

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Блажнова Галина Николаевна

**ДИНАМИКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАЗНОПОЛЫХ КУРИНЫХ
ЭМБРИОНОВ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ**

06.02.01 - диагностика болезней и терапия животных, патология,
онкология и морфология животных

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор, академик РАЕН
Л.Д. Тимченко

Ставрополь – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ	СТР.
ВВЕДЕНИЕ.....	3-8
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Морфологические и функциональные показатели развития куриного эмбриона в онтогенезе.....	9-27
1.2. Принципы формирования экспериментальных групп куриных эмбрионов для изучения онтогенетических закономерностей.....	28-34
1.3. Особенности развития куриного эмбриона в зависимости от пола.....	34-40
Глава 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭТАПОВ РАБОТЫ.....	41-50
Глава 3. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ РАЗНОГО ПОЛА В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ (результаты собственных исследований)	
3.1. Сравнительная оценка эффективности разделения куриных эмбрионов по полу методами взвешивания яиц перед инкубацией и визуальной оценки гонад.....	51-54
3.2. Уровень половых гормонов (тестостерон, эстрадиол) у экспериментальных куриных эмбрионов в онтогенезе.....	54-61
3.3. Оценка физического развития куриных эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок.....	61-70
3.4. Морфометрические показатели осевого скелета и костей грудной и тазовой конечностей у куриных эмбрионов в зависимости от половой принадлежности.....	70-80
3.5. Динамика уровня апоптоза и альфа-фетопротеина в онтогенезе разнополых куриных эмбрионов.....	80-90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91-109
ВЫВОДЫ.....	110-111
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114-137
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	138-140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности тематики исследований. Эта-лонной моделью для изучения закономерностей пренатального онтогенеза является куриный эмбрион, благодаря исследованию которого раскрыты особенности гисто- и органогенеза, изучены механизмы онтогенеза, получены данные о функциональных преобразованиях (Рагозина М.Н., 1961; Задарновская Г.Ф., 1966; Рольник В.В., 1968; Токин Б.П., 1970; Шмальгаузен И.И., 1984; Бессарабов Б.Ф., 2006; Трунова А.П., 2008; Черников С.В., 2012).

Опираясь на принцип «минимальных различий» на практике чаще экспериментальные группы формируются с учетом традиционных критериев: породность, идентичность условий инкубации, размер и масса яиц, целостность и окраска скорлупы, вероятность инфицирования и пр. (Сахер А-А.И., 2001; Долгорукова А.М., 2007; Голубцова В.А., 2008; Хохлов Р.Ю., 2009). Однако в биологии уже доказано, что одним из определяющих факторов, который потенциально может изменить результаты эксперимента, является пол (Маляренко Т.Н., Кураев Г.В, Маляренко Ю.Е., 2000; Таов И.Х., 2004; Арешидзе Д.А., Тимченко Л.Д., Сивакова Н.Н. и др., 2006; Тагиров М.Т., 2010). Так, признано, что половая дифференцировка обеспечивается половыми гормонами - стероидами, которые имеются как у мужских, так и у женских особей, но содержатся у них в различных пропорциях. Однако информация о количестве этих гормонов у разнополых куриных эмбрионов в литературе практически отсутствует.

При экспериментах в постнатальном онтогенезе учет половых различий давно является одним из традиционно используемых критериев отбора животных в экспериментальную группу. Однако в пренатальном периоде развития изучение показателей у разнополых особей очень сложный, трудоемкий и не всегда выполнимый процесс, связанный с этическими и методическими проблемами. А что касается куриных эмбрионов, то следует отметить отсутствие четких рекомендаций по достоверному определению их пола.

Имеются единичные данные по изучению отдельных показателей у разнополых куриных зародышей в конкретные сутки развития (Шредер В.Н., 1965; Гром А.М., 1966; Рольник В.В., 1968; Будиков О.М., 1971). В то же время подавляющее количество разносторонних исследований онтогенеза куриного эмбриона проведены без учета половой дифференцировки.

В свете изложенного представляет интерес изучение у разнополых эмбрионов кур ряда параметров, которые общепризнанны в качестве информативных для оценки интенсивности развития организма в пренатальном периоде онтогенеза. К их числу относится уровень апоптоза и альфа-фетопротеина, интегративно и ярко демонстрирующие интенсивность формообразовательных процессов в развивающемся эмбрионе (Шмагель К.В., Черешнев В.А., 2002).

Важнейшим критерием нормального развития является степень сформированности скелета и физического развития, полноценность которых тесно связана с гормональным фоном организма, в том числе уровнем половых гормонов (Фисинин В.И., Журавлёв И.В., Айдинян Т.Г., 1990). К сожалению, для куриного эмбриона, данные о размерах отдельных костей единичны, устаревшие и не отражают посуточной динамики в пренатальном онтогенезе, а для разнополых особей вообще отсутствуют. Отсутствуют также сведения о половых отличиях индексов физического развития.

В связи с вышеизложенным получение новых сведений о морфофункциональных особенностях куриного эмбриона, в том числе в соответствии с его половой дифференцировкой, представляется крайне актуальным.

Цель: изучить динамику морфофункциональных показателей куриных эмбрионов разного пола в процессе развития.

Задачи:

1) на основе оценки эффективности различных методов дифференцировки по полу сформировать экспериментальные группы куриных эмбрионов с учетом половых различий;

2) уточнить уровень половых гормонов у разнополых куриных эмбрионов в процессе развития;

3) исследовать морфометрические показатели роста и развития куриных эмбрионов разного пола и оценить их физическое развитие;

4) изучить закономерности изменчивости размеров осевого скелета и костей конечностей в пренатальном онтогенезе кур в зависимости от половой принадлежности;

5) исследовать динамику апоптического индекса и альфа-фетопротеина у куриных эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок.

Научная новизна. Впервые в пренатальном онтогенезе кур проведена сравнительная оценка методов отбора эмбрионов в экспериментальную группу (взвешивание яиц перед инкубацией, визуальная оценка половых желез) с указанием эффективности каждого из методов.

Выявлены закономерности динамики уровня тестостерона, эстрадиола, апоптоза и альфа-фетопротеина, морфометрических и остеометрических параметров разнополых куриных зародышей в онтогенезе. Для куриных зародышей обоего пола кросса Родонит 3 установлены нормативные значения перечисленных критериев в процессе инкубации.

Впервые установлены достоверные различия длины осевого скелета, грудной и тазовой конечностей у разнополых куриных эмбрионов в процессе инкубации. В пренатальном онтогенезе разнополых кур выявлена слабая коррелятивная взаимосвязь между апоптическим индексом и уровнем альфа-фетопротеина. Доказано, что ген *p53*, отвечающий за физиологическую гибель клеток присутствует у куриных эмбрионов обоего пола на протяжении инкубации.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследований динамики апоптического индекса, альфа-фетопротеина, половых гормонов, а также показателей физического развития и размеров костей грудной и тазовой конечностей куриных эмбрионов обоего пола в процессе инкубации, углубляют и расширяют представления о морфофункциональных особенностях куриного эмбриона в онтогенезе и могут быть использованы в фундаментальных, хозяйственных, и биотехнологических целях.

Данные о динамике тестостерона, эстрадиола и альфа-фетопротеина могут быть учтены при разработке технологии и получении биологически активных субстанций из эмбриональных тканей кур и препаратов на их основе, в том числе, гормон-содержащих и АФП-содержащих.

Результаты работы использованы в процессе патентного поиска по заявке № 2013144527 от 03.10.2013 г «Поликомпонентный мелатонинсодержащий препарат для регенерации тканей ротовой полости и способ его получения».

Результаты исследования внедрены и используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий по дисциплине «Биология размножения и развития» Северо-Кавказского федерального университета; по дисциплине «Анатомия и физиология» Ставропольского государственного педагогического института; по дисциплинам «Анатомия животных», «Цитология, гистология и эмбриология», «Физиология и этология животных» Донского государственного аграрного университета.

Материалы диссертации внедрены и используются в научно-исследовательской деятельности отдела инкубации Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства г. Сергиев-Посад; проблемной научно-исследовательской лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии НИИ прикладных биотехнологий Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета (приложение 1).

Полученные результаты внедрены и используются в практической деятельности ООО «Ставропольский птицекомплекс», ООО НПО «БиоМодуль» г. Ставрополь, а так же при производстве косметических средств из эмбриональных тканей птиц в производственную деятельность ООО НПО «СайТЭК» г. Ставрополь (приложение 2).

Результаты морфофункциональных показателей разнополых эмбрионов кур использованы в базовой части государственного задания №2014/216 по теме: «Разработка технологий комплексных ветеринарных биопрепаратов на основе

экологически чистого регионального сырья животного, растительного и микробного происхождения» в 2014 году.

Методология и методы исследования. Методологическая основа представлена принципиально новым подходом к организации эксперимента при работе с куриным эмбрионом, заключающимся в целесообразности формирования экспериментальных групп эмбрионов с учетом половых различий, что обеспечивает достоверность полученных результатов. В работе применен комплекс методов: морфометрические, остеометрические, метод индексов, специальные методы обработки эмбриона для оценки костного остова, выявления уровня апоптоза и АФП, а также методы анализа, сопоставления и статистики.

Положения, выносимые на защиту:

1) формирование экспериментальных групп куриных эмбрионов с учетом пола обеспечивает минимальный диапазон стандартного отклонения средней (m) исследуемых показателей в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий;

2) динамика всех морфометрических, остеометрических показателей, индексов физического развития, уровня эстрадиола, тестостерона, апоптоза, АФП имеет особенности в зависимости от половой принадлежности эмбрионов кур;

3) уровень апоптоза, АФП, половых гормонов, индексы физического развития, длина осевого скелета и костей грудной и тазовой конечностей у разнополых куриных эмбрионов на протяжении всего пренатального онтогенеза отличается.

Степень достоверности. Представленные в работе исследования выполнены в лабораторных условиях на откалиброванном сертифицированном оборудовании с использованием стандартизированных реактивов и общепринятых методик. В работе использовано 6180 куриных эмбрионов одного кросса - Родонит 3. Полученные результаты обработаны с помощью программы Primer of Biostatistics (Version 4.03).

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на VI Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (г. Астрахань, 2008), XIII Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» (г. Новосибирск, 2008), научно-методических конференциях «Университетская наука – региону» (г. Ставрополь, 2011-2013), научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр ЮНЦ РАН (г. Ростов-на-Дону, 2009, 2010, 2011), при этом доклады были отмечены почетными грамотами первой и третьей степени; международных научно-практических конференциях «Современные проблемы теории и практики инновационного развития АПК» (г. Нальчик, 2011), IV и V «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (г. Ростов-на-Дону, 2011, 2013), где доклады были отмечены дипломами третьей степени (приложение 3), а так же на XI межвузовской научно-практической конференции «Молодежь и образование XXI века» (г. Ставрополь, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 6 из них изданы в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 22 рисунками, в том числе 10 микрофотографиями, 13 диаграммами, 13 таблицами. Работа состоит из введения, глав обзора литературы, организации этапов работы и собственных исследований, а также заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и приложения. Список использованной литературы содержит 235 источника, в том числе – 57 зарубежных авторов.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфологические и функциональные показатели развития куриного эмбриона в онтогенезе

Двести лет тому назад, проводя опыт по вскрытию яиц на протяжении трех недельного периода инкубации, ученый древнего мира Аристотель (IV в. до н. э.) проследил как тонкий валик клеток превращается в сложный организм - куриный эмбрион (КЭ) [103, 40]. Этот объект с древности вызывает интерес ученых, что объясняется круглогодовой доступностью эмбриона [106, 155], развитием его в замкнутом пространстве вне материнского организма [110], относительной непродолжительностью развития и удобством изучения [170]. Куриный зародыш - легкодоступный объект, не требующий ухода и кормления [105].

Давний повышенный интерес к биологии куриного эмбриона позволил накопить обширный материал, который с успехом используется не только в современной практической деятельности биологов, медиков, вирусологов и биотехнологов [157], но и в качестве фундаментальной информации, раскрывающей механизмы онтогенеза, особенности гисто- и органогенеза куриного зародыша.

М.Н. Рагозина [111], Г.С. Крок [78], Г.Ф. Задарновская [61], В.В. Рольник [118], И.И. Шмальгаузен [176], Н.П. Третьяков, Б.Ф. Бессарабов, Г.С. Крок [154], Б.Ф. Бессарабов [16] - это далеко не полный список известных ученых-эмбриологов, которые в своих трудах представили широкий перечень сведений о закономерностях нормального эмбрионального развития кур.

Особенности формирования цыпленка в различные периоды инкубации, в связи с приспособлением птиц к развитию в яйцевых оболочках, освещены в работе М.Н. Рагозиной [111]. Автор предложила деление развития куриного зародыша на четыре периода (зародышевый 1-8-е сутки, предплодный 8-14-е сутки, плодный 14-20-е сутки и период вылупления 21-е сутки), в основу которого положила смену типов дыхания и питания.

Анатомическое и микроскопическое строение органов пищеварения, дыхания, кровообращения и кроветворения, нервной, половой, мочевыделительной

систем, кожи и ее производных, а также желез внутренней секреции куриного эмбриона в развитии осветил Г.С. Крок [78]. Кроме того, им раскрыто эмбриональное развитие органов вышеуказанных систем с приведением конкретных суток инкубации.

Благодаря комплексу критериев развития, таких как масса эмбриона и внезародышевых органов (сероза, желточный мешок, амнион, аллантоис), скорость ее прироста, и динамика эритро- и лейкопоза, Г.Ф. Задарновской [61] установлено, что рост и развитие куриного эмбриона породы русская белая в условиях искусственной инкубации представляет собой периодический процесс, отличающийся строгой закономерностью. Это, по её мнению, является универсальным свойством для эмбрионов не только птиц, но и млекопитающих, рыб и амфибий. Результаты, полученные автором, являются достоверными, число исследованных куриных эмбрионов составило большую выборку (14370). При этом автор не приводит при измерении посуточной массы эмбрионов и его временных органов стандартную ошибку среднего, что недопустимо не только с позиций законов статистики, но и не исключает существование разброса статистических различий.

Г.Ф. Задарновской [61] также изучено эмбриональное кроветворение в яйцах на разных этапах развития, выявлены общие закономерности, проявляющиеся в постоянном увеличении количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина в крови по мере роста и развития эмбриона. Помимо этого, установлены критические периоды развития зародыша курицы (8-11-е, 16-18-е сутки) и закономерности их проявления. Кроме того, автор изучает закономерности развития провизорных органов и обмен веществ у развивающегося эмбриона. Ею освещена роль провизорных органов (аллантоиса и амниона) в транспорте солей кальция из скорлупы в зародыш со второй половины инкубации.

В монографической сводке В.В. Рольник [118] уделяет внимание вопросам биологии эмбрионального развития куриного эмбриона, морфологии, физиологии и обмену веществ, а также приводит возрастные признаки куриного эмбриона, характеризующие морфологическое развитие зародыша. Ею подробно раскрыто эмбриональное развитие временных органов, систем кровообращения, дыхания и

пищеварения, нервной и половой системы, развитие мускулатуры, скелета и желез внутренней секреции. Кроме того, приведены данные об условиях среды, которые необходимы для нормального развития.

И.И. Шмальгаузен [176] в числе первых, кто постигал законы эмбрионального роста на эмбрионах курицы. Выявил, что скорость роста, в процессе развития зародыша начиная с ранних этапов инкубации (с первых суток) постоянно снижается, причём проходит это снижение не всегда равномерно. Автор установил, что на 4-, 6-, 8-, 9-, 11-, 12-, 15-е сутки инкубации происходит периодическое воздействие веществ, тормозящих рост как всего эмбриона, так и отдельных его органов. Также автором изучено развитие органов мезодермального и энтодермального происхождения. Ученый строил свой эксперимент на минимальном количестве эмбрионов (примерно десять десятков) полученных от случайных кур. Такой подход наложил отпечаток на цифровые результаты веса эмбрионов и всех его органов, о чем автор указал в своей работе, но на данном этапе исследований эти факты ему не препятствовали, так как целью исследований было выявление закономерностей роста. Но впоследствии исследователь считает, что учет генетически однородного материала обязательно необходим.

Обстоятельные сведения о морфологии развития куриного зародыша представлены в коллективной работе Н.П. Третьякова, Б.Ф. Бессарабова, Г.С. Крок [154], где основная масса информации посвящена морфологии половых органов и клеток самки и самца, так как авторы считают, что эмбриональное развитие птицы зависит от их качества.

Работа Б.Ф. Бессарабова [16], посвящена описанию процессов развития тканей и органов и их функциональной активности куриного эмбриона с первых суток его развития до вывода цыпленка (21-х суток инкубации). Ученым приводятся числовые данные об увеличении массы эмбриона к первоначальной массе яйца, и результаты по изменению температуры внутри и на поверхности куриного яйца при инкубации.

Благодаря накопленному теоретическому и экспериментальному материалу о закономерностях эмбрионального развития цыплёнка и его временных органов

многие ученые предложили не противоречащую друг другу хронологию развития куриного эмбриона с выделением «стадий развития» [111, 103,153, 118, 159, 16].

Основополагающие сведения о морфофункциональных особенностях развития куриного зародыша получены на протяжении 20-го века. Среди разнообразия современных научных трудов по изучению эмбрионального развития кур значительно больше работ, в которых изучают массу тела и органов, относительный и абсолютный их приросты, линейные размеры эмбрионов, на основе которых рассчитывают индексы физического развития, морфофункциональные показатели крови и обмена веществ как в норме, так и при факторном влиянии [26, 38, 126, 87, 167]. При этом масса и длина тела считаются существенными показателями, по которым в определённой мере ученые судят, как о положительном, так и об отрицательном влиянии условий инкубации или факторов экзо- и эндогенной природы на организм птицы, а также они составляют основу для расчета индексов физического развития. Поэтому в ряде работ указанные критерии не рассматриваются изолированно, а сочетаются с другими показателями.

С этих позиций подошли многие ученые, изучая у нормально развивающихся куриных эмбрионов вышеуказанные критерии роста и развития, представив по ним большой объем числового материала. Так, в ряде диссертационных работ в пределах одного типа продуктивности (яичного) можно наблюдать отличающиеся данные по одним и тем же показателям, что не вызывает возражений, так как генетически используемый при исследовании материал был различным.

Р.Ю. Хохлов [162], изучая морфологию яичника и яйцевода у куриных эмбрионов кросса «Ломан Браун», выявил сроки закладки, этапы формирования и критические фазы развития органов и представил цифровой материал по массе и длине указанных органов и самих эмбрионов с 4-х по 20-е сутки развития.

Морфометрические изменения массы, длины, относительной массы тела, и внутренних органов с 6-х по 20-е сутки развития куриных эмбрионов в норме и при разных режимах инкубации показала в своей работе В.А. Голубцова [42]. Ею установлено, что термоконтрастный режим усиливает развитие сердечнососудистой системы, и повышает морфологические показатели крови - гемоглобин и ко-

личество эритроцитов. Автор описала развитие иммунокомпетентных органов (печени, селезенки, тимуса, бурсы) при дифференцированном и термостабильном режимах инкубации, где выявила что эти условия инкубации не привели к патологическим изменениям, а наоборот, в некоторые сутки отмечался интенсивный рост органов по сравнению с традиционными условиями инкубации при которых развивались эмбрионы.

Сравнивая цифровые данные по массе и длине куриных эмбрионов разных кроссов и пород, А.-А. Исмаил Сахер [124] доказал превосходство этих показателей у куриных эмбрионов развивавшихся на свету, по сравнению с развивающимися в темноте.

И.Б. Солдатова [126] подробно описала, с применением математического уравнения, закономерности всего эмбрионального роста массы тела курицы и представила результаты измерений и расчетов массы тела эмбрионов *Gallus gallus* с пятых по семнадцатые сутки инкубации по данным разных авторов.

Однако не только в рамках яичного типа направления, но и в пределах одной породы (белый леггорн), результаты в большей или меньшей степени отличаются, что демонстрируют следующие работы.

Так, А.П. Трунова [156] изучила абсолютные и относительные показатели массы и линейных размеров тела, внутренних (печени, селезенки, тимуса, бурсы) и внезародышевых органов куриного эмбриона, а также прирост массы тела (абсолютный и относительный) в норме, и при влиянии амброзийным аллергеном в разные сроки развития (11, 13, 15, 17, 19) и представила это в числовом материале. Кроме того, автор отразила принципиально новые для куриного эмбриона гематологические, иммунологические, цитохимические показатели лимфоцитов и нейтрофилов крови. В процессе последних исследований ею получены данные о нормативном уровне ферментативной активности клеток крови в пренатальном онтогенезе кур, а также об их взаимосвязи с морфометрическими показателями развития.

Изучая показатели роста и развития, практически совпадающие с перечнем критериев изученных предыдущим автором, С.В. Черников [167], не прибегая к

воздействию какими-либо факторами, представил цифровой материал по этим критериям на протяжении всего пренатального онтогенеза кур с пятых по двадцатые сутки инкубации.

При сопоставлении работ этих исследователей можно наблюдать, что в рамках одной породы куриных эмбрионов (белый леггорн) имеются отклонения данных, которые не превышают 10%. Например, абсолютные показатели массы на 11, 13, 15, 17, 19-е сутки инкубации в работе А.П. Труновой [156] составили соответственно $3,34 \pm 0,32$ г; $6,53 \pm 0,20$ г; $12,04 \pm 0,23$ г; $18,95 \pm 0,23$ г; $25,62 \pm 0,38$ г, а у С.В. Черникова [167] в эти сроки развития куриного зародыша $2,945 \pm 0,054$ г; $6,264 \pm 0,078$ г; $11,47 \pm 0,152$ г; $18,71 \pm 0,175$ г; $27,54 \pm 0,186$ г соответственно.

Сравнение результатов, полученных этими двумя исследователями, позволило прийти к суждению, что при отборе куриных зародышей в группу, не учтенным авторами остался только пол, что наводит на определенную мысль о роле пола как определяющего фактора, обеспечивающего анатомическое и физиологическое различие эмбрионов.

В научной и практической работе для изучения роста и развития на основе комплекса морфометрических показателей (длина, масса, окружность грудной клетки) исследователи оценивают физическое развитие, которое сегодня рассматривается как комплекс морфофункциональных свойств организма в конечном итоге определяющее запас его физических сил [95]. Для его оценки ученые используют различные методы, в том числе и метод индексов, признанный наиболее объективным критерием оценки пропорциональности развития и его нарушений [68].

Основная масса исследований по вычислению индексов касается человека и других млекопитающих, а что касается куриного эмбриона, то следует отметить единичные работы. Так, пропорциональность развития организма чаще оценивают весо-ростовыми индексами, при этом некоторые из них применяют для эмбрионального периода. Используя индекс Кетле I указывающий на соотношение абсолютных показателей длины и массы тела А.П. Трунова [156] оценила эм-

бриональное развитие куриного организма как в норме, так и при влиянии амброзийным аллергеном.

В коллективной работе Л.Д. Тимченко и др., [147] была произведена оценка: физической организации тела куриного эмбриона в развитии, пропорциональности развития его грудной клетки, крепости телосложения, индекса «степени» являющегося модификацией индекса Вервека и характеризующего рост организма. Также ученые рассчитали индекс гармоничного морфологического развития (ИГМР) являющегося, по мнению авторов [67, 75], надёжным и удобным инструментом для оценки структурной полноценности организма за счет использования в нем коэффициента, рассчитанного для исследуемой группы, который делает связь между антропометрическими признаками, соответствующую действительности.

С.В. Черников [167] в своей работе с учетом величины объекта (куриный эмбрион) и особенностей периода его онтогенеза, рассчитал целый ряд индексов физического развития. Так, автор провел вычисление индекса, характеризующего пропорциональность развития - Кетле I, где установил закономерное его увеличение с 5-х по 20-е сутки инкубации. При анализе Кетле II являющегося дополнением предыдущего индекса исследователь не выявил закономерностей посуточной динамики индекса, а зафиксировал лишь значения минимума и максимума. Также этим автором рассчитаны индексы Ливии, Рорера, Боргарндта I и индекс гармоничного морфологического развития.

При сопоставлении значений Кетле I в работе С.В. Черникова [167] с работой А.П. Труновой [156] четко просматриваются выраженные различия между значениями, так же как при сравнении абсолютных показателей массы.

Следует отметить, что других данных об оценке физического развития куриного эмбриона методом индексов в доступной литературе найти не удалось.

Изучение особенностей куриного эмбриона заложило основы для решения теоретических и практических вопросов биологии развития. Однако в условиях современности не теряет актуальности выяснение механизмов регуляции роста и развития клеток и тканей организма, нарушение которых может привести к воз-

никновению различных патологий [171]. В основе формообразовательных процессов лежат такие взаимосвязанные явления, как пролиферация, дифференцировка и запрограммированная клеточная гибель (апоптоз) [63]. Если понятия «пролиферация» и «дифференцировка» прочно вошли в мышление исследователей, то значение апоптоза длительное время недооценивалось учеными [131].

Впервые морфологические доказательства существования апоптоза представлены в 1972 году J.F.R. Kerr в соавторстве [195]. Они сообщили о существовании особого типа клеточной гибели отличного от некроза, охарактеризовали две стадии процесса (образование апоптозных телец и их фагоцитоз другими клетками), подчеркнули, что апоптоз является активным и контролируемым процессом.

Апоптоз сопутствует дифференцировке специализированных тканей и является обязательным в жизни многоклеточных организмов (их развитии, нормальном функционировании, осуществлении регуляторных процессов) [14, 12, 227]. На сегодняшний день апоптоз определяют как высокорегулируемую форму запрограммированной смерти клетки с характерными морфологическими и биохимическими признаками [231]. Клетки, подвергающиеся такой гибели, активно используют генетически контролируемую программу, нацеленную на собственную гибель, совершая тем самым своего рода «суицид» [217].

Благодаря методической возможности регистрации генов и применению новейших технологий анализа генной активности доказано, что контроль над апоптозом осуществляется совокупностью генов (*bcl2*, *Bid*, *Bax*, *p53*), каждый из которых выполняет определенные задачи в организме [53, 130]. При этом последнему гену (*p53*) ученые отводят особое внимание, связывая это с тем, что он стимулирует апоптоз, принимает активное участие в регуляции клеточного обновления, что немаловажно в пренатальном периоде развития [9, 168]. Этому гену отводят важнейшую роль в противоопухолевой защите организма из-за его способности предотвращать фиксацию генетических повреждений, и он может находиться в неактивном состоянии, а при его активации останавливается клеточный цикл [53]. Эти гены хорошо изучены у млекопитающих и человека, а что касается птиц, сле-

дует отметить отсутствие какой-либо информации о тех или иных генах контролирующей апоптическую гибель клеток.

С момента первой публикации, посвященной апоптозу, прошло более 40 лет. За истекший период апоптоз стал центральной проблемой многих наук: фармакологии, генетики, вирусологии, цитологии, иммунологии, биохимии и эмбриологии [34]. При этом в эмбриологии запрограммированную клеточную гибель (апоптоз) считают важным механизмом ответственным за поддержание конкретного числа клеток, формообразование и ремоделирование тканей и органов [62, 97, 178, 86, 164, 194]. Кроме того, клеточный «суицид» в пренатальном онтогенезе является механизмом балансировки процессов пролиферации и дифференцировки [35].

Известно, что в развивающемся зародыше обязательно присутствуют клетки с морфологическими признаками апоптотической гибели, которая вовлечена в процессы элиминации клеток, формирование тканей, канализации протоков, формирование пальцев конечностей [125].

Запрограммированная клеточная гибель в процессе пренатального онтогенеза хорошо изучена у млекопитающих и человека [15], при развитии глаза [225], сердца [212], эпителия зачатка легкого, а также скелетной, мышечной и нервной системы [46]. Имеются сообщения об изучении физиологической гибели клеток у зародышей скатов, акул, гребенчатого тритона, дрозофилы, лягушки и птиц (куриный и перепелиный) [102, 11, 207]. Следует отметить, что основные сведения о деструктивных процессах в пренатальном онтогенезе кур получены на протяжении 20-го столетия. При этом на современном этапе развития науки изучению апоптоза у куриного зародыша должного внимания не уделяется.

Исследователи двадцатого века используют при изучении гибели клеток у куриного зародыша такие термины как физиологическая деструкция, дегенерация или некротическая зона. Термин «apoptosis» закрепился только после 1972 года, являющегося годом его введения в научный обиход.

В 50-х годах Гамбургер приводит свои наблюдения за развитием нервной трубки у куриного эмбриона, в которых отмечает, что при нормальном развитии часто имеет место гибель нейробластов [190].

Позже, изучая дегенерирующие клетки куриного эмбриона на стадии первичной полоски при электронно-микроскопическом исследовании, R. Bellairs [182] выявил, что ядра дегенерирующих клеток содержат сильно уплотненные участки, которые, по его мнению, соответствуют скоплениям хроматина, а также им отмечено, что оболочка этих клеток остается неизменной.

Доказано, что форма крыла у эмбрионов птиц образуется путем отделения от туловища серий клеточных дегенераций, особенно ярко выраженных на вентральной стороне зачатка [221].

Важный феномен, ведущий к изменению интенсивности деструктивных процессов при отделении пальцев ноги у куриного эмбриона, это укорочение или подавление нормальной реакции макрофагов, что доказано экспериментально M. Deleanu [186]. При развитии куриного эмбриона дегенерирующие клетки выявляются на стадии хвостовой почки, о чем указал в своей работе R. Lanot [201].

Сведения о локализации, распространении и значении клеточных деструктивных процессов при эмбриональном развитии органов (сердце, легкие, спинной мозг), систем (нервная, мышечная, половая) и частей тела (конечности) куриного зародыша представлены в обзорах И.И. Орловой [102], А.В. Балахонова, Т.Н. Песковой [11].

Ярким и наглядным примером сведений об апоптозе, представленных во многих классических учебниках и специальной научной литературе, является информация о клеточной гибели, наблюдаемой в свободной тазовой конечности куриного зародыша.

В основном авторы демонстрируют на рисунках исчезновение тканевых перемычек в межпальцевых участках конечностей, и подробно дают описание этому процессу [158, 205, 184]. Есть единичные работы по описанию механизмов апоптоза свободной грудной конечности [71, 221]

Основательные результаты по изучению физиологической гибели клеток на примере органогенеза печени куриных эмбрионов представлены в работах Т.С. Кутыревой [81, 82]. Установлено, что в развитии печени куриных эмбрионов породы «Русская белая» гибнущие клетки появляются на 3-и сутки инкубации,

т.е. при закладке зачатка органа. Ею выявлено, что в эмбриональной печени физиологическая гибель клеток происходит двумя способами: кариолизисом и кариопикнозом, причем, по мнению ученого, кариолизис имеет большой удельный вес и большее значение, чем пикноз. Автором приведены результаты распределения стадий кариолизиса в клетках печени по срокам развития куриного эмбриона (на 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18 и 20-е сутки инкубации) в процентах. В эти же сроки развития эмбрионов показано изменение числа клеток печени с признаками кариолизиса и кариопикноза.

К сожалению, после 90-х годов систематическое изучение нормальной гибели клеток у эмбриона цыпленка практически прекратились.

Имеются лишь единичные современные статьи, в которых сообщается о результатах исследования локализации апоптических клеток. Так, А.А. Ярилин [178] сообщает, что клетки в стадии апоптоза у куриных эмбрионов локализуются в процессе морфогенеза внутреннего уха. В ряде работ упоминается, что в сетчатке глаза птиц, апоптоз развивается в результате взаимодействия различных нейротрофических факторов и инициируется генной индукцией, которая меняет метаболические условия микроокружения [86, 89, 90, 91, 92]. При этом данная информация в новых источниках не является итогом исследовательской работы на современном этапе, а лишь служит ссылкой на ранее проведенные исследования в этой области.

С 2008 года активизировалась работа в этой области, о чем свидетельствуют появившиеся научные статьи, публикуемые ставропольскими биологами. Эти исследования касаются поиска доступных и адекватных методов регистрации апоптических клеток у куриного зародыша [17]. В результате автор предложил свою модификацию метода предложенного А.А. Абдувалиевым, М.С. Гильдиевой [1], заключающуюся в прижизненном введении трипанового синего в желточный мешок зародышу в объеме 1 мл, с последующем подсчетом окрашенных клеток через 30 минут. В последующие два года (2009-2010 гг) представлены интересные результаты исследования апоптоза во взаимосвязи с абсолютным приростом массы тела куриного эмбриона в процессе инкубации. При этом авторы установили

зависимость между обоими показателями, характер которой изменчив на протяжении пренатального онтогенеза кур [18, 144].

Известно, что интенсивность и интеграция пролиферации, дифференцировки и апоптоза в онтогенезе регулируется многочисленными белками, в том числе альфа-фетопротеином [171, 169, 135, 214]. Альфа-фетопротеин – уникальное соединение белковой природы с широким спектром биологической активности, относящийся к группе транспортных белков, которые образуются в организме преимущественно в эмбриональный период [134, 107, 172, 173].

В пренатальном онтогенезе α -фетопротеин выполняет различные функции - участвует в транспорте различных биологически активных веществ, является одним из факторов, запускающих механизм апоптоза, а также оказывает влияние на метаболизм стероидных, тиреоидных гормонов и связывает эстрогены [66, 84, 173, 165, 100, 180]. Кроме того, в этом периоде важной функцией альфа-фетопротеина является регуляция роста многих клеток и тканей, а также способность стимулировать и замедлять пролиферативные процессы, в зависимости от концентрации белка и свойств конкретных клеток [175, 113,].

Имеются немногочисленные сообщения о содержании АФП в тканях куриного эмбриона. Так, коллективами российских и иностранных исследователей альфа-фетопротеин обнаружен в сетчатке глаза с 4-го дня инкубации зародыша [173, 211]. Из сообщения К.В. Шмагеля, В.А. Черешнева [173] видно, что фетальный белок участвует в контроле развития глаза, так как присутствие антител к АФП в культуре клеток 7-дневной сетчатки глаза КЭ вызывает нарушение развития этого органа, а без антител формирование сетчатки происходит нормально.

R. Sanches, C. D'Incan, M. Kuiper et al., [224] детально проследили роль альфа-фетопротеина в формировании и дифференцировке центральной нервной системы в пренатальном онтогенезе цыпленка, высказав мнение о главенствующей роли этого белка в нейроорганогенезе. Однако вышеуказанные результаты отрывочны и не отражают количественной зависимости АФП от периода эмбриогенеза.

Оригинальные количественные данные уровня альфа-фетопротейна во взаимосвязи с морфофункциональными показателями роста и развития зародыша курицы представлены в работах ставропольских исследователей.

Так, с помощью твердофазного теста IMMULITE AFP получены результаты о наличии АФП на 4-е и 8-е сутки инкубации в тканевом гомогенате куриного эмбриона и гомогенате внезародышевых оболочек [139]. Авторы отмечают, что на 4-е сутки исследований у куриных эмбрионов числовые значения АФП значительно колеблются от 20 IU/ml до 247 IU/ml, а на 8-е сутки количество белка снижается и стабилизируется как в эмбрионе, так и во внеэмбриональных тканях. При этом авторы не указывают, на каком генетическом материале проводились исследования, по какому принципу отбирали особей в экспериментальные группы, эти неотмеченные факты возможно и обеспечили такой широкий разброс количественных значений белка.

При исследовании взаимосвязи массы печени с содержанием альфа-фетопротейна в крови куриных эмбрионов в процессе развития авторами приводятся данные уровня белка на 11-е ($1,274 \pm 0,16$ МЕ/мл) и 18-е ($0,915 \pm 0,11$ МЕ/мл) сутки инкубации, где отмечено, что уровень белка снижается, как и среднесуточная скорость увеличения массы печени [140]. Такие результаты позволили сделать заключение об обратно пропорциональной зависимости уровня АФП от массы печени и прямо пропорциональной от среднесуточной скорости увеличения массы печени.

Однако в данной статье не приводятся критерии, учитываемые при планировании эксперимента (порода или кросс эмбрионов, идентичность условий инкубации, и т.д.), что не позволило нам судить о достоверности представленных результатов.

С помощью иммуноферментного метода определения уровня АФП установлена динамика его содержания в гомогенате куриного эмбриона в развитии [141, 142, 166]. При этом авторами описывается динамика концентрации белка с 4-х по 19-е сутки инкубации и приводятся усредненные данные показателя, где можно наблюдать широкий диапазон статистических различий.

Научный труд С.В. Черникова [167] посвящен обстоятельным исследованиям альфа-фетопротеина у куриного эмбриона в развитии, где впервые получены новые сведения о динамике этого показателя, учитывая его прикладной акцент. В этой работе при формировании экспериментальных групп главным критерием отбора особей являлась породная принадлежность кур, от которой были получены яйца для исследований, а также соблюдались одинаковые условия инкубации, что, по мнению автора, обеспечило минимальные различия между эмбрионами. Им установлена волнообразная динамика, которая характеризуется повышением АФП до 12-го дня развития эмбриона, с последующим снижением к концу инкубации практически до исходного уровня. Выявлено четыре пика повышения концентрации АФП, а так же указано, что на 12-е сутки его содержание максимально ($42,8 \pm 0,286$ МЕ/мл), а на 9-е сутки минимально ($1,12 \pm 0,004$ МЕ/мл). Кроме того, выявлен характер коррелятивных взаимосвязей между уровнем АФП, общего белка в гомогенате куриного эмбриона и его морфометрическими показателями.

Известно, что образование альфа-фетопротеина и апоптоз – это два параллельно протекающих процесса в пренатальном онтогенезе, играющие ключевую роль в этом периоде развития организма [165].

Группой российских ученых в различных экспериментах была показана апоптозрегулирующая активность альфа-фетопротеина [136]. Другими учеными показана роль альфа-фетопротеина, как одного из факторов, запускающих механизм апоптоза [174]. А зарубежные ученые констатируют, что стимуляция пролиферации клеток под воздействием низких концентраций АФП происходит за счёт ингибирования апоптоза [200], а повышенные дозы α -фетопротеина (100-200 мкг/мл), наоборот индуцируют апоптоз [229].

Коллектив авторов в 2010 году опубликовал интересные данные о взаимосвязи уровня АФП с динамикой апоптоза у КЭ в процессе развития [145]. Рассуждения исследователей касаются динамики показателей с первых по двадцатые сутки инкубации, где отмечают ее циклический характер для обоих показателей с выделением разнонаправленного совпадения пиков подъема и спада, а также зарегистрировали четкую корреляционную взаимосвязь динамики АФП и апоптоза, сте-

пень которой между показателями к двадцатым суткам развития куриного эмбриона снижается.

В комплексе задач, стоящих перед биологической наукой, центральное место принадлежит выяснению закономерностей развития скелета, без знания которых невозможно получить качественный молодняк сельскохозяйственной птицы, отвечающий потребностям современного птицеводства, заключающиеся в получении максимальной продуктивности за счет повышения жизнеспособности и плодовитости птицы в условиях интенсивной эксплуатации.

Известно, что формирование скелета обеспечивается сочетанием стероидных гормонов (андрогены и эстрогены). Тестостерон, являясь основным андрогеном, ускоряет образование белковой матрицы кости, усиливает отложение в ней солей кальция, в результате увеличивается рост, толщина и прочность кости, а эстрогены в свою очередь влияют на развитие костного скелета посредством усиления активности остеобластов [151]. Костная система характеризует «благополучие организма» [76].

Скелет (от греч. skeleton – иссохший, мумия) образован костями и хрящами, закономерно расположенными в теле и соединенными между собой соединительной, хрящевой или костной тканями. Кости выполняют множество функций: опорную, защитную, локомоторную и формообразующую. Скелет придает телу внешнюю конфигурацию, вид и обеспечивает ему жесткое и прочное устройство, являясь футляром для внутренних органов [163, 36, 37, 213].

Опорный аппарат кур достаточно хорошо исследован в постинкубационном онтогенезе. Это, прежде всего, связано с полноценно-сформированными костными структурами, оценку которых можно проводить без методических трудностей. Изучено строение, физиология, гистология, даны классификации костей скелета, определены линейные размеры костей практически всех отделов, в том числе есть данные об изменениях показателей роста костей и их строения под влиянием факторов внешней среды [2, 3, 79, 104, 45, 128, 30, 108, 181].

Костная система в пренатальном онтогенезе кур исследована не так широко как у взрослых особей, имеются единичные работы, преимущественно зарубеж-

ных специалистов, по изучению эмбрионального скелета. Ученые с помощью специальных методов окраски, или на гистопрепаратах, в основном наблюдали за ходом окостенения костей принадлежащих к разным частям скелета в различные сроки инкубации эмбрионов, и лишь немногочисленные исследователи измеряли линейные размеры костей скелетного остова.

Так, немецкий ученый I. Prein [215] описал посуточное эмбриональное развитие крыла у беспородной курицы. Д.Н. Гофман, Н.Н. Ротт [43], также, как и предыдущий ученый, занимались исследованием крыла у породистых куриных эмбрионов - леггорнов. С помощью метода графической реконструкции скелета крыла ученые подробно описали образование, слияние, срастание и редукцию костей крыла по дням развития эмбриона, а также сообщили о гистогенезе, перихондральном и эндохондральном окостенении хряща различных костей крыла на протяжении всего пренатального онтогенеза.

Исследуя крыло, N. Holder [191] показал, что начало окостенения грудной конечности, а именно костей humerus, ulna и radius зародыша курицы осуществляется на 32-33 стадии нормального развития, датируемые по таблицам V.A. Hamburgera, H. Hamiltona примерно это 7-8-е сутки инкубации. А в 1998 году N. Saunder изучил происхождение проксимально - дистальных последовательно этой части скелета и установил роль эктодермы.

Подробно центры окостенения представил в своей работе X. Ноймейстер [99]. Критикуя метод рентгеновского снимка, с помощью метода осветления и окрашивания ализариновым красителем, автор описал и продемонстрировал на фотографиях участки окостенения костей черепа (клиновидная, теменная), клюва (подъязычная), свободной грудной конечности (плечевая, локтевая, лучевая), свободной тазовой конечности (бедренная, большеберцово-заплюсневая, малоберцовая, фаланги пальцев стопы), а также ребер и шейных позвонков у куриных эмбрионов чистокровной породы белый леггорн с 8-х по 21-е сутки инкубации. В эти же сроки развития автором приводятся числовые значения длины эмбрионов и ежедневный ее прирост. Следует отметить широкий разброс значений общей

длины тела эмбрионов в указанные сутки инкубации, что возможно связано с несовершенством отбора особей в экспериментальную группу.

Е. Shapiro [228] изучая окостенение позвоночника куриных эмбрионов заметил, что окостенение начинается в шейном его отделе на 12-13-е сутки инкубации, а на 19-й день развития зародыша зафиксировал окостенение позвонков в крестцовом отделе.

Ученые из Ирака сделали заключение обратное выводу предыдущего автора. Они указали, что кости черепа завершили свое окостенение в четырнадцатый день развития эмбриона, а позвонки шейного, грудного, поясничного отделов позвоночника в эти сутки инкубации только начинают окостеневать, а позвонки копчикового окостеневают на восемнадцатый день инкубации. Кроме того, учеными описано анатомическое строение скелета, проведены гистологические исследования костей черепа (лобная, теменная, затылочная, верхнезатылочная, кости носа, нижней челюсти, верхнечелюстные), ребер, позвоночника и его отделов, конечностей. При этом изучены три типа клеток (остеобласты, остециты и остеокласты). Появление центров окостенения авторы фиксировали на 5, 10, 14, 18 и 21-е сутки инкубации куриного эмбриона (*Gallus domesticus*) [230].

Работа турецких исследователей посвящена оценке особенностей развития крыла и тазовой конечности с 7-х по 21-е сутки инкубации куриных эмбрионов мясного направления – бройлеры [197]. Возникновение первичных центров окостенения костей крыла, и голени в процессе развития бройлерных эмбрионов авторы в таблице обозначают «+» - окостеневшие, «-» - не окостеневшие. Первое появление первичных центров окостенения ученые наблюдали на 9-й день инкубации, обращая особое внимание на сроки образования хряща и процесса окостенения. Авторы сообщают, что на 19-й день инкубации все центры оссификации скелета завершены, кроме следующих костей: лучевой, локтевой и запястья. Для оценки степени развития костей ученые соотносили показатели толщины и ширины костных образований. Однако конкретных числовых значений этих параметров в данной статье авторы не приводят.

А.К. Дживанян [48] в отличие от предыдущих ученых использовал метод прижизненной окраски костной ткани путем введения ализарина в сосудистую сеть аллантоиса, благодаря таким манипуляциям автор наблюдал за процессом окостенения. Кроме того, на гистологическом препарате с 7-го дня инкубации до вылупления куриного эмбриона породы Русская Белая он измерял диаметр диафиза костей конечностей и толщину костной манжетки и вывел индекс ее толщины для определения темпа развития.

Т.М. Половинцева, Ф.И. Сулейманов [109] в числе тех, кто представил абсолютные и относительные числовые значения длины тазовой конечности, а именно общей длины ноги, бедренной, большеберцово-заплюсневой и цевки у контрольной группы куриных эмбрионов кросса Хайсекс коричневый и при изменении температурно-влажностного режима инкубации. Длину ноги исследовали с 7-х суток пренатального онтогенеза, остальных костей с 13-х. Анализируя полученные авторами результаты можно отметить, что по некоторым из них данные представлены с широким разбросом статистических различий в отдельные сутки развития.

Обобщая вышеизложенные сведения можно сделать вывод, что куриный эмбрион на протяжении длительного периода остается одной из важнейших биологических моделей в экспериментальной биологии. Благодаря морфометрическим, гистологическим, биохимическим, гематологическим исследованиям, проведенным на этой модели на разных этапах ее изучения, уже выяснены основополагающие закономерности пренатального онтогенеза живой системы и определены многочисленные морфофункциональные показатели этого биологического объекта на всех уровнях развития (организменном, органном, тканевом, клеточном, молекулярном). Сегодня спектр интересов при изучении пренатального онтогенеза птиц расширился за счет молекулярно – генетических исследований. Особая роль отводится выяснению различных механизмов регуляции роста и развития клеток и тканей организма, позволяющих судить о причинах развития различных патологических процессов в пренатальном онтогенезе живой системы, среди которых важнейшая роль отводится изучению апоптоза и его пусковых механизмов, АФП и др.

Однако, несмотря на сравнительно достаточную изученность куриного эмбриона, еще существуют пробелы в научном знании его онтогенеза.

Аналитический обзор подтверждает факт отсутствия современных исследований по апоптозу в пренатальном онтогенезе кур. Чаще всего это лишь ссылки на статьи прошлых лет. Нет числовых данных по уровню апоптоза у куриных эмбрионов в развитии. Не выявлено, какими генами управляется апоптотическая гибель клеток. Крайне мало данных об уровне альфа-фетопротейна в развитии куриного эмбриона, а имеющиеся единичные примеры, представлены с широким разбросом статистических различий.

Исследования костной системы развивающегося куриного эмбриона касаются в основном оссификации костей скелета. При этом остеометрическим показателям уделено недостаточное внимание, а большинство доступных результатов представлено для разных пород. Такая ситуация позволяет с высокой степенью осторожности рассматривать имеющиеся данные в качестве межпородных, характеризующих закономерности пренатального развития опорно – двигательного аппарата кур в целом.

Нередко противоречивы и уже имеющиеся разнообразные данные о морфогенезе эмбриона, полученные на разных породах кур, а установленные на одной породе абсолютные и относительные величины не всегда соответствуют значениям конкретного критерия для эмбрионов птицы другой породы. По отдельным показателям отличается диапазон указанных разными авторами отклонений стандартной ошибки. При этом сравнение числовых значений морфометрических показателей, полученных А.П. Труновой [156] и С.В. Черниковым [167] на одной породе кур, в условиях одной лаборатории, с учетом идентичности массы инкубационных яиц и продуктивности, позволила нам рассматривать в качестве единственной причины имеющихся различий отсутствие дифференцировки эмбрионов по половому признаку. Это и обусловило наш принципиальный интерес к этому методическому подходу в процессе работы при исследовании всех показателей, определенных в соответствии с задачами эксперимента.

1.2. Принципы формирования экспериментальных групп куриных эмбрионов для изучения онтогенетических закономерностей

Научный эксперимент считается ведущим методом исследования, постановка которого осуществляется в точно регулируемых и контролируемых условиях, позволяющих следить за ходом процессов и ответными реакциями организма и воссозданием их при повторении условий [33, 72, 121, 74]. Организация эксперимента - это первое, с чем сталкивается биолог-исследователь, центральное место в которой принадлежит принципам, включающим требования, соблюдение которых определяет успех исследования [80, 98, 73].

Известны ключевые принципы, которые в разных сочетаниях применяются и для птиц [33, 47]. При планировании эксперимента ученые руководствуются следующей классификацией принципов, которую объединили в систему:

- принцип выбора методов исследования является основным и может включать использование метода периодов, но чаще применяют методы контрольных и параллельных групп; эти методы являются базовыми, и зависят от поставленных целей экспериментатора;

- продолжительность эксперимента, которая определяется в соответствии с задачами исследования;

- условия, в которых проводятся опыты; для птиц учитываются тип помещения, метод содержания (клеточный, напольный), температура, влажность, освещенность помещения, характеристика подстилки, условия инкубации;

- принцип комплектования групп, являясь сложным, и одновременно ответственным этапом в схеме эксперимента включает несколько определенных требований; так, применительно к взрослой птице эксперимент проводят на отселекционированной птице известного происхождения (порода, кросс, линия); подбор особей в группу чаще осуществляется по принципу аналогов (происхождение, возраст, пол, живая масса, продуктивность), при этом расхождения между группами не должны превышать 3-5%;

- количество особей в группах определяется экспериментатором в зависимости от целей исследования; при этом в группе взрослых птиц (метод параллельных групп с повторностью) должно быть не менее 20-30 особей.

Сообщается, что для получения объективных данных большое значение имеет число повторностей опытов, которых для научных экспериментов должно быть не менее двух [80].

Описанная классификация принципов используется довольно широко при экспериментах на животных-моделях в постнатальном онтогенезе. Перечень перечисленных принципов далеко не полон и пополняется в зависимости от целей исследователя.

Для пренатального онтогенеза кур при конструировании эксперимента система принципов в литературе не описана. Однако из многочисленных литературных сведений видно, что ученые пользуются принципами вышеописанной системы, при этом сами определяют их алгоритм [7, 42, 126, 156, 167]. Как правило, исследователи используют минимальный набор требований, выбирая их из разных принципов, которые представлены в основном отбором по разным критериям и количеством яиц или зародышей в группу для исследования.

Анализ доступной литературы свидетельствует о том, что в эксперименте с куриным эмбрионом практически всегда учитывается принцип пар-аналогов, традиционно используемый для других живых объектов. При этом, по мнению А.И. Овсянникова [101], этот подход может дать хорошие результаты только в том случае, если группы будут сформированы на основании объективных данных по каждому животному. Правильно сформированные группы не должны иметь статистически достоверных различий между собой. По мнению автора, важнейшее требование при использовании этого принципа – это максимальная аналогичность опытных групп.

В работе с куриными эмбрионами принцип выбора критериев для обеспечения минимальных отличий между особями многочисленными учеными представлен по-разному.

Так, обязательным требованием является оценка качества яиц до инкубации. При этом по данным многих ученых для инкубации яйца должны быть правильной формы, с гладкой, не очень пористой скорлупой, с маленькой пугой, расположенной на тупом конце яйца [103, 16].

Кроме того, перед инкубацией исследователи учитывают целостность скорлупы и массу яиц, затем оценивают степень загрязненности, мраморности и шероховатости яиц [42, 108, 32]. При этом в дополнение к указанным требованиям О.В. Вавилова [32] в схеме эксперимента обозначила принцип одинакового количества яиц в группах, полученных от одновозрастной птицы находящихся в одинаковых условиях содержания. Именно эти требования, по мнению ученого, определяют нормальное пренатальное развитие и выводимость.

Известно, что породность является значимым фактором, который может искажать результаты до степени, неприемлемой для интерпретации данных [96]. Кроме того, общность происхождения яиц от породистой курицы предполагает схожесть их морфологического и биохимического состава [123]. Поэтому практически во всех научных трудах, в первую очередь учитывается генетическое происхождение куриных эмбрионов (порода, линия, кросс), с указанием типа направления продуктивности и птицеводческого хозяйства, из которых они брались [48, 7, 108, 156, 167].

Так, в работе Н.П. Третьякова, Б.Ф. Бессарабова, Г.С. Крок [154] освещено описание пренатального онтогенеза кур в развитии с конкретизацией породы (белый леггорн) и линии (Д4) зародыша.

Часто группы формируют на основе морфологического анализа яиц с соблюдением идентичных условий инкубации [123, 49, 42].

И.И. Шмальгаузен [176] считает, что используя взвешивание эмбрионов как единственный метод можно получить надежные результаты.

Пользуясь принципом аналогичных групп А.М. Долгорукова [49] подбирала куриных эмбрионов с учетом породы (кросс Смена-2 породы корниш (линия А6) возраста эмбрионов и кур-родителей 230, 280, 360 дней, где в каждый возрастной период кур сформировано по три группы (I; II; III) яиц по относительной массе

желтка, которые автор трактовала как принципы. Количество исследуемых особей и эмбрионов было минимальным, однако опыты автор провела в трех повторностях, что обеспечило достоверность результатов и соблюдение методических подходов.

В эксперименте А-А. Исмаил Сахер [124] использовал принцип комплектации групп и требования по оценке качества яиц. Согласно этому принципу автор учитывал количество инкубационных яиц, их массу и происхождение (родительское стадо кросса «П-46»). При проведении овоскопирования отобраны яйца непригодные для инкубации.

По мнению Р.Ю. Хохлова [162] материалом для эмбриологических исследований должно быть яйцо от клинически здоровых взрослых кур, чтобы исключить инфицирование эмбрионов.

Одно из важнейших требований принципа комплектования экспериментальных групп животных является половая принадлежность [33]. Пол на сегодняшний день рассматривают как совокупность генетически детерминированных признаков особи, определяющих ее роль в процессе оплодотворения [10].

Большое число сообщений по различным видам животных указывают на достоверные отличия морфофункциональных показателей самок и самцов. Они описаны и для птиц в постнатальном онтогенезе при проведении исследований как с экспериментальной целью [129, 60, 70], так и в производственных опытах [161, 77, 83].

Однако проведение исследований на птице с учетом половых различий не возможно без надежных методов разделения по полу.

Для постнатального онтогенеза птиц такие методы описаны и применяются, начиная с суточного возраста. Это особенно важно в связи с тем, что на сегодняшний день основной чертой отрасли птицеводства является концентрация на птицеводческом предприятии не только кур одной породы, но и пола.

Сортировку суточного молодняка по полу проводят обязательно с целью исключения особей нежелательного пола, а также для формирования оптимального соотношения полов в родительском стаде [64, 127, 160, 203, 204]. Для этого цып-

лят после выемки разделяют по полу с помощью различных методов: молекулярно-генетических, цитогенетических, аутосексинга, зондового, акустического и визуально по гонадам, среди которых на практике широко используются только три метода: вентсексинг (японский метод), колорсексинг и федерсексинг [133, 52, 114, 115]. Однако по данным В.Д. Бутенко [31] большинство таких методов не обеспечивают высокую точность, некоторые из них трудоемки и сложны в использовании, другие оказывают стрессирующее действие и даже могут травмировать птенцов.

В начале 21 века в разработке методов разделения кур по полу выделился новый этап, характеризующийся тем, что процедура сексирования племенной и промышленной птицы стала перемещаться на ее эмбриональную сторону. Ово-сексинг является тем принципом, который дает уникальную возможность определения пола в пренатальном периоде развития кур [28].

Разделение эмбрионов по полу остается перспективной задачей и в лабораторной практике. Совершенно очевидно, что ее решение дополнит спектр критериев, обеспечивающих минимальные отличия экспериментальных групп куриных эмбрионов.

На сегодняшний день, имеются сообщения ученых, которые описали ряд разнообразных методов диагностики пола куриных зародышей.

Так, в лабораторной практике, для определения пола эмбрионов птиц в последнее время находят применение молекулярно-генетические методы [133]. К их числу относят полимеразно-цепную реакцию (ПЦР), которая позволяет безошибочно за два часа анализа одновременно определить пол у 100 эмбрионов с помощью специфических ДНК праймеров [208]. Точность сексирования зародышей этим методом составляет 100% [28]. Авторы отмечают, что вышеописанный метод крайне ценен для научно-исследовательской работы, а в промышленном птицеводстве метод непригоден ввиду дороговизны и высокотехнологичности.

По сообщению S. Klein, U. Baulain, M. Rokitta, et. al. [198] ДНК-сексинг эмбрионов считается прогрессивным и универсальным методом, так как противоположный пол эмбрионов можно определить в свежеснесенных яйцах, на стадии

бластодиска путем анализа геномной ДНК бластодермальных клеток, и на более поздних этапах пренатального онтогенеза не зависимо от видовой принадлежности.

В литературе еще описан метод доинкубационного сексинга куриных зародышей по массе яиц. Считается, что из более крупных по весу яиц вылупляются петушки, а из менее - курочки [118].

Есть рекомендации по делению эмбрионов на самцов и самок в определенные дни пренатального онтогенеза кур. Сообщается об идентификации пола на 6-е сутки инкубации, которую проводят на основании исследования крови эмбрионов путем подсчета количества Z-хромосом в кариотипах кровяных клеток. Сексирование зародышей на 7-е сутки развития осуществляют методом просвечивания скорлупы с целью регистрации окраски глаз самцов и самок. В период с 16-х по 18-е сутки пренатального онтогенеза в пробе аллантаической жидкости выявляют эстрогенные гормоны, уровень которых специфичен для женского пола зародышей. Имеются сообщения и об использовании метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) путем сканирования гонад для диагностики пола эмбрионов с десятого дня и до вылупления [210, 209, 223, 220, 187, 198, 216, 232].

Значительные успехи в сексировании куриных эмбрионов достигла Американская биотехнологическая компания «Эмбрекс», которая предложила экспериментально дифференцировать разнополых эмбрионов по гормональному статусу, учитывая, что различия в содержании гормонов становятся достоверными, начиная с 12-13 суток развития зародышей [189, 193]. При этом считается данный способ определения пола передовым и может в скором будущем быть использован в практических целях.

Наряду с вышеописанными методами, используя принцип максимальной аналогии опытных групп куриных эмбрионов, учет пола проводят визуально по гонадам. Главным достоинством этого метода, по мнению ряда авторов [39, 31], является очевидная простота и высокая точность определения пола. При этом эмбриона-самца распознают по двум одинаковым по форме семенникам симметрич-

но расположенным вдоль позвоночника, самку по редуцированному правому яичнику [162].

По мнению ряда ученых, перечисленные методы *in ovo* классифицируются как лабораторные, и не имеют широкого практического применения на производстве, а чаще всего используются только в научных исследованиях [31, 133, 28]. Однако ученые утверждают, что за ними будущее, а некоторые из методов будут положены в основу промышленного автоматического сексирования. При этом более перспективными для инкубаторных станций могут стать, как утверждают ученые, методы идентификации пола, основанные на сверхчувствительных сенсорных технологиях, при использовании которых не требуется разрушение скорлупы яиц.

В качестве заключения, можно отметить, что система принципов для комплектации экспериментальных групп в пренатальном онтогенезе кур не описана. Исследователи при формировании групп куриных эмбрионов используют ограниченный набор требований из принципов, предложенных для постэмбриогенеза, представленный в основном генетическим происхождением и требованиями качества яиц пригодных к инкубации. А что касается учета пола, который потенциально может изменить значения показателей и снизить разрыв статистических различий у особей в группе [132, 8, 133], то до сих пор нет единого мнения между учеными в выборе достоверных и доступных методов по определению пола куриных зародышей.

1.3. Особенности развития куриного эмбриона в зависимости от пола

Известно, что «оба пола имеют каждый свою, отличную от другого физиологическую химию» [29]. Имеется скудная информация в основном прошлого столетия по морфологии, физиологии, сроку пренатального онтогенеза, метаболизму, обмену веществ, массе яиц и эмбрионов, поглощению кислорода, микроэлементам, различной чувствительности и соотношению стероидных гормонов в зависимости от пола куриных эмбрионов.

Так, Micek et. al. [206] обнаружили на 4-й день инкубации половые различия в форме желточного мешка. У самок - левая и правая части равны, у самцов - имеет вытянутую по короткой оси яйца форму.

Продолжительность периода пренатального онтогенеза (19-21 день), у разнополых куриных эмбрионов несколько различна. Так, отмечено, что в первые 8 часов от начала периода вылупления в партии цыплят выводится больше курочек, в последующие 8 часов количество эмбрионов равное, а затем до конца вылупления выводятся петушки [185, 192]. Сходные данные были получены позже другими учеными, где указывается меньшая на 2-2,5 часа у эмбрионов-самок продолжительность инкубационного периода [44, 29].

У эмбрионов мужского и женского полов во время их пренатального развития наблюдаются определенные различия в газообмене. Они проявляются в большем испарении воды к 14-му дню инкубации у яиц, из которых вылупляются петушки, а также в большей потребности в кислороде у эмбрионов мужского пола в период с 10-го до 19-го дня инкубации [44]. Другими авторами отмечено, что достоверные отличия в газообмене куриных эмбрионов разного пола начинаются с одиннадцатого дня их развития [117, 31].

В.Д. Бутенко [31] сообщает о разной кислотности среды у разнополых куриных эмбрионов – ткани самок более кислые (низкий рН), в них больше гистидина и мало аргинина, а в белках больше фосфора и меньше серы.

О.М. Будиков [29] установил, что интенсивность обменных процессов тесно связана с полом будущего организма, при этом у самок преобладают процессы ассимиляции, а у самцов – диссимиляции. Это различие, по мнению автора, поддерживается соответствующими концентрациями биохимических веществ, из которых создается среда для протекания обменных процессов, и отражается во многих биохимических показателях.

Половые отличия в обмене веществ куриных эмбрионов наблюдала В.Н. Шредер [177]. Она обнаружила у самок на 10-е сутки развития низкую активность щелочной фосфатазы, но высокое содержание ДНК и РНК. Кроме того, ею выявлено, что реакция окислительного фосфорилирования выражена сильнее

на 44% у эмбрионов-самок, а также женские ткани проявляют большую способность поглощения кислорода чем мужские, что расходится с мнением В.В. Рольник [118], которая в своих исследованиях доказала обратное описанному процессу.

Как утверждают авторы, в процессе пренатального онтогенеза кур достоверно больше кальция потребляют эмбрионы мужского пола, что обуславливает больший вес костей и, следовательно, больший вес мышц и внутренностей [196, 29].

Достоверно показано, что вес яиц, из которых вылупляются петушки, в среднем больше на 0,4 г тех, из которых вылупляются самки, при этом разница составляет примерно 1%. При сопоставлении результатов авторы пришли к заключению, что больший процент самок выводится раньше из яиц меньшего веса, в которых больше относительный вес желтка [116, 29].

Зависит от пола куриного зародыша не только вес яиц, но и масса самих эмбрионов достоверно отличается, о чем в своей работе подтвердили W.H. Burke, M.N. Henry, I. Elezaj [183], продемонстрировав эти различия у разнополых на 11, 13 и 18-е сутки инкубации.

Замечена неодинаковая чувствительность к вредным воздействиям среды эмбрионов обоего пола. Проведя наблюдения за отмиранием раздельнополых куриных эмбрионов трех пород (белый леггорн, нью-гемпшир, австралорн) различных возрастов В.Г. Иванов [65] зарегистрировал, что в возрасте 9-11 дней половых различий в чувствительности еще нет, а в последующие дни инкубации эти различия хорошо заметны. Автор отмечает с 12 дня по 19-й смертность эмбрионов-самцов больше чем самок. Однако в период вылупления преимущественно погибают больше эмбрионы-самки, связывая это с тем, что они могут переживать неблагоприятные условия более длительный период и гибнут только при наступлении второго периода повышенной смертности эмбрионов. Такие заключения ученый сделал по всем трем исследуемым породам, при этом отметил, что наблюдаемые различия у белых леггорнов статистически достоверны, а по двум остальным материал собран небольшой и различия недостоверны.

Сообщается, что сразу после вылупления цыпленка разного пола имеют ряд морфологических и физиологических отличий. У эмбрионов мужского пола вес на несколько граммов, пульс, количество эритроцитов, длина и ширина головы, вес мышечного желудка и сердца больше чем у эмбрионов-самок [218, 219].

А.Г. Генчев, А.К. Османян [39] в числе тех исследователей, которые проводят эксперимент на разнополых куриных эмбрионах, представили цифровые значения по абсолютной и относительной массе яиц, эмбрионов, длине эмбрионов и их частей в зависимости от возраста несушки. Эта работа демонстрирует не только незначительно различающиеся числовые значения между эмбрионами противоположного пола, но и минимальный разрыв статистических различий.

Так, например, масса эмбрионов в зависимости от возраста несушки (32 недели) на 15, 19 и 21-е сутки инкубации у эмбрионов-самок составляет $15,5 \pm 0,2$ г; $26,2 \pm 0,4$ г; $31,7 \pm 0,5$ г, а у эмбрионов-самцов в эти сутки развития $15,8 \pm 0,2$ г; $27,2 \pm 0,4$ г; $32,3 \pm 0,5$ г соответственно. Кроме того, авторы отмечают, что с увеличением возраста «кур-родителей» наблюдаются достоверные различия по абсолютной массе между мужскими и женскими зародышами, а что касается относительной массы эмбрионов обоих полов, то у эмбрионов-самцов она выше, чем у эмбрионов-самок. Длина голени и плюсны в изучаемые сутки инкубации отличается, с большей разностью у мужских эмбрионов.

Необходимо выделить труды ученых и практиков, работающих над задачами птицеводческих хозяйств. Познание проблем направленного регулирования пола служит одним из наиболее перспективных путей активного вмешательства в процессы развития кур в течение зародышевой жизни. Для решения такой задачи специалисты влияют различными веществами, преимущественно аминокислотами и гормонами, способствующими дифференциации пола куриных эмбрионов в определенную сторону, зачастую в женскую [41, 56, 55, 54, 57, 58, 133].

Половые гормоны, вызывающие половую дифференцировку у всех видов млекопитающих, в том числе у птиц – это сигнальные химические вещества, оказывающие сложное и многогранное воздействие на организм в целом либо на определенные органы. Они обуславливают дифференциацию генитального тракта,

половых признаков, способствуют определению внешнего силуэта тела, и служат в организме для регуляции многих функций (роста, развития, обмена веществ, реакции на изменения условий среды) [6, 4].

Известно, что в птицеводстве вылупляется больше цыплят мужского пола. Это особенно актуально для птицефабрик, специализирующихся на яичном направлении, так как их приходится утилизировать или выращивать на мясо, что экономически не выгодно [133].

В связи с этим применяют различные приборы для определения половых гормонов еще в пренатальной жизни зародыша [31]. Это экспериментальные приборы, и находятся на испытании. Так, например, анализатор «Батта» служащий для определения эстрогена в яичевых оболочках яиц. Полученная таким образом проба жидкости из-под скорлупы смешивается с дрожжевыми клетками, которые в присутствии эстрогена дают характерное свечение [133].

В основном данные методы применяются учеными птицеводческой отрасли, основной целью, которых является ранняя диагностика пола с целью элиминации особей нежелательного пола.

Дифференцировка соматических тканей обусловлена гормонами, выделяемыми гонадами эмбрионов. Однако на каком сроке развития куриного эмбриона синтезируются гормоны, мнения ученых расходятся.

Известно, что мужские и женские гонады куриного зародыша синтезируют с начала второй недели инкубации в разном соотношении гормоны (эстрадиол, тестостерон) [6].

J.E. Woods, R.L. Weeks [233] описали способность к стероидному синтезу в закладке гонады до ее гистологической дифференцировки на 6-7 сутки инкубации куриного эмбриона. J.P. Weniger [234] установил, что гонады куриных эмбрионов начинают продуцировать женский половой гормон с 4-го дня, а мужской – с 6-го дня инкубации, то есть задолго до наступления морфологической дифференцировки. Позднее автор [235] методом тонкослойной хроматографии в генетическом яичнике 5-дневного эмбриона выявил способность к синтезу эстрогена из мечено-

го прогестерона, при этом в семенниках способности к синтезу мужского гормона-тестостерона автор не обнаружил.

В.Д. Бутенко [31] опроверг утверждение об отсутствии синтеза тестостерона и сообщает, что куриный эмбрион-самец начинает продуцировать мужской гормон с 5-го дня инкубации.

Имеются единичные сведения об определении малых количеств гормонов у куриных эмбрионов разного пола в конкретные стадии инкубации [118]. При этом одни работы указывают на наличие конкретного гормона, не указывая числового значения. Другие также числовое значение не приводят, а только сообщают, насколько повышен или снижен гормон у эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок в конкретные сутки инкубации.

Так, I. Gallien et. al. [188] флуориметрически и колориметрически идентифицировали эстрогены в экстракте куриного эмбрионального яичника.

В процессе работы по изучению гормонов во внеэмбриональных тканях куриного зародыша, R. Stoll, R. Maraud [226] обнаружили их в амниотической и аллантоисной жидкостях на седьмые сутки инкубации, с 8-х суток отметили повышение их количества у самок, а на 17-е сутки, наоборот, у самцов количество стероидных гормонов более чем в два раза больше, чем у самок. При этом, какими авторами пользовались методами для определения уровня гормонов, в статье не приводится.

Таким образом, анализ представленных сведений свидетельствует о том, что имеются попытки исследования куриных эмбрионов с учетом половых признаков. Однако, накопленная в этой области информация преимущественно устаревшая, поскольку основные исследования проведены не позже 20 века. Имеющиеся сведения зачастую малоинформативны, разрозненные и не отражают всей совокупности морфофункциональных особенностей исследуемого биообъекта.

В то же время в единичных работах, благодаря учету пола, можно наблюдать минимальный разлет числовых данных, что свидетельствует о необходимости регистрации половых признаков при экспериментальном исследовании в пренатальном периоде развития кур для получения достоверных результатов. Недоста-

точно сведений об уровне половых гормонов в онтогенезе куриного зародыша, а сведений об их количестве, и тем более с учетом половых различий, в литературе вообще не приводятся.

Глава 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭТАПОВ РАБОТЫ

Исследования по диссертационной работе проводились в период с 2008 по 2014 гг. на кафедре ботаники, зоологии и общей биологии, на базе проблемной научно-исследовательской лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии НИИ прикладных биотехнологий Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета.

Все эксперименты проводились в соответствии с правилами защиты позвоночных животных, используемых в научных целях [119, 120].

Материалом для исследований служили эмбрионы кур на разных этапах развития, количество которых в эксперименте за весь период работы составило 6180. Выращивание эмбрионов, используемых в процессе работы, осуществляли в инкубаторе ИЛБ-0,5 (Россия) с автоматическим регулированием параметров инкубации. Процесс инкубации зародышей отображен на рисунке 1. Температурный и влажностный режимы на всем протяжении инкубации соответствовали нормативам инкубации куриных эмбрионов. Ежедневные манипуляции с куриными эмбрионами осуществлялись в одно и то же время суток.

На всех этапах работы перед инкубацией формировали поэтапно партии оплодотворенных яиц по принципу максимальной аналогии, учитывая следующие требования:

- генетическое происхождение птицы, для чего использовали сертифицированные оплодотворенные яйца кур яичного направления продуктивности кросса Родонит 3 (родительская форма породы белый леггорн), полученные на Кумской птицефабрике;

- идентичность формы, целостность, цвет, внутренняя топография внезародышевых структур яйца, для чего до инкубации яйца оценивали по внешним признакам визуально и с помощью овоскопа ПКЯ-10 (Россия); яйца отбирали правильной формы, без видимых дефектов, шероховатость отсутствовала, «мраморность» скорлупы слабовыраженная, пуга расположена на тупом конце яйца;

- половая принадлежность, для чего разделили куриные эмбрионы по полу двумя взаимодополняющими методами.

Первый метод разделения по полу - доинкубационное взвешивание каждого яйца с учетом рекомендаций Рольник В.В. [118]. Взвешивание осуществляли с помощью весов ВЛТЭ-150 (Россия) (рисунок 2). Предварительно на каждое яйцо простым карандашом наносили маркировку с номером. Опираясь на метод предложенный автором, в соответствии с нашей модификацией, условное деление по полу куриных эмбрионов проводили, отталкиваясь от среднего числового значения массы яиц. При этом яйца с массой выше среднего, условно относили к эмбрионам мужского пола, ниже среднего - женского пола. Укомплектованные группы куриных яиц с зародышами разного пола закладывали в инкубационные лотки с маркировкой половой дифференцировки куриных эмбрионов, которые помещали в инкубатор, где инкубировали с 8-х по 19-е сутки пренатального развития.

Второй метод разделения по полу заключался в отборе яиц, на каждые из указанных суток, для препаровки с целью визуальной оценки половых желез (семенники, яичники). Эмбрионов-самцов и самок отличали по половым железам, которые расположены в брюшной полости. Самца идентифицировали по нахождению справа и слева одинаковых по размеру телец (семенников) (рисунок 3). Самку - по редуцированному правому тельцу и крупному левому (яичник) (рисунок 4) [162]. Дифференцировку половых желез проводили под стереомикроскопом МС-2 фирмы ЛОМО (рисунок 5).

Всех эмбрионов на разных этапах работы делили на три части, в одной из которых проводили морфометрию и расчет индексов физического развития. Из этих же эмбрионов выборочно формировали подгруппы эмбрионов, у которых определили уровень половых гормонов. У эмбрионов второй части проводили оценку костной системы (скелет). В третьей части эмбрионов определяли уровень апоптоза, АФП, ген *p53*. При этом каждая часть была представлена экспериментальными группами разнополых эмбрионов и группами эмбрионов не разделенными по половому признаку, сформированными на различных этапах исследования в соответствии с поставленными задачами.



Рисунок 1 - Процесс инкубации куриных яиц в инкубаторе ИЛБ-0,5



Рисунок 2 - Взвешивание куриных яиц на электронных весах ВЛТЭ-150

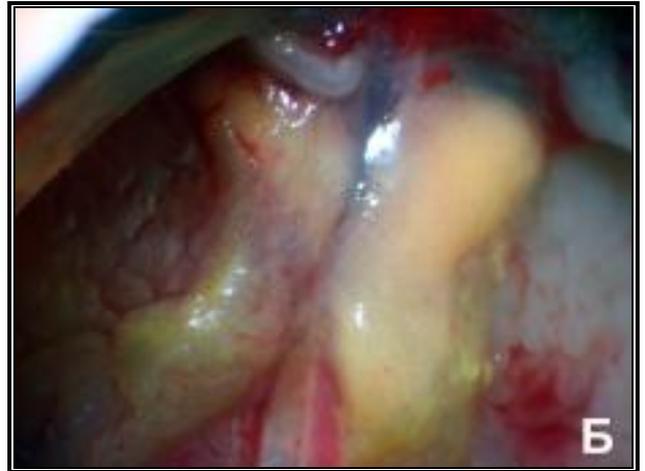


Рисунок 3 - Куриный эмбрион-самец (А) и семенники бобовидной одинаковой формы, 10× (Б) на 19-е сутки инкубации

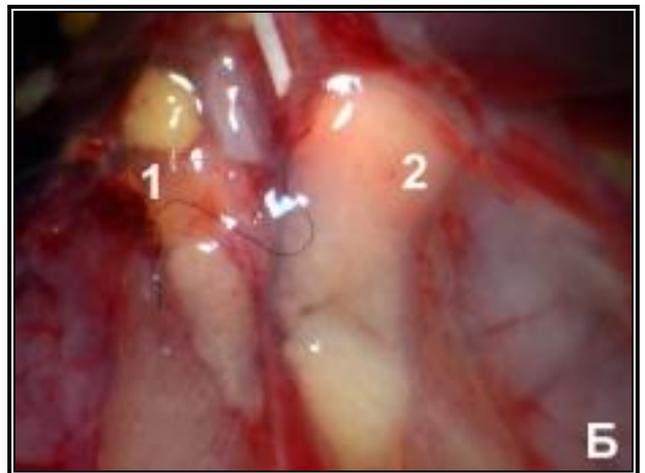


Рисунок 4 - Куриный эмбрион-самка (А) и правый редуцированный (1) и левый яичники, 10× (2) (Б) на 19-е сутки инкубации



Рисунок 5 - Оценка половых желез у разнополовых куриных эмбрионов под стереомикроскопом МС-2

Все значения морфофункциональных показателей, полученные для разнополовых эмбрионов, сравнивались со значениями аналогичных показателей с группой эмбрионов без учета половых различий. Это проводилось для подтверждения приоритетности деления эмбрионов по полу, как методического приема, обеспечивающего максимальную точность исследуемых критериев и их большую достоверность, по сравнению с аналогичными критериями, полученными на эмбрионах в группах, сформированных без учета половых различий.

Морфометрические исследования куриных эмбрионов разного пола осуществляли на 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки инкубации.

Массу тела измеряли в граммах с помощью электронных весов ВЛТЭ-150 (Россия) с точностью до 0,001 г. Длину тела и окружность грудной клетки измеряли в сантиметрах при помощи сантиметровой ленты и штангенциркуля. За длину тела эмбриона принимали размер от клюва до конца хвоста.

Полученные результаты морфометрии раздельнополовых куриных эмбрионов использовали для оценки физического развития, которую проводили методом индексов. Вычисляли следующие индексы физического развития: Кетле I, Кетле II, и индекс гармоничного морфологического развития (ИГМР), которые

рассчитывали по адаптированным к куриному эмбриону формулам, изложенным в работах А.П. Труновой [156], С.В. Черникова [167].

Уровень тестостерона и эстрадиола в супернатанте зародышей с восьмых по девятнадцатые сутки инкубации определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа основанного на принципе «сэндвича» на анализаторе марки Stat fax 303 Plus (США) (рисунок 6), с использованием наборов реагентов Стероид-тестостерон-01 фирмы «Алкор Био» (Россия) и тест-систем Estradiol sensitive ELISA фирмы «DRG» (Германия).

Особенности формирования костной системы зародышей исследовали по методике Доусона, модифицированной в отделе эмбриологии НИИЭМ АМН СССР [51]. Скелет эмбрионов кур изучали с 12-х по 19-е сутки инкубации. Выбор данных периодов пренатального онтогенеза обусловлен особенностями объекта исследования. Используемые растворы, при данном методе, размягчают все ткани эмбриона при минимальном числе точек опоры (оссификации), в связи, с чем окрашивание целостного костного остова эмбриона на ранних стадиях развития является проблематичным и не всегда выполнимым процессом. Поэтому исследования с более ранних суток методически не целесообразны.

В соответствии с указанной методикой куриные эмбрионы помещали в 96% этанол на 7-8 суток, в объемном соотношении 1:10. Далее эмбрионы помещали в 1% раствор КОН на 1-2 суток, с целью просветления мягких тканей. Затем эмбрион проводили сначала через смеси различных растворов с окраской ализарином красным, после проводили через смеси глицерина, спирта и воды с целью обезвоживания тканей. Обработанные препараты хранили в чистом глицерине.

Тотальные препараты разнополых куриных эмбрионов, изготовленные по данной методике, изучали под настольной лупой ПРОТЕХ 8608D-D X8 (Китай) при увеличении в 8 раз. Измеряли общую длину скелета эмбрионов при помощи сантиметровой ленты и длину костей грудной (плечевая, лучевая, локтевая, пястная третья кость) и тазовой (бедренная, большеберцово-заплюсневая, цевка) конечностей с использованием электронного штангенциркуля ЩЦЦ-II 0-250 0,01 (Россия) (рисунок 7).



Рисунок 6 - Определение уровня половых гормонов у куриных эмбрионов разного пола с помощью иммуноферментного анализа на микростриповом фотометре Stat fax 303 Plus



Рисунок 7 - Измерение длины тазовой конечности куриного эмбриона

Для обеспечения объективности оценки отличий между длиной костей эмбрионов самок и самцов при сравнении их в пренатальном онтогенезе нами использован критерий абсолютной и относительной разницы согласно общепринятым рекомендациям [176, 156].

Вычисление абсолютной разницы для разнополых куриных зародышей производилось следующим образом: среднее числовое значение показателя одного пола зародыша отнималось от среднего числового значения аналогичного критерия другого пола эмбриона на определенной стадии развития.

Расчет критерия относительной разницы для куриных эмбрионов разного пола осуществлялся делением значения, полученного для эмбриона-самца на значение эмбриона-самки в конкретные дни пренатального онтогенеза.

Изучение апоптоза проводилось классическим (количественным) методом - расчет апоптического индекса (АИ). Этот критерий характеризует количество клеток с морфологическими проявлениями апоптоза по отношению к общему количеству клеток (в %). Вычисление АИ проводили с 8-х по 19-е сроки инкубации в трех группах КЭ (эмбрионы-самцы, эмбрионы-самки, группа эмбрионов, сформированная без учета половых различий).

Подсчет количества апоптических клеток в гомогенатах разнополых куриных зародышей осуществляли по методу Абдувалиева А.А., Гильдиевой М.С. [1].

Для получения суспензии клеток применяли следующие приемы: механическое размельчение эмбриональной ткани на гомогенизаторе фирмы «Vitek» (Австрия), затем к гомогенизированной ткани добавляли 0,25% раствор трипсина, подогретого до температуры плюс 37°C в соотношении 1:10, и в течение 5 минут трипсинизировали с использованием магнитной мешалки по Л.П. Дьяконову, В.И. Ситькову [50], далее пипеткой отбирали 0,2 мл суспензии сливали ее в пробирку, в которую вносили 0,8 мл краски трипанового синего, содержимое пробирки перемешивали и выдерживали 5 минут и заполняли камеру с сеткой Горяева. Апоптические клетки опознавали по окрашенному в голубой цвет хроматину.

Апоптический индекс (АИ) вычисляли по формуле, предложенной M.D. Logsdon, R.E. Meyn, P.C. Besa et. al., [202].

$$AI = N_m / N \times 100,$$

где N_m – количество апоптических клеток;

N – общее количество клеток в исследуемой совокупности.

Выявление гена *p53* осуществлялось в гомогенате тканей КЭ мужского и женского пола. Наличие гена определяли на 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки инкубации. Пробоподготовка включала гомогенизацию эмбрионов, центрифугирование гомогенизированной массы с использованием центрифуги «Hettich» Universal 320 (Германия) при 4000 об/с в течение 10 минут и замораживание проб при температуре минус 18...20°C в морозильной камере. При транспортировке замороженных проб использовался теплоизолирующий контейнер из пенопласта, в который были помещены охлаждающие элементы.

Все последующие манипуляции выполнялись в НИИ биологии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону).

Выделение ДНК проводили двумя способами (сорбентный и термокоагуляционный) из супернатанта зародышей кур с использованием наборов реагентов фирмы «Литех». Амплификацию фрагментов ДНК проводили с применением метода ПЦР. Пробы помещали в многоканальный амплификатор «Терцик» (Россия) для прохождения ПЦР-циклов, состоящих из тепловой денатурации ДНК, ее отжига с праймером, и удлинения цепи (элонгации). После завершения ПЦР-циклов осуществляли детекцию продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле, с применением специфического окрашивания бромистым этидием. Далее полученный гель помещали на фильтр трансиллюминатора Gel Doc (Bio Rad) (США) (рисунок 8). Просматривали изображение фотографическим способом на базе компьютера, с переводом изображения в цифровой формат.

Уровень АФП определяли методом ИФА на приборе Stat fax 303 Plus (США), с учетом инструкции по использованию набора реагентов АФП-ИФА-БЕСТ (Россия) [69]. При приготовлении проб (супернатант гомогенатов куриных эмбрионов) руководствовались подробной схемой изложенной в работе С.В. Черникова [167].



Рисунок 8 - Заключительный этап ПЦР анализа по выявлению гена *p53* у куриного эмбриона с помещением агарозного геля с пробами на фильтр трансиллюминатора Gel Doc

Результаты экспериментов подвергали вариационно-статистической обработке. Вариационные ряды, полученные в эксперименте, характеризовали по следующим показателям: средняя арифметическая величина (M); квадратическое отклонение (δ); ошибка средней арифметической величины или средняя квадратическая ошибка (m). Достоверность различий сравниваемых показателей оценивали по критерию Стьюдента с использованием программы Primer of Biostatistics (Version 4.03). Для сравнения варьирующих признаков измеряемых в различных единицах использовали ту же программу с критериями расчета коррелятивной зависимости.

Микрофотографирование осуществлялось при помощи комплекса визуализации изображения, состоящего из микроскопа «Микмед-2» (Россия) и цифровой фотокамеры «Olympus-5060» (Япония). Выбор методов микрофотографирования осуществлялся согласно рекомендациям, изложенных в учебном пособии Л.Д. Тимченко, В.Н. Вакулина [138]. Фиксация результатов исследования осуществлялась при помощи цифровой фотокамеры «SONY DSC-W50» (Китай).

ГЛАВА 3. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ РАЗНОГО ПОЛА В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ (результаты собственных исследований)

3.1. Сравнительная оценка эффективности разделения куриных эмбрионов по полу методами взвешивания яиц перед инкубацией и визуальной оценки гонад

В соответствии с материальным обеспечением лаборатории, в которой выполнялась диссертационная работа и на основании анализа доступности, удобства, стоимости и простоты исполнения каждого из методов разделения по полу куриных зародышей, представленных в пункте 1.2. главы 1., выбор был сделан в пользу двух методов, которые в соавторстве [148] использованы в дополнении друг с другом:

- взвешивание яиц перед инкубацией с учетом рекомендаций В.В. Рольник [118];

- визуальная оценка половых желез после препаровки с учетом рекомендаций Ю.В. Бондаренко [27] в развитии куриного эмбриона с 8-х по 19-е сутки инкубации.

В процессе работы по разделению разнополых эмбрионов вначале отобрали 2100 яиц, которые поделили по массе (первый метод). В соавторстве [25] установлено, что средняя масса одного яйца ($n=2100$) составила $63,3 \pm 0,12$ г. При этом выявлено 1134 яйца (54%), масса которых, являлась ниже средней, то есть с условно женскими куриными эмбрионами и 966 яиц (46%) выше средней массы - с предположительно мужскими эмбрионами.

На этапе визуальной оценки половых желез, с 8-х по 19-е сутки инкубации, проводили вскрытие эмбрионов, условно разделенных по полу первым методом. При этом на каждые указанные сутки развития использовали разное количество зародышей (таблицы 1 и 2). Этот факт методически обоснован разными причинами на разных этапах инкубации.

Так, численность исследуемых эмбрионов в предплодном периоде развития (8-12-е сутки инкубации) больше, что обусловлено целью исключения вероятности ошибки в определении пола, которая может быть существенной, в связи с ма-

лоразличимым, по мнению Левиной С.Е. [85], отсутствием или наличием симметрии в развитии гонад в указанный период пренатального онтогенеза.

Считается, что с 13-х суток развития КЭ, и до вылупления, симметрия в гонадах четко выраженная [162], и пол можно определить без ошибки, поэтому число эмбрионов, начиная с этих суток развития, меньше, чем в предплодном периоде.

В период с 8-х по 19-е дни инкубации в обеих группах (эмбрионы-самцы, эмбрионы-самки) учитывали замерших, с кровяными кольцами зародышей и неоплодотворенные яйца, которые выбраковывались, чем обусловлено различие посуточного количества эмбрионов. В дальнейшем было обчислено количество эмбрионов обеих групп с учетом выбраковки, и выявлены несовпадения второго метода в сравнении с первым.

Таблица 1 - Посуточное распределение куриных эмбрионов-самок при разделении их по полу методом визуализации гонад в процессе развития

Сутки развития	Количество эмбрионов- ♀	Число выбракованных эмбрионов	Итоговое количество эмбрионов- ♀ с учетом выбраковки	Несовпадение с результатами разделения по полу первым методом	
				Абсолютное количество несовпадений результатов	%
8	120	12	108	16	1,46
9	120	10	110	16	1,46
10	120	6	114	13	1,19
11	120	5	115	10	0,91
12	120	4	116	7	0,64
13	78	2	76	Несовпадений не обнаружено	-
14	76	2	74	Несовпадений не обнаружено	-
15	76	1	75	Несовпадений не обнаружено	-
16	76	0	76	Несовпадений не обнаружено.	-
17	76	0	76	Несовпадений не обнаружено	-
18	76	0	76	Несовпадений не обнаружено	-
19	76	0	76	Несовпадений не обнаружено	-
Итого:	1134	42	1092	62	5,66

Приведенные в таблице 1 результаты в целом показывают, что от 1134 эмбрионов, 42 эмбриона (3,7%) подверглись выбраковке, которая приходилась на предплодный период пренатального онтогенеза кур. В итоге количество эмбрионов-самок с учетом выбраковки в эксперименте составило 1092.

Из представленных в таблице результатов видно, что в процессе использования указанных методов, имеются несовпадения результатов. Так, при вскрытии 1092 эмбрионов, которые в соответствии с первым методом считались самками, визуально установлено, что с 8-х по 12-е дни инкубации, 62 эмбриона являлись эмбрионами-самцами, что на 5,66% не совпало с результатами, полученными первым методом.

При этом больше половины несовпадений (45 эмбрионов) приходится на 8-, 9- и 10-е сутки развития. Это подтверждает ошибку при использовании метода доинкубационного взвешивания яиц. В то время как с 13-х по 19-е сутки развития КЭ несовпадений не обнаружено, следовательно, вероятность ошибки исключена.

Таблица 2 - Посуточное распределение куриных эмбрионов-самцов при разделении их по полу методом визуализации гонад в процессе развития

Сутки развития	Количество эмбрионов - ♂	Число выбракованных эмбрионов	Итоговое количество эмбрионов-♂ с учетом выбраковки	Несовпадение с результатами разделения по полу первым методом	
				Абсолютное количество несовпадений результатов	%
8	100	4	96	2	0,2
9	100	2	98	2	0,2
10	100	3	97	1	0,1
11	100	3	97	1	0,1
12	100	3	97	1	0,1
13	68	2	66	Несовпадений не обнаружено	-
14	68	1	67	Несовпадений не обнаружено	-
15	66	2	64	Несовпадений не обнаружено	-
16	66	1	65	Несовпадений не обнаружено	-
17	66	2	64	Несовпадений не обнаружено	-
18	66	1	65	Несовпадений не обнаружено	-
19	66	0	66	Несовпадений не обнаружено	-
Итого:	966	24	942	7	0,7

Анализируя данные представленные в таблице 2 можно отметить, что в группе эмбрионов-самцов (966), разделенных по полу первым методом, 24 эмбриона (2,5%) подверглись выбраковке. Поэтому итоговое количество эмбрионов, которые использованы в эксперименте, заключающемся в визуальной оценке гонад, составило 942.

После препарирования на разные сроки инкубации 942 эмбрионов, условно принятых за мужские, и визуальной оценки гонад, установлено, что семь из них

являлись эмбрионами-самками, что на 0,7% не совпало с результатами, полученными первым методом.

В результате перегруппировки по половому признаку в процессе взаимодополняющего использования двух описанных методов, установлено, что от общего числа зародышей (2100), выбранных изначально для эксперимента, в итоге выявлено 1037 эмбрионов женского пола и 997 - мужских эмбрионов, что в процентном соотношении составляет 49,4% и 47,4% соответственно. Благодаря этому сформированы с высокой степенью достоверности группы разнополых куриных эмбрионов, на которых и проводилась серия дальнейших исследований согласно поставленным задачам.

Сопоставляя эффективность метода визуальной оценки гонад и метода взвешивания инкубационных яиц с целью половой дифференцировки эмбрионов, можно отметить достаточно низкий процент несовпадений полученных результатов, суммарно по обеим половозрастным группам, разделенным в процессе эксперимента, не превышает 6,36%.

Таким образом, для разделения куриных эмбрионов по полу возможно самостоятельное использование обоих методов. Однако, учитывая вероятность (хотя и незначительную) наличия несовпадений, для исключения ошибки, предпочтительно использование указанных методов в комплексе.

3.2 Уровень половых гормонов (тестостерон, эстрадиол) у экспериментальных куриных эмбрионов в онтогенезе

Для исследования уровня стероидных гормонов у куриных эмбрионов на различных этапах развития, из куриных эмбрионов-самок и самцов, половая принадлежность которых установлена вышеуказанными методами, в процессе работы дополнительно формировали подгруппы, выборочно по 30 эмбрионов на каждые сутки инкубации.

Кроме того, особое внимание уделили исследованию уровня гормонов у тех эмбрионов, у которых данные об их половой принадлежности не совпали, при оп-

ределении методом визуальной оценки гонад и методом доинкубационного взвешивания яиц.

Установлено, что с 8-х по 19-е сутки инкубации тестостерон в подгруппе эмбрионов - ♂ (таблица 3) и эстрадиол в подгруппе эмбрионов - ♀ определяется на всех этапах эмбриогенеза [22].

Таблица 3 - Средние значения уровня тестостерона на протяжении эмбриогенеза в подгруппе куриных эмбрионов-самцов в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий ($M \pm m$)

Сутки развития	Уровень тестостерона, нмоль/л	
	Куриные эмбрионы - ♂, n = 30	Группа куриных эмбрионов, сформированная без учета половых различий, n = 30
8	2,61±0,006	2,42±0,1
9	2,65±0,01	2,64±0,08
10	3,28±0,008*	2,83±0,29
11	3,73±0,005* [■]	3,16±0,16
12	3,91±0,003* [■]	2,92±0,18
13	4,15±0,004* [■]	3,13±0,18
14	4,49±0,003* [■]	2,67±0,16
15	5,01±0,004* [■]	4,62±0,09*
16	5,85±0,006* [■]	5,67±0,08*
17	6,17±0,003* [■]	2,77±0,22*
18	6,36±0,003* [■]	2,66±0,23
19	6,88±0,006* [■]	3,33±0,37

n - количество эмбрионов на каждые исследуемые сутки инкубации;

* ($P \leq 0,05$) – достоверная разница в сравнении с предыдущими сутками инкубации;

[■] ($P \leq 0,05$) – достоверная разница в сравнении с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

Так, в подгруппе эмбрионов-самцов уровень тестостерона с восьмых по девятнадцатые сроки пренатального онтогенеза достоверно увеличивается с 2,61±0,006 нмоль/л до 6,88±0,006 нмоль/л. Минимальная концентрация отмечена на 8-е сутки, а максимальная – на 19-е сутки развития.

При посуточном сравнении уровня тестостерона в подгруппе мужских эмбрионов зафиксировано, что различие значения на 9-е сутки в сравнении с предыдущими сутками инкубации недостоверно. В период с 10-х по 19-е сутки инкубации наблюдается посуточная достоверная разница уровня тестостерона в подгруппе эмбрионов-самцов.

На протяжении пренатального онтогенеза средние значения тестостерона в группе разнополых куриных эмбрионов характеризуются посуточной сменой возрастания и убывания. При этом на 15-, 16- и 17-е сутки в этой группе отмечены достоверные различия уровня тестостерона в сравнении с предыдущими сутками. Данные, полученные на 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 18- и 19-е сутки пренатального онтогенеза не имеют достоверных отличий с предыдущими сутками в группе эмбрионов, сформированной без учета пола.

Кроме того, рассуждая о статистических различиях можно отметить, что в группе, где учет пола не осуществлялся диапазон их значений на каждые сутки значительно шире, чем в подгруппе эмбрионов-самцов.

При сравнении уровня тестостерона в обеих группах куриных эмбрионов выявлено, что в подгруппе эмбрионов-самцов и в группе эмбрионов, сформированной без учета половых различий, средние значения количества гормона на каждые изучаемые сутки развития зародышей отличаются.

Так, в начале предплодного периода пренатального онтогенеза на 8-, 9- и 10-е сутки инкубации зарегистрированы недостоверные результаты уровня гормона (тестостерон). С 11-х суток и до периода вылупления (19-е сутки инкубации) доказана достоверная разница средней концентрации гормона в исследуемых группах.

Установлено, что на 8-е сутки инкубации уровень эстрадиола (таблица 4) в подгруппе эмбрионов-самок составляет $27,10 \pm 0,14$ pg/мл, на 19-й день развития зародышей $59,70 \pm 0,06$ pg/мл. Эти значения достоверно увеличиваются в процессе пренатального онтогенеза и являются минимальным и максимальным значениями показателя.

Достоверная посуточная разница уровня гормона (эстрадиол) на каждые сутки инкубации по отношению к предыдущим суткам установлена на 10-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки инкубации эмбрионов-самок. В остальные периоды пренатального онтогенеза различия уровня эстрадиола на каждые исследуемые сутки в сравнении с предыдущими сутками инкубации в подгруппе эмбрионов-самок недостоверны.

Таблица 4 - Средние значения уровня эстрадиола на протяжении пренатального онтогенеза в подгруппе куриных эмбрионов-самок в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий ($M \pm m$)

Сутки развития	Уровень эстрадиола, pg/мл	
	Куриные эмбрионы - ♀, n = 30	Группа куриных эмбрионов, сформированная без учета половых различий, n = 30
8	27,10±0,14	25,82 ±0,76
9	27,30±0,04 [■]	26,51±0,15
10	30,31±0,03* [■]	15,11±1,14*
11	30,20±0,04 [■]	13,41±1,31
12	34,90±0,03* [■]	17,70±2,18
13	33,41±0,03* [■]	22,32±1,94
14	35,52±0,05* [■]	18,04±1,11
15	41,70±0,04* [■]	33,70±1,87*
16	42,80±0,04* [■]	17,52±1,72*
17	45,61±0,04* [■]	21,81±2,15
18	52,41±0,05* [■]	28,91±3,26
19	59,70±0,06* [■]	22,21±2,42

n - количество эмбрионов на каждые исследуемые сутки инкубации;

* ($P \leq 0,05$) – достоверная разница в сравнении с предыдущими сутками инкубации;

■ ($P \leq 0,05$) – достоверная разница в сравнении с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

В группе куриных эмбрионов, сформированной без учета половых различий, уровень эстрадиола с восьмых по девятнадцатые сроки пренатального онтогенеза имеет посуточный волнообразный характер, со сменой пиков подъема и пиков спада. Следует отметить, что для куриных эмбрионов в группе без учета половых различий на каждые сутки инкубации отмечался широкий разброс статистических различий уровня гормона по сравнению с подгруппой эмбрионов, где главным критерием отбора особей в группу являлся учет пола.

В группе куриных эмбрионов, сформированной без учета пола зарегистрированы достоверные изменения уровня эстрадиола на 10-, 15- и 16-е сутки пренатального онтогенеза в сравнении с предыдущими сутками инкубации. В остальные исследуемые периоды инкубации средние значения уровня гормона достоверно не отличались.

Из результатов, приведенных в таблице 4 видно, что на каждые исследуемые дни инкубации при сравнении уровня эстрадиола в подгруппе женских куриных эмбрионов и у эмбрионов в группе без учета половых различий средние значения

показателя отличаются. При этом достоверная разница уровня эстрадиола зарегистрирована на все исследуемые сутки инкубации, за исключением восьмых, где различия недостоверны.

Данные о количестве стероидных гормонов в процессе пренатального развития кур противоположного пола в сравнении с разнополой группой эмбрионов, приведённые в таблицах 3 и 4, представлены в виде графиков, где наглядно можно проследить динамику гормонов.

Анализируя динамику тестостерона в целом (рисунок 9), можно отметить, что она изменчива и различна в обеих группах куриных эмбрионов в зависимости от этапов пренатального онтогенеза.

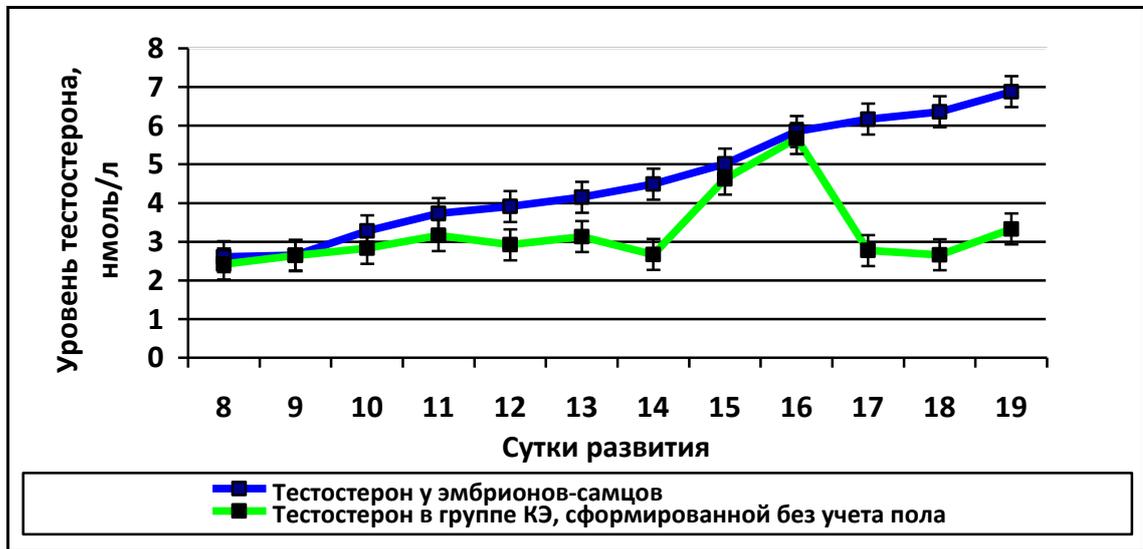


Рисунок 9 - Динамика уровня тестостерона у эмбрионов-самцов и зародышей в группе без учета половых различий в процессе развития

Зафиксировано, что с 8-х по 11-е, с 12-х по 13-е, с 14-х по 16-е и с 18-х по 19-е сутки развития, динамика исследуемого показателя в двух группах куриных эмбрионов совпадает. С 11-х по 12-е и с 13-х по 14-е сутки инкубации динамика показателя противоположна, а с 16-х по 18-е дни развития динамика гормона в обеих группах зародышей имеет значительный разнонаправленный характер.

При анализе уровня эстрадиола (рисунок 10) установлено, что в подгруппе женских эмбрионов уровень гормона отличается и различен в зависимости от суток инкубации в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета пола. Так, с 8-х по 9-е, с 11-х по 12-е, с 14-х по 15-е и с 16-х по 18-е сутки развития, динамика исследуемого показателя в двух группах куриных эмбрионов

совпадает. А в интервалах между 9-ми и 11-ми, 12-ми и 14-ми, 15-ми и 16-ми, 18-ми и 19-ми сутками инкубации динамика уровня эстрадиола в обеих группах противоположна.

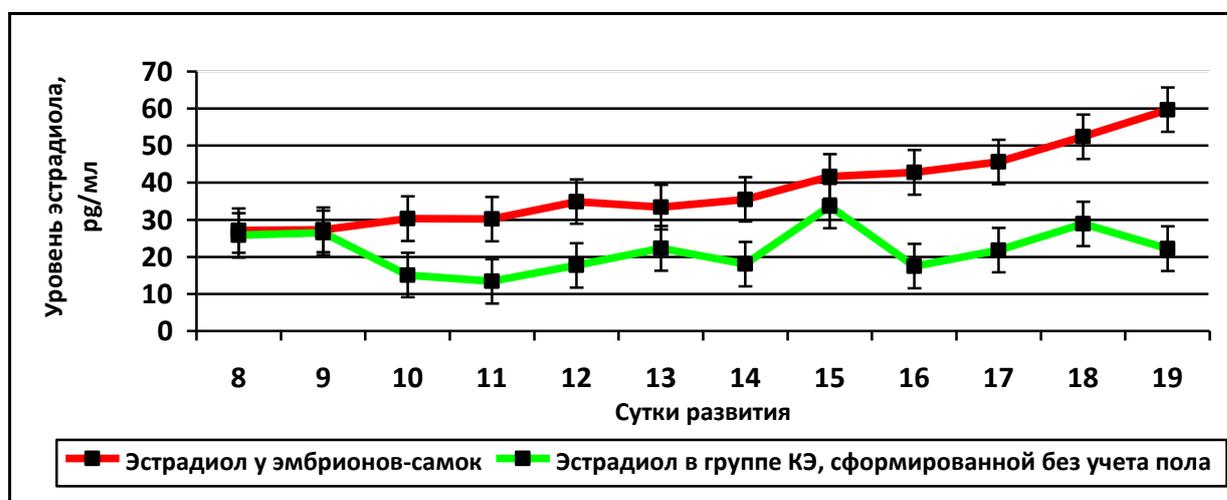


Рисунок 10 - Динамика уровня эстрадиола у эмбрионов-самок и зародышей в группе без учета половых различий в процессе развития

Дополнительно в соответствии с результатами, представленными в таблицах 1 и 2., пункта 3.1. главы 3 провели исследование уровня гормонов у эмбрионов, у которых данные об их половой принадлежности вызвали сомнения. При этом на 8-, 9-, 10-, 11- и 12-е сроки пренатального онтогенеза у каждого в отдельности мужского и женского эмбриона (таблица 5) определяли уровень противоположного гормона (эстрадиол и тестостерон соответственно).

Так, в группе женских эмбрионов на 8-е сутки инкубации выявлено 13 эмбрионов мужского пола, что совпадает с результатами метода визуальной оценки гонад. У трех эмбрионов под номерами 6, 9 и 13 (таблица 5) отмечено следовое количество уровня тестостерона ($<0,2$ нмоль/л), следовательно, данные эмбрионы принадлежат к женскому полу. На 9-е сутки развития куриных эмбрионов-самок зафиксировано, что большая часть эмбрионов (14) является противоположным полом, а два эмбриона (№ 3; № 16) имеют низкий уровень гормона и, следовательно, они принадлежат к эмбрионам женского пола. В остальные периоды пренатального онтогенеза (10, 11, 12 сутки инкубации) у всех 30 эмбрионов установлена мужская половая принадлежность.

В группе мужских эмбрионов на 8-е и 9-е сутки инкубации выявлено по одному эмбриону мужского пола, что совпадает с результатами метода визуальной оценки гонад и по одному эмбриону женского пола.

Таблица 5 - Абсолютная концентрация уровня эстрадиола и тестостерона у каждого эмбриона противоположного пола в отдельности в предплодном периоде пренатального онтогенеза

Сутки инкубации	8	9	10	11	12
№ эмбриона	Уровень тестостерона, нмоль/л у эмбрионов-самок				
1	2,57	2,69	3,26	3,69	3,89
2	2,68	2,71	3,31	3,74	3,94
3	2,61	<0,2	3,38	4,53	4,32
4	2,53	2,68	3,25	3,81	3,93
5	2,17	2,71	3,26	3,78	3,89
6	<0,2	2,67	4,01	4,18	4,16
7	3,21	2,68	3,12	3,69	3,87
8	2,18	2,74	3,14	3,72	-
9	<0,2	2,72	4,12	3,83	
10	2,58	2,59	3,17	3,66	
11	2,69	2,83	4,03	-	
12	2,27	2,74	3,25		
13	<0,2	2,67	3,29		
14	2,11	2,69	-		
15	3,24	2,58			
16	2,18	<0,2			
Уровень эстрадиола, рг/мл у эмбрионов-самцов					
1	27,8	27,0	29,9	27,8	30,5
2	3,6	3,4	-	-	-

В остальные периоды пренатального онтогенеза (10, 11, 12 сутки инкубации) у всех трех эмбрионов установлена женская половая принадлежность.

Таким образом, с помощью иммуноферментного метода установлены средние нормативные показатели предела онтогенетической изменчивости уровня тестостерона и эстрадиола у разнополых куриных эмбрионов с восьмых по девятнадцатые сутки инкубации. При этом уровень обоих гормонов в указанный период инкубации достоверно увеличивается.

Кроме того, зарегистрированы достоверно отличающиеся результаты уровня эстрадиола с 9-х по 19-е сутки инкубации в подгруппе женских эмбрионов и уровня тестостерона с 11-х по 19-е сроки развития в подгруппе мужских эмбрионов в сравнении с уровнем одноименных показателей групп эмбрионов, пол которых не учитывался.

На разных этапах инкубации четко зафиксирован разнонаправленный характер динамики каждого исследуемого гормона в сравнении с группой эмбрионов без учета половых различий.

3.3. Оценка физического развития куриных эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок

Морфометрические показатели, характеризующие пропорциональность и гармоничность физического развития считаются ключевыми критериями для оценки роста и развития организма. При этом основными критериями являются масса, длина тела и окружность грудной клетки, изменение которых зависит от многих факторов, в том числе и пола. Однако количественных данных в соответствии со спектром указанных критериев для разнополоых куриных зародышей на протяжении инкубации недостаточно, а для эмбрионов кросса «Родонит 3» вообще отсутствуют. Это послужило основанием для проведения исследований массы, длины и окружности грудной клетки в процессе инкубации эмбрионов разного пола указанного кросса, результаты которых отражены в таблицах 6, 7 и 8 соответственно.

Приведенные в таблице 6 результаты показывают, что средние значения абсолютной массы тела в зависимости от пола куриных эмбрионов на все сутки инкубации достоверно отличаются. При сравнении каждой однополой группы эмбрионов, с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий, значения массы имеют достоверные отличия на отдельные этапы развития. Установлено, что с 8-х по 19-е сутки инкубации во всех трех группах куриных эмбрионов (эмбрионов-самцов, эмбрионов-самок, без учета половых различий) масса тела достоверно возрастает, а ее динамика имеет линейный характер.

Так, у эмбрионов-самцов с $0,91 \pm 0,011$ г до $28,06 \pm 0,014$ г, у эмбрионов женского пола с $0,85 \pm 0,005$ г до $27,55 \pm 0,003$ г, у эмбрионов в группе без учета половых различий с $0,86 \pm 0,02$ г до $27,69 \pm 0,07$ г.

В период с восьмых по девятнадцатые сутки развития выявлены достоверные различия при ($P \leq 0,05$) абсолютной массы тела между мужскими эмбрионами и

женскими. При этом на все исследуемые сутки инкубации отмечено превосходство массы эмбрионов-самцов по сравнению с эмбрионами-самками.

Таблица 6 - Масса тела куриных эмбрионов-самцов и самок в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета пола в процессе инкубации ($M \pm m$)

Сутки инкубации	Масса тела, г		
	Куриные эмбрионы- ♂, n=60	Куриные эмбрионы - ♀, n=60	Группа куриных эмбрионов, сформированная без учета половых различий, n=60
8	0,91±0,011 ^{▲■}	0,85±0,005	0,86±0,02
9	1,37±0,002* ^{▲■}	1,22±0,002* [■]	1,31±0,01*
10	1,98±0,003* [▲]	1,85±0,002* [■]	2,01±0,02*
11	2,98±0,004* [▲]	2,83±0,002* [■]	2,99±0,06*
12	4,53±0,003* ^{▲■}	4,35±0,003*	4,39±0,07*
13	6,45±0,004* ^{▲■}	5,99±0,014* [■]	6,63±0,06*
14	8,65±0,002* ^{▲■}	8,23±0,002*	8,31±0,07*
15	10,85±0,002* [▲]	10,11±0,005* [■]	10,82±0,07*
16	14,24±0,004* ^{▲■}	13,99±0,006* [■]	14,64±0,06*
17	17,99±0,007* ^{▲■}	17,32±0,005* [■]	18,49±0,07*
18	23,06±0,002* ^{▲■}	22,87±0,003* [■]	23,31±0,06*
19	28,06±0,014* ^{▲■}	27,55±0,003* [■]	27,69±0,07*

n - количество эмбрионов на каждые исследуемые сутки инкубации;

* ($P \leq 0,05$) – достоверная разница в сравнении с предыдущими сутками инкубации;

▲ ($P \leq 0,05$) – достоверная разница при сравнении двух разнополых групп КЭ;

■ ($P \leq 0,05$) – достоверная разница групп противоположного пола в сравнении с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

При сравнении массы тела в процессе развития куриных эмбрионов противоположного пола с одноименным показателем в группе КЭ, сформированной без учета пола, достоверные различия зарегистрированы на все сутки инкубации за исключением 10-, 11-, 15-х в группе эмбрионов мужского пола и 8-, 12-, 14-х суток инкубации в группе зародышей женского пола.

Следует отметить минимальный разлет стандартного отклонения средней (m) на каждые сутки инкубации в группах разнополых куриных эмбрионов по сравнению с эмбрионами в группе без учета половых различий.

Анализируя данные представленные в таблице 7, можно заключить, что длина тела в группах куриных эмбрионов (эмбрионы-♂, эмбрионы -♀) достоверно отличается с большим преобладанием показателя в группе мужских эмбрионов на всех этапах пренатального онтогенеза, когда проводились исследования.

При сравнении каждой однополой группы эмбрионов, с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий, значения длины достоверно отличаются на отдельные этапы развития.

Таблица 7 - Длина тела куриных эмбрионов противоположного пола в сравнении с группой эмбрионов без учета половых различий в процессе инкубации ($M \pm m$)

Сутки инкубации	Длина тела, см		
	Куриные эмбрионы - ♂, n=60	Куриные эмбрионы - ♀, n=60	Группа куриных эмбрионов, сформированная без учета половых различий, n=60
8	2,23±0,02 [▲]	2,17±0,01	2,21±0,04
9	2,61±0,002* ^{▲■}	2,38±0,002* [■]	2,53±0,02*
10	3,21±0,004* ^{▲■}	2,98±0,003* [■]	3,39±0,03*
11	3,59±0,002* ^{▲■}	3,38±0,002* [■]	3,74±0,05*
12	4,83±0,002* [▲]	4,22±0,002* [■]	4,71±0,09*
13	5,43±0,002* [▲]	5,12±0,002* [■]	5,31±0,07*
14	5,74±0,002* [▲]	5,53±0,002* [■]	5,69±0,06*
15	6,63±0,002* ^{▲■}	6,14±0,002* [■]	6,42±0,05*
16	7,28±0,002* [▲]	7,03±0,003* [■]	7,24±0,06*
17	7,54±0,003* [▲]	7,34±0,006* [■]	7,57±0,06*
18	7,91±0,002* [▲]	7,65±0,004* [■]	7,83±0,08*
19	8,39±0,006* ^{▲■}	8,15±0,001*	8,18±0,09*

n - количество эмбрионов на каждые исследуемые сутки инкубации;

* ($P \leq 0,05$) – достоверная разница в сравнении с предыдущими сутками инкубации;

▲ ($P \leq 0,05$) – достоверная разница при сравнении двух разнополой групп КЭ;

■ ($P \leq 0,05$) – достоверная разница групп противоположного пола в сравнении с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

Длина тела, также как и масса у мужских, женских и эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий начиная с 8-х суток развития, постепенно увеличивается, достигая на 19-е сутки максимального значения – 8,39±0,006 см; 8,15±0,001 см; 8,18±0,09 см соответственно.

Минимальное значение длины тела у трех групп куриных эмбрионов приходится на 8-е сутки развития и составляет для эмбрионов-самцов - 2,23±0,02 см, для эмбрионов-самок - 2,17±0,01 см и эмбрионов в группе без учета половых различий - 2,21±0,04 см.

На протяжении инкубации установлено, что не только масса тела, но и длина тела у мужских куриных эмбрионов от женских достоверно отличается.

При сравнении длины тела эмбрионов обеих групп разных по половому признаку с группой КЭ, сформированной без учета половых различий, зафиксированы достоверные различия на 9-, 10-, 11-, 15-, 19-е сутки в группе эмбрионов мужского пола и на 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17- 18-е развития женских эмбрионов.

Справедливо отметить, что в группе, где учет пола не производился, разлет статистических различий шире в отличие от таковых в группе разнополых куриных эмбрионов. Данный факт указывает на то, что именно учет пола как методологический подход обеспечивает минимальный диапазон стандартного отклонения от средней (m).

Ещё одним важным критерием, без которого невозможно провести оценку гармоничности физического развития организма считается окружность грудной клетки (ОГК) (таблица 8).

Таблица 8 - Окружность грудной клетки раздельнополых куриных эмбрионов в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий в процессе инкубации ($M \pm m$)

Сутки инкубации	Окружность грудной клетки, см		
	Куриные эмбрионы - ♂, n=60	Куриные эмбрионы - ♀, n=60	Группа куриных эмбрионов, сформированная без учета половых различий, n=60
8	2,24±0,008 [▲]	2,18±0,008	2,23±0,03
9	2,75±0,002* ^{▲■}	2,69±0,002* [■]	2,89±0,02*
10	3,25±0,005* ^{▲■}	3,05±0,001* [■]	3,18±0,02*
11	3,43±0,002* ^{▲■}	3,26±0,003* [■]	3,36±0,02*
12	3,99±0,005* ^{▲■}	3,67±0,011* [■]	3,91±0,02*
13	4,41±0,011* ^{▲■}	4,18±0,011*	4,21±0,05*
14	4,49±0,006* ^{▲■}	4,30±0,003*	4,24±0,06
15	4,76±0,041* ^{▲■}	4,46±0,004*	4,41±0,04*
16	5,31±0,001* ^{▲■}	5,17±0,002* [■]	5,23±0,02*
17	6,12±0,014* ^{▲■}	5,96±0,009* [■]	6,17±0,02*
18	6,62±0,008* ^{▲■}	6,33±0,012* [■]	6,54±0,02*
19	6,95±0,008* ^{▲■}	6,73±0,011* [■]	6,82±0,02*

n - количество эмбрионов на каждые исследуемые сутки инкубации;

* ($P \leq 0,05$) – достоверная разница в сравнении с предыдущими сутками инкубации;

[▲] ($P \leq 0,05$) – достоверная разница при сравнении двух разнополых групп КЭ;

[■] ($P \leq 0,05$) – достоверная разница групп противоположного пола в сравнении с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

Выявлено, что значения показателя в трех группах КЭ с 8-х по 19-е сроки развития отличаются и являются пиками минимума и максимума, а также достоверно увеличиваются у эмбрионов - самцов с $2,24 \pm 0,008$ см до $6,95 \pm 0,008$ см; эмбрионов - самок с $2,18 \pm 0,008$ см до $6,73 \pm 0,011$ см; в группе куриных эмбрионов, сформированной без учета половых различий с $2,23 \pm 0,03$ см до $6,82 \pm 0,02$ см. При этом на каждые сутки исследования в пренатальном онтогенезе отмечено превосходство ОГК у эмбрионов-самцов по сравнению с эмбрионами-самками.

Из результатов, представленных в таблице 8 видно, что в трех группах куриных эмбрионов окружность грудной клетки достоверно отличается по сравнению с предыдущими сутками развития.

Так же, как и два описанных выше критерия (масса и длина тела), окружность грудной клетки в группах обоего пола достоверно отличается на 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, и 19-е дни инкубации, что указывает на роль пола как определяющего фактора обеспечивающего анатомическое и физиологическое отличие эмбрионов.

Достоверные различия ОГК зарегистрированы на все исследуемые сутки инкубации, кроме 8-х в мужской группе эмбрионов и на 9-, 10-, 11-, 12-, 16-, 17-, 18-, 19-е сутки у женских эмбрионов при сравнении критерия каждой группы обоего пола с группой КЭ, сформированной без учета половых различий. Кроме того, отмечен минимальный размах статистических различий в группах противоположного пола по сравнению с группой без учета пола зародышей.

Полученные значения морфометрических показателей позволяют провести индексацию физического развития разнополых куриных эмбрионов в процессе инкубации с помощью Кетле I, Кетле II и ИГМР в сравнении с эмбрионами в группе без учета половой дифференцировки. Индексы физического развития в группе куриных эмбрионов, сформированной без учета половых различий полученные в соавторстве [147] представлены в таблице 9.

На протяжении инкубации зафиксировано, что индексы физического развития во всех трех группах куриных эмбрионов отличаются и характеризуются конкретными числовыми значениями.

Таблица 9 - Индексы физического развития у куриных эмбрионов обоего пола в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий

Сутки инкубации	КЭ - ♀, n=60; КЭ - ♂, n=60	Кетле I	Кетле I в группе КЭ, сформированной без учета пола, n=60	Кетле II	Кетле II в группе КЭ, сформированной без учета пола, n=60	ИГМР	ИГМР в группе КЭ, сформированной без учета пола, n=60
8	♂	0,418±0,001 ^{▲■}	0,336±0,014	0,178±0,001 [■]	0,165±0,005	104,7±0,09	104,7±0,11
	♀	0,384 ±0,002 [■]		0,193±0,029		104,9±0,18	
9	♂	0,520±0,001 ^{*▲■}	0,419±0,013 ^{***}	0,199±0,001 [*]	0,208±0,005 [*]	102,2±0,27 [*]	101,9±0,34 ^{***}
	♀	0,507±0,001 ^{**■}		0,233±0,025		101,6±0,19 ^{**}	
10	♂	0,620±0,002 ^{*▲■}	0,581±0,016 ^{***}	0,185±0,0006 ^{*▲■}	0,171 ±0,002 [*]	103,1±0,25 [*]	103,2±0,49 ^{***}
	♀	0,610±0,002 ^{**}		0,204±0,0006 [■]		103,3±0,21 ^{**}	
11	♂	0,828±0,002 ^{*▲}	0,842±0,022 ^{***}	0,220±0,0009 ^{*▲■}	0,246±0,006 [*]	103,9±0,27 [*]	103,7±0,52
	♀	0,819±0,002 ^{**}		0,238±0,0008 ^{**}		101,6±1,36	
12	♂	0,959±0,007 ^{*▲}	0,953±0,020 ^{***}	0,191±0,001 ^{*▲■}	0,206±0,007 [*]	101,4±0,22 [*]	101,4±0,74 ^{***}
	♀	1,015±0,001 ^{**■}		0,237±0,001 [■]		101,2±0,21	
13	♂	1,181±0,0009 ^{*▲■}	1,134±0,012 ^{***}	0,213±0,001 ^{*▲■}	0,236±0,008 [*]	100,1±1,34	100,9±1,52
	♀	1,171±0,001 ^{**■}		0,226±0,0007 ^{**}		101,4±0,18	
14	♂	1,509±0,001 ^{*▲■}	1,408±0,018 ^{***}	0,256±0,0008 ^{*▲■}	0,240±0,007	99,54±0,56	99,56±0,91
	♀	1,487±0,001 ^{**■}		0,270±0,0008 ^{**■}		99,26±0,46 ^{**}	
15	♂	1,629±0,001 ^{*▲■}	1,568±0,014 ^{***}	0,243±0,0007 ^{*▲}	0,299±0,038	99,25±0,54	99,19±0,81
	♀	1,635±0,001 ^{**■}		0,264±0,0006 ^{**}		99,17±0,54	
16	♂	1,938±0,012 ^{*▲■}	2,006±0,021 ^{***}	0,265±0,0007 ^{*▲■}	0,287±0,006	99,83±0,64	99,99±1,106
	♀	1,978±0,001 ^{**}		0,279±0,0008 ^{**}		99,09±0,66	
17	♂	2,375±0,001 ^{*▲■}	2,289±0,016 ^{***}	0,309±0,0007 ^{*▲}	0,302±0,007	100,9±0,17	99,86±1,178
	♀	2,354±0,001 ^{**■}		0,323±0,002 ^{**■}		99,59±0,44	

18	♂	2,898±0,012* [▲]	2,879±0,035***	0,365±0,0006* [▲]	0,368±0,007*	99,60±0,45*	99,54±1,039
	♀	2,979±0,001** [■]		0,382±0,0009** [■]		99,42±0,46	
19	♂	3,338±0,001* ^{▲■}	3,186±0,045***	0,391±0,0009* [▲]	0,404±0,007*	99,70±0,54	99,31±1,631
	♀	3,377±0,009** [■]		0,415±0,001**		99,04±0,53	

n - количество эмбрионов на каждые исследуемые сутки инкубации;

* ($P \leq 0,05$) – достоверная разница у эмбрионов-самцов в сравнении с предыдущими сутками инкубации;

** ($P \leq 0,05$) – достоверная разница у эмбрионов-самок в сравнении с предыдущими сутками инкубации;

*** ($P \leq 0,05$) – достоверная разница в группе КЭ, сформированной без учета пола в сравнении с предыдущими сутками инкубации;

[▲] ($P \leq 0,05$) – достоверная разница при сравнении двух разнополовых групп КЭ;

[■] ($P \leq 0,05$) – достоверная разница групп противоположного пола в сравнении с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

В процессе анализа Кетле I, отмечено закономерное его возрастание с восьмых по девятнадцатые сроки инкубации в трех группах куриных зародышей. При этом на указанный период пренатального онтогенеза приходится минимальное значение индекса (8-е сутки), которое в группах мужских эмбрионов составляет $0,418 \pm 0,001$, в женской - $0,384 \pm 0,002$, без учета пола - $0,336 \pm 0,014$, и максимальное значение (19-е сутки) $3,338 \pm 0,001$ - у эмбрионов-самцов, $3,377 \pm 0,009$ - у эмбрионов-самок, у эмбрионов в группе, сформированной без учета половых различий - $3,186 \pm 0,045$. В то же время в трех группах куриных эмбрионов индекс Кетле I в сравнении с предыдущими сутками развития достоверно отличается. Кроме того, рассматривая средние значения индекса Кетле I в группах противоположного пола, установлены достоверные различия на каждые исследуемые сутки инкубации, что подтверждает различие пропорций мужских эмбрионов кур от женских.

В отличие от предыдущего показателя, индекс Кетле II не имеет четкой закономерности посуточной динамики в каждой из изучаемых групп куриных зародышей. Так, в группе мужских эмбрионов с 8-х по 9-е; с 10-х по 11-е; с 12-х по 14-е; с 15-х по 19-е сутки развития значения индекса увеличиваются, в остальные периоды пренатального онтогенеза Кетле II снижается. В женской группе куриных зародышей возрастание индекса приходится на те же сутки развития, описанные у эмбрионов-самцов, за исключением периодов снижения показателя с 9-х по 10-е; с 11-х по 13-е; с 14-х по 15-е дни инкубации.

При сравнении Кетле II между куриными эмбрионами-самцами и эмбрионами-самками достоверные различия отмечены с середины предплодного периода пренатального онтогенеза (10-е сутки) и до вылупления (19-е сутки).

Касательно индекса Кетле II в трех группах куриных эмбрионов, на каждые исследуемые сутки инкубации, в сравнении с предыдущими сутками развития, достоверные различия зарегистрированы, в мужской группе эмбрионов на все исследуемые сутки развития, в женской группе и сформированной без учета пола зародышей в отдельные сроки инкубации: 11-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-е сутки и 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 18- и 19-е сутки инкубации соответственно.

Результаты по расчету индекса гармоничного морфологического развития, полученные в соавторстве [24] свидетельствуют о том, что данный показатель физического развития в зависимости от пола куриных зародышей и в группе эмбрионов без учета половых различий, на все исследуемые сутки инкубации изменяется недостоверно. При этом значения индекса в трех группах зародышей приближаются к 100, что согласуются со значениями нормы установленными Черниковым С.В. [167].

Если рассматривать значения индекса у эмбрионов противоположного пола и в группе без учета половых различий в отдельности по суткам, то в начале предплодного периода развития КЭ (8, 9, 10, 11, 12-е) обнаружены большие отклонения от сотни, что можно рассматривать как норму, так как об истинном уровне гармонии в это время рассуждать сложно. С конца предплодного периода и до вывода цыпленка наблюдается выравнивание значения индекса приближающегося к 100, то есть к периоду вылупления эмбрионы приобретают видоспецифическую форму и соответственно больший уровень гармоничности. Следовательно, при нормальных условиях инкубации, никаких изменений гармоничности развития эмбрионов кур в зависимости от пола не наблюдается.

Таким образом, установлено, что разнополые куриные эмбрионы на протяжении инкубации развиваются по-разному, о чем свидетельствует полученные результаты оценки массы, линейных размеров тела и индексов физического развития. При этом у эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок выявлены общие черты, проявляющиеся в возрастании с 8-х по 19-е сутки инкубации массы, длины, окружности грудной клетки и индекса Кетле I, значения которых на протяжении эксперимента достоверно отличаются между группами. Еще одной общей чертой является то, что в группах обоего пола зафиксирован минимальный разрыв статистических различий при исследовании всех изученных критериев развития по сравнению с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий.

Имеются и особенности в развитии раздельнополых КЭ, которые отражены в разнонаправленном характере посуточного прироста Кетле II для эмбрионов-самцов и самок. Также установлено, что ИГМР достоверно не изменяется на протяжении эксперимента в двух разнополых группах зародышей, что свидетельст-

вует об одинаковом уровне гармоничности мужских и женских куриных эмбрионов.

При сравнении изучаемых критериев каждой однополой группы эмбрионов с одноименными критериями в группе эмбрионов, сформированной без учета пола, установлено, что на большинство суток исследования имеющиеся различия достоверны. Исключение составляет ИГМР, который в каждой однополой группе эмбрионов на все сутки исследования достоверно не отличается от значений этого критерия в группе эмбрионов, сформированной без учета пола.

3.4. Морфометрические показатели осевого скелета и костей грудной и тазовой конечностей у куриных эмбрионов в зависимости от половой принадлежности

Известно, что половая дифференцировка куриного эмбриона контролируется стероидными гормонами [146], и синхронно совпадает с минерализацией костей скелета [159]. Эти сведения обусловили интерес к изучению у разнополох куриных эмбрионов динамики морфометрических показателей длин костей скелета на протяжении инкубации. Для эмбрионов-самцов, эмбрионов-самок и эмбрионов в группе без учета половых различий самостоятельно и в соавторстве [19, 23] определены средние значения длин осевого и периферического скелета (плечевая, лучевая, локтевая, пястная третья кость, бедренная, большеберцово-заплюсневая, цевка) на 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки инкубации. Морфометрию осуществляли на цельных и фрагментированных тотальных препаратах, образцы которых представлены на рисунках 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19.

При этом между абсолютными величинами длины осевого скелета и костей периферического скелета (таблица 10) разнополох эмбрионов, в онтогенезе выявлены достоверные, незакономерно изменчивые отличия, которые можно даже визуально наблюдать во внешнем строении скелета у разнополох птичьих эмбрионов (рисунок 19).

В группах эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок диапазон статистических различий (m) для всех изученных костей скелета на каждые сутки инкубации ниже, по сравнению с эмбрионами в группе без учета половых различий.



Рисунок 11 - Общий вид тотального препарата скелета грудной конечности КЭ-самца на 15-е сутки инкубации. Окраска ализарином красным.



Рисунок 12 – Тотальный препарат плечевой кости на 15-е сутки КЭ-самца. Окраска ализарином красным, 10×.



Рисунок 13 – Тотальные препараты сверху- локтевой и снизу- лучевой костей на 15-е сутки КЭ-самца. Окраска ализарином красным, 10×.



Рисунок 14– Тотальный препарат пястной третьей кости на 15-е сутки КЭ-самца. Окраска ализарином красным, 10×.

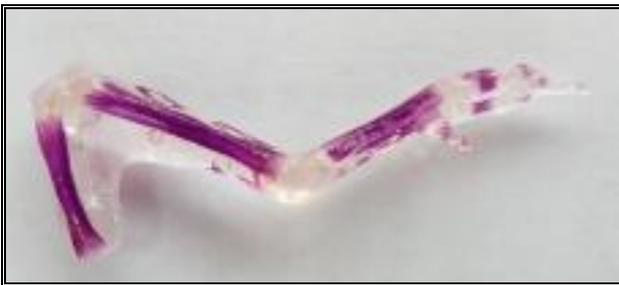


Рисунок 15 - Общий вид тотального препарата скелета свободной тазовой конечности куриного эмбриона-самки на 15-е сутки инкубации. Окраска ализарином красным.



Рисунок 16 – Тотальный препарат бедренной кости на 15-е сутки куриного эмбриона-самки. Окраска ализарином красным, 10×.



Рисунок 17 – Тотальный препарат большеберцово-заплюсневой кости на 15-е сутки куриного эмбриона-самки. Окраска ализарином красным, 10×.



Рисунок 18 – Тотальный препарат цевки на 15-е сутки куриного эмбриона-самки. Окраска ализарином красным, 10×.



Рисунок 19 - Тотальные препараты скелета куриного эмбриона-самца (слева), эмбриона-самки (справа) на 16-е сутки инкубации

При сравнении абсолютных величин размеров изучаемых костей разнополых куриных эмбрионов с аналогичными показателями костей в группе эмбрионов, пол которых не дифференцировался, на каждые сутки инкубации установлены в разной степени выраженные различия. Так, достоверные отличия абсолютной длины осевого скелета и большеберцово-заплюсневой кости в группах эмбрионов разного пола в сравнении с одноименными критериями в группе эмбрионов, сформированной без учета половых различий, зафиксированы на все сутки инкубации, за исключением длины осевого скелета на 15-е сутки инкубации в группе женских эмбрионов, где различия недостоверны.

Сравнивая у разнополых эмбрионов абсолютные величины длины костей - плечевой, лучевой, локтевой и пястной третьей, с величинами указанных костей

Таблица 10 - Средние значения линейных размеров костей грудной и тазовой конечностей разнополых куриных эмбрионов в сравнении с группой КЭ без учета половых различий в процессе развития

Сутки развития	Группы КЭ: эмбрионы ♀; эмбрионы ♂; без учета пола, n=50	L, осевого скелета, мм	L, плечевой кости, мм	L, лучевой кости, мм	L, локтевой кости, мм	L, пястной третьей кос- ти, мм	L, бедренной кости, мм	L, больше- берцово- заплюсневой кости, мм	L, цевки, мм
12	♀	81,13±0,331* [■]	4,04±0,04*	3,91±0,07*	3,31±0,05*	2,78±0,097* [■]	5,92±0,142*	8,06±0,042* [■]	5,37±0,08* [■]
	♂	86,21±0,371 [■]	4,53±0,03 [■]	4,43±0,03 [■]	4,08±0,04 [■]	3,71±0,03 [■]	6,57±0,047 [■]	9,44±0,03 [■]	6,45±0,05 [■]
	КЭ в группе без учета пола	87,93±0,665	3,97±0,11	4,08±0,11	3,58±0,16	3,11±0,10	6,05±0,13	8,99±0,19	6,06±0,17
13	♀	83,33±0,327* [■]	4,35±0,09* [■]	4,19±0,04*	3,65±0,03* [■]	3,3±0,03* [■]	6,49±0,13* [■]	8,73±0,14* [■]	6,18±0,02* [■]
	♂	92,63±0,415 [■]	5,03±0,14	4,73±0,03 [■]	4,45±0,03	4,31±0,02 [■]	7,15±0,04 [■]	11,05±0,24 [■]	7,05±0,03 [■]
	КЭ в группе без учета пола	88,05±0,568	4,71±0,11	4,32±0,13	4,06±0,14	4,09±0,10	6,91±0,11	9,74±0,13	6,77±0,11
14	♀	87,07±0,44* [■]	4,88±0,05*	4,63±0,06*	4,23±0,03* [■]	4,21±0,03* [■]	6,68±0,08* [■]	9,7±0,05* [■]	6,52±0,02* [■]
	♂	100,6±0,432 [■]	5,78±0,11 [■]	5,55±0,03	5,16±0,04	5,1±0,02 [■]	7,61±0,14	13,06±0,05 [■]	7,41±0,03
	КЭ в группе без учета пола	90,95±0,201	5,09±0,16	5,26±0,13	4,93±0,18	4,53±0,12	7,30±0,12	12,53±0,11	7,05±0,21
15	♀	96,11±0,457*	5,61±0,03* [■]	5,43±0,03* [■]	5,1±0,03* [■]	5,03±0,03* [■]	7,5±0,09* [■]	12,63±0,07* [■]	7,31±0,04* [■]
	♂	102,2±0,818 [■]	6,9±0,03 [■]	6,73±0,03 [■]	6,24±0,03	5,77±0,033	9,2±0,02 [■]	15,12±0,10 [■]	8,7±0,04
	КЭ в группе без учета пола	96,51±0,097	6,36±0,13	5,99±0,13	6,23±0,11	5,63±0,13	8,18±0,13	13,16±0,13	8,66±0,15
16	♀	101,9±0,413* [■]	6,85±0,05*	6,65±0,03* [■]	6,17±0,03* [■]	5,52±0,04* [■]	9,14±0,03* [■]	14,91±0,04* [■]	8,6±0,02* [■]
	♂	110,3±0,303 [■]	7,64±0,03 [■]	7,44±0,02	6,9±0,02 [■]	6,23±0,03 [■]	11,4±0,15 [■]	16,4±0,02 [■]	9,24±0,02
	КЭ в группе без учета пола	103,2±0,112	7,09±0,19	7,11±0,21	6,76±0,07	5,85±0,10	10,74±0,13	15,67±0,11	8,95±0,15
17	♀	109,4±0,309* [■]	7,4±0,04* [■]	7,31±0,04* [■]	6,87±0,03* [■]	6,15±0,05*	10,99±0,25* [■]	16,11±0,04* [■]	9,2±0,24* [■]
	♂	117,4±0,341 [■]	8,45±0,03	8,37±0,04	8,07±0,03 [■]	7,32±0,04 [■]	14,12±0,04 [■]	17,65±0,03 [■]	10,5±0,16 [■]
	КЭ в группе без учета пола	113,5±0,166	8,24±0,15	8,17±0,16	7,62±0,21	6,21±0,10	13,11±0,23	17,96±0,12	10,02±0,12

Продолжение таблицы 10

18	♀	116,4±0,319* [■]	8,21±0,03* [■]	8,13±0,03* [■]	7,77±0,03* [■]	6,6±0,03* [■]	13,23±0,042* [■]	17,44±0,07* [■]	9,8±0,04* [■]
	♂	124,3±0,396 [■]	9,56±0,03	9,4±0,04	8,89±0,03 [■]	8,14±0,03 [■]	14,75±0,034 [■]	19,8±0,033 [■]	13,26±0,03 [■]
	КЭ в группе без учета пола	118,3±0,110	9,38±0,16	9,39±0,12	8,19±0,14	6,83±0,10	13,99±0,21	18,35±0,11	12,11±0,16
19	♀	119,4±0,319* [■]	9,22±0,03* [■]	9,04±0,04* [■]	8,72±0,03* [■]	7,86±0,04* [■]	14,65±0,034* [■]	19,63±0,02* [■]	13,42±0,17* [■]
	♂	129,1±0,278 [■]	13,3±0,16	12,97±0,23 [■]	11,4±0,06 [■]	9,31±0,14 [■]	17,15±0,034 [■]	24,55±0,03 [■]	16,42±0,18 [■]
	КЭ в группе без учета пола	127,8±0,090	12,69±0,15	12,01±0,13	10,2±0,19	8,51±0,11	16,37±0,14	21,05±0,11	14,12±0,25

n - количество эмбрионов на каждые исследуемые сутки инкубации;

* ($P \leq 0,05$) – достоверная разница при сравнении двух разнополых групп КЭ;

■ ($P \leq 0,05$) – достоверная разница групп обоего пола в сравнении с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

в группе эмбрионов без учета пола, установили, что для мужских и женских эмбрионов достоверные различия отмечены в разные сутки инкубации. Так, для плечевой кости в женской группе эмбрионов на 13-, 15-, 17-, 18- и 19-е сутки, в мужской группе эмбрионов на 12-, 14-, 15- и 16-е дни инкубации, для лучевой кости у эмбрионов-самок на 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки, у эмбрионов-самцов на 12-, 13-, 15- и на 19-е сутки инкубации. Касательно локтевой кости, достоверные различия от величин, отмеченных в группе эмбрионов, сформированной без учета пола, зафиксированы в группе женских эмбрионов на все сутки развития, за исключением 12-х. В мужской - на 12-е, и с 16-х по 19-е сутки инкубации.

Абсолютная длина пястной третьей кости у эмбрионов-самок и эмбрионов-самцов в сравнении с длиной одноименной кости у эмбрионов в группе без учета половых различий достоверно отличается на все изученные сутки инкубации, кроме 15-х суток в мужской группе КЭ, и 17-х суток в женской, где различия недостоверны.

При оценке абсолютной длины бедренной кости и цевки в группах обоего пола, в сравнении с аналогичными критериями в группе эмбрионов, сформированной без учета половых различий, установлены достоверные различия на все изучаемые сутки инкубации. Исключение составляет абсолютная длина бедренной кости на 12-е сутки у эмбрионов-самок и на 14-е сутки у эмбрионов-самцов, а также абсолютная длина цевки на 14-, 15- и 16-е сутки у эмбрионов-самцов, где различия недостоверны в сравнении с длиной одноименных костей у эмбрионов в группе, сформированной без учета половых различий.

Оценивая абсолютную разницу между длиной осевого скелета и костей периферического скелета у куриных эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок, выявили, что она не постоянна и характеризуется числовыми максимумами и минимумами в разные сутки инкубации (таблица 11).

Так, числовые минимумы абсолютной разницы длины осевого скелета, плечевой, лучевой, бедренной и большеберцово-заплюсневой кости между разнополами КЭ установлены на 12-е сутки инкубации, и составили 5,08; 0,49; 0,52; 0,65 и 1,38 мм соответственно.

Пики минимума абсолютной разницы длины локтевой кости, пястной третьей кости и цевки совпали на 16-е сутки инкубации (0,73; 0,71 и 0,64 мм соответственно).

Таблица 11 - Абсолютная разница между средними значениями линейных размеров костей в онтогенезе куриных эмбрионов, разделенных по полу

Сутки инкубации	Абсолютная разница костей, мм							
	Осевого скелета	Свободной грудной конечности				Свободной тазовой конечности		
		Плечевой	Лучевой	Локтевой	Пястной третьей	Бедренной	Большеберцовой	Цевки
12	5,08	0,49	0,52	0,77	0,93	0,65	1,38	1,08
13	9,3	0,68	0,54	0,8	1,01	0,66	2,32	0,87
14	13,53	0,9	0,92	0,93	0,89	0,93	3,36	0,89
15	6,09	1,29	1,3	1,14	0,74	1,7	2,49	1,39
16	8,4	0,79	0,79	0,73	0,71	2,26	1,49	0,64
17	8,0	1,05	1,06	1,2	1,17	3,13	1,54	1,3
18	7,9	1,35	1,27	1,12	1,54	1,52	2,36	3,46
19	9,7	4,08	3,93	2,68	1,45	2,5	4,92	3,0

Числовой максимум абсолютной разницы длины осевого скелета между эмбрионами-♂ и эмбрионами-♀ составил 13,53 мм, который приходится на начало плодного периода - 14-е сутки развития. В конце плодного периода пренатального онтогенеза (19-й день инкубации) у разнополых эмбрионов зафиксированы числовые пики абсолютной разницы длины трех костей (плечевой, локтевой, лучевой), относящихся к свободной грудной конечности и одной кости (большеберцово-заплюсневой), принадлежащей к скелету тазовой конечности. На 17-е сутки отмечен числовой максимум абсолютной разницы длины бедренной кости (3,13 мм). А на 18-е сутки пик максимума абсолютной разницы зарегистрирован для длины костей цевки (3,46) и пястной третьей кости (1,54).

При анализе критерия относительной разницы длины всех исследуемых костей на каждые изучаемые сутки исследования между эмбрионами разного пола для различных костей на протяжении развития не одинаков, незакономерно изменчив и представлен его числовыми максимумами и минимумами. При этом относительный критерий является ярким подтверждением преобладания всех указанных костей самцов, по сравнению с костями самок.

Для наглядности сравнительная динамика критерия относительной разницы представлена в виде графика.

Относительная разница длины осевого скелета и большеберцово-заплюсневой кости у эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок представлена на рисунке 20.

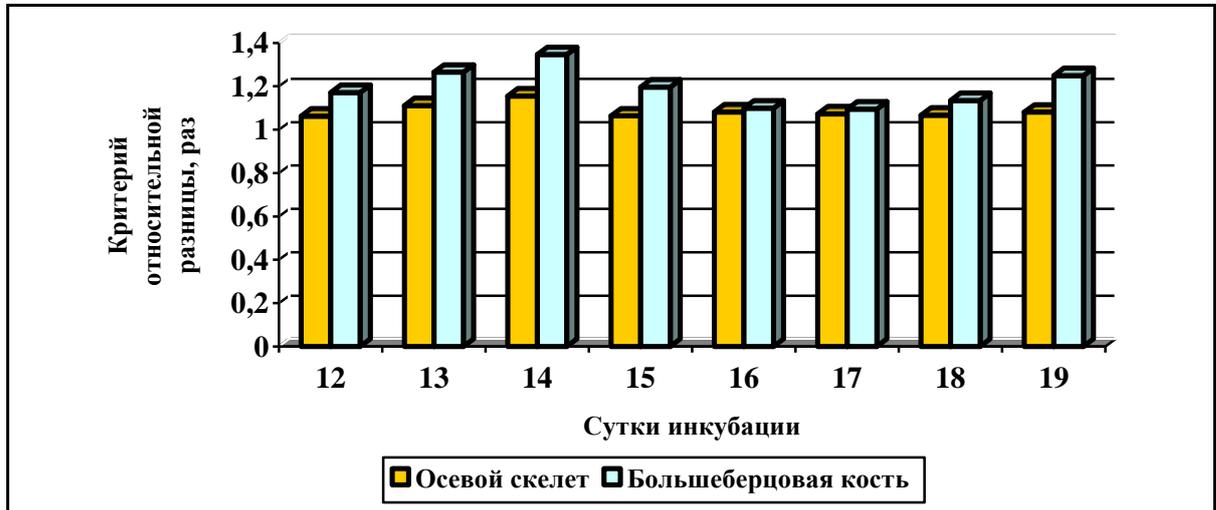


Рисунок 20 - Относительная разница длины осевого скелета и большеберцово-заплюсневой костей у куриных эмбрионов разного пола в процессе развития

Для осевого скелета и большеберцово-заплюсневой кости относительное различие длины этих костей у самцов по сравнению с самками закономерно возрастает с 12-х по 14-е сутки развития. При этом числовые максимумы (в 1,155; 1,346 раза соответственно) разницы показателя совпали, и приходятся на 14-е сутки развития.

Для костей грудной конечности, кроме пястной третьей кости при сравнении разнополых эмбрионов, зафиксировано закономерное нарастание относительной разницы их длины с 12-х по 15-е сутки инкубации (рисунок 21). Следует отметить, совпадение числовых максимумов различия длины указанных костей на 19-е сутки инкубации (в 1,442; 1,434; 1,307 раза соответственно). Оценивая интенсивность относительного различия между мужскими эмбрионами и женскими для пястной третьей кости, выявлена противоположная плечевой, лучевой и локтевой костям тенденция этого параметра (рисунок 22).

При этом числовой максимум относительной разницы приходится на 12-е сутки развития (в 1,334 раза).

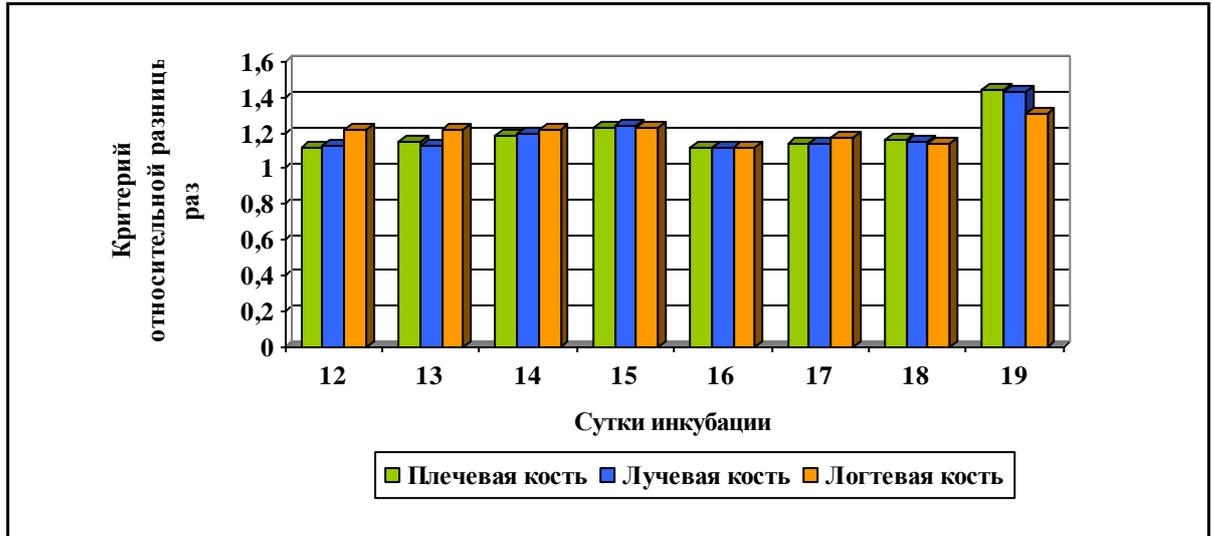


Рисунок 21 - Относительная разница длины костей грудной конечности у разнополох куриных эмбрионов в процессе инкубации

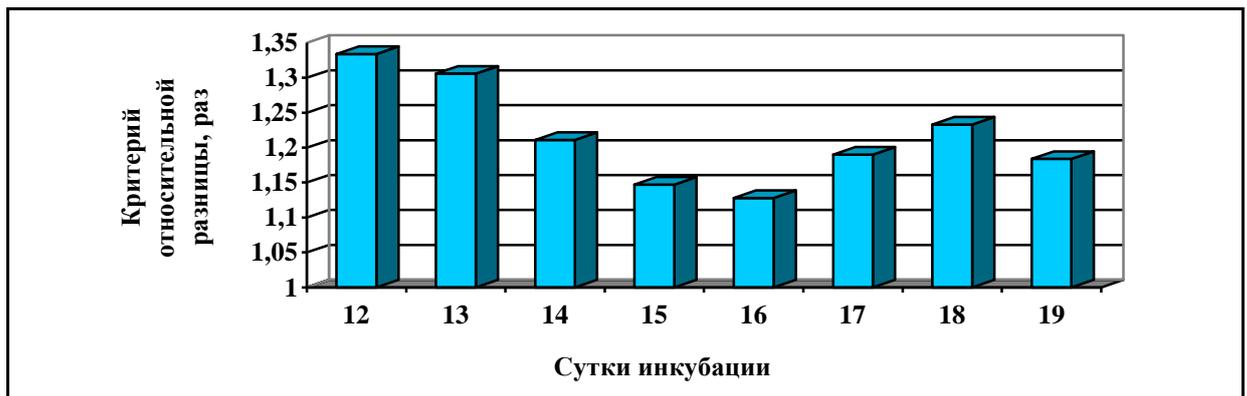


Рисунок 22 - Относительная разница длины пястной третьей кости у КЭ-♂ и КЭ-♀

Относительное различие длины бедренной кости (рисунок 23) куриных эмбрионов-самцов по сравнению с эмбрионами-самками характеризуется его закономерным возрастанием с 12-х по 17-е сутки развития, с максимумом на 17-е сутки инкубации (в 1,284 раза).

При рассмотрении аналогичного критерия (рисунок 24) для длины цевки эмбрионов-самцов по сравнению с эмбрионами-самками, четко зафиксировано не закономерное, волнообразное его изменение на протяжении всего периода исследования.

Числовой максимум (в 1,353 раза) между величиной различия у разнополых эмбрионов приходится на конец плодного периода, то есть на 18-е сутки развития.

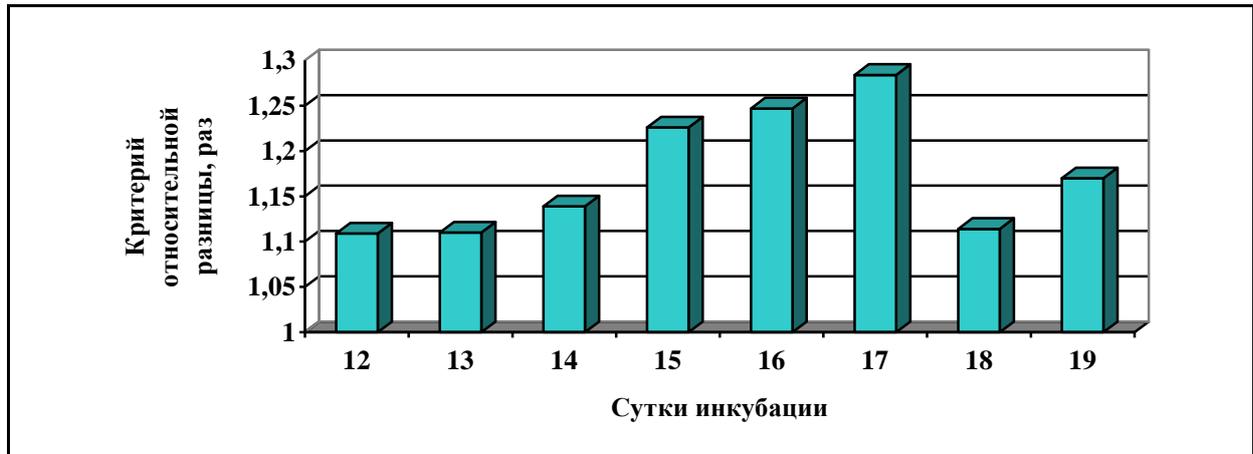


Рисунок 23 - Относительная разница длины бедренной кости у КЭ-♂ и КЭ-♀

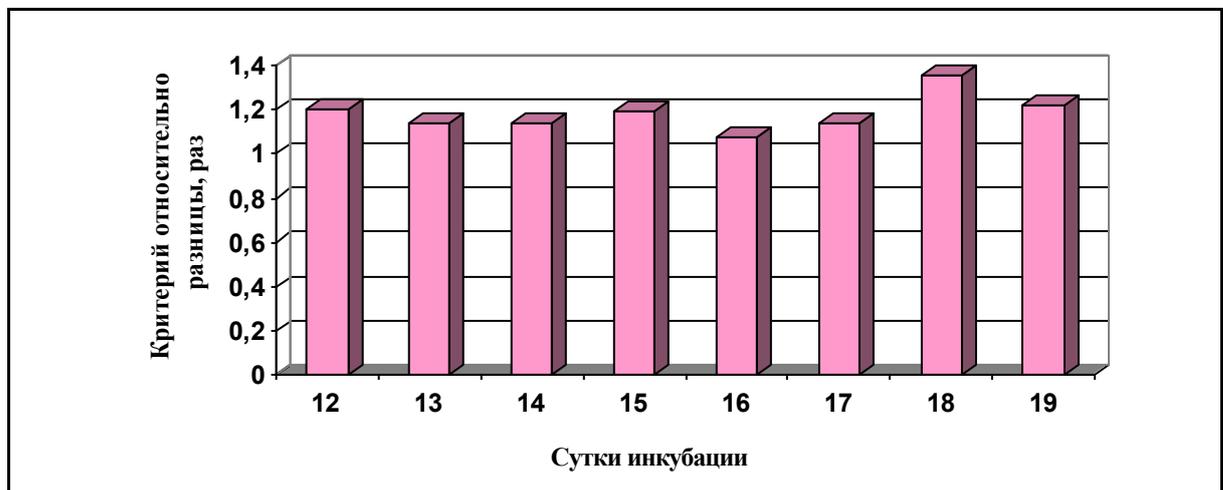


Рисунок 24 - Относительная разница длины цевки у КЭ-♂ и КЭ-♀

Таким образом, результаты исследования разнополых куриных эмбрионов с 12-х по 19-е сутки инкубации свидетельствуют о достоверном отличии длины различных костей осевого и периферического скелета, с абсолютным превышением значений указанных костей скелета у самцов по сравнению с самками на все сутки инкубации.

На каждые исследуемые сутки инкубации установлены в разной степени выраженные различия абсолютных значений длины изученных костей разнополых куриных эмбрионов с аналогичным показателем костей у эмбрионов в группе, сформированной без учета половых различий. Кроме того, на 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки инкубации, зафиксирован минимальный разлет стандартно-

го отклонения от средней (m), для исследованных костей скелета у разнополых эмбрионов, в сравнении с эмбрионами в группе, сформированной без учета половых признаков.

В то же время по всем исследуемым костям динамика абсолютной разницы на всем протяжении исследования неупорядочена. Динамика относительной разницы длины осевого скелета и костей свободной грудной и тазовой конечностей в онтогенезе для разнополых эмбрионов отличается и характеризуется неодновременной сменой периодов возрастания и убывания.

3.5. Динамика уровня апоптоза и альфа-фетопротеина в онтогенезе разнополых куриных эмбрионов

С помощью количественного метода изучения запрограммированной гибели клеток установлено, что она присутствует у разнополых куриных эмбрионов на протяжении всех исследуемых этапов пренатального онтогенеза. Фрагмент исследования уровня апоптоза на 15-е сутки развития эмбрионов-самцов и -самок представлен на рисунках 25 и 26. Установлено, что апоптотический индекс на всех изучаемых сутках развития куриных эмбрионов обоего пола отличается. В соавторстве [20] на все сутки исследования выявлен низкий диапазон значений статистических различий (m) у куриных эмбрионов обоего пола по сравнению с группой эмбрионов, где половые различия не учитывались.

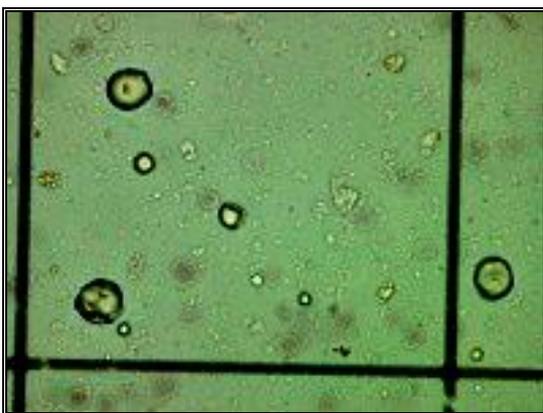


Рисунок 25 - Апоптотические клетки у куриных эмбрионов-♂ на 15-е сутки инкубации. Дифференциальное окрашивание трипановым синим, 400×

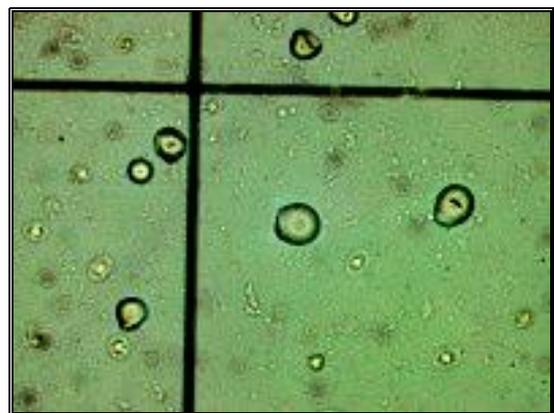


Рисунок 26 - Апоптотические клетки у куриных эмбрионов -♀ на 15-е сутки инкубации. Дифференциальное окрашивание трипановым синим, 400×

В период с 8-х по 19-е сутки инкубации выявлены достоверно отличающиеся значения апоптического индекса между КЭ-♂ и КЭ-♀ (таблица 12).

Таблица 12 - Апоптический индекс у куриных эмбрионов разного пола и эмбрионов в группе, сформированной без учета половых различий в процессе развития (M±m)

Сутки инкубации	Апоптический индекс, %		
	Куриные эмбрионы-♂, n=50	Куриные эмбрионы -♀, n=50	Группа куриных эмбрионов, сформированная без учета половых различий, n=50
8	30,90±0,09* [■]	29,30±0,08 [■]	30,25±0,25
9	35,40±0,08* [■]	31,30±0,07 [■]	34,20±0,21
10	29,60±0,05* [■]	34,80±0,03 [■]	31,80±0,23
11	28,30±0,05* [■]	28,80±0,21 [■]	23,80±0,16
12	23,02±0,02*	24,01±0,04 [■]	23,03±0,17
13	9,86±0,01* [■]	10,78±0,01	10,82±0,13
14	23,10±0,03* [■]	20,40±0,04 [■]	22,40±0,18
15	24,80±0,03* [■]	25,03±0,06 [■]	23,70±0,29
16	30,60±0,05* [■]	33,10±0,06 [■]	32,10±0,23
17	26,90±0,03* [■]	29,80±0,05 [■]	30,4±0,22
18	15,80±0,02* [■]	17,30±0,04 [■]	16,70±0,27
19	9,35±0,01*	8,42±0,01 [■]	9,11±0,28

n - количество КЭ на каждые исследуемые сутки инкубации;

* (P ≤ 0,05) – достоверная разница при сравнении двух разнополых групп КЭ;

■ (P ≤ 0,05) – достоверная разница групп противоположного пола в сравнении с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

При сравнении апоптического индекса КЭ каждой группы противоположного пола с одноименным показателем в группе эмбрионов, сформированной без учета половых различий, зафиксированы достоверные отличия на все сутки изучения, за исключением 12-х и 19-х суток в группе эмбрионов-самцов, и 13-х у эмбрионов-самок, где различия индекса недостоверны.

Для наглядности результаты исследования апоптического индекса у куриных эмбрионов разного пола и эмбрионов в группе без учета половых различий представлены в виде графика (рисунок 27). Установлено, что характер динамики исследуемого индекса на протяжении инкубации в группах эмбрионов кур обоего пола и без учета половых различий, не всегда совпадает. Она не постоянна и характеризуется незакономерной сменой пиков подъема и спада.

Так, с 8-х по 9-е сутки инкубации отмечено увеличение АИ у эмбрионов-самцов на 4,5%, у эмбрионов-самок на 2%, в группе КЭ без учета пола на 3,95%.

Далее, с 9-х по 10-е сутки инкубации, значение индекса снижается в мужской группе эмбрионов на 5,8%, а у женских КЭ на те же сутки инкубации, напротив, значение показателя продолжает нарастать до $34,80 \pm 0,03\%$.

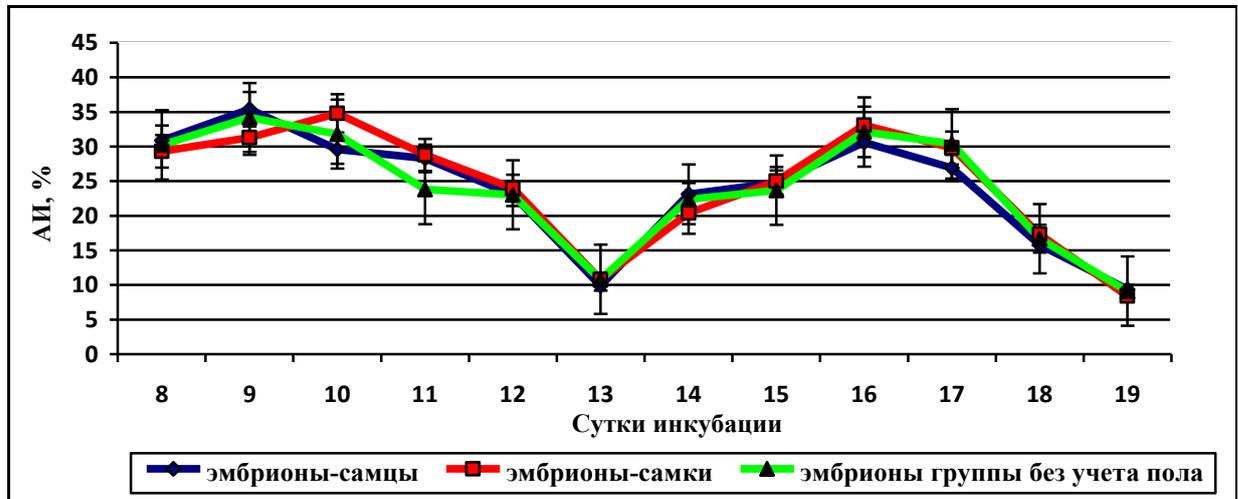


Рисунок 27 - Динамика апоптического индекса у куриных эмбрионов на протяжении инкубации

Таким образом, на 9-е сутки у эмбрионов -♂ и на 10-е сутки у эмбрионов -♀ приходится первый пик подъема апоптического индекса, значения которого для мужских и женских эмбрионов составили $35,40 \pm 0,08\%$ и $34,80 \pm 0,03\%$ соответственно. В группе куриных эмбрионов, сформированной без учета половых различий пик апоптического индекса ($34,20 \pm 0,21\%$) совпадает с пиком у эмбрионов-самцов, который приходится на 9-е сутки инкубации.

С 9-х суток инкубации в двух группах КЭ (эмбрионы-самцы, КЭ в группе без учета пола), и с 10-х суток у эмбрионов-самок, индекс интенсивно снижается, вплоть до 13-х суток инкубации, включительно. За это время АИ уменьшился на 25,54% у мужских эмбрионов, на 24,02% - у женских эмбрионов и 23,38% - у эмбрионов в группе, сформированной без учета половых различий. Следовательно, 13-е сутки пренатального развития являются пиком спада апоптического индекса для всех трех групп КЭ.

Начиная, с 13-х суток развития наблюдается очередное интенсивное нарастание апоптического индекса в трех группах КЭ, с тенденцией сохранения до 16-х суток инкубации включительно. Так, в группах эмбрионов-♂ АИ увеличился на 20,74%, у эмбрионов-♀ - на 22,32%, в группе куриных эмбрионов, сформирован-

ной без учета половых различий - на 21,28%. В динамике АИ на указанном отрезке инкубации зафиксирован следующий четко выраженный пик подъема показателя (16-е сутки) для трех групп КЭ, значения которых для мужской, женской и группы куриных зародышей, сформированной без учета половых различий составили $30,60 \pm 0,05\%$; $33,10 \pm 0,06\%$; $32,10 \pm 0,23\%$ соответственно.

С 16-х суток инкубации динамика апоптического индекса интенсивно снижается вплоть до 19-х суток пренатального онтогенеза. У эмбрионов мужского пола - на 21,25%, на 24,68% - у женских эмбрионов и на 22,99% - в группе КЭ, сформированной без учета половых различий. Кроме того, на начало периода вылупления эмбрионов (19-е сутки) приходится минимальное значение АИ, являющееся очередным и последним пиком спада показателя для всех трех групп КЭ. Значения пиков спада АИ составили для эмбрионов-самцов, самок и группы КЭ, пол которых не учитывался $9,35 \pm 0,01\%$; $8,42 \pm 0,01\%$; $9,11 \pm 0,28\%$ соответственно.

По-нашему мнению такая динамика апоптического индекса на протяжении эксперимента связана с различной интенсивностью формообразовательных процессов у куриных эмбрионов разного пола.

Дополнительно в процессе работы провели исследование по выявлению гена *p53*. Этот ген является центральным компонентом механизма, обеспечивающий генетический контроль апоптической гибели у человека [168]. А, что касается птиц, то сведения о наличии гена *p53* отсутствуют.

В соавторстве [143] при выделении фрагментов ДНК двумя методами: коротким по времени выполнения (40 мин.) – сорбентным, и в два раза длительным – термокоагуляционным выявлено наличие гена *p53* у кур кросса Родонит 3 в пренатальном периоде развития.

Зафиксировано, что в процессе исследования, ген *p53* методом ПЦР выявляется на все исследуемые сутки инкубации как у куриных эмбрионов-♂, так и у эмбрионов-♀.

При сравнении результатов на 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки пренатального онтогенеза кур мужского и женского пола на электрограммах зафиксировано свечение амплифицированного фрагмента ДНК,

особенно четко выраженное при выделении его сорбентным методом. Фрагмент исследования гена *p53* на 8-е сутки развития обнаруженный с помощью двух методов выделения ДНК у эмбрионов-самцов отражен на рисунке 28.

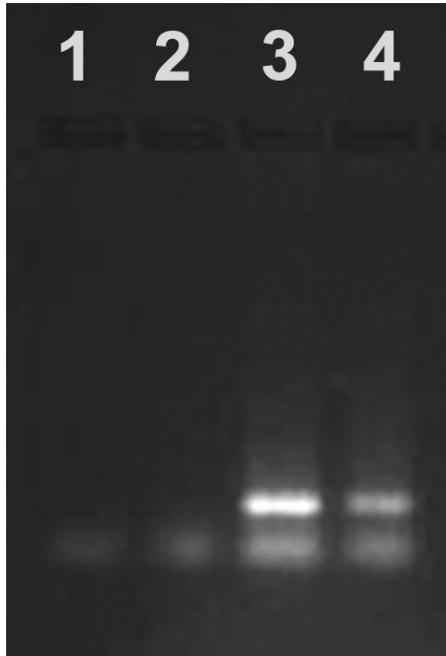


Рисунок 28 - Электрофореграмма результатов амплификации на 8-е сутки пренатального периода развития куриных эмбрионов-самцов (№3 сорбентный метод; №4 термокоагуляционный метод)

С учетом специфичности используемого праймера данное свечение продуктов ПЦР мы идентифицировали как ген *p53*.

Исследование альфа-фетопротеина, который обеспечивает нормальное течение пролиферации, дифференцировки и апоптоза, позволило в соавторстве [21] выявить, что этот белок присутствует у разнополых куриных эмбрионов на всех исследуемых этапах пренатального онтогенеза. Средние значения АФП в зависимости от половой дифференцировки и в группе эмбрионов, сформированной без учета половых различий представлены в таблице 13.

Выявлено, что на 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки инкубации у куриных эмбрионов противоположного пола и в группе эмбрионов без учета половых различий средние значения альфа-фетопротеина отличаются.

При анализе абсолютных числовых значений АФП с 8-х по 19-е сутки развития между уровнем этого белка у куриных эмбрионов обоего пола установлены достоверные отличия. При этом на каждые исследуемые сутки инкубации отме-

чено количественное преобладание белка у эмбрионов-самцов по сравнению с эмбрионами-самками.

Таблица 13 - Уровень альфа-фетопротейна у куриных эмбрионов разного пола и в группе эмбрионов, сформированной без учета половых различий (M±m)

Сутки инкубации	Уровень альфа-фетопротейна, МЕ/мл		
	Эмбрионы-самцы, n=50	Эмбрионы-самки, n=50	Группа КЭ, сформированная без учета половых различий, n=50
8	2,61±0,002* [■]	1,91±0,002 [■]	1,54±0,02
9	1,78±0,002* ^{■▲}	1,21±0,002 ^{■▲}	1,18±0,01
10	2,18±0,003* ^{■▲}	1,91±0,002 ^{■▲}	3,18±0,11
11	1,22±0,003* ^{■▲}	1,11±0,006 ^{■▲}	3,89±0,11
12	41,20±0,07* ^{■▲}	38,30±0,05 ^{■▲}	40,50±0,17
13	1,75±0,004* ^{■▲}	2,18±0,001 ^{■▲}	7,88±0,10
14	9,19±0,002* ^{■▲}	8,16±0,004 ^{■▲}	12,30±0,13
15	19,10±0,04* ^{■▲}	17,20±0,02 ^{■▲}	23,80±0,12
16	8,44±0,008* ^{■▲}	7,15±0,003 ^{■▲}	11,70±0,13
17	3,18±0,002* ^{■▲}	2,32±0,002 ^{■▲}	4,44±0,11
18	15,09±0,007* ^{■▲}	12,32±0,003 ^{■▲}	11,40±0,14
19	3,11±0,009* ^{■▲}	3,02±0,006 ^{■▲}	2,52±0,14

n - количество КЭ на каждые исследуемые сутки инкубации;

* (P ≤ 0,05) – достоверная разница при сравнении двух разнополых групп КЭ;

■ (P ≤ 0,05) – достоверная разница групп противоположного пола в сравнении с группой КЭ, сформированной без учета половых различий;

▲ (P ≤ 0,05) – достоверная разница на каждые сутки инкубации в сравнении с предыдущими сутками развития в каждой группе КЭ.

Сравнивая значения альфа-фетопротейна в процессе развития куриных эмбрионов разного пола с одноименным показателем в группе КЭ без учета половых признаков, достоверные различия зафиксированы на протяжении всего эксперимента.

Следует отметить, что в группе, где пол куриных зародышей не учитывался, статистические различия (m) на каждые сутки инкубации имеют больший разлет по сравнению с этими различиями в группах эмбрионов разделенных по полу.

Анализируя динамику альфа-фетопротейна, представленную на рисунке 29, можно отметить, что на всех экспериментальных этапах пренатального онтогенеза она во всех трех группах КЭ изменяется волнообразно. При этом характер посуточной динамики альфа-фетопротейна на протяжении инкубации у эмбрионов-

самцов и эмбрионов-самок совпадает. А что касается группы эмбрионов, сформированной без учета половых различий, то характер динамики показателя отличается от динамики в разнополых группах КЭ.

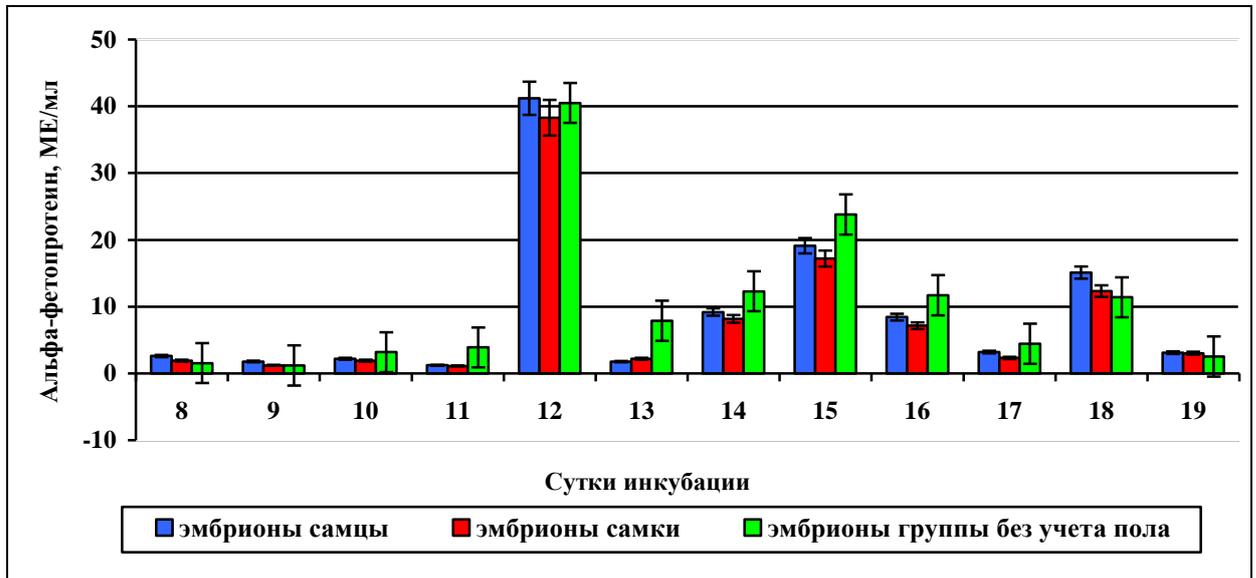


Рисунок 29 - Динамика уровня альфа-фетопротеина в процессе развития куриных эмбрионов

Так, с 8-х по 9-е сутки развития во всех трех группах КЭ уровень альфа-фетопротеина незначительно снижается. У эмбрионов-самцов - на 0,83 ME/мл, в женской группе куриных зародышей - на 0,7 ME/мл, у КЭ в группе, сформированной без учета половых различий - на 0,36 ME/мл.

Далее, с 9-х по 10-е сутки инкубации АФП достоверно увеличивается у эмбрионов- ♂ с $1,78 \pm 0,002$ ME/мл до $2,18 \pm 0,003$ ME/мл, у эмбрионов - ♀ с $1,21 \pm 0,002$ ME/мл до исходного уровня $1,91 \pm 0,002$ ME/мл. У эмбрионов группы без учета половых различий АФП увеличивается, со значений $1,18 \pm 0,01$ ME/мл до $3,18 \pm 0,11$ ME/мл, то есть почти в три раза.

С 10-х суток развития по 11-е сутки отмечается снижение уровня белка в мужской и женской группах куриных эмбрионов на 0,96 и 0,8 ME/мл соответственно. Тогда как в группе КЭ, сформированной без учета половых различий, уровень альфа-фетопротеина продолжает нарастать с $3,18 \pm 0,11$ ME/мл до $3,89 \pm 0,11$ ME/мл.

В трех группах куриных эмбрионов с 11-х по 12-е сутки инкубации отмечена наиболее выраженная суточная динамика альфа-фетопротеина за весь пренаталь-

ный период онтогенеза, которая проявляется в резком повышении уровня альфа-фетопротеина в группе мужских эмбрионов на 39,98 МЕ/мл, в группе женских - на 37,19 МЕ/мл, в группе КЭ, сформированной без учета половых различий - на 36,61 МЕ/мл. При этом на 12-е сутки инкубации концентрация АФП достигает первого максимума, значения которой составляют у эмбрионов-самцов $41,20 \pm 0,07$ МЕ/мл, у эмбрионов-самок - $38,30 \pm 0,05$ МЕ/мл, у эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий - $40,50 \pm 0,17$ МЕ/мл.

С 12-х по 13-е сутки инкубации отмечено самое резкое за все время исследования достоверное падение уровня АФП на 39,45 МЕ/мл в мужской группе КЭ, 36,12 МЕ/мл - в женской, и на 32,62 МЕ/мл – в группе зародышей, сформированной без учета половых различий.

Далее, в отрезке между 13-ми и 14-ми сутками инкубации как в разнополых группах куриных эмбрионов, так и в группе, сформированной без учета половых различий, содержание альфа-фетопротеина достоверно увеличивается, вплоть до 15-х суток развития. За указанное время прирост содержания белка в группе эмбрионов-♂ составил 17,35 МЕ/мл, в женской группе чуть меньше - 15,02 МЕ/мл, в группе, сформированной без учета половых различий – 15,92 МЕ/мл. При этом в мужской, женской и в группе эмбрионов без учета половых различий на 15-е сутки инкубации концентрация АФП достигает второго по величине максимального значения ($19,10 \pm 0,04$ МЕ/мл; $17,20 \pm 0,02$ МЕ/мл; $23,80 \pm 0,12$ МЕ/мл соответственно).

В промежутке между 15-ми и 17-ми сутками развития в группах эмбрионов обоего пола и эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий, зафиксировано достоверное падение уровня альфа-фетопротеина, выраженное с различной посуточной интенсивностью. Так с 15-х по 16-е дни инкубации снижение содержания белка более интенсивное, которое для эмбрионов-самцов составило 10,66 МЕ/мл, для эмбрионов-самок - 10,05 МЕ/мл, для эмбрионов группы без учета половых различий - 12,1 МЕ/мл. Напротив, с 16-х по 17-е сутки инкубации, падение уровня АФП менее интенсивное, которое вдвое меньше, чем в предыдущем интервале инкубации и составляет для мужской, женской и группы эмбрио-

нов, сформированной без учета половых различий 5,26 МЕ/мл; 4,83 МЕ/мл; 7,26 МЕ/мл соответственно.

Уровень АФП с 17-х по 18-е сутки инкубации вновь резко возрастает с $3,18 \pm 0,002$ МЕ/мл до $15,09 \pm 0,007$ МЕ/мл в группе мужских эмбрионов, и с $2,32 \pm 0,002$ до $12,32 \pm 0,003$ МЕ/мл - в женской группе зародышей и с $4,44 \pm 0,11$ МЕ/мл до $11,4 \pm 0,14$ МЕ/мл - в группе эмбрионов без учета половых различий. При этом суточный прирост в указанный период составил для эмбрионов-♂ 11,91 МЕ/мл, для женских - 10,0 МЕ/мл, для эмбрионов группы без учета половых различий – 6,96 МЕ/мл. Кроме того, на 18-е сутки инкубации зафиксирован третий по величине пик максимума исследуемого показателя в трех группах КЭ.

Концентрация альфа-фетопротеина у разнополых куриных эмбрионов на завершающем этапе пренатального онтогенеза (с 18-х по 19-е сутки) снова снижается на 11,98 МЕ/мл у эмбрионов мужского пола, достигая числового значения $3,11 \pm 0,009$ МЕ/мл, на 9,3 МЕ/мл - у эмбрионов женского пола, достигая значения $3,02 \pm 0,006$ МЕ/мл и на 8,88 МЕ/мл - у эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий, достигая концентрации белка $2,52 \pm 0,14$ МЕ/мл.

При сопоставлении кривых динамики альфа-фетопротеина и апоптического индекса, у эмбрионов-самцов (рисунки 30, 31) и у эмбрионов-самок (рисунки 32, 33) отмечен разный характер взаимосвязи. Так, в группе эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок с 8-х по 9-е сутки развития зафиксирован разнонаправленный характер взаимосвязи показателей. С 9-х по 10-е сутки инкубации, у эмбрионов-самцов выявлено падение АИ и незначительное увеличение уровня АФП. В эти сутки инкубации в женской группе эмбрионов отмечен противоположный эмбрионам-самцам характер взаимосвязи показателей, выражающийся в увеличении обоих показателей. В интервале между 10-ми и 11-ми сутками развития динамика значений АИ и АФП в обеих группах разнополых зародышей характеризуется тенденцией к снижению.

В отрезке между 11-ми и 12-ми сутками инкубации в группах эмбрионов разделенных по полу вновь отмечен разнонаправленный характер взаимосвязи пока-

зателей. При этом оптический индекс снижается, а альфа-фетопротеин резко увеличивается.

С 12-х по 13-е сутки развития эмбрионов-самок и эмбрионов-самцов выявлено падение сопоставляемых показателей. Зафиксировано, что с 13-х по 15-е сутки инкубации динамика оптического индекса и альфа-фетопротеина одновременно нарастает в обеих группах зародышей.



Рисунок 30 – Динамика оптического индекса в процессе развития эмбрионов-самцов

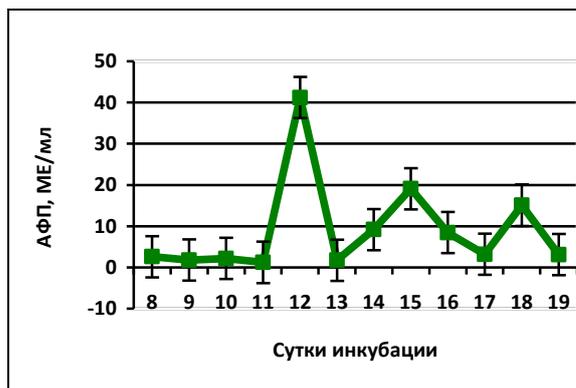


Рисунок 31 - Динамика альфа-фетопротеина в процессе развития эмбрионов-самцов



Рисунок 32 – Динамика оптического индекса в процессе развития эмбрионов-самок



Рисунок 33 - Динамика альфа-фетопротеина в процессе развития эмбрионов-самок

В отдельные сутки инкубации плодного периода пренатального онтогенеза кур женского и мужского пола отмечен ярко выраженный разнонаправленный характер взаимосвязи AI и АФП. Так, в промежутке между 15-ми и 16-ми сутками инкубации AI увеличивается, а уровень АФП снижается в обеих группах КЭ. В интервале между 17-ми и 18-ми сутками развития зафиксирован противополож-

ный характер взаимозависимости показателей в двух группах эмбрионов, где апоптический индекс снижается, а АФП повышается.

В промежутке между 16-ми и 17-ми и на завершающем этапе развития эмбрионов-самок и эмбрионов-самцов (18-е и 19-е сутки) зарегистрирован спад как уровня АФП, так и АИ.

Оценивая как у эмбрионов-самцов, так и у эмбрионов-самок коррелятивную зависимость значений уровня альфа-фетопротейна и апоптического индекса на протяжении исследования, выявили разнонаправленную (положительную и отрицательную) посуточную корреляцию (0 - 0,3).

Таким образом, на каждые исследуемые сутки инкубации установлены достоверные отличия как апоптического индекса, так и уровня альфа-фетопротейна у эмбрионов-самцов по сравнению с эмбрионами самками. С 8-х по 19-е сутки инкубации установлен минимальный диапазон статистических различий (m) апоптического индекса и уровня альфа-фетопротейна в группах раздельнополых эмбрионов по сравнению с эмбрионами группы, сформированной без учета половых различий.

Полученные результаты исследования апоптического индекса и уровня альфа-фетопротейна для куриных эмбрионов разного пола кросса Родонит 3 на протяжении инкубации, по-нашему мнению, можно считать нормативными.

Динамика АИ на протяжении инкубации у эмбрионов обоего пола и в группе КЭ, сформированной без учета половых различий, не всегда совпадает. А, что касается динамики уровня АФП, то она совпадает в группах разного пола на каждые сутки исследования. При этом в группе эмбрионов, где половые различия не учтены, характер динамики отличается от таковой в группах обоего пола.

С помощью ПЦР-метода установлено, что ген *p53* присутствует у куриных эмбрионов разного пола на всем протяжении исследования, а сам метод является вполне адекватным для выявления гена в пренатальном онтогенезе птиц. При этом результаты работы подтверждают предпочтительность использования для этой цели метода, основанного на сорбентном способе выделения ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Объектами исследования в биологической науке являются самые разнообразные модели, при этом очень интересной моделью, на которой проводят эксперименты еще со времен Аристотеля, считается куриный эмбрион.

Всестороннее изучение куриного эмбриона позволило систематизировать фундаментальные знания о морфологии и физиологии отдельных систем органов, с момента их закладки до морфофункциональной зрелости. Этот багаж знаний связан с именами ученых-эмбриологов нашей страны М.Н. Рагозиной [111], Г.С. Крок [78], Г.Ф. Задарновской [61], В.В. Рольник [118], Б.Ф. Бессарабовым [16]. При этом в настоящее время интерес ученых к куриному эмбриону не ослабевает, а только нарастает. Это связано с расширением методических возможностей для регистрации тех или иных параметров, в частности с цитологическими, гистологическими, иммунологическими и молекулярно-генетическими исследованиями [49, 42, 156, 32, 167].

По мере развития науки, биология пополнилась новым термином – апоптоз [86], в обеспечении которого принимает участие, в том числе альфа-фетопротеин [173, 142]. Обзор литературных источников подтвердил отсутствие числового материала по уровню апоптоза в пренатальном онтогенезе птиц. А имеющиеся единичные сообщения об апоптозе эмбрионов кур малоинформативны, устаревшие, так как представлены в основном в 20 веке [102, 11]. Отдельные современные сведения по апоптозу у эмбрионов кур не отражают итог исследовательской работы, а содержат ссылки на статьи прошлых лет. При этом основной поток современных исследований по затронутым проблемам, активно начался ставропольскими исследователями с 2008 года.

В единичных работах представлены абсолютные значения альфа-фетопротеина у куриного эмбриона в развитии. При этом результаты имеют как широкий разброс количественных значений белка [139], так и широкий диапазон статистических различий (m) [142, 167].

Среди неразрешенных вопросов в биологии остается выяснение закономерностей развития эмбрионального скелета кур. Несмотря на имеющиеся единич-

ные работы по наблюдению за окостенением костей скелета, обобщение теоретического материала не имеет своего завершения. А недостаточное количество экспериментальных данных по остеометрическим показателям для конкретной породы в процессе пренатального онтогенеза кур требует восполнения.

В биологии нет человека, животного и птицы вообще, а существуют мужчина и женщина, бык и корова, петух и курица, то есть особи разного пола, отличающиеся по ряду анатомических и физиологических параметров [5]. Поэтому все эксперименты на животных-моделях в постнатальном онтогенезе проводят с обязательным учетом половых различий, что на наш взгляд в равной степени должно относиться к пренатальному периоду развития. Учет пола в схеме эмбриологического эксперимента обеспечит минимальный разлет статистических различий между отдельными индивидами в группе.

Поэтому все вышеперечисленные аспекты, не получившие полного разъяснения со стороны науки, требуют детального рассмотрения с позиций их изучения в зависимости от половых различий куриных эмбрионов. Вышеизложенное послужило основой для постановки задач наших исследований.

Принципиальным моментом в решении всех поставленных нами задач было дифференцирование куриных эмбрионов по полу, которое осуществляли перед инкубацией и с 8-х по 19-е сутки инкубации.

С этой целью нами использовано несколько методов, поскольку на сегодняшний день не предложено универсального метода, который бы применялся как в практической деятельности, так и с экспериментальной целью. Критериями при выборе методов для дифференцировки пола КЭ стала доступность, простота в исполнении и минимальный набор оборудования. В литературе перечень методов, отвечающих указанным критериям, представлен доинкубационным сексингом КЭ по массе яиц [118] и визуальной оценкой симметрии гонад [39].

В результате применения двух методов разделения КЭ по полу, убедились в том, что каждый метод дает незначительный процент ошибки, в сумме составляющий 6,36%. По-нашему мнению полученный процент ошибки в каждом используемом методе складывается из разных причин. Так, при разделении КЭ по

полу методом взвешивания яиц перед инкубацией ошибка может возникать из-за колебаний массы яиц в пределах около среднего значения. А при методе визуализации гонад, наше убеждение совпало с мнением С.Е. Левиной [85], где ошибка в определении пола зародышей возможна из-за малоразличимой редукции правого яичника у эмбрионов-самок.

В итоге наших исследований именно комплексное сочетание указанных методов, позволило нам свести процент ошибки к нулю, и выбрать для эксперимента куриных эмбрионов обоего пола с уверенностью, что это самец и самка. На основании чего поэтапно формировались экспериментальные группы раздельнополых куриных эмбрионов, с которыми решались другие задачи.

Несмотря на то, что наукой накоплены значительные фактические данные, раскрывающие природу стероидных гормонов, которые определяют половую дифференцировку и функциональную активность репродуктивной системы в пренатальном онтогенезе кур [118, 36], нерешенным остается вопрос об уровне гормонов (тестостерон и эстрадиол) на протяжении инкубации, что особенно актуально, и обусловило наш интерес в их исследовании у разнополых куриных эмбрионов.

На наш взгляд получение таких сведений, крайне важно, так как они должны являться основой в понимании сложного механизма соматического эмбриогенеза, и прежде всего, в процессе формирования половых различий. Кроме того, учитывая прикладную роль куриного зародыша, данные об уровне тестостерона и эстрадиола расширяют сырьевые возможности эмбриональных тканей кур и могут учитываться биотехнологами при разработке технологии биологически активных препаратов, в том числе, гормон-содержащих.

С 8-х по 19-е сутки инкубации исследованию на наличие тестостерона и эстрадиола подвергли тканевой гомогенат 720 куриных эмбрионов обоего пола, половая принадлежность которых установлена вышеописанными методами.

Результаты исследований, выполненных нами, свидетельствуют о разном уровне тестостерона и эстрадиола у куриных эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок, значения которых достоверно увеличиваются с 8-х по 19-е сутки инкуба-

ции в обеих группах КЭ. Интенсивный рост репродуктивных органов (семенники и яичники) в этом периоде онтогенеза, и активизация их функции обеспечивает, по-нашему мнению, увеличение уровня обоих гормонов на протяжении исследования.

В группах эмбрионов-самок при исследовании эстрадиола и эмбрионов-самцов при исследовании тестостерона, на все сутки инкубации установлены достоверные отличия с уровнем соответствующих гормонов у эмбрионов группы без учета половых различий. Исключение составляет уровень тестостерона у эмбрионов-самцов на 8-, 9-, 10-е сутки инкубации, а также уровень эстрадиола у эмбрионов-самок на 8-е сутки. Установленные отличия в указанные сроки инкубации, при сравнении с уровнем соответствующих гормонов у эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий, недостоверны. В результате этих сравнений подтверждена приоритетность дифференцировки эмбрионов по полу, как методического приема, который обеспечил максимальную точность исследуемых критериев, достоверность и минимальный диапазон статистических различий (m) в группах эмбрионов, разделенных полу по сравнению с группой, где пол зародышей не учитывался.

В то же время, метод твердофазного иммуноферментного анализа позволил нам не только восполнить недостающие сведения о количестве гормонов у эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок в развитии, но благодаря гормональной проверке эмбрионов, у которых половая принадлежность не совпала с двумя методами разделения по полу (доинкубационный сексинг, визуализация гонад) оценить уровень достоверности указанных методов. А сам метод на наш взгляд вполне пригоден для определения половых различий кур на разных этапах развития и может быть использован в экспериментальных и биотехнологических целях.

Одним из наиболее изученных показателей развития куриного зародыша является рост, как одна из характеристик, позволяющая судить о способах и путях адаптации эмбриона к условиям окружающей среды [94, 156]. При этом общепринятыми критериями для изучения закономерностей роста и развития и сегодня продолжают оставаться масса тела и линейные размеры [124, 42, 156, 167]. Одна-

ко, что касается исследования этих критериев с учетом пола куриных эмбрионов, в литературе представлены единичные сведения о различиях массы и длины разнополох зародышей в отдельные сутки инкубации [39, 183]. На наш взгляд недостаток числового материала по указанным параметрам для конкретной породы, является существенным пробелом в экспериментальной биологии, который мы попытались восполнить для куриных эмбрионов обоего пола кросса Родонит 3.

Проведенные нами исследования, позволили установить, что несмотря на то, что масса, длина тела и окружность грудной клетки, увеличивались с 8-х по 19-е сутки инкубации в обеих группах, интенсивность прироста указанных критериев на каждые сутки инкубации у эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок была разной.

За указанный период прирост массы, длины и окружности грудной клетки составил для эмбрионов мужского пола 27,15 г; 6,16 см; 4,71 см, эмбрионов женского пола 26,7 г; 5,98 см; 4,55 см соответственно.

На примере массы, длины и ОГК, с учетом минимального диапазона их статистических различий, у эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок по сравнению с эмбрионами группы, сформированной без учета пола, неоднократно убеждаемся, что наша позиция о необходимости деления зародышей по полу в эксперименте оправданна.

При сравнении значений массы, длины и окружности грудной клетки, полученных для эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок со значениями одноименных критериев у эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий на протяжении эксперимента, выявлены как достоверные, так и недостоверные различия в каждой из сравниваемых групп КЭ.

По-нашему мнению отмеченные разнонаправленные статистические различия в каждого из исследуемых показателей, связаны с соотношением количества эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок, которые составляют группу эмбрионов, пол которых не учитывался. Так, в случае достоверности результатов, количественное соотношение эмбрионов мужского и женского пола в группе эмбрионов без учета половых различий может являться равным или доминирует определенный пол эмбрионов, противоположно не совпадающий с полом эмбрионов срав-

ниваемой группы. Напротив, при получении недостоверных различий, группу эмбрионов, сформированную без учета половых различий составляют эмбрионы, половые различия которых превалируют или совпадают с полом эмбрионов сравниваемой группы (КЭ-♂, КЭ-♀).

К сожалению, изученные морфометрические показатели не позволяют объективно оценить развитие куриных эмбрионов, в том числе и разнополых особей. Внешним интегральным проявлением адекватности процессов роста и развития условиям существования организма является оценка физического развития [13]. В литературе имеются единичные сообщения по изучению физического развития куриного эмбриона в онтогенезе [156, 147, 167]. Однако при расчете индексов авторы использовали группы куриных эмбрионов без учета половых различий, что на наш взгляд является главной методической ошибкой при комплектации экспериментальных групп.

Учитывая литературные сведения о том, что индексы, вычисление которых проводилось для человека и животных с учетом пола, отличаются [122, 150], то интерес вызывает зависимость гармоничности развития у куриных эмбрионов противоположного пола.

С этой целью нами определен перечень индексов физического развития, представленный Кетле I, Кетле II и ИГМР. Каждый из указанных индексов является вполне информативным, а при их комплексном сочетании они являются интегральными индикаторами, которые направлены на оценку структурной полноценности развивающегося организма.

Полученные в соавторстве значения для всех трех индексов [149] свидетельствуют о том, что индекс Кетле I, при сравнении его между эмбрионами-самцами и эмбрионами-самками, достоверно отличается и возрастает с 8-х по 19-е сутки инкубации. А Кетле II у эмбрионов сравниваемых групп имеет достоверные различия, начиная с 10-х и заканчивая 19-ми сутками инкубации. При этом последний индекс имеет разнонаправленный характер посуточной динамики в каждой из изучаемых групп куриных зародышей, что позволяет констатировать, что развитие мужских куриных эмбрионов и женских идет по-разному.

При сравнении ИГМР между разнополыми эмбрионами выявлено, что мужские и женские куриные эмбрионы развиваются одинаково гармонично, так как значения индекса достоверно между группами не отличаются и приближаются к 100. Полученные нами результаты по ИГМР совпали с данными Черникова С.В. (2012), где автор не разделяя эмбрионы на половые группы, отметил, что значения индекса на протяжении инкубации неизменны.

Кроме того, еще раз подтверждено, что в группах обоего пола разрыв статистических различий ниже по сравнению с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий.

Организм как единое целое – замкнутая и одновременно открытая биологическая система формируется в пренатальный период онтогенеза, благодаря процессам гисто- и органогенеза [142]. При этом скелет занимает центральное положение в становлении организма, его закладка осуществляется с ранних этапов пренатального онтогенеза, и он обеспечивает каркас формирующимся органам.

Изучение закономерностей скелета – очень важный элемент познания состояния живой системы в пренатальный период онтогенеза, поскольку от полноценного развития костей скелета зависит качество выведенного молодняка, его дальнейшая жизнеспособность, продуктивность, экстерьер и интерьер взрослой птицы [59].

Считается, что наиболее полно уровень развития организма, в том числе скелета, отражает комплекс морфометрических показателей, среди которых линейные размеры костей представляют особый интерес, так как характеризуют рост организма, направленный на достижение видоспецифической формы [118, 167].

Обзор доступных литературных источников свидетельствует о недостатке числового материала по линейным размерам костей скелета у эмбрионов кур, а что касается разнополых эмбрионов, данные отсутствуют.

Вышеизложенное явилось основанием к расчету линейных размеров осевого скелета и костей грудной и тазовой конечностей у разнополых куриных эмбрионов кросса Родонит 3, что по-нашему мнению, существенно дополнит спектр сведений о закономерностях их онтогенеза.

На основании наших исследований установлено, что абсолютные значения длины всех исследуемых нами костей, увеличивается с 12-х по 19-е сутки инкубации у эмбрионов обоего пола. При этом на каждые сутки развития выявлены достоверные отличия всех остеометрических показателей между эмбрионами-самцами и эмбрионами-самками.

При сравнении абсолютных величин длины осевого и костей периферического скелета в группах КЭ каждого пола с соответствующими показателями в группе без учета половых различий, на все исследуемые сутки инкубации зафиксированы в разной степени выраженные отличия.

Дополнительно оценивали критерии абсолютной и относительной разницы. С помощью критерия абсолютной разницы выявлено, что по всем исследуемым костям динамика разницы на всем протяжении исследования неупорядочена и представлена числовыми пиками максимума и минимума.

Критерию относительной разницы мы уделяем особое внимание при обсуждении, так как он является индикатором, демонстрирующим, во сколько раз идет опережение в развитии конкретной кости между эмбрионами-самцами и эмбрионами-самками на каждые исследуемые сутки инкубации. Для длины осевого скелета, и костей периферического (плечевой, лучевой, локтевой, пястной третьей кости, бедренной, большеберцово-заплюсневая, цевки) на протяжении исследования этот критерий неупорядочно изменяется и характеризуется в конкретные сутки инкубации числовыми пиками максимума и минимума.

Установлено, что числовые максимумы относительной разницы для длины осевого скелета и большеберцово-заплюсневой кости у КЭ-самцов, по сравнению с КЭ-самками, приходятся на 14-е сутки (в 1,155; 1,346 раза соответственно). Числовые минимумы разницы зафиксированы для длины осевого скелета на 12-сутки инкубации (в 1,062 раза), для длины большеберцово-заплюсневой кости на 17-е сутки (в 1,095раза).

Максимумы относительной разницы для костей свободной грудной конечности (плечевая, лучевая и локтевая), при сравнении разнополых эмбрионов приходятся на 19-е сутки инкубации (в 1,442; 1,434; 1,307 раза соответственно). А ми-

нимумы разницы для длины указанных костей приходятся на 16-е сутки (в 1,115; 1,118; 1,118 раза соответственно). Максимум относительного различия пястной третьей кости между эмбрионами сравниваемых групп отличается от вышеописанных костей конечности и приходится на 12-е развития (в 1,334 раза), а минимум совпал на 16-е сутки (в 1,128 раза).

Касательно относительного различия длины бедренной кости эмбрионов-самцов по сравнению с самками, максимум отмечен на 17-е сутки (в 1,284 раза), минимум на 12-е сутки (в 1,109 раза). Максимум аналогичного критерия для длины цевки между разнополыми КЭ, зафиксирован на 18-е сутки развития (в 1,353 раза), минимум различия приходится на 16-е сутки (в 1,074 раза).

Установлено, что стандартное отклонение от средней (m) длины всех изученных нами костей, на 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки инкубации у эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок ниже по сравнению с группой эмбрионов, сформированной без учета половых признаков.

Во второй половине XX века произошел коренной перелом теоретических основ в биологии. В биологическую науку внедрен новый термин «апоптоз», который перевернул сложившиеся годами представления о динамическом равновесии организма и занял прочные позиции в эмбриологии, пополнив ряд фундаментальных понятий - пролиферация и дифференцировка [86, 12].

Потребность в изучении апоптоза и его пусковых механизмов определилась отсутствием системного подхода к оценке динамики этого интегративного критерия на протяжении всего пренатального периода онтогенеза кур, а у разнополых куриных эмбрионов вопрос о нормальной гибели клеток вообще не поднимался, о чем свидетельствует обзор научной литературы.

По-нашему мнению такого рода исследования могут иметь прогностическое значение с целью направленного регулирования соматического эмбриогенеза. Изучение динамики апоптоза в нормальных тканях разнополых куриных эмбрионов позволит накопить сведения о развитии этого явления, что может способствовать объяснению развития многих патологических процессов приводящих к гибели эмбрионов.

Исходя из вышеизложенного в двух группах куриных эмбрионов (самцы и самки) рассчитывали апоптический индекс с 8-х по 19-е сроки инкубации, затем значения индекса на каждые сутки инкубации сравнивали с таковыми, полученными для эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий.

Уже на первые исследуемые сутки инкубации (8-е) и по последние (19-е) нами отмечено, что значения апоптического индекса между куриными эмбрионами разного пола достоверно отличаются.

На 12-е и 19-е сутки в группе эмбрионов-самцов, и 13-е у эмбрионов-самок различия индекса недостоверны в сравнении со значениями у эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий.

В остальные периоды исследования апоптический индекс достоверно отличается в каждой однополой группе эмбрионов от этого показателя у эмбрионов составляющие группу без учета половых различий.

Проведенные нами исследования, позволили установить, что характер динамики апоптического индекса на протяжении инкубации в группах эмбрионов кур противоположного пола и в группе без учета половых различий, не всегда совпадает. При этом динамика показателя не постоянна и характеризуется незакономерной сменой возрастания и убывания.

Для анализа возможных причин вышеуказанной динамики, в качестве примера нами рассмотрены сроки пренатального развития, когда отмечены максимальные пики подъема и спада уровня АИ в исследуемых группах куриных зародышей.

Первый, максимальный пик АИ приходится на 9-е сутки у эмбрионов-♂ ($35,40 \pm 0,08\%$) и у эмбрионов, пол которых не учитывался ($34,20 \pm 0,21\%$), а что касается эмбрионов-♀ пик показателя установлен на 10-е сутки инкубации ($34,80 \pm 0,03\%$).

Отмеченные на разные сроки инкубации пики подъема АИ у эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок находят свое объяснение в том, что с 8-х суток инкубации осуществляется половая дифференцировка зародышей, с продуцированием половых гормонов (тестостерон и эстрадиол) [118], что влечет за собой изменения

в половых органах эмбрионов. Так, у самцов по данным В.И. Фисинина и др. [159] на 9-е сутки развития произошла дегенерация мюллеровых протоков, а у самок на 10-е сутки правый мюллеровый проток завершил свое развитие, следовательно, перечисленные формообразования и регрессия половых органов, безусловно сопряжены с инициацией апоптоза.

Кроме того, в эти промежутки инкубации (9-е и 10-е сутки) наряду с преобразованиями в репродуктивной системе, по данным литературы происходит активное формирование полостей внутренних и наружных органов (ноздри имеют вид щелей, объем желудка увеличивается, образуются заметные складки в кишечнике) [159, 16], что на наш взгляд, сказывается на уровне АИ.

Во время первого, минимального пика АИ (13-е сутки) у эмбрионов-самцов ($9,86 \pm 0,01\%$), эмбрионов-самок ($10,78 \pm 0,01\%$) и эмбрионов группы без учета половых различий ($10,82 \pm 0,13\%$), отмечена низкая интенсивность формообразовательных процессов. К этому сроку инкубации уже произошла закладка многих, в том числе жизненно важных, органов и тканей, в которых нарастает уровень дифференцировки в уже образовавшихся органах, что по-нашему мнению закономерно связано со снижением АИ.

В динамике АИ на 16-е сутки инкубации отмечен второй пик подъема показателя у эмбрионов мужской и женской половой принадлежности, а также эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий. Нам представляется, что увеличение индекса в это время, связано с повышением уровня пролиферативных процессов на фоне активизации апоптической гибели первичных тканевых элементов. В частности, дифференцируются пальцы крыла, удлиняется клюв. В костном мозге усиливается гемопоэз, в связи с чем, пролиферативные процессы в нем протекают более интенсивно. Первичная почка значительно уменьшается в размере за счет инволюции. В селезенке дифференцируется белая и красная пульпа. Большого развития достигают складки слизистой оболочки кишечника. В железистом желудке дифференцируются поверхностные и глубокие железы. На этом этапе наблюдаются активное увеличение массы как органов, так и организма в целом.

К 19-м суткам, когда отмечен следующий пик спада апоптического индекса у эмбрионов-самцов ($9,35 \pm 0,01\%$), эмбрионов-самок ($8,42 \pm 0,01\%$) и группы КЭ, пол которых не учитывался ($9,11 \pm 0,28\%$) все системы органов полностью сформированы и преобладает функциональная и физиологическая зрелость органов, следовательно, интенсивность формообразовательных процессов сводиться к минимуму.

В эти сутки инкубации (19-е) идет активная подготовка к вылуплению цыпленка и изменения происходят как во временных, так и в постоянных органах зародыша. По данным М.Н. Рагозиной [111], В.В. Рольник [118], В.И. Фисинина и др., [159] и Б.Ф. Бессарабова [16] этот период знаменуется исчезновением содержимого амниотической полости. Начинают запускаться сосуды аллантаиса в связи с реабсорбцией аллантаической жидкости. Окончательно втягивается в брюшную полость эмбриона желточный мешок. На 19-е сутки развития происходит пролом скорлупы яичным зубом, и, следовательно, перестройка способа дыхания с появлением нового органа – легкое. Внекишечный способ питания становится дополнительным, а внутрикишечный основным. Начинает функционировать вторичная почка. В половой системе созревают фолликулы и ооциты. Именно указанные особенности развития, на наш взгляд, могут послужить существенными причинами заключительного пика спада апоптического индекса в трех группах куриных зародышей.

Таким образом, именно особенности динамики апоптического индекса определяются интенсивностью формообразовательных процессов, которые у куриных эмбрионов разного пола в отдельные периоды онтогенеза могут быть выражены по-разному.

С учетом интереса к поиску регуляторных механизмов процесса апоптоза для различных живых организмов, а также общеизвестные сведения о роли гена *p53*, четко обозначенной для человека и млекопитающих, изучение этого гена в пренатальном периоде онтогенеза у кур явилось самостоятельным и принципиально новым этапом исследования, для этого биологического объекта.

По-нашему мнению сведения о гене *p53* представляют фундаментальный интерес, поскольку использованные нами методы выявления гена вполне могут обогатить методологию изучения пренатального онтогенеза птиц. Ген *p53* при экспрессии способен предотвращать генетические повреждения в эмбриогенезе млекопитающих и человека [9, 168], это направление может быть также актуально при изучении различных патологий, в том числе опухолей у птиц.

В связи с неоднократно изложенной нами роли дифференцировки куриных эмбрионов по полу, исследование по выявлению указанного гена проводили у разнополых зародышей с 8-х по 19-е сутки инкубации.

Прежде чем приступить к исследованию, перед нами встал вопрос, каким методами выделения ДНК в соответствие с их чувствительностью, отдавать предпочтение при проведении ПЦР - реакции на наличие гена *p53* у птиц. По итогам консультаций специалистов в области генетики (Ростовский НИИ биологии ЮФУ), было решено использовать два способа предварительного выделения ДНК (сорбентный и термокоагуляционный).

Установлено, что ген *p53* выявлялся на все исследуемые сутки инкубации как у куриных эмбрионов-♂, так и у эмбрионов-♀, о чем свидетельствует на электрограммах свечения амплифицированных фрагментов ДНК.

Зафиксировано, что исследуемый ген (*p53*) обнаружен с помощью обоих методов выделения ДНК, при этом особенно четко выраженное свечение амплификации фрагментов ДНК, отмечено при выделении их сорбентным методом. На наш взгляд указанный факт может быть связан с минимально затраченным временем на выполнение этого метода, что исключает «потерю» ДНК.

В обеспечении нормальной работы целого ряда регуляторных эффектов в эмбриональной клетке (пролиферация, дифференцировка, апоптоз) принимают участие различные белки, в том числе открытый более чем четырех десятилетий назад альфа-фетопротеин [136]. Его функции в пренатальном онтогенезе многогранны, о чем свидетельствуют данные литературы [84, 165, 180].

Аналитический обзор подтвердил, что крайне мало данных по уровню альфа-фетопротеина куриного эмбриона, а имеющиеся единичные, представлены с ши-

роким разбросом статистических различий. Наш интерес к исследованию альфа-фетопротеина обусловлен несколькими причинами.

Во-первых, куриные эмбрионы в зависимости от пола развиваются по-разному, что доказано вышеописанными исследованиями, в связи, с чем уровень АФП в различных структурных элементах разнополых зародышей может отличаться, что требует подтверждения.

Во-вторых, учитывая возрастающую прикладную роль куриного зародыша, ткани которого используют в качестве сырья при разработке биологически активных препаратов, иммуноотротных и косметических средств [112, 137, 93, 75], количественные значения белка, в зависимости от половой принадлежности куриных эмбрионов, могут сыграть определяющую роль при выборе оптимального срока пренатального периода развития, для указанных целей.

В-третьих, получение таких сведений, крайне важно, так как уровень АФП у куриных эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок, может служить отправной точкой при целенаправленной инициации исследуемого параметра.

С помощью иммуноферментного анализа удалось зафиксировать наличие альфа-феторотеина у эмбрионов обоего пола, и выявить превосходство количества белка у эмбрионов-самцов по сравнению с самками на все сутки исследования (с 8-х по 19-е). Очевидно, это превосходство связано с тем, что на протяжении инкубации масса зародышей положительно коррелирует с уровнем АФП [141], что полностью перекликается с полученными нами, данными о превышении массы эмбрионов-самцов над массой эмбрионов-самок.

Установлено, что уровень белка между эмбрионами женской и мужской принадлежности, и при сравнении каждой группы обоего пола с одноименным показателем в группе эмбрионов, сформированной без учета половых различий, достоверно различен на всем протяжении эксперимента.

Выявлено, что динамика АФП на протяжении инкубации у КЭ-♂ и КЭ-♀ совпадает, а у эмбрионов, половая принадлежность которых не учитывалась, характер динамики белка отличается от таковой в группах эмбрионов, разделенных по полу. При этом динамика альфа-фетопротеина у эмбрионов трех групп (эм-

брионы-самцы, эмбрионы-самки и эмбрионы в группе без учета половых различий) меняется волнообразно, с совпадающим во всех трех группах, но не закономерным по срокам инкубации, чередованием периодов снижения и повышения концентрации показателя.

С целью объяснения вышеуказанной динамики, подробнее остановимся на тех периодах инкубации, в которых отмечены ярко выраженные пики подъема уровня АФП. У эмбрионов трех исследуемых групп, такие пики зафиксированы на одни сутки (12-е) предплодного периода и 15-е и 18-е сутки, относящиеся к плодному периоду.

Следует отметить, что установленные нами пики концентрации белка для разнополых зародышей, совпали с пиками, выявленные С.В. Черниковым [167] для эмбрионов неопределенного пола.

Первый, самый значительный всплеск содержания АФП (12-е сутки инкубации), установленный для эмбрионов-самцов ($41,2 \pm 0,07$ МЕ/мл), эмбрионов-самок ($38,3 \pm 0,05$ МЕ/мл) и эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий ($40,5 \pm 0,17$ МЕ/мл), можно объяснить тем, что на фоне активных формообразовательных процессов (развитие органов зрения, повышение активности инсулина и др.) отмеченных С.В. Черниковым [167], пик концентрации белка, вероятно, может быть связан с поступлением из белкового мешка нового источника пищи – белка, который дает старт ферментативной деятельности пищеварительным железам желудочно-кишечного тракта [111, 159], что не исключает усиления белково-синтетической функции печени, а значит и повышение эндогенного уровня АФП. Не исключается и эндогенный приток АФП в составе белков, несмотря на отсутствие данных противоречащих этой гипотезе. В это же время С.В. Черников [167] установил максимальный пик процентного содержания АФП в объеме общего белка в гомогенате тканей эмбриона.

На 15-е сутки инкубации нами отмечен второй по величине пик концентрации АФП для КЭ-♂, КЭ-♀ и эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий. При этом числовые значения уровня АФП составили $19,1 \pm 0,04$ МЕ/мл; $17,2 \pm 0,02$ МЕ/мл; $23,8 \pm 0,12$ МЕ/мл соответственно.

Данная стадия развития зародышей по данным М.Н. Рагозиной (1961) характеризуется исчезновением густой массы белка из белкового мешка. Это свидетельствует о том, что экзогенный процесс поступления белка из белковой оболочки через серо-амниотический канал в полость эмбриона, стал интенсивнее по отношению к предыдущим суткам инкубации (14-м), что на наш взгляд возможно сопряжено с повышением концентрации АФП. Кроме того, на 15-е сутки инкубации Б.Ф. Бессорабовым [16] отмечено разрастание печени, в которой осуществляются процессы кроветворения. Учитывая факт, что печень у млекопитающих является одним из основных местом синтеза АФП, не исключено, что всплеск белка у птиц может быть связан с функционированием этого органа.

Третий по величине пик максимума исследуемого показателя для трех групп куриных эмбрионов приходится на 18-е сутки инкубации. АФП у эмбрионов мужской, женской и без учета половых различий групп составляет $15,09 \pm 0,007$ МЕ/мл; $12,32 \pm 0,003$ МЕ/мл; $11,4 \pm 0,14$ МЕ/мл соответственно.

Несмотря на снижение общей интенсивности пролиферативных процессов, связанное с завершением формообразования большинства органов, в этот период С.В. Черников [167] обращает внимание на повышение пролиферативной активности различных специализированных клеток и начало втягивания петли желточного мешка, с чем и связывает очередное повышение уровня АФП.

По данным М.Н. Рагозиной [111] в этот отрезок времени отмечено отсутствие общего белка в белковом мешке и в полости амниона, при этом его наличие, зафиксировано в верхних отделах желудочно-кишечной трубки вплоть до мышечного слоя желудка эмбриона. Такое богатое поступление белка в эмбрион наряду с морфофункциональными преобразованиями в АФП продуцирующих органах, наш взгляд, также может служить объяснением всплеска АФП в указанные сутки инкубации (18-е).

При сопоставлении статистических различий (m), установлен минимальный диапазон указанных различий на каждые сутки инкубации в пользу эмбрионов дифференцированных по полу при исследовании как оптического индекса, так и уровня альфа-фетопротеина.

Несмотря на описанные выше единые механизмы, лежащие, по-нашему мнению, в основе изменения уровня АФП в пренатальном онтогенезе кур, установленные количественные отличия уровня этого белка у эмбрионов различных групп, могут быть подтверждением различной интенсивности формообразовательных процессов у эмбрионов разного пола. Этот факт согласуется с сообщениями E.C. Coligado [185], E.W. Henderson [192] о том, что при средней продолжительности пренатального периода развития (19-21 день) из одной партии инкубационных яиц, в первые 8 часов, вылупляется большее количество цыплят-самок.

Полученные результаты исследования альфа-фетопротеина и апоптического индекса для разнополых куриных зародышей позволили выявить ряд особенностей их динамики в онтогенезе. Эти критерии проявляются на каждый день инкубации и реализуются параллельно в пренатальном периоде развития, следовательно, могут быть взаимосвязаны. Поэтому, сочли необходимым провести сопоставление динамики альфа-фетопротеина и апопического индекса у эмбрионов разного пола.

Анализ сопоставления кривых динамики альфа-фетопротеина и апопического индекса, у эмбрионов-самцов и у эмбрионов-самок позволил выявить разный характер взаимосвязи, проявляющийся для каждой разнополой группы зародышей различным соотношением падения и возрастания показателей в конкретные сутки инкубации.

Для подтверждения гипотезы, с учетом полученных данных о различном числовом материале АФП и АИ на разных этапах пренатального онтогенеза, провели коррелятивный анализ между указанными параметрами у эмбрионов обоего пола.

Установлена как положительная, так и отрицательная посуточная коррелятивная взаимосвязь динамики альфа-фетопротеина и апопического индекса у эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок.

Резюмируя вышеизложенные сведения, необходимо подчеркнуть, что центральное место в эмбриологическом эксперименте при формировании экспери-

ментальных групп занимает, половая дифференцировка куриных эмбрионов, благодаря которой возможно добиться минимального диапазона статистических различий (m), между отдельными индивидами в группе. Проведенные нами исследования, позволили дополнить спектр знаний о разнополых эмбрионах кур, а также отразить принципиально новые для этого биологического объекта морфофункциональные критерии (апоптоз, ген *p53*).

Так, использованный нами комплекс методов разделения куриных зародышей по полу, позволяет осуществлять достаточно точную половую дифференцировку на протяжении инкубации, и сформировать половые группы зародышей для дальнейшей работы с ними. С учетом прикладной роли куриного эмбриона, данные уровня тестостерона и эстрадиола, можно использовать при разработке биологически активных средств (БАВ, БАД), в том числе гормон-содержащих препаратов и косметики.

Установленные для разнополых куриных эмбрионов морфометрические показатели тела, на основе которых произведен расчет индексов физического развития (Кетле I Кетле II, ИГМР), являются константами физиологической нормы развития эмбрионов кросса Родонит 3, а полученные закономерности их динамики могут быть экстраполированы на другие кроссы кур.

Знание закономерностей развития скелета в пренатальном онтогенезе разнополых кур, является ключом для понимания интенсивности роста тех или иных костей на определенном этапе развития, благодаря чему можно получить желаемую после вылупления птицу, отвечающую потребностям современного птицеводства.

Полученные сведения о динамике апоптического индекса и альфа-фетопротеина в супернатанте разнополых куриных эмбрионов на разных этапах онтогенеза, позволяют судить о нормальном развитии зародышей и рассматривать в качестве нормы, а установленные абсолютные значения АИ и АФП можно считать нормативными для разнополых КЭ кросса Родонит 3.

Полученные результаты подтверждают наличие у разнополых кур на протяжении всего пренатального онтогенеза гена *p53*, центральная роль которого в ка-

честве регулятора апоптоза подтверждена для млекопитающих и человека. Указанные сведения определяют весомые перспективы для дальнейших исследований в области экспрессии этого гена во взаимосвязи с уровнем апоптоза, а соответственно, и для объяснения причин различных патологических процессов и нарушение развития. Кроме того, подтверждено преимущество сорбентного метода предварительного выделения ДНК при выявлении гена *p53*, что расширяет методические возможности исследования пренатального онтогенеза птиц.

Все полученные результаты, по-нашему мнению, информативны для оценки уровня нормального развития, знание которого является базой для направленной селекции живого организма, в том числе в птицеводстве. Полученные сведения, особенно по уровню альфа-фетопротейна и апоптического индекса, являющихся важнейшими механизмами регуляции формообразовательных процессов, позволяют рассчитывать на их использование в процессе целенаправленного управления пренатальным онтогенезом кур с целью получения хозяйственно-полезных признаков и для прогнозирования и профилактики патологических процессов.

ВЫВОДЫ

1. Для половой дифференцировки куриных эмбрионов с экспериментальной целью наиболее целесообразно совместное использование методов доинкубационного взвешивания яиц и визуальной оценки гонад, что исключает вероятность методической ошибки, заключающейся в несовпадении результатов, полученных обоими методами и составившей 6,36% от числа яиц, отобранных для эксперимента.

2. Уровень тестостерона у куриных эмбрионов-самцов и эстрадиола у эмбрионов-самок достоверно увеличивается с 8-х по 19-е сутки развития. Минимальное и максимальное количество тестостерона для эмбрионов-самцов ($2,61 \pm 0,006$ нмоль/г; $6,88 \pm 0,006$ нмоль/г), а эстрадиола для эмбрионов-самок ($27,10 \pm 0,14$ pg/мл; $59,70 \pm 0,06$ pg/мл) отмечено на 8-е и 19-е сутки инкубации соответственно.

3. Абсолютные значения массы, длины, окружности грудной клетки, индекса Кетле I у куриных эмбрионов разного пола имеют достоверные отличия с 8-х, а Кетле II - с 10-х по 19-е сутки пренатального онтогенеза. У эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок при общей тенденции возрастания всех показателей, отсутствует четкая закономерность посуточной динамики Кетле II. Количественные значения показателей физического развития, за исключением индекса гармоничного морфологического развития, в большинство из суток исследования у разнополых куриных эмбрионов достоверно отличаются от значений идентичных показателей у эмбрионов группы, сформированной без учета половых различий.

4. С 12-х по 19-е сутки инкубации длина различных костей осевого и периферического скелета разнополых куриных эмбрионов достоверно отличается, с четким превышением абсолютных величин и значений относительной разницы у самцов по сравнению с самками. Динамика абсолютной и относительной разницы длины этих костей в онтогенезе для разнополых эмбрионов отличается и характеризуется неодновременной сменой периодов возрастания и убывания.

5. Уровень апоптического индекса у эмбрионов разного пола с 8-х по 19-е сутки инкубации достоверно отличается. Максимальное значение АИ у эмбрионов-самцов ($35,40 \pm 0,08\%$) приходится на 9-е сутки, у эмбрионов-самок ($34,80 \pm 0,03\%$) на 10-е сутки. Минимальное значение АИ для разнополых куриных эмбрионов приходится на 13-е сутки развития и составляет для эмбрионов-самцов и самок $9,86 \pm 0,01\%$; $10,78 \pm 0,01\%$ соответственно.

6. В тканях разнополых куриных эмбрионов на всем протяжении инкубации с 8-х по 19-е сутки выявлен альфа-фетопротеин, уровень которого у эмбрионов-самцов достоверно превышает этот показатель у самок. Динамика АФП эмбрионов разного пола совпадает и характеризуется наличием трех ярко выраженных пиков подъема (12-е; 15-е; 18-е сутки инкубации). Максимальное значение у эмбрионов-самцов и самок приходится на 12-е сутки $41,20 \pm 0,07$ МЕ/мл; $38,30 \pm 0,05$ МЕ/мл соответственно, а минимальное - на 11-е сутки $1,22 \pm 0,003$ МЕ/мл; $1,11 \pm 0,006$ МЕ/мл соответственно.

7. На всех этапах исследования стандартное отклонение средней (m) уровня тестостерона, эстрадиола, апоптического индекса, альфа-фетопротеина, морфометрических и остеометрических параметров, ниже в экспериментальных группах куриных эмбрионов, разделенных по полу, по сравнению со значениями идентичных критериев эмбрионов в группе, сформированной без учета половых различий.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты исследования могут быть использованы в научно-исследовательской, практической и образовательной деятельности учреждений биологического, ветеринарного, сельскохозяйственного, биотехнологического профиля в качестве вспомогательной информации, характеризующей пренатальный онтогенез кур.

2. Для куриных эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок кросса Родонит 3 полученные значения уровня стероидных гормонов, массы, длины, окружности грудной клетки, индексов Кетле I, Кетле II, гармоничного морфологического развития, остеометрическим показателям, апоптического индекса и альфа-фетопротеина в процессе инкубации, а также наличие гена *p53* можно рассматривать как нормативные, использовать для создания оценочных таблиц и учитывать в селекционной работе, а также при диагностике различных патологических процессов и нарушений развития.

3. Метод доинкубационного сексинга по массе яиц и визуализации гонад целесообразно использовать в одновременном сочетании при комплектации экспериментальных групп в эмбриологическом эксперименте на птице.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АИ – апоптический индекс

АФП – альфа-фетопротеин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИГМР – индекс гармоничного морфологического рназвития

ИФА – иммуноферментный анализ

КЭ – куриный эмбрион

КЭ-♂ - куриный эмбрион-самец

КЭ-♀ - куриный эмбрион-самка

МЕ – международная единица измерения АФП, 1МЕ/мл (IU/ml) = 1,25 нг/мл

ОГК - окружность грудной клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдувалиев, А.А. Дифференциальное окрашивание опухолевых клеток трипановым синим для определения апоптоза / А.А. Абдувалиев, М.С. Гильдиева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 2. – С. 36-38.
2. Автократов, Д.М. Курс анатомии домашних птиц / Д.М. Автократов. - М.-Л., 1928. – 245 с.
3. Азимов, С.Г. Рост и экстерьерные особенности мясных цыплят / С.Г. Азимов // Труды Узбекского НИИЖ. – 1964. – Вып. 9. – С. 56-57.
4. Алексеевич, Л.А. Проблемы детерминации пола у птиц на примере *Gallus gallus domesticus* / Л.А. Алексеевич, Н.А. Лукина, Н.С. Никитин, А.А. Некрасова [и др.] // Генетика. – 2009. – Т. 45. - № 3. – С. 293-304.
5. Алексеева, И.А. «Пол организма. Первичные и вторичные половые признаки» / И.А. Алексеева. – Пенза, 2010. – 30 с.
6. Ангелова, П.А. Механизмы гонадальной половой дифференцировки у птиц на примере куриного зародыша / П.А. Ангелова // Успехи современной биологии. – 1984. – Т. 98. – Вып. 3. - № 6. – С. 446-450.
7. Аристархова, Э.А. Использование питательных веществ яиц эмбрионами и постэмбриональный рост кур: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / Э.А. Аристархова. – Боровск, 1992. – 23 с.
8. Арешидзе, Д.А. Принципиальный подход к формированию экспериментальных групп при изучении онтогенетических преобразований в организме человека (аналитический обзор проблемы) / Д.А. Арешидзе, Л.Д. Тимченко, Н.Н. Сивакова, Т.М. Макарова, Е.Л. Тинькова // Вестник Московского государственного областного университета. Серия «Естественные науки». – 2006. – № 4. – С. 23-26.
9. Аруин, Л.И. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения / Л.И. Аруин // Клиническая медицина. - 2000. - № 1. – С. 5-10.
10. Асланян, М.М. Генетика пола: учебное пособие / М.М. Асланян, О.П. Солдатова. – Ростов-на-Дону, 2009. – 92 с.

11. Балахонов, А.В. Нормальная гибель клеток в эмбриогенезе позвоночных животных / А.В. Балахонов, Т.Н. Пескова // Успехи современной биологии. – 1982. – Т. 94. – Вып. 3. - №6. – С. 433-445.
12. Барышников, А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин. – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
13. Безруких, М.М. Возрастная физиология (физиология развития ребенка) / М.М. Безруких, В.Д. Сонькин, Д.А. Фабер. – М: «Академия», 2008 – 416 с.
14. Белушкина, Н.Н. Молекулярные основы апоптоза / Н.Н. Белушкина, Х.А. Хасан, С.Е. Северин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 1998. - №4. – С. 15-23.
15. Белушкина, Н.Н. Молекулярные основы патологии апоптоза / Н.Н. Белушкина, С.Е. Северин // Архив патологии. – 2001. – Т. 63. – № 1. – С. 53-60.
16. Бессарабов, Б.Ф. Инкубация яиц с основами эмбриологии сельскохозяйственной птицы / Б.Ф. Бессарабов. – М.: КолосС, 2006. – 240 с.
17. Блажнова, Г.Н. Модификация метода исследования уровня апоптоза у эмбрионов кур в процессе развития / Г.Н. Блажнова // Экология России и сопредельных территорий: Мат-лы XIII-й междунар. экологической студенческой конференции. – Новосибирск, 2008. – С. 138.
18. Блажнова, Г.Н. Взаимосвязь массы куриного зародыша с количеством апоптотических клеток на различных этапах развития / Г.Н. Блажнова, А.П. Пономаренко // Тезисы докладов Пятой ежегодной научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2009. – С. 8-9.
19. Блажнова, Г.Н. Морфометрические показатели интенсивности оксификации осевого скелета и костей верхних и нижних конечностей эмбрионов кур в процессе развития / Г.Н. Блажнова // Тезисы докладов Шестой ежегодной научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2010. – С. 9-10.
20. Блажнова, Г.Н. Статистическая характеристика уровня апоптоза у разнополых куриных эмбрионов, и без учета половых различий в процессе развития /

- Г.Н. Блажнова, Л.Д. Тимченко // *Perspektywiczne opracowania są nauką i technikami* – 2011: Materiały VII Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji. - *Nauk biologicznych.: Przemysł. Nauka i studia.* - Vol. 43. – S. 23-26.
21. Блажнова, Г.Н. Динамика уровня альфа-фетопротеина в куриных эмбрионах в зависимости от половой дифференцировки // Г.Н. Блажнова, Л.Д. Тимченко // *Современные проблемы теории и практики инновационного развития АПК: Мат-лы Междунар. науч.-практ. конф. посвященной, 30-летию КБГСХА им. В.М. Кокова (г. Нальчик, 12-14 октября 2011 г.).* Нальчик: Изд-во ООО «Полиграфсервис и Т» – 2011. – С. 100-101.
 22. Блажнова, Г.Н. Исследование уровня половых гормонов у кур на разных сроках эмбрионального развития / Г.Н. Блажнова // *Тезисы докладов Седьмой ежегодной научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН.* – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 11-12.
 23. Блажнова, Г.Н. Длина осевого и периферического скелета разнополовых куриных эмбрионов в процессе развития / Г.Н. Блажнова, Л.Д. Тимченко // *Аграрная Россия.* – 2013. – № 1 – С. 25-28.
 24. Блажнова, Г.Н. Индекс гармоничного морфологического развития у разнополовых куриных эмбрионов в онтогенезе / Г.Н. Блажнова, Л.Д. Тимченко, А.П. Пономаренко // *Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Мат-лы V Междунар. научн.-практ. конф. (г. Ростов-на-Дону, 3-5 октября 2013 г.).* – Ростов н/Дону: Изд-во СКНЦ ВШ ЮФУ, 2013. – С. 425-426.
 25. Блажнова, Г.Н. Сравнительная оценка эффективности дифференцировки куриных эмбрионов по полу методами доинкубационного взвешивания яиц и визуальной оценки гонад [Электронный ресурс] / Г.Н. Блажнова, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, А.П. Пономаренко // *Современные проблемы науки и образования.* – 2014. – № 4. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/118-13996> (дата обращения: 21.07.2014).
 26. Болотников, И.А. Иммунопрофилактика инфекционных болезней птиц / И.А. Болотников. – М.: Россельхозиздат, 1982. – 183 с.

27. Бондаренко, Ю.В. Генетические основы выведения и использование ауто-сексной птицы: автореф. дис. ... д-ра биолог. наук / Ю.В. Бондаренко. – Харьков. 1995. – 48 с.
28. Бондаренко, М.Ю. Сравнительная характеристика и современная классификация методов определения пола сельскохозяйственной птицы (Аналитический обзор) / М.Ю. Бондаренко, Омар Хусейн Али // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво». – 2013. - Вип. 7. - № 23. – С. 111-120.
29. Будиков, О.М. Генетические, биохимические и физиологические основы дифференциации куриных яиц по полу до инкубации / О.М. Будиков // Физиолого-биохимические основы повышения продуктивности с.-х. животных. – М.: Колос, 1971. – С. 171- 183.
30. Бурьян Марлен, Одноступенчатая инкубация – естественный выбор / Бурьян Марлен // Птицеводство. – 2005. - №5. – С. 10-12.
31. Бутенко, В.Д. Акустический способ определения пола цыплят суточного возраста: дис. ... канд. с-х. наук: 06.02.04 / В.Д. Бутенко. – Волгоград, 2002. – 143 с.
32. Вавилова, О.В. Развитие иммунокомпетентных органов кур в антенатальном онтогенезе под влиянием «Ксидифона» и «Иммунала»: дис. ... канд. ветеринар. наук: 06.02.01 / О.В. Вавилова. – Великие Луки, 2010. – 125 с.
33. Викторов, П.И. Методика опытного дела в животноводстве: учебное пособие КСХН / П.И. Викторов. – 1983. – 113 с.
34. Волкова, Т.О. Молекулярные механизмы апоптоза лейкозной клетки / Т.О. Волкова, Н.Н. Немова. – М.: Наука, 2006. – 205 с.
35. Волянский, Ю.Л. Молекулярные механизмы запрограммированной клеточной гибели / Ю.Л. Волянский, Т.Ю. Колотова, Н.В. Васильев // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114. – Вып.6. – С. 679-692.
36. Вракин, В.Ф. Анатомия и гистология домашней птицы / В.Ф. Вракин, М.В. Сидорова. - М.: Колос, 1984. – 288 с.

37. Вракин, В.Ф. Морфология сельскохозяйственных животных. Анатомия с основами цитологии, эмбриологии и гистологии / В.Ф. Вракин, М.В. Сидорова. - М.: Агропромиздат, 1991. – 528 с.
38. Гаврилов, А.А. Характеристика пространственной организации домена α -глобиновых генов кур: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.03 / А.А. Гаврилов. – Москва, 2008. – 24 с.
39. Генчев, А.Г. Рост и развитие эмбрионов в зависимости от их пола и возраста кур бройлерного типа / А.Г. Генчев, А.К. Османян // Известия ТСХА. – 1996. – Вып. 4. – С. 179-188.
40. Гилберт, С. Биология развития: в 3-х т. Пер. с англ. / С. Гилберт – М.: Мир, 1993. – Т. 1. – 228 с.
41. Глик, Б. Рост, жизнеспособность иммунная реакция и воспроизводительная способность птиц, выведенных из яиц, погружаемых в растворы, содержащие пропионат тестостерона / Б. Глик // Труды 13 Всемирного конгресса по птицеводству. - Киев. – 1966. – С. 297-300.
42. Голубцова, В.А. Морфофункциональные изменения органов кроветворения эмбрионов кур при разных режимах инкубации: дис. ... канд. биол. наук: 16.00.02 / В.А. Голубцова. – М., 2008. – 130 с.
43. Гофман, Д.Н. Развитие скелета крыла в эмбриогенезе птиц разных типов размножения / Д.Н. Гофман, Н.Н. Ротт // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отделение биологии. – 1961. - Т. 66. № 1. – С. 40-53.
44. Гром, А. Изучение некоторых физиологически-биохимических вопросов регуляции соотношения пола у птицы / А. Гром, М. Галай, Ш. Иванко, И. Киселевич [и др.] // Труды 13 Всемирного конгресса по птицеводству. Киев. – 1966. - С. 549.
45. Гурфинкель, В.С. Скелетная мышца: структура и функция / В.С. Гурфинкель, Ю.С. Левик. – М.: Наука, 1985. – С. 6-83.
46. Данилов, Р.К. Развитие нервно-мышечных взаимодействий в онтогенезе позвоночных и человека / Р.К. Данилов, А.Г. Маннапов // Успехи современной биологии. – 1990. – Т. 110. – Вып. 1. - №4. – С. 134-142.

47. Дегтярева, С.П. Методика опытного дела / С.П. Дегтярева, С.Л. Сафронов. Методические указания - СПбГАУ, Санкт-Петербург.: – 2011. – 19 с.
48. Дживанян, А.К. К сравнительному эмбрио-гистогенезу скелета конечностей птиц при некоторых типах размножения: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.К. Дживанян. – Ереван, 1965. – 22 с.
49. Долгорукова, А.М. Эмбриональное развитие мясных кур в зависимости от возраста птицы, морфологического и биохимического состава яиц: дис. ... канд. биол. наук 03.00.13 / А.М. Долгорукова. – Боровск, 2007. – 140 с.
50. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / Л.П. Дьяконов, В.И. Ситьков. М. Компания Спутник+, 2000. – 400 с.
51. Дыбан, А.П. Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ / А.П. Дыбан, В.С. Баранов, И.М. Акимова // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1970. – Т.59. – № 10. – С. 89-100.
52. Егорова, А.В. Биотехнологические методы использования генов-модификаторов при создании новых селекционных форм color- и feathersex color feathersex птицы / А.В. Егорова, Я.С. Ройтер, А.А. Севастьянова и др. // Проблемы биологии продуктивных животных. — 2011. — № 1. — С. 23–26.
53. Жижина, Г.П. Роль апоптоза в нормальном онтогенезе, патогенезе и старении / Г.П. Жижина // Клиническая геронтология. – 2002. – Т. 8. – № 4. – С. 3-10.
54. Жмурин, Л.М. Влияние аминокислот на формирование пола у кур / Л.М. Жмурин, В.И. Михайлов // Труды 13 Всемирного конгресса по птицеводству, Киев – 1966. – С. 277-280.
55. Жмурин, Л.М. Активность цитохромоксидазы в тканях куриных эмбрионов, развивавшихся под влиянием аминокислот / Л.М. Жмурин, И.А. Бурков // Бюллетень ВНИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. – 1968. – Вып. 1. - № 5. – С. 39-41.

56. Жмурин, Л.М. Влияние белковых препаратов на дифференциацию пола и развитие куриных эмбрионов / Л.М. Жмурин // Бюллетень ВНИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. – 1968. – Вып. 2. - № 6. – С. 19- 23.
57. Жмурин, Л.М. Аминокислотный состав тканей эмбрионов в связи с дифференциацией их пола под влиянием аминокислот / Л.М. Жмурин, Л.П. Сергеева // Бюллетень ВНИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. – 1968. – Вып. 3. - № 7. – С. 15- 23.
58. Жмурин, Л.М. Влияние глицина и аспарагиновой кислоты на показатели липидного обмена куриных эмбрионов / Л.М. Жмурин, Л.П. Сергеева // Бюллетень ВНИИ физиологии и биохимии с.-х. животных. – 1968. – Вып. 4. - № 8. – С. 8- 12.
59. Жуков, В.М. Деформации скелета птиц / В.М. Жуков. – Барнаул, 1993. – 122 с.
60. Забудский, Ю.И. Стресс-устойчивость рано и поздно вылупившихся цыплят разного пола в зависимости от продолжительности пребывания в инкубаторе / Ю.И. Забудский // Сельскохозяйственная биология. – 2002. - №6. – С. 15-22.
61. Задарновская, Г.Ф. Сравнительные материалы по эмбриогенезу домашних птиц: дис. ... д-ра биол. наук / Г.Ф. Задарновская. – Ставрополь, 1966. – 426 с.
62. Зеленина, Н.В. Программированная клеточная гибель в эмбриогенезе / Н.В. Зеленина, Р.К. Данилов // Глава 5 в книге Новикова В.С. Программированная клеточная гибель. СПб.: «Наука». – 1996. - С.79-89.
63. Зенкина, В.Г. Регуляторы апоптоза и механизм их действия в женской гонаде / В.Г. Зенкина, В.С. Каредина, О.А. Солодкова, А.О. Михайлов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2010. - №7. – С. 7-14.
64. Зелятров, А.В. Прогнозы развития производства бройлеров к 2000 году зарубежом / А.В. Зелятров, // Птицеводство. – 1981. - № 9. – С. 39-40.

65. Иванов, В.Г. Различная чувствительность самцов и самок эмбрионов кур / В.Г. Иванов // Доклады Академии наук СССР. – 1955. – Т. 100. - № 4. – С. 829-832.
66. Игнатьева, Г.А. Противоопухолевый эффект конъюгата альфа-фетопротеина с ристицином / Г.А. Игнатьева, А.Ю. Топтыгин, Л.С. Сеславина, И.Г. Сидорович // 1-ая Национальная конференция Российской ассоциации аллергологов, клинической иммунологии и иммунофармакологии. М. - 1997. - С. 269.
67. Изаак, С.И. Проявление типа конституции в физическом и моторном развитии детей дошкольного возраста / С.И. Изаак, В.Д. Сонькин // Методы исследования физического развития детей и подростков в популяционном мониторинге. – М.: 1999. – С. 191-205.
68. Изаак, С.И. Физическое развитие и биоэнергетика мышечной деятельности школьников / С.И. Изаак, Т.В. Панасюк, Р.В. Тамбовцева. – Москва – Орел: ОРАГС, 2005. – 224 с.
69. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации альфа-фетопротеина в сыворотке крови: ЗАО «Вектор Бест». – Кольцово, 2008. – 21 с.
70. Калинич О.А., Постинкубационный морфогенез скелета и мышц свободной грудной конечности у самок японских перепелов: дис... к-т. биол. наук: 16.00.02 / О.А. Калинич. – Брянск, 2009. – 194 с.
71. Карлсон, Б. Основы эмбриологии по Пэттену: Пер. с англ. – М.: Мир, Т. 2. – 1983. - 390 с.
72. Каркищенко, Н.Н. Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2005. – 608 с.
73. Каркищенко, Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2007. – 320 с.
74. Капанадзе, Г.Д. Биологические и зоотехнические особенности светлогорских мини-свиней, их совершенствование и рациональное использование 06.02.10: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Г.Д. Капанадзе – Москва, 2011. – 47 с.

75. Каузова, А.С. Морфофункциональные особенности эмбрионов крыс, получавших в период беременности новый биологически активный препарат на основе эмбрионально-яичной массы и растительного сырья: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.30 / А.С. Каузова. – Ставрополь, 2009. – 186 с.
76. Коржуев, П.А. Различия в количестве крови и весе скелета в эмбриональный период у млекопитающих и птиц / П.А. Коржуев // Тр. ин-та. морфологии животных им. А.Н. Сервцева. - М. – 1960. - С. 51-58.
77. Кочиш, И.И. биология сельскохозяйственной птицы // И.И. Кочиш, Л.И. Сидоренко, В.И. Щербатов. – Москва: «КолосС», 2005. – 202 с.
78. Крок, Г.С. Микроскопическое строение органов сельскохозяйственных птиц с основами эмбриологии / Г.С. Крок. – Киев, 1962. – 187 с.
79. Кузьмина, М.А. Морфофункциональные особенности задних конечностей куриных / М.А. Кузьмина // Труды института зоологии АН КазССР, 1964. - Т. 24. – С. 90-120.
80. Кузнецов, В.М., Основы научных исследований в животноводстве / В.М. Кузнецов. - Киров: Зональный НИИСХ Северо-Востока, 2006. – 568 с.
81. Кутырева, Т.С. Соотношение деструктивных и пролиферативных процессов в печени куриных эмбрионов разных сроков развития. / Т.С. Кутырева // Онтогенез: Учеб. пособие. М.: 1971. - т. 2. - № 6. - С. 591 - 593.
82. Кутырева, Т.С. Формы клеточных деструкций в ходе развития эмбриональной печени кур / Т.С. Кутырева // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1980. – Т. 78. – №5. – С. 64-69.
83. Лагутов, П.А. Эффективность применения зеленой подкормки, выращенной с использованием сапропеля, в рационе цыплят-бройлеров / П.А. Лагутов // Птица и птицепродукты. – 2010. - №5. – С. 51-55.
84. Лазаревич, Н.Л. Молекулярные механизмы регуляции экспрессии гена альфа-фетопротеина / Н.Л. Лазаревич // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – Вып. 1. – С. 139-158.
85. Левина, С.Е. Очерки развития пола в раннем онтогенезе высших позвоночных. М., Изд-во: «Наука», 1974. – 238 с.

86. Лушников, Е.Ф. Гибель клетки / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов. – М.: Медицина, 2001. – 192 с.
87. Максимов, В.Ф. Развитие миокарда у куриного эмбриона при ограничении внешнего дыхания / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская // Морфология. – 2009. – Т. 135. - № 2. – С. 38-42.
88. Маляренко, Т.Н. Возрастная физиология / Т.Н. Маляренко, Г.В. Кураев, Ю.Е. Маляренко. - 2-е изд., перераб. и доп. – М., 2000.
89. Матвеева, Н.Ю. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы / Н.Ю. Матвеева // Pacific Medical Journal. – 2003. - № 4. - С. 12-16.
90. Матвеева, Н.Ю. Ультраструктурная характеристика апоптоза ганглиозных клеток сетчатки плодов человека / Н.Ю. Матвеева // Тихоокеанский медицинский журнал, 2004. - № 3. – С. 21-23.
91. Матвеева, Н.Ю. Онтогенетические различия ганглиозного слоя сетчатки глаза плодов человека / Н.Ю. Матвеева, Н.Е. Романова // Тихоокеанский медицинский журнал, 2004. - №2. - С.26-28.
92. Матвеева, Н.Ю. Роль оксида азота в апоптозе нейронов сетчатки глаза плодов человека / Н.Ю. Матвеева, С.Г. Калиниченко, И.И. Пушин, П.А. Мотавкин // Морфология. – 2006. – Т. 129. - №1. – С. 43-48.
93. Маханьков, О.В. Динамика морфологических изменений ожоговой раны кожи после аппликации с экстрактом эмбриональной печени и воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения (экспериментальное исследование) // О.В. Маханьков, В.А. Сумеркина / Вестник ОГУ. – 2006. - № 12. – С.143 - 145.
94. Микляева, М.А. Особенности раннего онтогенеза экологически различных групп птиц / М.А. Микляева, Л.Ф. Скрылева. – Мичуринск, 2001. – 133 с.
95. Мишкова, Т.А. Морфофункциональные особенности и адаптационные возможности современной студенческой молодежи в связи с оценкой физического развития: автореф. дис... к-т биол. н., - Москва, 2010. – 24 с.

96. Моисеева, И.Г. Влияние породы и коррелятивной изменчивости на качество куриных яиц / И.Г. Моисеева, Е.В. Толоконникова // Доклады АН СССР, серия Биология. -1970. - № 4. – С. 941-944.
97. Новиков, В.С. Программированная клеточная гибель / В.С. Новиков. - СПб.: Наука, 1996. – 276 с.- ISBN 5-02-026059-2.
98. Новиков, Д.А. Статистические методы в медико-биологическом эксперименте (типовые случаи) / Д.А. Новиков, В.В. Новочадов. Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2005. – 84 с.
99. Ноймейстер, Х. Наблюдения окостенения скелета эмбриона курицы / Х. Ноймейстер // Труды XIII Всемирного конгресса по птицеводству. – Киев. – 1966. – С. 543-548.
100. Общая врачебная практика по Джону Нобелю / Под ред. Дж. Нобеля. - М.: Практика, 2005. - 1760 с.
101. Овсянников, А.И. Основы опытного дела в животноводстве. М. «Колос», 1976. – 304 с.
102. Орлова, И.И. Физиологические деструктивные процессы в эмбриогенезе / И.И. Орлова // Успехи современной биологии. – 1972. – Т 73. – Вып. 1. – С. 96-112.
103. Отрыганьев, Г.К. Инкубация / Г.К. Отрыганьев, В.А. Хрымов, Г.М. Колобов. М.: Изд-во «Колос», 1964. – 288 с.
104. Отрыганьев, Г.К. Рождение птицы. - Изд-во 2-е, доп. М.: Колос, 1970. – 112 с.
105. Патент РФ № 2463591. Способ отбора куриных эмбрионов / Е.Е. Тяпугин, Т.А. Скотникова, В.И. Фисинин и др. 2011106675/10: заяв. 22.02.2011, опубл. 10.10.2012.
106. Пельтцер, С.О. Круглогодичная инкубация куриных яиц: автореф. дис. ... док. с/х. наук: № 553 / С.О. Пельтцер. – Москва, 1969. – 36 с.
107. Побединский, Н.М. Содержание трофобластического бета-1 гликопротеина и альфа-фетопропротеина в сыворотке крови при физиологически протекающей беременности / Н.М. Побединский, Н.И. Размахина, Л.С. Александров и др. // Акушерство и гинекология. – 1991. - № 7. - С. 18-21.

108. Половинцева, Т.М. Рост и развитие органов движения кур в антенатальном онтогенезе при разных режимах инкубации: дис. ... канд. биол. наук 16.00.02 / Т.М. Половинцева. – Москва, 2008. – 120 с.
109. Половинцева, Т.М. Развитие костей тазовой конечности эмбрионов кур при изменении температурно-влажностного режима / Т.М. Половинцева, Ф.И. Сулейманов // Онтогенез. – 2008. – Т. 39. - № 3. – С. 227-230.
110. Прокудина, Н.А. Гистологическая картина 7-суточных куриных эмбрионов кур при использовании 4-кратных доз ретинола и α -токоферола / Н.А. Прокудина, П.Ф. Сурай, В.А. Бреславец // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: IV Междунар. научно-практич. конф. – Горки-Беларусь, 1998. – С. 308-312.
111. Рагозина, М.Н. Развитие зародыша домашней курицы в его соотношении с желтком и оболочками яйца. М.: Академия наук, 1961. – 168 с.
112. Ржепаковский, И.В. Разработка биостимулятора эмбрионального и оценка его эффективности при иммунодефицитных состояниях у животных раннего возраста: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23;16.00.02 / И.В. Ржепаковский. – Ставрополь, 2003. – 157 с.
113. Родионов, С.Ю. К вопросу о механизмах противоопухолевой активности альфа-фетопротейна человека *in vitro* / С.Ю. Родионов, О.В. Лебединская, М.В. Киселевский и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2006. - №3. – С. 41-47.
114. Ройтер, Я.С. Использование генов модификаторов при селекции колор- и федерсексной птицы / Я.С. Ройтер, А.В. Егорова, А.А. Севастьянова и др. // Доклады РАСХН. – 2011. - № 5. – С. 42-45.
115. Ройтер, Я.С. Биотехнологические методы использования генов-модификаторов при селекции колор- и федерсексной птицы / Я.С. Ройтер, А.В. Егорова, Т.Н. Дегтярева, О.Л. Амелина и др. // Вестник РАСХН. – 2012. - № 3. – С. 61-63.
116. Рольник, В.В. Методика изучения газообмена эмбрионов птиц / В.В. Рольник // Физиологический журнал СССР. 1963. – Вып. 49 - № 8. – С. 1000.

117. Рольник, В.В. Газообмен развивающегося куриного эмбриона / В.В. Рольник, Э.Л. Портенко // Журнал общей биологии, 1964. – Вып. 25 - № 2. – С. 133.
118. Рольник, В.В. Биология эмбрионального развития птиц. – Ленинградское отделение: Изд-во «Наука», 1968. – 425 с.
119. Руководства и рекомендации для Европейских независимых комитетов по вопросам этики // Европейский форум по качественной клинической практике. - Брюссель, 1995, 1997.
120. Рекомендации Комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. – Женева, 2000.
121. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Под ред. Каркищенко Н.Н., Грачевой С.В. – М.: - 2010. – 336 с.
122. Савельева, А.В. Возрастно-половые особенности физического развития студентов Арзамасского медицинского колледжа / А.В. Савельева, С.А. Сабурцев, Г.А. Трофимова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. - № 2. – С. 678-681.
123. Саламатин, А.В. Изменчивость содержания яичного желтка, использование питательных веществ яйца эмбрионом, неонатальный рост и эффективность репродукции мясных кур: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / А.В. Саламатин, – Москва, 2004. – 129 с.
124. Сахер, А-А.И. Рост и развитие куриных эмбрионов яичных кроссов при освещении яиц во время инкубации: дис. ... канд. с/х. наук: 06.02.04 / А-А.И. Сахер, – Москва, 2001. – 87 с.
125. Светлаков, А.В. Апоптоз в преимплантационном эмбриогенезе (обзор литературы) / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина // Проблемы репродукции. – 2002. - № 5. – С. 15-23.
126. Солдатова, И.Б. Закономерности роста эмбрионов, развития слуховых ядер продолговатого мозга и метаболизма выводковых птиц (на примере домашней курицы *Gallus gallus*): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.08 / И.Б. Солдатова, – Москва, 2008. – 136 с.

127. Старчиков, Н. Влияние отдельного выращивания курочек и петушков на их рост, развитие и продуктивные качества / Н. Старчиков, А. Догадаев // Передовой науч-произв. опыт в птицеводстве: Экспресс информация. – 1983. - № 4. – С. 14-16.
128. Сулейманов, Ф.И. Морфология мышц и костей кур в онтогенезе при выпайивании омагниченной воды и скармливания бактериальных препаратов (изменения мышц и костей грудки и окорочков): автореф. дис.... канд. ветерин. наук: 16.00.02 / Ф.И. Сулейманов. – Воронеж, 1987. – 18 с.
129. Сулейманов, Ф.И. Онтогенез домашней утки и влияние на него биостимулятора роста (морфофункциональная, биохимическая и сравнительно-видовая характеристика): дис.... д-р. ветерин. наук: 16.00.02 / Ф.И. Сулейманов. – Бишкек, 1999. – 326 с.
130. Суханова, Г.А. Апоптоз / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева. – Томск: Изд-во ТПУ. – 2006. – 172 с. – ISBN 5-94440-008-0.
131. Сухих, Г.Т. Апоптоз в гормонально-зависимых тканях репродуктивной системы / Г.Т. Сухих, М.М. Дементьева, В.Н. Серов и др. // Акушерство и гинекология. 1999. - № 5. – С. 12-14.
132. Таов, И.Х. Влияние возраста коров на течение беременности, морфофункциональные, продуктивные показатели и репродуктивный потенциал их потомства: дис.... докт. с/х. наук: 06.02.01 / И.Х. Таов. – Нальчик, 2004. – 306 с.
133. Тагиров, М.Т. Смещение полового соотношения у кур после продолжительного хранения яиц / М.Т. Тагиров // Биотехнология - 2010. – Т. 3. – № 3. – С. 84-90.
134. Татаринцев, Ю.С. Прошлое и будущее онко-фетальных белков / Ю.С. Татаринцев // Лекция к актовому дню института 14 ноября 1988 г. – М., 1988.
135. Терентьев, А.А. Короткие АФП – подобные мотивы онкофетальных белков как возможные структурные маркеры их общих функций / А.А. Терентьев, Н.Т. Молдогазиева, И.М. Мохосоев // Современные наукоемкие технологии. - 2008. – № 5. – С. 50-53.

136. Терентьев, А.А. 45 лет альфа-фетопротеину как диагностическому биомаркеру / А.А. Терентьев, Ю.С. Татаринов, Д.М. Никулина // Астраханский медицинский журнал (приложение): Мат-лы 6-й междунар. научно-практ. конф. «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (г. Астрахань, 8-11 сентября 2008 г.). – 2008. - № 3. – С. 3-6.
137. Тимченко, Л.Д. Новый стимулятор роста микроорганизмов / Л.Д. Тимченко, Н.В. Косик // Материалы научной конференции «Университетская наука - региону». – Ставрополь: СКГТУ, 2004. – С. 220.
138. Тимченко, Л.Д. Основы микроскопической техники для биолога: Учебное пособие / Л.Д. Тимченко, В.Н. Вакулин – Ставрополь: СГУ, 2005. – 164 с.
139. Тимченко, Л.Д. Содержание альфа-фетопротеина (АФП) в эмбрионах кур на ранних стадиях эмбриогенеза / Л.Д. Тимченко, А.П. Трунова, В.Н. Стрекалова, С.В. Черников // Проблемы развития биологии и экологии на Северном Кавказе: Мат-лы 52 научн. конф. «Университетская наука – региону». – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2007. – С. 245-246.
140. Тимченко, Л.Д. Взаимосвязь массы печени с содержанием альфа-фетопротеина в крови куриных эмбрионов в процессе развития / Л.Д. Тимченко, А.П. Трунова, В.Н. Стрекалова, С.В. Черников [и др.] // Проблемы развития биологии и экологии на Северном Кавказе: Мат-лы 53 научн. конф. «Университетская наука – региону». – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2008. – С. 182-184.
141. Тимченко, Л.Д. Содержание альфа-фетопротеина в гомогенате куриного эмбриона в процессе развития / Л.Д. Тимченко, А.П. Трунова, С.В. Черников, Р.В. Горбовский, Г.Н. Блажнова // Астраханский медицинский журнал (приложение): Мат-лы 6-й междунар. научно-практ. конф. «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (г. Астрахань, 8-11 сентября 2008 г.). – 2008. - № 3. – С. 44-47.
142. Тимченко, Л.Д. Содержание альфа-фетопротеина в гомогенате куриного эмбриона и его взаимосвязь с морфометрическими показателями роста и развития организма / Л.Д. Тимченко, А.П. Пономаренко, С.В. Черников // Вестник

- Московского государственного областного университета. Серия «Естественные науки». – 2009. - № 3. – С. 70-73.
143. Тимченко, Л.Д. Выявление гена *p53* методом ПЦР у куриного эмбриона / Л.Д. Тимченко, Г.Н. Блажнова, А.П. Пономаренко // Управление функциональными системами организма: Мат-лы междунар. научно-практ. интернет конф., посвященной 80-летию каф. физиологии СтГАУ. – Ставрополь: Изд-во ООО Респект, 2010. – С. 28-31.
144. Тимченко, Л.Д. Динамика уровня апоптоза в гомогенате куриного зародыша во взаимосвязи с абсолютным приростом массы тела в процессе эмбриогенеза / Л.Д. Тимченко, Г.Н. Блажнова, А.П. Пономаренко // Вестник Московского государственного областного университета. Серия «Естественные науки». – 2010. – № 1. – С. 66-70.
145. Тимченко, Л.Д. Взаимосвязь уровня альфа-фетопротейна и апоптоза в процессе развития куриного эмбриона / Л.Д. Тимченко, С.В. Черников, Г.Н. Блажнова // Аграрная Россия. Научно-производственный журнал. – 2010. – № 5. – С. 53-54.
146. Тимченко, Л.Д. Динамика уровня апоптоза, тестостерона и эстрадиола у разнополых куриных эмбрионов в процессе развития / Л.Д. Тимченко, Г.Н. Блажнова // Современные проблемы патологической анатомии, патогенеза и диагностики болезней животных: Мат-лы 17-й Всероссийской научно-методич. конф. по патологической анатомии животных. – Москва: Изд-во ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, 2011. – С. 198-200.
147. Тимченко, Л.Д. Показатели физического развития куриного эмбриона / Л.Д. Тимченко, Д.А. Арешидзе, С.В. Черников, Г.Н. Блажнова // Вестник Московского государственного областного университета. Серия «Естественные науки». – 2011. - № 3. – С. 98-101.
148. Тимченко, Л.Д. Комплексный подход к оценке признаков половых различий у куриных эмбрионов // Л.Д. Тимченко, Г.Н. Блажнова, // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Мат-лы IV Междунар. научн.-

- практ. конф. (г. Ростов-на-Дону, 22-25 сентября 2011 г.). – Ростов н/Дону: Изд-во СКНЦ ВШ ЮФУ, 2011. – С. 185.
149. Тимченко, Л.Д. Физическое развитие разнополых куриных эмбрионов в онтогенезе / Л.Д. Тимченко, Г.Н. Блажнова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/118-14183> (дата обращения: 06.08.2014).
150. Тинькова Е.Л. Клинический статус, морфогенез плаценты овец, серопозитивных к кокциеллезному антигену, и особенности пренатального и раннего постнатального развития их потомства: автореф. дис. ... доктора биол. наук. – Новочеркасск, 2013–37 с.
151. Ткачук, В.А., Осадчий О.Е. Гормональная регуляция физиологических функций. Глава 5 в кн. Физиология человека. Под ред. В.М. Покровского, Г.Ф. Коротько. Изд-во: М. – Медицина. - 1997. - Т. 1. – С. 242-272.
152. Токин, Б.П. Общая эмбриология / Б.П. Токин. – М.: Высшая школа, 1970. – 507 с.
153. Третьяков, Н.П. Инкубация с основами эмбриологии / Н.П. Третьяков, Г.С. Крок. – М.: Колос, 1968. – 248 с.
154. Третьяков, Н.П. Инкубация с основами эмбриологии / Н.П. Третьяков, Б.Ф. Бессарабов, Г.С. Крок. – М.: Агропромиздат. – 1990. – 192 с.
155. Трунова, А.П. Куриный эмбрион как экспериментальный и сырьевой объект для биологии, медицины и биотехнологии / А.П. Трунова // Естествознание и гуманизм. – 2005. – Т. 2. - № 5. – С. 100.
156. Трунова, А.П. Особенности развития и иммуногенез куриного эмбриона под влиянием амброзийного антигена: дис. ... канд. биол. наук 03.00.30 / А.П. Трунова. – Ставрополь, 2008. – 181 с.
157. Тяпугин, Е.Е. Оценка и отбор яичных кур по показателям эмбрионального развития: дис. ... канд. биол. наук 06.02.07 / Е.Е. Тяпугин. – Дубровицы, 2013. – 112 с.
158. Фильченков, А.А. Апоптоз и рак / А.А. Фильченков, Р.С. Стойка. – Киев: МОРИОН, 1999. – 182 с.

159. Фисинин, В.И. Эмбриональное развитие птицы / В.И. Фисинин, И.В. Журавлёв, Т.Г. Айдинян. М. Агропромиздат. – 1990. – 240 с.
160. Фисинин, В.И. Резервы повышения выхода мяса от мясных кур методами племенной работы // В.И. Фисинин, А.В. Егорова, Е.С. Елизаров и др.. Сергиев Пасад, 2005. – 47 с.
161. Хамхоев, Р.Т. Адаптивность и продуктивные качества родительских стад и бройлеров отечественных мясных кроссов в условиях Республики Ингушетия: автор. дис.... к-т. с-х. наук: 06.02.04 / Р.Т. Хамхоев. – Ставрополь, 2004. – 24 с.
162. Хохлов, Р.Ю. Функциональная морфология органов размножения кур в онтогенезе: дис. ... док. биол. наук: 16.00.02 / Р.Ю. Хохлов. – Уфа, 2009. – 480 с.
163. Хрусталева, И.В. О взаимосвязи живой массы и массы скелета у молодняка кур-несушек / И.В. Хрусталева, Б.В. Криштофорова // Сб. научных трудов МВА. – М., 1988. – Т. 100. – С. 67-69.
164. Цимоха, А.С. Изменение состава и ферментативных активностей протеасом при апоптозе в клетках K562: автореф. дис. ... канд. биол. наук 03.00.03 / А.С. Цимоха. – СПб, 2007. – 31 с.
165. Черешнев, В.А. Альфа-фетопропротеин / В.А. Черешнев, С.Ю. Родионов, В.А. Черкасов, Н.Н. Малютина [и др.]. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, – 2004. – 376 с.
166. Черников, С.В. Использование иммуноферментного метода для определения уровня альфа-фетопропротеина в гомогенате куриного эмбриона / С.В. Черников // Биоразнообразие, биоресурсы, новые материалы и здоровье населения региона: Мат-лы 56 научн. метод.-конф. «Университетская наука – региону». – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2011. – С. 181-185.
167. Черников, С.В. Динамика альфа-фетопропротеина, минеральных элементов и показатели физического развития у куриных эмбрионов в онтогенезе: дис. ... канд. биол. наук 03.03.05 / С.В. Черников. – Ставрополь, 2012. – 168 с.
168. Чумаков, П.М. Функция гена *p53*: выбор между жизнью и смертью (обзор) / П.М. Чумаков // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – Вып. 1. – С. 34.

169. Шабалдин, А.В. Роль альфа-фетопротеина в патогенезе врожденных пороков развития плода / А.В. Шабалдин, Т.А. Симонова, Г.В. Лисаченко // *Мать и дитя*. – 2007. - №3. – С. 16-19.
170. Шейнис, С.А. Питание куриного зародыша в последние дни инкубации / С.А. Шейнис // *Доклады Академии наук СССР*. – 1954. – Т. ХСVI. – С. № 5. – С. 1077-1080.
171. Шилов, В.Н. Молекулярные механизмы структурного гомеостаза / В.Н. Шилов. – М.: «Интерсигнал», 2006. – 288 с.
172. Шмагель, К.В. Использование математического моделирования для получения значений нормы сывороточных показателей, характеризующих функцию фето-плацентарного комплекса / К.В. Шмагель // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 1995. - № 3. – С. 28-32.
173. Шмагель, К.В. Альфа-фетопроtein: строение, функции и роль в эмбриогенезе / К.В. Шмагель, В.А. Черешнев // *Акушерство и гинекология*. – 2002. - № 5. – С. 6-8.
174. Шмагель, К.В. Альфа-фетопроtein: диагностическое значение в акушерстве / К.В. Шмагель, В.А. Черешнев // *Акушерство и гинекология*. – 2002. - № 5. – С. 8-11.
175. Шмагель К.В., Черешнев В.А. Иммуитет беременной женщины. М.: Медицинская книга: Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2003. - 226 с.
176. Шмальгаузен, И.И. Рост и дифференцировка / И.И. Шмальгаузен – Киев: Наукова думка, 1984. – Т.1. – 176 с.
177. Шредер, В.Н. Физиология и биохимия возникновения и регуляции пола потомства. – М.: Наука, 1965. – С. 138-141.
178. Ярилин, А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // *Пат. физиол.* – 1998. – № 2. – С. 38-48.
179. Araya, M. Gastrointestinal symptoms and blood indicators of copper load in apparently healthy adults undergoing controlled copper exposure / M. Araya, M. Olivares, F. Pizarro et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2003. – Vol. 77. – P. 646-650.

180. Bartha, J.L. Relationship between alpha-fetoprotein and fetal erythropoiesis / J.L. Bartha, R. Comino-Delgado [et al] // *J. Reprod. Med*, 1999. - Vol. 44. - № 8. - P. 689-697.
181. Borzemska, W. Der einfluss von Mikroklima des Geflugeistalles auf die Embriophatogenese bei Huhnern / W. Borzemska, T.M. Janowski, J. Niedziotka // *Proc. 3 Int. Kongr. Tierhyg., Wien.* – 1980.
182. Bellairs, R. // *Journal Anatom*, 1961. - Vol. 95. - P. – 54.
183. Burke, W.H. Comparison of embryos and chicks that developed as single individuals in double yolk eggs with whose that developed in single yolk eggs /W.H. Burke, M.N. Henry, I. Elezaj // *Poultry Sc.* 1997. - Vol. 76. - № 6. - P. 901-907.
184. Chen, Y. Shaping limbs by apoptosis / Y. Chen, X. Zhao // *Journal Exp. Zool.* - 1998. - Vol. 282. - P. – 691-702.
185. Coligado, E.C. The relation of length of incubation period to growth mortality and sex ratio in single comb white leghorn chicks / E.C. Coligado // *Philipp. Agr.*, 1953. - № 37. – P. – 111.
186. Deleanu, M. // *Revue Roumaine d'Embryologie et de Cytologie., ser. Embryol.*,1964 / - V. 1. - № 61. - P. 229.
187. Пат. 06365339 USA, МКИ С 12 Q 100. Gender determination of avian embryo / K.A. Duum, D.A. Athinson (USA)/ Заяв. 2.09.99. Оpubл. 02.04.2002. - 2с.
188. Gallien, I. / I. Gallien, *Le Foulgos* // *Compt. Rend Soc. boil.*, 1957 / - V. 151. - P. 1088.
189. Пат. 06176119 USA, А 01 JI 4500. Method for localizing allantois fluid of avian eggs / Gore A.K., Bryan T. (USA); Embrex, Inc. – Заяв. 20. 10. 98; Оpubл. 23.01.2001. – 2с.
190. Hamburger, V. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* —1952. — V. 55. — P. 117.
191. Holder, N. The onset of osteogenesis in the developing chick limb / N. Holder // *J. Åmbryol. Åxperim. Morphol.* —1978. — V. 44. — P. 15–29.
192. Henderson, E.W. Which chicks hatch first – male or female? / E.W. Henderson // *Michigan State Univ. Agric. Exptl. Sta. Quart. Bull.* – 1956. - V. 38. — № 3. - P. 362.

193. Пат. 06244214 USA, A 01 K 4300. Concurrent in ovo injection and detection method and apparatus / Hebrank J.H. (USA); Embrex, Inc. — Заяв. 22.12.99; Оpubл. 12.06.2001. — 2с.
194. Jacobson, M. Programmed cell death in animal development / M. Jacobson, M. Weil, M. Raff // *Cell*. — 1997. — V. 88. — P. 347-354.
195. Kerr, J.F.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics / J.F.R. Kerr, A.N. Wyllie and A.R. Currie // *The British Journal of Cancer*. — 1972. — V. 26. — № 4. — P. 239-257.
196. Kosin, I.L. Evidence of a sex differential in the utilization of shell calcium by the chick embryo / I.L. Kosin, S.S. Munro // *Sci. Agr.* — 1941. — V. 21. — P. 315.
197. Kürtül, İ. Ossification and Growth of the Bones of the Wings and Legs in Prehatching Period of the Hubbert Strain Broiler / İ. Kürtül, Ş.H. Atalgin, K. Aslan, E.Ü. Bozkurt // *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* — 2009. — V. 15. — № 6. — P. 869-874.
198. Klein, S. Sexing the freshly laid egg-development of embryos after manipulation; analytical, approach and localization of the blastoderm in the intact egg / S. Klein, U. Baulain, M. Rokitta, G. Marx, J. Thielebein, F. Ellendorff // *World's Poultry Sci. Journal*. — 2003. — V. 59. — №1. — P. 39-45.
199. Klein, S. Management of newly hatched male layer chicks-current knowledge on sex determination and sex diagnosis in chicken: poultry / S. Klein, D. Flock, F. Ellendorff // *World's Poultry Sci. Journal*. — 2003. — V. 59. — №1. — P. 62-64.
200. Laderrou, M.P. / M.P. Laderrou, L.M. Pilarski // *Anticancer Res.* — 1994. — Vol. 14. — P. 2429-2438.
201. Lanot, R. // *Compt. rend. Soc. boil.* — 1980. — Vol. 174. — № 1. — P. 11.
202. Logsdon, M.D. Apoptosis and the Bcl – 2 gene family – patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma / M.D. Logsdon, R.E. Meyn, P.C. Besa et al. // *Int. of Radiat. Oncol. Biol. Phys.* — 1999 — V. 44. — P. 19-29.
203. Marks, M.L. Sexual dimorphism in early feed and water intake of broilers / M.L. Marks // *Poultry Sci.* — 1985. — V. 64. — №3. — P. 425-428.

204. Marks, M.L. Sexual dimorphism in broilers following periods of equal water and feed intake / M.L. Marks // *Poultry Sci.* – 1987. – V. 66. - №3. – P. 481-489.
205. Merino, R. Mitochondria and apoptosis / R. Merino, Y. Ganán, D. Macías, et al // *Eur. Journal Biochem.* – 1998 – V. 252. – P. 1-15.
206. Micek, J. Отбор цыплят по полу на 4-й день после закладки яиц в инкубатор после просвечивания /J. Micek, A. Chnaperowa, E. Trnkova // *Drubeznictvi.* – 1955. – Т. 3. – № 6. - P. 82.
207. Nassif, C. The role of morphogenetic cell death during *Drosophila* embryonic head development / C. Nassif, A. Daniel, et al., // *Dev Biol.* – 1998 – V. 197. – P. 170-186.
208. Nandi, S. Sex diagnosis and sex determination / S. Nandi, D. McBride, R. Blanco, M. Clinton // *World's Poultry Sci. Journal.* – 2003. – V. 59. - №1. – P. 8-14.
209. Nakamura, D. Rapid identification of sex in birds by flow cytometry / D. Nakamura, T. Tiersch et.al. // *Cytogenetics and CM Genetics.* – 1990. – V. 53. – P. 201-205.
210. Omura, T.A. Cytological observation on the sex-chromosome of blood corpuscles excised in the vitelline vessels of the chick embryo / T.A. Omura // *Japan J. Genetics.* – 1967. – V. 42. - №1. – P. 61-65.
211. Palazin, L.S. Antibodies to alpha-fetoprotein disrupt histogenesis in culture chick retinae / L.S. Palazin, M.A. Copado, V. Rutz-Gutierrez, M. Dorado et al. // *Tissue and Cell.* – 1996. – Vol. 28. – № 2. – P. 223-226.
212. Pexider, A.G. / *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* – 1975. – Vol. – 1. – P. 100.
213. Potten, C.S., Differential radiation response amongst proliferating epithelial cells. / C.S. Potten, S.E. Al-Barwari, J. Searles // *J. Cell. Physiol.*, - 1978. – Vol. – 11. – P. 149-160.
214. Pena, M.O. / M.O. Pena, J. Lee, D.J. Thiele // *J. Nutr.* – 1999. – Vol. 129. – P. 1251-1260.
215. Prein, I. Die Entwicklung des Extremitatenskelettes beim Hauchuhn. / I. Prein // *Anat. Hefte.* – 1919. - Bd. 51.

216. Phelps, P. Automated identification of male layer chicks prior to hatch / P. Phelps, A. Bhutada, S. Bryan, et.al. // *World's Poultry Sci. Journal.* – 2003. – V. 59. - №1. – P. 33-38.
217. Que, F.G. Cell death by apoptosis / F.G. Que, G.J. Gores // *Gastroenterol.* – 1996. – Vol. 110. – P. 1-6.
218. Romanoff, A.L. Morphological study of differentiation of sex in chicks / A.L. Romanoff // *Poultry Sci.* 1933. – V. 12. - №2. – P. 2.
219. Romanoff, A.L. Chemical and physiological sex differences in newly hatched chicks / A.L. Romanoff // *Poultry Sci.* 1948. – V. 27. - №5. – P. 643.
220. Пат. 06029080 USA, МКИ 57 0 А 61 В 505 Method and apparatus for avian pre-hatch sex determination / R.D. Reynnells, C.J. Flegal (USA). Заяв. 06.07.98. Опыб. 20.02.2000. – 2с.
221. Saunders, J.W. The role of the apical ridge of ectoderm in differentiation of the morphological structure and inductive specificity of limb parts in the chick / J.W. Saunders, J.M. Cairns, M.T. Gasseeling // *Journal Morphol.* – 1957. – V. 101. – P. 57-87.
222. Saunder, A.N. The proximo-distal sequence of the origin of the parts of chick wing and the role of the ectoderm / A.N. Saunder // *Journal. Exp.* - 1998. – V. 108. - P. 363-403.
223. Santos, G.A. A method for separating sex-linked imperfect albino (S⁺ALS) and nonalbino embryos before hatch / G.A. Santos, F.G. Silversides // *Poultry Sci.* – 1996. – V. 75. - № 5. – P. 585-588.
224. Sanches, R. Autologous fibroblasts as potential vehicle for regional ovarian cancer gene therapy / R. Sanches, C. D'Incan, M. Kuiper et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1998. – Vol. 451. – P. 331-334.
225. Silver, J. *Morphol.* // J. Silver., A.F. Hughes. – 1973. – Vol. 40. – P. 159-170.
226. Stoll, R. Existence dhormones steroliques dans lorganisme de embryon du poulet au cours de sa differenciation sexuelle / R. Stoll, R. Maraud // *C. r. Acad. Sci.*, 1956. - V. 242. - №9. – P. 1235.

227. Simon, H.U. Molecular mechanisms of programmed cell death / H.U. Simon // Apoptosis, 1996. V. 1. - P. 107-109.
228. Shapiro, E. Vertebral development of chick embryo during days 3-19 of incubation / E. Shapiro // J. Morph. 1992. – V. 213. – P. 317-333.
229. Semenkova, L. / L. Semenkova, E. Dudich, I. Dudich, N. Tokhtamisheva et al. // Eur. J. Biochem. – 2003. – Vol. 270. – P. 4388-4399.
230. Sawad, A.A. Morphological Study of the Skeleton Development in Chick Embryo (*Gallus domesticus*) / A.A. Sawad, A. Balsam, A.N. Anwar, Al.-Silawi // International Journal of Poultry Science. – 2009. – V. 8. - № 7. – P. 710-714.
231. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease / C.B. Thompson // Scienc. – 1995. – Vol. – 267. – P. 1459-1460.
232. Tiersch, T.R. Identification of sex in chickens by flow cytometry / T.R. Tiersch // World's Poultry Sci. Journal. – 2003. – V. 59. - № 1. – P. 25-32.
233. Woods, J.E. / J.E. Woods, R.L. Weeks // Gen. and Compar Endocrinol. 1969. – V. 13. – P. 242-254.
234. Weniger, P. Active hormonale des gonades norphologiquement indifferenciees de embryon de poulet / P. Weniger // Arch. Anat. Microscop. Et morphol. Exptl. 1961. – V. 50. - №3. – P. 269.
235. Weniger, P. / P. Weniger // Ann. Embryol. et Morphogen. 1969. – V. 2. – P. 433-444.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

<p>ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ПТИЦЕВОДСТВА</p> <p>141000, г. Сергиев Посад-11, Московская обл. ул. Ленинградская, 12 Тел. 8 - (4962) 7-79-70 (факс) 8 - (4962) 751-21-08 Ор. 38.04.11 г. № 286 № _____</p> <p>№ _____ от _____ № _____</p> <p>[справка]</p>	<p>«Утверждаю» Первый заместитель директора Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства по научно-исследовательской работе, д.б.н., профессор академик РАН  Егоров И.А.</p>
---	--

СПРАВКА

Дана Блажновой Галине Николаевне в том, что материалы ее кандидатской диссертации на тему: «Динамика морфо-функциональных показателей разнополых куринных эмбрионов в процессе развития» по специальности 06.02.01 – диагностика болезней и терапии животных, патология, онкология и морфология животных, внедрены и применяются в научно-исследовательской работе отдела инкубации ГНУ ВНИТИП (г. Сергиев Посад).

Объектом внедрения являются данные об уровне половых гормонов (тестостерон, эстрадиол) и величина апоптического индекса, линейных размеров костей осевого и периферического скелета у разнополых куринных эмбрионов в процессе развития, а также об уровне апоптоза и альфа-фетопротеина, у куринных эмбрионов смешанных по полу групп на протяжении инкубации.

Заведующая отделом инкубации ВНИТИП
канд. с.-х. наук, доцент  Л.Ф. Дедюкина

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по научной работе
Северо-Кавказского федерального
университета д-р тех. наук,
профессор И.А. Бадрашвили
 2014 г.

АКТ
о внедрении результатов научных исследований

Мы, нижеподписавшиеся, заместитель директора по научной работе ИБС д.т.н., доцент Лодыгин А.Д., заведующий ПНИИ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» д.вет.н., профессор Тимченко Л.Д., ведущий научный сотрудник ПНИИ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» д.б.н., доцент Рязановский И.В., составили настоящий акт о том, что результаты диссертационного исследования аспиранта кафедры ботаники, зоологии и общей биологии ИБС Блажновой Галины Николаевны на тему «Динамика морфофункциональных показателей разнополых куринных эмбрионов в процессе развития» внедрены в научно-исследовательскую деятельность ПНИИ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» ПНИИ прикладных биотехнологий ИБС.

Заместитель директора по научной работе
Института живых систем,
доктор технических наук, доцент  Лодыгин А.Д.

Заведующий ПНИИ «Экспериментальной
иммуноморфологии, иммунопатологии
и иммунобиотехнологии» ПНИИ прикладных биотехнологий
Института живых систем,
доктор ветеринарных наук, профессор  Тимченко Л.Д.

Ведущий научный сотрудник ПНИИ
«Экспериментальной иммуноморфологии,
иммунопатологии и иммунобиотехнологии»
ПНИИ прикладных биотехнологий
Института живых систем,
кандидат биологических наук, доцент  Рязановский И.В.

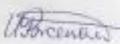
«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО НПО
«БиоМодуль»
И.А. Усаков


2010 г.

СПРАВКА

Дана Блажновой Галине Николаевне, в том, что материалы ее диссертации на тему «Динамика морфофункциональных показателей разнополюх куриных эмбрионов в процессе развития», в частности результаты об уровне тестостерона, эстрадиола и альфа-фетопротейна учтены и использованы в практической деятельности ООО НПО «БиоМодуль» (г. Ставрополь) при разработке технологии получения биологически активных субстанций из эмбриональных тканей кур и препаратов на их основе, в том числе гормон-содержащих и АФП-содержащих.

Главный технолог
ООО НПО «БиоМодуль»
кандидат биологических наук

 И.В. Разековский

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО
«Ставропольский птицекомплекс»
Кирилин А.М.


2014 г.

СПРАВКА
о внедрении результатов научных исследований

Рассмотренные материалы по диссертационному исследованию аспиранта кафедры ботаники, зоологии и общей биологии Института живых систем ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет» Блажновой Г.Н. по теме «Динамика морфофункциональных показателей разнополюх куриных эмбрионов в процессе развития» внедрены и используются в практической деятельности ООО «Ставропольский птицекомплекс» (г. Ставрополь). В частности, учитывается ряд сведений о закономерностях эмбриогенеза кур, представленных автором в информационных материалах.

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО НПО
«СайТЭК» к.б.н. Омелянчук
Павел Анатольевич


2014 г.

АКТ
о внедрении результатов научных исследований

Научные результаты, полученные в процессе выполнения диссертационного исследования Блажновой Галины Николаевны на тему «Динамика морфофункциональных показателей разнополюх куриных эмбрионов в процессе развития» внедрены в производственную деятельность ООО Научно-производственное объединение «СайТЭК» г. Ставрополя, и используются при производстве косметических средств из эмбриональных тканей птиц.

Начальник отдела
технического контроля

 Вилинская Л.В.

