

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ ГОМОГЕНАТА ИЗ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ПЧЕЛ

Сердюченко Ирина Владимировна, канд. ветеринар. наук, доцент кафедры «Микробиология, эпизоотология и вирусология», ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ им. И. Т. Трубилина.

350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13.

E-mail: serd-ira2013@yandex.ru.

Гугушвили Нино Нодариевна, д-р биол. наук, проф. кафедры «Микробиология, эпизоотология и вирусология», ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ им. И. Т. Трубилина.

350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13.

E-mail: gugushvili.nino@yandex.ru.

Ключевые слова: пчела, фосфатаза, гомогенат, кислая, технологические, иммунологические.

Цель исследования – расширение технологических возможностей в области иммунологических исследований в пчеловодстве. Методика исследований представляет собой определение активности кислой фосфатазы в гомогенате из органов и тканей пчел, включающей подготовку биологического субстрата, обработку его буферной смесью с pH равной 5,0, инкубацию биологического субстрата, промывание дистиллированной водой, высушивание, дополнительное окрашивание мазков биологического субстрата, затем промывание дистиллированной водой, высушивание и определение по количеству окрашенных гранул в цитоплазме в биологическом субстрате процента активности фермента кислой фосфатазы, микроскопирование и определение по степеням окрашенности гранул в цитоплазме тромбоцитов, находящихся в гомогенате из органов и тканей. В качестве биологического субстрата использовался гомогенат из органов и тканей пчел. Для проведения исследований создали 4 группы пчел разных пород (итало-карпатской, карпатской, приокской, серой горной кавказской), которые были подвергнуты исследованию по вышеуказанной методике. Данный метод позволил определить микробные свойства организма пчел, а именно, активность кислой фосфатазы, определение которой в мазках гомогената из органов и тканей является одним из важных тестов диагностики иммунитета организма пчел. Было установлено, что чем выше средний цитохимический индекс, тем выше активность фермента кислой фосфатазы в органах и тканях пчел, и следовательно, выше состояние иммунитета у пчелы. Он оказался выше в 1 группе пчел итало-карпатской породы. Предлагаемый способ позволяет уменьшить материальные затраты и время на определение исследуемого показателя. Данная методика позволяет экспресс-методом определить микробицидные свойства организма пчел путем определения активности кислой фосфатазы в тромбоцитах находящихся в гомогенате из органов и тканей.

Иммунитет (immunitas – невосприимчивость) представляет собой устойчивость пчел различных возрастов к микробам и продуктам их жизнедеятельности.

У пчел, как у общественных насекомых, существует тесная связь устойчивости отдельных особей с устойчивостью всей пчелиной семьи [3]. Здоровые, устойчивые к болезням пчелы создают устойчивые к болезням семьи [2].

Снижение иммунитета любого живого организма, в том числе и пчел, влечет за собой нарушение гомеостаза организма и вытекающие из него последствия: снижение жизнеспособности, работоспособности, репродуктивной способности и т. д. [1, 4, 7].

В связи с этим определение активности кислой фосфатазы в мазках, полученных из гомогената тканей и органов, как показателя уровня иммунитета насекомого, имеет важное значение в диагностике иммунобиологической реактивности организма пчел в разные физиологические периоды [5, 6].

Цель исследования – расширение технологических возможностей в области иммунологических исследований в пчеловодстве.

Задача исследований – определение активности кислой фосфатазы гомогената из органов и тканей пчел по среднему цитохимическому индексу.

Материалы и методы исследований. Для проведения исследований было создано

4 группы пчел 4 пород (итало-карпатской, карпатской, приокской, серой горной кавказской) по 10 пчел в каждой группе.

Поставленная задача была решена так – для определения активности кислой фосфатазы в гомогенате из органов и тканей пчел, определяли активность фермента кислой фосфатазы по среднему цитохимическому индексу.

Применение методики основано на взаимодействии кислой фосфатазы с α -нафтилфосфатом натрия, которая катализирует гидролиз α -нафтилфосфата натрия с образованием α -нафтола и фосфорнокислого двузамещенного натрия.

Для активации кислой фосфатазы в систему вводили буферную смесь, состоящую из 50,70-48,50 мл 0,1 М раствора моногидрата лимонной кислоты (цитрата натрия), 49,30-51,50 мл 0,2 М двузамещенного фосфорнокислого натрия, 24 мг этилендиаминтетрауксусной кислоты для обеспечения pH=4,8-5,0. Образовавшийся комплекс (азокраситель) окрашивал кислую фосфатазу, содержащуюся внутри в виде гранул в цитоплазме нейтрофильных гранулоцитов.

Активность кислой фосфатазы в платоцитах гемолимфы определялась по 4 степеням.

1 степень. Подготовка мазков гомогената из органов и тканей и их фиксация. У пчел (не обездвиженных эфиром, чтобы активность фермента не снизилась) глазными ножницами и пинцетом удаляли сначала наружный покров, затем кишечник. Ткани и органы (от десяти пчел) помещали в ручной стеклянный гомогенизатор и добавляли физраствор из расчета 1:1 буферной смесью, затем осторожным движением тefлонового пестика вверх и вниз, чтобы не вылилось содержимое, гомогенизировали в течение 1-2 минут. Каплю гомогената наносили на край сухого обезжиренного стекла. Затем впереди капли под углом 45° подводили шлифованный край покровного стекла и движением правой руки от себя распределяли каплю тонким слоем по предметному стеклу. Мазки высушивали на воздухе и фиксировали в парах 40% формалина в течение 3-5 минут.

2 степень. Инкубация мазков гомогената. На фиксированные формалином мазки гомогената наносили равномерным слоем инкубационную смесь и помещали во влажную камеру. Инкубацию мазков проводили в темноте в течение 2-2,5 ч при температуре 37,5 °С. Затем промывали дистиллированной водой, высушивали, дополнительно окрашивали мазки 0,5% метиленовым синим в течение 0,5-1 мин, затем промывали дистиллированной водой, сушили и по количеству окрашенных гранул в цитоплазме (платоцитов – в красно-коричневый, мембраны – в сине-фиолетовый, ядра клеток – в голубой цвета) определяли активность фермента кислой фосфатазы по среднему цитохимическому индексу.

3 степень. Микроскопия мазков. Микроскопию проводили с использованием иммерсионной системы при увеличении (90×15).

4 степень. Выведение среднего цитохимического индекса. Сначала проводили визуальную оценку цитохимической реакции следующим образом:

0-я степень – окрашено только ядро в голубой цвет, цитоплазма не окрашена, контуры мембраны слабо окрашены в серо-фиолетовый цвет;

1-я степень – вся цитоплазма диффузно окрашена в красно-коричневый цвет, контуры мембраны окрашены в сине-фиолетовый цвет, ядро в голубой цвет;

2-я степень – в цитоплазме хорошо видны окрашенные в красно-коричневый цвет гранулы, окрашено более $\frac{1}{4}$ цитоплазмы, контуры мембраны интенсивно окрашены в сине-фиолетовый цвет, в голубой цвет;

3-я – всю цитоплазму занимают гранулы, окрашенные в красно-коричневый цвет, но ядро свободно, окрашено $\frac{3}{4}$ и более цитоплазмы, контуры мембраны интенсивно окрашены в сине-фиолетовый цвет, в голубой цвет;

4-я степень – гранулы занимают всю цитоплазму и наслаиваются на ядро, окрашены в красно-коричневый цвет, контуры мембраны интенсивно окрашены в сине-фиолетовый цвет, в голубой цвет.

Затем (предварительно подсчитав 100 нейтрофилов) вычисляли по формуле средний цитохимический индекс:

$$СЦИ = \frac{a + b + c + d}{100},$$

где а, б, в, г, д – количество клеток соответственно 0, 1, 2, 3, 4-й степени.

Результаты исследований. При микроскопии мазков были получены следующие результаты:

– у пчел итало-карпатской породы неактивных платоцитов, т. е. нулевых (0), было подсчитано в мазке гемолимфы в количестве 12 клеток, первой степени – 13 клеток, второй степени – 16, третьей степени – 22, четвертой степени – 37;

– у пчел карпатской породы: платоцитов нулевой степени – 13 клеток; первой – 12; второй – 16; третьей – 22; четвертой – 37;

– у пчел приокской породы: платоцитов нулевой степени – 27 клеток; первой – 11; второй – 13; третьей – 16; четвертой – 32;

– у пчел серой горной кавказской породы: платоцитов нулевой степени – 33 клетки; первой – 9; второй – 10; третьей – 16; четвертой – 32.

Сводные данные микроскопических исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1

Группы пчел	Количество обнаруженных плазмоцитов, шт.				
	0 степени	1 степени	2 степени	3 степени	4 степени
1 группа (итало-карпатская порода)	12	13	16	22	37
2 группа (карпатская порода)	13	12	16	22	37
3 группа (приокская порода)	27	11	13	16	32
4 группа (серая горная кавказская порода)	33	9	10	16	32

По приведенной выше формуле подсчитали средний цитохимический индекс кислой фосфотазы в гомогенате из органов и тканей пчел по всем четырем породным группам. Сводные данные подсчета отражены в таблице 2.

Таблица 2

Группы пчел	Средний цитохимический индекс
1 группа (итало-карпатская порода)	2,59
2 группа (карпатская порода)	2,58
3 группа (приокская порода)	2,13
4 группа (серая горная кавказская порода)	2,05

Предложенный способ показывает непосредственное содержание изучаемого фермента в гомогенате из органов и тканей у пчел.

По активности кислой фосфатазы определяют состояние микробицидных систем гемолимфы, принимающих участие в формировании неспецифической резистентности организма пчел.

Активность кислой фосфатазы в платоцитах гемолимфы определяется по четырём ступеням.

Средний цитохимический индекс у пчел разных пород варьирует, что обусловлено видовыми особенностями организма насекомого.

Высокие показатели среднего цитохимического индекса (2,59) в первой группе пчел итало-карпатской породы указывают на высокую активность фермента кислой фосфатазы в органах и тканях у пчел, и, следовательно, высокое состояние иммунного статуса организма пчел данной породы.

Заключение. Определение активности кислой фосфатазы в мазках гомогената из органов и тканей является одним из важных тестов диагностики иммунитета организма пчел. Данная методика позволяет экспресс-методом определить микробицидные свойства организма пчел путем определения активности кислой фосфатазы в тромбоцитах, находящихся в гомогенате из органов и тканей. На практике данный метод является наиболее быстрым и точным, по сравнению с известным методом определения кислой фосфатазы в сыворотке крови у теплокровных животных, как с научной, так и с экономической точки зрения, за счет правильного подбора сочетания компонентов. Способ позволяет уменьшить материальные затраты и время на определение исследуемого показателя.

Библиографический список

1. Троцук, О. О. Приокские пчелы в Рязанской области / О. О. Троцук, М. О. Короткова, Д. В. Колесниченко // Пчеловодство. – 2015. – № 6. – С. 14-16.
2. Зюман, Б. В. Устойчивость пчел к заболеваниям / Б. В. Зюман, А. П. Шариков, Н. И. Лобаченко // Пчеловодство. – 1987. – № 5. – С. 12.
3. Сердюченко, И. В. Микробиоценоз кишечника медоносных пчел и его коррекция : дис. ... канд. ветеринар. Наук : 06.02.02 / Сердюченко Ирина Владимировна. – Краснодар, 2013. – 145 с.
4. Морева, Л. Я. Статистический анализ комплекса признаков пчел серой горной кавказской породы / Л. Я. Морева, И. А. Морев, А. В. Абрамчук, Л. С. Пимахова [и др.] // Труды Русского энтомологического общества. – 2013. – Т. 84, № 1. – С. 29-33.
5. Гумовский, И. Е. Изучение хозяйственно-полезных признаков пчел карпатской породы в условиях Московской и Рязанской областей // Аграрная Россия. – 2013. – № 9. – С. 9-10.
6. Литвинова, А. Р. Достоинства и недостатки пчел карпатской породы / А. Р. Литвинова, И. В. Сердюченко, В. И. Терехов, А. А. Шевченко // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : мат. X Всероссийской конф. – Краснодар : КубГАУ, 2017. – С. 237-238.
7. Serdyuchenko, I. V. Quantitativ evaluation of microflora the digestive tract of bees before and after wintering / I. V. Serdyuchenko // International conference on advanced engineering, science and technology : conference proceedings. – Netherlands : Rotterdam, 2017. – P. 74-79.