

СОДЕРЖАНИЕ ОКСИДА АЗОТА (NO) И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА МИОГЕНЕЗ, В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ КУР (*Gallus gallus domesticus* L.)*В.Ю. ТИТОВ^{1, 2}✉, А.М. ДОЛГОРУКОВА¹, И.И. КОЧИШ²,
О.В. МЯСНИКОВА²

Известно, что оксид азота участвует в процессе миогенеза у птиц. Ранее мы установили, что в эмбрионах птицы мясного направления продуктивности имеет место интенсивное окисление оксида азота, в то время как в эмбрионах яичных кур оно незначительное и NO накапливается в составе соединений-доноров. В пределах породы, линии и кросса степень окисления эмбрионального NO варьировала не более чем на 15 %, и указанный признак наследуется. В связи с этим возникает ряд вопросов. Если мясная продуктивность каким-либо образом связана со степенью окисления оксида азота, то какова его роль? Оказывает ли сам NO или продукты его окисления эпигенетическое воздействие в процессе эмбриогенеза? Как осуществляется окисление NO в тканях эмбриона и какова непосредственная физиологическая роль этого процесса? Можно ли регулировать развития эмбриона, воздействуя на синтез NO или стимулируя его окисление? Цель работы заключалась в сопоставлении изменения содержания NO в тканях эмбрионов кур мясного и яичного направлений продуктивности с изменением экспрессии ряда генов, вовлеченных в миогенез, для выяснения механизмов возможного эпигенетического эффекта NO как фактора регуляции эмбрионального развития. Мы показали, что с концентрацией NO, включенного в состав соединений-доноров, связана экспрессия нескольких генов, ответственных за миогенез. Для исследования были взяты эмбрионы кур (*Gallus gallus domesticus* L.) яичного кросса Hisex White и породы мини-мясная (линия A77, группа 2), характеризующиеся соответственно высокой и низкой интенсивностью окисления эмбрионального NO. В тканях гомогената эмбриона на 6-е сут и в гомогенатах грудных мышц и мышц бедра на 14-е сут оценивали экспрессию семи генов, участвующих в миогенезе или влияющих на него. Это гены фактора пролиферации миоцитов 2с (*Mef 2c*), миогенной дифференциации 1 (*MyoD1*), фактора миогенеза 5 (*Myf 5*), миозина (*Myh 1*), миогенина (*Myog*), миостатина (*MSTN*), рецептора гормона роста (*GHR*). В качестве референсного гена использовался ген домашнего хозяйства *TBP* (ген ТАТА-связывающего белка). При инкубации определяли концентрацию эмбрионального NO и интенсивность его окисления в сопоставлении с транскрипционной активностью генов миогенеза при применении *in ovo* нитроаргинина (NA, блокатор синтеза NO) и зеленого света (фактор, способствующий интенсификации окисления эмбрионального NO до нитрата, но не влияющий на интенсивность синтеза NO). NA при введении перед закладкой на инкубацию на 6-е сут приводил к снижению концентрации соединений-доноров NO в гомогенате эмбриона на 70 % и повышал экспрессию генов *MyoD1*, *Myog* и *Mef 2c* в эмбрионах кур яичного кросса Hisex White. У породы мини-мясных кур (линия A77, группа 2), для которых характерно низкое содержание депонированного NO, имела место та же тенденция (снижение концентрации соединений-доноров и повышение экспрессии генов *MyoD1*, *Myog* и *Mef 2c*), но разница между контролем и опытом была менее выражена. Использование зеленого света во время инкубации также способствовало повышению экспрессии генов *MyoD1*, *Myog* и *Mef 2c* на 6-е сут инкубации. На основании этих данных можно предположить, что на экспрессию указанных генов влияет концентрация депонированного NO в тканях эмбриона. Факторы, вызывающие снижение концентрации депонированного NO, усиливают экспрессию генов вне зависимости от способа снижения (менее интенсивный синтез или более активное окисление). Следовательно, окисление NO в тканях эмбриона может быть способом регуляции экспрессии генов. Механизмы, обеспечивающие это окисление, наследуются. Искусственная регуляция содержания доноров NO в тканях эмбриона проблематична, поскольку аргинин — источник NO в птичьем эмбрионе находится в концентрации насыщения для NO-синтазы, а блокатор синтеза NO нитроаргинин эффективно подавляет синтез NO только на протяжении первых 7 сут инкубации. При этом степень окисления NO в эмбрионе является высокочувствительным параметром для селекционного отбора.

Ключевые слова: оксид азота, экспрессия генов, эмбриогенез птиц, миогенез.

О том, что NO интенсивно синтезируется в процессе эмбриогенеза, сообщали многие исследователи (1-3). Такие выводы сделаны на основании анализа действия блокаторов NO-синтазы и экзогенных соединений — доноров NO. Обсуждается роль NO в качестве эндогенного эпигенетического

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

регулятора экспрессии генов и клеточного фенотипа (4, 5), рассматриваются эффекты NO в отношении экспрессии некоторых генов у бактерий (6-8), генов опухолей (9), генов, ответственных за миогенез (10), предполагаются различные механизмы действия, в частности модификация метилирования гистоновых белков (11-13) Но в этих работах не учитывалось содержание метаболитов NO в тканях. Следовательно, полученные данные не давали представления об интенсивности как синтеза, так и метаболизма NO и о том, как влияют на эти параметры экзогенно вводимые доноры NO, блокаторы NO-синтазы и аргинин — ее субстрат. Мы при помощи высокочувствительного и высокоспецифичного ферментного сенсора (14) установили, что с начала развития в птичьей эмбрионе — замкнутой системе интенсивно накапливаются метаболиты NO. Их концентрация в эмбрионах одного вида примерно одинакова. Но у одних пород, линий и кроссов метаболиты NO аккумулируются преимущественно в виде соединений-доноров NO, тогда как у других в виде продукта окисления NO — нитрата NO₃⁻. Причем нитрат накапливается преимущественно в эмбрионах мясных пород, линий и кроссов. В них степень окисления NO до нитрата более 90 %. В эмбрионах птицы яичного направления продуктивности аккумулировались в основном соединения-доноры NO при степени окисления NO до нитрата не более нескольких процентов. Были и промежуточные формы по этому признаку. В пределах породы, линии и кросса степень окисления NO различается не более чем на 10-15 % (15, 16). Анализ характера наследования этого признака у гибридов F₁ указывает на то, что он обусловлен не одним, а несколькими генами (16).

Известный фактор, способствующий увеличению скорости постэмбрионального роста, — зеленый свет при инкубации также усиливал окисление эмбрионального NO (15, 16).

Так как нитрат накапливается в основном в мышечной ткани, можно предположить, что именно в ней происходит окисление NO (15, 16).

Однако до сих пор неясен механизм взаимосвязи между степенью окисления эмбрионального NO и особенностями постэмбрионального развития у птицы. Применение гистологических методов показало отсутствие качественных различий в миогенезе у эмбрионов с высокой и низкой степенью окисления NO (16).

Данные, полученные D. Cazzato с соавт. (10), указывали на связь NO с экспрессией генов, вовлеченных в миогенез. Но авторы не оценивали содержание NO в тканях, предположительно связанное с экспрессией генов. Есть и другие работы, указывающие на наличие влияния NO на развитие и состояние мышц (17-22), в частности на дифференциацию и пролиферацию миобластов (17-19), на активацию клеток-сателлитов (20, 21), на предотвращение деградации миофибрилл (22). И также отсутствовал контроль содержания метаболитов NO в тканях.

В представляемой работе мы изучили взаимосвязь процессов накопления соединений-доноров NO в тканях и их окисления до нитрата с экспрессией семи генов миогенеза, исследованных D. Cazzato с соавт. (10). Такое сравнение позволило ответить на вопрос, оказывает ли эмбриональный NO эпигенетическое воздействие, как происходит окисление NO в тканях эмбриона, какова непосредственная физиологическая роль этого процесса и можно ли регулировать развитие эмбриона, воздействуя на синтез NO или стимулируя его окисление.

Нашей целью было сопоставление изменения содержания NO в тканях эмбрионов кур мясного и яичного направлений продуктивности с изменением экспрессии некоторых генов, вовлеченных в миогенез, для

выявления роли, механизмов возможного эпигенетического эффекта NO как фактора регуляции эмбрионального развития.

Методика. Эксперимент проводили на эмбрионах кур (*Gallus gallus domesticus* L.) яичного кросса Hisex White и породы мини-мясная (линия A77, группа 2) соответственно с низкой и высокой степенью эмбрионального окисления NO.

Инкубацию проводили в условиях вивария (ФГБУ СГЦ «Загорское», ЭПХ ВНИТИП, г. Сергиев Посад, Московская обл., 2023–2024 годы). Использовали инкубаторы Стимул Инк-1000 («Рэмил», Россия). Температура с 1-х по 18-е сут (инкубационный период) — 37,6 °С, с 19-х по 21-е сут (выводной период) — 37,2 °С в соответствии с рекомендациями (23). Препарат блокатора NO-синтазы N ω -нитро-L-аргинина (НА) для введения в яйцо готовили на стерильном физиологическом растворе, в контроле использовали только физиологический раствор. Препараты вводили шприцем через отверстие в скорлупе со стороны воздушной камеры. Отверстие диаметром 1 мм просверливали микросверлом. После введения препаратов отверстие заклеивали медицинским клеем БФ-6. В эксперименте по выявлению эффекта освещения зеленым светом использовали инкубаторы ИПХ-10 (ЗАО «Пятигорсксельмаш», Россия) с энергосберегающими лампами Navigator NCL-SH10 мощностью 15 Вт с зеленым светофильтром (световой поток 975 лм), в контроле яйца находились в темноте, в опыте — при круглосуточном освещении с 1-х по 14-е сут. Повторность опыта 4-кратная, повторы выполняли со сменой инкубаторов. Для выявления эффектов освещения и N ω -нитро-L-аргинина брали яйца от одной несушки.

Гомогенаты содержимого яйца, лишённого скорлупы, получали в стеклянном гомогенизаторе («DWK Life Sciences GmbH», Германия; 6 °С, 8 мин, 40 фрикций/мин), после 11-х сут инкубации применяли измельчитель («Oster», Мексика).

Для определения концентрации метаболитов NO в гомогенатах эмбриона или его тканей использовали разработанный нами ферментный сенсор (14, 24).

Для оценки относительной экспрессии генов на 6-е и 14-е сут инкубации отбирали не менее 5 эмбрионов из каждой группы, наиболее соответствующих по развитию своей возрастной стадии. У каждого эмбриона брали образцы тканей размером не более 5×5 мм (туловище эмбриона на 6-е сут, ткань грудной мышцы и мышцы бедра на 14-е сут). Образцы помещали в пробирки типа эппендорф объемом 2 мл с 1 мл консервирующего реагента RNeasy RNA Stabilization Reagent («Qiagen N.V.», Германия) и хранили при –20 °С до анализа.

Тотальную РНК из образцов тканей выделяли согласно протоколу производителя используемого набора RNeasyMini Kit («Qiagen N.V.», Германия). Концентрацию и качество выделенной из тканей РНК оценивали с помощью настольного флуориметра Qubit 3.0 («ThermoFisher Scientific», США) с набором Qubit™ RNA HS Assay Kit («ThermoFisher Scientific», США). Загрязняющую геномную ДНК в образцах РНК удаляли при помощи набора RapidOut DNA Removal Kit («ThermoFisher Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Синтез одноцепочечной комплементарной ДНК (кДНК) на тотальной РНК выполняли с набором iScript RT Supermix («Bio-Rad», США) в программируемом термостате ГНОМ («ДНК-Технология», Россия) согласно протоколу производителя.

Реакцию амплификации (ПЦР в реальном времени — ПЦР-РВ, детекция флуоресцентным красителем SYBR Green) с праймерами семи участвующих в миогенезе или влияющих на него генов — гена миостатина *MSTN*,

рецептора гормона роста *GHR*, фактора миогенной дифференциации 1 *MyoDI*, фактора миогенеза 5 *Myf 5*, миогенина *Myog*, фактора пролиферации миоцитов 2с *Mef 2c*, миозина *Myh 1*, а также референсного гена домашнего хозяйства *TBP* (ген ТАТА-связывающего белка) (ЗАО «Евроген», Россия) проводили с набором Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) («ThermoFisher Scientific», США) в стандартных 96-луночных планшетах Semi-Skirted 96-well PCR Plate. Планшеты заклеивали оптически прозрачной пленкой UltraFlux RT-PCR («SSIbio», США) для предотвращения контаминации и испарения ПЦР-смеси и помещали в амплификатор Light Cycler® 96 System («Roche», Швейцария). В качестве отрицательного контроля использовали буферные растворы и деионизированную воду. Экспрессию генов-кандидатов в количественной детекции ПЦР-РВ рассчитывали относительно референсного гена *TBP* методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (25). Анализ экспрессии генов выполнен в Международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы (кафедра зоогиены и птицеводства им. А.К. Даниловой, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина).

Полученные данные анализировали с использованием программы Microsoft Excel 2007. Результаты представлены в виде средних значений (*M*) и стандартных ошибок средних ($\pm SEM$). Оценку достоверности различий между сравниваемыми показателями проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Ферментативный сенсор дает возможность оперативно контролировать состав нитро- и нитрозосоединений. Используемый нами ферментный сенсор основан на свойстве нитрита (NO_2^-), S-нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) и нетиолатных нитрозосоединений, не содержащих железа (RNO), обратимо ингибировать фермент каталазу в присутствии галоид-ионов и терять способность ингибировать под воздействием ряда соединений, различных для каждой группы (14, 24). Все нитросоединения и нитрат восстанавливали до нитритов треххлористым ванадием, вследствие чего они приобретали ингибирующие свойства нитрита (14). Высокомолекулярные нитросоединения, способные продуцировать ДНКЖ (RNO_2), определяли как вещества, приобретающие ингибирующие свойства ДНКЖ в присутствии двухвалентного железа и тиолов (14).

Активность каталазы определяли калориметрическим методом, основанным на контроле кинетики теплопродукции, сопровождающей разложение перекиси водорода (14). В тканях нет процессов, идущих со сравнимым тепловым эффектом и способных приводить к искажению данных. Такой контроль позволяет проводить измерение без какой-либо предварительной подготовки и очистки образца в нейтральной среде, поскольку нет необходимости в очистке от соединений, окрашивающих препараты и приводящих мутность. То есть концентрацию исследуемых соединений можно определять без их модификации. Приборной основой сенсора служит высокочувствительный калориметр «Dithermanal» (Венгрия) либо ВДК -1 «Главдиагностика» (Россия). Чувствительность определения концентрации нитрозосоединений — до 50 нМ (14).

В специальной литературе описаны другие ферментные сенсоры для определения концентрации нитрита, также основанные на принципе ингибирования каталазы (26, 27).

Таким образом, мы можем без подготовки образца и модификации объекта определить концентрацию всех соединений, имеющих $NO(NO^+)$

группу и способность передавать эту группу на другие соединения, определив их принадлежность к RSNO, ДНКЖ, RNO₂, а также неорганическому нитрату.

Факторы, влияющие на интенсивность синтеза и окисления NO в курином эмбрионе. Как видно из данных, приведенных в таблице 1, метаболиты NO накапливаются в тканях эмбриона кур с первых суток инкубации. Причем вначале накапливаются доноры NO (RSNO, ДНКЖ, RNO₂), а затем в эмбрионах мясных форм происходит их окисление до нитрата. Накопление заканчивается на 3-и сут, достигая суммарной концентрации в гомогенате 130-150 мкмоль/л. С 3-х по 11-е сут этот показатель существенно не изменяется. С 11-х сут концентрация начинает расти, достигая к 14-м сут 600-800 мкмоль/л (15, 16). Логично оценить взаимосвязь экспрессии генов с содержанием метаболитов NO в тканях в раннем эмбриогенезе между 3-ми и 11-ми сут, когда концентрация метаболитов NO в тканях стабильна, а также после 11-х сут, когда происходит стремительное накопление метаболитов NO.

1. Концентрация (мкмоль/л) доноров NO и нитрата (NO₃⁻) в эмбрионах кур (*Gallus gallus domesticus* L.) разного направления продуктивности под влиянием нитроаргина (НА) и зеленого света на 7-е и 14-е сут инкубации (M±SEM, виварий ФГБУ СГЦ «Загорское», ЭПХ ВНИТИП, г. Сергиев Посад, Московская обл.)

Вариант	7-е сут		14-е сут	
	доноры NO	NO ₃ ⁻	доноры NO	NO ₃ ⁻
Яичный кросс Hisex White				
Контроль (n = 6)	140,5±7,2	< 0,1	629,8±17,1	2,1±1,1
Введение in ovo:				
0,3 мл физиологического раствора перед закладкой на инкубацию (n = 6)	138,5±6,9	< 0,1	636,5±18,3	1,9±1,2
0,3 мл физиологического раствора на 11-е сут инкубации (n = 10)	141,6±7,7	< 0,1	641,4±19,1	2,1±1,3
0,3 мл 30 мМ НА перед закладкой на инкубацию (n = 6)	39,5±3,1	< 0,1	631,5±18,9	1,9±1,3
0,3 мл 30 мМ НА на 11-е сут инкубации (n = 7)	142,7±7,1	< 0,1	369,6±12,6	1,8±0,9
Воздействие зеленым светом с 1-х по 14-е сут (n = 10)	52,8±3,4	88,3±4,5	235,4±9,9	402,6±13,9
Порода мини-мясная (линия А77, группа 2)				
Контроль (n = 10)	1,9±0,9	143,3±6,8	10,2±2,4	762,1±18,6
Введение in ovo:				
0,3 мл физиологического раствора перед закладкой на инкубацию (n = 6)	1,8±0,6	144,1±7,1	10,8±2,3	758,3±19,2
0,3 мл физиологического раствора перед закладкой на 11-е сут инкубации (n = 7)	1,8±0,6	142,8±7,3	11,1±2,2	759,4±18,8
0,3 мл 30 мМ НА перед закладкой на инкубацию (n = 8)	1,4±0,4	38,8±3,1	11,5±2,2	751,5±18,7
0,3 мл 30 мМ НА на 11-е сут инкубации (n = 6)	1,7±1,0	141,7±7,7	6,9±1,0	468,8±12,1

Блокатор NO-синтазы N ω -нитро-L-аргинин (НА) эффективно подавляет эмбриональный синтез NO только при введении до закладки яиц на инкубацию, поскольку до 11-х сут амниотическая оболочка для него непроницаема (15, 16). Достоверное снижение концентрации производных NO при введении НА до закладки наблюдали на 7-е, но не на 14-е сут. Снижение их концентрации на 14-е сут наблюдалось при введении НА на 11-е сут. Но эффективность блокирования значительно меньше — на 40 %, в то время как при вводе НА до закладки на инкубацию на 7-е сут регистрируется снижение более чем на 70 % (см. табл. 1).

Использование зеленого света — известный способ повышения скорости роста и мясной продуктивности птицы (28-30). Ранее мы показали,

что зеленый свет способствует интенсификации окисления NO в эмбрионе (15). В представляемом исследовании зеленый свет, используемый в процессе инкубации, индуцирует окисление эмбрионального NO в течение всего эмбриогенеза (см. табл. 1).

Влияние блокаторов синтеза NO и зеленого света на экспрессию некоторых генов. Условия амплификации при оценке экспрессии генов представлены в таблице 2.

2. Праймеры и режимы амплификации, использованные при оценке экспрессии генов, участвующих в миогенезе или влияющих на него

Ген (белок)	Температура отжига, °C	Пара праймеров (5' → 3')
<i>TBP</i> (Тата-связывающий белок)	64	F: AGCTCTGGGATAGTGCCACAG R: ATAATAACAGCAGCAAAACGCTTG
<i>Myh 1</i> (миозин)	64	F: AGACAAAAACCTGGTGCC R: CCTCGTCTCCACCATTCTTG
<i>MyoD1</i> (фактор миогенной дифференциации 1)	64	F: CGTGAGCAGGAGGATGCATA R: GGGACATGTGGAGTTGTCTG
<i>Myf 5</i> (фактор миогенеза 5)	64	F: TGCCCTGAGGAAGAGAACAC R: ACGATGCTGGAGAGGCAGTC
<i>Mef 2c</i> (фактор пролиферации миоцитов 2c)	58	F: AGCAGCTAGCCACTTCTC R: AATATTCACCACCCGGTTCA
<i>Myog</i> (миогенин)	58	F: AGCCTCAACCAGCAGGAG R: TGCGCCAGCTCAGTTTTGGA
<i>MSTN</i> (миостатин)	64	F: TTTAGAGGTCAGAGTTACAGACAC R: TTTAGGTGCTATAATCCAGTCCCA
<i>GHR</i> (рецептор гормона роста)	54	F: CAGATACTGACAGGCTCCTGAGT R: GAGATGGCATCATATGTGTCGCT

Примечание. Режим амплификации: горячий старт — 95 °C, 600 с; 40 циклов — денатурация при 95 °C, 15 с, отжиг праймеров при указанной в таблице температуре, 30 с, элонгация при 72 °C, 30 с.

Относительную экспрессию генов интереса оценивали методом 2^{-ΔΔСТ}, где Ст — ПЦР-цикл, в котором флуоресцентный сигнал от красителя пересекает установленный пороговый уровень. Таким образом, чем меньше величина Ст, тем интенсивнее идет амплификация и, следовательно, тем выше экспрессия гена.

Введение НА перед закладкой на инкубацию снижало концентрацию метаболитов NO в туловище эмбриона, регистрируемую на 6-е сут, на 70 %, но не влияло на степень их окисления до нитрата (табл. 3).

Это снижение сопровождалось увеличением экспрессии генов миогенной дифференцировки 1 (*MyoD1*), миогенина (*Myog*), фактора пролиферации миоцитов 2c (*Mef 2c*). У яичного кросса Hisex White в тканях эмбриона увеличение экспрессии этих генов было достоверным, у породы мини-мясных кур достоверно повышалась только экспрессия гена *MyoD1*, но наблюдалась та же тенденция, что и у кросса Hisex White (см. табл. 3).

Экспрессия этих же генов (*MyoD1*, *Myog* и *Mef 2c*) достоверно увеличивалась под действием зеленого света (см. табл. 3). Зеленый свет не блокирует синтез NO, но интенсифицирует окисление NO до нитрата (15, 16). Следовательно, блокатор синтеза NO и активатор его окисления оказывают схожий эффект на экспрессию исследуемых генов.

Степень окисления эмбрионального NO под действием света сохраняется до заключительной стадии эмбриогенеза (см. табл. 1). Но на 14-е сут в гомогенатах мышц эмбрионов в опыте экспрессия большинства исследуемых генов снижалась по сравнению с контролем, при этом в грудных мышцах достоверное снижение отмечали для *MyoD1* и *Myf 5*, в мышцах бедра и голени — только для *Myf 5* (табл. 4). Во всех образцах мышечной ткани эмбрионов из опытной группы имела место более высокая экспрессия гена миогенина *Myog*.

3. Экспрессия генов, участвующих в миогенезе или влияющих на него, в 6-суточных эмбрионах кур (*Gallus gallus domesticus*) разного направления продуктивности при воздействии блокатора синтеза NO нитроаргинина и зеленого света ($M \pm SEM$, виварий ФГБУ СГЦ «Загорское», ЭПХ ВНИТИП, г. Сергиев Посад, Московская обл.)

Вариант	NO ₃ ⁻ /NO, %	Доноры NO + NO ₃ ⁻ , мкмоль/л	Экспрессия генов ($\Delta Ct = Ct - Ct \text{ TBP}$)						
			<i>MSTN</i>	<i>GHR</i>	<i>MyoD1</i>	<i>Myf 5</i>	<i>Myog</i>	<i>Mef 2c</i>	<i>Myh 1</i>
Н и т р о а р г и н и н									
<i>Яичный кросс Hisex White (n = 8)</i>									
Контроль	1,9±1,1	144,1±8,2	1,2±0,1	-0,4±0,2	1,7±0,3	13,7±0,8	4,2±0,4	2,7±0,2	20,7±0,3
Опыт	2,2±1,3	40,1±5,7*	1,7±0,1	-0,2±0,1	-0,1±0,1*	11,8±1,1	2,4±0,5*	0,9±0,1*	21,1±0,2
<i>Порода мини-мясная (линия А77, группа 2) (n = 8)</i>									
Контроль	97,8±2,5	131,4±7,8	0,9±0,2	-0,1±0,1	0,5±0,1	11,7±0,5	1,2±0,2	0,46±0,2	-3,4±0,3
Опыт	97,1±2,2	39,7±5,8*	1,5±0,5	0,9±0,4*	-0,9±0,3*	12,3±1,1	0,9±0,6	0,98±0,5	-3,0±0,4
З е л е н ы й с в е т									
<i>Яичный кросс Hisex White (n = 10)</i>									
Контроль	1,2±0,7	139,2±8,8	1,8±0,2	0,6±0,1	-0,2±0,2	8,0±1,1	0,2±0,5	1,2±0,4	-1,1±0,3
Опыт	63,7±2,1*	135,4±8,1	1,9±0,4	0,5±0,2	-0,7±0,4*	8,8±1,3	-0,6±0,2*	0,4±0,2*	-0,5±0,8
<p>П р и м е ч а н и е. NO/NO₃⁻ — доля эмбрионального NO, окисленного до NO₃⁻. Дизайн опыта см. раздел «Методика». Концентрацию доноров NO, нитрата и степень окисления NO до нитрата определяли в гомогенате эмбриона. <i>MSTN</i> — ген миостатина, <i>GHR</i> — ген рецептора гормона роста, <i>MyoD1</i> — ген фактора миогенной дифференциации 1, <i>Myf 5</i> — ген фактора миогенеза 5, <i>Myog</i> — ген миогенина, <i>Mef 2c</i> — ген фактора пролиферации миоцитов 2с, <i>Myh 1</i> — ген миозина. В качестве референсного гена использовался ген домашнего хозяйства <i>TBP</i> (ген ТАТА-связывающего белка).</p> <p>* Различия с контролем статистически значимы при $p < 0,05$.</p>									

4. Экспрессия генов, участвующих в миогенезе или влияющих на него, в грудных мышцах, мышцах бедра и голени в 14-суточных эмбрионах кур (*Gallus gallus domesticus*) яичного кросса Hisex White при воздействии зеленого света ($M \pm SEM$, виварий ФГБУ СГЦ «Загорское», ЭПХ ВНИТИП, г. Сергиев Посад, Московская обл.)

Вариант	NO ₃ ⁻ /NO, %	Доноры NO + NO ₃ ⁻ , мкмоль/л	Экспрессия генов ($\Delta Ct = Ct - Ct_{TBP}$)						
			<i>MSTN</i>	<i>GHR</i>	<i>MyoD1</i>	<i>Myf 5</i>	<i>Myog</i>	<i>Mef 2c</i>	<i>Myh 1</i>
Грудные мышцы ($n = 10$)									
Контроль	2,4±0,6	618,8±15,1	-0,9±0,2	-1,3±0,1	-4,5±0,5	0,3±2,5	-0,8±0,9	-0,7±0,9	-2,6±0,6
Опыт	61,3±2,8	621,4±16,6	-0,2±0,4	-1,0±0,1	-2,6±0,6*	6,6±0,5*	-2,3±0,4*	-1,6±0,4	-2,6±0,3
Мышцы бедра и голени ($n = 10$)									
Контроль	2,4±0,6	618,8±15,1	-0,8±0,2	-1,1±0,2	-4,3±0,5	1,1±2,4	-1,6±0,6	-1,5±0,3	-2,8±0,3
Опыт	61,3±2,8	621,4±16,6	-1,1±0,2	-1,2±0,1	-3,6±0,2	6,2±1,0*	-2,8±0,5*	-1,6±0,2	-3,0±0,2

Примечание. NO/NO₃⁻ — доля эмбрионального NO, окисленного до NO₃⁻. Дизайн опыта см. раздел «Методика». Концентрацию доноров NO, нитрата и степень окисления NO до нитрата определяли в гомогенате эмбриона. *MSTN* — ген миостатина, *GHR* — ген рецептора гормона роста, *MyoD1* — ген фактора миогенной дифференциации 1, *Myf 5* — ген фактора миогенеза 5, *Myog* — ген миогенина, *Mef 2c* — ген фактора пролиферации миоцитов 2с, *Myh 1* — ген миозина. В качестве референсного гена использовался ген домашнего хозяйства *TBP* (ген ТАТА-связывающего белка).

* Различия с контролем статистически значимы при $p < 0,05$.

Отметим, что высокая степень окисленности эмбрионального NO характерна для мясных форм птицы. Этот показатель наследуется и варьирует не более чем на 10-15 % в пределах линии и кросса. В постэмбриональный период содержание нитро-и нитрозосоединений выравнивается (15, 16). Следовательно, анализируемый признак связан с процессами, происходящими в период эмбрионального развития, и наследуется генетически. Возникает вопрос, как окисление NO может влиять на скорость роста мышечной ткани. Допустимо предположить, что NO связывается с некоей физиологической мишенью, которая обуславливает процессы, способствующие активации постэмбрионального роста, при этом NO после связывания с мишенью в конечном итоге окисляется до нитрата. Также возможно, что окисление NO продуцирует какие-то промежуточные соединения (NO_2 , NO^+), которые служат стимуляторами роста мышечной ткани.

По нашим данным, у разных пород и кроссов, характеризующихся одинаковой степенью окисления эмбрионального NO, экспрессия генов, ответственных за миогенез, может различаться в несколько раз. В связи с этим в контроле и опыте мы использовали яйца от одной и той же несушки. Полученные данные показывают (см. табл. 1, 3), что экспрессия генов в нашем опыте зависит от концентрации соединений-доноров NO. Ее снижение способствует увеличению экспрессии *MyoD1*, *Myog* и *Mef 2c* на начальном этапе эмбриогенеза. Такое снижение может быть достигнуто либо за счет уменьшения продукции NO, либо посредством интенсификации окисления синтезированного NO до нитрата (см. табл. 3).

Таким образом, полученные в работе результаты говорят о том, что депонированный NO влияет на экспрессию этих генов и именно NO, а не продукты его окисления. Можно предположить, что окисление NO в тканях эмбриона это способ (или один из способов) регуляции экспрессии генов. Влияние света на процесс окисления NO указывает на то, что структуры, обеспечивающие окисление, есть во всех эмбрионах, но их активация либо запрограммирована генетически, либо частично может происходить под воздействием внешних факторов (в частности, света). Механизмы, обеспечивающие это окисление, наследуются. Наследование этого признака в гибридах показывает, что он обусловлен не одним геном. Низкая концентрация доноров NO в эмбрионах мясных форм (несколько мкмоль/л) указывает на то, что количество доноров NO, измеряемое сотнями мкмоль/л не является жизненно необходимым. Искусственная регуляция содержания доноров NO в тканях эмбриона проблематична, поскольку в птичьем эмбрионе аргинин находится в концентрации насыщения для NO-синтазы, а блокатор синтеза NO нитроаргинин эффективно блокирует синтез NO только на протяжении первых 7 сут инкубации. В то же время степень окисления NO в эмбрионе является высокочувствительным параметром для селекционного отбора, поскольку разница между яичными и мясными формами по этому показателю достигает двух порядков. Степень окисления NO наследуется, следовательно, она обусловлена генетически. Определить механизм наследования этих генов у разных видов птицы является задачей наших будущих исследований.

¹ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства,
141311 Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад,
ул. Птицеградская, 10,
e-mail: vtitov43@yandex.ru ✉, anna.dolg@mail.ru;

²ФГБОУ ВО Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии —
МВА им. К.И. Скрябина,

Поступила в редакцию
29 января 2024 года

NITRIC OXIDE (NO) CONTENT AND EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN MYOGENESIS IN EMBRYONAL TISSUES OF CHICKENS (*Gallus gallus domesticus* L.)

V. Yu. Titov^{1, 2} ✉, A. M. Dolgorukova¹, I. I. Kochish², O. V. Myasnikova²

¹Federal Scientific Center All-Russian Research and Technological Poultry Institute RAS, 10, ul. Ptitsegradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141311 Russia, e-mail vtitov43@yandex.ru (✉ corresponding author), anna.dolg@mail.ru; ²Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, ul. Akademika K.I. Skryabina, Moscow, 109472 Russia, e-mail kochish.i@mail.ru, omyasnikova71@gmail.com

ORCID:

Titov V. Yu. orcid.org/0000-0002-2639-7435

Kochish I. I. orcid.org/0000-0001-8892-9858

Dolgorukova A. M. orcid.org/0000-0002-9958-8777

Myasnikova O. V. orcid.org/0000-0002-9869-0876

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 24-26-00148

Final revision received January 29, 2024

doi: 10.15389/agrobiol.2024.2.316eng

Accepted February 26, 2024

Abstract

Nitric oxide is known to be involved in myogenesis in birds. Previously, we established that in the embryos of poultry bred for meat, intensive oxidation of nitric oxide occurs while in the embryos of egg hens it is insignificant and NO accumulates in donor compounds. Within the breed, line and cross, the degree of oxidation of embryonic NO varied by no more than 15 %, and this trait is inherited. In this regard, a number of questions arise. If meat productivity is somehow related to the degree of oxidation of nitric oxide, then what is its role? Does NO itself or its oxidation products have an epigenetic effect during embryogenesis? How is NO oxidized in embryonic tissues and what is the direct physiological role of this process? Is it possible to regulate embryo development by influencing NO synthesis or stimulating its oxidation? The purpose of the work was to compare changes in the NO content in the tissues of meat and egg chicken embryos with changes in the expression of a number of genes involved in myogenesis, in order to elucidate the mechanisms of the possible epigenetic effect of NO as a factor in the regulation of embryonic development. We have shown that the expression of several genes responsible for myogenesis is associated with the concentration of NO in donor compounds. For the study, embryos of chickens (*Gallus gallus domesticus* L.) of the Hisex White egg cross and the mini-meat breed (line A77, group 2), characterized by high and low intensity of embryonic NO oxidation, respectively, were used. In tissues of the embryo homogenate on day 6 and in homogenates of pectoral and thigh muscles on day 14, the expression of seven genes involved in or influencing myogenesis was assessed. These are the genes for myocyte proliferation factor 2c (*Mef 2c*), myogenic differentiation 1 (*MyoD1*), myogenesis factor 5 (*Myf 5*), myosin (*Myh 1*), myogenin (*Myog*), myostatin (*MSTN*), and growth hormone receptor (*GHR*). The housekeeping gene *TBP* (TATA-binding protein gene) was a reference gene. During incubation, we assessed the concentration of embryonic NO, the intensity of its oxidation and the transcriptional activity of myogenesis genes as influenced by in ovo administered nitroarginine (NA), a blocker of NO synthesis, and green light that intensifies the oxidation of embryonic NO to nitrate but does not affect the intensity of NO synthesis. NA, when administered before incubation, on day 6, led to a 70 % decrease in the concentration of NO donor compounds in the embryo homogenate and increased the expression of the *MyoD1*, *Myog* and *Mef 2c* genes in the embryos of Hisex White egg cross. In the mini-meat chickens (line A77, group 2), which are characterized by a low level of deposited NO, the same trend occurred, that is, a decrease in the concentration of donor compounds and an increase in the expression of the *MyoD1*, *Myog* and *Mef 2c* genes, but the difference between the control and test embryos was less pronounced. The use of green light during incubation also contributed to an increase in the expression of the *MyoD1*, *Myog* and *Mef 2c* genes on day 6. Based on these data, it can be assumed that the expression of these genes is affected by the concentration of accumulated NO in the embryo tissues. Factors that cause a decrease in the concentration of accumulated NO increase gene expression, regardless of the method of NO reduction (due to less synthesis or more active oxidation). Therefore, the oxidation of NO in the tissues of the embryo may be a way of regulating gene expression. Mechanisms that ensure this oxidation, are inherited. Artificial regulation of the level of NO donors in embryonic tissues is problematic, since arginine, the source of NO in the avian embryo, is in a saturation concentration for NO synthase, and the NO synthesis blocker nitroarginine effectively suppresses NO synthesis only during the first 7 days of incubation. Nevertheless, the rate of NO oxidation in the embryo is a highly sensitive parameter for selection.

Keywords: nitric oxide, gene expression, avian embryogenesis, myogenesis.

REFERENCES

1. Battaglia C., Ciottii P., Notarangelo L., Fratto R., Facchinetti F., de Aloysio D. Embryonic production of nitric oxide and its role in implantation: a pilot study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2003, 20(11): 449-454 (doi: 10.1023/b:jarg.0000006706.21588.0d)
2. Ribeiro M., Ogando D., Farina M., Franchi A. Epidermal growth factor modulation of prostaglandins and nitrite biosynthesis in rat fetal membranes. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2004, 70(1): 33-40 (doi: 10.1016/j.plefa.2003.08.003).
3. Vignini A., Turi A., Giannubillo S., Pescosolido D., Scognamiglio P., Zanconi S., Silvi C., Mazzanti L., Tranquilli A. Follicular fluid nitric oxide (NO) concentrations in stimulated cycles: the relationship to embryo grading. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2008, 277(3): 229-232 (doi: 10.1007/s00404-007-0445-y).
4. Socco S., Bovee Rh., Palczewski M., Hickok J., Thomas D. Epigenetics: the third pillar of nitric oxide signaling. *Pharmacological Research*, 2017, 121: 52-58 (doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.011).
5. Vasudevan D., Bovee R., Thomas D. Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes. *Nitric Oxide*, 2016, 59: 54-62 (doi: 10.1016/j.niox.2016.08.002).
6. Vasil'eva S., Stupakova M., Lobysheva I., Mikoyan V., Vanin A. Activation of the *Escherichia coli* SoxRS-regulon by nitric oxide and its physiological donors. *Biochemistry (Moscow)*, 2001, 66: 984-988 (doi: 10.1023/a:1012317508971).
7. Green J., Rolfe M., Smith L. Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. *Virulence*, 2014, 5(8): 794-809 (doi: 10.4161/viru.27794).
8. Tucker N., D'autréaux B., Spiro S., Dixon R. Mechanism of transcriptional regulation by the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, 34(Pt 1): 191-194 (doi: 10.1042/BST0340191).
9. Dokunmu T., Opara S., Imaga N., Awani O., Enoma D., Adelani B. P53 gene expression and nitric oxide levels after artemisinin-caffeine treatment in breast, lungs and liver of DMBA-induced tumorigenesis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2023, 24(2): 451-458 (doi: 10.31557/APJCP.2023.24.2.451).
10. 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, 320(2): 269-280 (doi: 10.1016/j.yexcr.2013.11.006).
11. 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, 288(22): 16004-16015 (doi: 10.1074/jbc.M112.432294).
12. Rezakhanlou A., Miller C., McMullin B., Ghaffari A., Garcia R., Ghahary A. Gaseous nitric oxide exhibits minimal effect on skin fibroblast extracellular matrix gene expression and immune cell viability. *Cell Biol. Int.*, 2011, 35(4): 407-415 (doi: 10.1042/CBI20100420).
13. Xu C., Chen X., Grzeschik S., Ganta M., Wang C. Hydroxyurea enhances *SMN2* gene expression through nitric oxide release. *Neurogenetics*, 2011, 12(1): 19-24 (doi: 10.1007/s10048-010-0268-z).
14. Titov V.Yu., Petrenko Yu.M., Vanin A.F., Stepuro I.I. *Biofizika*, 2010, 55(1): 95-106 (in Russ.).
15. Titov V.Yu., Dolgorukova A.M., Kochish I.I., Myasnikova O.V., Nikonov I.N. Features of nitric oxide metabolism in embryos of different bird species as genetically determined sign associated with meat productivity. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2022, 57(2): 343-355 (doi: 10.15389/agrobiology.2022.2.343eng).
16. Titov V.Yu., Kochish I.I., Dolgorukova A.M. *Oksid azota (NO) v embrional'nom i postembrional'nom razvitiy ptits* [Nitric oxide (NO) in embryonic and postembryonic development of birds]. Moscow, 2022 (doi: 10.18720/SPBPU/2/z22-25) (in Russ.).
17. Li Y., Wang Y., Willems E., Willemsen H., Franssens L., Buyse J., Decuypere E., Everaer N. In ovo L-arginine supplementation stimulates myoblast differentiation but negatively affects muscle development of broiler chicken after hatching. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2016, 100: 167-177 (doi: 10.1111/jpn.12299).
18. Sibisi N., Snyman C., Myburgh K., Niesler C. Evaluating the role of nitric oxide in myogenesis in vitro. *Biochimie*, 2022, 196: 216-224 (doi: 10.1016/j.biochi.2021.11.006).
19. Wang R., Li K., Sun L., Jiao H., Zhou Y., Li H., Wang X., Zhao J., Lin H. L-Arginine/nitric oxide regulates skeletal muscle development via muscle fibre-specific nitric oxide/mTOR pathway in chickens. *Anim Nutr.*, 2022, 10: 68-85 (doi: 10.1016/j.aninu.2022.04.010).
20. Buono R., Vantaggiato C., Pisa V., Azzoni E., Bassi M., Brunelli S., Sciorati C., Clementi E. Nitric oxide sustains long-term skeletal muscle regeneration by regulating fate of satellite cells via signaling pathways requiring Vangl2 and cyclic GMP. *Stem Cells*, 2012, 30(2), 197-209 (doi: 10.1002/stem.783).
21. Anderson J., Zhu A., Mizuno T. Nitric oxide treatment attenuates muscle atrophy during hind limb suspension in mice. *Free Radic. Biol. Med.*, 2018, 115: 458-470 (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.021).
22. Samengo G., Avik A., Fedor B., Whittaker D., Myung K., Wehling-Henricks M., Tidball J. Age-related loss of nitric oxide synthase in skeletal muscle causes reductions in calpain S-nitrosylation that increase myofibril degradation and sarcopenia. *Aging Cell*, 2012, 11(6): 1036-1045 (doi: 10.1111/acel.12003).

23. Fisinin V.I., Dyadichkina L.F., Goldin Yu.S., Pozdnyakova N.S., Melekhina T.A., Danilov R.V., Gupalo I.M., Royter L.M., Vedenkina I.V., Shinkarenko L.A., Vorontsov A.N., Bosov D.Yu., Afonin V.V. *Tekhnologiya inkubatsii yaits sel'skokhozyaystvennoy ptitsy* [Technology for incubating poultry eggs]. Sergiev Posad, 2016 (in Russ.).
24. Krych-Madej J., Gebicka L. Interaction of nitrite with catalase: enzyme activity and reaction kinetics studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2017, 171: 10-17 (doi: 10.1016/j.jinorg-bio.2017.02.023).
25. Schmittgen T., Livak K. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108 (doi: 10.1038/nprot.2008.73).
26. Zazoua A., Hnaïen M., Cosnier S., Jaffrezic-Renault N., Kherrat R. A new HRP/catalase biosensor based on microconductometric transduction for nitrite determination. *Materials Science and Engineering C*, 2009, 29: 1919-1922 (doi: 10.1016/j.msec.2009.03.008).
27. Ojani R., Raouf J.-B., Rahemi V. A simple and efficient electrochemical sensor for electrocatalytic reduction of nitrite based on poly(4-aminoacetanilide) film using carbon paste electrode. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2011, 58(2): 247-254 (doi: 10.1002/jccs.201190084).
28. 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, 190: 214-219 (doi: 10.1016/j.ygcen.2013.06.027).
29. Sobolewska A., Elminowska-Wenda G., Bogucka J., Szpinda M., Walasik K., Bednarczyk M., Paraczevska-Achtel M. Myogenesis — possibilities of its stimulation in chickens. *Folia biologica (Krakow)*, 2011, 59(3-4): 85-90 (doi: 10.3409/fb59_3-4.85-90).
30. 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. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006, 290(4): R1062-R1070 (doi: 10.1152/ajpregu.00378.2005).