УДК 636.5:612.621:612.018
DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2026.3.59-70

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛОНИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (BOS TAURUS) МЕТОДОМ SCNT ПРИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ ДОНОРСКИХ ФИБРОБЛАСТОВ ТРИХОСТАТИНОМ А

[1,2]Кузнецов А.Б., [3]Шаповалова Д.С., [1]Шунаев А.В., [3]Шкаленко В.В., [1]Казарин Г.А., [1,4]Немковский Г.Б.

[1]ООО «ВЕСТТРЭЙД ЛТД-лаборатория экспериментальной эмбриологии, Москва; [2]ФГБОУ «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, г. Москва; [3]ФГБОУ «Волгоградский государственный аграрный университет», Вологда; [4]«Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Исследование посвящено обоснованию выбора эффективной концентрации трихостатина А (ТСА) для предобработки донорских фибробластов в технологии клонирования эмбрионов крупного рогатого скота методом пересадки ядер соматических клеток (SCNT). Культуры фибробластов кожи уха обрабатывали ТСА в диапазоне 0–100 нМ в течение 24 ч. Оценивали целостность ДНК (метод ДНК-комет), степень конденсации хроматина (когерентно-фазовая микроскопия), а также морфокинетику реконструированных эмбрионов. Установлено, что повышение концентрации ТСА до 50 нМ сопровождается максимальной деконденсацией хроматина — снижение фазовой высоты на 25,9% относительно контроля ($p<0,05$). При этом повреждения ДНК минимальны: доля ДНК в хвосте кометы снижена на 37% ($p<0,05$), момент хвоста — в 1,7 раза ($p<0,05$). При 50 нМ доля погибших клеток не превышает 5%. Дальнейшее увеличение дозы до 100 нМ не усиливает деконденсацию ($p>0,05$), но резко повышает цитотоксичность: доля погибших клеток возрастает в 3,2 раза ($p<0,01$), уровень фрагментации ДНК увеличивается в 2,6 раза ($p<0,05$). Обработка фибробластов 50 нМ ТСА перед реконструкцией повышает выход бластоцист в 1,6 раза (с 37,2% до 59,3%; $p<0,05$), увеличивает их диаметр на 14,9% (до 184,4±12,9 мкм; $p<0,05$) и снижает эмбриональную смертность на переходе «морула–бластоциста» с 20% до 5%. Полученные данные позволяют рекомендовать 50 нМ ТСА в качестве оптимальной концентрации для модуляции эпигенетического статуса донорских клеток в протоколах клонирования.

Ключевые слова: трихостатин А, соматические клетки, пересадка ядер, клонирование эмбрионов, крупный рогатый скот, деконденсация хроматина, целостность ДНК, выход бластоцист

Проблемы биологии продуктивных животных. 2026. 3:59-70

Введение

Технология клонирования животных в настоящее время рассматривается не как экспериментальный феномен, а как прикладной инструмент агробиотехнологии и регенеративной медицины. Однако, согласно обзорной работе Yagi, Horng и Hochedlinger (2024), ограничением остаётся эпигенетическая инерция дифференцированных клеток, препятствующая их эффективному репрограммированию. Несмотря на отработанную методологию SCNT, выход жизнеспособных эмбрионов остаётся низким. Ключевым лимитирующим фактором является не столько жизнеспособность донорских клеток, сколько их эпигенетический статус, который, по

данным Ji с соавт. (2024), препятствует эффективному репрограммированию. В отличие от эмбриональных, соматические клетки несут устойчивый набор эпигенетических меток, закрепляющих их дифференцировку. Когда после пересадки ядра пытается запуститься эмбриональный геном, эти метки мешают экспрессии ключевых регуляторов – и развитие останавливается. Важную роль в инициации репрограммирования играют пионерные факторы транскрипции. Mirizio, Sampson и Iwafuchi (2024) продемонстрировали, что эти белки обеспечивают первоначальный доступ к плотно упакованному хроматину, создавая условия для связывания других регуляторов. Однако их активность сама регулируется эпигенетическими механизмами, что формирует цикл, требующий детального анализа для разработки стратегий репрограммирования. Обобщая данные 2022–2024 годов, Ji с соавт. (2024) указывают: основные причины неудач при клонировании сельскохозяйственных животных – это сбои в метилировании ДНК и модификациях гистонов. Установлено, что данные нарушения могут быть скорректированы с помощью малых молекул. Один из самых перспективных инструментов – ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDACi), и среди них перспективным представителем является трихостатин А (TCA). Он повышает ацетилирование гистонов, снимая репрессию с генов плюрипотентности. Вместе с тем трихостатин А характеризуется дозозависимым действием: повышение концентрации сверх оптимального уровня сопровождается индукцией апоптотических процессов, что нивелирует положительный эффект модуляции хроматина. Pagano с соавт. (2025) на раковых клетках поджелудочной железы в условиях микрогравитации показали, что эффект TCA зависит от микроокружения. Gilardini Montani с соавт. (2017) подтвердили, что в опухолевых клетках TCA запускает как апоптоз, так и аутофагию, что является следствием его проапоптотического действия через каспазный каскад. Прямая экстраполяция данных на фибробласты КРС ограничена различиями в клеточных системах и условиях, но сам принцип дозозависимости остаётся общим. В настоящее время исследователи переходят от монотерапии TCA к комбинированным схемам. Zhang с соавт. (2024) на свиньях показали, что смесь разных HDACi даёт лучший выход бластоцист, чем TCA в одиночку. При этом авторы подчёркивают: протокол необходимо подбирать под конкретный вид и стадию развития эмбриона. В 2026 году предложены новые подходы. De Aguiar с соавт. (2026) использовали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки КРС (biPSCs) в качестве доноров ядер (PSCNT) и получили 33,3% бластоцист против 21,9% на обычных фибробластах. Кроме того, они показали, что задержка созревания ооцитов не снижает их компетенции, что облегчает планирование экспериментальных схем. Альтернативный подход предложили Behdarvandiyan с соавт. (2026). Они применили транскрипционное перепрофилирование лекарств – сравнили профили экспрессии SCNT- и IVF-эмбрионов и выявили палбоциклиб (ингибитор CDK4/6) как соединение, которое модулирует гены репрограммирования. Обработка ооцитов этим препаратом в первые 12 часов удлиняла первое дробление, обеспечивая репрограммирующим факторам дополнительное время для действия. Это приводило к улучшению дробления, повышению выхода бластоцист и усилению экспрессии маркеров (NANOG, POU5F1). Оценка донорских клеток только по морфологии недостаточна. Требуется эпигенетическое профилирование, поиск оптимальных доноров (вплоть до iPSCs) и тщательный подбор регуляторов с учётом их токсичности (Pagano et al., 2025; Gilardini Montani et al., 2017). Дальнейший прогресс SCNT, вероятно, будет складываться из комбинации этих подходов – модуляторов клеточного цикла, транскрипционного перепрофилирования и эпигенетических модуляторов (Behdarvandiyan et al., 2026).

Цель нашей работы – подобрать экспериментально обоснованную концентрацию TCA для обработки соматических клеток перед клонированием. Мы оценивали, как разные дозы TCA влияют на целостность ДНК, модификации гистонов, конденсацию хроматина и, главное, на способность обработанных клеток поддерживать нормальное развитие реконструированных эмбрионов.

Материал и методы

Работа выполнена в лаборатории ООО «ВЕСТТРЭЙД ЛТД» (Россия). Все процедуры с биологическим материалом проводили в соответствии с этическими нормами, принятыми для работы с репродуктивными тканями сельскохозяйственных животных, согласно руководству Federation of Animal Science Societies (FASS, 2010), а также требованиями национальных стандартов Российской Федерации: ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ 28424-2014 «Средства воспроизводства. Эмбрионы крупного рогатого скота. Технические условия». Объектом исследования служили культуры соматических клеток (фибробласты), используемые в качестве доноров ядер при клонировании эмбрионов методом пересадки ядер соматических клеток (SCNT). Яичники крупного рогатого скота были получены на мясоперерабатывающем комбинате «Домодедовский» (Московская область, г. Домодедово). В работе оценивали влияние двух факторов: (1) количества пассажей клеток (ранние пассажи: 3–5; поздние пассажи: 10–15) и (2) концентрации трихостатина А (ТСА) в диапазоне от 0 до 100 нМ. Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO_2) в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. На основании предварительных экспериментов для реконструкции эмбрионов были выбраны фибробласты 5-го пассажа. Установлено, что на 4-м пассаже наблюдается снижение выживаемости эмбрионов на переходе «морула–бластоциста» (показатель Б/М снижается до 0,83), тогда как на 9-м пассаже, несмотря на компенсаторное увеличение Б/М, ухудшается раннее дробление (показатель М/8 снижается). Таким образом, 5-й пассаж обеспечивает оптимальный баланс между пролиферативным потенциалом клеток и их эпигенетической пластичностью. Обработку ТСА проводили в течение 24 часов до проведения анализов или использования клеток в SCNT. Оценка повреждений ДНК методом ДНК-комет. Для выявления степени фрагментации ДНК в соматических клетках применяли метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет) согласно стандартному протоколу (МР 4.2.0014-10, 2011). Анализ проводили на клетках с разным пассажным уровнем после 24-часовой инкубации с ТСА в концентрациях 0 (контроль), 25, 50 и 100 нМ. Клетки фиксировали в агарозном геле, подвергали лизису, щелочной денатурации (pH> 13) и электрофорезу. После окрашивания флуоресцентным красителем (SYBR Green I) изображения комет анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа и специализированного программного обеспечения (Comet Assay IV, Perceptive Instruments). Уровень повреждений ДНК оценивали по длине «хвоста кометы» (tail length, мкм) и проценту ДНК в хвосте (% tail DNA). Для каждого образца анализировали не менее 100 клеток. Анализ конденсации хроматина с помощью когерентно-фазовой микроскопии. Для оценки изменений структуры хроматина в живых клетках без фиксации применяли когерентно-фазовую микроскопию (КФМ). Метод основан на измерении фазовой высоты клеток, которая коррелирует с плотностью упаковки хроматина, что было ранее продемонстрировано для аналогичных оптических методов (Guerenne-Del Ben et al., 2019). Измерения проводили до и после обработки клеток ТСА в указанных концентрациях, фиксируя динамические изменения фазового сдвига. Для каждого экспериментального условия анализировали не менее 50 клеток. Для оценки эффективности преимплантационного развития эмбрионов, полученных методом SCNT, рассчитывали относительные показатели перехода между ключевыми стадиями эмбриогенеза: отношение количества морул к числу восьмиклеточных эмбрионов (М/8), отношение количества бластоцист к числу морул (Б/М), отношение количества бластоцист к числу восьмиклеточных эмбрионов (Б/8), а также общий выход бластоцист. Эмбрионы получали методом электрослияния соматической клетки (фибробласта) и энуклеированного ооцита MII с последующим культивированием в инкубаторе при температуре 38,5 ^{0C}. Газовая смесь 6% CO2, 5% O2, 89% N2 приготовлена универсальной газосмесительной станцией ГСС (ВЕСТТРЭЙД ЛТД, Россия). Определение стадии развития эмбриона проводили с использованием планшетного

мультигазового инкубатора «Эмбриовизор», оснащенного Timelapse системой мониторинга развития эмбрионов (ВЕСТТРЭЙД ЛТД, Россия).

Получение и культивирование эмбрионов методом SCNT: ооциты аспирированы из фолликулов диаметром 2–8 мм; Созревание ооцитов КРС in vitro проводили в среде ТСМ-199, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 0,5 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (FSH), 5 мкг/мл лютеинизирующего гормона (LH) и 1 мкг/мл 17β-эстрадиола, в течение 27 ч при 38,5 °C в атмосфере 5% CO_2 . Энуклеация выполнена через 27,5 ч созревания; донорские фибробласты (5-й пассаж) вводили в перивителлиновое пространство; слияние - два импульса постоянного тока (2,4 кВ/см, 20 мкс); активация - 5 мкМ ионофором кальция (4 мин) с последующей инкубацией в 2 мМ 6-диметиламинопурина (4 ч); культивирование эмбрионов - среда CR1aa с 0,3% БСА при 38,5 °C, 5% CO_2 , 5% O_2 до 7 сут; общее число ооцитов: *n=* 932 (контроль) и *n=* 875 (ТСА). Полученные показатели были проанализированы пакетом STADIA, STATISTICA (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего. Достоверность различий между группами оценивали с помощью параметрических критериев (t-критерий Стьюдента). Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

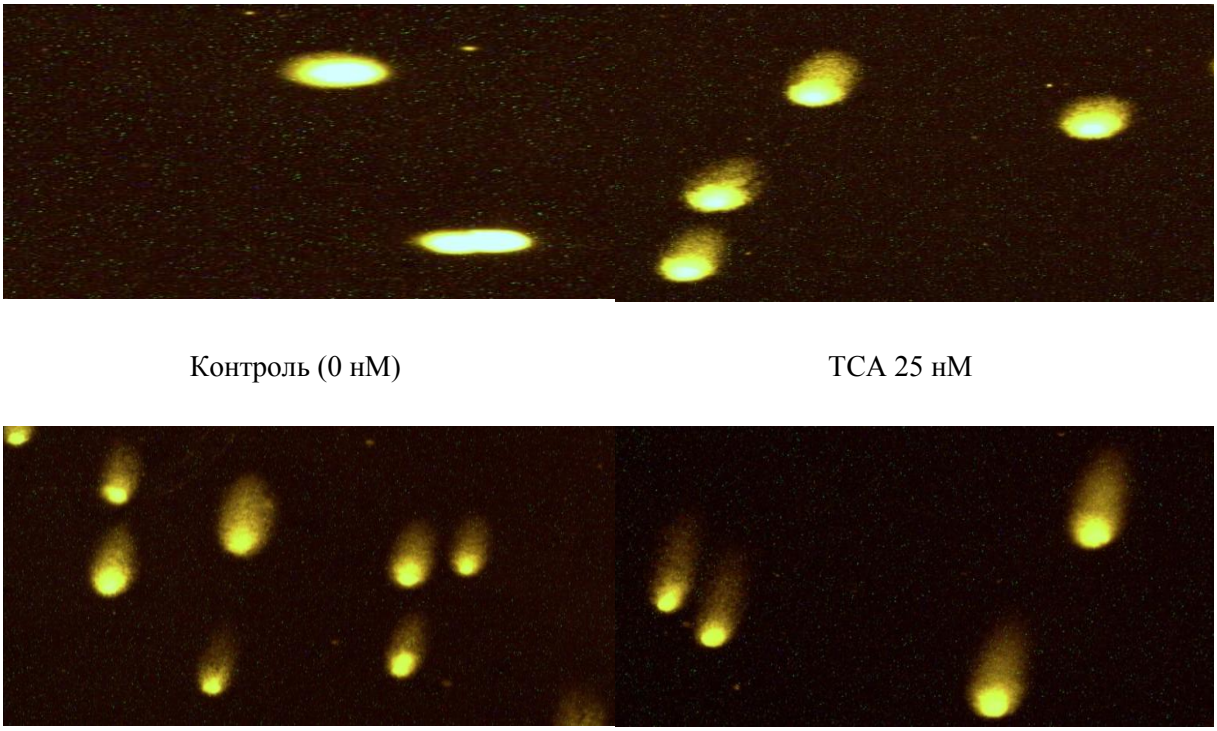
Результаты и обсуждение

В работе оценивали действие ТСА в трёх независимых подходах: метод ДНК-комет — для целостности генома, когерентно-фазовая микроскопия — для структуры хроматина, и морфокинетика эмбрионов после SCNT. Сопоставление результатов трёх независимых методов оценки (ДНК-комет, когерентно-фазовая микроскопия и морфокинетический анализ эмбрионов) позволило идентифицировать концентрацию 50 нМ как обеспечивающую максимальный эпигенетический эффект при минимальном цитотоксическом действии. Полученные данные представлены в виде дозозависимых эффектов, которые легли в основу выбора оптимальной концентрации ТСА. При оценке генотоксического действия ТСА методом ДНК-комет был проведен анализ повреждений ДНК в фибробластах, культивируемых в присутствии различных концентраций трихостатина А (ТСА), выявил немонотонную зависимость степени фрагментации генома от дозы препарата. Изображения ДНК-комет представлены на рисунке 1.

Таблица 1. ***Показатели повреждения ДНК фибробластов, культивированных в присутствии ТСА, определённые методом ДНК-комет (M ± σ; n = 100 клеток)***

Концентрация ТСА, нМ	% ДНК в «голове» кометы	% ДНК в «хвосте» кометы	Момент хвоста* (Tail Moment), усл. ед.
0	92,11±1,89	7,89±1,75	2,45 ± 0,52
25	92,99±2,01^{aa}	7,01±1,98^{bb}	2,10 ± 0,48^{ccc}
50	93,03±2,26^{aa}	4,97±2,31^{bbb}	1,44 ± 0,39 ^{ccc}
100	83,29±2,36^{aaa}	16,71±2,51^{bbb}	5,10 ± 0,71 ^{ccc}

Примечание: * - момент хвоста рассчитан как произведение длины хвоста (мкм) на процент ДНК в хвосте. Статистическая значимость различий с контролем (0 нМ ТСА) обозначена буквенными индексами: ^{a} <0,05; - ^{aa} <0,01; ^{aaa} <0,001 для показателя «% ДНК в голове кометы»; ^{b}<0,05; ^{bb} <0,01; ^{bbb} <0,001 для показателя «% ДНК в хвосте кометы», ^{c} <0,05; ^{cc} <0,01; ^{ccc} <0,001 – для показателя «Момент хвоста».



Контроль (0 нМ) ТСА 25 нМ

ТСА 50 нМ ТСА 100 нМ

Рис. 1. Изображения ДНК-комет для каждой концентрации ТСА (0, 25, 50, 100 нМ)

При концентрации 50 нМ ТСА зафиксировано максимальное снижение фрагментации ДНК: доля ДНК в хвосте кометы уменьшилась на 37 % (с 7,89 % до 4,97 %), а интегральный момент хвоста сократился в 1,7 раза (с 2,45 до 1,44 усл. ед.; $p < 0,05$). Увеличение концентрации до 100 нМ сопровождалось ростом этих показателей в 2,6 раза ($p < 0,05$), что свидетельствует о цитотоксическом действии высокой дозы.

При изучении влияния предобработки донорских клеток ТСА на развитие эмбрионов SCNT показано, что использование фибробластов, культивированных с оптимальной концентрацией ТСА (50 нМ), для реконструкции эмбрионов методом SCNT привело к значимому улучшению морфокинетических показателей (табл. 2).

Таблица 2. ***Показатели развития клонированных эмбрионов, полученных методом SCNT с использованием фибробластов, обработанных трихостатином.***

Показатель	**ТСА$^-$**	**ТСА$^+$ (50 нМ)**
Отношение количества морул к количеству 8-клеточных эмбрионов (М/8)	0,81 ± 0,02	0,92 ± 0,03*
Отношение количества бластоцист к количеству морул (Б/М)	0,79 ± 0,02	0,95 ± 0,01*

Отношение количества бластоцист к количеству 8-клеточных эмбрионов (Б/8)	0,63 ± 0,02	0,87 ± 0,03*
Выход бластоцист (BR)**	0,37 ± 0,01	0,59 ± 0,01*
Диаметр бластоцисты, мкм	160,54 ± 10,60	184,40 ± 12,92*

Примечание: * - различия с контролем достоверны при p <0,05. ** выход бластоцист рассчитан как отношение числа бластоцист к общему числу ооцитов, использованных для реконструкции; рассчитан от общего числа ооцитов (932 – контроль, 875 – опыт).

Предобработка фибробластов 50 нМ ТСА статистически значимо улучшила все этапы развития эмбрионов. Показатель М/8 увеличился на 13,6 % ($p<0,05$), что свидетельствует о более успешной активации генома донорского ядра. На этапе формирования бластоцист доля Б/М достигла 0,95 (в 1,2 раза выше контроля), а показатель Б/8 возрос в 1,38 раза (с 0,63 до 0,87). Интегральный выход бластоцист повысился в 1,6 раза (с 0,37 до 0,59; $p<0,05$), а средний диаметр бластоцист увеличился на 14,9 % (с 160,5 до 184,4 мкм; $p<0,05$). Модификация хроматина с помощью ТСА облегчает активацию эмбрионального генома и последующую дифференцировку, что подтверждает эффективность включения обработки донорских клеток в протокол SCNT.

На рисунке 2 представлены реконструированные эмбрионы КРС.

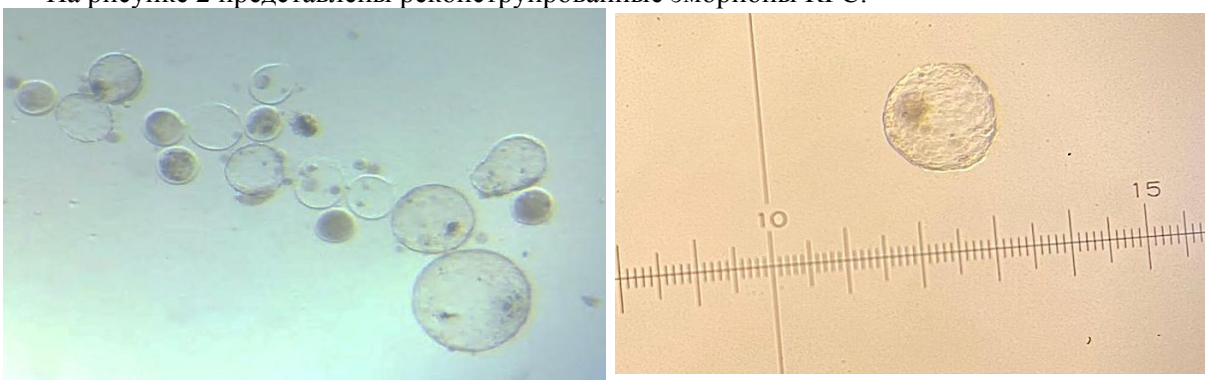
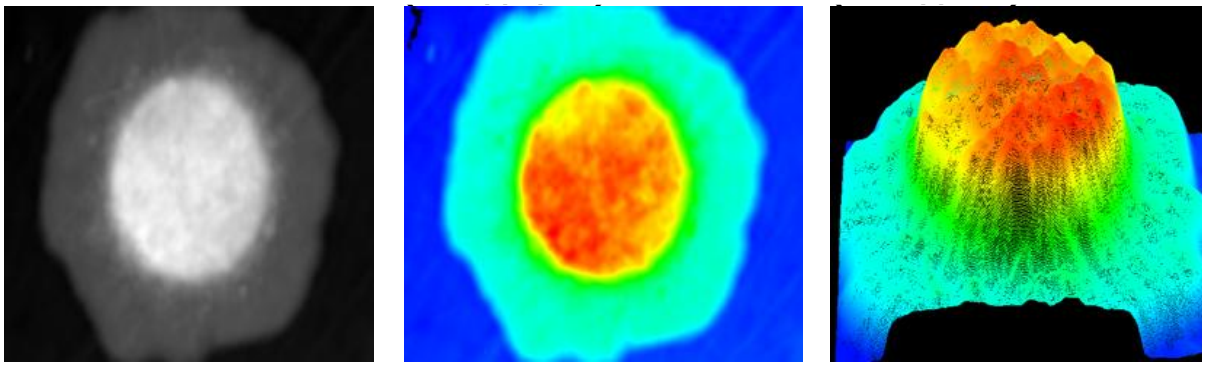
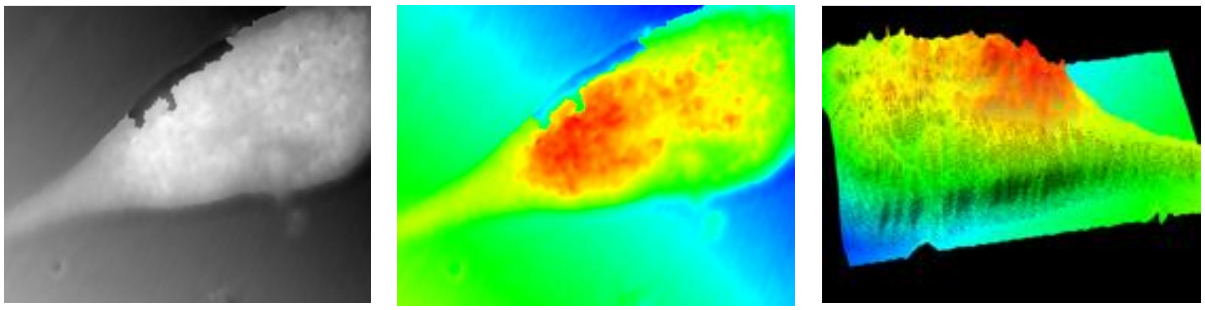


Рисунок 2. ***Реконструированные эмбрионы КРС (эмбрионы-клоны). А-бластоцисты. Б - Измерение диаметра бластоцисты. Цена деления = 14,4 мкм.***

Оценка структурной организации хроматина в живых клетках методом когерентно-фазовой микроскопии (КФМ) позволила выявить зависимость фазовой высоты фибробластов — параметра, обратно коррелирующего со степенью конденсации хроматина (Guerenne-Del Ben et al., 2019), — от состава культуральной среды. Фазовая высота клеток отражает оптическую плотность клетки, включая ядерный материал: более высокие значения соответствуют конденсированному, транскрипционно неактивному хроматину, тогда как уменьшение фазовой высоты свидетельствует о его деконденсации и повышении доступности генома для факторов транскрипции (Guerenne-Del Ben et al., 2019). Фазовые портреты фибробластов кожи КРС представлены на рисунке 3.



А Фазовое изображение (ФИ) ФИ (псевдоцвет) ФИ (псевдо 3D)



Б Фазовое изображение (ФИ) ФИ (псевдоцвет) ФИ (псевдо 3D)

Рисунок 3. ***Фазовые портреты фибробластов кожи. А-фазовый портрет фибробласта в суспензии, Б – фазовый портрет фибробласта при адгезии.***

В данной работе изучали влияние различных концентраций ТСА на процесс деконденсации хроматина, регистрируемый методом когерентно-фазовой микроскопии (КФМ). Результаты, представленные в таблице 3 и на рисунках 4–5, демонстрируют четкую дозозависимую динамику.

Таблица 3. ***Фазовая высота фибробластов после 24-часового культивирования с ТСА (M±σ), n=50***

Концентрация ТСА, нМ	0	10	20	40	50	60	80	100
Фазовая высота, нм	345,2 ±24,7	314,6 ±13,5	296,0 ±53,5	267,5 ±24,5*	255,7 ±11,7*	253,4 ±6,4*	250,4 ±14,5*	252,0 ±12,5*

Примечание: * - различия с контролем достоверны при p <0,05.

Зависимость имела выраженный характер: с ростом концентрации ТСА от 0 до 50 нМ фазовая высота клеток последовательно снижалась — хроматин постепенно деконденсировался. При 10 нМ спад составил 8,9%, а максимум (25,9%) наблюдался на 50 нМ. При концентрации 10 нМ фазовая высота уменьшилась на 8,9% относительно контроля (314,6 ± 13,5 нм против 345,2 ± 24,7 нм). Наиболее выраженное снижение зафиксировано при 50 нМ ТСА: фазовая высота достигла 255,7 ± 11,7 нм, что на 25,9% ниже контрольного значения (p <0,05). При дальнейшем повышении концентрации до 60, 80 и 100 нМ показатель фазовой высоты стабилизировался на уровне 250–255 нм, не претерпевая значимых изменений (различия между 50 нМ и 100 нМ

составляют 1,5%, p>0,05). Это указывает на достижение предела деконденсации хроматина в использованных условиях культивирования. Полученная зависимость имеет колоколообразный характер с насыщением: максимальный эффект достигается при 50 нМ ТСА, и дальнейшее увеличение концентрации не приводит к дополнительной деконденсации, но, как показано на рисунке 5, сопровождается значительным возрастанием цитотоксичности (увеличение доли погибших клеток в 3,2 раза при 100 нМ по сравнению с 50 нМ).

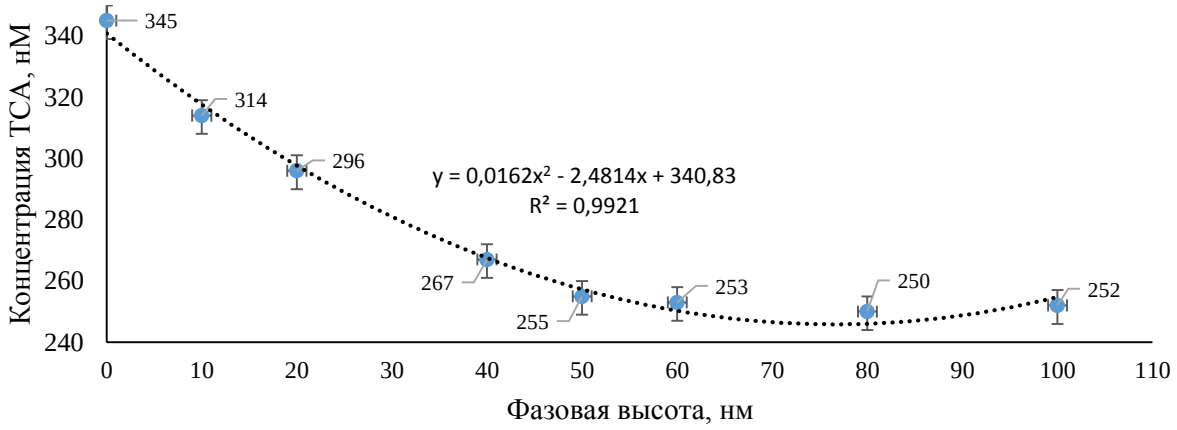


Рисунок 4. ***Зависимость фазовой высоты фибробластов от концентрации трихостатина А (ТСА) в культуральной среде***

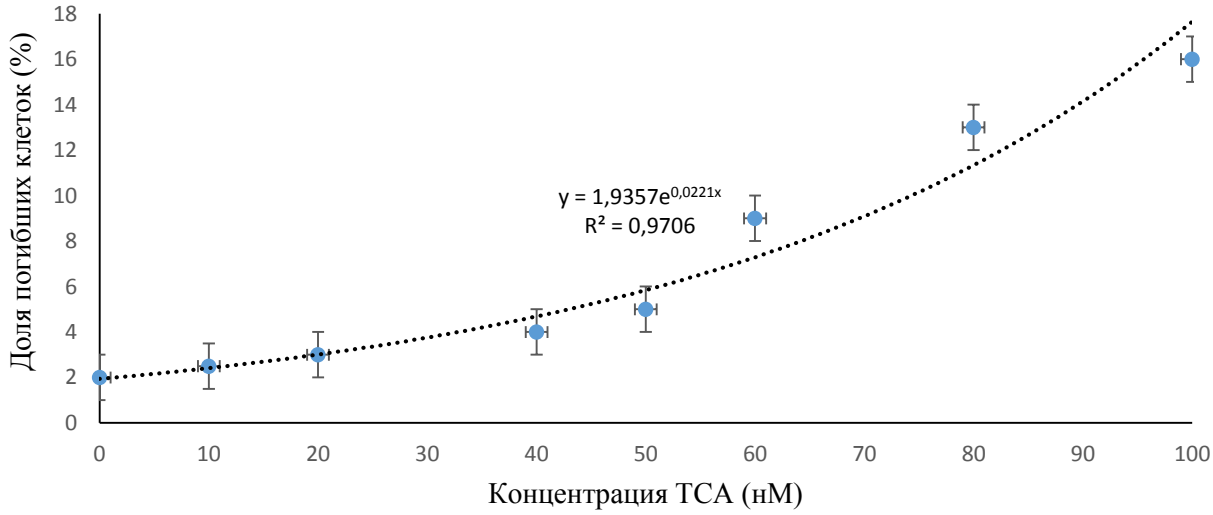


Рисунок 5. ***Процент позитивных клеток (дифференциальная окраска ядер акридиновым оранжевым и бромистым этидием) при культивировании в течение 24 часов при различных концентрациях трихостатина А.***

На рисунке 5 представлена зависимость доли погибших клеток (выраженной в процентах) от концентрации ТСА в диапазоне от 0 до 100 нМ. Оценку жизнеспособности проводили методом двойного флуоресцентного окрашивания акридиновым оранжевым и бромистым этидием, позволяющим дифференцировать, живые, апоптотические и некротические клетки. График демонстрирует: кривая цитотоксичности имеет выраженный пороговый характер. В

интервале концентраций от 0 до 50 нМ включительно доля погибших клеток остается на низком уровне, не превышающем 5%, и статистически не отличается от контроля ($p>0,05$). Это свидетельствует об отсутствии значимого токсического эффекта ТСА в указанном диапазоне. При повышении концентрации до 60 нМ отмечается достоверное возрастание количества погибших клеток. Дальнейшее увеличение концентрации до 80 и 100 нМ сопровождается значительным ростом цитотоксичности: при 100 нМ ТСА доля погибших клеток достигает максимальных значений, превышая показатель при 50 нМ в 3,2 раза ($p <0,01$). Форма кривой указывает на наличие критического порога (50 нМ), выше которого ТСА проявляет выраженное токсическое действие. Сопоставление с данными, представленными в таблице 3 и на рисунке 4, позволяет заключить, что концентрация 50 нМ является оптимальной: при ней достигается максимальная деконденсация хроматина (снижение фазовой высоты на 25,9%) при сохранении высокой жизнеспособности клеток. Превышение этого порога, хотя и не приводит к дальнейшему увеличению деконденсации (плато на кривой фазовой высоты), вызывает прогрессирующую гибель клеток, что, предположительно, связано с индукцией апоптоза вследствие остановки клеточного цикла и активации каспазного каскада (Pagano et al., 2025; Gilardini Montani et al., 2017). Область плато (50–100 нМ) совпадает с зоной достоверного возрастания цитотоксических эффектов, продемонстрированных на рисунке 5. При 100 нМ ТСА, несмотря на отсутствие изменений фазовой высоты по сравнению с 50 нМ, доля погибших клеток увеличивается в 3,2 раза ($p <0,01$). Таким образом, при концентрации 50 нМ достигается максимальная деконденсация хроматина при минимальном повреждении клеток. Полученная зависимость согласуется с данными метода ДНК-комет (табл. 1), где минимальный уровень фрагментации ДНК также регистрировался при 50 нМ ТСА. Следовательно, именно эта концентрация может быть рекомендована для предобработки донорских соматических клеток в технологии клонирования эмбрионов. Выявлена немонотонная зависимость: при 50 нМ достигается максимальный эпигенетический эффект, тогда как дальнейшее повышение концентрации не сопровождается дополнительной деконденсацией, но приводит к достоверному возрастанию цитотоксичности. Ниже сопоставляется этот парадокс с данными других авторов и оценивается его место среди современных стратегий клонирования. При сравнении полученных результатов с данными литературы установлено, что обработка донорских фибробластов 50 нМ ТСА снизила долю ДНК в хвосте кометы на 37% относительно контроля, а при 100 нМ этот параметр вырос в 2,6 раза. Данные, полученные в настоящем исследовании, согласуются с результатами Zhang с соавт. (2024), которые на модели свиных эмбрионов также продемонстрировали наличие пороговой концентрации TSA (100 нМ), превышение которой ассоциировано с остановкой развития эмбрионов. При этом чувствительность к ингибиторам HDAC может варьировать в зависимости от линии клеток и условий культивирования. В работе линии не различались по ответу, поэтому использовались только клетки пятого пассажа и среда с высокой глюкозой. Такие условия сами по себе меняют структуру хроматина: фазовая высота на DMEM с 4,5 г/л глюкозы составила 343 нм против 323 нм на DMEM/F12. Выбор концентрации 50 нМ обоснован тем, что дальнейшее увеличение дозы (до 60 нМ и выше) не приводило к дополнительному снижению фазовой высоты (плато на кривой), однако сопровождалось достоверным возрастанием доли погибших клеток (рис. 5). Pagano с соавт. (2025) на модели раковых клеток человека в условиях микрогравитации также выявили пороговую концентрацию 50 нМ ТСА, превышение которой ассоциировано с цитотоксичностью. Данное совпадение может свидетельствовать о консервативности механизмов ингибирования HDAC, однако требуются дополнительные исследования для подтверждения этого предположения в различных клеточных системах. Тем не менее, полученные данные на фибробластах КРС подтверждают, что 50 нМ является безопасной и эффективной концентрацией в данной модели, что согласуется с литературными данными на других системах. Huang с соавт. (2023) показали, что донорские фибробласты передают клонированным эмбрионам «хроматиновую память» – устойчивые

паттерны открытости/закрытости хроматина, которые мешают нормальному развитию. Добавление TSA частично стирает эту память, но не полностью – иначе фазовая высота продолжала бы снижаться и при 100 нМ. Наблюдается плато, а не бесконечная деконденсация; возможно, часть репрессивных меток (например, H3K9me3) устойчива к ингибиторам HDAC. Обработка донорских клеток – не единственный способ. Behdarvandiyan с коллегами (2026) применили транскрипционное перепрофилирование лекарств: ингибитор CDK4/6 палбоциклиб увеличивал выход бластоцист у коров с 28% до 46%. В настоящем исследовании при 50 нМ TSA выход возрос с 37% до 59%, эффект сопоставим, однако механизмы действия различаются. Luis H. de Aguiar et al. (2026) показали, что индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) в качестве доноров ядер дают выход бластоцист 33% против 22% на фибробластах. Результаты de Aguiar с соавт. (2026) подтверждают, что исходный эпигенетический статус донорского ядра является определяющим фактором эффективности SCNT. Что касается условий культивирования, Li с соавт. (2024) при оптимизации НМС у овец выяснили, что тип донорских клеток (мезенхимальные стволовые против фибробластов) влияет на результат сильнее, чем концентрация ингибитора: выход бластоцист варьировал от 18% до 37% в зависимости от типа клеток. Wang с соавт. (2025) на овцах также показали, что эмбрионы из iPSC имеют больший диаметр и более высокую экспрессию генов плюрипотентности, что согласуется с выявленной в ряде работ положительной корреляцией между диаметром бластоцист и их качеством (r=0,958). В настоящем исследовании 50 нМ TSA увеличила диаметр бластоцист на 15% и снизила смертность на переходе морула–бластоциста с 20% до 5%. Можно предположить, что TSA влияет не только на компактизацию хроматина, но и на метаболические переключения на стадии кавитации, поскольку клетки трофэктодермы нуждаются в высокой экспрессии генов ионного транспорта (например, ATP1B1). Хотя прямые измерения транскриптома не проводились, фазовая высота коррелировала со способностью к кавитации.

Таким образом, концентрация 50 нМ представляет собой пороговое значение, при котором дальнейшее увеличение дозы не даёт дополнительного эпигенетического преимущества, но уже начинает сопровождаться цитотоксическими эффектами. Комбинация TSA с ингибиторами гистонметилтрансфераз (например, хетоцин) могла бы изменить порог, как показано на свиньях (Zhang с соавт., 2024), но это следующий этап.

Заключение

Установлено, что оптимальной концентрацией трихостатина А для предобработки донорских фибробластов в технологии SCNT является 50 нМ. При данной концентрации достигается максимальная деконденсация хроматина (снижение фазовой высоты на 25,9% относительно контроля, $p < 0,05$) при минимальном уровне повреждений ДНК: доля ДНК в хвосте кометы уменьшается на 37% по сравнению с контролем, а момент хвоста снижается в 1,7 раза. Показано, что обработка соматических клеток ТСА в концентрации 50 нМ статистически значимо улучшает морфокинетические показатели реконструированных эмбрионов: эффективность дробления возрастает на 13,6% ($p < 0,05$), доля бластоцист от числа 8-клеточных эмбрионов увеличивается в 1,38 раза, а выход бластоцист повышается в 1,6 раза ($p < 0,05$). Продемонстрировано, что использование фибробластов, предварительно культивированных с 50 нМ ТСА, приводит к получению бластоцист более высокого качества: их средний диаметр составляет 184,4 ± 12,9 мкм, что на 14,9% превышает контрольный показатель (160,5 ± 10,6 мкм; $p < 0,05$). Определён порог цитотоксического действия ТСА: концентрации до 50 нМ включительно не вызывают значимой гибели клеток (доля погибших клеток <5%). Превышение этого порога (60–100 нМ) приводит к резкому увеличению цитотоксичности: при 100 нМ количество погибших клеток возрастает в 3,2 раза по сравнению с показателем при 50 нМ ($p < 0,01$), что сопровождается экспоненциальным ростом фрагментации ДНК (доля ДНК в хвосте кометы увеличивается в 2,6 раза). Таким образом, проведённое исследование вносит вклад в

разработку протоколов повышения эффективности клонирования, демонстрируя, что предварительная оценка состояния соматических клеток (целостность ДНК, степень конденсации хроматина) и использование TCA в строго определённой концентрации позволяют значительно улучшить результативность SCNT. Полученные концентрационные зависимости валидны для фибробластов кожи крупного рогатого скота в стандартных условиях культивирования; для других клеточных систем и протоколов необходимо индивидуальное титрование TCA. Вместе с тем полученные данные открывают перспективы для дальнейшего совершенствования технологии, включая комбинирование TCA с другими эпигенетическими модуляторами и ростовыми факторами. Это согласуется с современными тенденциями развития методов клеточного репрограммирования, отражёнными в недавних работах (Zhang et al., 2024; de Aguiar et al., 2026; Behdarvandiyan et al., 2026).

Список литературы

1. ГОСТ 28424-2014. Средства воспроизводства. Эмбрионы крупного рогатого скота. Технические условия. Москва: Стандартинформ, 2015.
2. ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. Москва: Стандартинформ, 2016.
3. МР 4.2.0014-10. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет in vitro. Методические рекомендации. Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. 17 с.
4. Behdarvandiyan P., Jafarpour F., Hajian M., et al. Transcriptional drug repositioning enhances the development of somatic cell nuclear transfer embryos by inhibiting CDK4/6 during the first cleavage of bovine pseudo-zygotes. Theriogenology. 2026; 251:117735. doi: 10.1016/j.theriogenology.2025.117735. PMID: 41202451.
5. de Aguiar L.H., Lee Y.L., Abdelhady A.W., Koganti P.P., Selvaraj V., Cheong S.H. Flexible oocyte manipulation with delayed maturation and improved somatic cell nuclear transfer efficiency using induced pluripotent stem cells. Theriogenology. 2026; 251:117754. doi: 10.1016/j.theriogenology.2025.117754. PMID: 41265330.
6. Federation of Animal Science Societies. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. 3rd ed. FASS; 2010.
7. Gilardini Montani M.S., Granato M., Santoni C., et al. Histone deacetylase inhibitors VPA and TSA induce apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells. Cell Oncol (Dordr). 2017; 40(2):167-180. doi: 10.1007/s13402-017-0314-z. PMID: 28160167.
8. Guerenne-Del Ben T., Rajaofara Z., Couderc V., et al. Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering highlights state of chromatin condensation in CH region. Sci Rep. 2019; 9(1):13862. doi: 10.1038/s41598-019-50453-0.
9. Huang Y., Zhang J., Li X., et al. Chromatin accessibility memory of donor cells disrupts bovine somatic cell nuclear transfer blastocysts development. FASEB J. 2023; 37(9):e23111. doi: 10.1096/fj.202300131rrr.
10. Ji Y.C., Li Y.H., Wang M.J., Zheng R.Z., Yu T., Su J.M. Epigenetic Mechanisms of Reprogramming of Animal Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. Journal of Agricultural Biotechnology. 2024; 32(7):1669-1680. doi: 10.3969/j.issn.1674-7968.2024.07.018.
11. Li W., Chen H., Zhang M., et al. Optimization of handmade cloning technique in sheep and preliminary investigation of umbilical cord mesenchymal stem cells as donor nuclei. Reprod Domest Anim. 2024; 59(9):e14632. doi: 10.1111/rda.14632.
12. Mirizio G., Sampson S., Iwafuchi M. Interplay between pioneer transcription factors and epigenetic modifiers in cell reprogramming. Regen Ther. 2024; 28:246-252. doi: 10.1016/j.reth.2024.12.014. PMID: 39834592; PMCID: PMC11745816.
13. Pagano C.A., Masini M.A., Sabbatini M., et al. Simulated Microgravity-Induced Alterations in PDAC Cells: A Potential Role for Trichostatin A in Restoring Cellular Phenotype. Int J Mol Sci. 2025; 26(10):4758. doi: 10.3390/ijms26104758.
14. Wang D., Liu Y., Li L., et al. Construction and Influence of Induced Pluripotent Stem Cells on Early Embryo Development in Black Bone Sheep. Biology (Basel). 2025; 14(5):484. doi: 10.3390/biology14050484.

15. Yagi M., Horng J.E., Hochedlinger K. Manipulating cell fate through reprogramming: approaches and applications. Development. 2024; 151(19):dev203090. doi: 10.1242/dev.203090. PMID: 39348466; PMCID: PMC11463964.
16. Zhang S., Du Q., Tang P., Huang S. Application and effect of epigenetic modifiers in the development of somatic cell nuclear transposition pig embryos. Journal of Agriculture and Forestry. 2024; 71(3):181-193. doi: 10.30089/JAF.202409_71(3).0004. References (for publications in Russian)

References (for publications in Russian)

1. GOST 28424-2014. *Sredstva vosproizvodstva. Embriony krupnogo rogatogo skota. Tekhnicheskie usloviya* . Moscow: Standartinform; 2015. (In Russian)
2. GOST 33215-2014. *Rukovodstvo po soderzhaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila oborudovaniya pomeshcheniy i organizatsii protsedur*. Moscow: Standartinform; 2016. (In Russian)
3. MR 4.2.0014-10. *Otsenka genotoksicheskikh svoystv metodom DNK-komet in vitro. Metodicheskie rekomendatsii*. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2011. 17 p. (In Russian)

UDC 636.5:612.621:612.018

Assessment of the state of somatic cells to increase the efficiency of embryo cloning

[1,2]Kuznetsov A.B., [3]Shapovalova D.S., [1]Shunaev A. V., [3]Shalenko V.V., [3]Kazarin G.A., [1.4]Nemkovskiy G.B.

[1]Westtrade LTD - laboratory of experimental embryology, Moscow;
[2]Pirogov russian national research medical university, Moscow;
[3]Volgograd State Agrarian University, Volgograd, Russian Federation;
[4]I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia", Moscow

ABSTRACT. The study aims to determine the effective concentration of trichostatin A (TSA) for donor fibroblast pretreatment in bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT). Ear skin fibroblast cultures were exposed to 0–100 nM TSA for 24 h. We assessed DNA integrity (comet assay), chromatin condensation (coherent phase microscopy), and the morphokinetics of reconstructed embryos. Raising TSA to 50 nM resulted in maximal chromatin decondensation, with phase height reduction by 25.9% relative to control ($p<0.05$). At this concentration, DNA damage was minimal: tail DNA fraction decreased by 37% ($p<0.05$), and tail moment dropped 1.7‑fold ($p<0.05$). At 50 nM, the proportion of dead cells did not exceed 5%. Further increase to 100 nM caused no additional decondensation ($p>0.05$) but sharply elevated cytotoxicity: dead cells increased 3.2‑fold ($p<0.01$), and DNA fragmentation rose 2.6‑fold ($p<0.05$). Fibroblast pretreatment with 50 nM TSA improved blastocyst yield 1.6‑fold (from 37.2% to 59.3%; $p<0.05$), increased blastocyst diameter by 14.9% (to 184.4±12.9 μm; $p<0.05$), and reduced embryo mortality at the morula–blastocyst transition from 20% to 5%. These findings support 50 nM TSA as the optimal concentration for epigenetic modulation of donor cells in cloning protocols.

Keywords: trichostatin A, somatic cells, nuclear transfer, embryo cloning, cattle, chromatin decondensation, DNA integrity, blastocyst yield

Problemy biologii produktivnykh zhivtnykh **(Productive Animal Biology). 2026. 3: 59-70**

Поступило в редакцию: 07.06.2026 Получено после доработки: 08.09. 2026

Сведения об авторах:
Кузнецов Александр Борисович, аспирант, тел. +7 (960) 365 69 47; shdiana1412@gmail.com;
Шаповалова Диана Сергеевна, к.м.н., н. с., доцент, тел. +7 (985) 424 32 37, kuz.ab@outlook.com;
Шкаленко Вера Владимировна, д.б.н., профессор, тел. +7(996)509 53 53; v.shkalenko@volgau.ru
Казарин Георгий Андреевич, н.с.;
Немковский Глеб Борисович, к.т.н., доцент, nemkovskiy_g_b@staff.sechenov.ru