



DOI 10.22363/2312-797X-2025-20-1-151-161

EDN IZQTNT

УДК 661.982:598.2:577.218

Научная статья / Research article

Эффекты оксида азота, связанные с экспрессией ряда генов на эмбриональной стадии развития птиц

В.Ю. Титов^{1,2}  , И.И. Кочиш¹ , О.В. Мясникова¹ ,
А.М. Долгорукова² , М.А. Зайцева¹, П.С. Романов¹, А.Р. Варданян³ 

¹Московская государственная ветеринарная академия — МВА им. К.И. Скрябина, Москва,
Российская Федерация

²Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский
и технологический институт птицеводства, Сергиев Посад, Российская Федерация

³ЗАО «Научный центр оценки анализа рисков безопасности пищевых продуктов», Ереван,
Республика Армения
 vtitov43@yandex.ru

Аннотация. Данные, полученные различными исследователями, свидетельствуют о влиянии оксида азота на экспрессию ряда генов, в частности генов, связанных с миогенезом у птиц. Количественная оценка этого эффекта и изучение перспектив его использования ранее не проводились, поскольку контроль содержания метаболитов NO в тканях представлял методическую сложность. Цель исследования — выяснить взаимосвязь содержания NO в тканях птичьих эмбрионов и экспрессии генов, ответственных за миогенез, на различных стадиях эмбриогенеза. Использовался высокочувствительный и высокоспецифичный ферментный сенсор, позволяющий оперативно определять содержание основных метаболитов NO в тканях. Экспрессию генов определяли методом ПЦР-РВ. На эмбрионах кур и перепелов исследовали взаимосвязь содержания NO в тканях и экспрессии 7 генов, участвующих в процессе миогенеза: фактора пролиферации миоцитов 2с (mef 2с), миогенной дифференциации 1 (myoD1), фактора миогенеза 5 (myf 5), миозина (myh 1), миогенина (myog), соматостатина (MSTN), гонадотропного гормона (GHR). Установлено, что блокирование синтеза NO, снижающее содержание депонированного NO в тканях на 50...70 %, приводит к изменению экспрессии большинства исследованных генов в несколько раз. В основном имело место снижение экспрессии генов, в частности, миостатина (MSTN), ответственного за подавление роста и дифференциации мышечной ткани. Таким образом, оксид азота в птичьем эмбрионе может играть роль прежде всего регулятора роста мышечной ткани, что важно для быстрорастущих форм поскольку пролиферация миоцитов происходит на эмбриональной стадии развития. Регуляция может осуществляться путем активации механизмов окисления NO до нитрата, что имеет место в эмбрионах быстрорастущих форм.

© Титов В.Ю., Кочиш И.И., Мясникова О.В., Долгорукова А.М., Зайцева М.А., Романов П.С., Варданян А.Р., 2025



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Ключевые слова: птичьи эмбрионы, соединения-доноры NO, эмбриогенез птиц, миогенез

Вклад авторов: Авторы в равной степени внесли свой вклад в подготовку данного исследования и рукописи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00148.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

История статьи: поступила 1 декабря 2024 г., принята к публикации 20 декабря 2024 г.

Для цитирования: Титов В.Ю., Кочиш И.И., Мясникова О.В., Долгорукова А.М., Зайцева М.А., Романов П.С., Вардanian А.Р. Эффекты оксида азота, связанные с экспрессией ряда генов на эмбриональной стадии развития птиц // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2025. Т. 20. № 1. С. 151—161. doi: 10.22363/2312-797X-2025-20-1-151-161 EDN IZQTNT

Effects of nitric oxide associated with expression of some genes at embryonic stage of avian development

Vladimir Y. Titov^{1, 2}  , Ivan I. Kochish¹ , Olga V. Myasnikova¹ ,
Anna M. Dolgorukova² , Maria A. Zaytseva¹, Pyotr S. Romanov¹,
Harutyun R. Vardanyan³ 

¹Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation

²Russian Research and Technological Poultry Institute, Sergiev Posad, Russian Federation

³Scientific Center for Food Safety Risk Assessment and Analysis, Yerevan, Republic of Armenia
 vtitov43@yandex.ru

Abstract. Data obtained by various researchers indicate the effect of nitric oxide (NO) on expression of some genes, in particular, the genes associated with myogenesis in birds. But until now it has not been possible to quantify this effect and possibility of its use, since the control of content of NO metabolites in tissues presented a methodological difficulty. The purpose of this research was to find out relationship between the NO content in tissues of avian embryos and the expression of genes responsible for myogenesis at various stages of embryogenesis. We used a highly sensitive and highly specific enzyme sensor to determine the content of the main NO metabolites in tissues. Gene expression was determined by PCR-RT. The relationship between the NO content in tissues and the expression of 7 genes involved in the process of myogenesis was studied in chicken and quail embryos. There are the genes of myocyte proliferation factor 2c (mef 2c), myogenic differentiation 1 (MyoD1), myogenesis factor 5 (myf 5), myosin (mhy 1), myogenin (myog), somatostatin (MSTN), gonadotropin hormone (GHR). Blocking the synthesis of NO, which leads to a decrease in deposited NO in tissues by 50...70%, results in a change in expression of most of the studied genes. Basically, there was a decrease in gene expression, in particular, myostatin (MSTN), which is responsible for suppressing growth and differentiation of muscle tissue. Thus, nitric oxide in an avian embryo can primarily play the role of regulator of muscle tissue growth, which is important for fast-growing breeds since myoblast proliferation occurs at embryonic stage of development. Regulation can be carried out by activating the mechanisms of oxidation of NO to nitrate which occurs in the embryos of fast-growing breeds.

Key words: avian embryos, NO donor compounds, avian embryogenesis, myogenesis

Authors' contribution. The authors contributed equally to the preparation of this study and the manuscript.

Conflict of interest. The authors declared no conflict of interests.

Funding. The study was supported by Russian Science Foundation grant No. 24-26-00148.

Article history: received 1 December 2024; accepted 20 December 2024.

For citation: Titov VY, Kochish II, Myasnikova OV, Dolgorukova AM, Zaytseva MA, Romanov PS, Vardanyan HR. Effects of nitric oxide associated with expression of some genes at embryonic stage of avian development. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2025;20(1):151—161. doi: 10.22363/2312-797X-2025-20-1-151-161 EDN IZQTNT

Введение

Согласно данным ряда исследователей, оксид азота (NO) оказывает влияние на экспрессию ряда генов [1–3], в т. ч. генов, связанных с миогенезом [4]. До сих пор не было возможности оценить этот эффект количественно и определить перспективы его использования, так как контроль содержания метаболитов NO в тканях методически сложен. Благодаря использованию высокочувствительного и высокоспецифичного ферментного сенсора, позволяющего производить такой контроль [5], мы установили, что в птичьем эмбрионе около 2 % аргинина тратится на синтез оксида азота [6]. Интенсивность синтеза NO примерно одинаковая во всех эмбрионах птиц одного вида. Но в эмбрионах мясных форм NO, преимущественно, окисляется до нитрата, в то время как в эмбрионах яичных форм он накапливается в составе так называемых соединений — доноров NO: S-нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), высокомолекулярных нитратов (RNO_2). Разница по показателю соотношения нитрата и соединений — доноров в эмбрионе достигает двух порядков [6, 7].

Очевидно, что для обеспечения жизненно необходимых физиологических процессов оксид азота в птичьем эмбрионе синтезируется в избыточном количестве. Об этом говорит хотя бы тот факт, что в эмбрионах мясных форм NO, в основном, окислен до нитрата [6]. Было показано, что со степенью окисления NO в эмбрионе коррелируют некоторые гистологические показатели эмбриональных мышц [6]. В связи с данными о влиянии NO на экспрессию генов [1–4], можно предположить, что основная часть оксида азота в эмбрионе выполняет роль регулятора экспрессии генов, в частности, ответственных за миогенез. Мы имеем возможность количественно оценить этот эффект и практически использовать его в птицеводстве.

Цель исследования — выяснить взаимосвязь содержания NO в тканях птичьих эмбрионов и экспрессии генов, ответственных за миогенез, на различных стадиях эмбриогенеза.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали оплодотворенные яйца следующих пород и кроссов кур: кросс «Смена 9» (порода корниш (линия СМ 56), порода плимутрок (линия СМ 79) и исходный гибрид), кроссы Хайсекс белый и Хайсекс коричневый, породы Мини мясные (линия А77), Куланги, Брама Палевая, Юрловская голосистая и Орловская, а также перепелов породы японская серая, полученные в ООО «Генофонд» (Россия). Инкубацию яиц проводили в условиях инкубатория

(ФГБУ СГЦ «Загорское», ЭПХ ВНИТИП, г. Сергиев Посад, Московская обл.). Использовали инкубаторы ИПХ-10 (Россия). Температура в инкубационный период (с 1 по 18 сутки инкубации) — 37,6 °С, в выводной период (с 19 по 21 сутки инкубации) — 37,2 °С в соответствии с рекомендациями ВНИТИП [10].

Во всех случаях для определения экспрессии генов отобрали по 5...8 эмбрионов каждой породы или кросса.

Для определения содержания нитро- и нитрозосоединений в гомогенатах использовали ферментный сенсор, действие которого основано на уникальной способности нитрита и других нитрозосоединений, имеющих в составе NO^+ -группу, ингибировать каталазу в присутствии галоид-ионов с примерно равной эффективностью, одинаково зависящей от pH-среды [5–8]. Способность ингибировать фермент утрачивается под действием ряда веществ, специфичных для каждой группы нитрозосоединений [5]. Для определения нитросоединений использовали треххлористый ванадий для восстановления нитрогруппы в нитрозогруппу, имеющую способность ингибировать каталазу. Чувствительность метода — 40 нМ [5, 7].

Экспрессию генов изучали на основе метода ПЦР-РВ [9]. В качестве контроля взяли ген «домашнего хозяйства» — ТАТА-связывающий белок (ТВР), так как на его экспрессию нитроаргинин и аргинин не оказывали эффекта.

Из гомогенизированной ткани выделяли РНК, проводили синтез к ДНК методом ПЦР с обратной транскрипцией. Расчет экспрессии генов-кандидатов в количественной детекции ПЦР-РВ определяли относительно контрольного гена ТВР при помощи метода $2^{-\Delta\Delta\text{СТ}}$ [9], где Ст — ПЦР-цикл, в котором флуоресцентный сигнал от красителя пересекает установленный пороговый уровень. Таким образом, чем меньше величина Ст, тем интенсивнее идет процесс амплификации и, следовательно, более высокая экспрессия гена.

На шестые-седьмые сутки эмбриогенеза из-за сложности отбора мышечной ткани получали гомогенат эмбриона с помощью стеклянного гомогенизаторе DWK Life Sciences GmbH, Германия (8 мин, 40 фрикций/мин, 6 °С). На 13–14-е сутки развития получали гомогенат грудных и бедренных мышц эмбриона, используя измельчитель тканей Oster (Мексика).

Для установления зависимости между содержанием депонированного NO в тканях и экспрессией исследуемых генов в яйца перед закладкой и на 11-е сутки инкубации вводили растворы экзогенных веществ: блокатора синтеза оксида азота — нитроаргинина (Н), а также смесь нитроаргинина и субстрата синтеза оксида азота — аргинина (Н+А). Дозировка указана в табл. 3, 4. В контрольную группу (К) в эти же сроки вводили стерильный физиологический раствор. Ввод в яйцо осуществлялся через скорлупу со стороны воздушной камеры инсулиновыми шприцами. Использовали препараты $\text{N}\omega$ -нитро-L-аргинина и L-аргинина Merck, разведение осуществляли на стерильном физиологическом растворе.

Для статистической обработки применяли пакет программ BioStat.

Инкубацию проводили в условиях вивария (ФГБУ СГЦ «Загорское», ЭПХ ВНИТИП, г. Сергиев Посад, Московская обл.). Использовали инкубаторы ИПХ-10 (Россия). Температура в инкубационный период (с 1-х по 18-е сутки инку-

бации) — 37,6 °С, в выводной период (с 19-х по 21-е сутки инкубации) — 37,2 °С в соответствии с рекомендациями ВНИТИП¹.

Для статистической обработки применяли пакет программ BioStat.

Результаты исследования и обсуждение

Исследованы эмбрионы десяти пород, линий и кроссов кур, характеризующихся высокой (80 % и более — группа 1) и низкой (2...4 % — группа 2) степенью окисления NO в тканях эмбриона. В среднем величина экспрессии большинства генов в эмбрионах мясных и бойцовых форм, отличающихся высокой степенью окисленности оксида азота до нитрата в тканях, была ниже, чем в эмбрионах яичных форм, отличающихся незначительной степенью окисления. По экспрессии фактора миогенной дифференциации 1 (myoD1), фактора миогенеза 5 (myf 5) и миогенина (myog) между этими группами были достоверные различия по критерию Манна — Уитни (табл. 1, 2).

Таблица 1

Экспрессия генов: фактора пролиферации миоцитов 2с (mef 2с), миогенной дифференциации 1 (myoD1), фактора миогенеза 5 (myf 5), миозина (mhy 1), миогенина (myog), соматостатина (MSTN), гонадотропного гормона (GHR) — в ткани грудных мышц куриных эмбрионов различных пород, линий и кроссов на 14-е сутки инкубации* (n = 7)

Порода, линия, кросс	NO ₃ ⁻ / NO, %	Доноры NO+нитрат, мкМ	MSTN	GHR	mef2c	myog	mhy 1	myoD1	myf 5
Группа 1									
Мини мясные (линия А77 группа 2)	98,7±1,8	495,5±21,1	-1,5±0,7	-1,3±0,5	-1,6±0,5	0,7±0,4	5,4±0,6	-0,5±0,5	10,1±0,5
СМ56 «Корниш»	97,6±2,7	519,8±17,6	-2,5±0,4	-2,6±0,3	-1,4±0,3	2,0±0,4	4,2±0,5	-1,2±0,5	9,3±0,4
Куланги	95,7±2,5	528,5±17,7	-0,2±0,4	-1,2±0,6	-0,6±0,5	7,2±1,3	13,3±1,1	6,4±0,4	2,0±0,2
Смена 9	97,9±2,6	572,7±18,5	-3,8±0,4	-2,5±0,3	-2,6±0,3	-2,8±0,3	15,8±1,7	-3,4±0,4	3,1±0,3
Брама палевая	80,4±2,9	501,1±17,1	-5,2±1,0	-4,9±0,5	-7,9±2,9	1,1±0,5	0,7±0,5	4,6±0,7	2,9±0,5
Группа 2									
Хайсекс белый	1,8±1,0	474,6±16,6	-1,3±0,9	-2,3±0,6	-2,0±1,1	-0,3±0,8	4,7±0,4	-2,1±0,6	5,9±0,6
Плимутрок СМ79	2,9±1,3	461,7±18,2	-2,8±0,5	-2,2±0,7	-2,1±1,3	-6,2±0,8	4,8±0,5	-1,6±1,1	2,4±0,8
Юрловская	3,6±1,9	448,1±15,3	-6,7±0,5	-6,1±1,1	-8,1±0,6	-1,1±0,3	-0,3±0,2	2,9±0,8	-0,3±0,2
Хайсекс браун	2,3±0,8	474,6±16,6	0,4±0,4	-2,6±0,4	-2,7±1,2	-0,8±0,7	0,4±0,3	-4,6±0,7	-0,6±0,4
Орловская	1,9±1,1	444,1±14,2	-1,4±0,8	-1,7±0,4	-1,1±0,8	-2,6±0,7	13,3±2,3	-4,1±0,4	5,1±1,0
								u _{эксп} < u _{крит}	u _{эксп} < u _{крит}

*В табл. 1 представлены ΔCt = Ct – Ct TBP.

Источник: составлено В.Ю. Титовым, И.И. Кочишем, О.В. Мясниковой, А.М. Долгоруковой, М.А. Зайцевой, П.С. Романовым, А.Р. Варданяном.

Таблица 2

¹ Фисинин В.И., Дядичкина Л.Ф., Голдин Ю.С., Позднякова Н.С., Мелехина Т.А., Данилов Р.В., Гупало И.М., Ройтер Л.М., Веденкина И.В., Шинкаренко Л.А., Воронцов А.Н., Босов Д.Ю., Афонин В.В. Технология инкубации яиц сельскохозяйственной птицы : руководство. 3-е изд., переработ. и доп. Сергиев Посад, 2016. EDN: VUZCXN

Экспрессия генов: фактора пролиферации миоцитов 2с (mef 2с), миогенной дифференциации 1 (myoD1), фактора миогенеза 5 (myf 5), миозина (mhy 1), миогенина (myog), соматостатина (MSTN), гонадотропного гормона (GHR) – в ткани ножных мышц куриных эмбрионов* (n = 7)

Порода, линия, кросс	NO ₃ ⁻ / NO, %	Доноры NO+нитрат, мкМ	MSTN	GHR	mef2c	myog	mhy 1	myoD1	myf 5
Группа 1									
Мини мясные	97,6 ± 1,8	501,5 ± 18,2	0,4 ± 0,8	0,7 ± 0,2	-2,3 ± 1,8	1,4 ± 1,0	6,8 ± 1,3	0,9 ± 1,2	11,5 ± 1,7
СМ56 Корниш Линия «Смены 9»	95,8 ± 2,9	520,1 ± 16,4	-1,9 ± 0,3	-1,7 ± 0,4	0,7 ± 0,4	12,0 ± 1,7	8,3 ± 2,6	3,4 ± 0,8	13,4 ± 2,1
Куланги	95,2 ± 2,6	528,5 ± 17,7	-1,8 ± 0,9	-2,2 ± 1,8	2,9 ± 1,7	7,0 ± 1,6	14,3 ± 2,0	3,9 ± 0,6	1,4 ± 0,9
«Смена9»	98,1 ± 2,6	561,7 ± 18,7	-2,1 ± 0,4	-1,7 ± 0,5	-1,1 ± 0,8	-2,6 ± 1,4	12,6 ± 2,3	-4,1 ± 1,2	2,8 ± 0,4
Брама	78,5 ± 3,0	495,5 ± 16,6	-3,3 ± 0,5	-3,2 ± 1,4	-7,1 ± 0,9	0,5 ± 0,3	-0,2 ± 0,1	-4,3 ± 0,7	-5,8 ± 0,6
Группа 2									
Хайсекс белый	2,4 ± 1,1	442,5 ± 15,8	-0,4 ± 0,2	-0,4 ± 0,1	-1,3 ± 0,5	-0,2 ± 0,1	6,2 ± 0,2	-2,5 ± 0,4	6,7 ± 1,5
Плимутрок СМ79, линия «Смены 9»	3,1 ± 1,8	493,2 ± 17,4	-2,1 ± 0,2	-1,6 ± 0,3	0,0 ± 0,1	-0,4 ± 0,1	6,7 ± 2,2	-3,8 ± 0,5	5,0 ± 0,8
Юрловская	3,8 ± 1,8	434,7 ± 16,1	-5,6 ± 0,6	-4,7 ± 0,6	-9,0 ± 1,4	-0,6 ± 0,2	-1,1 ± 0,8	-4,7 ± 0,4	-7,5 ± 1,4
Хайсекс браун	2,3 ± 1,3	451,6 ± 17,2	-1,0 ± 0,9	-1,2 ± 2,2	0,8 ± 0,2	0,4 ± 1,0	10,1 ± 2,4	-0,4 ± 1,8	2,9 ± 2,3
Орловская	2,3 ± 1,2	428,3 ± 13,1	0,4 ± 0,2	-0,7 ± 0,3	-0,8 ± 0,2	-1,8 ± 0,3	12,4 ± 1,9	-2,5 ± 0,4	4,3 ± 0,8
						u _{эксп} < u _{крит}			

* В табл. 2 представлены ΔCt = Ct – Ct TBP.

Источник: составлено В.Ю. Титовым, И.И. Кочишем, О.В. Мясниковой, А.М. Долгоруковой, М.А. Зайцевым, П.С. Романовым, А.Р. Варданяном.

Внутри этих групп установлены большие различия в экспрессии генов. Например, экспрессия миостатина варьирует от -1,2 до -6,9 в группе 2 и от -1,6 до -5,4 в группе 1 в грудных мышцах (см. табл. 1). В ножных мышцах различия не меньшие (см. табл. 2). Только по экспрессии фактора миогенной дифференциации 1 (myoD1) и фактора миогенеза 5 (myf 5) в грудных и миогенина (myog) в ножных мышцах между этими группами были достоверные различия по критерию Манна — Уитни.

В связи с этим для установления зависимости между содержанием депонированного NO в тканях и экспрессией исследуемых генов наиболее информативным видится варьирование концентрацией депонированного NO в пределах одной породы, линии и кросса, используя блокаторы синтеза NO и субстрата его синтеза — аргинина.

Нитроаргинин эффективно ингибирует синтез NO, что приводит к снижению содержания метаболитов NO в тканях эмбриона, не изменяя при этом степень окисленности синтезированного NO до нитрата (табл. 3, 4), которая определяется особенностью тканей зародыша [6]. Но эффект Н не постоянен. Введенный перед закладкой на инкубацию, он эффективно ингибирует синтез NO в куриных и перепелиных эмбрионах до 11 суток. Затем его эффект исчезает, но возобновляется

после повторного ввода в яйцо [6]. Н — конкурентный ингибитор, конкурирующий с аргинином (А) — субстратом синтеза NO, за NO-синтазу. Введение в яйцо А вместе с Н в концентрации в 10 раз большей, чем Н, полностью снимало ингибирующий эффект последнего (табл. 3, 4).

Как мы установили, А в яйце находится в концентрации насыщения для NO — синтазы [6]. Его ввод в яйцо не приводит к интенсификации синтеза NO, но снимал эффект Н (табл. 3, 4).

Н, введенный до закладки на инкубацию, обеспечивал снижение интенсивности накопления метаболитов NO в эмбрионе к 7 суткам примерно на 70 % (табл. 3, 4). При этом в тканях эмбрионов кур, как и перепелов, имело место снижение экспрессии большинства исследуемых генов, которая не изменялась, если вместе с Н в яйцо вводился аргинин (Н+А). Содержание метаболитов NO в гомогенатах также не изменяется при вводе Н+А. Сам А, введенный в яйцо без Н, не оказывал достоверного воздействия ни на экспрессию генов (табл. 3), ни на содержание метаболитов NO в тканях эмбриона (табл. 3, 4).

Таблица 3

Влияние блокатора синтеза NO нитроаргинина на экспрессию ряда генов в 7- и 14-суточных эмбрионах кур линии Х2 кросса Хайсекс белый*

Группы	NO ₃ ⁻ / NO,%	До- норы NO+ нитрат, мкМ	Экспрессия(ген-TBP)						
			MSTN	Myf5	Mef2	GHR	Myog	MyoD1	Mhy1
7 суток									
К	1,5 ± 0,8	162,2±8,4	-2,45±0,25	-1,12±0,15	-0,21 ±0,23	-1,85±0,21	0,38±0,07	-1,15±0,18	-2,61 ±0,24
Н	1,4±1,1	54,8±5,5 <i>p</i> <0,05	-1,38±0,07 <i>p</i> <0,05	-0,07±0,04	0,48±0,13 <i>p</i> <0,05	-1,08±0,26 <i>p</i> <0,05	0,23±0,06	-0,25±0,06 <i>p</i> <0,05	-0,58±0,14 <i>p</i> <0,05
Н+А	1,6±0,9	167,1±8,8	-2,53±0,1	-0,77±0,11	-0,91±0,22	-2,01±0,28	-0,13±0,09	-0,70±0,13	-2,08±0,14
А	1,6±1,0	171,1±9,9	-2,49±0,15	-0,87±0,13	-0,58±0,22	-1,96±0,27	-0,08±0,07	-0,96±0,16	-2,91±0,26
14 суток грудь									
К	2,5±1,2	465,7±10,3	-2,43±0,38	1,31±0,05	-0,03±0,22	-1,85±0,34	-1,02±0,19	-1,83±0,22	-3,72±0,15
Н	2,6±1,2	250,2±9,5 <i>p</i> < 0,05	-1,18±0,06 <i>p</i> <0,05	1,67±0,29	0,53±0,17 <i>p</i> <0,05	-1,01±0,18 <i>p</i> <0,05	-0,54±0,16 <i>p</i> <0,05	-0,80±0,20 <i>p</i> <0,05	-2,93±0,12 <i>p</i> <0,05
Н+А	2,8±1,5	462,4±11,2	-1,56±0,09	-1,12±0,06	-0,13±0,23	-1,35±0,09	-2,30±0,31	-1,91±0,27	-3,52±0,20
14 суток бедро									
К	2,5±1,2	475,7±10,3	-1,36±0,08	-0,42±0,14	1,37±0,24	0,12±0,1	-1,60±0,26	-0,44±0,27	-2,47±0,44
Н	2,6±1,2	239,2±8,5 <i>p</i> <0,05	-0,14±0,22 <i>p</i> <0,05	1,21±0,21 <i>p</i> <0,05	1,42±0,33	0,57±0,35	-1,05±0,14 <i>p</i> <0,05	0,01±0,15 <i>p</i> <0,05	-0,35±0,19 <i>p</i> <0,05
Н+А	2,8±1,5	452,3±11,2	-1,07±0,18	-0,51±0,30	0,1±0,19	-1,08±0,14	-2,29±0,27	-0,76±0,26	-1,64±0,41

*В яйца группы Н перед закладкой на инкубацию и на 11-е сутки вводилось 0,3 мл 30 мМ нитроаргинина; в группе Н+А — перед закладкой и на 11-е сутки — 0,15 мл 60 мМ нитроаргинина + 0,15 мл 600 мМ аргинина; в контрольную (К) в эти же сроки — 0,3 мл стерильного физиологического раствора. В группу А перед закладкой — 0,3 мл 300 мМ аргинина.

Источник: составлено В.Ю. Титовым, И.И. Кочишем, О.В. Мясниковой, А.М. Долгоруковой, М.А. Зайцевым, П.С. Романовым, А.Р. Варданяном.

Из тех генов, на экспрессию которых Н оказывал достоверное влияние по снижению экспрессии, отметим прежде всего миостатин (MSTN). У кур она на 7-е сутки снижалась более чем в 2 раза (см. табл. 3), у перепелов на 6-е сутки — в 7 раз (табл. 4). Также экспрессия гонадотропного гормона (GHR) снижалась в 1,3 раза у перепелов и в 2 раза у кур. На экспрессию других генов эффект не везде однозначен. Так на экспрессию фактора миогенеза 5 (myf5) у перепелов не было достоверного эффекта (табл. 4), у кур — на грани достоверности (см. табл. 3). На экспрессию фактора пролиферации миоцитов 2 (mef2) достоверный эффект был у кур — снижение в 1,6–1,7 раза. У перепелов достоверного эффекта не было (табл. 4). На экспрессию миогенина (myog) у кур на 7-е сутки достоверного эффекта не было. У перепелов достоверное снижение экспрессии в 1,5 раза. На экспрессию фактора миогенной дифференциации 1 (myoD1) достоверный эффект на 7-е сутки не наблюдался у кур. Экспрессия миозина (mhy 1) у кур достоверно снижалась в 2–4 раза. У перепелов этот ген не представлен (табл. 3, 4).

Н, введенный повторно на 11-е сутки, на 14-е сутки вызывал снижение накопления метаболитов NO в тканях эмбриона на 50...60 % (табл. 3, 4). Это сопровождалось изменением экспрессии исследуемых генов, прежде всего, миостатина (MSTN) и гонадотропного гормона (GHR). У кур экспрессия MSTN под действием Н снижалась в 2,3–2,4 раза в ткани грудных и ножных мышц (см. табл. 3), у перепелов в грудных — в 1,17 раза, в ножных — в 1,9 (табл. 4). Экспрессия GHR снижалась у кур в 1,4...1,7 раза, у перепелов в грудных мышцах снижение экспрессии в 1,5 раза, в ножных — в 2,7 раза (табл. 3, 4). Сохранялись и эффекты на другие гены. Заметим, что различия в экспрессии генов между грудными и ножными мышцами в некоторых случаях существенные, несмотря на то что достоверной разницы по содержанию метаболитов NO между ними нет.

Таблица 4

Влияние блокатора синтеза NO нитроаргинина на экспрессию ряда генов в 6- и 13-суточных эмбрионах перепелов породы японская серая*

Группы	NO ₃ ⁻ / NO,%	Доноры NO+нитрат, мкМ	Экспрессия (ген-TBP)					
			MSTN	Myf5	Mef2	GHR	Myog	MyoD1
6 суток								
К	1,1±0,8	149,3±7,9	-0,61±0,06	2,82±0,06	-1,56±0,08	-0,20±0,08	-0,80±0,30	0,05±0,05
Н	1,2±0,8	28,1±2,1 <i>p</i> <0,05	2,20±0,80 <i>p</i> <0,05	2,94±0,10	-1,22±0,09	0,21±0,10 <i>p</i> <0,05	-0,20±0,05 <i>p</i> <0,05	0,15±0,10
Н+А	1,1±0,8	150,5±8,1	-1,48±0,18	2,46±0,08	-1,10±0,11	-0,15±0,18	-0,74±0,09	0,21±0,07
13 суток грудь								
К	2,5±1,5	576,6±13,3	0,20±0,16	2,29±0,13	0,21±0,07	0,91±0,12	0,89±0,18	0,66±0,12
Н	2,4±1,2	322,4±11,2 <i>p</i> <0,05	0,42±0,08	2,39±0,13	0,18±0,07	1,54±0,04 <i>p</i> <0,05	1,21±0,13	0,91±0,17

Окончание табл. 4

Группы	NO ₃ ⁻ / NO,%	Доноры NO+нитрат, мкМ	Экспрессия (ген-TBP)					
			MSTN	Myf5	Mef2	GHR	Myog	MyoD1
13 суток бедро								
К	2,4±1,5	565,4±12,8	-0,43±0,13	2,20±0,13	-0,27±0,07	0,15±0,18	0,21±0,10	0,38±0,06
Н	2,3±1,4	308,1±12,8 <i>p</i> < 0,05	0,48±0,20 <i>p</i> < 0,05	2,71±0,13	0,39±0,17 <i>p</i> < 0,05	1,60±0,24 <i>p</i> < 0,05	1,24±0,14 <i>p</i> < 0,05	1,14±0,09 <i>p</i> < 0,05

*В яйца группы Н перед закладкой на инкубацию и на 11-е сутки вводилось 0,15 мл 15 мМ нитроаргинина. В группе Н+А — перед закладкой и на 11-е сутки — 0,15 мл (30 мМ нитроаргинина + 300 мМ аргинина 1:1). В контрольную (К) в эти же сроки — 0,3 мл стерильного физиологического раствора.

Источник: составлено В.Ю. Титовым, И.И. Кочишем, О.В. Мясниковой, А.М. Долгоруковой, М.А. Зайцевым, П.С. Романовым, А.Р. Вardanяном.

Ввод Н+А снимал эти эффекты, как снимал и эффект Н по снижению концентрации метаболитов NO (см. табл. 3, 4).

В литературе есть точка зрения, что NO имеет эпигенетический эффект, оказывая влияние на метилирование гистоновых белков, ингибируя ферменты, осуществляющие деметилирование [2]. Есть основание предполагать, что в эмбрионах птиц в качестве регулятора экспрессии выступает механизм окисления NO до нитрата. Исходя из анализа наследования степени окисления NO в эмбрионе, этот процесс определяется как минимум двумя генами [6]. Т.е. наследуются гены, детерминирующие активацию окисления NO.

О том, каков механизм этого окисления можно сказать только то, что накопления нитрита в тканях не происходит [6]. Следовательно, окисление происходит без генерации в окружающую среду активных форм азота. На сегодняшний день мы не знаем способа искусственно снизить интенсивность этого окисления. Но есть способ искусственно его повысить. Это облучение инкубируемых эмбрионов зеленым светом, которое приводит к некоторому увеличению скорости роста [10—12], а также к достоверному увеличению степени окисления эмбрионального NO [6, 7]. Эффекты на экспрессию генов, наблюдаемые нами под действием облучения, были по некоторым генам схожи с наблюдаемыми под действием блокатора NO-синтазы [7]. Мы не рискуем рассматривать облучение зеленым светом как полноценный контроль, поскольку свет может оказывать и другие эффекты, не связанные с NO. Но сопоставление этого эффекта с эффектом нитроаргинина, который блокирует синтез NO, но не влияет на степень его окисления (см. табл. 3, 4), а также со средними величинами экспрессии у яичных и мясных форм (см. табл. 1, 2) дает основание предполагать, что эффект связан с концентрацией соединений-доноров NO в тканях. К последним относятся, нитрозотиолы (RSNO), динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), некоторые высокомолекулярные нитраты [5, 13].

Заключение

Таким образом, снижение содержания соединений-доноров NO приводит к снижению экспрессии большинства исследованных генов, ответственных за миогенез. Отметим снижение экспрессии миостатина, ответственного за подавление роста и дифференциации мышечной ткани. Следовательно, оксид азота в птичьем эмбрионе может играть роль прежде всего регулятора роста мышечной ткани, что важно для быстрорастущих форм, поскольку пролиферация миобластов происходит на эмбриональной стадии развития. Регуляция может осуществляться путем активации механизмов окисления NO до нитрата.

Список литературы

1. Vasudevan D., Bovee Rh., Thomas D. Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes // *Nitric Oxide*. 2016. Vol. 59. P. 54–62. doi: 10.1016/j.niox.2016.08.002 EDN: XZGAXR
2. Hickok J., Vasudevan D., Antholine W., Thomas D. Nitric oxide modifies global histone methylation by inhibiting jumonji C domain-containing demethylases // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288. No 22. P. 16004–16015. doi: 10.1074/jbc.M112.432294
3. Socco S., Bovee Rh., Palczewski M., Hickok J., Thomas D. Epigenetics: The third pillar of nitric oxide signaling // *Pharmacological Research*. 2017. Vol. 121. P. 52–58. doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.011
4. Cazzato D., Assi E., Moscheni C., Brunelli S., De Palma C., Cervia D., Perrotta C., Clementi E. Nitric oxide drives embryonic myogenesis in chicken through the upregulation of myogenic differentiation factors // *Experimental Cell Research*. 2014. Vol. 320. P. 269–280. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.11.006 EDN: SSFUQH
5. Titov V. Yu. The Enzymatic technologies open new possibilities for studying nitric oxide (NO) Metabolism in living systems // *Current Enzyme Inhibition*. 2011. Vol. 7. No 1. P. 56–70. doi: 10.2174/157340811795713774 EDN: OIAEVH
6. Титов В.Ю., Кочиш И.И., Долгорукова А.М. Оксид азота (NO) в эмбриональном и постэмбриональном развитии птиц. М.: Зооветкнига, 2022. 140 с. <https://elib.spbstu.ru/dl/2/z22-25.pdf/info> doi: 10.18720/SPBPU/2/z22-25 EDN: VSDSLT
7. Титов В.Ю., Долгорукова А.М., Кочиш И.И., Мясникова О.В. Содержание оксида азота (NO) и экспрессия генов, ответственных за миогенез, в эмбриональных тканях кур (*Gallus gallus domesticus* L.) // *Сельскохозяйственная биология*. 2024. Т. 59. № 2. С. 316–327. doi: 10.15389/agrobiol.2024.2.316rus EDN: BTJQCF
8. Krych-Madej J., Gebicka L. Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies // *J. Inorg. Biochem.* 2017. Vol. 171. P. 10–17. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.02.023 EDN: YYAUVF
9. Schmittgen T., Livak K. Analyzing real — time PCR data by comparative CT method // *Nature Protocols*, 2008. Vol. 3. No 6. P. 1101–1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73
10. Rozenboim I., El Halawani M., Kashash Y., Piestun Y., Halevy O. The effect of monochromatic photostimulation on growth and development of broiler birds // *General and Comparative Endocrinology*. 2013. Vol. 190. P. 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.027>
11. Sobolewska A., Elminowska-Wenda G., Bogucka J., Szpinda M., Walasik K., Bednarczyk M., Paraczewska-Achtel M. Myogenesis — Possibilities of its Stimulation in Chickens // *Folia biologica (Kraków)*. 2011. Vol. 59. No 3-4. P. 85–90. doi: 10.3409/fb59_3-4.85-90
12. Halevy O., Piestun Y., Rozenboim I., Yablonka-Reuveni Z. In ovo exposure to monochromatic green light promotes skeletal muscle cell proliferation and affects myofiber growth in posthatch chicks // *Am.J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. Vol. 290. No 4. R1062–R1070. doi: 10.1152/ajpregu.00378.2005
13. Vanin A.F. Physico-chemistry of dinitrosyl iron complexes as a determinant of their biological activity // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. No 19. ID 10356. doi: 10.3390/ijms221910356 EDN: CKMCHK

Об авторах:

Титов Владимир Юрьевич — доктор биологических наук, профессор кафедры радиобиологии и биофизики, Московская государственная ветеринарная академия — МВА им. К.И. Скрябина, Российская

Федерация, 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23; главный научный сотрудник, Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, Российская Федерация, 141311, Московская область, г. Сергиев Посад, ул. Птицеградская, д. 10; e-mail: vtitov43@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-2639-7435 SPIN-код: 3912-0315

Кочиш Иван Иванович — доктор сельскохозяйственных наук, академик РАН, заведующий кафедрой зоогигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой, Московская государственная ветеринарная академия — МВА им. К.И. Скрябина, Российская Федерация, 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23; e-mail: kochish.I@mail.ru

ORCID: 0000-0001-8892-9858 SPIN-код: 9333-9995

Мясникова Ольга Вячеславовна — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры зоогигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой, Московская государственная ветеринарная академия — МВА им. К.И. Скрябина, Российская Федерация, 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23; e-mail: omyasnikova71@gmail.com

ORCID: 0000-0002-9869-0876 SPIN-код: 1466-8393

Долгорукова Анна Михайловна — кандидат биологических наук, заведующая отделом инкубации, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, Российская Федерация, 141311, Московская область, г. Сергиев Посад, ул. Птицеградская, д. 10; e-mail: anna.dolg@mail.ru

ORCID: 0000-0002-9958-8777 SPIN-код: 7630-3146

Зайцева Мария Александровна — студент 3 курса факультета биотехнологии и экологии, Московская государственная ветеринарная академия — МВА им. К.И. Скрябина, Российская Федерация, 109472, г. Москва, 109472, ул. Академика Скрябина, д. 23; e-mail: may-zay@yandex.ru

Романов Петр Сергеевич — студент 3 курса факультета биотехнологии и экологии, Московская государственная ветеринарная академия — МВА им. К.И. Скрябина, Российская Федерация, 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23; e-mail: romanovpeter1367@yandex.ru

Варданян Арутюн Робертович — кандидат биологических наук, научный сотрудник, Научный центр оценки и анализа рисков безопасности пищевых продуктов, Республика Армения, 0071, г. Ереван, Матисское шоссе, д. 107/2; e-mail: harvard3@yandex.ru

ORCID: 0009-0002-1050-8433