

## Protokol č.1: Imunologie hmyzu – hemocyty

1. **Úvod:** hemocyty = krevní buňky hmyzu, slouží především k pohlcování cizorodých částic (jednoduchý imunitní systém) a hojení ran.  
Typy: prohemocyty, plazmatocyty, granulocyty, sferulocyty, adipohemocyty, oenocytoidy, koagulocyty. Mají různé funkce (fagocytóza, koagulace), mohou být sesilní (usedlé) x volné (cirkulující), 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).



Obr. *Drosophila melanogaster*: zleva kukla a larva, samotná larva III. instaru, více larev.

3. **Počítání hemocytů v Bürkerově komůrce**, porovnání s počtem lidských krvinek:

Počet buněk v 1 mm<sup>3</sup> (μl) suspenze lze určit vzorcem: 
$$b = \frac{n}{c * v * h} * z$$

b...počet buněk v 1 mm<sup>3</sup>

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

Hloubka: 0,1 mm

Plocha malého čtverce: 1/400 mm<sup>2</sup> = 0,0025 mm<sup>2</sup>

Plocha velkého čtverce: 1/25 mm<sup>2</sup> = 0,04 mm<sup>2</sup>

Počítáme ve 20 velkých čtvercích.

Počet hemocytů *G. mellonella* uvádí Chapman1998: 4 mil./celá larva VII. instaru,

Shapiro 1968: průměr ± SD: 33693 ± 3300 v mm<sup>3</sup>

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/ mm<sup>3</sup>

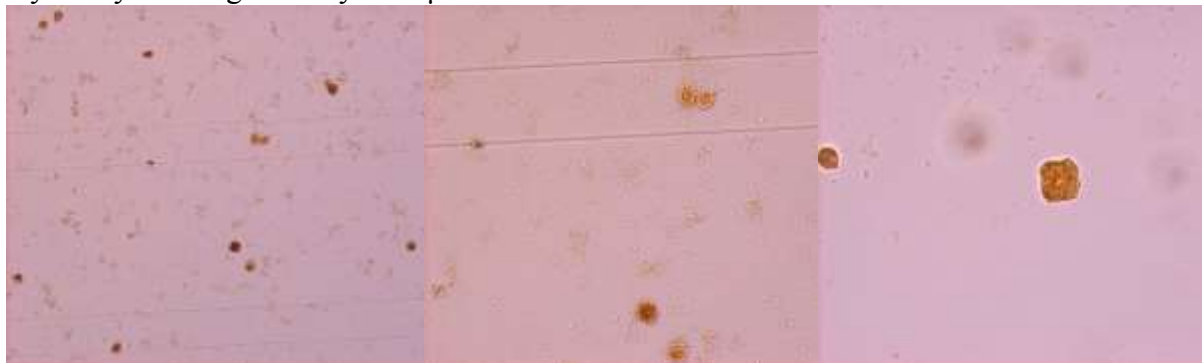
Lidské leukocyty: 4-9.103/ mm<sup>3</sup>

Výsledky:

*G. mellonella*: 27 500 hemocytů v 1μl

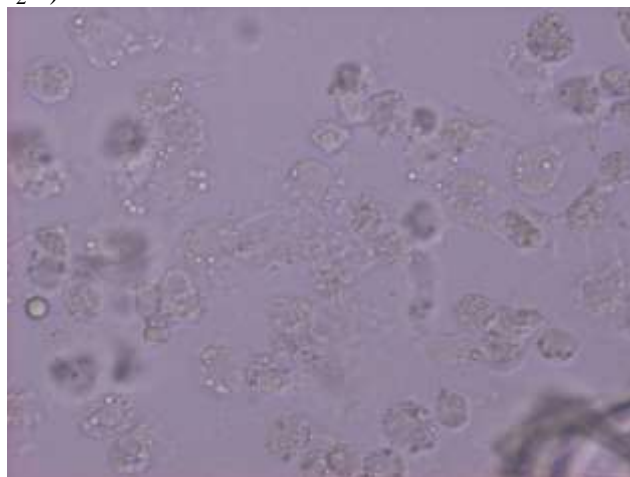
*Drosophila*: 57 800 hemocytů v 1μl (během ředění se stala chyba, což vysvětluje abnormální koncentraci hemocytů)

4. **Specifické barvení hemocytů *G. mellonella*** 0.05% akridinovou oranží (granulocyty), fotodokumentace (Olympus BX43 + kamera Infinity 2, Quick Photo Micro software).  
Výsledky: 6 500 granulocytů v 1 $\mu$ l.

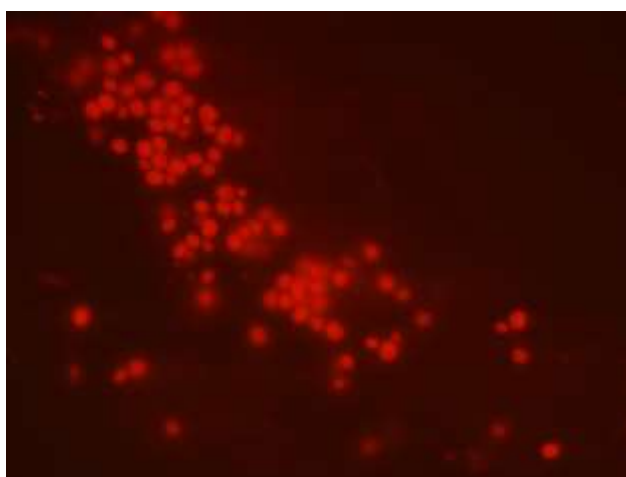


Obr. hemocytů *G. mellonella* po obarvení, přičemž granulocyty získají výraznou oranžovou barvu

5. **Adherence plasmatocytů *G. mellonella*** pomocí přidáných vápenatých iontů ( $\text{CaCl}_2$ , 0.022g v 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) fotodokumentace.



6. **Hemocyty *D. melanogaster* značené RFP** (hml-Gal4;UAS-RFP), fotodokumentace.  
Výsledky: hemocyty značené RFP pod fluorescenčním mikroskopem svítí výrazně rudě.



## 7. Závěr

V dnešním cvičení jsme s použitím Bürknerovy komůrky počítali hemocyty odebrané z *Galleria mellonella*. Vyšlo nám, že v přepočtu na jeden  $\mu$ l je v hemolymfě 27500 hemocytů. Dále jsme u *G. mellonella* pozorovali adheenci plasmatocytů pomocí přidáných vápenatých iontů a hemocyty značené RFP.