

Zadání samostatného cvičení:

2. Hemolýza

Klíčové pojmy:

Hemolýza, erythrocyty, ultrazvuk, mechanické účinky ultrazvuku, kavitace, Bürkerova komůrka, optický mikroskop, objektiv, okulár, kondenzor

Praktický význam:

V této úloze demonstrujeme biologické destruktivní účinky ultrazvuku demonstrující především jeho využití při čistění nástrojů, či zubním lékařství. Nicméně vlastní úloha je více zaměřena na manuální dovednosti, a to práci s automatickou pipetou a světelným mikroskopem, které jsou rutinní záležitostí v naprosté většině biologických laboratoří. Vlastní ruční počítání krvinek v zorném poli mikroskopu je nedílnou součástí hematologické praxe. Doplňkem je možno demonstrovat i jiné destruktivní účinky na vzorek krve, a tím simulovat situace, které mohou vést ke znehodnocení odebraného biologického materiálu.

2.1 Hemolýza erythrocytů ultrazvukem

Cíl:

Ověřit účinek ultrazvuku na erythrocyty z hlediska délky jeho působení

Pomůcky:

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

Postup:

- 1) V kádince je připravena suspenze erythrocytů (2% koňská krev). 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 $0,1\text{ml}$ naředte přidáním $0,9\text{ml}$ 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 zanešte počet krvinek přepočítaný na 1ml plné krve a stupeň hemolýzy v závislosti na době ozvučení, do grafu vynesete závislost stupně hemolýzy na době ozvučení

Výstup:

Graf závislosti stupně hemolýzy na době ozvučení

Diskuze:

Uvažujte v nad hlavními rozdíly mezi zde použitým ultrazvukovým vlněním a ultrazvukovým vlněním využívaným v diagnostice, aneb proč považujeme diagnostický ultrazvuk za jednu z nejbezpečnějších modalit.

2.2 Volitelné: Hemolýza erytrocytů mechanickými vlivy

Ozvučování vzorku nahradte mechanickým protřepáváním. Uzavřenou zkumavku opětovně po dobu jedné minuty usilovně protřepávejte. Případně opakovaným natahováním a vypouštěním do injekční stříkačky, např. série po 10 cyklech. Výstupem opět graf závislosti stupně hemolýzy na doby protřepávání/počtu natažení do stříkačky.

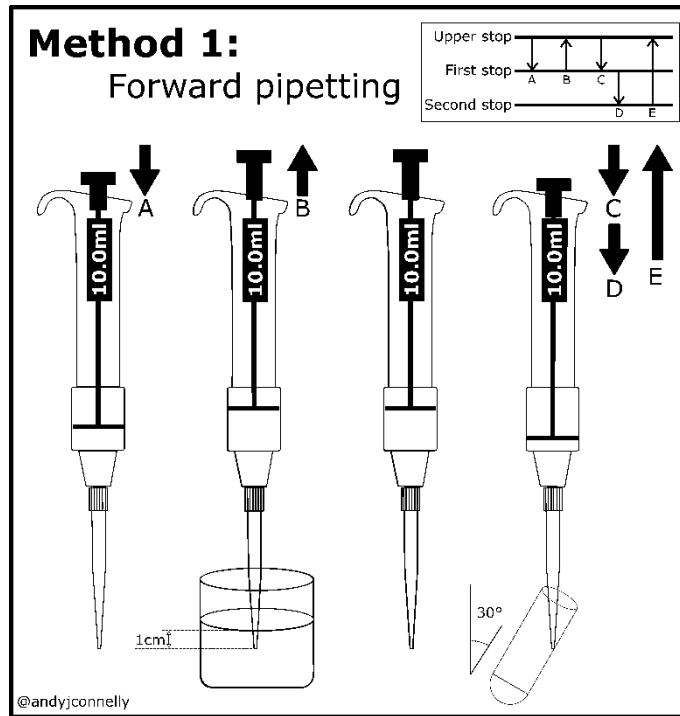
2.3 Volitelné: Stanovení absorpční křivky hemolyzované krve

Dle návodu z úlohy 1.1 proveďte stanovení absorpční křivky a absorpčního maxima zhemolyzované krve.

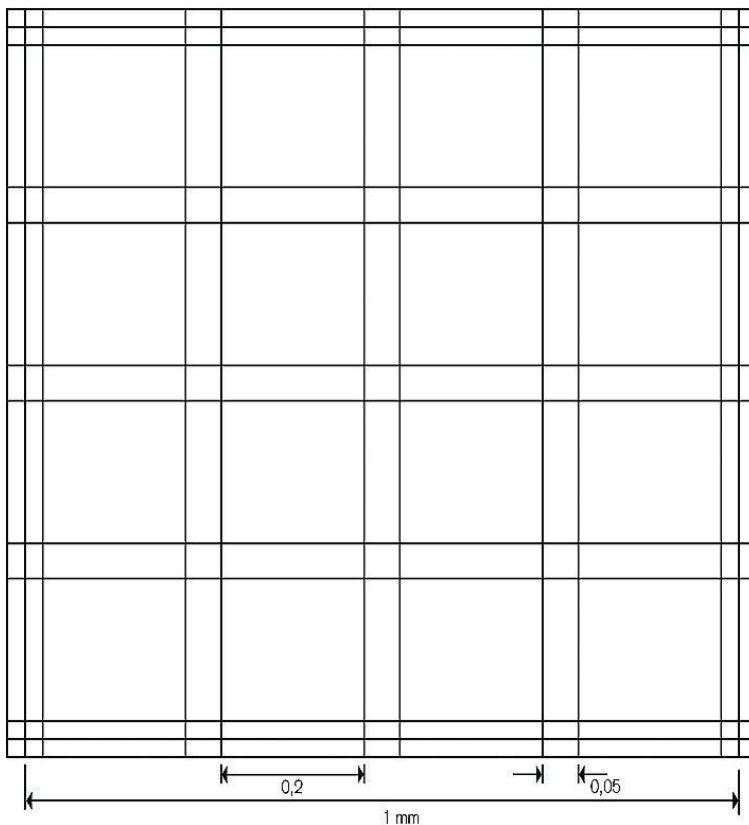
Příloha:

1) Technika pipetování:

Převzato z:
<https://andyjconnelly.wordpress.com/2017/02/12/practical-pipetting-a-guide/>

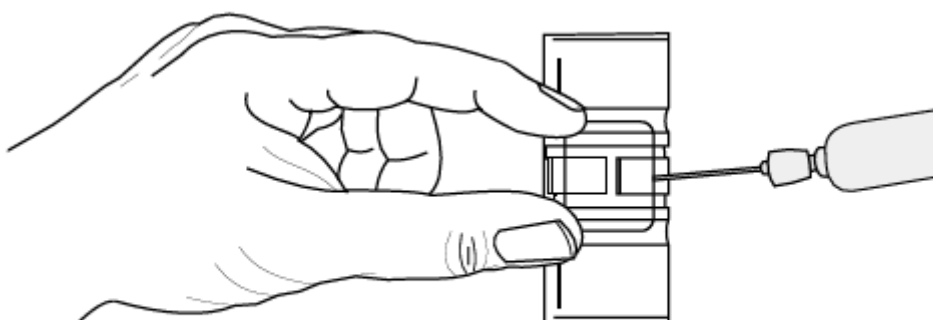


2) Schéma rastru Bürkerovy komůrky:



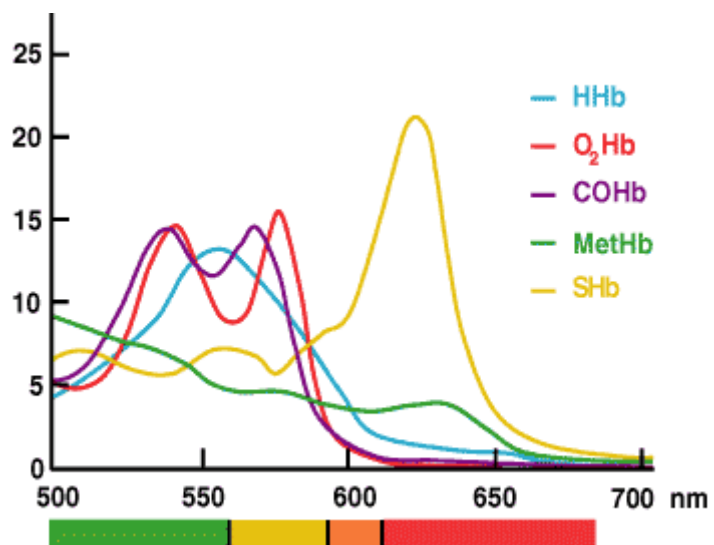
Převzato z:
<https://cz.vwr.com/store/product/7120539/pocitacky-bunek-burker-blaubrand>

3) Technika pipetování do Bürkerovy komůrky:



Převzato z:
<https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>

4) Absorpční křivky různých typů hemoglobinu



Převzato z:

<https://acutecaretesting.org/en/articles/hemoglobin-and-its-measurement>