

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.

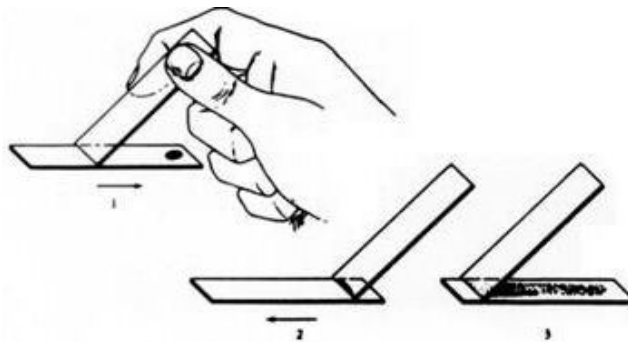
Materiál:

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

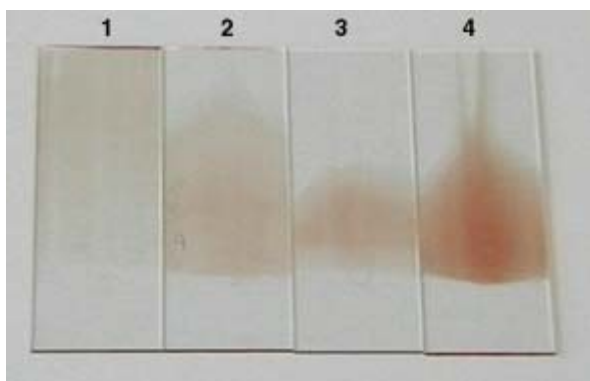
Postup práce:

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

Barvení soupravou Leukodif 200

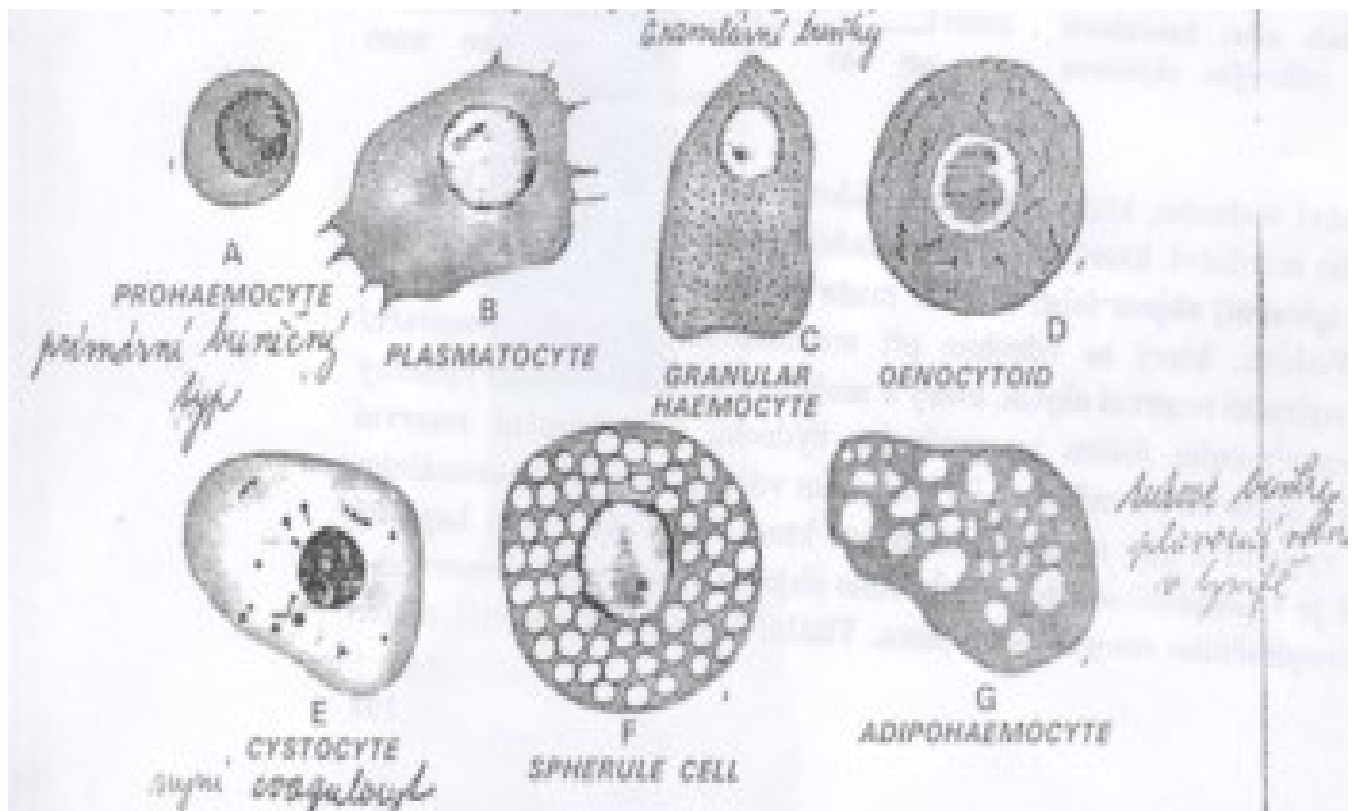
ponořit 5x1s do fixačního roztoku č. 1 (metanol), ořít kapky o stěnu nádoby

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

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

opláchnout v dest.H₂O a nechá zaschnout na vzduchu

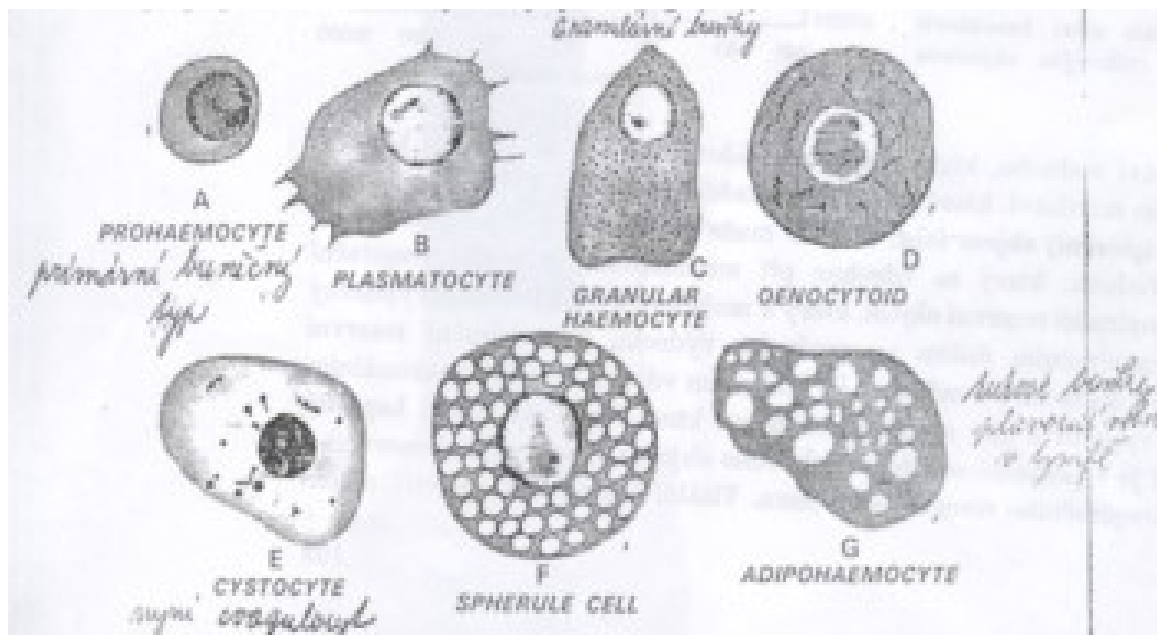
Vyhodnocení: v roztěru z hemolymfy pozorujeme hemocyty a zakreslíme



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, fenylothiomočovina, injekční stříkačka - inzulinka, 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 (na topení)
2. další kapku - 10 μ l přeneseme do eppendorfky obsahující fenylothiomočovinu, aby se hemolymfa nesrazila, přidáme 5 μ l roztoku částic škrobu a necháme 20min 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 μ l roztoku inertních částic, larvy necháme v teple 20 min kultivovat (larvy při injikaci nenatahovat), (in vitro zp.)

5. po kultivaci částic (škrobu) v larvě ustříhneme 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 |
| 4 | 1 | | 5 |
| 3 | | | 3 |
| 4 | | | 4 |
| 4 | 1 | | 5 |
| 3 | | | 3 |
| 21 | 2 (%) | 0 (%) | 23 |

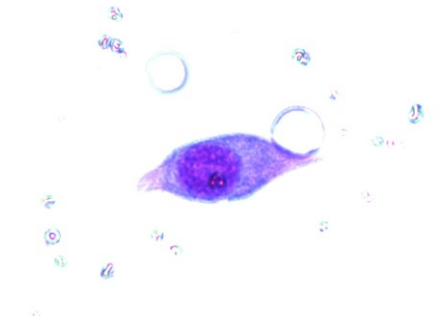
Tabulka: počty fagocytujících hemocytů v roztěru hemolymfy hmyzu

FI = počet fagocytovaných částic / počet fagocytujících buněk = X

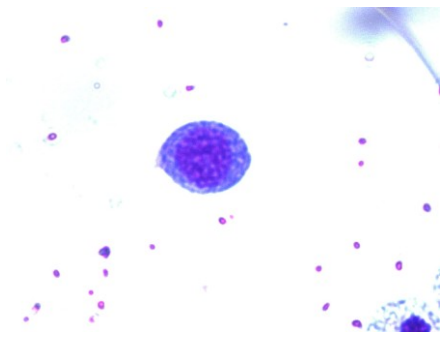
%F = počet fagocytujících buněk / počet buněk schopných fagocytózy = x%

Schéma pokusu

| METODA | | Bez fagocyt. (kontr.) | Fagocytóza in vivo, in vitro |
|------------------|---------------|---|--|
| každý ze dvojice | larva sklo | kapka <input type="checkbox"/> → → roztěr, barvení | 10 µl hemol s phenylthio + 5 µl (MSHP) → kultivace → → roztěr <input type="checkbox"/> barvení |
| | | | larva + 20 µl (škrob) → → kultivace → → roztěr <input type="checkbox"/> barvení |



plazmocyty



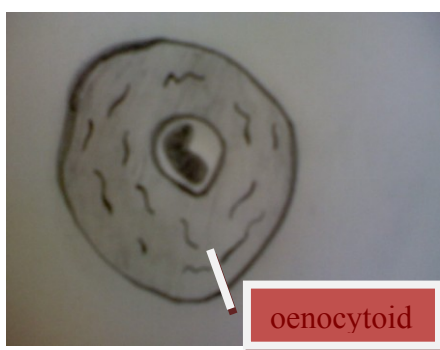
granulocyty



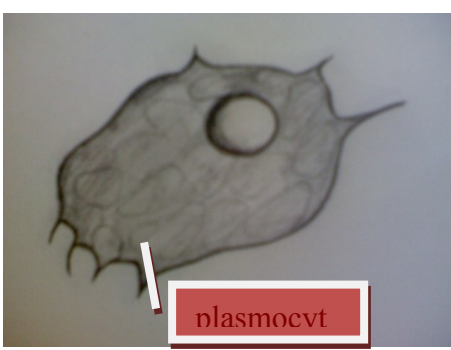
fagocytyza in vitro



fagocytyza in vivo



oenocytoid



plazmocyty