

**Υπολογισμός αριθμού και βιωσιμότητας  
κυτταρικού πληθυσμού**



## ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

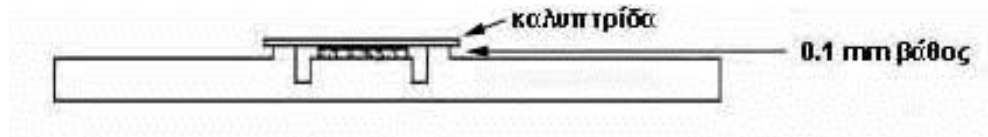
**Σκοπός της άσκησης :** η χρήση του αιμοκυτταρομέτρου για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης κυττάρων και τη μελέτη της βιωσιμότητάς τους.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέτρηση του **αριθμού** των κυττάρων ενός πληθυσμού, καθώς και ο έλεγχος της **βιωσιμότητάς** τους, χρησιμοποιείται ευρύτατα, σε ποικίλα πεδία επιστημονικά πεδία, όπως στην ανάπτυξη και διατήρηση κυτταροκαλλιιεργιών, σε αναλύσεις αίματος, σε μετρήσεις για προσδιορισμό κυτταρικής αύξησης, στην επίδραση διαφόρων φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων στις κυτταρικές λειτουργίες. Όπως είναι ευνόητο η μέτρηση όλων των κυττάρων ενός πληθυσμού είναι μία εξοντωτική εργασία. Μπορεί όμως να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων σε ένα μικρό δείγμα γνωστού όγκου και στη συνέχεια να υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων που εμπεριέχεται στο αρχικό εναιώρημα από το οποίο προέρχεται το δείγμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες, τα **αιμοκυτταρόμετρα** (haemocytometers), στις οποίες είναι δυνατή η μέτρηση κυττάρων όπως αιμοσφαιρίων, ζύμης και άλλων που βρίσκονται σε εναιώρημα.

### Μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο

Το αιμοκυτταρόμετρο (εικόνα 1) περιέχει ένα ή δύο πλέγματα μέτρησης κυττάρων. Κάθε πλέγμα υποδιαιρείται σε 9 μεγάλα τετράγωνα με πλευρά μήκους 1 mm (εικόνα 2). Τα μεγάλα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα των οποίων η κάθε πλευρά έχει μήκος 0,25 mm. Το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο υποδιαιρείται σε 25 μικρά τετράγωνα καθένα από τα οποία έχει μήκος 0,20 mm. Κάθε ένα από τα 25 μικρότερα τετράγωνα υποδιαιρείται σε 16 ακόμα μικρότερα τετράγωνα (εικόνα 2). Το κεντρικό δηλαδή τετράγωνο αποτελείται από  $16 \times 25 = 400$  πολύ μικρά τετράγωνα κάθε ένα από τα οποία έχει πλευρά μήκους 0,05 mm.

**A****B**

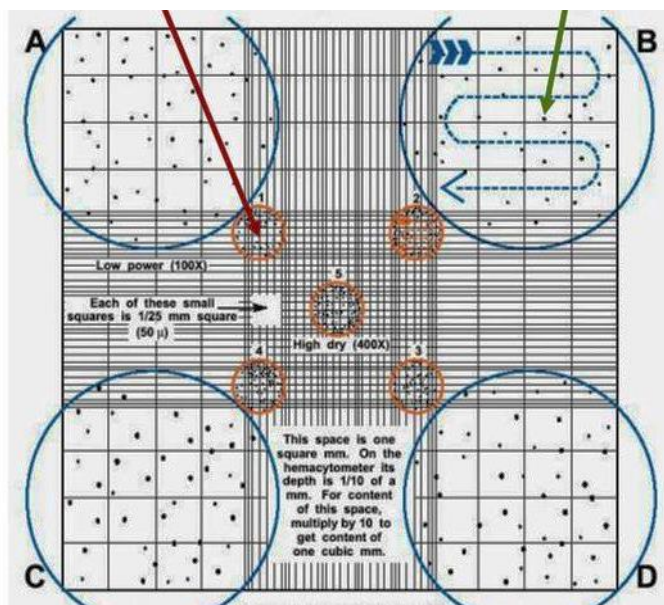
**Εικόνα 1.** Α. Αιμοκυτταρόμετρο, που φέρει δύο πλέγματα μέτρησης. Β. Πλάγια όψη υπικού αιμοκυτταρόμετρου,

Το επίπεδο κάθε πλέγματος είναι 0,1 mm χαμηλότερα απ' ότι το επίπεδο στήριξης της καλυπτρίδας (εικόνα 1Α). Επομένως μεταξύ πλέγματος και καλυπτρίδας δημιουργείται ένας χώρος, ύψους 0,1 mm, στον οποίο εισέρχεται το εναιώρημα των κυττάρων. Στα 5 μικρά τετράγωνα του κεντρικού τετραγώνου (εικόνα 2, πορτοκαλί μικρά τετράγωνα) γίνεται η μέτρηση πολυάριθμων μικρών κυττάρων (ερυθρά αιμοσφαίρια, ζυμοκύτταρα), ενώ στα 4 μεγάλα ακραία τετράγωνα τετραγώνου (εικόνα 2, μπλε τετράγωνα) γίνεται η μέτρηση των λευκών αιμοσφαιρίων. Ο όγκος των τεσσάρων γωνιακών 16αδων είναι:

$$0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ cm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$$

Επομένως αν είναι N ο μέσος αριθμός κυττάρων που υπάρχουν σε κάθε μια από τις γωνιακές 16αδες αυτές τότε η συγκέντρωση των κυττάρων είναι:

$$M \text{ κύτταρα} / 10^{-4} \text{ ml} = M \times 10^4 \text{ κύτταρα} / \text{ml}$$



**Εικόνα 2.** Μεγεθυμμένη άποψη του πλέγματος μέτρησης. A, B, C, D με όγκο  $10^{-4}$  ml (μπλε κύκλοι στις γωνίες). 1, 2, 3, 4, 5 με όγκο  $4 \times 10^{-6}$  ml (πορτοκαλί κύκλοι στο κέντρο). Από τα κύτταρα που εφάπτονται στη περίμετρο, μετρούμε μόνον εκείνα που υπάρχουν στην επάνω και στην αριστερή πλευρά του κάθε τετραγώνου.

Αν το δείγμα μας είναι πολύ πυκνό και χρειαστεί να γίνει αραιώση, τότε η αρχική συγκέντρωση τους είναι:

$$M \times \Sigma \times 10^4 \text{ κύτταρα /ml}$$

Όπου  $\Sigma$  είναι ο συντελεστής αραιώσης και ισούται με  $V_{\text{τελικός}} / V_{\text{αρχικός}}$

Για παράδειγμα αν ο μέσος αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν σε κάθε μεγάλο γωνιακό τετράγωνο είναι 25 και ο συντελεστής αραιώσης 1:100, τότε η συγκέντρωσή τους στο αρχικό δείγμα είναι:

$$25 \times 100 \times 10^4 = 2,5 \times 10^7 \text{ κύτταρα /ml}$$

Όταν το δείγμα μας περιέχει πάρα πολλά κύτταρα (ερυθρά αιμοσφαίρια) ή βακτήρια που έχουν πολύ μικρό μέγεθος τότε μετράμε τα κύτταρα που υπάρχουν στις 4 γωνίες και στο κέντρο του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου (εικόνα 2, πορτοκαλί

τετράγωνα). Ο όγκος του καθενός από αυτά είναι το 1/25 του κάθε μεγάλου γωνιακού τετραγώνου (16αδα), άρα  $10^{-4}/25 \text{ ml} = 4 \times 10^{-6} \text{ ml}$ . Η συγκέντρωση των κυττάρων υπολογίζεται όπως και προηγουμένως

### **Έλεγχος βιωσιμότητας με trypan blue**

Συχνά είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζει κανείς το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων πριν αρχίσει το πείραμα ή κατά την διάρκειά του για να προχωρήσει στο επόμενο στάδιο. Επίσης η γνώση της βιωσιμότητας των κυττάρων είναι απαραίτητη στον έλεγχο της πορείας των διαφόρων κυτταροκαλλιιεργειών. Μια γενική στρατηγική που ακολουθείται είναι η χρήση χρωστικών που βάφουν είτε μόνο τα νεκρά είτε μόνο τα ζωντανά κύτταρα. Η χρωστική trypan blue είναι μια χρωστική που βάφει μόνο τα νεκρά κύτταρα και αυτό γιατί δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων. Η βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού του δείγματος υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Βιωσιμότητα \%} = \frac{\text{αριθμός αχρωμάτιστων κυττάρων}}{\text{ολικός αριθμός κυττάρων}} \times 100$$

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΥΛΙΚΑ

Αιμοκυτταρόμετρα  
Σιφώνια Pasteur  
Πιπέτες 10 μl και 100 μl  
Σωληνάκια Eppendorf  
Φωτονικό μικροσκόπιο

### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Εναιώρημα κυττάρων  
Χρωστική trypan blue 0,4%

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

#### Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Εξοικειωθείτε πρώτα με την εικόνα του πλέγματος κάτω από το μικροσκόπιο στις στους αντικειμενικούς φακούς 10x και 40x ως εξής:

1. Τοποθετείστε το αιμοκυτταρόμετρο στο μικροσκόπιο.
2. Εντοπίστε με το μικρότερο αντικειμενικό φακό (4x) το πλέγμα.
3. Με τον αντικειμενικό 10x βρείτε το κεντρικό μεγάλο τετράγωνο και εντοπίστε τα 4 γωνιακά τετράγωνα (εικόνα 2, μπλε).
4. Με προσοχή, λόγω του πάχους του αιμοκυτταρόμετρου, φέρτε στην θέση παρατήρησης τον αντικειμενικό 40x.
5. Απομακρύνετε το αιμοκυτταρόμετρο από το μικροσκόπιο και μεταφέρετε σε αυτό το εναιώρημα των κυττάρων ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα.
6. Τοποθετήστε την καλυπτρίδα με τρόπο που να καλύπτει και τα δύο πλέγματα του αιμοκυτταρόμετρου (εικόνα 1).
7. Μεταφέρατε με πιπέτα 10 μl εναιωρήματος κυττάρων ζύμης στην περιοχή του ενός πλέγματος ακουμπώντας προσεκτικά το ρύγχος της πιπέτας στην άκρη της

καλυπτρίδας. Αδειάστε ώστε να καλυφθεί με το εναιώρημα το πλέγμα με τη δράση του τριχοειδούς φαινομένου.

8. Μετρείστε στη μεγέθυνση 40x τα κύτταρα που υπάρχουν στα 5 μικρά τετράγωνα του κεντρικού τετραγώνου, αφού τα αφήσετε 5 min να καθίσουν στο πλέγμα, ως εξής: σε κάθε τετράγωνο μετρείστε τα κύτταρα που εμπεριέχονται σ' αυτό. Από τα κύτταρα που βρίσκονται στις 4 πλευρές του τετραγώνου να συμπεριλάβετε στην μέτρηση όσα εφάπτονται στην μεσαία γραμμή, η οποία αποτελεί και τα όρια κάθε τετραγώνου, και μάλιστα μόνον εκείνα που βρίσκονται στην πάνω και στην αριστερή πλευρά και όχι αυτά που βρίσκονται στην κάτω και δεξιά πλευρά.
9. Επαναλάβετε τα βήματα 5-8 και για το δεύτερο πλέγμα.

**Προσοχή:** Αν πάνω από το 10% των κυττάρων έχουν συσσωματωθεί, επαναλάβετε όλη τη διαδικασία αφού προηγουμένως κάνετε αρκετές αναρροφήσεις του εναιωρήματος με το σιφώνιο ώστε να μην σχηματιστούν συσσωματώματα. Αν επίσης παρατηρήσετε περισσότερα από 30 κύτταρα/τετράγωνο και στα 5 τετράγωνα που μετράτε επαναλάβετε την διαδικασία αραιώνοντας κατάλληλα για να αποφευχθούν λάθη μέτρησης.

Οι βασικές αρχές που ισχύουν για την αραιώση των χημικών διαλυμάτων ισχύουν και για την αραιώση των κυτταρικών εναιωρημάτων:

α) Όλες οι αραιώσεις καθορίζονται αναφορικά με ένα αρχικό πυκνό εναιώρημα (στοκ εναιώρημα).

β) Αραίωση είναι ο αριθμός των μερών του αρχικού διαλύματος που έχει διαλυθεί σε ένα συνολικό όγκο. Π.χ. αραιώση 1:10 (ή 1/10) σημαίνει ότι προσθέτουμε 1 μέρος αρχικού διαλύματος σε 9 μέρη διαλύτη ώστε να έχουμε συνολικό όγκο 10 μέρη (δεν προσθέτουμε 1 μέρος σε 10 μέρη).

γ) Όταν το εναιώρημα είναι πολύ πυκνό να κάνετε διαδοχικές αραιώσεις.

**Προσοχή:** Το διάλυμα στο οποίο θα εναιωρηθούν οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι θα πρέπει να είναι ισότονο προς αυτούς (π.χ. τα αιμοσφαίρια σε φυσιολογικό ορό). Τα κύτταρα της ζύμης όμως λόγω του κυτταρικού τους τοιχώματος είναι ωσμωτικά σταθερά και στο νερό.



### **Μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής trypan blue και υπολογισμός βιωσιμότητας.**

- Μεταφέρετε 50 μl από το διάλυμα χρωστικής trypan blue σε ένα σωληνάκι Eppendorf. Προσθέστε 50 μl εναιώρημα κυττάρων ζύμης από το αρχικό διάλυμα. Αφήστε τα για 5-10 min.
- Μεταφέρετε όπως προηγουμένως το εναιώρημα σε κάθε πλέγμα του αιμοκυτταρόμετρου και μετρήστε βαμμένα και άβαφα κύτταρα.

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Υπολογισμός συγκέντρωσης και εύρεση ποσοστού βιωσιμότητας στο δείγμα κυτταρικού πληθυσμού.