

Téma: Příprava roztěru hemolymfy

Teorie: Pozorování buněk hemocytů, hemolymfa u bezobratlých

Cíl: připravit roztěr z jednoho zástupce hmyzu (zavíječ voskový nebo bourec morušový) ke sledování hemocytů u hmyzu.

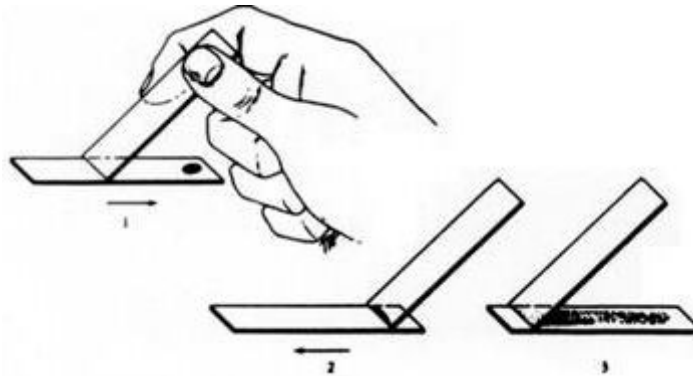
Materiál:

larvy bourec nebo zavíječe, kyvety na barvení, roztok May - Grünwald konc., PBS, Giemsa barvivo v poměru 1:9 s destilovanou vodou, metylalkohol, podložní skla, rukavice, sterilní bodce, ajatin na desinfekci, alkohol na čištění skel, budík, nastavitelné mikropipety, špičky, žiletky, teplotní vodní lázeň

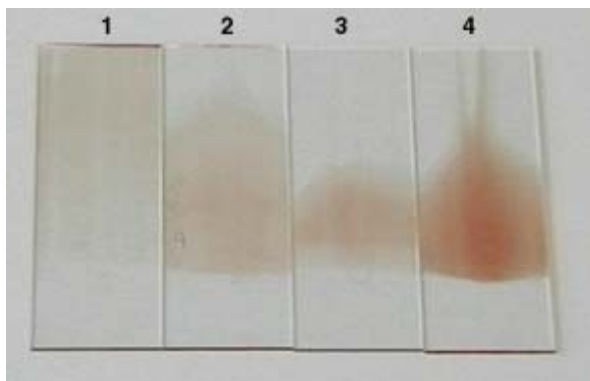
Postup práce:

Ustříhneme 1 nožku larvy a vytékající hemolymfu zachytíme kapkou na sklíčko a kapku rozetřeme a sklíčko s nátěrem zahřejeme

Roztěr:



Roztěry



1. příliš tenký a dlouhý
2. dobrý
3. příliš krátký, kapka krve byla moc malá
4. příliš silný, kapka krve byla moc velká

Barvení podle Pappenheima v květech:

3 min. fixace v kvěť s metylalkoholem

3 min. May - Grünwald konc. (minimálně 2 min.)

1 min. PBS

15 min. Giemsa - Romanowski 1:9 s vodou

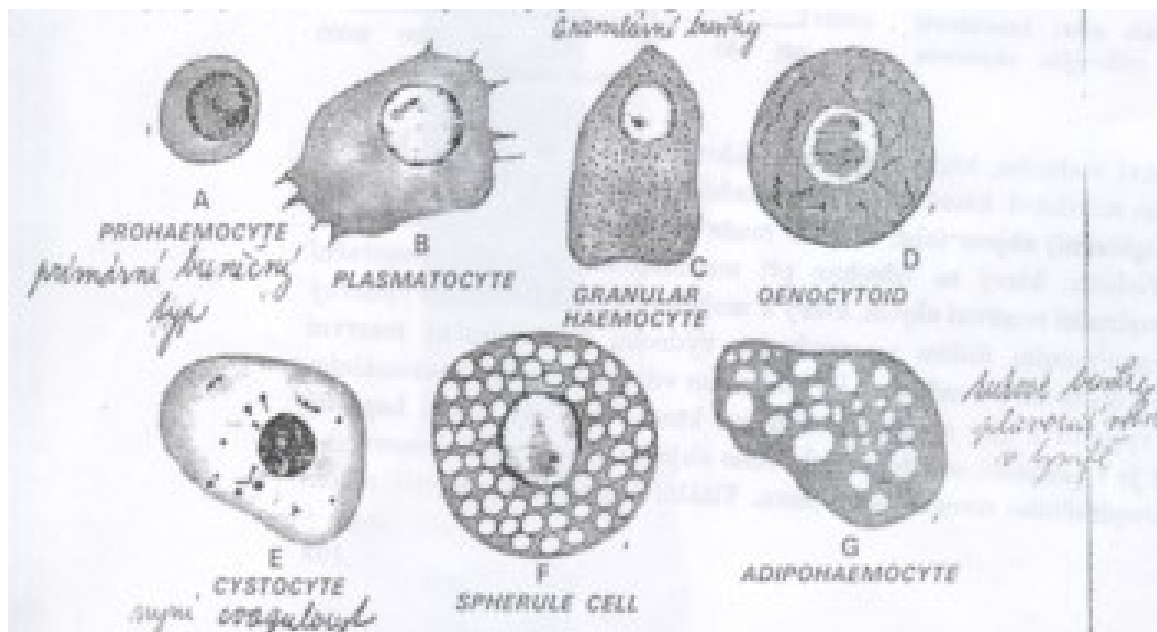
opláchnout v PBS, nechat schnout

pozn. sklíčka vkládat rubem k sobě do 1 drážky

Vyhodnocení: v roztěru z hemolymfy pozorujeme hemocyty, z krevních roztěrů člověka i myši počítáme krevní diferenciál - viz návod na další praktika

Sledování fagocytárních schopností hemocytů u larev Bource morušového nebo Zavíječe voskového.

Teorie: V hemolymfě se nachází tyto typy hemocytů: prohemocyt, plazmatocyt, granulocyt, eonocytoid, coagulocyt, sferulocyt, adipohemocyt. U Zavíječe fagocytují plazmatocyt a granulocyt, u Bource jen granulocyt. Cílem bude naučit se poznávat hemocyty a pozorovat jejich fagocytární aktivitu.



Cíl: Sledování fagocytární aktivity hemocytů, výpočet fagocytárního indexu a % fagocytózy

Materiál: Larvy Bource nebo Zavíječe (na každého posluchače 1 kus), roztok suspenze inertních částic MSHP (600 000/1 μ l, PBS:MSHP – 1:1), fenylothiomočovina, injekční stříkačka - mikrotubulinka, nůžky, podložní sklíčka, barvicí roztoky, eppendorfky, špičky, nastavitelné mikropipety

Postup:

1. Ustříhneme 1 nožku larvy a vytékající hemolymfu zachytíme kapkou na sklíčko a kapku rozetřeme a sklíčko s nátěrem zahřejeme
2. další kapku - 20 μ l přeneseme do eppendorfký obsahující fenylthiomočovinu, aby se hemolymfa nesrazila, přidáme 15 μ l roztoku částic MSHP a necháme kultivovat 30 minut
3. po kultivaci kápneme kapku hemolymfy stejným způsobem na podložní sklíčko a rozetřeme a sklíčko s nátěrem zahřejeme
4. do další larvy injikujeme 15 μ l roztoku inertních částic, larvy necháme v teple 30 min kultivovat
5. po kultivaci částic MSHP v larvě ustříhneme 1 nožku larvy a vytékající hemolymfu zachytíme kapkou na sklíčko a kapku rozetřeme a sklíčko s nátěrem zahřejeme
6. roztěry barvíme podle Pappenheima. (viz výše)

Výsledek a vyhodnocení: Pozorujeme a počítáme poměr množství fagocytovaných částic a množství fagocytů a vypočítáme fagocytární index (FI) a % fagocytózy zvlášť u fagocytózy s částicemi MSHP a zvlášť u fagocytózy s bakteriemi.

FI = (počet fagocytovaných částic)/(počet fagocytujících buněk)

% fagocytózy = (počet fagocytujících buněk)/(celkový počet buněk schopných fagocytózy v daném prostoru) x 100

1. Roztěry hodnotíme pomocí diferenciálního počtu hemocytů, při kterém jako fagocytující označujeme jen ty částice, které pohltily 3 a více partikulí.
2. Vypočítáme fagocytární index FI tak, že dělíme počet fagocytovaných částic počtem fagocytujících buněk.
3. Vypočítáme % fagocytózy tak, že dělíme počet fagocytujících buněk v daném prostoru počtem všech buněk schopných fagocytózy a násobíme 100.

Příklad vyhodnocení:

plasmatocty	granulocyt	neznámý	suma
3			3
4	1		5
3			3
4			4
4	1		5
3			3
21	2 (%)	0 (%)	23

Tabulka: počty fagocytujících hemocytů v roztěru hemolymfy hmyzu

FI = počet fagocytovaných částic / počet fagocytujících buněk = X

%F = počet fagocytujících buněk / počet buněk schopných fagocytózy = X%

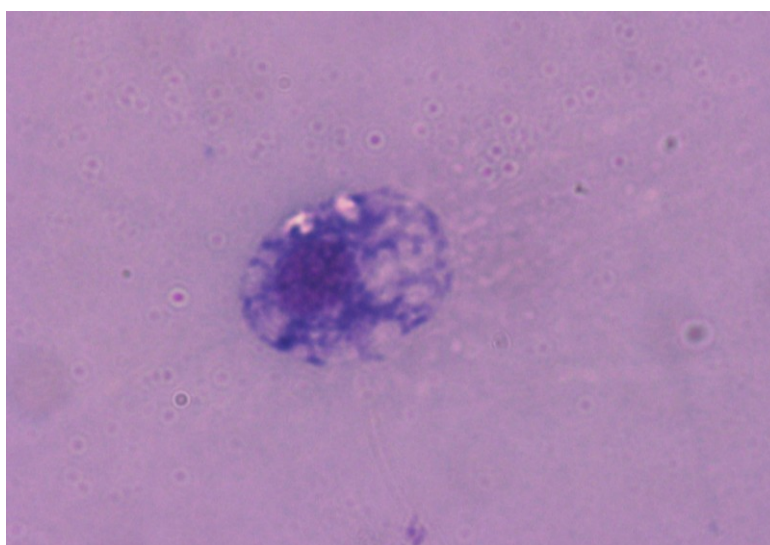
Schéma pokusu

METODA		Bez fagocyt. (kontr.)	Fagocytóza in vivo, in vitro
každý ze dvojice	larva sklo	kapka <input type="checkbox"/> → → roztěr, barvení	20 μ l hemol + 15 μ l (MSHP) → → kultivace → → roztěr <input type="checkbox"/> barvení

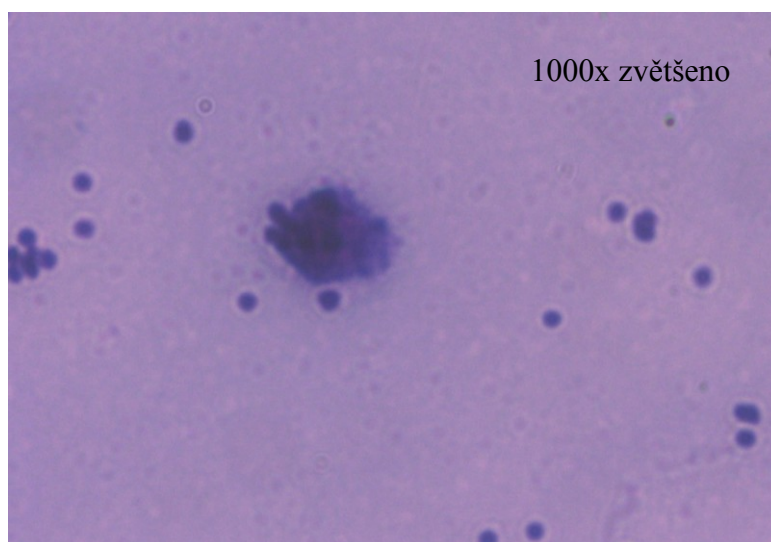
			larva + 15 μ l (MSHP + hep.) → → kultivace → → roztěr <input type="checkbox"/> barvení
--	--	--	--

Výsledky:

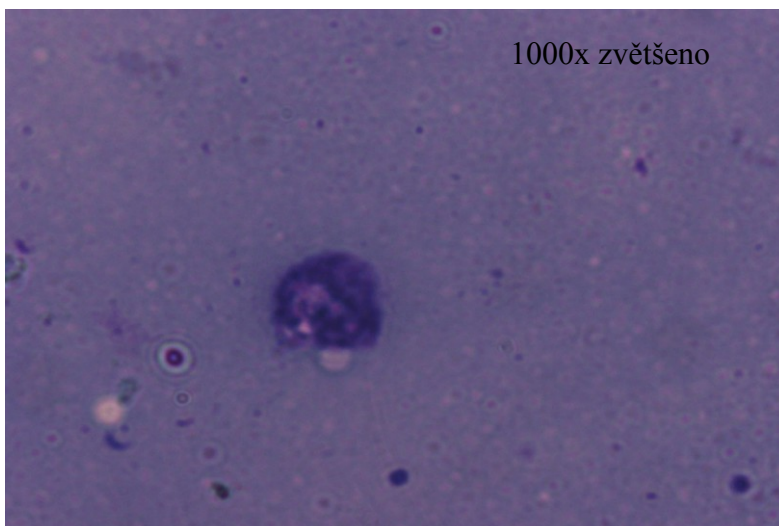
V praktiku jsem se naučila v roztěru hemolymfy rozeznávat základní typy buněk – hemocytů. Především plazmatocyty, sferulocyty, granulocyty, ojediněle i prohaemocyt a adipocyt. Cystocyt se mi v roztěru nepodařilo nalézt. Na následujících obrázcích jsou hemocyty z roztěru hemolymfy při tisícinásobném zvětšení za použití imersního objektivu.



Obr. 1 granulocyt (kontrola)



Obr. 2 plazmatocyt (in vitro)



Obr.3 plasmatocyt (in vivo)

Součástí tohoto úkolu bylo i sledování fagocytárních schopností hemocytů u larev zavíječe voskového

IN VIVO		IN VITRO	
plasmatocyt	granulocyt	plasmatocyt	granulocyt
0	3	4	3
1	0	5	0
0	0	3	5
0	3	5	2
5	7	3	2
6	1	5	6
1	3	6	1
1	15	4	4
2	1	4	2
3	4	0	3
14	35	39	21

Výpočet fagocytárního indexu

$$FI_{IN\ VITRO} = (\text{počet fagocytovaných částic}) / (\text{počet fagocytujících buněk})$$

$$FI_{IN\ VITRO} = 60/20 = 3,0$$

$$FI_{IN\ VIVO} = 49/20 = 2,5$$

Výpočet procenta fagocytózy

$$\% \text{ fagocytózy} = (\text{počet fagocytujících buněk}) / (\text{celkový počet buněk schopných fagocytózy v daném prostoru})$$

$$\% \text{ fagocytózy}_{IN\ VITRO} = 14 / 20 = 0,7 \rightarrow \text{In vitro fagocytuje } 70\% \text{ fagocytů}$$

% fagocytózy_{IN VIVO} = 9/20 = 0,45 In vivo fagocytuje **45%** fagocytů

Závěr:

Fagocytární index je vyšší in vitro než in vivo. To znamená, že in vitro připadá v průměru na jeden fagocyt 3 pohlčených částic. In vivo je v průměru fagocytováno 2,5 částic MSHP jedním fagocytem. Z toho vyplývá, že buňky in vitro snadněji pohlcují cizorodé částice. To potvrzuje i vypočtené procento fagocytózy, které je při in vitro pozorování 1,2x větší než pozorování in vivo. Toto procento fagocytózy udává, kolik procent z fagocytů daného pozorovaného souboru fagocytovala cizorodé částice MSHP.