

ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η ικανότητα άμεσης μέτρησης του αριθμού κυττάρων είναι εξαιρετικά χρήσιμη σε ποικίλες επιστήμες, όπως βιολογία, μικροβιολογία, ιατρική, βιοτεχνολογία'. Εφαρμόζεται σε περιπτώσεις στις οποίες απαιτείται άμεσο αποτέλεσμα, τα κύτταρα δεν έχουν την ικανότητα αναδιπλασιασμού ή έχουν πολύ αργούς ρυθμούς διπλασιασμού, απαιτείται η άμεση γνώση κυτταρικού φορτίου για τον εμβολιασμό μιας νέας καλλιέργειας με συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων κλπ. Το όργανο που συμβάλλει στην άμεση μέτρηση του αριθμού κυττάρων είναι το αιμοκυτταρόμετρο **Neubauer**

1.1. Δομή και Λειτουργία του Αιμοκυτταρόμετρου Neubauer

Το αιμοκυτταρόμετρο αποτελείται από τα εξής κύρια μέρη:

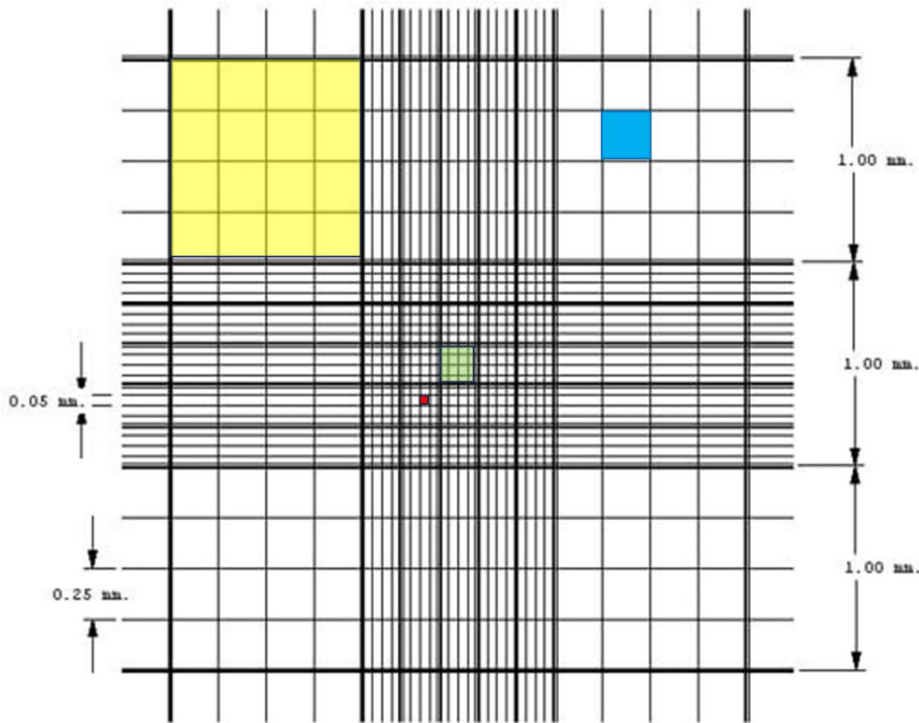
Γυάλινη πλάκα:

Η πλάκα διαθέτει ένα κεντρικό πλέγμα χαραγμένο με ακρίβεια, το οποίο διευκολύνει την οπτική καταμέτρηση των κυττάρων. Το πλέγμα περιβάλλεται από δύο αυλακώσεις, που δημιουργούν σταθερό χώρο για τη διασπορά του δείγματος.

1. **Καλυπτρίδα:** Ένα λεπτό κομμάτι γυαλιού τοποθετείται πάνω από την πλάκα για να περιορίσει τον όγκο του δείγματος σε σταθερό πάχος (συνήθως 0,1 mm).
2. **Χάραξη του πλέγματος:** Το πλέγμα περιλαμβάνει τετράγωνα συγκεκριμένων διαστάσεων. Συνήθως, το κεντρικό πλέγμα έχει συνολική επιφάνεια 1 mm² και χωρίζεται σε 9 κύρια τετράγωνα (διάστασης 1 mm x 1 mm).
 - **Κεντρικό τετράγωνο:** Περιέχει 25 δευτερεύοντα τετράγωνα, καθένα από τα οποία χωρίζεται σε 16 μικρότερα τετράγωνα. Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση μικρών κυττάρων, όπως βακτήρια ή ζυμομύκητες.
 - **Περιφερειακά τετράγωνα:** Συχνά χρησιμοποιούνται για μεγαλύτερα κύτταρα, όπως τα λευκοκύτταρα.

Στο σχ.1 φαίνεται το πλέγμα ενός αιμοκυτταρόμετρου

Το ύψος του δείγματος (πάχος στρώσης) είναι σταθερό και ίσο με 0,1 mm.



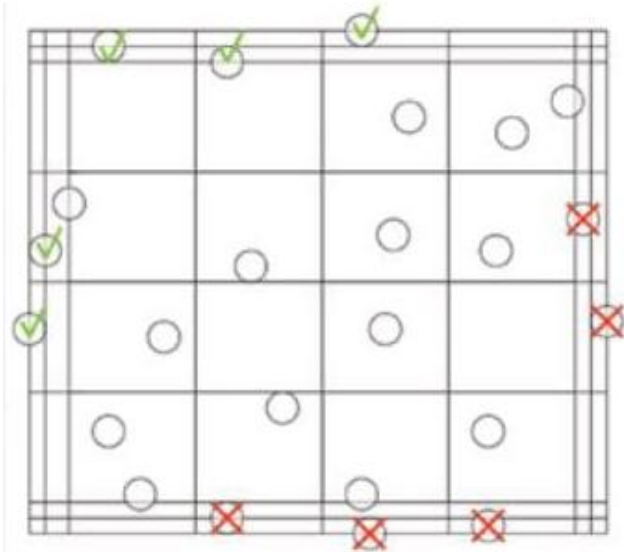
Σχήμα 1: Απεικόνιση του πλέγματος του αιμοκυτταρομέτρου Neubauer.

Βάσει των διαστάσεων με τις οποίες κατασκευάζεται το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer υπολογίζονται οι επιφάνειες και οι όγκοι των χώρων που φαίνονται στον Πιν.1

Πίνακας 1: Επιφάνεια και αντίστοιχοι όγκοι των χώρων πάνω από το πλέγμα

Area (mm ²)	Volume (mm ³ ή μl)
1 x 1 = 1	1 x 0.1 = 0.1
0.25 x 0.25 = 0.0625	0.0625 x 0.1 = 0.00625
0.20 x 0.20 = 0.04	0.04 x 0.1 = 0.004
0.05 x 0.05 = 0.0025	0.0025 x 0.1 = 0.00025

Σε κάθε τετράγωνο που χρησιμοποιείται για την μέτρηση του αριθμού κυττάρων, τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στις δεξιά ή επάνω γραμμές προσμετρώνται ενώ αυτά που βρίσκονται στις αριστερά και κάτω γραμμές δεν προσμετρώνται.



Σχήμα 2: Σημειώνονται οι περιμετρικές περιοχές των τετραγώνων που προσμετρώνται κατά τον προσδιορισμό του αριθμού κυττάρων

1.2. Αρχή Υπολογισμού Συγκέντρωσης Κυττάρων

Η συγκέντρωση κυττάρων υπολογίζεται από τον αριθμό των κυττάρων που παρατηρούνται στο πλέγμα, λαμβάνοντας υπόψη τον γνωστό όγκο του δείγματος πάνω από το πλέγμα.

Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης:

1. Μετράμε τον αριθμό κυττάρων (N) σε (k) τετράγωνα όγκου V το κάθε τετράγωνο.
2. Η συγκέντρωση κυττάρων ανά mm^3 (cells/mm^3) προκύπτει ως:

$$C = \frac{N}{k * V} \quad (1)$$

Επειδή συνήθως η συγκέντρωση των κυττάρων εκφράζεται ως cells/ml η σχέση (1) τροποποιείται ως:

$$C = 1000 * \frac{N}{k * V} \quad (2)$$

Διόρθωση για αραιώση:

Αν το δείγμα έχει αραιωθεί, ο τελικός υπολογισμός μέσω της σχέσης (2) γίνεται:

$$C_F = DF * C = 1000 \frac{N * DF}{k * V} \quad (3)$$

όπου DF : συντελεστής αραιώσης.

Παράδειγμα:

Εάν μετρηθούν 200 κύτταρα σε 5 μεγάλα τετράγωνα και το δείγμα έχει αραιωθεί 1:10, άρα ο συντελεστής αραιώσης $DF = 10$:

$$C = 1000 \frac{200 * 10}{5 * 0.1} = 4000000 = 4 * 10^6 \text{ cells/ml}$$

1.3. Πιθανά σφάλματα που επηρεάζουν την ακρίβεια της μέτρησης

1. Ανομοιόμορφη κατανομή κυττάρων: Προκύπτει από ανεπαρκή ανάδευση του δείγματος.
2. Υπερφόρτωση του πλέγματος: Δυσκολεύει τη διάκριση των κυττάρων.
3. Ανακρίβεια στη χάραξη του πλέγματος: Μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Προσδιορισμός συγκέντρωσης κυττάρων ζύμης σε καλλιέργεια

2.1. Υλικά:

- Αιμοκυτταρόμετρο.
- Μικροσκόπιο.
- Καλυπτρίδα.
- Διάλυμα κυττάρων ζύμης.
- Διάλυμα αραιώσης (π.χ. αποστειρωμένο νερό ή φυσιολογικός ορός).
- Πιπέτα.

2.2. Πειραματική Διαδικασία

1. Προετοιμασία δείγματος
 - Ανακατέψτε καλά το διάλυμα κυττάρων ζύμης για ομοιογένεια.
 - Εάν είναι απαραίτητο, αραιώστε το δείγμα (π.χ. 1:10).
2. Προετοιμασία αιμοκυτταρομέτρου
 - ✓ Καθαρίστε την πλάκα και την καλυπτρίδα με αιθανόλη.
 - ✓ Τοποθετήστε την καλυπτρίδα πάνω στην πλάκα.
3. Φόρτωση δείγματος
 - Με τη βοήθεια πιπέτας, φορτώστε μικρή ποσότητα από το δείγμα στην άκρη του αιμοκυτταρομέτρου.
 - Το υγρό θα διανεμηθεί ομοιόμορφα κάτω από την καλυπτρίδα λόγω τριχοειδούς δράσης.
4. Μικροσκοπική παρατήρηση

- ✦ Τοποθετήστε το αιμοκυτταρόμετρο κάτω από το μικροσκόπιο.
- ✦ Χρησιμοποιήστε χαμηλή μεγέθυνση για να εντοπίσετε το πλέγμα και αυξήστε για την καταμέτρηση.

5. Καταμέτρηση κυττάρων

- Μετρήστε τα κύτταρα σε 5 τετράγωνα.
- Καταγράψτε τον αριθμό κυττάρων ανά τετράγωνο.

6. Υπολογισμός συγκέντρωσης κυττάρων

Υπολογίστε τη συγκέντρωση των κυττάρων σύμφωνα με τον τύπο που δόθηκε στο θεωρητικό μέρος.

2.3. Σημειώσεις Ακρίβειας:

- ✓ Αποφύγετε την υπερφόρτωση ή την υποφόρτωση του δείγματος.
- ✓ Εξασφαλίστε ότι τα κύτταρα δεν επικαλύπτονται ή δεν σχηματίζουν συσσωματώματα.