

4. Годівля риб: Підручник / І.М. Шерман, М.В. Гринжевський, Ю.О. Желтов та ін.; За ред. І.М. Шермана. – К.: Вища освіта, 2001. – 269 с.

5. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки: / Пер. с англ.; Под ред. А.А. Баева и Я.М. Варшавского. – Москва: Мир, 1974. – 955 с.

6. Rivis I.F., Danylic B.B., Procyk J.M. Simultaneous determination of common, esterified and unesterified fatty acids // 10th International Symposium: Advances and application of chromatography in industry. – Bratislava, 1996. – P. 152 – 153.

7. Рівіс Й.Ф., Данилик Б.Б. Газохроматографічне визначення високомолекулярних неестерифікованих жирних кислот в біологічному матеріалі // Український біохімічний журнал. – 1997. – Т. 69, № 1. – С. 79 – 83.

8. Рівіс Й.Ф., Скорохід І.В., Данилик Б.Б., Процик Я.М. Одночасне газохроматографічне визначення окремих естерифікованих і неестерифікованих високомолекулярних кислот у біологічному матеріалі //Український біохімічний журнал. – 1997. – Т. 69, № 2. – С. 110 – 115.

КОНЦЕНТРАЦИЯ НЕЭТЕРИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (НЭЖК) В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ И РОСТ КАРПА ПРИ ДОБАВЛЕНИИ К РАЦИОНУ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ И ФУЗОВ

М.М.Цап, Институт биологии животных УААН

Показано влияние скормливаемого подсолнечного фуза и рапсового масла на содержание неэтерифицированных форм высокомолекулярных жирных кислот (НЭЖК) в скелетных мышцах и рост карпа.

CONCENTRATION OF NONESTERIFIED FORMS OF HIGH MOLECULAR FATTY ACIDS (NEFA) IN SKELETAL MUSCLES AND GROWTH OF CARP AT ADDITION TO RATION OF VEGETABLE BUTTERS AND FUSAS

M.M.Tsap, IBA UAAS

Data about effect of sunflower-seed scrap and rapeseed oil as fodder on content of nonesterified forms of high molecular fatty acids (NEFA) in skeletal muscles and growth of carp are pointed.

УДК 636.082.45.3.5

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ
ОКРАШИВАНИЯ СПЕРМИЕВ ЖИВОТНЫХ КРАСИТЕЛЕМ
НОЕCHST 33342 ДЛЯ X,Y-СОРТИНГА**

О.А. Чернецов, В.А. Шигимага

Институт животноводства УААН

А.Л. Татарец

НТК Институт монокристаллов, НАНУ

В проточном сортинге спермы метод окрашивания клеток красителем Hoechst 33342 требует сокращения во времени. Для ускорения окрашивания были использованы повышенные концентрации красителя, озвучивание клеток, электромагнитное воздействие.

**Hoechst 33342, X,Y-сортинг, флуоресцентный клеточный сортер, сперма,
ДНК**

Методы управления полом потомства животных являются предметом всесторонних исследований в биотехнологии в связи с большой уже достигнутой и ожидаемой практической и теоретической значимостью результатов [1-4].

Основным коммерчески и научно разрабатываемым методом сейчас является фракционирование спермы на X-Y-клетки в проточных флуоресцентных сортерах, измеряющих интенсивность свечения спермиев, окрашенных витальным флуоресцентным ДНК-красителем, с учетом большей светимости X-клеток, содержащих у быка на 3,8 % больше ДНК, чем Y-клетки (рис.1) [5].

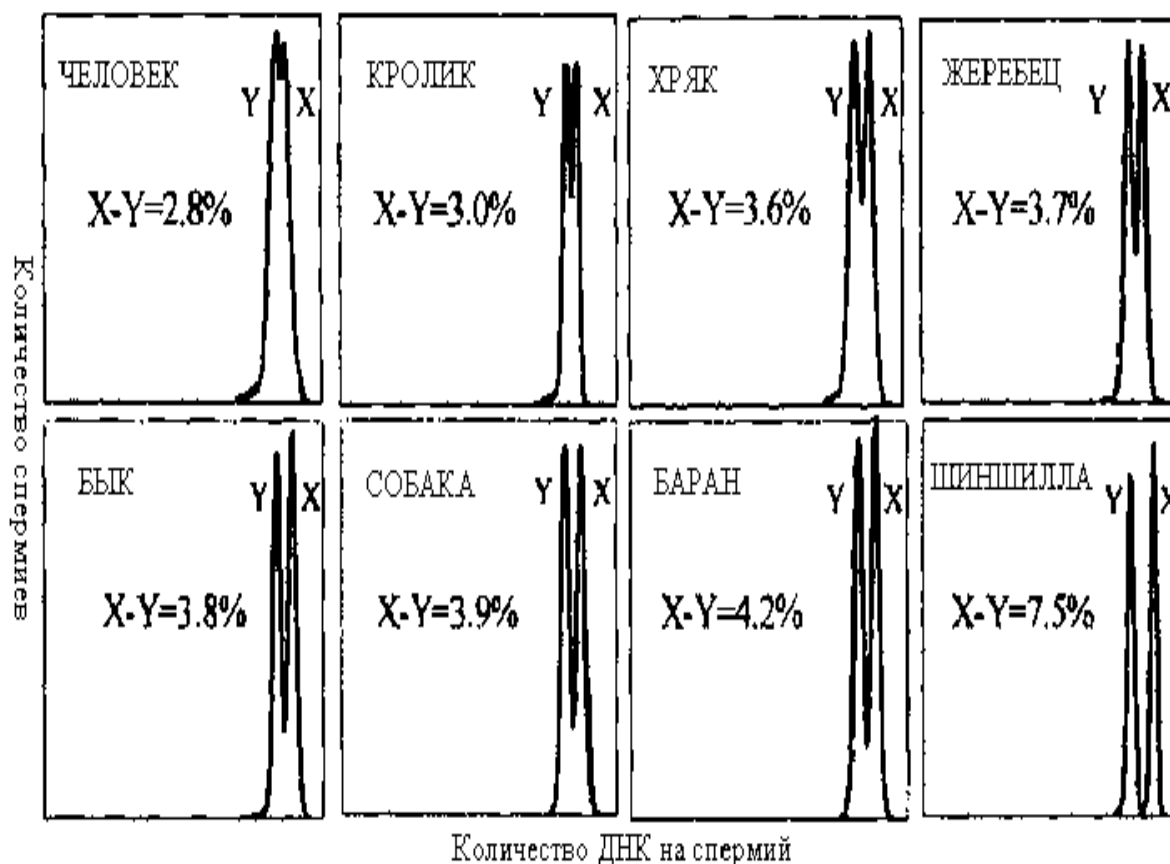


Рис.1. Разница содержания ДНК в X- и Y-клетках животных и человека

Двухпиковое распределение спермиев по интенсивности свечения ДНК-красителя имеет зону перекрывания, и сортер настраивают так, чтобы он не отклонял спермии с величиной светимости, принадлежащей этой зоне [6].

Для окрашивания спермы при проточном сортинге используют бисбензимидаз Hoechst 33342 (рис.2). Частота возбуждения молекул Hoechst 33342 находится в области ближнего ультрафиолета, около 350 нм, спектр флуоресценции имеет максимум в 461 нм. Этот краситель растворим в воде, однако, имеет достаточную липофильность, чтобы проходить интактные клеточные мембраны. Обладая сродством к ДНК, Hoechst 33342 не встраивается между азотистыми основаниями как этидиум бромид, а связывается с ДНК по малой борозде селективно с А-Т нуклеотидными парами, что значительно снижает его мутагенность [6].

С учётом того, что окрашиваемая ДНК спермиев репликационно неактивна, потенциальная мутагенность Hoechst 33342 не проявляется. Поэтому этот краситель используют и для сортинга спермы человека [7-8].

В используемых в настоящее время методиках процесс окрашивания занимает длительное время, при этом желток-содержащие среды-разбавители не добавляются, что снижает качество спермы.

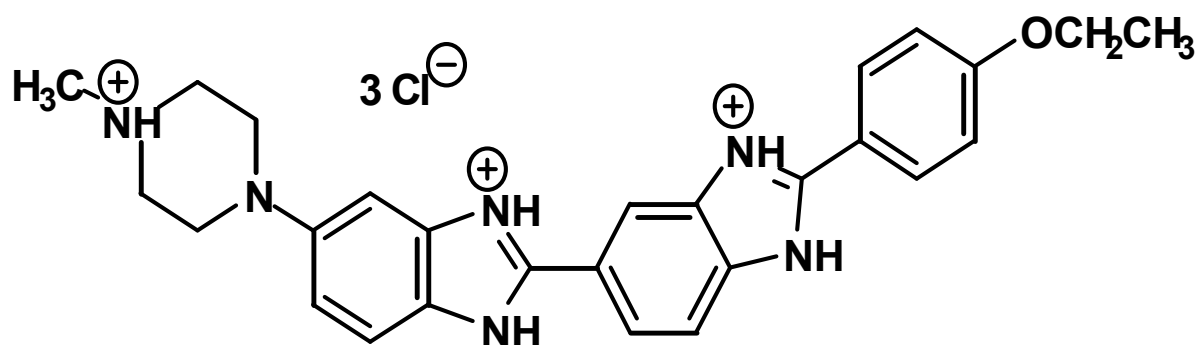


Рис. 2. Структурная формула Hoechst 33342

Таким образом, целью работы было: а) сократить во времени этап окрашивания, возможно, за счет увеличения концентрации красителя и изменения условий окрашивания, б) определить токсичность увеличенной концентрации красителя.

Материалы и методы исследований. 1. Окрашивание спермы красителем Hoechst 33342 проводили по стандартной методике [8]. Готовили маточный раствор красителя – 5 мг/мл в дистиллированной воде. Сперму быка разбавляли лактозо-цитратным разбавителем при 37 °С. На 1 мл разбавленной спермы с концентрацией клеток 150 млн/мл добавляли 8 мкл маточного раствора красителя Hoechst 33342. Затем выдерживали при 36 °С в течение 60 минут. В опыте последний этап окрашивания (60 минут при 36 °С) заменяли: а) прибавлением 3 % ДМСО (диметилсульфоксид); б) озвучиванием окрашиваемой спермы частотами в диапазоне 100–10000 Гц в течение 1 минуты; в) окрашиванием 10-кратной концентрацией Hoechst 33342 в течении 5 минут при 36 °С; г) воздействием на окрашиваемую сперму импульсным электромагнитным (ЭМ) полем напряженностью 0,5 - 3 кВ/см. Затем сперму отмывали в разбавителе, трижды центрифугируя и удаляя надосадочную жидкость. Измерение уровня флуоресцентной светимости окрашенной спермы проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian).

2. Проверку красителя на токсичность проводили согласно ГОСТ 22636-77 п.3.11.3, аналогично проверке спермосана. Во флаконах делали разведения раствора красителя в лактозо-цитратном разбавителе спермы, один флакон – разбавитель без красителя (контроль). При 37 °С во флаконы вносили свежеполученную сперму быка до конечной концентрации 150 млн/мл. Затем оценивают пробы по подвижности спермиев под микроскопом при температуре 40–42 °С. Подвижность спермиев, абсолютную выживаемость и выживаемость спермиев в часах устанавливали по ГОСТ 20909.4-75. Допустимое расхождение двух параллельных определений не должно превышать 10 %. Оценку токсичности данной концентрации красителя проводят по Н.Г.Балашову [9], определяя коэффициент токсичности (K_m):

$$K_m = A_1 : A_2, ,$$

где: A_1 – среднее число подвижных спермиев в исходной сперме;

A_2 – среднее число подвижных спермиев через 3 часа после разбавления раствором красителя (или без него в контроле).

Значение $K_m < 1,8$ указывает на не токсичность взятой концентрации. Значение $K_m > 2,3$ указывает на токсичность.

Результаты исследований. На рис.3 показана флуоресцентная светимость спермиев быка после стандартного окрашивания Hoechst 33342 (кривая №1) и светимость спермиев после окрашивания 10-кратной концентрацией Hoechst 33342 в течении 5 минут при 36 °С (кривая №2). Увеличение концентрации красителя позволило сократить время окрашивания с 60 до 5 минут, при этом флуоресценция спермиев снизилась лишь на 20 %. Проверка Hoechst 33342 на токсичность показала, что значение K_m , даже для 18-кратной концентрации равно 1. То есть, токсичность для локомоторного аппарата спермиев отсутствует при 18-кратной концентрации.

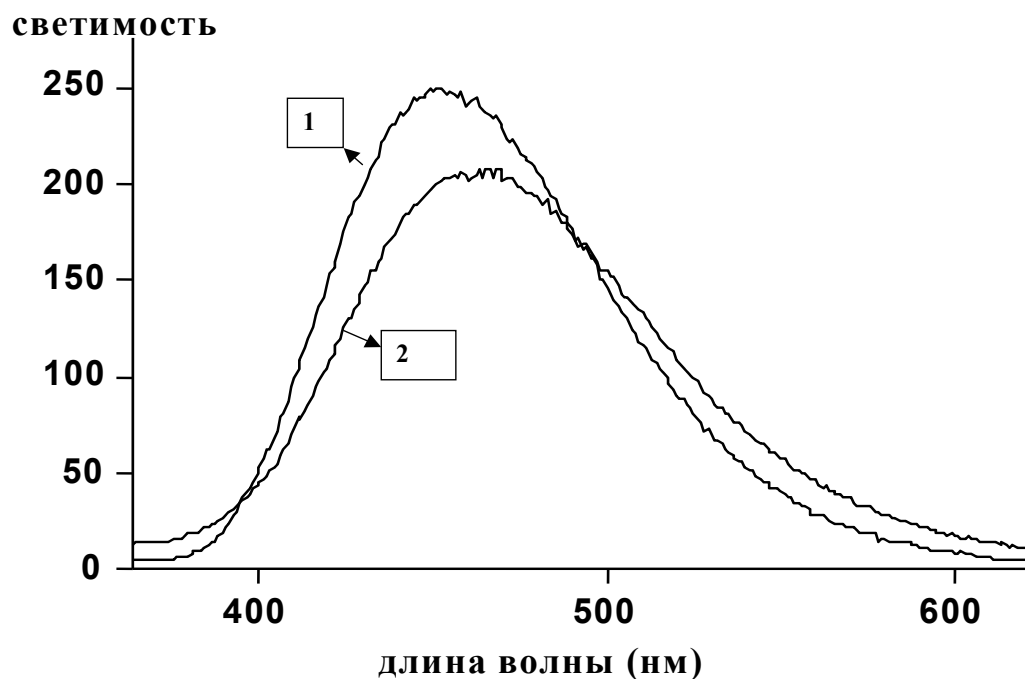


Рис.3. Флуоресценция спермы при стандартном и модифицированном окрашивании

Окрашивание спермы с добавлением 3 % ДМСО, озвучиванием, ЭМ-воздействием тоже дало пониженный уровень флуоресценции в сравнении со стандартным методом окрашивания. Проверая нашу гипотезу о возможном разрушающем влиянии на молекулы Hoechst 33342 ЭМ-воздействия, мы подвергли раствор Hoechst 33342 без спермиев ударам импульсным электромагнитным полем напряженностью 0,5 - 3 кВ/см. Ввиду малого объема раствора (80 мкл), который мы могли подвергать ЭМ-воздействию, соответственно, мы получили и низкий флуоресцентный сигнал с высоким уровнем шума. Результаты приведены на рис.4, верхняя кривая – это светимость раствора Hoechst 33342 без ЭМ-воздействия, нижняя кривая – это светимость раствора Hoechst 33342 после ЭМ-удара напряженностью 3 кВ/см, между ними расположились напряженности 0,5-1,5 кВ/см, подтверждая нашу гипотезу. Для более точного установления влияния ЭМ-воздействия на молекулы Hoechst 33342 необходимы дополнительные исследования при больших уровнях светимости.

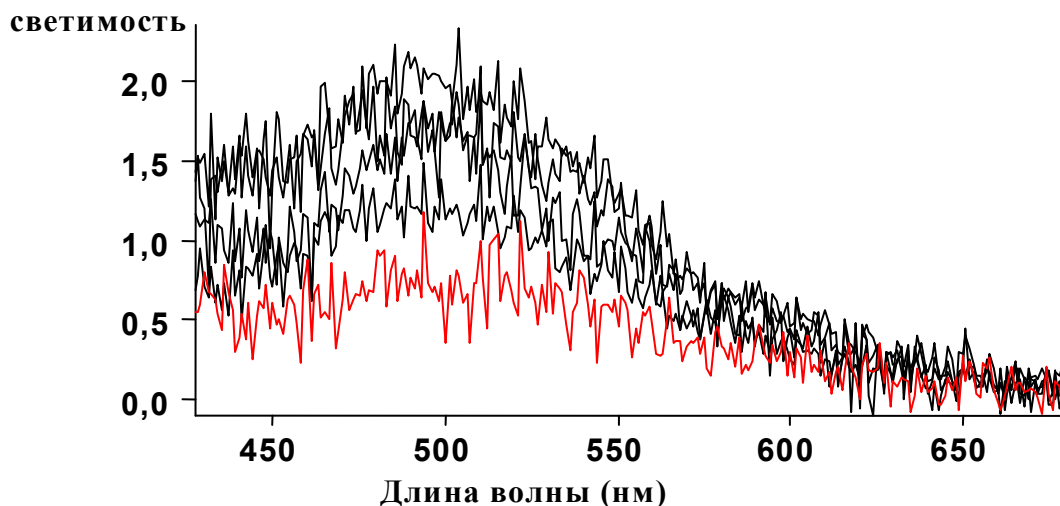


Рис.4. Флуоресценция Hoechst 33342 после ЭМ-воздействия

Выводы:

1. Длительность окрашивания спермиев красителем Hoechst 33342 может быть сокращена с 60 до 5 минут.
2. Для ускорения проникновения красителя в спермии и усиления диффузионно-адсорбционных процессов возможно использовать повышение концентрации красителя в 10 раз и озвучивание клеток.
3. Для проверки равномерности прокрашиваемости клеток необходимо перейти на измерение флуоресцентных сигналов от отдельных спермиев.

Библиографический список

1. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. - К.: Аграрна наука, 1995. – 183 с.
2. Бердышев Г.Д., Криворучко И.Ф. Генетика человека с основами медицинской генетики. – К.: Вища школа, 1979. – 447 с.
3. XY Inc. Press Releases. XY Inc. and L'Alliance Boviteq sign deal to commercialize bovine sexed sperm - March 2005 [//www.xyinc.com/news/releases/05_0308_boviteq.php](http://www.xyinc.com/news/releases/05_0308_boviteq.php)
4. Seidel G.E., Johnson L.A. Sexing mammalian sperm – overview // Theriogenology. – 1999. – V. 52. – P. 1267-1272.
5. Johnson L.A., Flook J.P., Look M.V., Pinkel D. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations // Gamete Res. – 1987. – V. 16. - P. 1-9.
6. Seidel G.E., Garner Jr. Current status of sexing mammalian spermatozoa // Reproduction. – 2002. – V. 124, P. 733–743.
7. Fugger E.F, Black S.H., Keyvanfar K., Schulman J.D. Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection // Human Reprod. - 1998. – V. 13: - P. 2367-2370.
8. Johnson L.A., Welch G.R. Sex preselection: high speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency // Theriogenology. – 1999, 52, - P. 1323-1341.

9. Бугров А.Д., Склярів П.М. Методичні рекомендації по використанню гентаміцину і ампіциліну для санації сперми бугаїв при її заморожуванні і деконсервації. - Х., 2004. - С. 5-6.

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ВДОСКОНАЛЕННЯ ФАРБУВАННЯ СПЕРМИ ТВАРИН
БАРВНИКОМ HOECHST 33342 ДЛЯ X,Y-СОРТИНГУ

О.О. Чернецов, В.О. Шигимага, Інститут тваринництва УААН

А.Л. Татарец, НТК Інститут монокристалів НАНУ

У проточному сортигу сперми метод фарбування клітин Hoechst 33342 потребує скорочення у часі. Для прискорення проникнення фарби і посилення дифузійно-адсорбційних процесів застосували підвищену концентрацію фарби, звукові хвилі, електромагнітну обробку.

METHODICAL APPROACHES TO PERFECTION OF COLOURING OF ANIMAL SPERM BY
HOECHST 33342 FOR X, Y-sorting

O.A. Chernetsov, V.A. Shigimaga. Institute of Animal Industries UAAS,

A.L. Tatarets. State Scientific Institution "Institute for single crystals" NASU

In flow cytometric sperm sorting the method of cell colouring by Hoechst 33342 demands reduction in time. For acceleration of colouring the increased concentration of dye, sound affect on cells, electromagnetic influence have been used.

УДК 641.004.12:637.514.7

**АСПЕКТИ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ ТА БЕЗПЕКИ НАПІВФАБРИКАТУ
КІСТКОВОГО ХАРЧОВОГО ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПРОДУКТІВ
ХАРЧУВАННЯ З ЙОГО ВИКОРИСТАННЯМ**

О.І. Черевко, М.П. Головка, Л.О. Чуйко, М.Л. Серік, Д.Є. Подворчан

Харківський державний університет харчування та торгівлі

Ю.І. Крутін

ТОВ «Технополігон»

Запропонована технологія напівфабрикату кісткового харчового (НКХ) – збагачуючої добавки на біоорганічні сполуки кальцію. Доведена безпечність його використання в технології продукції харчування. Визначені радіопротекторні властивості НКХ. Проведені дослідження щодо визначення засвоюваності біоорганічного кальцію з НКХ.

**харчова кістка, напівфабрикат кістковий харчовий, біоорганічні сполуки
кальцію**

Харчування - найважливіший фактор, який обумовлює стан здоров'я сучасної людини і впливає на спроможність організму протистояти несприятливим факторам довкілля. При цьому дуже важливим є регулярне та повноцінне забезпечення організму всіма необхідними нутрієнтами [1].

Значна кількість сучасних харчових продуктів, унаслідок рафінування, дистиляції, перекристалізації, консервування та інших технологічних процесів, позбавлені великої кількості природних біологічно активних речовин (БАР). Кальцій - один із найбільш дефіцитних мінеральних нутрієнтів [1-2].

Організм приблизно на 5 % представлений мінералами. На відміну від білків, жирів та вуглеводів вони не виробляються організмом, а повинні до нього надходити з їжею [1]. Понад два мільярди жителів на Землі потерпає від нестачі мінералів [3]. У США та Країнах Західної Європи потреба населення у мінералах задовольняється на 70 %, у країнах СНД люди відчувають ще більшу нестачу