

Сравнительное исследование результативности лапаротомического и лапароскопического методов трансплантации клонированных эмбрионов у овец*

В. А. ЛУКАНИНА¹, Р. Ю. ЧИНАРОВ¹, С. В. ПОЗЯБИН², Н. И. ШУМАКОВ², О. В. ЧЕРКАСОВА², Г. Н. СИНГИНА¹

¹ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, п. Дубровицы, 60, г.о. Подольск, Московская обл., 142132, Российская Федерация

² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина, ул. Академика Скрябина, 23, Москва, 109472, Российская Федерация

Резюме. Пересадка ядер соматических клеток (SCNT) рассматривается сегодня в качестве наиболее результативного метода создания генетически отредактированных сельскохозяйственных животных. Однако эффективность получения клонированного потомства остается относительно низкой. В ряде исследований на мелком рогатом скоте, включая овец, было показано, что использование лапароскопии, по сравнению с традиционным методом пересадки эмбрионов посредством лапаротомии, сопряжено с меньшим травматизмом и позволяет повысить суяжность реципиентов. В отношении клонированных эмбрионов таких исследований ранее не проводили. Цель исследования – сравнение лапаротомического и лапароскопического методов пересадки клонированных эмбрионов у овец. Работу проводили на овцах романовской породы (n = 12 и 13 соответственно). Предварительно оценивали результативность используемого протокола ультразвукового исследования (УЗИ) для определения суяжности у овец на различных сроках гестационного периода. Трансплантацию 2-х дневных клонированных эмбрионов осуществляли на 2-й день после выявления охоты. Диагностику суяжности после пересадки эмбрионов проводили с использованием УЗИ на 35–41-й дни после пересадки. Точность положительного прогноза (подтверждения суяжности) на всех сроках проведения УЗИ-диагностики по применяемому протоколу на 28...29-й, 35...36-й, 42...43-й, 56...58-й, 71-й, 85-й и 98-й дни составила 100 %. Использование лапароскопического метода для пересадки клонированных эмбрионов не было сопряжено со смертностью во время операции, в то время как при хирургической пересадке она составила 8,3 %. Использование лапароскопического метода позволило сократить продолжительность операционной процедуры в 2,9 раза в среднем с 44,1±13,3 до 15,4±4,3 мин. (p<0,01). Процент суяжности, достигнутый при использовании лапароскопического метода, был сопоставим с результатами использования хирургической пересадки клонированных эмбрионов и составил 30,8±12,8 % против 36,4±14,5 %. В целом использование лапароскопического метода для пересадки клонированных эмбрионов овец характеризуется более низкой травматичностью, существенным сокращением периода проведения операционной процедуры без потери результативности.

Ключевые слова: пересадка эмбрионов, романовская порода овец, хирургия, лапароскопия, биотехнология, ветеринария

Сведения об авторах: В. А. Луканина, младший научный сотрудник, аспирант (e-mail: kristybatle@gmail.com); Р. Ю. Чинаров, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник; С. В. Позыбин, доктор ветеринарных наук, профессор; Н. И. Шумаков, кандидат ветеринарных наук, доцент; О. В. Черкасова, кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель; Г. Н. Сингина, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Для цитирования: Сравнительное исследование результативности лапаротомического и лапароскопического методов трансплантации клонированных эмбрионов у овец / В. А. Луканина, Р. Ю. Чинаров, С. В. Позыбин и др. // Достижения науки и техники АПК. 2023. Т. 37. №3. С. 39–43. doi: 10.53859/02352451_2023_37_3_39.

*исследования выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по теме 0445-2021-0004.

Comparative study of the efficiency of laparotomic and laparoscopic methods of transplantation of cloned embryos in sheep

V. A. Lukanina¹, R. Y. Chinarov¹, S. V. Pozyabin², N. I. Shumakov², O. V. Cherkasova², G. N. Singina¹

¹ L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, p. Dubrovitsy, 60, g.o. Podol'sk, Moskovskaya obl., 142132, Russian Federation

² Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named after K.I. Skryabin, ul. Akademika Skryabina, 23, Moskva, 109472, Russian Federation

Abstract. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) is considered today as the most effective method of creating farm animals by genome editing. However, despite the significant progress made in the development of SCNT technology, the efficiency of producing cloned offspring remains relatively low. In a number of studies on small ruminants, including sheep, it has been shown that the use of laparoscopy, compared with the traditional method of embryo transfer using laparotomy, is associated with fewer injuries and allows for an increase in the pregnancy rate. No studies have been conducted on cloned embryos to date. The aim of our work was a comparative study of surgical and laparoscopic methods of transfer of cloned embryos in sheep. The studies were carried out on Romanov sheep (n = 12 and 13, respectively). The efficiency of the ultrasound protocol used to determine pregnancy in sheep at various stages of the gestational period was preliminarily evaluated. The 2 days cloned embryos were transferred to the synchronized recipients on the 2nd day after the estrus was detected. Ultrasound studies were carried out at 35–41 days after embryo transfer to detect the pregnancy. It has been shown that ultrasound studies according to the protocol used is a reliable method of pregnancy detection in sheep. The positive predictive value (confirmation of pregnancy) at the all stages of ultrasound studies at the 28–29, 35–36, 42–43, 56–58, 71, 85, and 98 days was 100 %. The use of the laparoscopic method for transferring cloned embryos was not associated with mortality during surgery, while with embryo transfer through laparotomy, mortality was 8.3 %. It was found that the use of the laparoscopic method allowed for a 2.9-fold average decrease in the duration of the surgical procedure from 44.1±13.3 to 15.4±4.3 minutes. The pregnancy rate achieved using the laparoscopic method was comparable with the results obtained using surgical transfer of cloned embryos and amounted to 30.8±12.8 versus 36.4±14.5 %. Thus, the use of the laparoscopic method for transfer of cloned sheep embryos is characterized by a lower injury rate and a significant reduction in the duration of the surgical procedure without a significant loss of efficiency.

Keywords: embryo transplantation, Romanov sheep breed, surgery, laparoscopy, biotechnology, veterinary medicine

Author Details: V. A. Lukanina, junior research fellow, post graduate student (e-mail: kristybatle@gmail.com); R. Y. Chinarov, Cand. Sc. (Vet.), senior research fellow; S. V. Pozyabin, D. Sc. (Vet.), prof.; N. I. Shumakov, Cand. Sc. (Vet.), assoc. prof.; O. V. Cherkasova, Cand. Sc. (Vet.), senior lecturer; G. N. Singina, Cand. Sc. (Biol.), leading research fellow

For citation: Lukanina VA, Chinarov RY, Pozyabin SV, et al. [Comparative study of the efficiency of laparotomic and laparoscopic methods of transplantation of cloned embryos in sheep]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2023;37(3):39–43. Russian. doi: 10.53859/02352451_2023_37_3_39.

Вспомогательные репродуктивные технологии играют все большую роль как в ускорении селекционного процесса существующих племенных ресурсов, так и в создании новых селекционных форм [1, 2]. С развитием технологий геномного редактирования (GE), основанных на использовании CRISPR/Cas9, стало возможным эффективное введение направленных генетических изменений в геном сельскохозяйственных животных разных видов, включая овец [3]. О перспективах практического использования таких технологий свидетельствует тот факт, что ряд ведущих племенных компаний в различных странах мира реализуют проекты, направленные на их развитие [4]. Существует два основных метода внесения генетических изменений в эмбрионы сельскохозяйственных животных: микроинъекция в цитоплазму (CI) зигот и пересадка ядер соматических клеток (SCNT), в геном которых были предварительно внесены заданные генетические изменения [5, 6, 7]. Метод CI технически более прост, однако результативность получения GE-потомства нестабильна и в различных экспериментах может варьировать от 5,7 до 83,3 % [8]. При пересадке ядер GE-клеток все полученное потомство будет нести заданные генетические изменения. Однако технологически получение клонированных эмбрионов более сложный процесс. Хотя на сегодняшний день уже успешно клонированы различные виды сельскохозяйственных животных, включая овец, степень развития клонированных эмбрионов до получения потомства остается относительно невысокой [9, 10, 11]. Причины такой низкой результативности, с одной стороны, связаны с пониженной способностью клонированных эмбрионов к дальнейшему эмбриональному развитию, с другой стороны, с неспособностью репродуктивных органов самок-доноров обеспечить необходимые условия для развития клонированных эмбрионов.

На сегодняшний день для пересадки эмбрионов у мелкого рогатого скота, включая овец, используют, главным образом, хирургический метод посредством лапаротомии. Пересадку клонированных эмбрионов мелкого рогатого скота, включая овец, до сих пор осуществляли только с использованием лапаротомии. Так, Ashtiani S.K. et al. [9] для получения клонированных эмбрионов овец в качестве кариопластов использовали фибробласты, выделенные из уха взрослых животных, в качестве цитопластов – знуклеированные ооциты, полученные *in vitro*. Использовали два различных протокола клонирования: 1 – пересадка клеток под зону пеллюциды с трансплантацией эмбрионов на ранних стадиях развития ($n = 80$) в яйцеводы реципиентов ($n = 15$); 2 – интрацитоплазматическая инъекция кариопластов с культивированием и пересадкой 8-и дневных эмбрионов ($n = 28$) в рога матки реципиентов ($n = 17$). Пересадку проводили при наличии хотя бы одного желтого тела. Доля суягных ярок по результатам УЗИ диагностики при использовании двух указанных протоколов составила соответственно 13,3 и 11,8 %, из которых 6,7 и 5,9 % принесли потомство. Доля потомков от числа пересаженных клонированных эмбрионов составила соответственно 1,25 % (мертвоорожденный) и 3,57 %. Доля суягных ярок после пересадки клонированных эмбрионов, полученных с использованием генетически модифицированных соматических клеток, составляла 40,0 % [11] и 46,5 % [12].

Однако использование метода лапаротомии сопряжено с образованием спаек в репродуктивном тракте после повторного хирургического вмешательства и требует относительно длительных интервалов перед повторным использованием самок-реципиентов [13]. В качестве

альтернативы, лишенной таких недостатков, был предложен метод лапароскопической пересадки эмбрионов, который успешно применен на мелком рогатом скоте, включая овец [14, 15] и коз [16]. Кроме того, использование эндохирургического метода пересадки эмбрионов не требует использования общей анестезии, характеризуется меньшей, по сравнению с лапаротомическим, инвазивностью, существенно меньшей продолжительностью операционной процедуры. Был показан более высокий процент беременности коз после пересадки эмбрионов с использованием эндохирургического метода, по сравнению с лапаротомическим, оцененный по результатам УЗИ-диагностики на 30-й день после пересадки: 46,1 % против 28,6 % ($p < 0,05$) [16].

Цель исследования – сравнение результативности лапароскопического и лапаротомического методов пересадки эмбрионов, полученных методом пересадки ядер соматических клеток, у овец.

Условия, материалы и методы. Исследования проводили на половозрелых ярках романовской породы в период с сентября 2021 г. по декабрь 2022 г. Животных содержали под навесами группами по 10...15 голов. В зимний период овцы получали сено-концентратный рацион в соответствии с нормами потребностей, летом их содержали на пастбище и дополнительно давали концентраты согласно нормам потребностей. Животные имели неограниченный доступ к питьевой воде и соли. Синхронизацию полового цикла ярок выполняли с использованием двух различных схем, как описано ранее [17]. Выявление охоты проводили с использованием вазоэктомированного барана пробника.

На первом этапе выполнения исследований проводили оценку результативности используемого протокола УЗИ-диагностики в группе овец с известным сроком суягности ($n = 20$). Искусственное осеменение осуществляли свежеполученным семенем по общепринятой методике. Исследования суягности выполняли с использованием портативного УЗИ-сканера Draminski 4Vet Slim (Draminski, Польша) с конвексным датчиком с центральной частотой 2-8 МГц (тип R50) на 28...29-й (УЗИ1), 35...36-й (УЗИ2), 42...43-й (УЗИ3), 56...58-й (УЗИ4), 71-й (УЗИ5), 85-й (УЗИ6), 98-й (УЗИ7) дни гестационного периода, считая день выявления охоты как день 0. При проведении УЗИ во все временные периоды оценивали статус суягности (да/нет). При выполнении УЗИ1, УЗИ2 и УЗИ3, наряду с определением статуса суягности, оценивали многоплодие (одноплодная беременность / многоплодная беременность). Для определения результативности УЗИ-диагностики суягности использовали показатели чувствительности, специфичности, точности позитивного прогноза, точности негативного прогноза и общей точности (табл. 1). При расчетах использовали подход, предложенный для оценки результатов медицинской УЗИ-диагностики [18], оценку корректной или ложной диагностики проводили на основании сопоставления результатов УЗИ и окотов.

Таблица 1. Критерии оценки результативности УЗИ-диагностики*

Параметр	Формула
Чувствительность	$a / (a + c) \times 100$
Специфичность	$d / (d + b) \times 100$,
Точность позитивного прогноза	$a / (a + b) \times 100$,
Точность негативного прогноза	$d / (c + d) \times 100$
Общая точность	$(a + d) / (a + b + c + d) \times 100$

*а – корректно положительный, b – ложно положительный, c – ложно отрицательный, d – корректно отрицательный.

На втором этапе выполнения исследований проводили сравнение результативности пересадки клонированных эмбрионов овец с использованием двух методов на основе оценки результатов УЗИ-диагностики на 35...41-й дни гестационного периода. Для получения клонированных эмбрионов в качестве доноров ядер использовали эмбриональные фибробласты из гибридного плода, несущего 75 % крови домашней овцы (*Ovis aries*) романовской породы и 25 % крови дикого барана архара (*Ovis ammon*). Процедуру клонирования методом пересадки ядер соматических клеток (SCNT) осуществляли, используя модифицированную методику, разработанную ранее для крупного рогатого скота [19]. Для трансплантации отбирали 2-х дневные клонированные эмбрионы, находящиеся на стадии более 2-х клеток. Пересадку проводили яркам с синхронизированным половым циклом [17], проявившим признаки охоты и при наличии хотя бы одного желтого тела на одном из яичников. Пересадку осуществляли на 2-й день после выявления охоты хирургическим (1-я группа, n = 12) или эндохирургическим методом (2-я группа, n = 13). Ярков, отобранных для трансплантации, подвергали голодной диете за 48 ч и не поили за 12...24 ч до предполагаемой операции.

Пересадку эмбрионов хирургическим методом с помощью лапаротомии выполняли под общей анестезией. Для этого делали линейный вентральный срединный разрез длиной 10...13 см по белой линии, начиная с 2...3 см краниально вымени и двигаясь вперед, избегая повреждения молочных вен. Хирургический стол наклоняли для смещения к диафрагме органов желудочно-кишечного тракта. Обнаруживали рога матки и яичники и осторожно вытягивали их из брюшной полости. Визуализировали яичники и определяли наличие желтых тел, которые имели диаметр не менее 7 мм (рис. 1). При наличии овуляции только на одном из яичников для пересадки использовали рог матки на ипсилатеральной стороне. Эмбрионы предварительно помещали в капилляр длиной 115 мм, соединенный с 1 мл шприцем типа Лuer. Капилляр заполняли следующим образом: среда для переноса эмбрионов – столбик длиной 25...30 мм, воздух – 2...3 мм, среда, содержащая эмбрионы – 30...40 мм, воздух – 2...3 мм, среда – 25...30 мм. Капилляр вводили в кончик рога матки через прокол стенки на глубину не менее 1,5...2 см. Перенос эмбрионов проводили путем выдавливания содержимого капилляра. По завершении процедуры его осторожно извлекали. Брюшную полость орошали 20 мл 0,25 %-ного раствора Фармоксидина («Мосагроген», Россия) или теплым лактированным раствором Рингера или стерильным физиологическим раствором, после чего извлеченные части репродуктивного тракта помещали обратно в

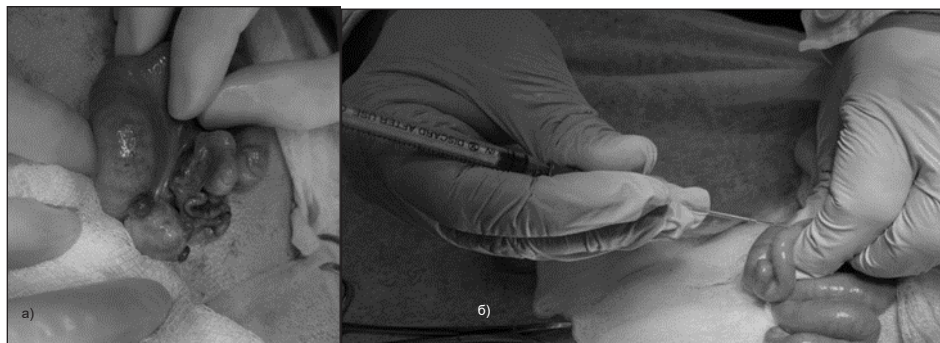


Рис. 1. Этап хирургического метода пересадки эмбрионов у 1,5 годовой ярки романовской породы: а – визуализация желтых тел, б – введение капилляра с эмбрионами в рог матки.

брюшную полость. Разрез брюшной полости зашивали, образуя шов обрабатывали Тетраамицином (Zoetis, Германия) и спреем Аллюниум (Nicovet, Германия). За реципиентами вели наблюдение до нормального возобновления функций. Обработку швов выполняли ежедневно в течение 5 дней.

Проведение пересадки эмбрионов эндохирургическим методом с помощью двухпортовой лапароскопии осуществляли под местной анестезией. Животное фиксировали на операционном столе. Места надрезов для троакаров обрабатывали раствором новокаина и лидокаина. Для уменьшения травматизма внутренних органов делали линейный вентральный разрез брюшной стенки длиной 2...3 см левее или правее срединной линии, подготавливая тем самым место введения троакара. Установив троакар, подключали шланг подачи газа и ожидали нужного наполнения внутренней полости. Затем с противоположной стороны осуществляли установку второго троакара. В троакар вводили эндоскоп и визуализировали матку и яичники, определяли наличие и количество желтых тел диаметром не менее 7 мм (рис. 2). При наличии овуляций

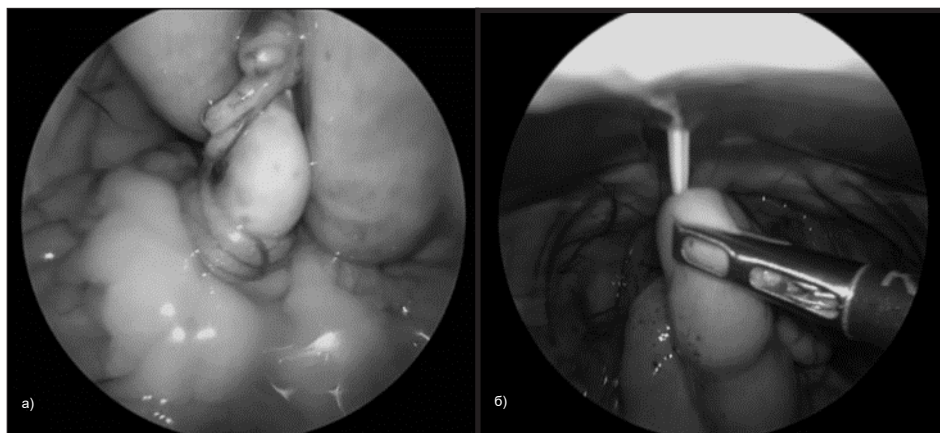


Рис. 2. Этап лапароскопического метода пересадки эмбрионов у 1,5-летней ярки романовской породы: а – визуализация желтых тел эндоскопом, б – введение капилляра с эмбрионами в рог матки.

только на одном из яичников, пересадку эмбрионов выполняли ипсилатерально. Эмбрионы загружали в капилляр, как описано ранее. Капилляр через катетер Tomcat вводили в рог матки по направлению к яйцеводу на глубину не менее 0,5...1 см. По завершении переноса эмбрионов катетер, эндоскоп, щипцы и троакары осторожно извлекали. Область надрезов обрабатывали 5...10 мл раствора Фармоксидина («Мосагроген», Россия). Кожу закрывали не рассасывающимся швом первого размера. Шов обрабатывали Тетраамицином (Zoetis, Германия) и спреем Аллюниум (Nicovet, Германия). За реципиентами вели наблюдение до нормального возобновления функций.

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ

Таблица 2. **Результативность УЗИ-диагностики статуса суягности (да/нет) овец на различных сроках проведения исследований**

Показатель*	Диагностика						
	УЗИ1	УЗИ2	УЗИ3	УЗИ4	УЗИ5	УЗИ6	УЗИ7
Срок суягности, дн.**	28...29	35...36	42...43	56...58	71	85	98
Чувствительность, %	90±6,7	100	95±4,9	95±4,9	100	100	95±4,9
Точность позитивного прогноза, %	100	100	100	100	100	100	100
Общая точность, %	90±6,7	100	95±4,9	95±4,9	100	100	95±4,9

*показатели специфичности и точности негативного прогноза не оценивали, так как корректно отрицательный диагноз отсутствовал (все 20 овец оказались суягными);

**день 0 – день выявления охоты и искусственного осеменения.

данных УЗИ-диагностики по используемому протоколу с фактическими результатами ягнения овец в отношении определения статуса суягности (да/нет) показал высокую результативность метода: чувствительность и общая точность метода варьировала от 90 до 100 %. Максимальные величины этих показателей были наблюдали на 35...36-й, 71-й и 85-й дни гестационного периода. Точность позитивного прогноза во все периоды проведения исследований составила 100 % (табл. 2).

Отмечена высокая специфичность метода (100 %) и точность позитивного прогноза (100 %) УЗИ-диагностики многоплодия (многоплодная / одноплодная беременность) на всех сроках проведения. Чувствительность метода при этом оказалась относительно низкой. При проведении УЗИ на 28...29-й день корректно были диагностированы 29,4 %, 35...36-й – 63,2 %, 42...43-й – 44,4 % многоплодных беременностей, в то время как соответственно 70,6, 36,8 и 55,6 % фактически многоплодных беременностей были определены как одноплодные. Низкая точность негативного прогноза, при котором фактически многоплодные беременности определяли одноплодными (7,7, 12,5 и 9,1 % при проведении диагностики на 28...29-й, 35...36-й и 42...43-й дни соответственно), обуславливала, в целом, относительно низкую общую точность диагностики многоплодия в эти дни гестационного периода: 33,3, 65,0 и 47,4 % соответственно (табл. 3).

Таблица 3. **Результативность УЗИ-диагностики на многоплодие у овец, имеющих положительный статус суягности, на различных сроках проведения исследований**

Показатель	Диагностика		
	УЗИ1	УЗИ2	УЗИ3
Срок суягности, дн.*	28...29	35...36	42...43
Чувствительность, %	29,4±10,7	63,2±10,8	44,4±11,4
Специфичность, %	100	100	100
Точность позитивного прогноза, %	100	100	100
Точность негативного прогноза, %	7,7±6,3	12,5±7,4	9,1±6,6
Общая точность, %	33,3±11,1	65,0±10,7	47,4±11,5

*день 0 – день выявления охоты и искусственного осеменения.

Из 12 овец, подвергшихся хирургической пересадке эмбрионов, одно животное пало во время операции (смертность – 8,3 %), поэтому в дальнейших расчетах его не учитывали. У всех овец идентифицировали желтые тела, среднее число которых составило 2,2±0,7 с вариациями у отдельных особей от 1 до 4. Продолжительность операции

онной процедуры составила в среднем 44,1±13,3 мин. с варьированием у отдельных животных от 30 до 60 мин. В среднем одному реципиенту было пересажено 14,1±4,2 эмбриона с вариациями от 8 до 21 эмбриона. Результативность хирургической пересадки клонированных эмбрионов, оцененная по результатам УЗИ-диагностики

на 35...41 дни, составила 36,4 % (табл. 4).

Использование лапароскопии позволяло визуализировать желтые тела, число которых в среднем составило 2,2±0,6 с вариациями у отдельных животных от 1 до 3 и было аналогично числу желтых тел, непосредственно визуализируемых при проведении хирургических операций. Эндохирургический метод позволило сократить продолжительность операционной процедуры в среднем до 15,4±4,3 минут. Степень суягности, достигнутая при его использовании, была сопоставима с результатами, полученными при хирургической пересадке клонированных эмбрионов, и составила 30,8±12,8 %.

Таблица 4. **Сравнительная характеристика хирургического и эндохирургического методов пересадки эмбрионов у овец**

Показатель	Хирургический метод*	Лапароскопический метод
Число реципиентов, голов	12	13
Смертность во время операции, n (%)	1 (8,3)	0 (0,0)
Число желтых тел, ед.	2,2±0,7	2,2±0,6
Продолжительность операции, мин.	44,1±13,3	15,4±4,3
Число пересаженных эмбрионов, шт.	14,1±4,2	16,7±4,6
Степень суягности на 35-41-й дни, %	36,4±14,5	30,8±12,8

*при проведении расчетов, животное, павшее вое время операции, не учитывали.

Выводы. Результаты проведенных нами исследований результативности УЗИ-диагностики по применяемому нами протоколу показали высокую эффективность метода в отношении определения статуса суягности (90 – 100 %). Значения показателя точности позитивного прогноза на всех сроках проведения исследований составили 100 %, что позволяет рассматривать УЗИ-диагностику по применяемому нами протоколу, в качестве достоверного критерия выявления суягности при проведении трансплантации эмбрионов овцам – реципиентам. Лапароскопический метод обладает рядом преимуществ для пересадки клонированных эмбрионов у овец, по сравнению с классическими хирургическими, связанными с лапаротомией. Применение лапароскопии позволяет в 2,9 раза сократить продолжительность операционной процедуры, уменьшить объем операционной травмы и не требует применения общего наркоза. При этом ее результативность, оцененная по проценту суягных реципиентов на 35...41 дни, сопоставима с получаемой при хирургическом методе.

Литература

1. Зиновьева Н. А., Позябин С. В., Чинаров Р. Ю. Вспомогательные репродуктивные технологии: история становления и роль в развитии генетических технологий в скотоводстве // *Сельскохозяйственная биология*. 2020. Т. 55. № 2. С. 225–242. doi: 10.15389/agrobiologia.2020.2.225rus.
2. Итоги и перспективы использования биотехнологических методов и приемов в воспроизводстве мелких жвачных / А.-М. М. Айбазов, Т. Мамонтова, Д. Коваленко и др. // *Сельскохозяйственный журнал*. 2021. Т. 14. № 1. С. 58–71. doi: 10.25930/2687-

1254/009.1.14.2021.

3. Van Eenennaam A. L. Application of genome editing in farm animals: cattle // *Transgenic Research*. 2019. Vol. 28. P. 93–100. doi: 10.1007/s11248-019-00141-6.
4. Зиновьева Н. А., Волкова Н. А., Багиров В. А. Геномное редактирование: современное состояние исследований и применение в животноводстве // *Биотехнология*. 2018. Т. 34. № 3. С. 9–22. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-3-9-22.
5. Zinovieva N. A., Volkova N. A., Bagirov V. A. Genome editing: current state of research and application to animal husbandry // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019. Vol. 55. No. 7. P. 711–721. doi: 10.1134/S000368381907007X.
6. Mahdi A. K., Medrano J. F., Ross P. J. Single-step genome editing of small ruminant embryos by electroporation // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23. No. 18. Article 10218. doi: 10.3390/ijms231810218.
7. Genome edited sheep and cattle / C. Proudfoot, D. F. Carlson, R. Huddart, et al. // *Transgenic Res*. 2015. Vol. 24. P. 147–153. doi: 10.1007/s11248-014-9832-x.
8. Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR era / P. Kalds, S. Zhou, B. Cai, et al. // *Frontiers in Genetics*. 2019. Vol. 10. Article 750. doi: 10.3389/fgene.2019.00750.
9. Successful experience in cloning the sheep / S. K. Ashtiani, M. H. Nasr-Esfahani, S. M. Hosseini, et al. // *Yakhteh Medical Journal*. 2008. Vol. 3. No. 10. P. 193–200.
10. Gene knockouts in goats using CRISPR/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer / Z. Fan, M. Yang, M. Regouski, et al. // *Liu C., Du Y. Microinjection. Methods in molecular biology*. New York: Humana Press, 2019. P. 373–390. doi: 10.1007/978-1-4939-8831-0_22.
11. CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMSCs differentiation / Y. Zhang, Y. Wang, B. Yulin, et al. // *J. Cell. Biochem*. 2018. Vol. 120. P. 1794–1806. doi: 10.1002/jcb.27474.
12. A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene / Z. Fan, I. V. Perisse, C. U. Cotton, et al. // *JCI Insight*. 2018. Vol. 3. Article e123529. URL: <https://insight.jci.org/articles/view/123529> (дата обращения: 20.02.2023). doi: 10.1172/jci.insight.123529.
13. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegagrus* / C. S. Li, N. Z. Fang, D. B. Koo, et al. // *Small Rumin Res*. 2000. Vol. 37. P. 57–63.
14. Mutiga E. R., Baker A. A. Transfer of sheep embryos through a laparoscope // *Vet Rec*. 1984. Vol. 114. P. 401–402.
15. McKelvey W. A., Robinson J. J., Aitken R. P. A simplified technique for the transfer of ovine embryos by laparoscopy // *Vet Rec*. 1985. Vol. 117. P. 492–494.
16. Laparoscopy vs. laparotomy for embryo transfer to produce transgenic goats (*Capra hircus*) / S. T. Shin, S. K. Jang, H. S. Yang, et al. // *J. Vet Sci*. 2008. Vol. 9. No. 1. P. 103–107. doi: 10.4142/jvs.2008.9.1.103.
17. Луканина В. А., Чинаров Р. Ю., Тарадайник Н. П. Сравнительное исследование результативности двух схем синхронизации половой охоты у овец // *Зоотехния*. 2021. № 12. С. 31–33. doi: 10.25708/ZT.2021.51.73.009.
18. The use of “overall accuracy” to evaluate the validity of screening or diagnostic tests / A. A. Alberg, J. Wan Park, B. W. Hager, et al. // *J. Gen. Intern. Med*. 2004. Vol. 19. P. 460–465.
19. Сингина Г. Н., Лопухов А. В., Шедова Е. Н. Развитие клонированных эмбрионов крупного рогатого скота in vitro в зависимости от параметров слияния и активации // *Сельскохозяйственная биология*. 2020. Т. 55. № 2. С. 295–305. doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.295rus.

References

1. Zinov'eva NA, Pozyabin SV, Chinarov RYu. [Assisted reproductive technologies: History of formation and role in the development of genetic technologies in cattle breeding]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. 2020;55(2):225-42. Russian. doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.225rus.
2. Aibazov A-MM, Mamontova T, Kovalenko D, et al. [Results and prospects for the use of biotechnological methods and techniques in the reproduction of small ruminants]. *Sel'skokhozyaistvennyi zhurnal*. 2021;14(1):58-71. Russian. doi: 10.25930/2687-1254/009.1.14.2021.
3. Van Eenennaam AL. Application of genome editing in farm animals: cattle. *Transgenic Research*. 2019;28:93-100. doi: 10.1007/s11248-019-00141-6.
4. Zinov'eva NA, Volkova NA, Bagirov VA. [Genome editing: Current state of research and application in animal production]. *Biokhnologiya*. 2018;34(3):9-22. Russian. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-3-9-22.
5. Zinovieva NA, Volkova NA, Bagirov VA. Genome editing: Current state of research and application to animal husbandry. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019;55(7):711-21. doi: 10.1134/S000368381907007X.
6. Mahdi AK, Medrano JF, Ross PJ. Single-step genome editing of small ruminant embryos by electroporation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(18): Article 10218. doi: 10.3390/ijms231810218.
7. Proudfoot C, Carlson DF, Huddart R, et al. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res*. 2015;24:147-53. doi: 10.1007/s11248-014-9832-x.
8. Kalds P, Zhou S, Cai B, et al. Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR era. *Frontiers in Genetics*. 2019;10: Article 750. doi: 10.3389/fgene.2019.00750.
9. Ashtiani SK, Nasr-Esfahani MH, Hosseini SM, et al. Successful experience in cloning the sheep. *Yakhteh Medical Journal*. 2008;3(10):193-200.
10. Fan Z, Yang M, Regouski M, et al. Gene knockouts in goats using CRISPR/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer. In: Liu C, Du Y, editors. *Microinjection. Methods in molecular biology*. New York: Humana Press; 2019. p. 373-90. doi: 10.1007/978-1-4939-8831-0_22.
11. Zhang Y, Wang Y, Yulin B, et al. CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMSCs differentiation. *J. Cell. Biochem*. 2018;120:1794-806. doi: 10.1002/jcb.27474.
12. Fan Z, Perisse IV, Cotton CU, et al. A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene. *JCI Insight [Internet]*. 2018 [cited 2023 Feb 20];3: Article e123529. Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/123529>. doi: 10.1172/jci.insight.123529.
13. Li CS, Fang NZ, Koo DB, et al. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegagrus*. *Small Rumin Res*. 2000;37:57-63.
14. Mutiga ER, Baker AA. Transfer of sheep embryos through a laparoscope. *Vet Rec*. 1984;114:401-2.
15. McKelvey WA, Robinson JJ, Aitken RP. A simplified technique for the transfer of ovine embryos by laparoscopy. *Vet Rec*. 1985;117:492-4.
16. Shin ST, Jang SK, Yang HS, et al. Laparoscopy vs. laparotomy for embryo transfer to produce transgenic goats (*Capra hircus*). *J. Vet Sci*. 2008;9(1):103-7. doi: 10.4142/jvs.2008.9.1.103.
17. Lukaniina VA, Chinarov RYu, Taradainik NP. [Comparative study of the effectiveness of two estrus synchronization schemes in sheep]. *Zootekhnika*. 2021;(12):31-3. Russian. doi: 10.25708/ZT.2021.51.73.009.
18. Alberg AA, Wan Park J, Hager BW, et al. The use of “overall accuracy” to evaluate the validity of screening or diagnostic tests. *J. Gen. Intern. Med*. 2004;19:460-5.
19. Singina GN, Lopukhov AV, Shedova EN. [Development of cloned bovine embryos in vitro depending on fusion and activation parameters]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. 2020;55(2):295-305. Russian. doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.295rus.