

Úloha č.4b: Ultrazvuková hemolýza

1 Cíl úlohy

Ověřit účinek ultrazvuku na erythrocyty z hlediska délky jeho působení

2 Důležité pojmy

3 Pomůcky

Ultrazvukový generátor BTL-07, mikroskop s připojením k počítači, Bürkerova komůrka, stojánek se zkumavkami, pipety, zkumavka s plochým dnem na ozvučení, suspenze erythrocytů, fyziologický roztok, buničitá vata, kontaktní medium (parafinový olej).

4 Pracovní postup

1. V kádince je připravena suspenze erythrocytů (ředěná zvířecí krev) .
2. Tuto suspenzi po dostatečném promíchání přelijte do skleněné zkumavky s plochým dnem, stačí cca 3 ml, což je asi polovina zkumavky. Dále pracujte jen s touto suspenzí.
3. Nejprve si spočítejte počet krvinek v této ještě neozvučené (kontrolní) suspenzi. Suspenzi je třeba naředit 10×, t.j. 0,1 ml suspenze a 0,9 ml fyziologického roztoku. Před jakoukoli manipulací je třeba suspenzi promíchat!
4. Naplňte Bürkerovu komůrku a spočítejte krvinky minimálně ve 20 malých čtvercích. Spočítejte množství neozvučených krvinek v 1 ml suspenze.
5. Zapněte ultrazvukový generátor. Hlavici upevněnou ve stojanu potřete parafinovým olejem, abyste docílili dobrého kontaktu hlavice se zkumavkou.
6. Před vlastním provedením hemolýzy nastavte čas – stačí 30 sekund. Sepněte **START** a postupně zvyšujte intenzitu ultrazvuku. Na hlavici v parafinovém oleji můžete sledovat kavitační bubliny. Časový spínač se automaticky vypne.
7. Nyní zkumavku s plochým dnem položte na hlavici. Nastavte intenzitu 0,1 W/cm² a dobu ozvučení 30 s. Sepněte **START** a po dané době ozvučení přístroj automaticky vypne. Z ozvučené suspenze po promíchání odeberte 0,1 ml naředte přidáním 0,9 ml fyziologického roztoku a spočítejte erythrocyty.

8. Suspenzi v kádince s plochým dnem znovu ozvučte opět po dobu 30 s. Po ozvučení dále postupujte dle bodu č.7. V případě, že průměrný počet krvinek v jedné komůrce klesne pod 5 neřeďte již suspenzi a Bürkerovu komůrku plňte neředěnou suspenzí!
9. Celkem provedete 6 ozvučování, pouze pokud by k plné hemolýze došlo dříve (například po čtvrtém třicetisekundovém ozvučování) pokus ukončíte.
10. Do tabulky zanešte počet krvinek přepočítaný na 1 ml plné krve a stupeň hemolýzy v závislosti na době ozvučení, do grafu vynesete závislost stupně hemolýzy n a době ozvučení.

Graf můžete dělat na milimetrový papír nebo pomocí programu SciDAVis. V případě, že se rozhodnete pro elektronický graf, bude vhodnou křivkou pro proložení naměřených hodnot exponenciála. Nezapomeňte, že máte vynášet stupeň hemolýzy, tedy že po dostatečně dlouhé době by byl stupeň hemolýzy 100%. Uvědomte si, že stupeň hemolýzy nemůže být nikdy vyšší ani že křivka závislosti stupně hemolýzy na čase nemůže být klesající – tyto dvě chyby jsou poměrně časté, vznikají při chybném zpracování dat na počítači (MS Excel nebo jiný nevhodný program) a svědčí pouze o tom, že dotyčný student nad výsledky nepřemýšlí.