



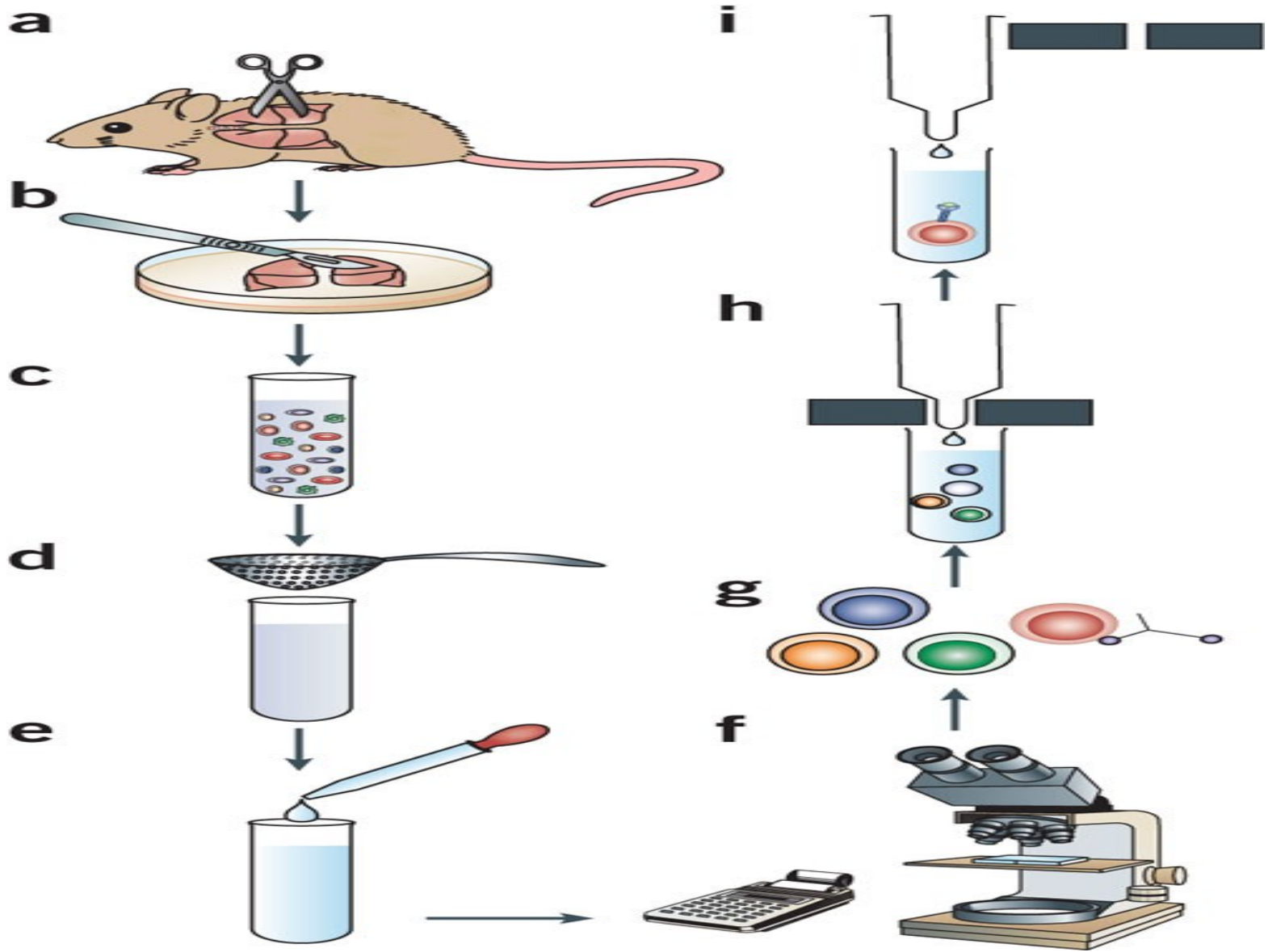
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Ειδικές μέθοδοι ανάλυσης κυτταρικών διεργασιών

Απομόνωση λεμφοκυττάρων από τη σπλήνα
ποντικού

Έλενα Κουιμτζόγλου

Τμήμα Βιολογίας



Γιατί χρησιμοποιούμε το ποντίκι;

- Είναι μικρό
- Είναι οικονομικό
- Αναπαράγεται κάθε 20 μέρες
- Παρουσιάζει 95% ομολογία στοιχείων με τον άνθρωπο
- Δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα
- Χρησιμοποιείται σε in vivo πειράματα



<https://www.pinterest.com/pin/90423904995027390>

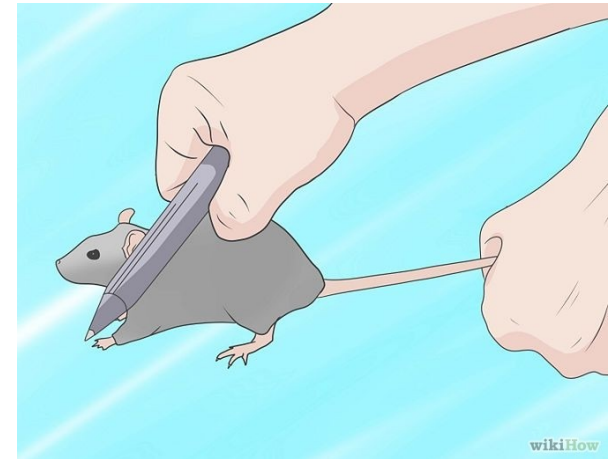
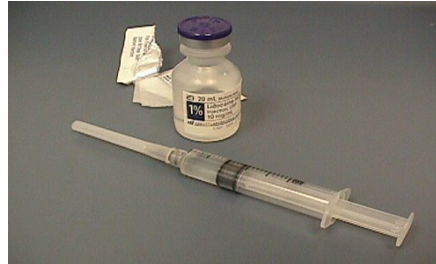
Γιατί προτιμάμε τον σπλήνα;



- Είναι σχετικά μεγάλο όργανο
- Έχει όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς

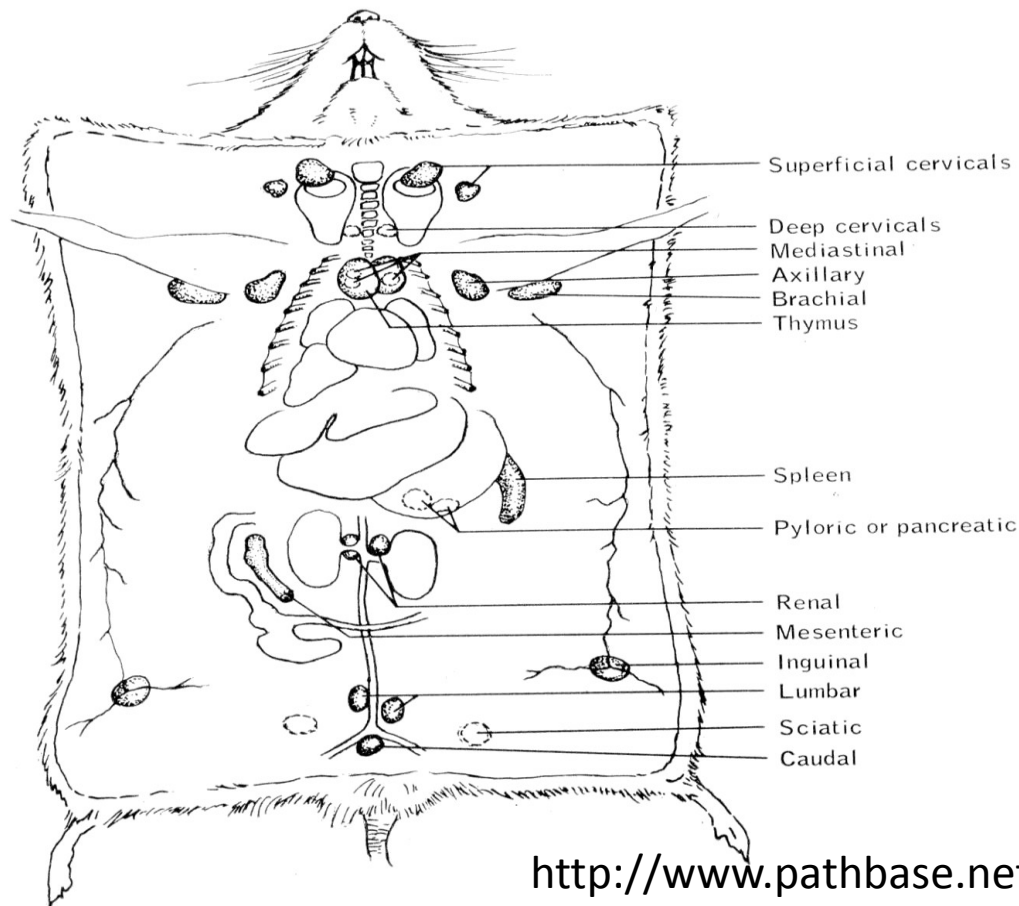
Πώς γίνεται η θανάτωση του ζώου;

- Με αναισθησία
- Με ασφυξία
- Με λαιμητόμο (αιμοβόρική μέθοδος)
- Με πίεση στο σβέρκο
→ παράλυση ΚΝΣ



<http://www.google.gr/imgres?imgurl>
<https://www.quora.com/>

! Ο σπλήνας βρίσκεται στην αριστερή πλευρά του ζώου, κάτω από τα πλευρά



Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο



Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται σε ένα από τα τετράγωνα 1, 2, 3, 4

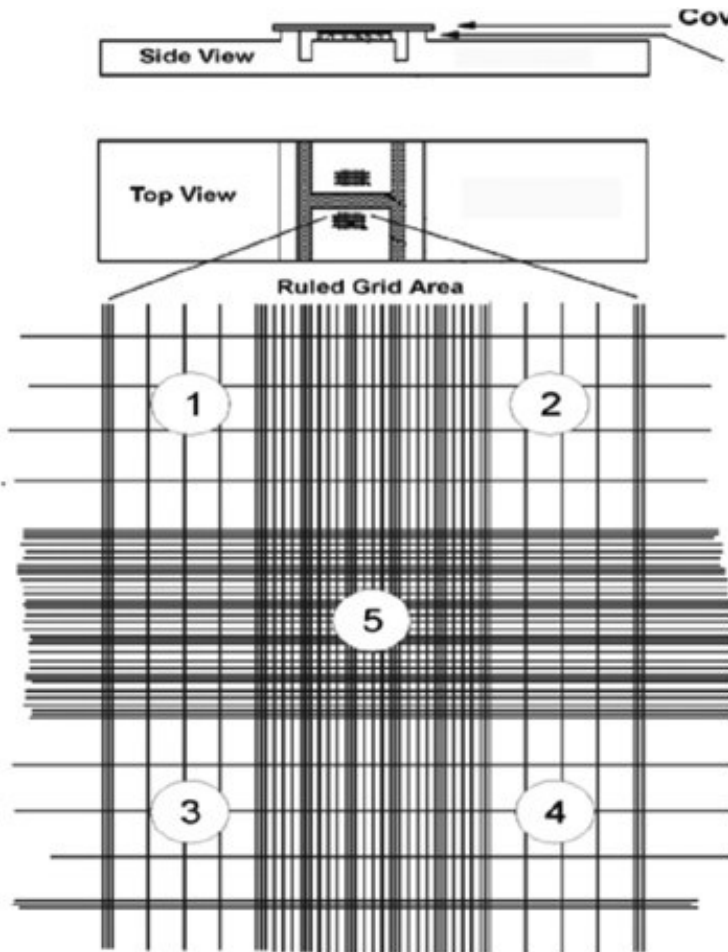
Η επιφάνεια καθενός από αυτά τα τετράγωνα είναι :

$$E = 1\text{mm} \times 1\text{mm} = 1\text{mm}^2$$

Το ύψος ανάμεσα στο αιμοκυτταρόμετρο και την καλυπτρίδα είναι 0,1mm

Ο όγκος της περιοχής μέτρησης (16 τετραγ.) είναι:

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

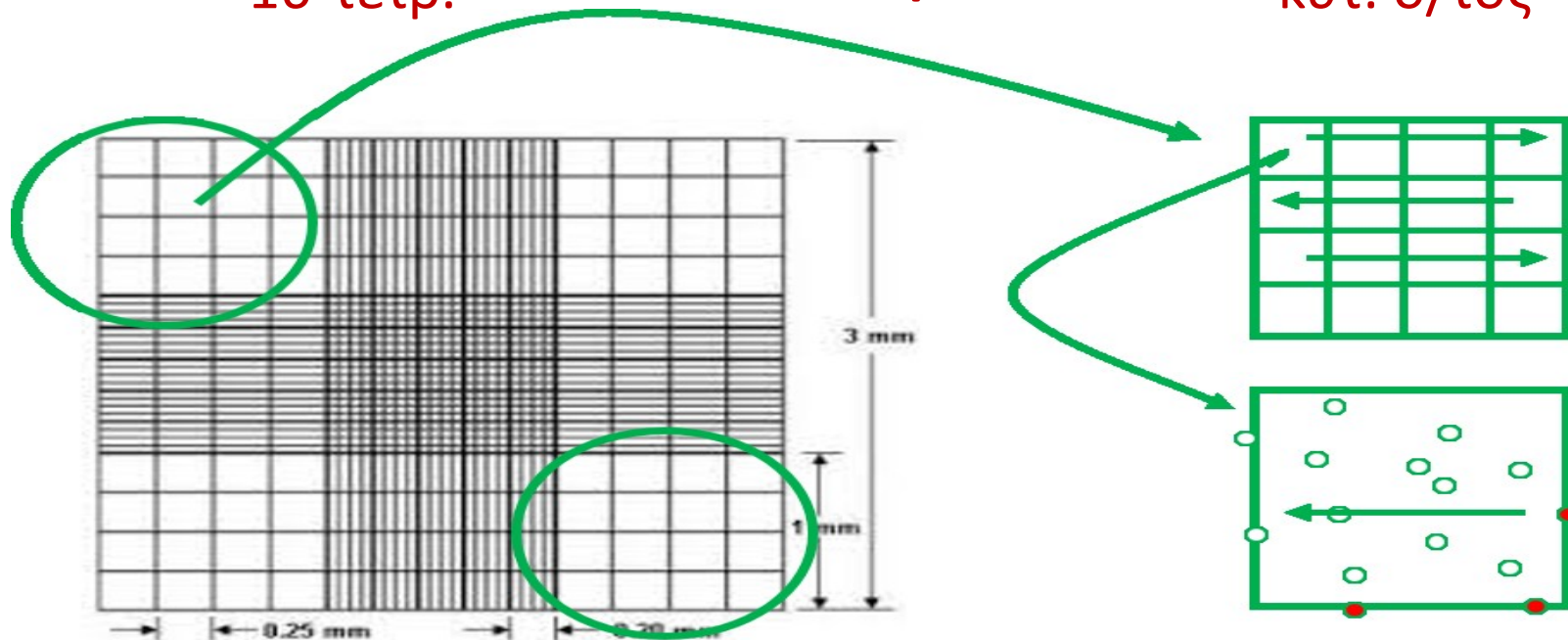


Ο αριθμός κυττάρων/ml είναι:

$$A_{16 \text{ τετρ.}} \times 10^4 \text{ κύτταρα/ml}$$

Ο αριθμός κυττάρων στο κυτταρικό διάλυμα
είναι:

$$A_{16 \text{ τετρ.}} \times 10^4 \text{ κύτταρα/ml} \times V_{\text{κυτ. δ/τος}}$$

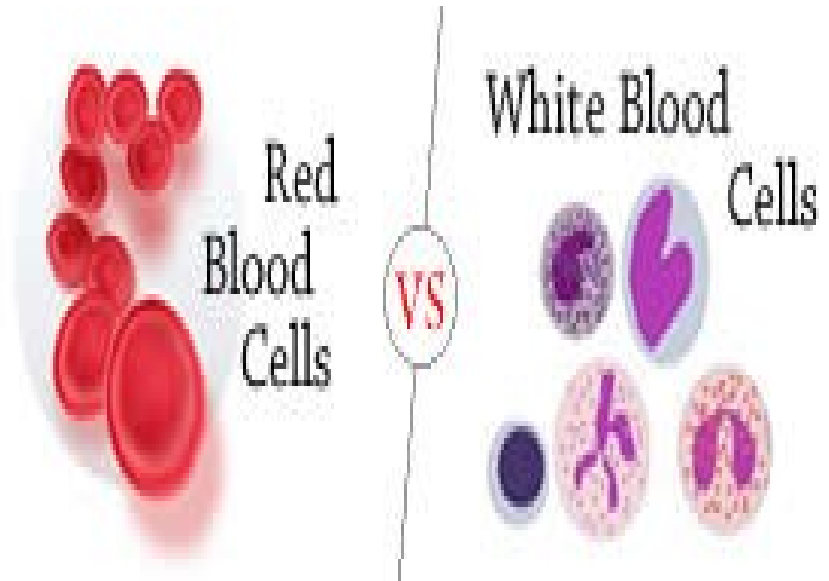
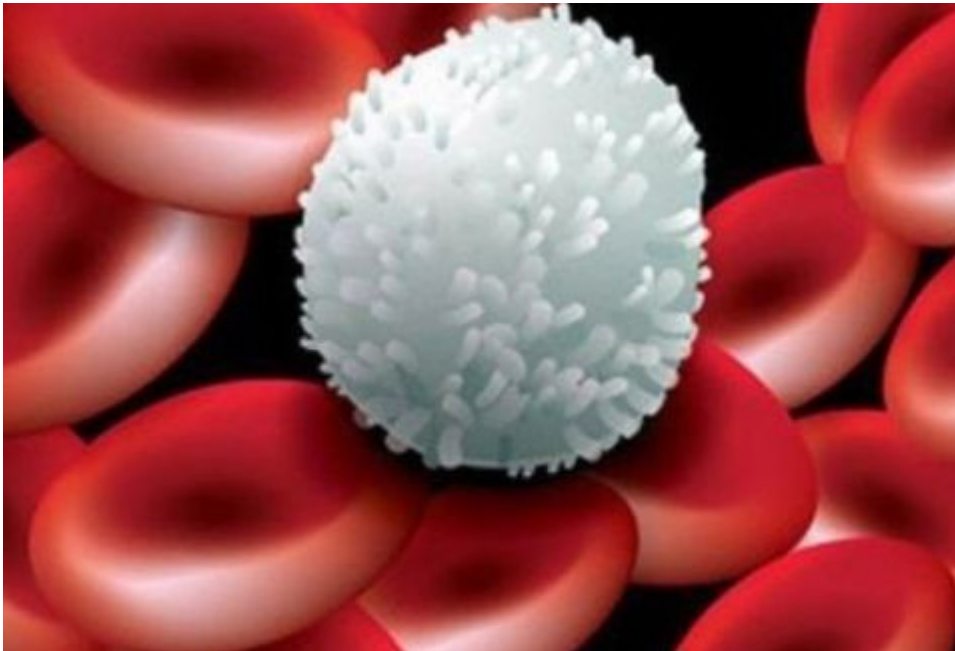


<https://www.google.gr/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRxqFQoTCPGr09->

<1rcgCFcLSGgodoz8Eag&url=http%3A%2F%2Fwww.gigayeast.com%2Fusing-a-hemocytometer>

Στο σπήνα διακρίνονται 2 βασικοί πληθυσμοί:

- Ερυθρά: μικρά, απύρρηνα και με λεία μεμβράνη
- Λευκά: μεγάλα, εμπύρρηνα και χωρίς λεία μεμβράνη



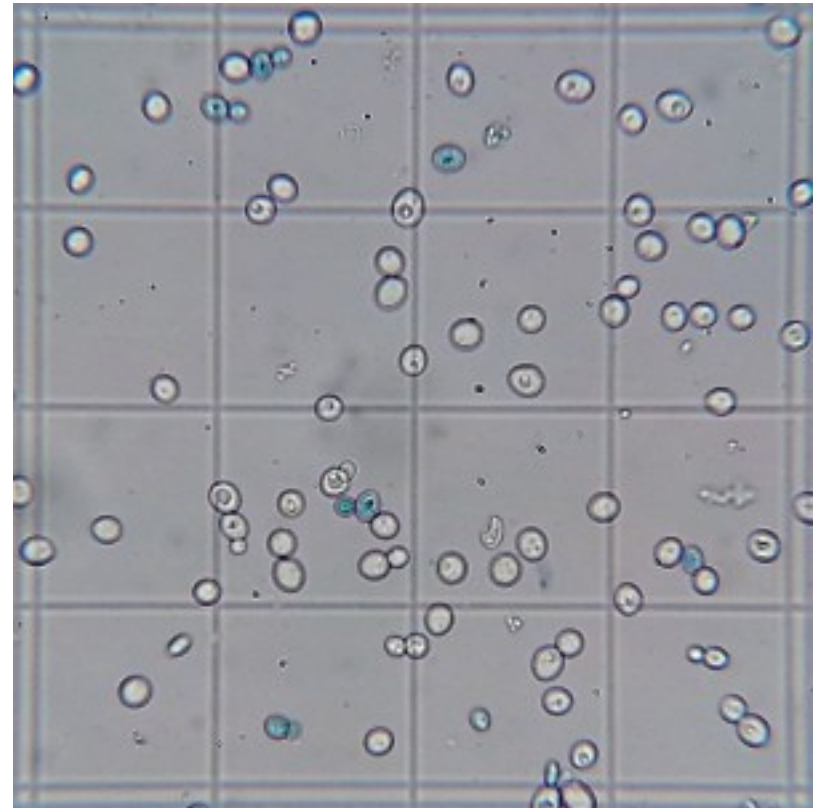
<http://nearpictures.com/pages/r/red-blood-cells-and-white-blood-cells-difference/>

<http://www.thepetsclinic.com/wp-content/uploads/2014/08/white-blood-cells-dogs.jpg>

Μέτρηση ζωντανών και νεκρών κυττάρων

- Η πλασματική μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων δεν επιτρέπει τη διέλευση μη-ηλεκτρολυτικών χρωστικών.
- Στα νεκρά κύτταρα δημιουργούνται οπές στην πλασματική μεμβράνη, από τις οποίες εισχωρεί η χρωστική **trypan blue** και τα βάφει **μπλε**.

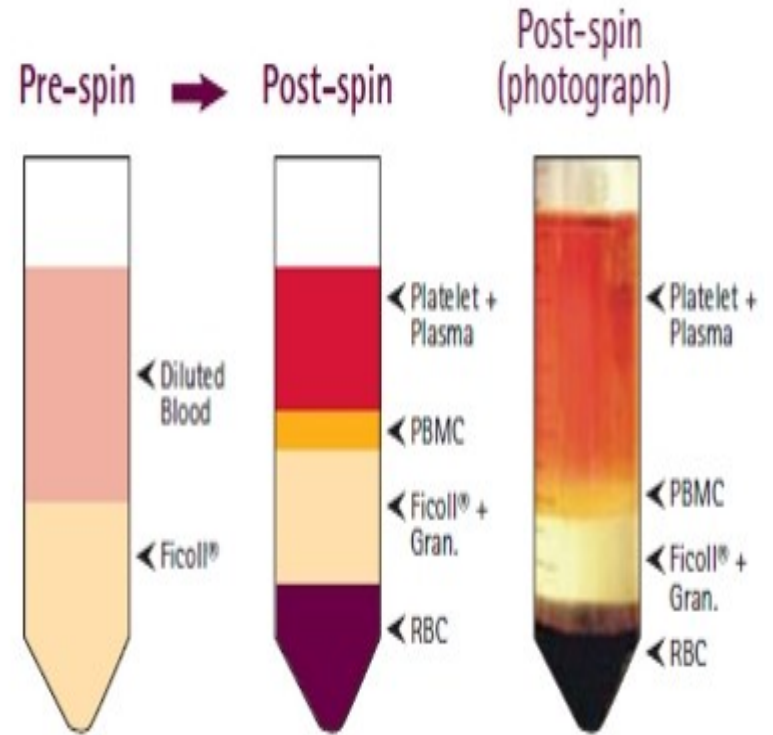
**! Τα νεκρά που βλέπουμε είναι λευκά.
Δε βλέπουμε ερυθρά νεκρά
γιατί τα ερυθρά λύονται.**



Διαχωρισμός λεμφοκυττάρων από ερυθροκύτταρα

Ο διαχωρισμός γίνεται με διαχωριστική φυγοκέντρηση με τη χρήση περκόλης (πολυμερές σουκρόζης και επιχλωριδίνης), λόγω μεγέθους

Από τους πόρους της περκόλης περνούν τα μικρότερα μόρια, ενώ τα μεγαλύτερα μένουν στην επιφάνειά της.



<http://nkcellspurification.blogspot.gr/2013/02/purifying-nk-cells-monocytes.htm>

Σκοπός του πειράματος:

- Απομόνωση κυττάρων από σπλήνα ποντικού
- Μέτρηση λευκών και ερυθρών
- Μέτρηση ζωντανών και νεκρών κυττάρων
- Διαχωρισμός λεμφοκυττάρων από ερυθροκύτταρα

Σας ευχαριστώ!



Τέλος Ενότητας



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Κρήτης**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Σημειώματα

Σημείωμα αδειοδότησης

- Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση, Όχι Παράγωγο Έργο 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

- Ως **Μη Εμπορική** ορίζεται η χρήση:
 - που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
 - που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
 - που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο
- Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Πανεπιστήμιο Κρήτης, Έλενα Κουιμτζόγλου 2015. «Ειδικές μέθοδοι ανάλυσης κυτταρικών διεργασιών. Απομόνωση λεμφοκυττάρων από τη σπλήνα ποντικού». Έκδοση: 1.0. Ηράκλειο 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://opencourses.uoc.gr/courses/course/view.php?id=366>

Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.