

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ КУР С РАЗНЫМ ТИПОМ ПРОДУКТИВНОСТИ**В.Ю. ТИТОВ¹, О.В. КОСЕНКО¹, Г.В. КОНДРАТОВ²**

Оксид азота (NO) в тканях человека и животных служит универсальным медиатором, опосредующим тонус гладкой мускулатуры сосудов и желудочно-кишечного тракта, деятельность центральной и вегетативной нервной системы, дифференциацию тканей и апоптоз, иммунный ответ, регуляцию экспрессии ряда генов. Это короткоживущее соединение, быстро окисляющееся до нитрата и нитрита. Известно, что эмбриогенез сопряжен с синтезом оксида азота и накоплением его метаболитов в эмбрионе. В настоящей работе мы изучали динамику содержания метаболитов NO в разных отделах куриного эмбриона и в зародыше в целом в процессе эмбриогенеза. В экспериментах использовали оплодотворенные яйца кур пород андалузская голубая, юрловская голосистая, голубая мясояичная, кохинхины белые, брама темная, брама палева, П-11, корниш, плимутрок, малайская бойцовая, куланги; линий Х1, Х2, Х12, Х34 кросса Хайсекс белый, Б5, Б6, Б56 породы корниш, Б7, Б9, Б79 породы плимутрок; кроссов СП 789, Хайсекс белый, Смена 8, Кобб 500. Содержание метаболитов NO в образцах определяли, используя разработанный ферментный сенсор, основанный на свойстве нитрита, нитрозиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) и нитропроизводных высокомолекулярных соединений (RNO₂) ингибировать фермент каталазу в присутствии галоид-ионов и на утрате ими этого свойства под действием определенных факторов, различных для каждой группы соединений. Выявлена тесная корреляция между мясной продуктивностью взрослых птиц и интенсивностью накопления метаболитов NO в разных отделах эмбриона. Различия между эмбрионами мясных и яичных форм по этому показателю могут достигать двух порядков. Эмбрионы кур мясояичного направления и мини-кур занимают промежуточное положение. Установлено, что нитрат, конечный продукт метаболизма, накапливается преимущественно в мышцах эмбриона. Время наиболее интенсивного метаболизма (первые 3 сут развития) дает основание предположить, что главным потребителем NO служит не сама мышечная ткань, а некий фактор, влияющий на ее гистогенез. NO либо активирует этот фактор, либо влияет на его синтез.

Ключевые слова: оксид азота, эмбриогенез, мясная продуктивность.

Оксид азота (NO) синтезируется в тканях человека и животных из аминокислоты L-аргинина. Он служит универсальным медиатором, опосредующим тонус гладкой мускулатуры сосудов и желудочно-кишечного тракта (1, 2), деятельность центральной и вегетативной нервной системы (2, 3), дифференциацию тканей и апоптоз (4, 5), иммунный ответ (2, 6), регуляцию экспрессии ряда генов (7). В тканях оксид азота — короткоживущее соединение, быстро окисляющееся до нитрата и нитрита, которые считаются конечными продуктами его метаболизма (2). В биологических объектах также образуются S-нитрозиолы (RSNO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) (8, 9). Они служат донорами оксида азота, опосредующими его физиологический эффект. Таковыми считаются и некоторые органические нитросоединения (RNO₂), способные продуцировать ДНКЖ в присутствии катионов закисного железа и тиолов (10). Благодаря соединениям-донорам физиологические эффекты оксида азота во много раз продолжительнее, чем время жизни его молекулы (8, 9).

Развитие эмбриона сопровождается интенсивной продукцией оксида азота (11, 12). Однако неизвестно, выполняет ли последний какую-либо специфическую роль в эмбриогенезе. Эмбрионы птиц очень удобны для исследования этого вопроса, поскольку представляют относительно замкнутую систему, развивающуюся отдельно от материнского организма, и имеют достаточно крупные размеры.

Ранее мы обнаружили, что развитие эмбрионов птиц сопровождается интенсивным накоплением метаболитов оксида азота (13). Амниотическая жидкость содержит физиологические доноры NO в концентрациях

до 4-6 ммоль/л. Их количество относительно стабильно с момента окончательного формирования зародыша до заключительной стадии предплодного периода (13, 14). Неорганические нитрат и нитрит в амнионе представлены в следовых количествах, нитрат аккумулируется в аллантоисе. Существует жесткая отрицательная корреляция между содержанием доноров NO в амнионе и количеством нитрата в аллантоисе ($r = -0,88$) (13, 14).

Было сделано предположение, что NO, синтезируемый клетками развивающегося зародыша, накапливается в амнионе в виде соединений-доноров и окисляется до нитрата. Интенсификация метаболизма NO приводит к уменьшению содержания доноров NO в амнионе и увеличению концентрации нитрата в аллантоисе (14). Показано, что существует положительная корреляция между мясной продуктивностью взрослых особей (скоростью прироста мышечной массы) и интенсивностью метаболизма NO в эмбрионе, оцениваемой по соотношению количества нитрата в аллантоисе и общего содержания доноров NO в амнионе. Разница между мясными и яичными формами по этому показателю достигает двух порядков, в то время как внутри линии и кросса разброс составляет не более 10 % (13, 14). Содержание оксида азота и его производных в эмбрионе может стать показателем чистоты линии, кросса, породы, который будет использоваться при подборе пар для селекции (13).

Цель настоящей работы — изучение динамики содержания метаболитов NO в различных отделах и в целом зародыше в связи с ролью оксида азота в эмбриогенезе.

Методика. В экспериментах использовали оплодотворенные яйца кур с разным типом продуктивности: породы андалузская голубая, юрловская голосистая, голубая мясояичная, кохинхины белые, брама темная, брама палевая, П-11, корниш, плумутрок, малайская бойцовая, куланги; линии Х1, Х2, Х12, Х34 кросса Хайсекс белый, Б5, Б6, Б56 породы корниш, Б7, Б9, Б79 породы плимутрок; кроссы СП 789, Хайсекс белый, Смена 8, Кобб 500, полученные в ООО «Генофонд» (Россия). Было исследовано от 20 до 40 эмбрионов каждой породы, линии и кросса.

Содержание метаболитов NO в образцах определяли не позднее, чем через 30 мин после отбора. Использовали разработанный нами ферментный сенсор, основанный на свойстве нитрита, нитрозотиолов (RSNO), ДНКЖ и нитропроизводных высокомолекулярных соединений (RNO₂) ингибировать каталазу в присутствии галоид-ионов и на утрате ими этого свойства под действием факторов, различных для каждой группы соединений (15, 16). Содержание нитрата оценивали после восстановления треххлористым ванадием до нитрита с последующим количественным определением (17). Метод позволяет оценить спектр продуктов окисления NO без предварительной подготовки и модификации образца с чувствительностью до 50 нМ (16, 17). Также использовали классический метод Грисса (12).

Содержимое амниона и аллантоиса отбирали на 14-е сут развития одноразовыми шприцами после вскрытия яйца. Для получения гомогенатов механически измельченные навески головы, туловища (на 6-е и 13-е сут), конечностей (13-е сут), грудных и бедренных мышц (18-е сут) эмбрионов заливали 158 мМ раствором хлорида натрия, содержащим фосфат калия (10 мМ, рН 7,4; в расчете на 1 г ткани на 20 мл раствора), и обрабатывали в стеклянном гомогенизаторе (8 мин, 40 фрикций/мин, 6 °С). При получении гомогенатов целого эмбриона аналогичной процедуре подвергали содержимое яйца, лишённого скорлупы.

Использовали инкубаторы ИПХ-10 (Россия, ЗАО «Пятигорксельмаш»), рассчитанные на 100 куриных яиц (температура в инкубационный

период — 37,6 °С, в выводной период — 37,2 °С).

Для статистической обработки применяли пакет программ BioStat.

Результаты. В аллантоисе у яичных кур концентрация нитрата составляла до 27 мкмоль/л, в то время как амнион был богат донорами NO (около 5 ммоль/л). У Х1 (отцовская линия яичного кросса Хайсекс белый), характеризующейся относительно более высокой живой массой и крепостью скелета, отмечали значительно более интенсивный эмбриональный метаболизм NO, чем у конечного гибрида (табл. 1).

1. Содержание метаболитов оксида азота (мкмоль/л) в амнионе и аллантоисе у эмбрионов кур различных пород, линий и кроссов на 14-е сут инкубации ($M \pm m$)

Порода, линия, кросс	Амнион, доноры NO	Аллантоис		Направление продуктивности
		доноры NO	NO ₃ ⁻	
СП 789, андалузская голубая, юрловская голосистая, Хайсекс белый и его линии Х2, Х3, Х12, Х34	5500,0±350,0	25,0±10,0	27,0±10,0	Яичное
Х1 (отцовская линия кросса Хайсекс белый)	3150,0±95,0	24,0±5,0	90,0±4,0	Яичное
Голубая мясояичная	1950,0±277,0	18,0±5,0	125,0±25,0	Мясояичное
Кохинхины белые	2500,0±200,0	50,0±15,0	150,0±20,0	Мясояичное
Брама темная	1500,0±200,0	25,0±10,0	180,0±30,0	Мясояичное
Брама палевая	875,0±30,0	20,0±5,0	195,0±5,0	Мясояичное
П-11 (мини-яичная)	1500,0±250,0	15,0±5,0	180,0±40,0	Яичное
Плимутрок с геном карликовости	850,0±200,0	25,0±10,0	150,0±50,0	Мясояичное
Мини-мясная № 5	30,0±10,0	15,0±5,0	470,0±60,0	Мясное
Кобб 500, Смена 8	10,0±5,0	10,0±5,0	510,0±90,0	Мясное
Корниш, линии Б5, Б6, Б56 (отцовские линии кросса Смена 8)	30,0±10,0	8,5±1,5	470,0±30,0	Мясное
Плимутрок, линии Б7, Б9, Б79 (материнские линии кросса Смена 8)	5100,0±270,0	25,0±6,0	16,0±4,0	Мясное, селекция на яичную продуктивность
Малайская бойцовая, куланги	16,0±8,0	8,0±4,0	410,0±20,0	Бойцовые

У мясных кроссов Кобб 500 и Смена 8 зафиксировали высокую интенсивность метаболизма оксида азота: до 500 мкмоль/л нитрата в аллантоисе и не более 10 мкмоль/л доноров NO в амнионе. Однако их родительские формы, относящиеся к породам корниш и плимутрок, кардинально отличались друг от друга по этому показателю. Все линии корнишей характеризовались высокой интенсивностью метаболизма NO, в то время как плимутроков — низкой. Известно, что корниш — мясная порода. Плимутроки тоже считаются мясными курами, но у них яйценоскость на 30-40 % выше, чем у корнишей. По нашим данным, все линии корнишей в возрасте 4 нед превосходили линии плимутроков по выходу потрошенной тушки и относительной массе мышц на 3-5 % (13). Бойцовые породы, полученные в результате селекции на живую массу и бойцовские качества, также характеризовались высокой интенсивностью метаболизма NO (см. табл. 1).

Эмбрионы кур мясояичного направления и мини-кур по интенсивности метаболизма NO занимали промежуточное положение между мясными и яичными. Известно, что мини-куры получены в результате селекции на мясную продуктивность при относительно высокой яйценоскости и экономичности расхода корма. У них, как у обычных мясных, эмбрионы имели высокую интенсивность метаболизма NO (см. табл. 1).

Результаты, полученные ранее на эмбрионах перепелов, цесарок и страусов (13, 14), аналогичны: интенсивность эмбрионального метаболизма NO у мясных форм значительно выше, чем у яичных.

Как следует из представленных данных (табл. 2 и 3), в зародыше нитрат в основном накапливался в мышечной ткани. На 6-е сут он обнаруживался преимущественно в туловище, на 13-е сут концентрировался в конечностях. Содержание нитрата в мышцах эмбриона на 18-е сут прямо коррелировало с его количеством в аллантоисе. Разница в содержании нитрата в мышцах между яичными и мясными формами кур сохранялась

до 5-7 сут после вывода.

2. Динамика содержания нитро- и нитрозосоединений (нмоль/г ткани) в разных частях тела у зародышей кур яичного (СП 789) и мясного (Кобб 500) кроссов ($M \pm m$)

Кросс	Туловище		Голова		Конечности	
	доноры NO	NO ₃ ⁻	доноры NO	NO ₃ ⁻	Доноры NO	NO ₃ ⁻
Показатель на 6-е сут						
СП 789	30,0±15,0	0,2±0,1	10,0±5,0	0,2±0,1	—	—
Кобб 500	31,0±10,0	370,0±15,0	7,0±3,0	0,3±0,1	—	—
Показатель на 13-е сут						
СП 789	15,3±5,0	1,8±1,5	50,0±15,0	1,8±1,5	3,8±1,5	10,0±2,0
Кобб 500	10,3±4,0	25,0±12,0	40,0±15,0	3,8±1,0	43,8±8,0	670,0±15,0

Примечание. Прочерки означают отсутствие данных (на 6-е сут конечности еще не сформированы).

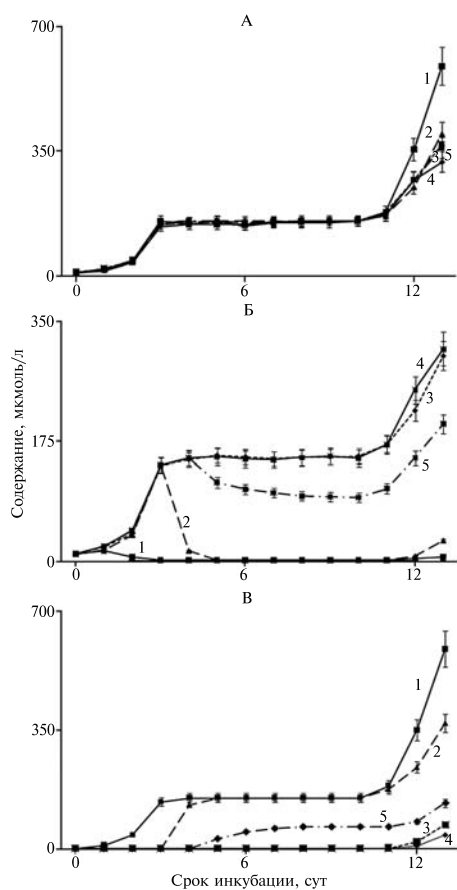
3. Содержание нитрата (нмоль/г) в мышцах у 18-суточных зародышей разных пород, линий и кроссов кур ($M \pm m$)

Линия, кросс, порода	Грудные	Бедрa и голени
Б5, Б6, Б56	1350±72	890±44
Б7, Б8, Б79	76±14	53±15
СП 789	33±12	30±18
Кобб 500	950±25	815±25
Юрловская голосистая	35±12	25±10
Малайская бойцовая	1200±85	1000±80

Гомогенат оплодотворенного куриного яйца (белок и желток) содержал от 5 до 15 мкмоль/л нитро- и нитрозосоединений. По мере развития эмбриона они накапливались в его тканях. В яйце, не претерпевающим развития, нитро- и нитрозосоединения не аккумулируются (14).

Доноры NO накапливались в развивающемся эмбрионе в первые 3 сут. При этом в течение 4-5 сут у некоторых форм происходило интенсивное снижение содержания доноров NO и увеличение — нитрата (NO₃⁻). На примере эмбрионов двух форм с высокоинтенсивным метаболизмом NO (Смена 8 и корниш Б56) и двух — с низкоинтенсивным (Хайсекс белый и плимутрок Б79), а также формы с промежуточной интенсивностью метаболизма (отцовская линия Х1 кросса Хайсекс белый) показано (рис.), что суммарное содержание всех нитро- и нитрозосоединений в гомогенате 7-суточных эмбрионов было примерно одинаковым. Оно оставалось стабильным до 11-х сут, после чего вновь начинало повышаться (см. рис.), что, возможно, связано с увеличением массы эмбриона и продукцией NO эндотелием сосудов. Интенсивность последней одинакова у яичных и мясных форм (14).

Можно предположить (см. табл. 2, 3), что на 1-4-е сут появлялся новый потребитель NO, депонированного в соединениях-донорах, — мышечная ткань, поскольку нитрат накапливался в ней. По данным



Общее содержание метаболитов NO (А), доноров NO (Б) и нитрата (В) в эмбрионах кур по срокам инкубации: 1 — кросс Смена 8, 2 — линия корниш Б56, 3 — линия плимутрок Б79, 4 — кросс Хайсекс белый, 5 — Х1 (отцовская линия кросса Хайсекс белый).

других исследователей, в развивающейся мышце наиболее интенсивной продукцией и метаболизмом NO сопровождается процесс образования миофибрилл (18, 19). Но на 1-4-е сут у эмбриона различима только почка конечности, в которой нет дифференцированных тканей. Это дает основание полагать, что основным потребителем NO становится не сама мышечная ткань, а какой-то фактор, способствующий ее развитию. В работе D. Cazzato с соавт. (20) говорится о воздействии NO на регуляторный фактор миогенной дифференциации 2a на начальной стадии развития куриного эмбриона: ингибирование генерации NO приводило к снижению экспрессии этого фактора, а применение доноров NO имело обратный эффект. Возможно, потребление NO связано с этим фактором, а накопление нитрата в тканях эмбриона, происходящее позднее 3-4-х сут инкубации, обусловлено трансформацией доноров NO, которые синтезируются тканями эмбриона уже со значительно меньшей интенсивностью. Поэтому суммарное содержание нитро- и нитрозосоединений относительно стабильно с 4-х по 11-е сут (см. рис.).

Таким образом, в эмбриогенезе птицы оксид азота играет важную роль, связанную предположительно с развитием мышечной ткани. У мясных форм его метаболизм в эмбрионах происходит многократно интенсивнее, чем у яичных форм, а нитрат, конечный продукт метаболизма, накапливается преимущественно в мышцах. Время наиболее интенсивного метаболизма (первые 3 сут развития) дает основание предположить, что основным потребителем NO служит не сама мышечная ткань, а фактор, влияющий на ее гистогенез. NO либо активировывает этот фактор, либо влияет на его синтез.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ignarro L. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation Research*, 1989, 65: 1-21.
2. Moncada S., Palmer R., Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 1991, 43: 109-142.
3. Stalmer J., Singel D., Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 1992, 258: 1898-1902.
4. Li J., Billiar T., Talanian R., Kim Y. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 240: 419-424.
5. Kim Y.-M., Chung H.-T., Simmons R., Billiar T. Cellular nonheme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 10954-10961.
6. Ischiropoulos H., Zhu L., Beckman J. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 298: 446-451.
7. Zhou J., Brune B. NO and transcriptional regulation: from signaling to death. *Toxicology*, 2005, 208: 223-233.
8. Severina I., Bussygina O., Pyatakova N., Malenkova I., Vanin A. Activation of soluble guanylate cyclase by NO donors — S-nitrosothiols, and dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*, 2003, 8: 155-163.
9. Vanin A. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physicochemistry, biochemistry and physiology. *Nitric Oxide*, 2009, 21: 1-13.
10. Lima E., Bonini M., Augusto O., Barbeiro H., Souza H., Abdalla D. Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005, 39: 532-539.
11. 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. *J. Assisted Reproduction and Genetics*, 2003, 20: 449-54.
12. Retsky M.I., Shakhov A.G., Bliznetzova G.N., Artemieva S.S., Kaverin N.N., Ermakova N.V., Kosmatych, N.A. Age dynamics of formation of nitric oxide at the large cattle. *Russian Agricultural Science*, 2004, 30: 58-60.
13. Titov V.Yu., Vinnikova E.Z., Akimova N.S., Fisinin V.I. Nitric oxide (NO) in bird embryogenesis: physiological role and ability of practical use. *World's Poultry Science Journal*, 2012, 68: 83-95.

14. Титов В.Ю., Акимова Н.С., Винникова Э.З., Фисинин В.И. Метаболизм окиси азота в эмбрионах быстро и медленно растущих форм сельскохозяйственной птицы. Доклады РАСХН, 2009, 35: 47-48.
15. Titov V.Yu., Petrenko Yu.M., Vanin A.F. Mechanism of inhibition of catalase by nitro and nitroso compounds. Biochemistry (Moscow), 2008, 73: 92-96.
16. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф., Степура И.И. Определение нитрита и нитрозосоединений в биосистемах калориметрическим методом. Биофизика, 2010, 55: 95-106.
17. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф. Ферментативный сенсор для определения содержания нитро- и нитрозосоединений в биообъектах. Клиническая лабораторная диагностика, 2009, 9: 6-14.
18. Stamler J., Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. Physiol. Rev., 2001, 81: 209-237.
19. Lee H., Baek M., Moon K., Song W., Chung Ch., Ha D., Kang M-S. Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. J. Biol. Chem., 1994, 269: 14371-14374.
20. 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. Exp. Cell Res., 2014, 320: 269-80.

¹ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства
Россельхозакадемии,

141300 Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад, ул. Птицеградская, 10,
e-mail: vtitov43@yandex.ru;

²ФГБОУ ВПО Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии
им. К.И. Скрябина,

109472 Россия, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23,
e-mail: kazagor@gmail.com

Поступила в редакцию
19 марта 2014 года

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN EMBRYOGENESIS OF EGG AND MEAT HENS

V.Yu. Titov¹, O.V. Kosenko¹, G.V. Kondratov²

¹All-Russian Research and Technological Institute of Poultry, Russian Academy of Agricultural Sciences, 10, ul. Ptitsegradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141300 Russia, e-mail vtitov43@yandex.ru;

²K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, ul. Akademika Skryabina, Moscow, 109472 Russia, e-mail kazagor@gmail.com

Received March 19, 2014

doi: 10.15389/agrobiol.2014.4.86eng

Abstract

It is known that nitric oxide (NO) mediates the regulation of smooth muscle tone in the blood vessels and the gastrointestinal tract, the central and autonomic nervous systems activity, differentiation and apoptosis in tissues, immune response, and gene expression in animals and humans. This is a short-lived substance oxidized rapidly to nitrate and nitrite. Embryogenesis is associated with the synthesis of nitric oxide (NO) and accumulation of its metabolites in embryo. Nevertheless, the mechanism of this relationship is unknown. In this paper we reported the results of comparing dynamics of the NO metabolite levels in the parts of and a whole embryo in the layers and broiler chicks. Incubated eggs were examined in the breeds (Andalusian Blue, Yurlovskaya Golosistaya, Golubaya Myasoyaichnaya, Cochin White, Brahma Dark, Brahma Pale, P-11, Cornish, Plymouth Rock, Malay fighting hens, Uzbek fighting hens), some lines (X1, X2, X12, X34 of Hysex White cross, B5, B6 and B56 of Cornish, B7, B9, and B79 of Plymouth Rock), and four crosses (SP 789, Hysex White, Smena 8, Cobb 500). The NO metabolites were detected using developed enzymatic sensor. The test is based on catalase inhibition by nitrite, nitrosothiols (RSNO), Fe-dinitrosyl complex and nitro derivatives of high-molecular compounds (RNO₂) in the presence of halide ions, repressed by the factors different for each class of compounds. The close correlation was observed between meat productivity of adult poultry and NO metabolites accumulation in different embryo parts. The NO metabolite accumulation differed up to 100 times in meat- and egg-hen embryos, and in meat-egg hens and mini-hens the intermediate parameters were indicated. It was shown that nitrate as a final metabolic product was accumulated in the muscle of embryo. Due to time when the most intensive accumulation occurs in ontogenesis (3 days), some factor rather than the muscle itself, but influencing muscle histogenesis could be considered as the main agent involved in NO metabolism. Nitric oxide as a mediator can either activate this agent, or affect its synthesis.

Keywords: nitric oxide, embryogenesis, meat productivity.