

Imunologie hmyzu – hemocyty

1. Úvod – hemocyty, typy, funkce, sesilní x volné, odlišné zastoupení během vývoje, infekce atd.
2. Odběr hemolymfy larev VII. instaru zavíječe voskového *Galleria mellonella* a larev III. instaru *Drosophila melanogaster*, fenylthiomočovina jako antikoagulant, naředění vzorku 20x v pufru (fosfátový pufr, pH=7,0), fotodokumentace (Olympus SZX9 + Nikon D3100).
3. Počítání hemocytů v Bürkerově komůrce, porovnání s počtem lidských krvinek:

Počet buněk v 1 mm³ (μl) suspenze lze určit vzorcem: $b = \frac{n}{c * v * h} * z$

b...počet buněk v 1 mm³

n...celkový počet napočítaných buněk

c...počet čtverců ve kterých se počítalo (nejčastěji 25 nebo 50)

v...plocha použitého čtverce (malý nebo velký)

h...hloubka komůrky

z...použití ředění suspenze (uvádí se kolikrát byla suspenze ředěna např. 20x, tedy 20)

Hloubka: 0,1 mm

Plocha malého čtverce: 1/400 mm² = 0,0025 mm²

Plocha velkého čtverce: 1/25 mm² = 0,04 mm²

Počítáme ve 20 velkých čtvercích.

Počet hemocytů *G. mellonella* uvádí Chapman 1998: 4 mil./celá larva VII. instaru, Shapiro 1968: průměr ± SD: 33693 ± 3300 v mm³

Počet hemocytů *D. suzukii*: Kacszo et al. 2012: 150-200 /larvu III. instaru, která obsahuje cca 2.5 μl hemolymfy

Lidské erytrocyty: 3-6.10⁶/ mm³

Lidské leukocyty: 4-9.10³/ mm³

4. Specifické barvení hemocytů *G. mellonella* 0.05% akridinovou oranží (granulocyty), fotodokumentace (Olympus BX43 + kamera Infinity 2, Quick Photo Micro software).
5. Adherence plasmacytů *G. mellonella* pomocí přidaných vápenatých iontů (CaCl₂, 0.022g v 10 ml H₂O) fotodokumentace.
6. Mutace *D. melanogaster* Bc „black cells“ – nefunkční crystal cells.
7. Hemocyty *D. melanogaster* značené RFP (hml-Gal4;UAS-RFP), fotodokumentace.