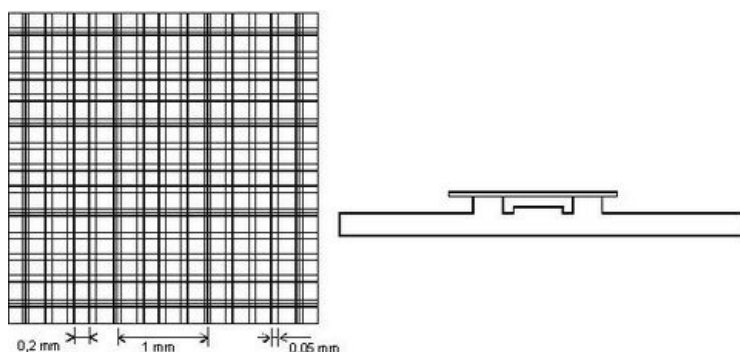


Stanovení počtu buněk, jejich viability a metabolické aktivity

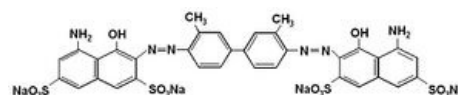
Řada postupů při práci s tkáňovými kulturami vyžaduje přesné stanovení počtu buněk ve vzorku. V praxi se běžně používají **dvě metody přímého stanovení počtu buněk**: ruční počítání v kalibrované komůrce pod světelným mikroskopem a poloautomatické počítání pomocí průtokového počítáče částic.

Počítání buněk v komůrce

Počítání buněk v komůrce je nejjednodušší a mnohdy i nejpřesnější metoda. U nás se obvykle používá **Bürkerova komůrka**. Na jednom mikroskopickém sklíčku jsou vybroušená dvě pole hluboká přesně 0,1 mm, na jejichž dně je síťovitý obrazec (vzdálenosti jednotlivých čar jsou uvedeny na obrázku).



Je-li třeba znát počet živých a mrtvých buněk ve vzorku, přidá se k buněčné suspenzi před počítáním barvivo, které neprochází intaktní buněčnou membránou, nebo je z intracelulárního prostoru aktivně transportováno ven. Nejčastěji se používá roztoku trypanové modři. Živé buňky zůstanou bezbarvé, zatímco mrtvé buňky, u nichž je porušena integrita buněčné membrány a jejich transportních mechanismů, se rychle zbarví na modro.



Trypanová modř

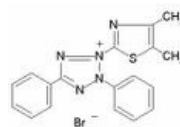
Použití průtokového počítáče

Při použití **průtokového počítáče** částic lze přístroj doplnit dalšími čidly, která blíže určí charakter buněk. Nejčastěji se měří elektrické vlastnosti částic nebo se sleduje jejich interakce s laserovým paprskem. Tyto techniky se označují jako **průtoková cytometrie** a rutinně se používají v klinické biochemii a hematologii např. ke stanovení krevního obrazu, vyšetření kostní dřeně nebo močového sedimentu.

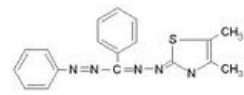
Používají se i **další metody určení počtu buněk**:

- denzitometrie obarvené buněčné kultury (barviva užívaná v histologii, metylénová modř, Janusova zeleň);
- stanovení DNA ve vzorku;
- stanovení celkové bílkoviny ve vzorku.
- stanovení aktivity některých enzymů (hexózaaminidáza).

Zvláštní postavení mezi těmito technikami zaujímá **MTT test**. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) je mitochondriálními dehydrogenázami redukováno na barevný formazan. Rychlost tvorby formazanu odpovídá aktivitě dýchacího řetězce, a odráží tak metabolickou aktivitu buňky.



MTT – oxidovaná forma



MTT - formazan (barevná forma)