

# Protokol

## 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.

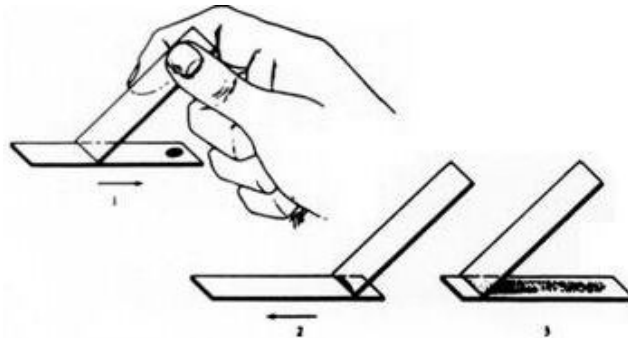
### Materiál:

Larvy bource nebo zavíječe, kyvety na barvení, barvicí souprava **Leukodif** (Biolatest) nebo barvicí roztoky na barvení podle Pappenheima (roztok May - Grünwald v poměru 1:1 s vodou, Giemsa barvivo v poměru 1:9 s destilovanou vodou, metylalkohol), podložní skla, rukavice, alkohol na čištění skel, nastavitelné mikropipety, špičky, oční nůžky, teplotní vodní lázeň

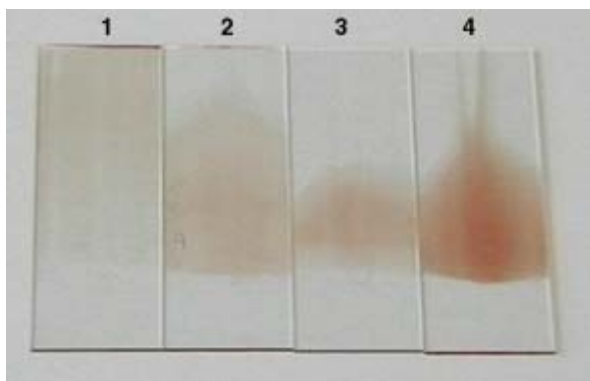
### Postup práce:

Ustříhneme 1 nožku larvy a vytékající hemolymfu zachytíme kapkou na sklíčko a kapku rozetřeme a sklíčko s nátěrem zahřejeme, např. na topení. Buňky lépe přilnou ke sklu.

### 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 kvetách:**

3 min. fixace v kvetě s metylalkoholem

3 min. May - Grunwald 1:1 s vodou (lépe 2 min.)

15 min. Giemsa - Romanowski 1:9 s vodou

opláchnout ve vodě, nechat schnout

pozn. sklíčka vkládat rubem k sobě do 1 drážky

### **další varianta barvení**

#### **Barvení soupravou Leukodif 200**

ponořit 5x1s do fixačního roztoku č. 1 (metanol), otřít kapky o stěnu nádobky

ponořit 3x1s do činidla č.2 (barvivo Eosin), otřít kapky o stěnu nádobky

ponořit 5x1s do činidla č. 3 (barvivo Azur), otřít kapky o stěnu nádobky

opláchnout v dest.H<sub>2</sub>O a nechá zaschnout na vzduchu

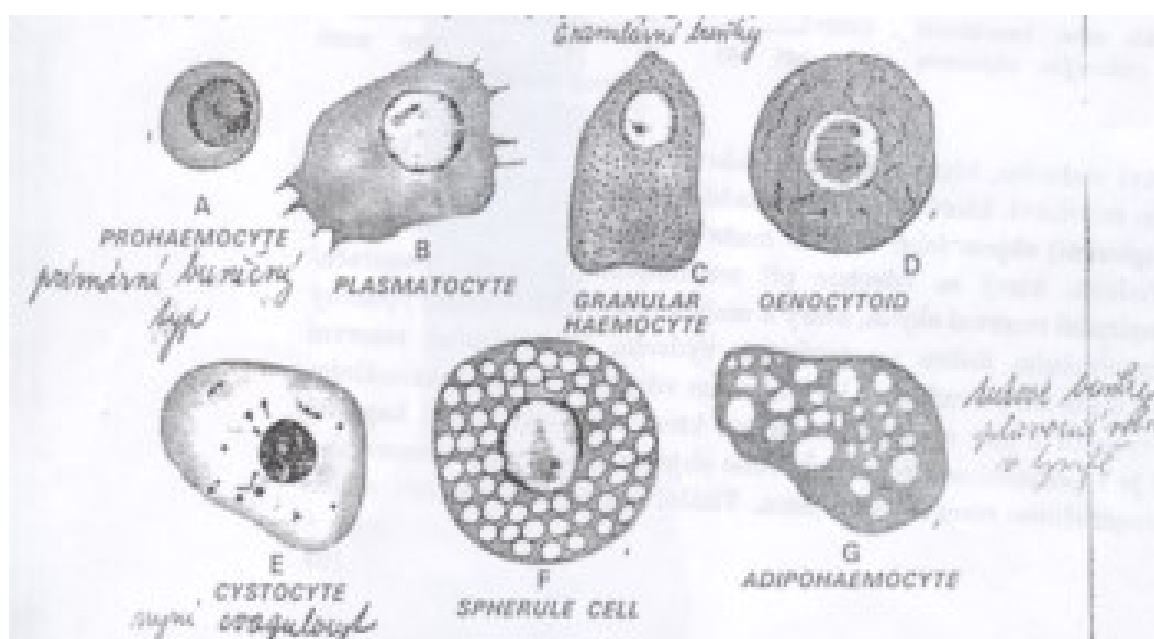
#### **Budeme provádět jednodušší barvení pomocí bervení Leukodif**

**Vyhodnocení:** v roztěru z hemolymfy pozorujeme hemocyty a zakreslíme

## Protokol

### 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 voskového**, roztok škrobových zrn, ředění škrobu: 15ml fyziol. roztoku plus 0,25g škrobu, fenylthiomočovina, injekční stříkačka - inzulinka, nůžky, podložní sklíčka, barvicí roztoky, eppendorfky, špičky, nastavitelné mikropipety, mikroskop

#### Postup:

1. Ustříhneme 1 nožku larvy a vytékající hemolymfu zachytíme kapkou na sklíčko a kapku rozetřeme a sklíčko s nátěrem zahřejeme (na topení)
2. další kapku - 15  $\mu$ l přeneseme do eppendorfky obsahující fenylthiomočovinu, aby se hemolymfa nesrazila, přidáme 7  $\mu$ l roztoku částic škrobu a necháme 20 min kultivovat
3. po kultivaci kápneme kapku hemolymfy stejným způsobem na podložní sklíčko a rozetřeme a sklíčko s nátěrem zahřejeme (in vivo způsob)

4. do další larvy injikujeme 20 µl roztoku inertních částic, larvy necháme v teple 20 min kultivovat (larvy při injikaci nenatahovat), (in vitro zp.)

5. po kultivaci částic (škrobu) v larvě ustrihneme 1 nožku larvy a vytékající hemolymfu zachytíme kapkou na sklíčko a kapku rozetřeme a sklíčko s nátěrem zahřejeme

6. roztěry barvíme barvicí soustavou **Leukodif** nebo podle Pappenheima.

**Výsledek a vyhodnocení:** 1. Pozorujeme hemocyty (kreslíme a fotíme aspoň tři druhy) bez fagocytózy a totéž s fagocytózou. 2. Počítáme poměr množství fagocytovaných částic a množství fagocytů a vypočítáme fagocytární index (FI) a % fagocytózy zvlášť u fagocytózy s částicemi škrobu (u in vitro způsobu)..

**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:**

plasmatocyt	granulocyt	neznámý	suma
3			3
1 <sup>3</sup> , 1 <sup>2</sup>	1		3
3			3

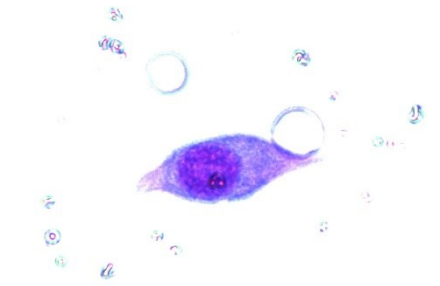
**Tabulka: počty fagocytujících hemocytů v roztěru hemolymfy hmyzu**

FI = počet fagocytovaných částic / počet fagocytujících buněk = X

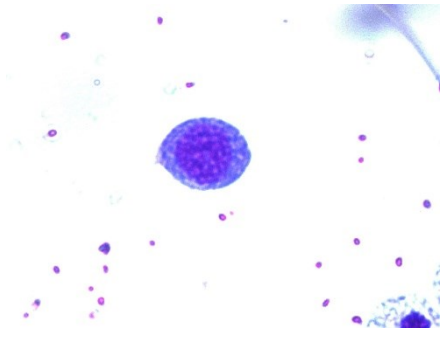
%F = počet fagocytujících buněk / počet buněk schopných fagocytózy = x%

**Schéma pokusu**

METODA		Bez fagocyt. (kontr.)	Fagocytóza in vivo, in vitro
každý ze dvojice	larva sklo	kapka <input type="checkbox"/> → → roztěr, barvení	15 µl hemol s phenylthio + 5 µl (škrob) → kultivace → → roztěr <input type="checkbox"/> barvení
			larva + 20 µl (škrob) → → kultivace → → roztěr <input type="checkbox"/> barvení



plazmocyty



granulocyty

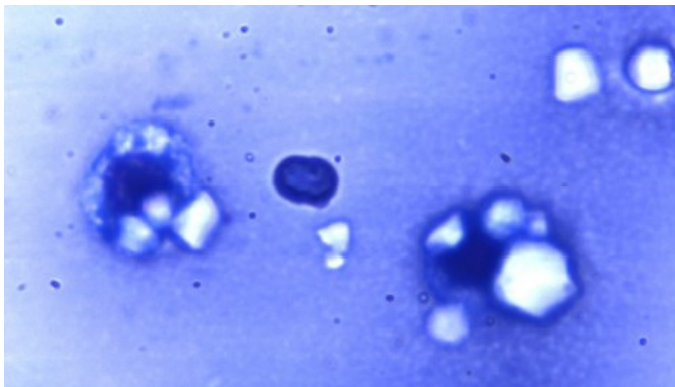


fagocytyza in vitro



fagocytyza in vivo

Fagocytyza in vitro





oenocytoid



plasmocyt