

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2014

Работа выполнена в ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет»

- Научный руководитель:** доктор ветеринарных наук, профессор
Тимченко Людмила Дмитриевна
- Официальные оппоненты:** **Зайцева Елена Владимировна** - доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского», профессор кафедры биологии, заместитель директора Естественно-научного института
- Баймишев Хамидулла Балтуханович** - доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Самарская государственная сельскохозяйственная академия», заведующий кафедрой «Анатомия, акушерство и хирургия»
- Ведущая организация:** ФГБОУ ВПО «Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д.К. Беляева»

Защита диссертации состоится « 18 » декабря 2014 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.062.02 при ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический 12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет» и на сайте <http://www.stgau.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2014 года и размещен на сайтах:
ВАК Минобразования и науки РФ <http://www.vak.ed.gov.ru> « ____ » _____ 2014 г.
ФГБОУ ВПО «Ставропольский ГАУ» <http://www.stgau.ru> « ____ » _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Дьяченко Юлия Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности тематики исследований. Эталонной 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 общепризнаны 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 апоптоза, 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.

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

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, 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.

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.

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. 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 В.В. Рольник (1968). Взвешивание осуществляли с помощью весов ВЛТЭ-150 (Россия). Укомплектованные группы куриных яиц с зародышами разного пола 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). Дифференцировку половых желез проводили под стереомикроскопом МС-2 фирмы ЛОМО.

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 скелета. В третьей части эмбрионов определяли уровень апоптоза и 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.

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 с помощью электронных весов ВЛТЭ-150 (Россия). Длину тела и окружность грудной клетки измеряли при помощи сантиметровой ленты и штангенциркуля. За длину тела эмбриона принимали размер от клюва до конца хвоста.

Индексы физического развития: Кетле I, Кетле II и ИГМР рассчитывали по адаптированным к куриному эмбриону формулам, изложенным в работах А.П. Труновой (2008), С.В. Черникова (2012).

Уровень тестостерона и эстрадиола в супернатанте зародышей определяли методом ИФА на анализаторе марки Stat fax 303 Plus (США).

Особенности формирования костной системы зародышей исследовали с 12-х по 19-е сутки инкубации по методике Доусона, модифицированной в отделе эмбриологии НИИЭМ АМН СССР (Дыбан А.П., и др., 1970). Тотальные препараты разнополых куриных эмбрионов 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 и тазовой конечностей с использованием электронного штангенциркуля ЩЦЦ-II 0-250 0,01 (Россия).

Вычисление абсолютной и относительной разницы проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в работах И.И. Шмальгаузена (1984); А.П. Труновой (2008).

Изучение апоптоза проводилось путем расчета апоптического индекса (АИ) M.D. Logsdon, et. al. (1999). Подсчет количества апоптических клеток в гомогенатах разнополых куриных зародышей осуществляли по методу А.А. Абдувалиева, М.С. Гильдиевой (2006).

Выявление гена *p53* осуществлялось в гомогенате тканей куриных эмбрионов мужского и женского пола с 8-х по 19-е сутки инкубации. Методика складывалась из гомогенизации эмбрионов, центрифугирования гомогенатов с использованием центрифуги «Hettich» Universal 320 (Германия) при 4000 об/с в течение 10 минут и замораживания 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 методом ПЦР с использованием многоканального амплификатора «Терцик» (Россия). Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле, с применением бромистого этидия. Полученный гель помещали на фильтр трансиллюминатора Gel Doc (Bio Rad) (США).

Уровень АФП определяли методом ИФА на приборе Stat fax 303 Plus (США), с учетом инструкции по использованию набора реагентов АФП-ИФА-БЕСТ (Россия).

Результаты экспериментов подвергали вариационно-статистической обработке с использованием программы Primer of Biostatistics (Version 4.03).

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, изложенным в учебном пособии Л.Д. Тимченко, В.Н. Вакулина (2005). Фиксация результатов исследования осуществлялась при помощи цифровой фотокамеры «SONY DSC-W50» (Китай).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сравнительная оценка эффективности разделения куриных эмбрионов

по полу методами взвешивания яиц перед инкубацией и визуальной оценки гонад

В процессе работы по разделению разнополых эмбрионов вначале отобрали 2100 яиц, которые поделили по массе (первый метод). Установлено, что средняя масса одного яйца 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.

В результате установлено, что из 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.

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.

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 эмбрионов, условно принятых за мужские, и визуальной оценке 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 наличия несовпадений, для исключения ошибки, предпочтительно использование указанных методов в комплексе.

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

Установлено, что с 8-х по 19-е сутки инкубации тестостерон в подгруппе эмбрионов-♂ (таблица 1) и эстрадиол в подгруппе эмбрионов-♀ выявляются методом ИФА.

У эмбрионов-самцов уровень тестостерона с восьмых по девятнадцатые сутки пренатального онтогенеза достоверно увеличивается с $2,61 \pm 0,006$ нмоль/л до $6,88 \pm 0,006$ 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.

В группе куриных эмбрионов, сформированной без учета пола, на протяжении пренатального онтогенеза, средние значения тестостерона характеризуются посуточной сменой возрастания и убывания. При этом на 15-, 16- и 17-е дни в этой группе отмечены достоверные различия уровня тестостерона в сравнении с предыдущими сутками.

Диапазон статистических различий (m) в группе, где учет пола не осуществлялся на каждые сутки инкубации значительно шире, чем в подгруппе эмбрионов-самцов.

При сравнении уровня тестостерона в двух группах куриных эмбрионов выявлено, что в подгруппе эмбрионов-самцов и в группе эмбрионов без учета половых различий средние значения количества гормона показателя на каждые изучаемые дни развития зародышей отличаются (таблица 1).

В целом динамика тестостерона изменчива и различна в зависимости от этапов пренатального онтогенеза в группах куриных эмбрионов-самцов и сформированной без учета пола. 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 указанных выше 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.

У эмбрионов-самок уровень эстрадиола достоверно увеличивается в процессе пренатального онтогенеза с $27,10 \pm 0,14$ pg/мл (8-е сутки инкубации) до $59,70 \pm 0,06$ pg/мл (19-е сутки). Эти значения являются минимальным и максимальным значениями показателя (таблица 2).

Достоверная посуточная разница уровня гормона (эстрадиол по отношению к предыдущим суткам) в подгруппе эмбрионов-самок установлена на 10-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 19-е сутки.

Таблица 1 - Средние значения уровня тестостерона на протяжении эмбриогенеза в подгруппе куриных эмбрионов-самцов в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий (M±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 ≤ 0,05) – сравнение с предыдущими сутками инкубации;

[■] (P ≤ 0,05) – сравнение с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

Таблица 2 - Средние значения уровня эстрадиола на протяжении пренатального онтогенеза в подгруппе куриных эмбрионов-самок в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий (M±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 ≤ 0,05) – сравнение с предыдущими сутками инкубации;

[■] (P ≤ 0,05) – сравнение с группой КЭ без учета половых различий.

В группе куриных эмбрионов без учета половых различий, уровень эстрадиола с 8-х по 19-е сутки пренатального онтогенеза имеет посуточный волнообразный характер, со смешанной пиков подъема и пиков спада. В этой группе, по сравнению с подгруппой эмбрионов, где

главным критерием отбора особей являлся учет пола, на каждые сутки инкубации отмечен широкий разброс статистических различий уровня гормона.

В группе куриных эмбрионов, сформированной без учета пола, на 10-, 15- и 16-е сутки пренатального онтогенеза, в сравнении с предыдущими сутками инкубации, зарегистрированы достоверные изменения уровня эстрадиола.

На каждые исследуемые сутки инкубации средние значения уровня эстрадиола отличаются в подгруппе женских куриных эмбрионов в сравнении с группой, сформированной без учета половых различий зародышей. При этом достоверная разница уровня эстрадиола зарегистрирована на все исследуемые сутки инкубации, за исключением восьмых, где различия недостоверны.

При анализе уровня эстрадиола установлено, что в подгруппе женских эмбрионов уровень гормона отличается 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.

Дополнительно уделено внимание исследованию уровня гормонов эмбрионов ($n=69$), у которых данные об их половой принадлежности не совпали при определении методом визуальной оценки гонад и методом доинкубационного взвешивания яиц. При этом на 8-, 9-, 10-, 11- и 12-е сроки пренатального онтогенеза у каждого в отдельности мужского и женского эмбриона определяли уровень противоположного гормона (эстрадиол и тестостерон соответственно). Проведенные исследования позволили подтвердить достоверность вышеуказанных методов разделения по полу КЭ в процессе эксперимента.

Таким образом, с помощью ИФА установлены средние нормативные показатели предела онтогенетической изменчивости уровня тестостерона и эстрадиола у разнополых куриных эмбрионов с 8-х по 19-е сутки инкубации.

Зарегистрированы достоверно отличающиеся результаты исследований 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, сформированной без учета половых различий.

Оценка физического развития куриных эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок

Основными критериями, характеризующими пропорциональность и гармоничность физического развития, 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 разнополых куриных зародышей на протяжении инкубации недостаточно, а для эмбрионов кросса «Родонит 3» вообще отсутствуют.

Средние значения абсолютной массы тела, длины и окружности грудной клетки в зависимости от пола куриных эмбрионов на все сутки инкубации достоверно отличаются с преобладанием значений каждого указанного показателя в группе мужских эмбрионов на всех этапах пренатального онтогенеза. При сравнении каждой однополой группы эмбрионов, с группой эмбрионов, сформированной без учета половых различий, значения массы, длины и окружности грудной клетки 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, длина тела и окружность грудной клетки достоверно возрастает, а их динамика имеет линейный характер.

Выявлен минимальный разлет стандартного отклонения средней (m) значений всех указанных показателей на каждые сутки инкубации в группах разнополых куриных эмбрионов по сравнению с эмбрионами в группе, пол которых не учитывался.

На каждые сутки инкубации в сравнении с предыдущими сутками во всех трех группах куриных эмбрионов масса, длина и ОКГ достоверно отличается. Исключение составляет ОКГ в группе эмбрионов, сформированной без учета пола на 14-е сутки инкубации, когда различие с предыдущими сутками недостоверно.

Полученные значения морфометрических показателей позволяют провести индексацию физического развития разнополых куриных эмбрионов в процессе инкубации с помощью Кетле I, Кетле II и индекса гармоничного морфологического развития в сравнении с группой эмбрионов, сформированной без учета пола. Индексы физического развития в трех группах куриных эмбрионов представлены в таблице 3.

На протяжении инкубации зафиксировано, что индексы физического развития во всех трех группах куриных эмбрионов отличаются и характеризуются конкретными числовыми значениями. 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 разнополых КЭ, которые отражены в разнонаправленном характере посуточного прироста Кетле II для эмбрионов-самцов и эмбрионов-самок. Также установлено, что ИГМР достоверно не изменяется на протяжении эксперимента в двух разнополых группах зародышей, что свидетельствует 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.

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

Для эмбрионов-самцов, эмбрионов-самок и эмбрионов в группе без учета половых различий определены средние значения длины осевого и периферического скелета (плечевая, лучевая, локтевая, пястная третья кость, бедренная, большеберцово-заплюсневая, цевка) с 12-х по 19-е сутки инкубации. Морфометрию осуществляли на цельных и фрагментированных тотальных препаратах, образцы которых представлены на рисунках 1, 2, 3. Между абсолютными величинами длины костей осевого скелета и периферического скелета (таблица 4) разнополых эмбрионов, в онтогенезе выявлены достоверные, закономерно изменяющиеся отличия. Отмечено четкое превышение абсолютных значений измеряемых костей у эмбрионов-самцов по сравнению с эмбрионами-самками на все сутки инкубации.

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

Таблица 3 - 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 без учета пола, n=60	ИГМР	ИГМР в группе КЭ 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 ≤ 0,05) – в сравнении с предыдущими сутками инкубации (эмбрионы-самки), ** (P ≤ 0,05) – в сравнении с предыдущими сутками инкубации (эмбрионы-самки); ▲ (P ≤ 0,05) – с предыдущими сутками инкубации (группа без учета пола); ▲ (P ≤ 0,05) – сравнение двух разнополовых групп КЭ; ■ (P ≤ 0,05) – сравнение каждой однополовой группы с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

При сравнении абсолютных величин изучаемых костей разнополох куриных эмбрионов с аналогичными показателями костей в группе эмбрионов, пол которых не дифференцировался, на каждые сутки инкубации установлены в разной степени выраженные различия.

В то же время по всем исследуемым костям динамика абсолютной разницы между значениями у куриных эмбрионов-♂ и эмбрионов-♀ на всем протяжении исследования законономерна, не постоянна и характеризуется числовыми максимумами и минимумами в разные сутки инкубации.



Рисунок 1 - Общий вид тотального препарата скелета свободной грудной конечности куриного эмбриона-самца на 15-е сутки инкубации. Окраска ализарином красным.



Рисунок 2 - Общий вид тотального препарата скелета свободной тазовой конечности куриного эмбриона-самки на 15-е сутки инкубации. Окраска ализарином красным.



Рисунок 3 - Тотальные препараты скелета куриного эмбриона-самца (слева), эмбриона-самки (справа) на 16-е сутки инкубации. Окраска ализарином красным.

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

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 разнополох эмбрионов, зафиксировано закономерное нарастание относительной разницы их длины с 12-х по 15-е сутки инкубации.

Таблица 4 - Средние значения линейных размеров костей грудной и тазовой конечностей разнополых куриных эмбрионов в сравнении с группой КЭ, сформированной 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 кости, мм	L, бедренной кости, мм	L, большеберцово-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 [■]
13	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
	♀	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* [■]
14	♂	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 [■]
	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
15	♀	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
16	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
	♀	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* [■]
17	♂	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
	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
18	♀	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
19	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
	♀	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* [■]
17	♂	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 [■]
	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
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 [■]
19	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
	♀	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* [■]
19	♂	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 [■]
	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 ≤0,05) –сравнение двух разнополых групп КЭ;

■ (P ≤0,05) – сравнение каждой однополой группы зародышей с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

Отмечено совпадение числовых максимумов относительного различия длины костей (плечевой, локтевой и лучевой) 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, выявили противоположную плечевой, лучевой и локтевой костям тенденцию этого параметра. При этом числовой максимум относительной разницы приходится на 12-е сутки развития (в 1,334 раза).

Относительное различие длины бедренной кости 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).

Относительное различие для длины цевки эмбрионов-самцов по сравнению с эмбрионами-самками, четко зафиксировано незакономерное, волнообразное его изменение на протяжении всего периода исследования. Числовой максимум (в 1,353 раза) относительного различия между разнополыми эмбрионами приходится на конец плодного периода, то есть на 18-е сутки развития.

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.

Динамика уровня апоптоза и альфа-фетопротейна 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. Установлено, что апоптотический индекс на всех изучаемых сутках развития куриных эмбрионов обоего пола отличается (таблица 5).

Таблица 5 - Апоптотический индекс у куриных эмбрионов разного пола и эмбрионов в группе, сформированной без учета половых различий в процессе развития (M±m)

Сутки инкубации	Апоптотический 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) – сравнение двух разнополых групп КЭ;

■ (P ≤ 0,05) – сравнение каждой однополой группы зародышей с группой КЭ, сформированной без учета половых различий.

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.

В период с 8-х по 19-е сутки инкубации выявлены достоверно отличающиеся значения апоптического индекса между куриными эмбрионами-самцами и эмбрионами-самками.

При сравнении АИ каждой группы КЭ противоположного пола с одноименным показателем в группе эмбрионов 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.

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.

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

Дополнительно в процессе работы провели исследование по выявлению гена *p53*. Этот ген является центральным компонентом механизма, обеспечивающим генетический контроль апоптической гибели у человека (Чумаков П.М., 2000). Что касается птиц, то сведения о наличии гена *p53* отсутствуют. 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.

Выявлено, что альфа-фетопроtein, обеспечивающий нормальное течение пролиферации, дифференцировки и апоптоза, присутствует у разнополых куриных эмбрионов на всех этапах исследования в пренатальном онтогенезе (таблица 6).

Таблица 6 - Уровень альфа-фетопроteина у куриных эмбрионов разного пола и в группе эмбрионов, сформированной без учета половых различий (M±m)

Сутки инкубации	Уровень альфа-фетопроteина, 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) – сравнение двух разнополых групп КЭ;

■ (P ≤ 0,05) – сравнение каждой однополой группы эмбрионов с группой КЭ, сформированной без учета половых различий;

▲ (P ≤ 0,05) – сравнение с предыдущими сутками развития в каждой группе КЭ.

Установлено, что в каждые сутки развития (с 8-х по 19-е) уровень АФП достоверно отличается как у эмбрионов обоего пола, так и при сравнении этого показателя каждой однополой группы с группой эмбрионов, сформированной без учета пола. При этом на каждые исследуемые сутки инкубации отмечено количественное преобладание уровня АФП у эм-

брионов-самцов по сравнению с эмбрионами-самками, за исключением 13-х суток инкубации, где преобладание АФП в пользу эмбрионов-самок.

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

Анализируя динамику альфа-фетопротейна, 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.

При сопоставлении динамики альфа-фетопротейна и апоптического индекса, у эмбрионов-самцов и у эмбрионов-самок 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 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 АИ и АФП в обеих группах разнополых зародышей характеризуется тенденцией к снижению.

Между 11-ми и 12-ми сутками инкубации в группах эмбрионов разделенных по полу вновь отмечен разнонаправленный характер взаимосвязи показателей. При этом апоптический индекс снижается, а уровень альфа-фетопротейна 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 апоптического индекса и альфа-фетопротейна одновременно нарастает в обеих группах зародышей.

В отдельные сутки инкубации плодного периода пренатального онтогенеза кур женского и мужского пола отмечен ярко выраженный разнонаправленный характер взаимосвязи АИ и уровня АФП. Так, в промежутке между 15-ми и 16-ми сутками инкубации АИ увеличивается, а уровень АФП снижается в обеих группах КЭ. В интервале между 17-ми и 18-ми сутками развития зафиксирован противоположный характер взаимозависимости показателей в двух группах эмбрионов, где апоптический индекс снижается, а уровень АФП повышается.

В промежутке между 16-ми и 17-ми сутками и на завершающем этапе развития эмбрионов-самок и эмбрионов-самцов (18-е и 19-е сутки) зарегистрирована динамика спада как АФП, так и АИ.

Оценивая коррелятивную зависимость динамики альфа-фетопротейна и апоптического индекса, выявлена разнонаправленная (положительная и отрицательная) посуточная как у эмбрионов-самцов, так у эмбрионов-самок корреляция (0 - 0,3).

Таким образом, на каждые исследуемые сутки инкубации установлены достоверные отличия как апоптического индекса, так и альфа-фетопротейна у эмбрионов-самцов по сравнению с эмбрионами самками.

С 8-х по 19-е сутки инкубации установлен минимальный диапазон статистических различий (m) при исследовании апоптического индекса и уровня альфа-фетопротейна в группах раздельнополых эмбрионов по сравнению с эмбрионами группы без учета половых различий.

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

ВЫВОДЫ

1. Для половой дифференцировки куриных эмбрионов с экспериментальной целью наиболее целесообразно совместное использование методов доинкубационного взвешивания яиц и визуальной оценке 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 большинстве 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-фетопроtein, 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-фетопроteина, 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, остеометрических показателей, апоптического индекса и альфа-фетопроteина 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 работ, опубликованных по теме диссертации Статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях

1. 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.

2. Тимченко, Л.Д. Взаимосвязь уровня α -фетопротейна и апоптоза в процессе развития куриного эмбриона / Л.Д. Тимченко, С.В. Черников, Г.Н. Блажнова // Аграрная Россия. – 2010. – № 5 – С. 53-54.

3. 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.

4. Блажнова, Г.Н. Длина осевого и периферического скелета разнополых куриных эмбрионов в процессе развития / Г.Н. Блажнова, Л.Д. Тимченко // Аграрная Россия. – 2013. – № 1 – С. 25-28.

5. Блажнова, Г.Н. Сравнительная оценка эффективности дифференцировки куриных эмбрионов по полу методами доинкубационного взвешивания яиц и визуальной оценки гонад / Г.Н. Блажнова, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, А.П. Пономаренко // Современные проблемы науки и образования [Электронный ресурс] – 2014. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/118-13996> (дата обращения: 21.07.2014).

6. Тимченко, Л.Д. Физическое развитие разнополых куриных эмбрионов в онтогенезе / Л.Д. Тимченко, Г.Н. Блажнова // Современные проблемы науки и образования [Электронный ресурс] – 2014. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/118-14183> (дата обращения: 06.08.2014).

Статьи в зарубежных изданиях

7. 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.

Статьи в других научных изданиях

8. Тимченко, Л.Д. Содержание альфа-фетопротейна 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). – 2008. – № 3. – С. 44-47.

9. 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.

10. 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, 2009. – С. 8-9.

11. 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, 2010. – С. 9-10.
12. 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, 2010. – С. 28-31.
13. 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, 2011. – С. 11-12.
14. Тимченко, Л.Д. Динамика уровня апоптоза, тестостерона и эстрадиола у разнополовых 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, 2011. – С. 198-200.
15. Блажнова, Г.Н. Динамика уровня альфа-фетопротейна 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. - Нальчик, 2011. – С. 100-101.
16. 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. – Ростов н/Дону, 2011. – С. 185.
17. 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, 2013. – 478 с.

Список сокращений и условных обозначений

- АИ – апоптический индекс
 АФП – альфа-фетопротейн
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 ИГМР – индекс гармоничного морфологического развития
 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

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Формат 60x84 1/16	Подписано в печать 03.10.2014	Уч.-изд. л. 0,7
Бумага офсетная	Усл. печ. л. 1,0	Тираж 120 экз.
	Заказ 348	

Отпечатано в Издательско-полиграфическом комплексе
ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет»
355029, г. Ставрополь, пр-т Кулакова, 2