

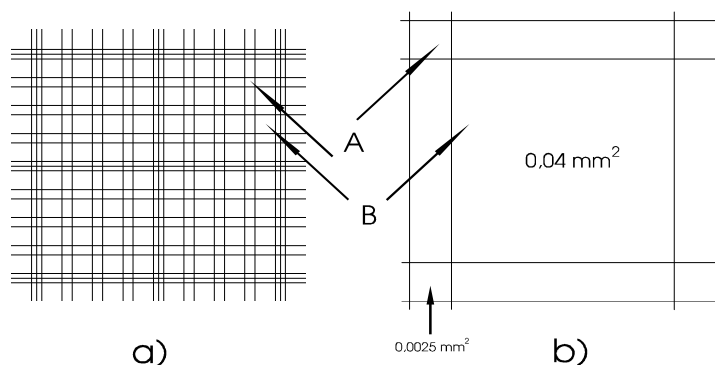
Počítání buněk

Potřeba spočítat množství buněk vzniká při řešení mnoha biologických otázek. Mnohé z nich mívají také klinický význam (zejména v hematologii je zjišťování počtu krvinek každodenním rutinním vyšetřením). Podle účelu a charakteru buněk mohou být ke spočítání množství buněk použity různé metody. Buňky bývají počítány přímo nebo nepřímo.

Nepřímo bývají počítány měřením charakteristik, které na počtu buněk závisí. O počtu buněk svědčí jejich hmotnost, kterou lze zjistit vážením. Množství buněk může být měřeno jako zákal suspenze nefelometricky (např. u bakteriální suspenze), nebo jako podíl objemu všech buněk ve vzorku (např. hematokrit pro červené krvinky). Na množství buněk lze usuzovat také dle intenzity metabolické činnosti buněk (např. u mikrobiálních kultur), nebo podle množství některé složky buněk (např. množství hemoglobinu v červených krvinkách). Někdy se podobným způsobem naměřené hodnoty přepočítávají podle kalibrační křivky na počet buněk (např. při nefelometrickém stanovení), jindy se naměřené hodnoty nepřepočítávají (např. hematokrit, který se udává jako poměrové číslo). V mikrobiologii je běžnou metodou zjištění počtu buněk ve vzorku též metoda kultivační. Ta spočívá ve vhodném naředění analyzovaného vzorku, následné kultivaci suspenze na vhodné půdě a spočítání množství narostlých kolonií.

Přímo lze buňky počítat v různě upravených preparátech pod mikroskopem, nebo pomocí automatických přístrojů. Pod mikroskopem lze použít počítací *komůrky* a suspenzi buněk umístit do ní, nebo *trvalý preparát* (např. hematologický, histologický). Trvalý preparát pro počítání buněk lze zhotovit ze známého objemu suspenze, který rozetřeme na definovanou plochu a po vysušení, fixaci a barvení buňky spočítáme. Automatické přístroje se dnes používají v klinických laboratořích pro počítání krevních buněk. Tyto přístroje registrují počet elektrických pulsů, které vznikají při průchodu krvinek malým otvorem opatřených po stranách platinovými elektrodami, na které je přiváděn elektrický proud. Vzhledem k relativně malé vodivosti krvinek klesne každým průchodem krvinky vodivost mezi elektrodami a tento pokles je jako puls automaticky zaznamenán. Pro přímé počítání v komůrce se nejčastěji používá Bürkerova komůrka - 0,5 cm silné zabroušené sklo, délky 7 cm a šířky 3 cm. Horní plocha je rozdělena dvěma silnými příčnými rýhami a jednou podélnou. Střední část je snížena o 0,1 mm proti okolí. Přikrytím střední části vzniká komůrka výšky 0,1 mm, spodní plocha je rozdělena jemnými vrypy na síť známých rozměrů. V Bürkerově komůrce lze kromě červených a bílých krvinek počítat i různé jednobuněčné organismy, např. řasy, kvasinky, prvoky, spory hub, do komůrky stačí kápnout vodnou suspenzi a počítat tyto organismy i neobarvené.

Mřížka Bürkerovy komůrky:



Obr.1

a) celkový pohled na mřížku

b) detail části mřížky

1. Počítání erytrocytů

Stanovení počtu erytrocytů patří mezi základní hematologická vyšetření. Fyziologický počet erytrocytů se pohybuje v rozmezí $4,3 - 5,3 \times 10^{12}$ v 1l krve u mužů a $3,8 - 4,7 \times 10^{12}$ v 1l krve u ženy. Při některých patologických stavech dochází ke zvýšení počtu erytrocytů (polycytémie), nebo naopak k jejich snížení (anémie). Na počtu erytrocytů a tím i obsahu hemoglobinu závisí schopnost krve přenášet kyslík.

Vzhledem k vysokému počtu erytrocytů, není možno počítání provádět v nativní krvi, ale v krvi přiměřeně zředěné. Ředění provádíme Hayemovým (čti ejemovým) roztokem, ve kterém se erytrocyty zvýrazní a ostatní elementy rozruší, takže neztěžují počítání. **Hayemův roztok** obsahuje prudký jed chlorid rtuťnatý, takže je nutné s ním pracovat opatrně.

Pomůcky:

Bürkerova komůrka, krev, Hayemův roztok (0,25 g HgCl₂, 0,5 g NaCl, 2,5 g Na₂SO₄, destilovaná voda do 100 ml), skleněné pipety, pipetovací nástavce, mikropipety, špičky, zkumavky, mikroskop.

Postup:

Do zkumavky napipetujeme 4 ml ředícího roztoku, k němu přidáme 20 μl krve (tj. ředění 200x). Špička s krví se musí nejdříve otřít a poté několikrát propláchnout v roztoku, aby se všechna krev dostala do zkumavky. Zkumavku se zředěnou krví zavřeme gumovou zátkou a důkladně promícháme, aby z erytrocytů vznikla rovnoměrná suspenze. Tu pak nabere Pasteurovou pipetou a naplníme počítací komůrku, tak aby bylo rovnoměrně přikryto celé počítací pole. Tekutina nesmí přetéct na horní plochu sklíčka ani do dělicí rýhy mezi poli s mřížkami.

Po naplnění počítacího prostoru přeneseme komůrku na stolek mikroskopu a vyčkáme několik minut, aby došlo k sedimentaci erytrocytů do jedné optické roviny. Erytrocyty počítáme pod objektivem zvětšujícím 20x, nebo 40x. Erytrocyty spočítáme ve dvaceti obdélnících ($0,01 = 1/100 \text{ mm}^2$) napříč komůrkou, tak abychom některá pole nepočítali opakovaně. V každém obdélníčku počítáme všechny krvinky ležící uvnitř a ty, které se dotýkají vně i zevnitř dvou stran. Zvolíme buď horní a pravou, nebo dolní a levou. U zbylých dvou stran nepočítáme ani krvinky, které se jich dotýkají zevnitř. Napočítané erytrocyty zaznamenáváme do tabulky.

Tab.1.

obdélník	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
počet																				

Výpočet:

Celkový počet erytrocytů ve 20 obdélníčcích vydělíme 20 a tak dostaneme průměrný počet v objemu $1/1000 \text{ mm}^3$ (plocha obdélníčku $1/100 \text{ mm}^2$, výška komůrky $1/10 \text{ mm}$). Výsledek násobíme 1000 a tím dostaneme množství krvinek v 1 mm^3 zředěné krve. Při 200 násobném ředění, násobíme ještě 200 a tak získáme skutečný počet erytrocytů v 1 mm^3 krve:

$$x = \frac{\text{součet}}{20} * 1000 * 200$$

Při počítání lze ve vzorci krátit a součet erytrocytů ve 20 obdélníčcích násobit 10 000. Výsledné číslo vyjádříme v počtu erytrocytů na 1l krve.

(Vzhledem k ředění a objemu komůrky ve 20 obdélníčcích, lze získat konečný výsledek i tak, že součet erytrocytů z těchto 20 obdélníčků vydělíme 100, čímž vyjde hodnota v $10^{12}/l$)

Výsledek:

Závěr:



2. Počítání leukocytů

Množství bílých krvinek je důležitým ukazatelem obranyschopnosti organismu a jeho imunobiologického stavu. Počet leukocytů kolísá v závislosti na řadě vlivů podstatně více než počet erytrocytů. Fyziologické hodnoty jsou v rozmezí $4 - 9 \times 10^9$ v 1l krve. Hodnoty vyšší nazýváme leukocytóza, nižší leukopenie.

Leukocyty se mohou počítat podobně jako erytrocyty, při počítání v B. komůrce se jako ředící roztok používá **Türkův roztok** (1 ml kyseliny octové, 1 ml 1% roztoku gentiánové violeti, do 100 ml destilovaná voda). Ledová kyselina octová rozruší erytrocyty a trombocyty, neporuší však leukocyty. Gentiánová violet obarví jádra leukocytů, které jsou pak výrazné a dají se snadno spočítat.

Pomůcky:

Bürkerova komůrka, krev, Türkův roztok, zkumavky, mikropipety, špičky, mikroskop

Postup:

Do zkumavky napipetujeme 380 μ l Türkova roztoku a přidáme 20 μ l krve (tj. ředění 20x). Špičku od krve několikrát propláchneme ředícím roztokem. Zkumavku uzavřeme gumovou zátkou a dokonale promícháme, aby vznikla rovnoměrná suspenze leukocytů. Preparát připravíme obdobným způsobem jako u erytrocytů. Počítáme pod objektivem zvětšující 20x, nebo 40x v 50 velkých ($0,04 = 1/25 \text{ mm}^2$) čtvercích počítací mřížky při zachování stejných zásad, při kterých jsme počítali erytrocyty.

Tab.2.

čtverec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
počet																				
čtverec	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
počet																				
čtverec	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50										
počet																				

Výpočet:

Celkový počet leukocytů v 50 čtvercích dělíme 50 a tak získáme průměrný počet leukocytů v objemu $1/250 \text{ mm}^3$ (plocha obdélníčku $1/25 \text{ mm}^2$, výška komůrky $1/10 \text{ mm}$). Převedeme objem na 1 mm^3 a vynásobíme ředěním.

$$x = \frac{\text{součet}}{50} * 250 * 20$$

Při počítání v 50 čtvercích a ředění 20x můžeme ve výpočtu krátit, pak stačí součet v 50 čtvercích násobit 100. Získanou hodnotu převedeme na 1l krve.

(Vzhledem k ředění a objemu komůrky v 50 čtvercích, lze získat konečný výsledek i tak, že součet leukocytů z těchto 50 čtverců vydělíme 10, čímž vyjde hodnota v $10^9/l$)

Výsledek:

Závěr:

