

## Úloha 5. Hemolýza erytrocytů ultrazvukem.

### Cíl úlohy:

Ověřit účinek ultrazvuku na erytrocyty z hlediska délky jeho působení

### Potřeby k měření:

Ultrazvukový generátor BTL-07, mikroskop s připojením k počítači, Bürkerova komůrka, stojánek se zkumavkami, pipety, zkumavka s plochým dnem na ozvučení, suspenze erytrocytů, fyziologický roztok, buničitá vata, kontaktní medium (parafinový olej).

### Pracovní postup:

V kádince je připravena suspenze erytrocytů (2% koňská krev).

- 1) Tuto suspenzi po dostatečném promíchání přelijte do skleněné zkumavky s plochým dnem, stačí cca 3 ml, což je asi polovina zkumavky. Dále pracujte jen s touto suspenzí.
- 2) Nejprve si spočítejte počet krvinek v této ještě neozvučené (kontrolní) suspenzi. Suspenzi je třeba naředit 10krát, to je 0,1 ml suspenze + 0,9 ml fyziologického roztoku. **Před jakoukoli manipulací je třeba suspenzi promíchat!**
- 3) Naplňte Bürkerovu komůrku a spočítejte krvinky minimálně ve 20 malých čtvercích. Spočítejte množství neozvučených krvinek v 1 ml suspenze.
- 4) Zapněte ultrazvukový generátor. Hlavici upevněnou ve stojanu potřete parafinovým olejem, abyste docílili dobrého kontaktu hlavice se zkumavkou.
- 5) Před vlastním provedením hemolýzy nastavte čas - stačí 30 sekund. Sepněte start a postupně zvyšujte intenzitu ultrazvuku. Na hlavici v parafinovém oleji můžete sledovat kavitační bubliny. Časový spínač se automaticky vypne.
- 6) Nyní zkumavku s plochým dnem položte na hlavici. Nastavte intenzitu  $0,1\text{W}/\text{cm}^2$  a dobu ozvučení 30 sekund. Sepněte START a po dané době ozvučení přístroj automaticky vypne. Z ozvučené suspenze po promíchání odeberte 0,1ml naředte přidáním 0,9ml fyziologického roztoku a spočítejte erytrocyty.
- 7) Suspenzi v kádince s plochým dnem znovu ozvučte opět po dobu 30s. Po ozvučení dále postupujte dle bodu č.6. V případě, že průměrný počet krvinek v jedné komůrce klesne pod 5 neředte již suspenzi a Bürkerovu komůrku plňte neředěnou suspenzí!
- 8) Celkem provedete 6 ozvučování, pouze pokud by k plné hemolýze došlo dříve (například po čtvrtém třicetisekundovém ozvučování) pokus ukončíte.
- 9) Do tabulky zaneste počet krvinek přepočítaný na 1ml **plné krve** a stupeň hemolýzy v závislosti na době ozvučení, do grafu vynesete závislost stupně hemolýzy n a době ozvučení.

V diskuzi se zamyslete nad možnými vlivy ultrazvuku na organismus.