

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *TRPM2* И *RYR2* В ПЕРИОД СОЗРЕВАНИЯ СИСТЕМЫ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ ЦЫПЛЯТ КАК РЕЗУЛЬТАТ ДОЗИРОВАННОГО НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

© 2024 г. **Е. С. Федорова**, кандидат биологических наук, **Е. Г. Чугунова**,
М. В. Позовникова, кандидат биологических наук

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, 196601, Санкт-Петербург, Пушкин, Московское ш., 55а
E-mail: pozovnikova@gmail.com

Исследования проводили с целью оценки вовлеченности генов-кандидатов *TRPM2* и *RYR2*, предположительно связанных с высокими адаптационными способностями кур в раннем онтогенезе, в процессы терморегуляции и термоадаптации в условиях гипотермического стресса. Работу проводили на курах генотипных пород русская белоснежная (отсеlectionированной на терморезистентность молодняка в условиях низких температур) и амрокс (селекция на терморезистентность не проводили). Для «перепрограммирования» адаптационных паттернов регуляторных характеристик системы температурного гомеостаза применяли дозированное низкотемпературное воздействие (+14...+16 °C, 6 ч) в чувствительный период раннего эмбриогенеза (5-е сутки инкубации). У суточных цыплят оценивали изменение ориентации обменных процессов, а у 14-суточных дополнительно – изменение уровня адаптационных способностей организма после воздействия низкотемпературного стресс-фактора (+7 °C, 1 ч) в сравнении с контрольными группами, не подвергавшимися охлаждению. Относительную экспрессию генов *TRPM2* и *RYR2* в образцах тканей эмбрионов и цыплят определяли методом ПЦР. Для 14-суточных цыплят русской белоснежной породы сила воздействия абиотического стресс-фактора, вероятно, была недостаточной для того, чтобы вызвать серьезные перестройки в обменных процессах организма. Однократное дозированное охлаждение эмбрионов породы амрокс привело к изменениям нормы реакции организма цыплят опытной группы, которые сохранились до 14-суточного возраста. Цыплята этой группы лучше адаптированы к холодовому стрессу, в качестве энергетического субстрата используют преимущественно липиды и белки, для поддержания температуры тела задействуют механизмы нескратительного термогенеза в мышцах. Это подтверждают различия в паттернах экспрессии генов *RYR2* и *TRPM2*, уровень относительной экспрессии которых в грудной мышце цыплят опытных групп выше, чем в контроле (для цыплят амрокс в 2,5 раза). Дозированное однократное низкотемпературное воздействие в чувствительный период раннего эмбриогенеза может способствовать повышению адаптационных способностей организма цыплят до 14-суточного возраста в условиях гипотермического стресса.

CHANGES IN THE EXPRESSION PROFILE OF *TRPM2* AND *RYR2* GENES DURING THE MATURATION OF THE CHICK THERMOREGULATION SYSTEM AS A RESULT OF DOSED LOW-TEMPERATURE EXPOSURE DURING THE SENSITIVE PERIOD OF EARLY EMBRYOGENESIS

E. S. Fedorova, E. G. Chugunova, M. V. Pozovnikova

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding –
Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry,
196601, Sankt-Peterburg, Pushkin, Moskovskoe sh., 55a
E-mail: pozovnikova@gmail.com

The studies were conducted to assess the involvement of candidate genes *TRPM2* and *RYR2*, presumably associated with high adaptive abilities of chickens in early ontogenesis, in the processes of thermoregulation and thermal adaptation under hypothermic stress. The work was carried out on chickens of the Russian Snow-White gene pool breed (isolated for thermal resistance of chicks at low temperatures) and Amrox (selection for thermal resistance was not carried out). To «reprogram» the adaptive patterns of the regulatory characteristics of the temperature homeostasis system, dosed low-temperature exposure (+14...+16 °C, 6 h) was used during the sensitive period of early embryogenesis (day 5 of incubation). In day-old chicks, a change in the orientation of metabolic processes was evaluated, and in 14-day-old chicks, additionally, a change in the level of adaptive abilities after exposure to a low-temperature stress factor (+7 °C, 1 hour) in a comparative aspect (experimental groups vs control groups that were not cooled). The relative expression of the *TRPM2* and *RYR2* genes in tissue samples of embryos and chicks was determined by PCR. For 14-day-old chicks of the Russian Snow-White breed, the strength of the impact of the abiotic stress factor was probably insufficient to cause serious changes in the metabolic processes of the body. A single dosed cooling of Amrox embryos led to changes in the body reaction rate of the chicks of the experimental group, which survived until the age of 14 days. Chicks of this group are better adapted to cold stress, lipids and proteins are mainly used as an energy substrate and the mechanisms of non-shivering thermogenesis in muscles are used to maintain body temperature. This is confirmed by differences in the expression patterns of the *RYR2* and *TRPM2* genes, the level of relative expression of which in the pectoral muscle of chicks of the experimental groups is higher than in the control (in Amrox chicks by 2.5 times). Dosed single low-temperature exposure during the sensitive period of early embryogenesis can help to increase the adaptive abilities of the body of chicks up to 14 days of age in conditions of hypothermic stress.

Ключевые слова: куры, эмбрион, терморезистентность, абиотический фактор, экспрессия генов.

Keywords: chickens, embryo, thermoresistance, abiotic factor, gene expression

Терморегуляция – это физиологический процесс, позволяющий поддерживать постоянную температуру тела в условиях непостоянной температуры внешней среды посредством регулирования процессов теплоотдачи и теплообразования.

Изучение особенностей биологического развития эмбриона птиц (в частности, кур) под влиянием абиотических факторов, например высокой или низкой температуры, – удобная модель исследования его адаптационных возможностей, поскольку эмбрион развивается вне тела матери, а также поддается «перепрограммированию» под влиянием внешних факторов, воздействующих в период эмбриогенеза. Так, широко исследовано улучшение термотолерантности цыплят к жаре в более позднем возрасте посредством представления развивающемуся эмбриону тепловых стимулов во время инкубации. В литературе достаточно много информации о влиянии повышенного температурного фона инкубации яиц на приобретение термотолерантности у кур, в частности, цыплят-бройлеров, на развитие продуктивных и адаптивных признаков в условиях жаркого климата [1, 2, 3]. Улучшенная термоустойчивость цыплят была достигнута путем использования повышенных температур инкубации, при этом период, в течение которого выполняли такие манипуляции, варьировал от 7-го до 20-го дня эмбрионального развития, а продолжительность воздействия – от 3 до 12 ч [4, 5].

В то же время низкотемпературное воздействие в эмбриональный период рассматривали исключительно для изучения снижения негативного влияния метаболического тепла на эмбрион и профилактики эндокринных заболеваний у птицы мясных промышленных кроссов [6, 7, 8]. Аналогично «программируется» адаптация к пониженным температурам среды, однако низкотемпературное влияние изучено в гораздо меньшей степени. Поскольку значительное количество кур содержится в странах с холодным климатом и поддержание оптимальных условий выращивания связано со значительными затратами на энергоресурсы, исследования, направленные на выявление генов-кандидатов, участвующих в механизмах терморегуляции при низких температурах, также актуальны.

Существует ряд генофондных пород кур, приспособившихся к жизни в условиях холодной среды и в результате развивших различные физиологические и биохимические механизмы адаптации к низким температурам [9, 10, 11]. К их числу относится русская белоснежная порода кур (РБ), содержащаяся в коллекции биоресурсов «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» Российского научно-исследовательского института генетики и селекции сельскохозяйственных животных – филиала Федерального исследовательского центра животноводства им. Л. К. Эрнста (<http://vniigen.ru/ckp-geneticheskaya-kollekciya-redkix-i-ischeyayushhix-porod-kur>). Ее представители обладают высокими адаптивными способностями, начиная с суточного возраста.

В более ранних исследованиях идентифицированы 12 генов-кандидатов в специфичных для РБ породы гомозиготных районах (ROH), которые предположительно связаны с ее терморегуляционными особенностями [12]. Для более подробного изучения были выбраны 2 наиболее релевантных гена: *TRPM2* и *RYR2*.

Как известно, за поддержание температуры тела отвечает вегетативная нервная система и гипоталамус. Организм воспринимает изменения температуры окружающей среды благодаря нервным окончаниям – терморецепторам, расположенным в различных органах и тканях, включая мозг. Они постоянно пере-

дают информацию в центральную нервную систему, а именно в гипоталамус, в котором расположен центр терморегуляции. Самое большое семейство «датчиков температуры» представляют собой ионные каналы с переходным рецепторным потенциалом (TRP). TRP активируются, если температура окружающей среды выходит за пределы верхнего или нижнего порогового значения. У млекопитающих известно 11 таких каналов, а у домашней птицы – только 3, и они почти не изучены [13]. Согласно литературным данным, за чувствительность к холоду отвечает ионный канал *TRPM8*. *TRPM2* филогенетически близок к этому каналу, однако считается, что его физиологическая роль заключается в предотвращении повышения температуры тела [14], что актуально для РБ кур, поскольку состояние перегрева у холодоадаптированных организмов наступает гораздо быстрее, чем у неадаптированных. Кроме того, некоторые активные формы кислорода также служат положительными регуляторами активации *TRPM2*, благодаря чему этот ионный канал может выступать в качестве датчика окислительной реакции в некоторых клеточных системах [15]. Предположительно, этот ген влияет на снижение чувствительности центральных терморецептивных структур РБ цыплят к низкой температуре.

Ген *RYR2* был выбран на основании того, что каналы высвобождения Ca^{2+} с высокой проводимостью, известные как рианодиновые рецепторы (RyR), опосредуют высвобождение Ca^{2+} из эндо/саркоплазматического ретикула в цитоплазму и, таким образом, играют важную роль, регулируя возбуждение и сокращение клеток скелетных и сердечных мышц, тем самым влияя на скорость метаболизма. Длительное воздействие холода на птиц вызывает развитие несократительного термогенеза (НСТ), процессы которого протекают преимущественно в скелетных мышцах. НСТ осуществляется при бесполезном переносе кальция (Ca^{2+}) через рианодиновый рецептор (RyR) и сарко-эндоплазматический ретикулум Ca^{2+} -АТФазу (SERCA) [16]. Скелетные мышцы птиц обладают очень высокой способностью поглощать циркулирующие жирные кислоты. В отличие от млекопитающих, до 95% мышечной работы на выносливость у птиц может обеспечивать энергия, полученная из липидов. Использование этого высококалорийного топлива, вероятно, сначала развивалось как адаптация к энергозатратному полету [17]. Терморегуляторный термогенез у птиц осуществляют именно скелетные мышцы, поскольку у них нет бурой жировой ткани.

В связи с изложенным основной целью исследований было определение участия аннотированных генов-кандидатов, предположительно связанных с высокими адаптационными способностями кур в раннем онтогенезе, в процессах терморегуляции и термоадаптации.

Методика. Объектом исследования были куры породы русская белоснежная и амрокс (<http://vniigen.ru/ckp-geneticheskaya-kollekciya-redkix-i-ischeyayushhix-porod-kur>) в возрасте 52 недель жизни. Порода кур русская белоснежная, яичного направления продуктивности – специализированная, для целей биопромышленности (производство эмбриональных вирусных вакцин). Кроме того, при ее создании проводили селекцию на терморезистентность молодняка в условиях низких температур, а также на устойчивость птицы к неопластическим заболеваниям. Амрокс – порода комбинированного направления продуктивности, селекцию на терморезистентность в ней не проводили.

Для постановки эксперимента яйца взвешивали на электронных весах HL-400EX (A&D Company Ltd.,

Табл. 1. Весовые характеристики инкубационного яйца и цыплят разного возраста, отобранных для исследования

Показатель		Группа			
		контрольная		опытная	
		амрокс	РБ	амрокс	РБ
Инкубационные яйца	п	60	60	60	60
	масса яйца, г	55,1 ± 0,3	58,3 ± 0,4	53,5 ± 0,4	60,1 ± 1,1
Суточные цыплята	п	10	10	10	10
	живая масса, г	39,4 ± 0,5	41,9 ± 1,0	38,5 ± 0,6	42,2 ± 1,0
14-суточные цыплята	п	10	10	10	10
	живая масса, г	173,5 ± 4,3	149,2 ± 1,5	181,0 ± 4,6	153,1 ± 2,4

Япония) и помещали в инкубаторе «РЭМИЛ-С» (REMIL, Россия). Инкубировали в лабораторных условиях при следующем режиме: +38,3 °C с 1-е по 3-и сутки, +37,8 °C с 4-е по 17-е сутки, +37,3 °C с 18-е по 21-е сутки. Яйца кур опытных групп на 5-е сутки инкубации (чувствительный период эмбриогенеза) охлаждали в течение 6 ч при +14...+16 °C. Суточных цыплят, отобранных для изучения активности релевантных генов-кандидатов, не подвергали охлаждению с целью определения динамики изменений регуляторных характеристик системы температурного гомеостаза. В 14-суточном возрасте после 12-часовой голодной выдержки их охлаждали в течение 1 ч при +7 °C для выяснения механизмов адаптации, сформировавшихся под воздействием аналогичного стресс-фактора в раннем эмбриогенезе.

Скорость газообмена (потребление кислорода и образование углекислого газа) измеряли на газоанализаторе МАГ-6-П-К (НОВАПРИБОР, Россия). Для этого суточных цыплят помещали в герметичную камеру. Время выдержки составило 15 минут при температуре +33 °C. Объем камеры и время выдержки были выбраны таким образом, чтобы предотвратить гипоксию. Дыхательный коэффициент определяли как объем выделяемого углекислого газа, по сравнению с объемом кислорода, поглощенного во время дыхания. Это соотношение характеризует направленность обменных процессов в организме (дыхательный коэффициент, равный 1,0, характеризует катаболизм чистых углеводов, 0,5 – жиров) и используется для обозначения смеси липидов, углеводов и белков в метаболическом субстрате [18]. На всех этапах исследования формирование всех групп проводили по принципу групп-аналогов с учетом породных особенностей (табл. 1).

Убой цыплят проводили методом декапитации; кровь для биохимического анализа собирали в пробирки с активатором свертывания (кремнезем) (ООО «Астрamed», Китай). В сыворотки крови определяли содержание триглицеридов (ммоль/л), глюкозы (ммоль/л), общего белка (г/л) и креатинина (мкмоль/л) на спектрофотометре UNICO 1200/1201 (UNICO, США) с использованием коммерческих наборов фирмы АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия).

Для изучения относительной экспрессии генов *TRPM2* и *RYR2* в контрольных и опытных группах отбирали навески различных органов и тканей у 7-суточных эмбрионов (аллантоис, навеска тела и головы после энуклеации), у суточных цыплят (мозг, печень, грудные мышцы) и у 14-суточных цыплят через 3 ч после воздействия абиотического стресс-фактора (мозг, печень, грудные мышцы). Образцы ткани немедленно помещали в стабилизатор РНК (ООО «Биолабмикс», Россия) и хранили при –80 °C. РНК выделяли с использованием коммерческого набора «Реагент «Лира»» (ООО «Биолабмикс», Россия). Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop

(Thermo Fisher Scientific, США). Средняя величина этого показателя варьировала в зависимости от типа ткани в пределах 350...800 нг/мкл. Уровень относительной экспрессии определяли двухэтапным методом, который включал в себя синтез кДНК с реагентами набора «Обратная транскриптаза М-MuLV-RH» (ООО «Биолабмикс», Россия) и ПЦР-РВ с использованием «БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×)» (ООО «Биолабмикс», Россия) на приборе QuantStudio™ 5 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве эндогенного контроля был выбран ген *Ap2m1* (табл. 2). Подбор последовательности праймеров выполняли в программе BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Табл. 2. Последовательность праймеров для генов и режим амплификации

Ген	Олигонуклеотидная последовательность	Режим ПЦР-РВ
<i>Ap2m1</i>	F: AAAAACAGGGCAAAGGGACT R: CACGGAAGGGAAGGATGATG	горячий старт – 95 °C, 5 мин,
<i>RYR2</i>	F: ACAACAAAACAGGCTCCGC R: CCAGCTTCCTTCCCAGCTAC	40 циклов:
<i>TRPM2</i>	F: GAACCAAGGCAGCCTCTCAT R: CTCCAGCACCACACAAACG	денатурация – 95 °C, 30 с отжиг праймеров – 60 °C, 30 с элонгация – 72 °C, 30 с плавление – 65...95 °C

Данные на графиках и в таблице представлены в виде Mean±SE. Достоверность различий оценивали с использованием критерия Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Расчет изменения уровня экспрессии генов выполняли методом 2ddCt [19]. Полученные результаты обрабатывали с использованием GraphPad Prism 12.0 (GraphPad Software Inc., США).

Результаты и обсуждение. Согласно литературным данным, формирование адаптивных изменений начинается сразу после воздействия температурного раздражителя на организм и впоследствии проявляется в изменении терморегуляторного ответа организма на аналогичное повторное воздействие [14].

По уровню относительной экспрессии гена *RYR2* в эмбриональных тканях достоверных различий между анализируемыми группами не установлено. После

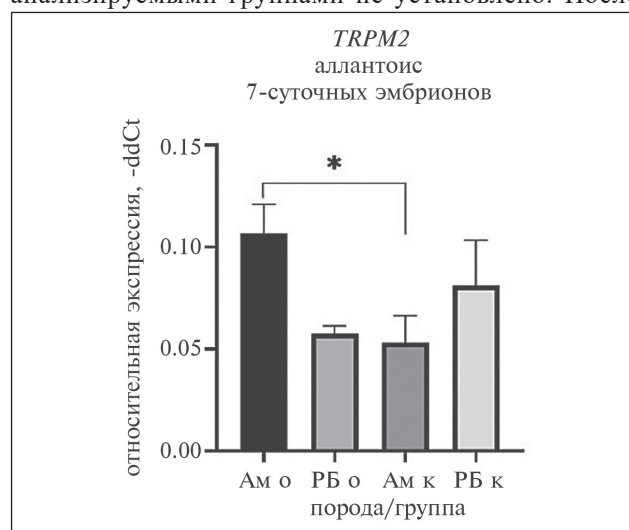


Рис. 1. Относительная экспрессия гена *TRPM2* в аллантоисе 7-суточных эмбрионов (* $p < 0,05$): Ам к – амрокс, контрольная группа; РБ к – русская белоснежная, контрольная группа; Ам о – амрокс, опытная группа; РБ о – русская белоснежная, опытная группа.

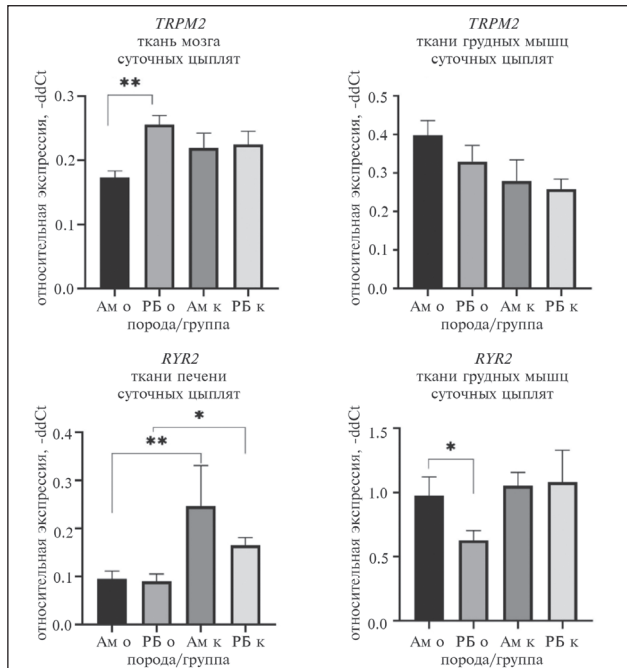


Рис. 2. Относительная экспрессия гена *TRPM2* и *RYR2* в образцах тканей суточных цыплят (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$): Ам к – амрокс, контрольная группа; РБ к – русская белоснежная, контрольная группа; Ам о – амрокс, опытная группа; РБ о – русская белоснежная, опытная группа.

охлаждения эмбрионов в чувствительный период повышенная активность гена *TRPM2* была отмечена только в аллантаоисе 7-суточных эмбрионов. Уровень относительной экспрессии этого гена у эмбрионов породы амрокс опытной группы, в сравнении с контролем, увеличился более чем в 2 раза (рис. 1). Эмбрионы русских белоснежных кур практически не отреагировали на воздействие изучаемого стресс-фактора.

Аналогичные результаты по уровню экспрессии гена *TRPM2* наблюдали у суточных цыплят: особи русской белоснежной породы почти не отреагировали на охлаждение изменением уровня относительной экспрессии *TRPM2* в мозге и грудной мышце, в то время как у цыплят амрокс величина этого показателя в грудной мышце выросла в 1,4 раза (рис. 2). Предположительно, это связано с тем, что длительная селекция на терморезистентность в русской белоснежной породе привела к физиологическим изменениям, вызвавшим смещение диапазона температур, выход за пределы которых приводит к активации гена ионного канала *TRPM2*.

Холодовой стресс оказывает большое влияние на обмен веществ в организме и задействует каскад механизмов поддержания температурного гомеостаза. В результате активации оси гипоталамус – гипофиз увеличивается уровень тиреоидных гормонов, мобилизуются запасы гликогена, а также повышается экспрессия генов, таких как *RYR2*, связанных с сократительными элементами. Особую роль в метаболизме тиреоидных гормонов и поддержании термогенеза играет печень, которая имеет тесную метаболическую связь с мышцами и способна стимулировать их сокращение, тем самым регулируя выработку тепла [20].

Относительная экспрессия *RYR2* в грудной мышце суточных цыплят русской белоснежной и амрокс в контрольных группах была ниже, чем в опытных, в 2,0 и 2,8 раза соответственно. Уровень экспрессии

этого гена в печени был выше, чем в грудной мышце, для всех групп, за исключением опытной группы амрокс, в 3,5...6,5 раз (рис. 2). Предположительно, у неонатальных цыплят контрольных групп различные манипуляции на выводе (сортировка, взвешивание, мечение крыловыми кольцами), сопряженные с нахождением в более холодной среде (23 °C в комнате против 37,3 °C в инкубаторе) привели к стрессу, в ответ на который организм был вынужден усилить интенсивность обмена веществ, о чем и свидетельствует повышенная экспрессия *RYR2* в печени. Однако у цыплят опытных групп попадание в более холодную среду (23 °C) не вызвало стрессовой реакции. Очевидно, однократное глубокое охлаждение эмбрионов в чувствительный период эмбриогенеза привело к трансформации процессов основного обмена и регуляторных характеристик системы температурного гомеостаза, что выражается в повышении порога возникновения реакции у суточных цыплят на температуры ниже термонейтральной.

Указанные особенности цыплят контрольных и опытных групп сохранились до 14-суточного возраста и проявились на фоне дозированного низкотемпературного воздействия (1 ч при +7 °C). Прежде всего, необходимо отметить межпородные различия в реакции на холод. Молодняк русской белоснежной породы легко перенес воздействие низкотемпературного стресс-фактора, в то время как цыплята породы амрокс продемонстрировали такие характерные признаки гипотермии, как вялость, сонливость, холодная дрожь, скрюченность тела (рис. 3).

Если суточный цыпленок не способен эффективно поддерживать температурный гомеостаз, оставаясь, по сути, еще пойкилотермным, то в возрасте 2 недель он обладает более совершенными механизмами терморегуляции и может поддерживать температуру тела посредством сократительного (холодовая дрожь) и несократительного термогенеза.

На наш взгляд, более высокий уровень относительной экспрессии *RYR2* в печени 14-суточных цыплят амрокс контрольной группы (почти в 2 раза, по сравнению с опытной) и низкий (в 2,8 раза, по сравнению с опытной) – в грудной мышце, после низкотемпературного воздействия, в сочетании с холодной дрожью – свидетельствует о мобилизации запасов гликогена в организме и активации процессов глюконеогенеза в печени с целью поддержания температуры тела. Цыплята опытной группы задействовали иной механизм терморегуляции. В ответ на охлаждение у них увеличилась относительная экспрессия гена *RYR2* в грудной мышце (в 2,5 раза, по сравнению



Рис. 3. Фенотипические проявления реакции на холод у цыплят контрольных групп пород амрокс (слева) и русская белоснежная (справа).

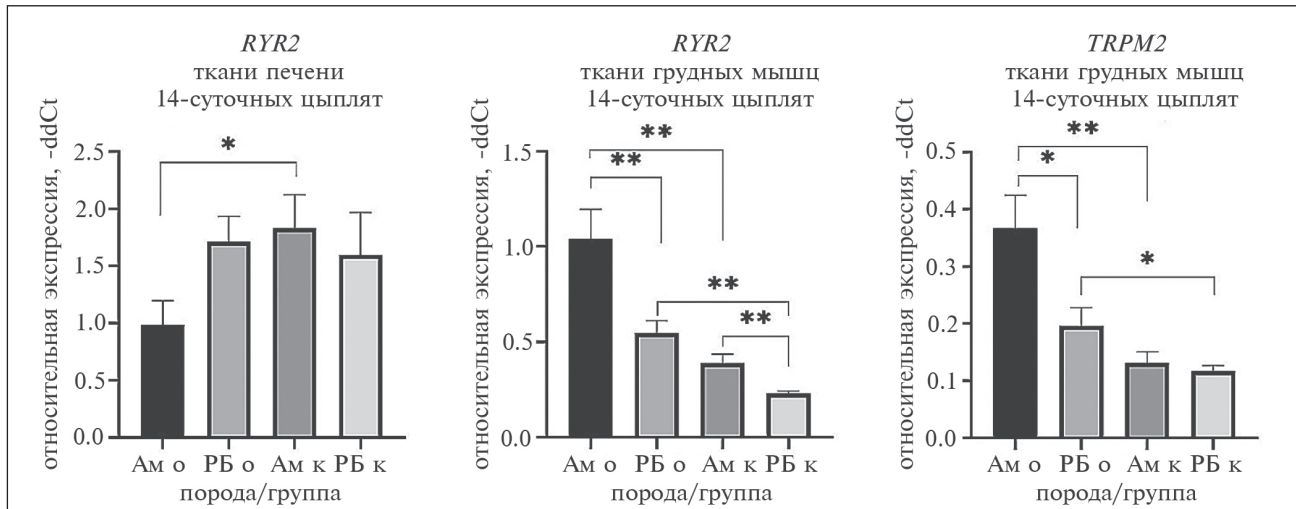


Рис. 4. Относительная экспрессия генов RYR2 и TRPM2 в образцах тканей 14-суточных цыплят спустя 3 ч после дозированного низкотемпературного воздействия (* $p<0,05$; ** $p<0,01$): Ам к – амрокс, контрольная группа; РБ к – русская белоснежная, контрольная группа; Ам о – амрокс, опытная группа; РБ о – русская белоснежная, опытная группа.

с контролем), что, по нашему мнению, служит показателем активации механизма НСТ, который, как известно, происходит преимущественно в мышцах (рис. 4).

Молодняк русской белоснежной породы, как и ожидалось, отреагировал на охлаждение в гораздо меньшей степени, в целом уровень экспрессии гена RYR2 в грудной мышце у них был ниже, чем у цыплят амрокс (в среднем в 2 раза); в опытной группе величина этого показателя была несколько выше, чем в контроле. Уровень экспрессии гена рианодиневого рецептора в печени у 14-суточных цыплят русской белоснежной породы после охлаждения был довольно высок, разницы между контролем и опытом практически не наблюдалось. Вероятно, это связано тем, что желток яиц кур русской белоснежной породы мельче, чем у птиц породы амрокс: относительная величина желтка 26...27% против 32...33% соответственно [21]. Поэтому, обладая более ограниченными ресурсами питательных веществ в организме, неонатальные цыплята русской белоснежной породы вынуждены в целях обеспечения энергетических потребностей организма более интенсивно абсорбировать остаточный желточный мешок.

Табл. 3. Биохимические показатели крови цыплят разного возраста анализируемых групп (n=10 в каждой группе)

Показатель	Группа			
	контрольная		опытная	
	амрокс	русская белоснежная	амрокс	русская белоснежная
Суточные цыплята на выводе				
Триглицериды, ммоль/л	2,2 ^a ± 0,3	1,5 ^b ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Глюкоза, ммоль/л	15,2 ± 0,4	14,3 ^a ± 0,4	14,2 ^a ± 0,5	12,8 ^b ± 0,4
Общий белок, г/л	41,9 ^a ± 1,9	29,4 ^c ± 3,6	31,1 ^c ± 3,1	28,9 ± 1,9
Креатинин, мкмоль/л	47,2 ± 3,7	30,5 ± 12,0	32,2 ± 8,0	37,5 ± 7,0
Дыхательный коэффициент	0,67 ^a ± 0,03	0,68 ± 0,02	0,78 ^b ± 0,04	0,65 ^a ± 0,03
14-суточные цыплята после низкотемпературного воздействия				
Триглицериды, ммоль/л	2,6 ^a ± 0,2	0,7 ^c ± 0,1	1,7 ^{ac} ± 0,2	0,7 ^d ± 0,1
Глюкоза, ммоль/л	20,6 ^{ac} ± 0,6	17,6 ^d ± 0,3	15,3 ^c ± 1,7	15,1 ^b ± 0,9
Общий белок, г/л	32,3 ^a ± 1,4	26,9 ^{ac} ± 0,7	31,9 ± 1,2	31,9 ^d ± 1,0
Креатинин, мкмоль/л	29,5 ± 5,2	27,5 ± 3,9	33,0 ± 5,4	23,6 ± 4,8

Различия между показателями в соответствующих строках статистически достоверны: ^{ab, bd} при $p<0,05$, ^{ac} $p<0,01$, ^{ed} $p<0,001$.

Активность гена TRPM2 после низкотемпературного воздействия возрастает у цыплят всех опытных групп, в сравнении с контрольными. Поскольку механизмы НСТ сопряжены с повышенным потреблением кислорода, необходимого для окислительного фосфорилирования, увеличивается и относительная экспрессия гена ионного канала TRPM2 как датчика окислительной реакции. Это косвенно свидетельствует и о различиях в ориентации адаптационного паттерна у цыплят контрольных и опытных групп.

Однократное дозированное воздействие сублетальных пониженных температур в чувствительный период эмбриогенеза изменило ориентацию адаптационного паттерна у цыплят опытных групп, в сравнении с контрольными (табл. 3). Так, у неонатальных цыплят амрокс контрольной группы, в сравнении с цыплятами остальных групп, отмечено более высокое содержание в крови триглицеридов (в 1,4...1,8 раза, $p<0,05$) и общего белка (в 1,3...1,4 раза, $p<0,01$), а также самое высокое содержание продукта белкового обмена – креатинина (в 1,3...1,5 раза). Очевидно, основным источником энергии для них служат жиры; запасы гликогена в организме значительно истощены. Показатель дыхательного коэффициента также указывает на преимущественно жировой обмен.

Креатинин – конечное звено белкового обмена, продукт распада аминокислоты креатина, вырабатывается в мышцах и участвует в энергетическом обмене мышечной и других тканей. Согласно литературным данным, предшественник креатинина – креатин – у эмбрионов перед выводом накапливается в основном в мышцах груди, в то время как гликоген, основное место метаболизма которого печень, накапливается преимущественно в ткани желточного мешка. К моменту вылупления уровень креатина увеличивается, а гликогена – снижается. При истощении запасов гликогена, который служит основным источником энергии до начала потребления корма неонатальными цыплятами, эту функцию берет на себя креатин [22]. Таким образом, уровень содержания креатинина в крови косвенно позволяет судить о наличии запасов гликогена.

Неонатальные цыплята амрокс опытной группы, в сравнении с птицей остальных групп, наоборот, более равномерно, без отклонения в преимущественное ис-

пользование какого-либо субстрата, использовали все виды питательных веществ; показатель дыхательного коэффициента указывает на использование преимущественно белков желточного мешка и запасов гликогена.

У суточных цыплят русской белоснежной породы, адаптированной к низким температурам и характеризующейся мелкожелткостью яиц, значения всех биохимических показателей крови были ниже, чем у цыплят амрокс. Особи опытной группы в большей степени израсходовали углеводные запасы организма, их обмен веществ уклонялся в сторону использования жиров в качестве основного источника энергии.

Повторное дозированное воздействие на 14-суточных цыплят стресс-фактора (низкая температура), аналогичное воздействию, которому подверглись цыплята опытных групп в период раннего эмбриогенеза, вызвало разные терморегуляторные реакции, которые зависели как от породы птиц, так и от того, сталкивался ли их организм с этим абиотическим фактором в пренатальный период. Кроме того, эксперимент был проведен после предварительной 12-часовой голодной выдержки, и до его окончания цыплята не получали корм. Отсутствие источника доступных углеводов в процессе эксперимента в сочетании с гипотермическим воздействием оказали на организм глубокое стрессовое влияние. Сильнее всего на охлаждение реагировали цыплята амрокс контрольной группы, которые для поддержания температуры тела активировали механизм глюконеогенеза, то есть синтеза глюкозы из жиров и белков. Косвенно об этом можно судить по высоким уровням триглицеридов (в 1,5 раза больше, чем в опытной группе, и в 3,7 раза, чем у цыплят РБ обеих групп, $p < 0,01$), глюкозы (в 1,4 раза выше, чем у РБ, $p < 0,01$) и общего белка (в 1,2 раза выше, чем у РБ контрольной группы) в крови. Глюконеогенез важен для предупреждения существенного снижения уровня глюкозы в крови во время голодания, он также активируется на холоде для получения дополнительной энергии, необходимой для поддержания температурного гомеостаза. Цыплята амрокс опытной группы отреагировали на низкотемпературное воздействие в меньшей степени, поскольку их организм уже сталкивался с этим стресс-фактором и смог в некоторой степени к нему адаптироваться.

Конечно, процесс глюконеогенеза протекал в печени цыплят всех групп, поскольку они все находились на голодной выдержке, однако птица русской белоснежной породы (а также цыплята амрокс опытной группы) для поддержания температуры тела задействовала и другие механизмы, в частности НСТ. Кроме того, для особей русской белоснежной породы, особенно в опытной группе, уровень воздействия стресс-фактора был недостаточным для того, чтобы вызвать серьезные перестройки в обменных процессах организма.

Выводы. Однократное дозированное охлаждение эмбрионов в диапазоне сублетальных температур в чувствительный период эмбриогенеза приводит к изменению ориентации адапционного паттерна регуляторных характеристик системы температурного гомеостаза, которые сохраняются до 14-суточного возраста цыплят. Птица, которая подверглась такому воздействию, для поддержания температуры тела задействует не только процессы использования в качестве энергетического субстрата гликогена и активацию глюконеогенеза в печени, но и более эффективный механизм терморегуляции – несократительный термогенез в мышцах, что подтверждают различиями в паттернах экспрессии генов *RYR2* и *TRPM2* у цыплят контрольных и опытных групп.

Необходимо также отметить межпородные различия. Поскольку в русской белоснежной породе проводили селекцию на терморезистентность молодняка к холоду, у этой птицы произошел сдвиг диапазона термонейтральных температур в сторону понижения. В результате уровень и экспозиция температурного стресс-фактора в проведенных исследованиях были недостаточными для того, чтобы вызвать серьезные перестройки в обменных процессах организма.

При этом даже однократное дозированное низкотемпературное воздействие в чувствительный период раннего эмбриогенеза позволило «перепрограммировать» ориентацию обменных процессов у эмбрионов и цыплят, что увеличило адаптационные возможности 2-недельных цыплят в условиях пониженных температур среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по темам ГЗ 124020200114-7 / 124020200029-4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.

Все процедуры на животных проводили в соответствии с Протоколом Комиссии по этике экспериментов на животных Федерального научного центра животноводства им. Л. К. Эрнста (№ 2020/2) и Законом Российской Федерации о ветеринарной медицине (№ 4979-1 от 14 мая 1993 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы статьи заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Литература.

1. *Brooding temperatures for chicks acclimated to heat during incubation: effects on post-hatch intestinal development and body weight under heat stress* / M. Aksit, S. Yalcin, C. Yenisey, et al. // *British Poultry Science*. 2010. Vol. 51. No. 3. P. 444–452. doi: 10.1080/00071668.2010.495746.
2. *Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses to later heat exposure in chickens: a review* / T. Loyau, L. Bedrani, C. Berri, et al. // *Animal*. 2015. Vol. 9. No. 1. P. 76–85. doi: 10.1017/S1751731114001931.
3. *Morita V.S., Almeida V.R., Matos Junior J.B., Vicentini T.I., van den Brand H., Boleli I. C. Incubation temperature alters thermal preference and response to heat stress of broiler chickens along the rearing phase* // *Poultry Science*. 2016; 1; 95 (8): 1795–1804. doi: 10.3382/ps/pew071.
4. *Hatching phase influences thermal preference of broilers throughout rearing* / Júnior J. B. Matos, T. I. Vicentini, A. R. Almeida, et al. // *PLoS One*. 2020. Vol. 15. No. 7. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0235600> (дата обращения 05.06.2024). doi: 10.1371/journal.pone.0235600.
5. *Al-Zghoul M. B., Mohammad K. M. M. Saleh Effects of thermal manipulation of eggs on the response of jejunal mucosae to posthatch chronic heat stress in broiler chickens* // *Poultry Science*. 2020. Vol. 99. No. 5. P. 2727–2735. doi: 10.1016/j.psj.2019.12.038.
6. *Exposure of embryos to cyclically cold incubation temperatures durably affects energy metabolism and antioxidant pathways in broiler chickens* / T. Loyau, A. Collin, C. Yenisey, et al. // *Poultry Science*. 2014. Vol. 93. No. 8. P. 2078–86. doi: 10.3382/ps.2014-03881.
7. *Effect of low incubation temperature and low ambient temperature until 21 days of age on performance and body temperature in fast-growing chickens* / D. Nyuadzi, A. Travel, B. Méda, et al. // *Poultry Science*. 2017. Vol. 96. No. 12. P. 4261–4269. doi: 10.3382/ps/pex264.

8. Short cold exposures during incubation and postnatal cold temperature affect performance, breast meat quality, and welfare parameters in broiler chickens / D. Nyuadzi, C. Berri, L. Dusart, et al. // *Poultry Science*. 2020. Vol. 99. No. 2. P. 857–868. doi: 10.1016/j.psj.2019.10.024.
9. Genome-wide scan for selective footprints and genes related to cold tolerance in Chantecler chickens / N. Y. Xu, W. Si, M. Li, et al. // *Zoological Research*. 2021. Vol. 42. No. 6. P. 710–720. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.189.
10. Thyroid transcriptome analysis reveals different adaptive responses to cold environmental conditions between two chicken breeds / S. Xie, X. Yang, D. Wang, et al. // *PLoS One*. 2018. Vol. 13. No. 1. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0191096> (дата обращения 05.06.2024). doi: 10.1371/journal.pone.0191096.
11. Performance differences of Rhode Island Red, Bashang Long-tail Chicken, and their reciprocal crossbreds under natural cold stress / S. Xie, X. Yang, Y. Gao, et al. // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2017. Vol. 30. No. 10. P. 1507–1514. doi: 10.5713/ajas.16.0957.
12. Identification of Key Candidate Genes in Runs of Homozygosity of the Genome of Two Chicken Breeds, Associated with Cold Adaptation / E. S. Fedorova, N. V. Dementieva, Y. S. Shcherbakov, et al. // *Biology (Basel)*. 2022. Vol. 11. No. 4. URL: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/4/547> (дата обращения 05.06.2024). doi: 10.3390/biology11040547.
13. Influence of temperature during incubation on the mRNA levels of temperature sensitive ion channels in the brain of broiler chicken embryos / S. M. D. Verlinden, T. Norton, M. L. V. Larsen, et al. // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2022. Vol. 268. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1095643322000575?via%3Dihub> (дата обращения 05.06.2024). doi: 10.1016/j.cbpa.2022.111199.
14. Evtushenko A. A., Voronova I. P., Kozyreva T. V. Effect of Long-Term Adaptation to Cold and Short-Term Cooling on the Expression of the TRPM2 Ion Channel Gene in the Hypothalamus of Rats // *Current Issues in Molecular Biology*. 2023. Vol. 45. No. 2. P. 1002–1011. doi: 10.3390/cimb45020065.
15. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia / R. Kraft, C. Grimm, K. Grosse, et al. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004. Vol. 286. No. 1. P. 129–137. doi: 10.1152/ajpcell.00331.2003.
16. Seasonal cold induces divergent structural/biochemical adaptations in different skeletal muscles of Columba livia: evidence for nonshivering thermogenesis in adult birds / P. Pani, G. Swalsingh, S. Pani, et al. // *Biochemical Journal*. 2023. Vol. 480. No. 17. P. 1397–1409. doi: 10.1042/BCJ20230245
17. Muscle non-shivering thermogenesis and its role in the evolution of endothermy / J. Nowack, S. Giroud, W. Arnold, et al. // *Frontiers in physiology*. 2017. Vol. 8. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2017.00889/full> (дата обращения 05.06.2024). doi: 10.3389/fphys.2017.00889.
18. Walsberg G., Wolf B. Variation in the respiratory quotient of birds and implications for indirect calorimetry using measurements of carbon dioxide production // *Journal of Experimental Biology*. 1995. Vol. 198. No. 1. P. 213–219. doi: 10.1242/jeb.198.1.213.
19. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{−ΔΔC_T} Method // *Methods*. 2001. Vol. 25. P. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
20. Ruuskanen S., Hsu B. Y., Nord A. Endocrinology of thermoregulation in birds in a changing climate // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2021. Vol. 519. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720720303907?via%3Dihub> (дата обращения 05.06.2024). doi: 10.1016/j.mce.2020.111088.
21. Станишевская О. И., Федорова Е. С. Сравнительная оценка стресс-реактивности организма кур пород русская белая с мутацией sw⁺ и амрокс на гипотермию в эмбриональном и раннем постнатальном периодах онтогенеза // *Сельскохозяйственная биология*. 2019. Vol. 54. No. 6. P. 1135–1143. doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1135rus.
22. Supply and demand of creatine and glycogen in broiler chicken embryos / J. Dayan, T. Melkman-Zehavi, N. Reich, et al. // *Frontiers in Physiology*. 2023. Vol. 14. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2023.1079638/full> (дата обращения 05.06.2024). doi: 10.3389/fphys.2023.1079638.

Поступила в редакцию 02.07.2024

После доработки 30.08.2024

Принята к публикации 05.11.2024