

УДК 619: 638.147.5: 612. 063

ОСОБЛИВОСТІ ПІДГОТОВКИ МАЗКІВ ГЕМОЛІМФИ БДЖОЛИ-ІМАГО

О. С. Кистерна, лікар вет. мед., ст. викл., пошукач, *В. В. Гаркава*, лікар вет. мед, ст. викл.

О. В. Мусієнко, к. вет. н., доцент

Lesya_sumy2008@ukr.net

Сумський національний аграрний університет

Дослідження гемолімфи медоносних бджіл є складним та важливим питанням, яким займалися Angalas (1901), Snodgrass (1925), Мюллер (1925), Метальников, Туманов (1930), Фіг, Моргенталер, Іегер, Шишкін, Дерлодже (1960), Соколов (1963), Запольских (1976), Злотін, Руденко, Немкова, Маслій (з 1986). Відомо, що морфологія гемоцитів бджоли може змінюватися впродовж життя у різні стадії розвитку, пори року, під дією різних збудників та препаратів. Також оцінка кількісних та якісних показників гемоцитів може відображати фагоцитарну активність клітин організму бджоли, що є цікавим для вивчення імунних реакцій комах.

Дослідження, що проводяться на кафедрі терапії, фармакології та клінічної діагностики СНАУ з метою розробки оздоровчих заходів на пасіках, спонукали нас більш ретельно підійти до цього питання. Був проведений аналіз різних методик підготовки мазків з гемолімфи, в результаті якого встановили схожість основних етапів, що різнилися за методами санації тіла та відбору гемолімфи, тривалістю висушування мазків, використання різних фіксаторів. Вивчалися і такі моменти, як вплив наркотизації на бджіл, занурення їх у гарячу воду «метод гарячої фіксації», використання різних вікових груп бджіл тощо.

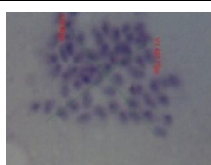
Були проведені досліди з підготовки мазків з гемолімфи згідно з запропонованими методиками з метою відпрацювання «загальних правил», яких слід дотримуватися, щоб одержати якісні мазки. Для візуальної оцінки використовували насадку на мікроскоп з перехідником на комп'ютер — цифрова камера DELTA OPTICAL 2.0 MP (http://www.astroscope.com.ua/kamera_delta_optical_2_mp/3394.htm).

У результаті експериментів була запропонована нижче наведена схема підготовки мазків із гемолімфи бджіл-імаго (табл.). Визначним при цьому була мінімізація впливу зовнішніх факторів на бджолу при відборі гемолімфи та виявлення небажаних змін у гемоцитах, що з'являються на певних етапах підготовки мазків та можуть змінити як саму якість виготовлення мазків, так і морфологію клітин (рис.).

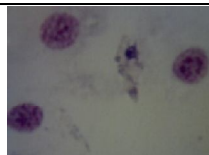
Таблиця

Удосконалена схема підготовки мазків гемолімфи бджоли-імаго

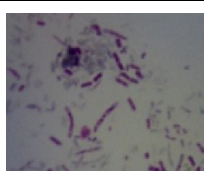
1. відбір бджіл	В експерименті порівнюють гемолімфу бджіл, відібраних за принципом аналогів (сила сім'ї, порода, вік). Бджіл беруть з вулика у ентомофільні садки. Потім пінцетом, невеликими порціями, відбирають у скляну ємність з попередньо розміщеним шматком бинту чи вати, за який бджоли чіпляються, тим самим полегшується їх фіксація. Наркотизацію не проводять свідомо, для попередження змін в гемоцитах (рис. а — адгезія гемоцитів бджоли).
2. фіксація бджіл	Живих бджіл фіксують тільки механічно, тримаючи пінцетами з обох боків. Одночасно тіло санують вухною паличкою, змоченою 40 % спиртом, щоб не викликати різкого почорніння покривів бджоли, як при застосуванні спиртів більшої концентрації. Це виявляється достатнім для попередження вильоту бджоли під час досліджу.
3. відбір гемолімфи	а) З грудного відділу: після декапітації бджоли, обережно вичавлюють гемолімфу на скло з грудки, не здавлюючи черевце — гемолімфа виявляється менш або майже не забруднена бактеріями — спосіб для визначення груп гемоцитів (рис. б). б) З черевця: між 3–4 тергіками шляхом проколу голкою; краплі гемолімфи, що виступили набираємо інсуліновим шприцом без голки з поверхні черевця або голкою через прокол — у гемолімфу потрапляють бактерії — спосіб для вивчення фагоцитарної реакції на присутність бактерій у черевці (рис. в)
4. нанесення на скло	На одне предметне скло від однієї бджоли наносять гемолімфу, яку розтягують покривним скельцем на 10–15 мм вздовж скла. Багато користуватися однаковим способом нанесення гемолімфи на скло — від кінця ребра впродовж предметного скла вліво — для спрощення подальшої мікроскопії. На одне скло — проба від однієї бджоли. Для одного експерименту беремо гемолімфу не менше ніж від 10–20 бджіл та враховуємо середні показники.
5. висихання	Тривалість висихання мазка залежить від об'єму відібраної гемолімфи та t° приміщення. Головне — досягнути відсутності липкості мазку, щоб подальша хімічна фіксація не знищила гемоцити. Пропонуємо: не менше 30–60' висихання при кімнатній t° та на теплом повітрі перед обігрівачем до припинення липкості мазку — 5–10'. Висушування менше ніж 30' призведе до «не досихання» мазків та змивання гемоцитів фіксатором (рис. г).
6. фіксація	Краща виявилася: метанол — 5'; 95 % етил. спирт 5'; спирт-ефір — 2'; Денатурат К — 5'. Тривала фіксація (більше 5–10') руйнує гемоцити (рис. г). Потім мазки потрібно просушити на повітрі 2–5' для випаровування фіксатора.
7. фарбування	Спосіб Романовського-Гімза — 30–60' в залежності від t° приміщення. Важливо правильно підготувати фарбу (для чого беруть 3 краплі густої фарби на 1 мл дистильованої води; використовують фосфатний концентрований буфер для гематологічних досліджень та контролю pH). Мазки фарбують методом підшарування, що попереджає осідання гранул фарби на мазках. Приклади якісно підготовлених мазків (рис. б, в, г).



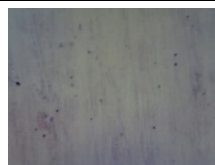
а



б



в



г



г

Рис. Візуалізація якості підготовлених мазків та зміни в гемоцитах бджоли

При виготовленні мазків з гемолімфи бджіл та подальшої морфологічної оцінки гемоцитів потрібно мінімізувати вплив зовнішніх факторів (наркоз, гаряча фіксація, тощо) на організм бджоли під час відбору гемолімфи та чітко дотримуватися запропонованої нами удосконаленої схеми підготовки мазків.