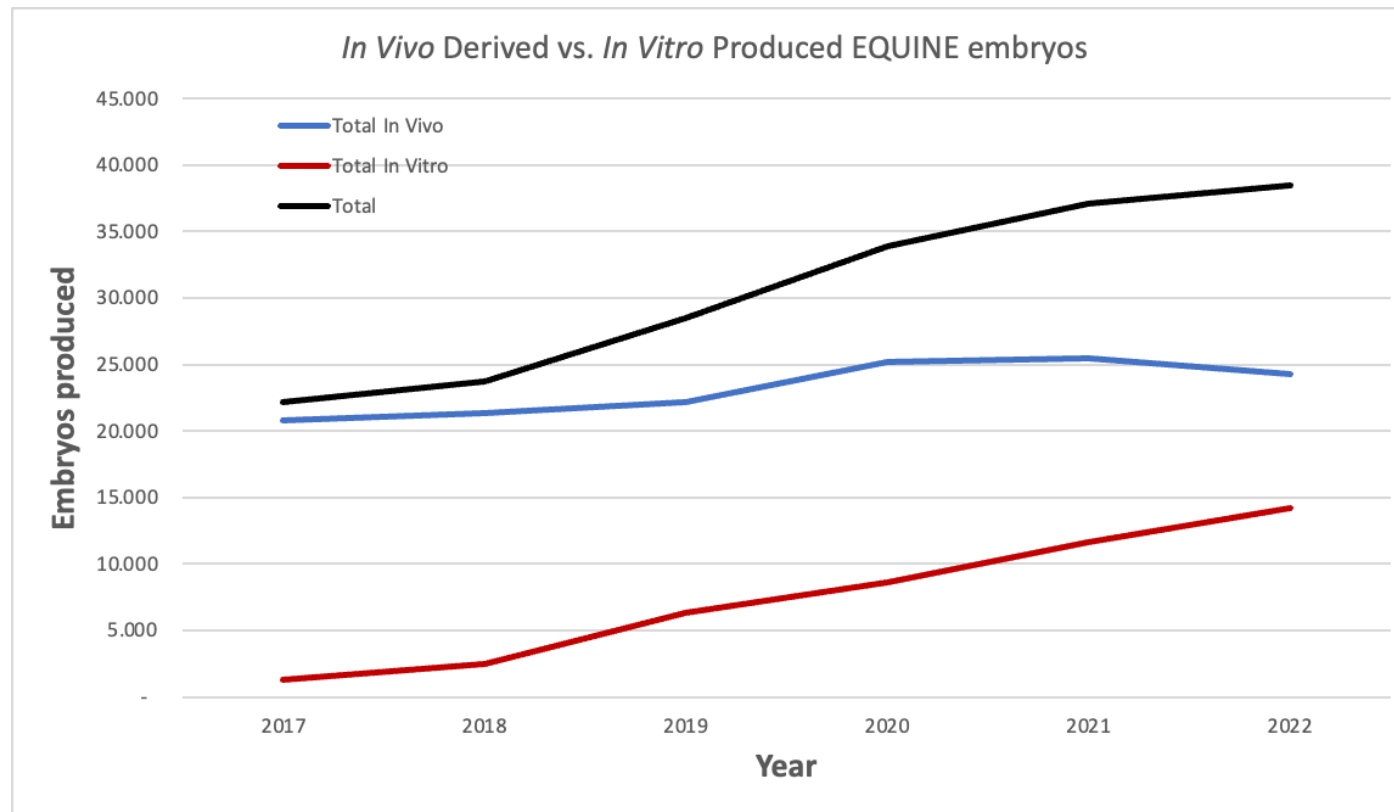


## Värske vs. Külmutatud veistel



## 2022 Embrüote tootmise statistika

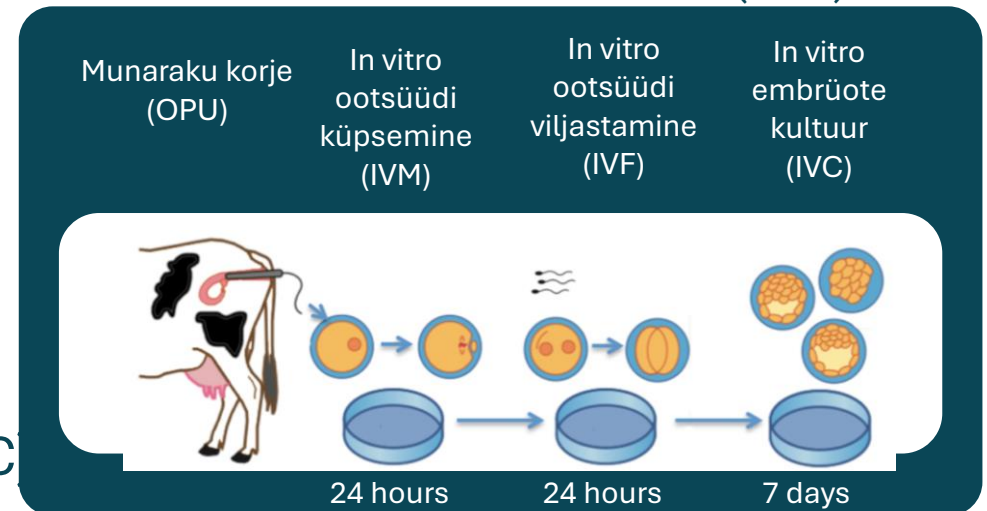
Hobuste embrüote globaalne toodang



# 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



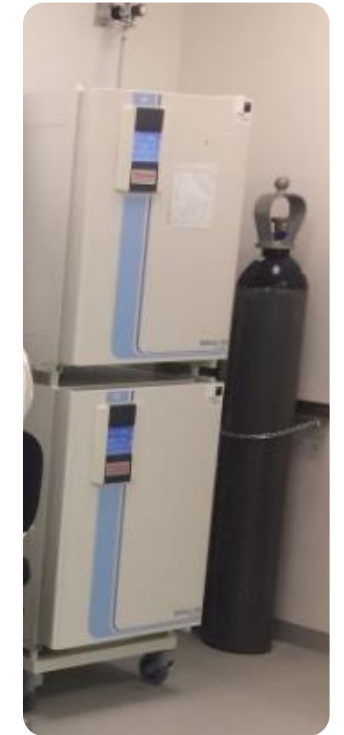
CO<sub>2</sub> inkubaator. Madal hapnikutase on IVC  
jaoks vajalik. Sisseehitatud gaasisegisti  
või eelevalt segatud tri-gaas



Külmik



Tsentrifuug sperma  
ettevalmistuseks -  
328 g



CO<sub>2</sub> inkubaatorid

# SP on tähtsad - gaasi kontsentratsioon ja temperatuur



# Labori varustus ja plastik

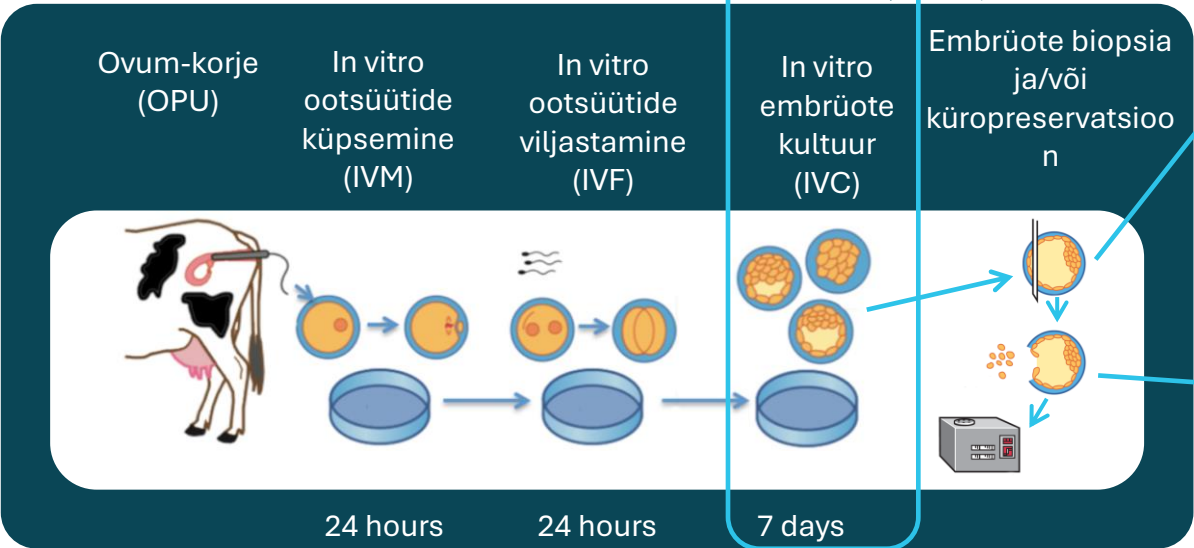
- Külmik
- CO<sub>2</sub> ja madala O<sub>2</sub> inkubaatorid
- Soojendusalus
- Laminaar tõmbekapp
- Plokk-soojendid
- 2, 10, 200, 1000 ul pipetid
- Kumuluse rakkude eemaldamise pipetid
- Ootsüütide/embrüote transpordimahutid
- Külmutamine/vitrifikatsioon
- Sperma ja stereo mikroskoop
- Tsentrifuug

KASUTA AINULT IVF TASEME ÜHEKORDSEID  
PLASTTOOTEID

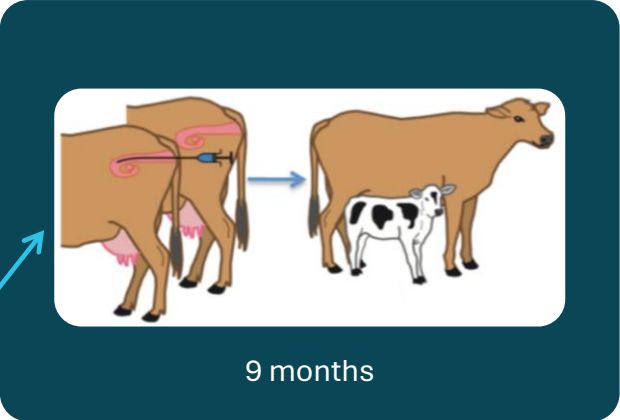


# Küpsemine

## In vitro embrüote tootmine (IVP)



## Embrüote siirdamine

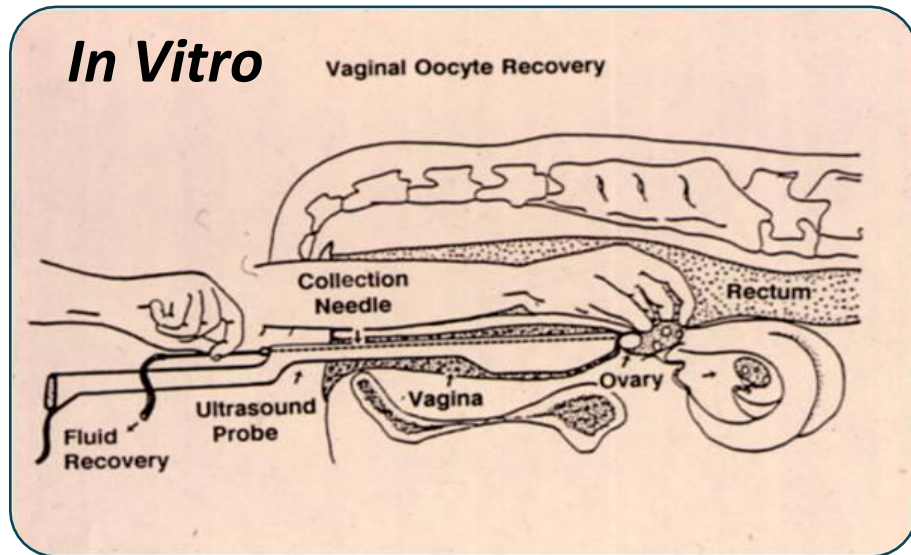


SNP-kiip embrüote geneetiline selektsioon

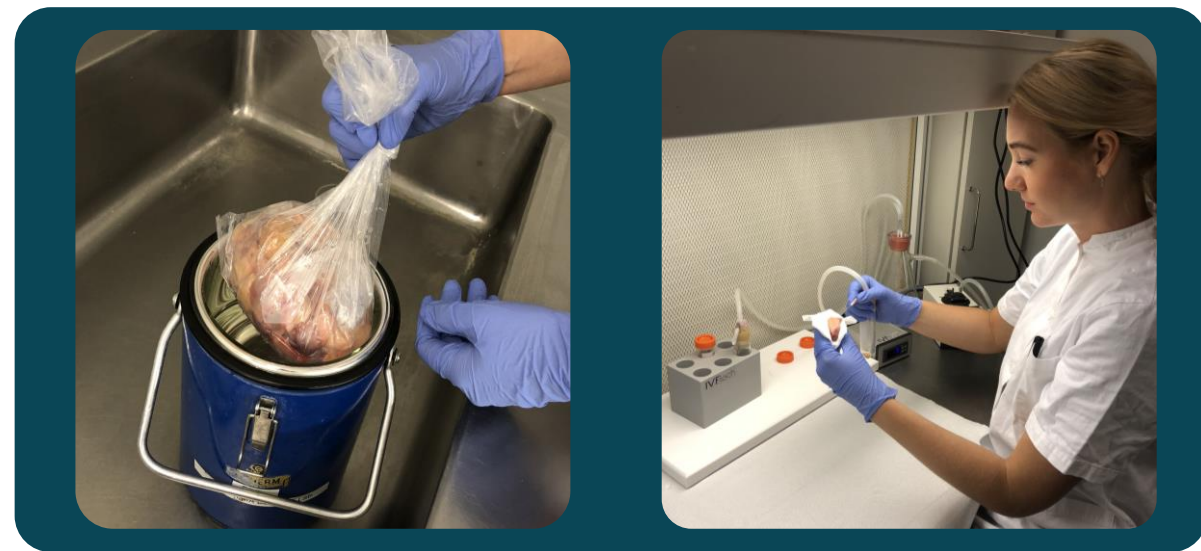


# Ootsüütide aspireerimine IVP

## 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

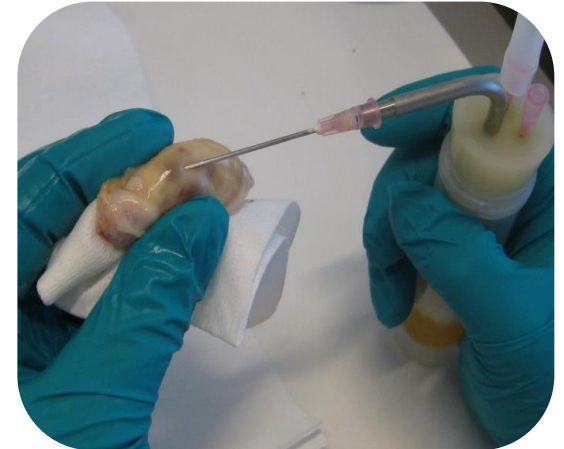
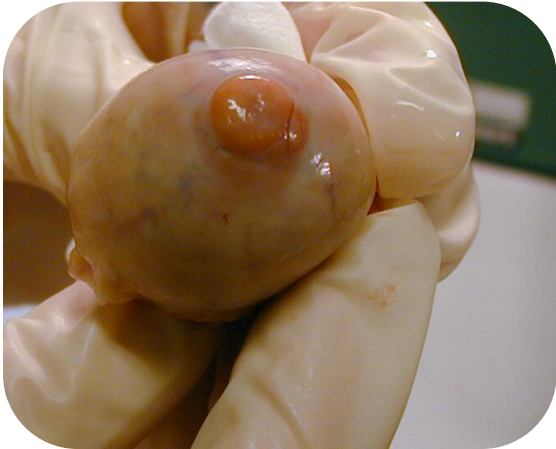


Ideaalis hoitakse temperatuur 30-33 kraadi Celsiust



# Veiste munasarjad tapamajast IVM

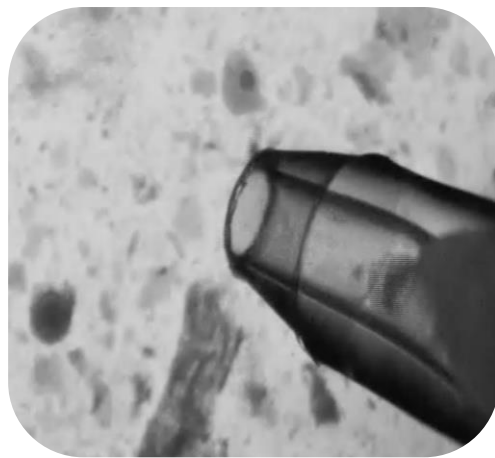
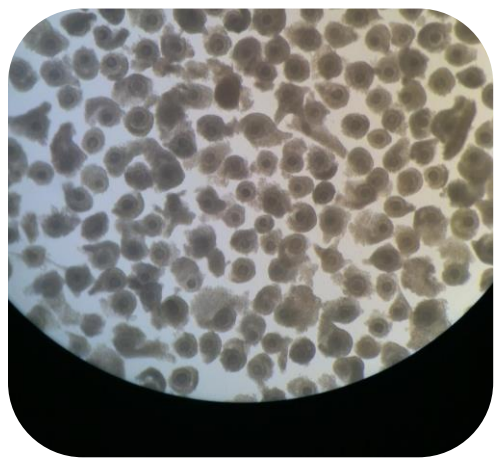
## Päev -1



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

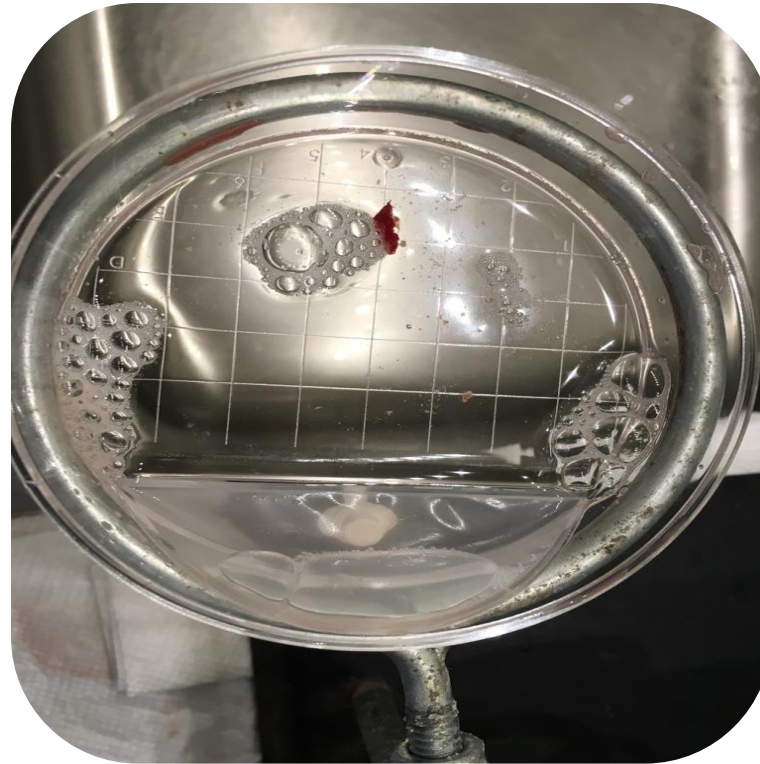
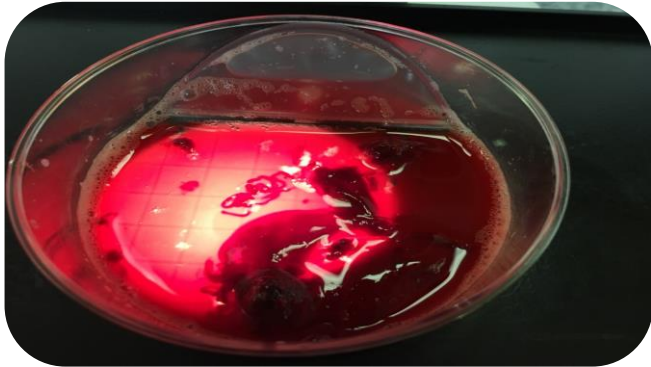
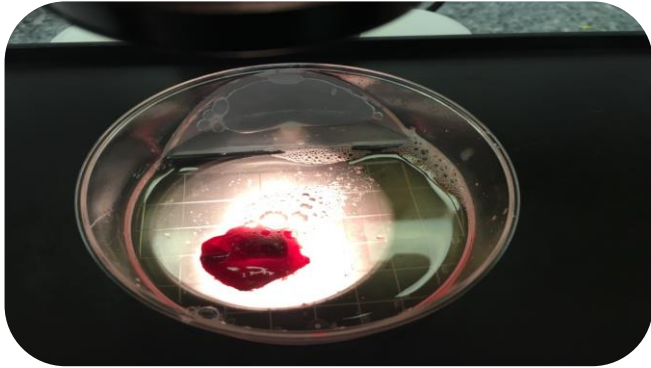
Katsutites sisaldub 150 µl hepariini  
ja mida hoitakse soojas (30-33 °C)  
Aspireeri, ära viiluta

# 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



Välidi vere hüübeid

Mõned hoiavad pumpa pidevalt töös

Mõned jätavad selle aspireerimise ajaks seisma

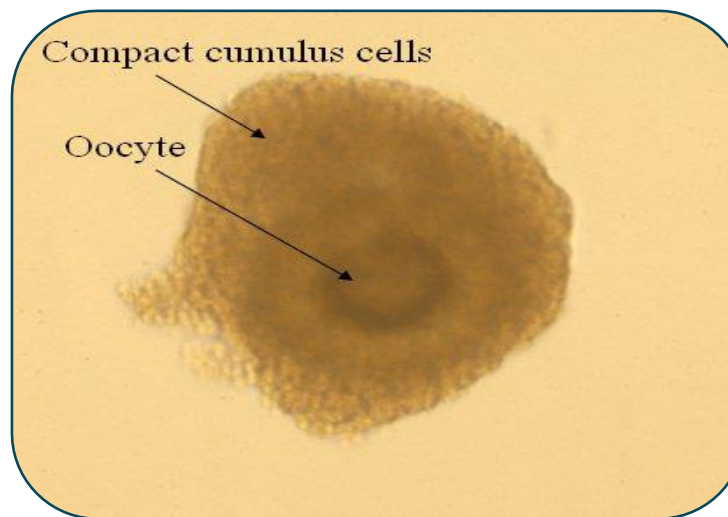
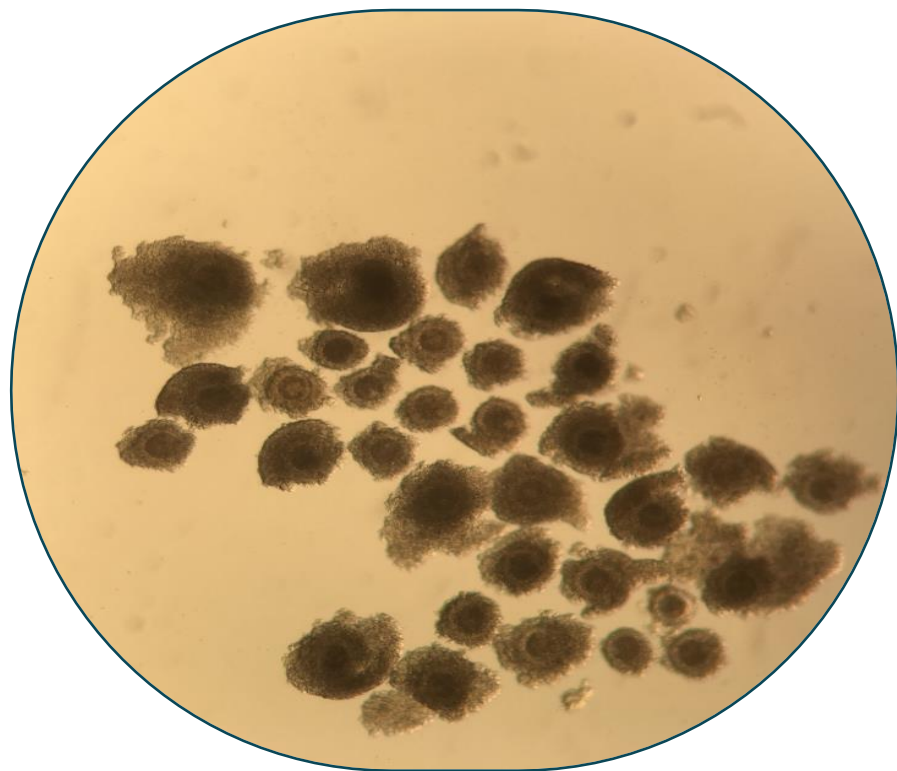
Veendu et filter ei kuivaks ära.

# Ebaküpsed ootsüüdid OPU-st

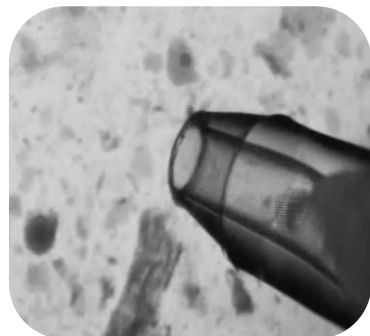


**ÄRGE EEMALDAGE KUMULUSE RAKKE**

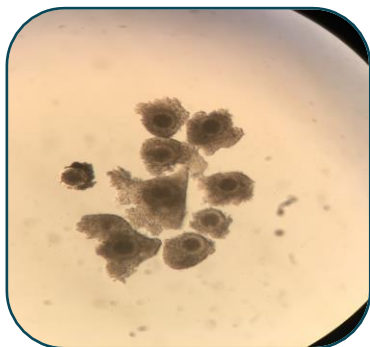
Nad on tähtsad küpsemisel ja viljastamisel



# Ootsüütide otsimine pärast OPU-t



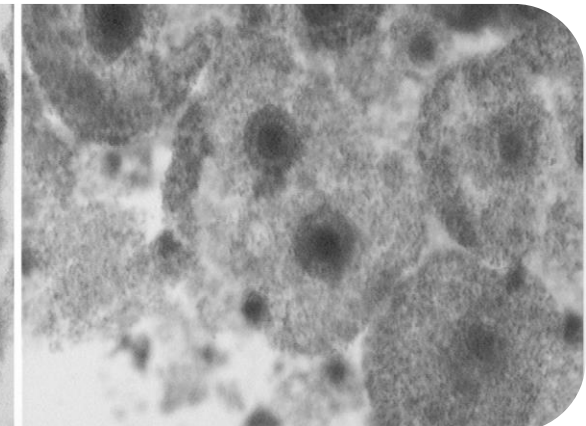
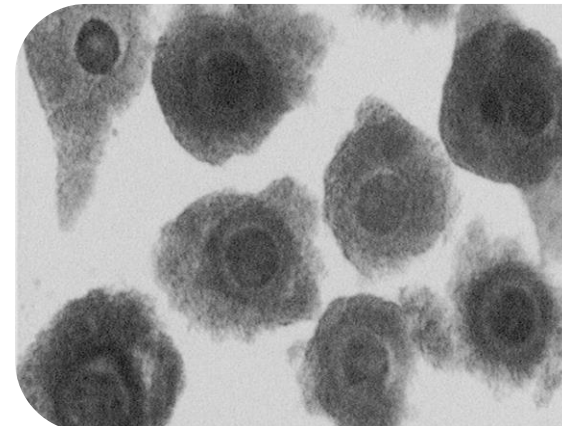
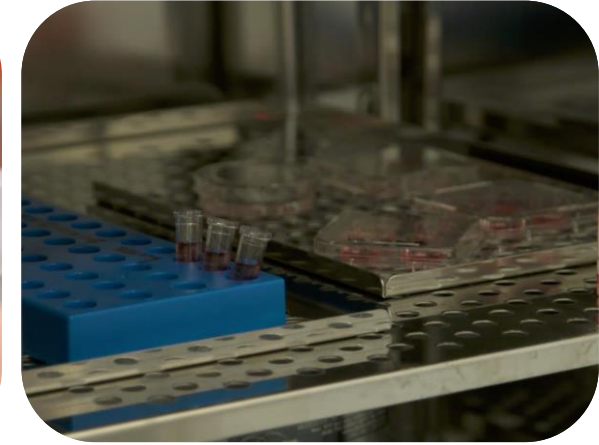
Ootsüütide otsimine, pesu, et kõrvalistest osakekestest lahti saada, loputus  
küpsemislahuses enne küpsemis-viaalidesse panekut



# 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



Veendu et viaalid ei ole embrüotoksilised – hangi nimekiri sellistest, mis on testitud veiste embrüotega



Tea ja kontrolli temperatuuri transpordimahutis !



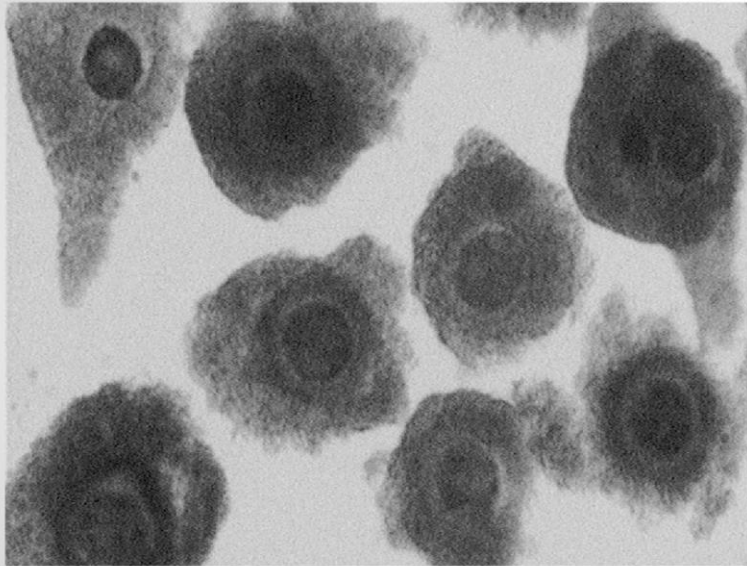
**NB Embrüotoksilised plasti**



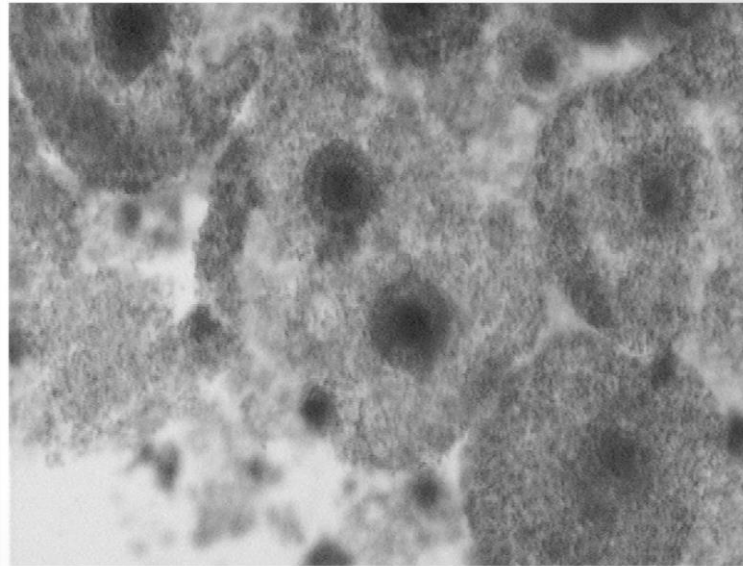
Pea meeles: Kuna keskkond on Hepes-puhverdatud, ei tähenda see, et see ei säilitaks pH-d lõputult, kuna see sisaldab ka bikarbonaati

# 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 pesmiseks tsentrifugeerimise ajal enne in vitro viljastamist

Labori sisustus, seadmed, KK ja SP

Küpsemine (IVM)  
Ootsüütide aspireerimine ja küpsemine

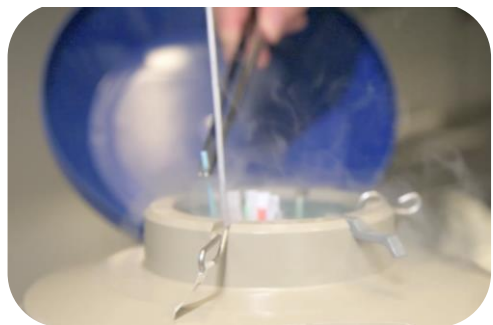
## Sperma ettevalmistus

Viljastamine (IVF)

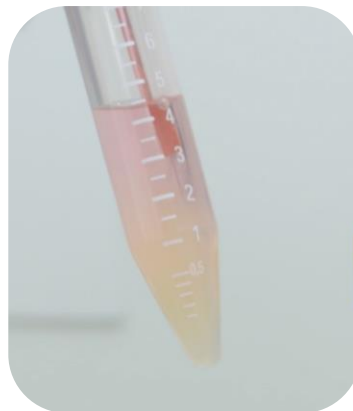
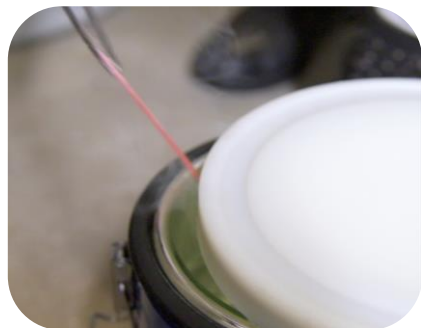
Kumuluse rakkude eemaldamine ja kultuur(IVC)



# Sperma ettevalmistamine



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



Tsentrifuugi 5 minutit 328 x g



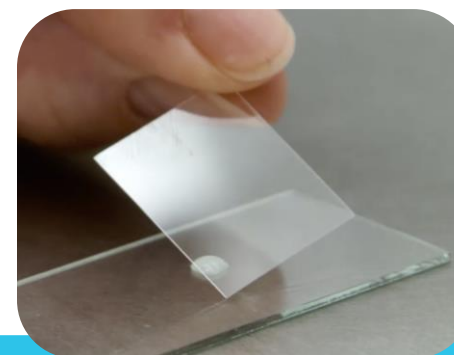
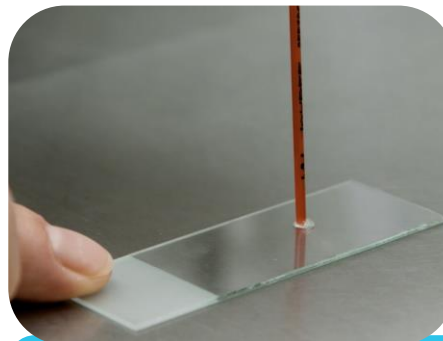
Eemalda supernatant



Lisa värske lahus



Tsentrifuugi uuest 5 minutit

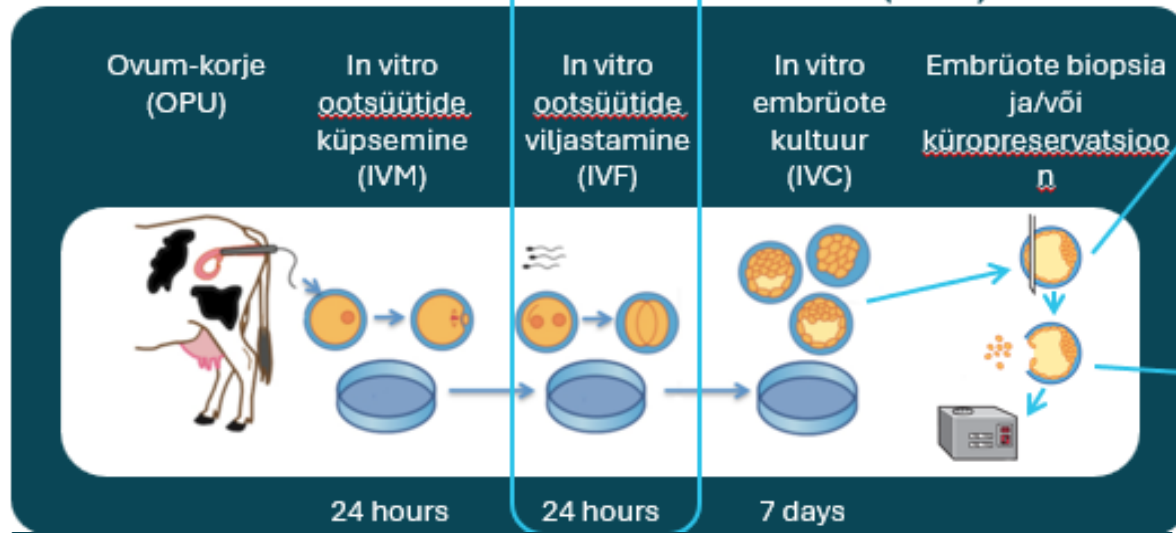


Hinnake liikuvus kohe, samal ajal, kui seemnerakkud on esmakordselt tsentrifugimisel.

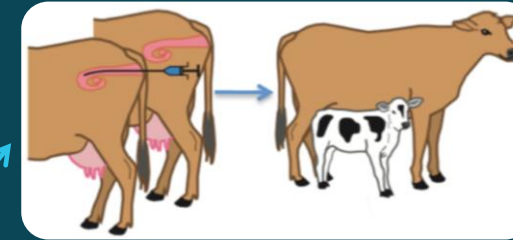


# Viljastamine

## In vitro embrüote tootmine (IVP)



## Embrüote ja tiinuste siirdamine



9 months

## Embrüote SNP-kiip genoom selektsioon



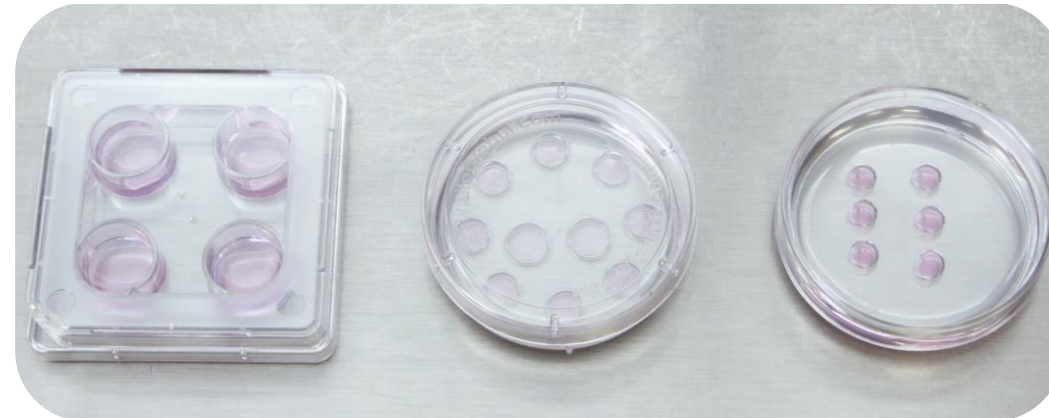
# In Vitro Viljastamine(IVF)

4-auguga  
Petri tass

Ettevalmistatud  
Mikro-tassid

Tilgad asetatud  
35mm Petri tassis

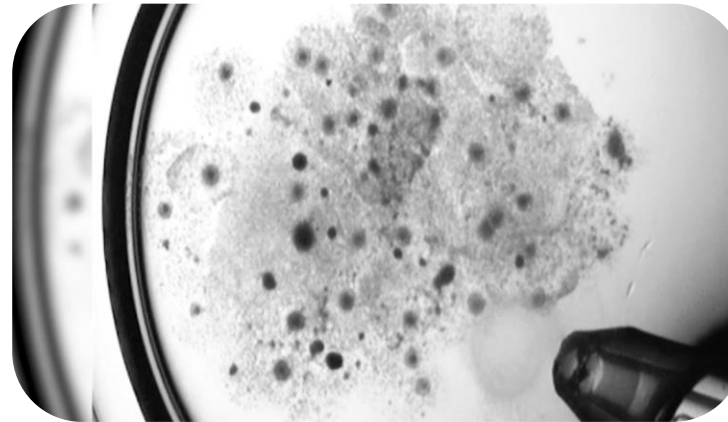
Tilgad  
4-auguga Petri  
tassis



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

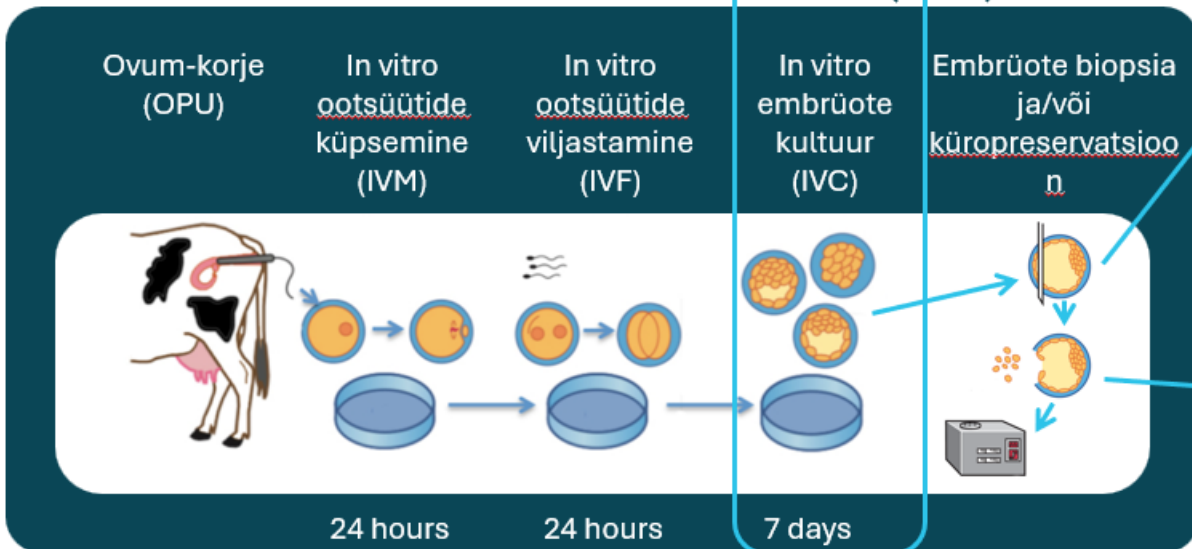


Inkubeeri üleöö 5-6 % CO<sub>2</sub>  
atmosfääriõhus 38.8°C juures

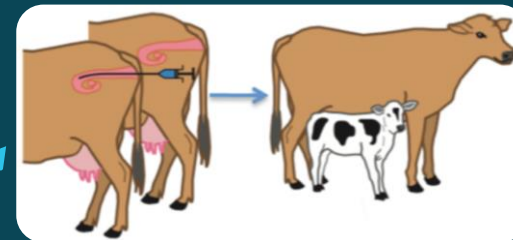
Kui spermide liikuvus oli madal ?

# Kultuur

## In vitro embrüote tootmine (IVP)



## Embrüote ja tiinuste siirdamine



9 months

## Embrüote SNP-kiip genoomseleksioon



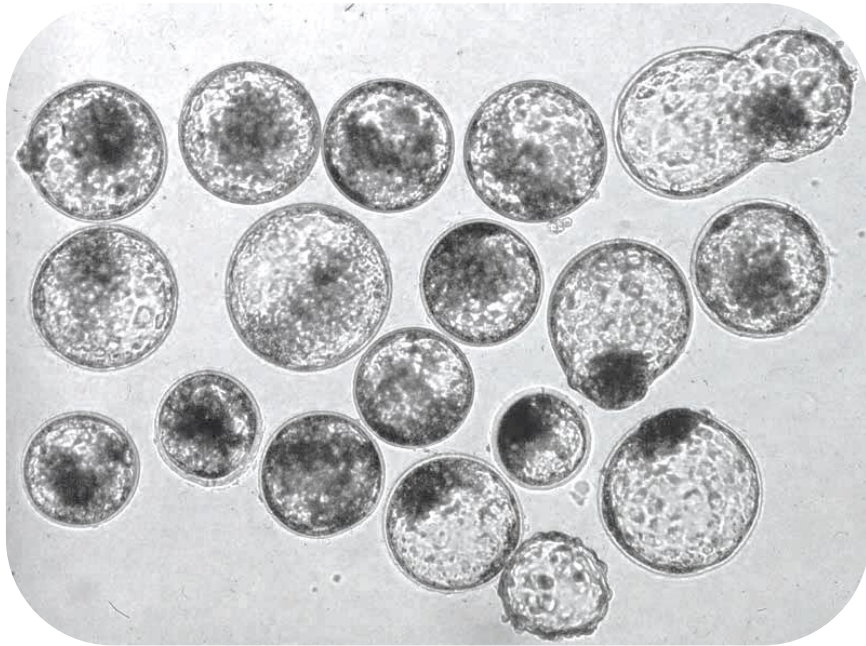
# Inkubatsiooni ja kultuuri tingimused

- 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
  - Ebahütlased 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 muutmine reproduktiivtehnoloogiates:

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

## Tehisaru (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 ressursside 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