

Veise embrüote tootmine Eestis

Ülle Jaakma, Ants Kavak
Eesti Maaülikool



Euroopa Maaelu Arengu
Põllumajandusfond:
Euroopa investeeringud
maapiirkondadesse

Karja hea geneetiline potentsiaal

- ...ühendatult optimaalse söötmise ja pidamisega on aluseks piima- ja lihatootmise kasumlikkusele
- Järglase geneetilise potentsiaali määravad emalt ja isalt päritud geenid
- Mida suurem võimalus on järglastele ema ja isa valida ning võimalus järelkasvu hulgas valikut teha, seda kiirem on geneetiline progress



By Uberprutser - Own work, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=26446231>

Veiste sigimistehnoloogiad

```
graph TD; A[Veiste sigimistehnoloogiad] --> B[Praktikas rakendatud, efektiivsed tehnoloogiad]; A --> C[Arendusjärgus tehnoloogiad]; B --- D[Suhteliselt stabiilne turg, kasvutendents]; C --- E[Tuleviku võtmeks on tehnoloogiate efektiivsuse tõstmine]; E --- F[Genoomaretuse võidukäik; transgeense tehnoloogia võimalused haigusmudelite ja terapeutiliste proteiinide tootmisel ning spetsiifiliste karjade loomisel];
```

Praktikas rakendatud, efektiivsed tehnoloogiad

- Kunstlik seemendus
- Spermide sooselektsioon
- Embrüote *in vivo* tootmine
- Embrüote *in vitro* tootmine
- Embrüote geneetiline testimine
- Munasarjatalitluse/innatsükli regulatsioon

Suhteliselt stabiilne turg, kasvutendents

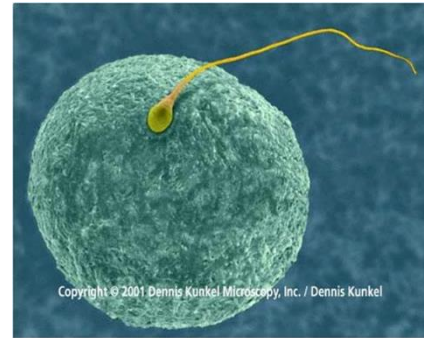
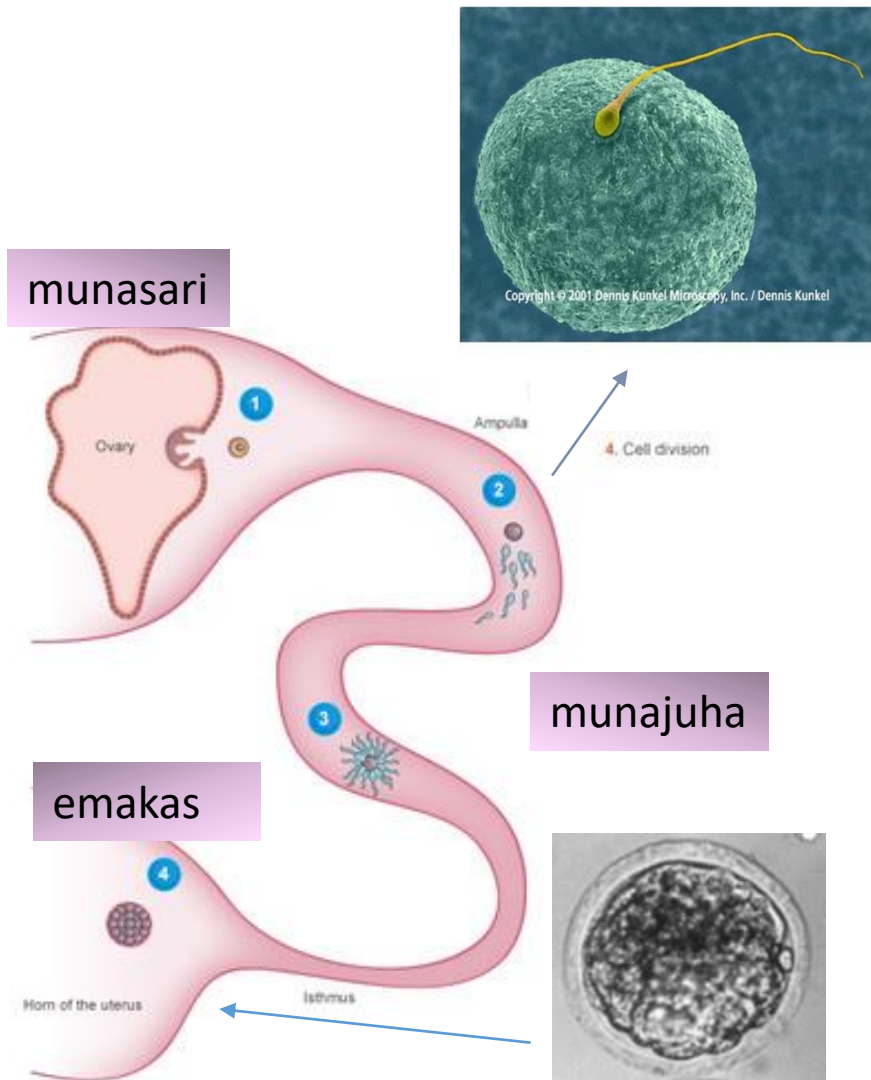
Arendusjärgus tehnoloogiad

- Kloonimine
- Geneetiline modifitseerimine

Tuleviku võtmeks on tehnoloogiate efektiivsuse tõstmine

Genoomaretuse võidukäik; transgeense tehnoloogia võimalused haigusmudelite ja terapeutiliste proteiinide tootmisel ning spetsiifiliste karjade loomisel

Munaraku viljastamine



1. Ovulatsioon – 10-12 tundi pärast inna lõppu.

2. Munaraku liikumine munajuha ampulli ossa, 6 tundi.

3. Viljastumine-
Munarakk on viljastusvõimeline 8-12 t pärast ovulatsiooni. Moodustub sügoot.

4. Rakkude jagunemine. Embrüo liigub piki munajuha ja 4 päeva pärast (8-16 raku arengujärgus) jõuab emakasarve.

5. Kinnitumine emaka seinale 20.–33. päeval pärast seemendust.

Lehma embrüod 7. päeva pärast viljastumist, diameeter 155-200 μm

Embrüote tootmine *in vivo* (emakast väljaloputamise teel)

- esimene embrüovasikas USA-s 1951
- Eestis alustati embrüosiirdamise juurutamist piimakarjakasvatuses 1982, esimene vasikas 1984
- Embrüosiirdamine koosneb järgmistest etappidest:
 - folliikulite kasvu ja ovulatsiooni hormoonidega esilekutsumine embrüodoonoritel
 - retsipientide ja doonorite inna sünkroniseerimine
 - embrüote väljaloputamine doonorlooma emakast,
 - embrüote arengujärgu ja kvaliteedi hindamine,
 - embrüote siirdamine retsipientidele.



Kui stimuleerida munasarja folliikuleid stimuleeriva hormooniga, siis küpseb korraga palju folliikuleid

Mittekirurgiline embrüote väljaloputamine ja siirdamine

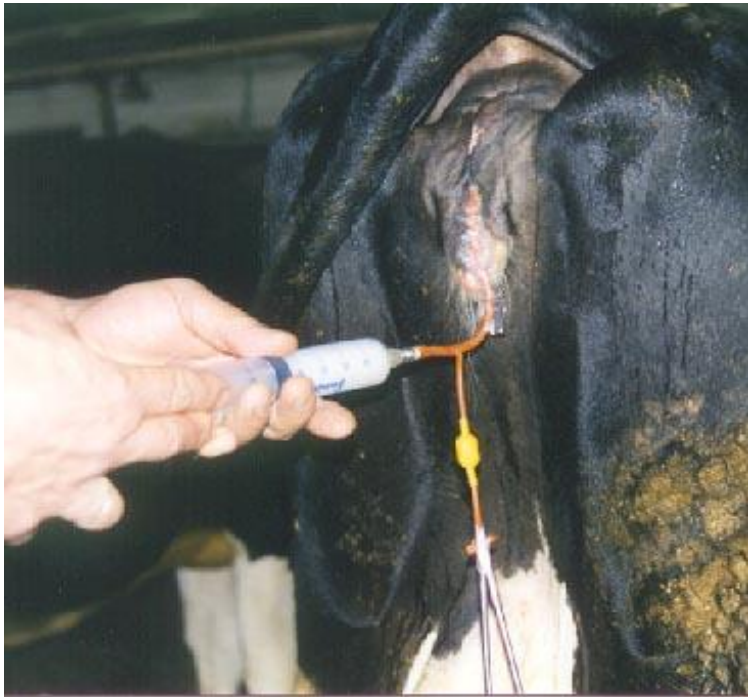
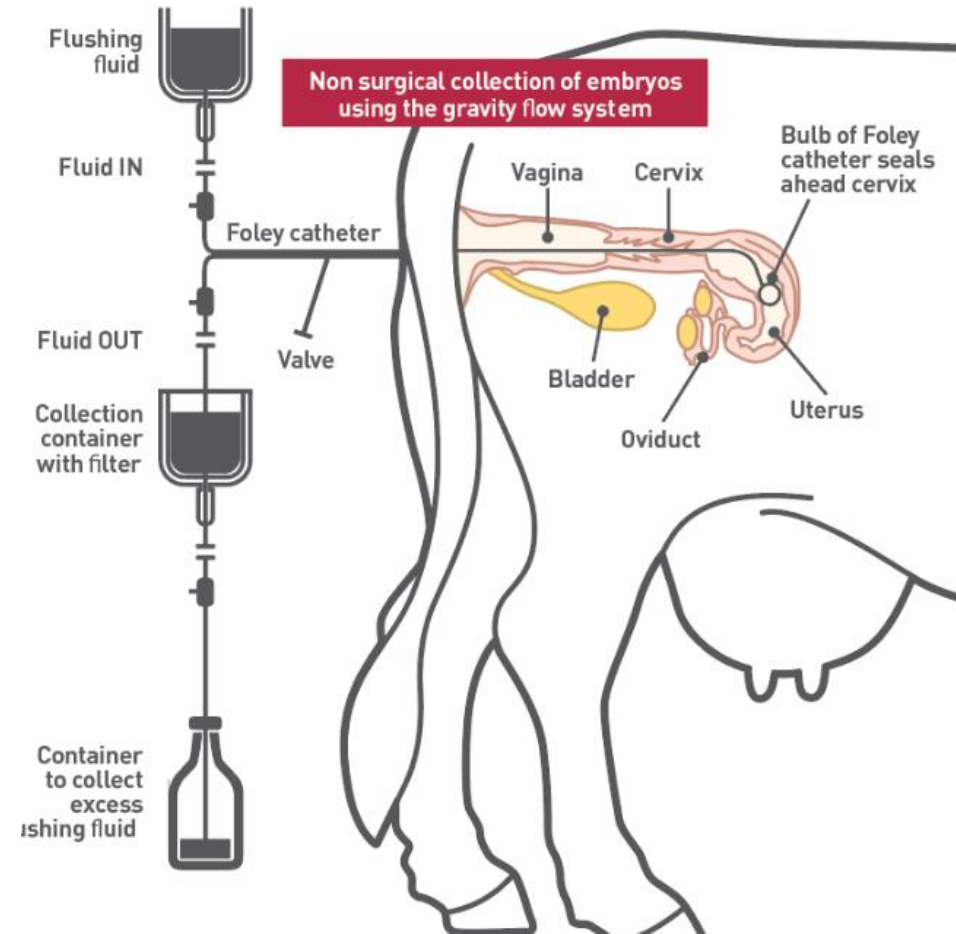


Foto: EMÜ VLBS arhiiv

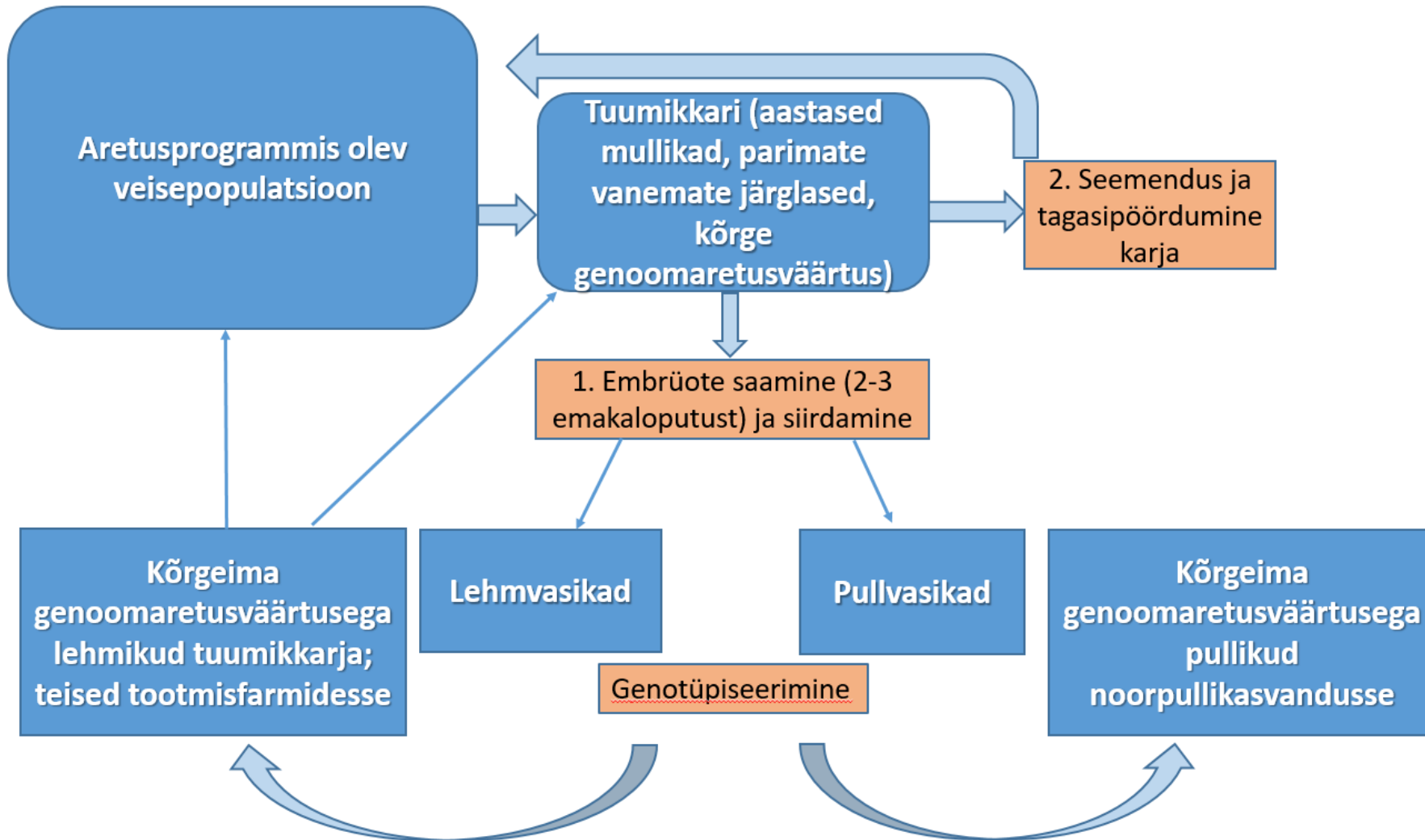


Mida annab *in vivo* embrüote saamine ja siirdamine

- võimalus saada tipplehmadelt rohkem järglasi (3-20 vasikat aastas)
- noorpullide saamine kindlalt vanematepaarilt
- generatsioonidevahelise intervalli lühendamine
- väikesearvuliste loomatõugude säilitamine
- ühelt tõult teisele üleminek
- embrüote eksport ja import



MOET (*multiple ovulation and embryo transfer*) kasutamine aretuses

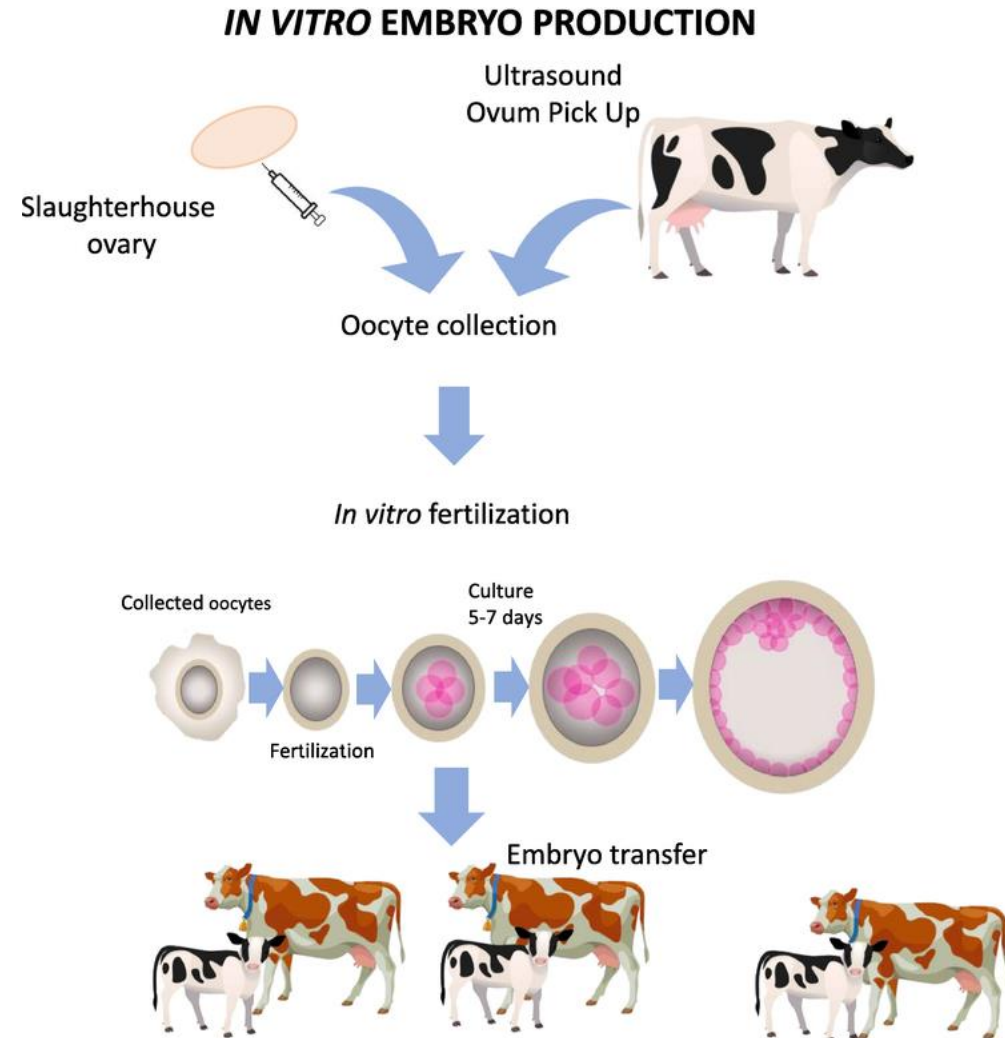


Munaraku *in vitro* (katseklaasis, kehaväline) viljastamine

Kasutusel alates 90´ aastatest

Tehnoloogia koosneb:

- Munarakkude kogumine lehma või mullika munasarjast
- Munarakkude *in vitro* viljastamine
- Embrüote kasvatamine blastostsüsti arengujärguni
- Embrüote siirdamine või külmutamine



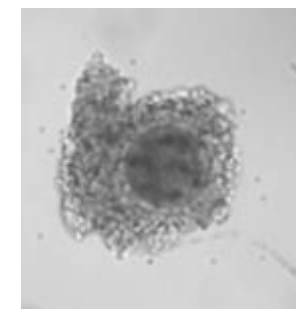
Munarakkude kogumine lehma või mullika munasarjast (*ovum pick-up*, OPU) ja munarakkude *in vitro* küpsemine



OPU



Munarakkude isoleerimine follikulaarvedelikust



Munarakk

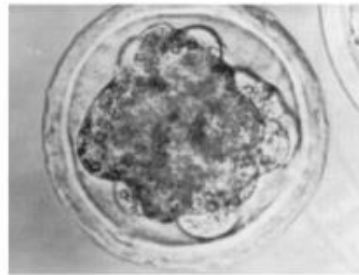
Munarakud küpsevad inkubaatoris 39 °C juures, 5,5 % CO₂ atmosfääris 24 tundi.

Munarakkude viljastamine ja embrüo kasvatamine blastotsüsti arengujärguni

2 rakuline
embrüo



moorula



blastotsüst



viljastatud munarakkude kasvatamine
inkubaatoris siirdamiseks sobiva
arenguastmeni- blastotsüstini (7-8 päeva),
siirdamine või külmutamine



Veise *in vivo* ja *in vitro* toodetud embrüote siirdamine maailmas

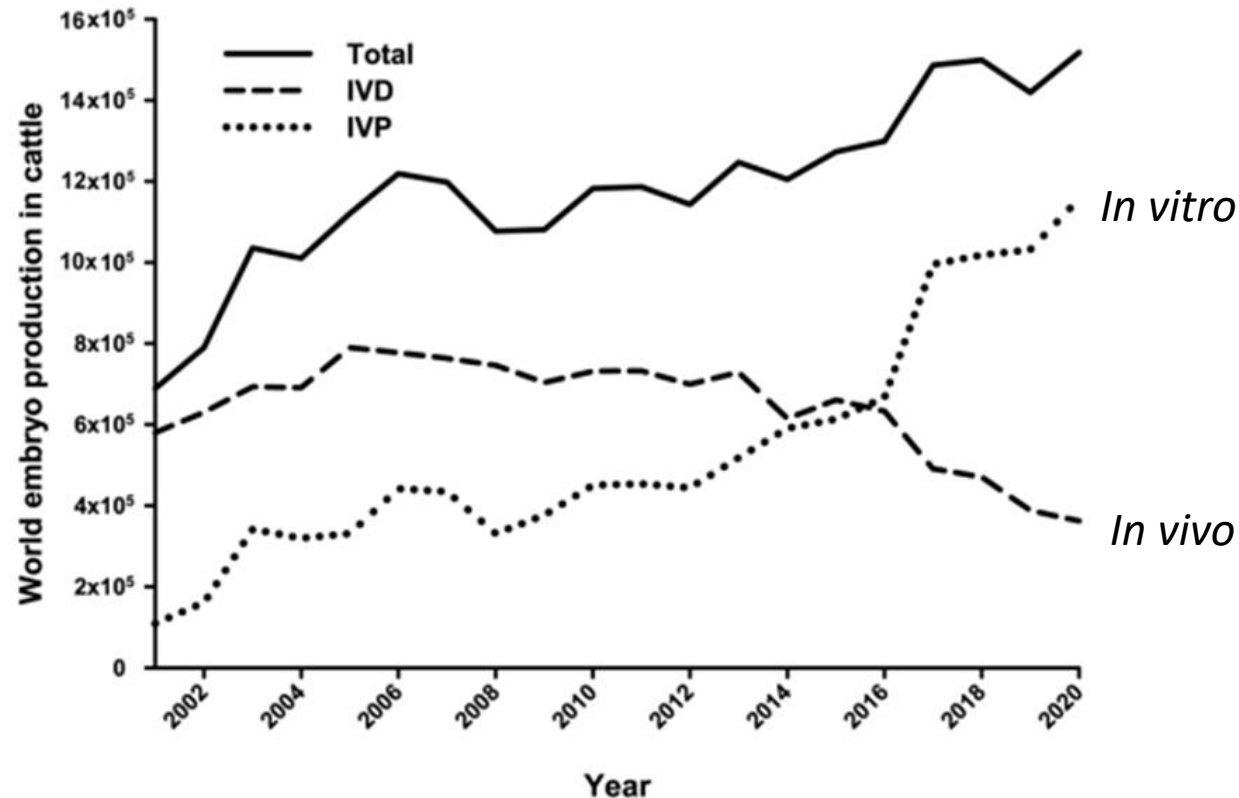


Figure 2. Number of bovine embryos (*in vivo* derived [IVD], *in vitro* produced [IVP], and total) recorded in the period 2001-2020

Embrüote tootmise Top 5 Euroopas 2020

- ***In vivo* embrüod***

- Prantsusmaa 38 000
- Saksamaa 25 000
- Itaalia 18 000
- Holland 12 000
- Venemaa 6000

- ***In vitro* embrüod***

- Holland 13 000
- Saksamaa 7000
- Prantsusmaa 2400
- Soome 1600
- Hispaania 800

<https://www.aete.eu/publications/statistics/>

*numbrid ümardatult

Embrüote *in vivo* ja *in vitro* tootmise võrdlus

***In vitro* embrüote tootmine**

Eelised:

- Munarakke saab võtta tiinetelt loomadelt ja noortelt loomadelt
- Munarakke võib koguda kord nädalas
- Munarakke võib saada ka loomadelt, kes ise ei tiinestu või kes ei sobib *in vivo* embrüote tootmiseks
- Ühe spermakõrrega saab viljastada kümneid munarakke erinevatelt emasloomadelt, sh suguselekteeritud sperma kasutamine
- Saab toota sama emaslooma embrüoid erinevate pullide spermaga
- Ei pea kasutama hormoone, ilma hormoonita ca 2 embrüot/nädal

Puudused:

- Munarakkude kogumiseks vajalik väga hea väljaõpe
- Tiinestumine ca 10% madalam kui *in vivo* embrüote puhul, eriti kui embrüo on olnud külmutatud

***In vivo* embrüote tootmine**

Eelised:

- 5-6 embrüot ühe embrüokogumistsükli kohta
- Võrreldes *in vitro* embrüotega, ca 10% parem tiinestumine
- Heade embrüodonorite korral (kes annavad palju embrüoid) ühe tiinuse maksumus väiksem kui *in vitro* embrüo korral

Puudused:

- Protseduuride vahe on 45-60 päeva
- Seemenduseks kulub mitu doosi spermat
- Kõik loomad ei anna embrüoid
- Kõrgetoodanguliste doonorite embrüod on tihti kehva kvaliteediga
- Tiinetel loomadel ei saa protseduuri teha
- Emakaloputus lükkab edasi lehma enda taastiinestamise aega

Veel embrüosiirdamise eeliseid

- Suvisel kuumal perioodil, kui tiinestumine langeb, annab embrüosiirdamine paremaid tulemusi kui seemendamine. Siiratakse jahedal aastaajal toodetud ja külmutatud embrüoid.
- Väga hea geneetikaga embrüoid on võimalik müüa.
- Suguselekteeritud sperma kasutamine embrüote tootmisel võimaldab kiiresti hea geneetikaga järelkasvu suurendada ning üleliigsed mullikad müüa.
- On võimalik ühelt tõult teisele kiirem üleminek või tõugude vaheliste proportsioonide muutmine.
- On võimalik soovitud tunnuste kiirem parandamine.

Millal embrüosiirdamisest abi ei ole

- Kui embrüosiirdamist tehakse juhuslikult, ilma kindla plaanita, mida selle abil saavutada tahetakse
- Kui karja reproduktiivne tervis on kehv
- Kui karja söötmis- ja pidamistingimused on kehvad
- Kui loomade tervise ja inna jälgimine on puudulik

Embrüote tootmise ühendamine genoomaretusega

Embrüo biopsia (rakuproov)

Genotüpeerimine

Embrüo valik sugupoole ja genoomaretusväärtuse alusel

- Kui ka emas- ja isaslooma genoomaretusväärtused on teada, siis on embrüo aretusväärtuse määramine veel täpsem
- Sigimistehnoloogiate abil toodetakse palju geenikombinatsioone, mille hulgast valida parimad, selektsiooni intensiivsus kasvab



Geenikiipide abil määratakse lisaks jõudluse-, sigivuse-, välimiku jt tunnustele ka pärilike haiguste või haigustele vastuvõtlikkuse markerid. Eraldi kiibid piima- ja lihaveistele (embrüotele)

Embrüosiirdamine Eestis

- Algusperiood
 - Esimene ET vasikas 1984, ELVI
 - 80´ aastad - 500 -1000 siirdamist aastas, kõik tasuta
 - Esimene IVF vasikas 1994, ELVI
- 90´ keskpaigast alates järgneval 20 aastal embrüosiirdamised seotud eeskätt teadusprojektidega, kohapeal teenuse tellimine vähene, embrüote import
 - 2003 embrüokogumisrühm J Kurõkini juhtimisel
 - Uurimistöös rõhk sperma viljastusvõimel
 - Esimene kloonvasikas ja transgeenne vasikas
- 2015 a alates
 - *In vitro* embrüote tootmise katsed
 - Esimesed OPU vasikad, 2017-2018
 - Teenuse tellimuste elavnemine
 - 2021 embrüokogumisrühma tegevusloa uuendamine, juhtiv loomaarst Ants Kavak



OTSUS

Tegevusloa muutmine

10.03.2021 1.2-17/112

Loomatauditõrje seaduse (edaspidi LTS) § 19² lg 1, maaeluministri 18. augusti 2020. aasta määruse nr 57 „Põllumajandus- ja Toiduameti põhimäärus“ § 9 lg 2 ja PTA peadirektori 06. jaanuari 2021. a käskkirja nr 1.1-2/6 alusel ning tulenevalt Eesti Maaülikooli (edaspidi EMÜ) poolt 19.02.2021 esitatud taotlusest EMÜ veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudi tõuaretuse ja biotehnoloogia õppetooli embrüokogumisrühma tegevusloa muutmiseks (registreeritud Põllumajandus- ja Toiduameti dokumendihaldussüsteemis 19.02.2021 nr 5-1/1869),

Otsustan:

1. Väljastada Eesti Maaülikooli veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudi tõuaretuse ja biotehnoloogia õppetooli embrüokogumis ja -tootmisrühmale tegevusluba nr EE12/1.

Tegevusluba antakse välja järgmistes käitlemisvaldkondades:

- 1) veise *in vivo* saadud embrüote kogumine, töötlemine, säilitamine ja vedu;
- 2) hobuse *in vivo* saadud embrüote kogumine, töötlemine, säilitamine ja vedu;
- 3) veise ootsüütide kogumine, töötlemine, säilitamine ja vedu ning embrüote *in vitro* tootmise, säilitamine ja vedu;
- 4) hobuse ootsüütide kogumine, töötlemine, säilitamine ja vedu ning embrüote *in vitro* tootmise, säilitamine ja vedu.

2. Tunnistada kehtetuks Veterinaar- ja Toiduameti Tartumaa veterinaarkeskuse juhataja 15.09.2003 käskkiri nr 2-2/6.

Embrüosiirdamine, EMÜ

Näitaja	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Toodetud <i>in vivo</i>						30	32	116
Siiratud <i>in vivo</i>	31		12					9
Toodetud OPU					78		13	
Siiratud OPU					17			
Toodetud tapamaja munasarjadest						283	283	

VIVET projekt 2016-2019

- OPU ja IVF tehnoloogia erinevate aspektide testimine farmitingimustes
- 1044 munarakku, 357 blastotsüsti, 133 siirdamist, 21 tiinust
- Kitsaskohad
 - folliikulipunktsiooni efektiivsus ja munarakkude saagis
 - munarakkude kvaliteet
 - tiinestumine
- Edasiarendus
 - Doonorite valik
 - OPU ja IVF infrastruktuur – kuidas tagada tingimused?
 - Täiuslikumad kasvulahused
 - IVF embrüotele sobiv külmutussüsteem