© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

ВОЗМОЖНОСТИ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ И СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК

ДЯДИЧКИНА О.В., КОРОТИНА О.Л., РАДЕЦКАЯ Л.Е., ГЕНЕРАЛОВ И.И.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.
Цель исследования – сравнить воспроизводимость результатов определения нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) при люминесцентной и световой микроскопии с использованием ДНК-селективных красителей.
Материал и методы. Материалом для исследования явились нейтрофильные гранулоциты, выделенные из периферической крови у женщин с физиологическим течением беременности во 2 и 3 триместрах гестации. Произведена оценка их способности образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки в спонтанном (инкубация 180 минут с физиологическим раствором) и стимулированном (инкубация 180 минут со Staphylococcus aureus) вариантах с микроскопической оценкой результатов.
Результаты. Проведен анализ воспроизводимости результатов различных вариантов микроскопии и окраски фиксированных мазков при определении спонтанного и стимулированного уровней образования нейтрофильных внеклеточных ловушек. Были использованы высокочувствительные флуоресцентные красители Sytox Green, DAPI, акридиновый оранжевый и Hoechst 33342. После обработки последними лейкоциты и ДНК ловушки определяли с помощью люминесцентной микроскопии с использованием соответствующих источников излучения и наборов светофильтров. Для световой микроскопии применяли краситель метиловый зеленый. Оптимальным флуоресцентным красителем для определения нейтрофильных внеклеточных ловушек явился Hoechst 33342. Результаты, полученные при люминесцентной микроскопии с использованием Hoechst 33342 и световой микроскопии с красителем метиловый зеленый, статистически не отличались.
Заключение. Световая микроскопия с использованием красителя метиловый зеленый не уступает люминесцентной микроскопии с применением красителя Hoechst 33342 для определения нейтрофильных внеклеточных ловушек и может быть использована в лабораториях любого уровня.
Ключевые слова: нейтрофильные внеклеточные ловушки, врожденный иммунитет, люминесцентная микроскопия, световая микроскопия, Hoechst 33342, метиловый зеленый.

Abstract.
Objectives. To compare the reproducibility of the results of neutrophil extracellular traps (NETs) determination using fluorescence microscopy and light microscopy with DNA selective dyes.
Material and methods. We examined neutrophilic granulocytes isolated from the peripheral blood of women with physiological pregnancy in the 2nd and the 3rd trimesters of gestation. Spontaneous (180 minutes incubation with saline) and stimulated (180 minutes incubation with Staphylococcus aureus) ability of neutrophils to form neutrophil extracellular traps was assessed by means of microscopic examination.
Results. Reproducibility results analysis was made after different types of microscopy and fixed smears staining was applied for the determination of spontaneous and stimulated neutrophil extracellular traps production levels. Highly sensitive fluorescent dyes Sytox Green, DAPI, acridine orange and Hoechst 33342 were used. Leukocytes and DNA traps were determined using Hoechst 33342 by means of fluorescence microscopy with appropriate radiation sources and color filters. Examination of stained cells with methyl green dye was carried out by light microscopy. Hoechst 33342 was found to be an optimal fluorescent dye for neutrophil extracellular traps detection. The results obtained by fluorescent microscopy using Hoechst 33342 and light microscopy with methyl green dye were not statistically different.
Conclusion. Assessment of neutrophil extracellular traps by light microscopy with methyl green dye is equivalent to fluorescent microscopy with Hoechst 33342; thus, it can be used in laboratory practice of resource-limited health

care settings.
Key words: neutrophil extracellular traps, innate immunity, fluorescent microscopy, light microscopy, Hoechst 33342, methyl green.

Изучение различных морфологических форм нейтрофильных гранулоцитов и их функциональной активности по-прежнему остается важной задачей практической медицины в связи с активной ролью последних в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета, а также в поддержании гомеостаза организма в целом [1, 2, 3]. В 2004 году описан новый механизм антимикробного действия нейтрофилов – образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs или НВЛ). Нейтрофильные гранулоциты после взаимодействия с микробными агентами (бактериями, простейшими, клетками грибов), а также с различными индукторами биологической или химической природы (опсонинами, цитокинами, активными формами кислорода при дыхательном взрыве, форбол-12-миристат-13-ацетатом и т.д.) выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры – НВЛ, в состав которых входят ДНК, гистоны, а также различные белки и ферменты гранул [4]. Было установлено, что образование НВЛ представляет собой один из базовых механизмов противоинфекционной защиты, биологическая функция которого не менее важна, чем фагоцитоз и секреция медиаторов нейтрофилами. Тем не менее, избыток образования НВЛ может приводить к развитию ряда заболеваний: системная красная волчанка [5], малярия, шигеллез [6], периодонтит [7], аппендицит [4], тромбоз вен нижних конечностей [8]. Обнаружено нарушение образования НВЛ и при акушерско-гинекологической патологии, а именно при бактериальном вагинозе, бесплодии, гестозе, антифосфолипидном синдроме [9, 10]. Таким образом, оценка уровня образования НВЛ является ценным диагностическим критерием в лабораторно-клинической практике. Однако применяющиеся в настоящее время методы для определения НВЛ не позволяют широко использовать их при массовых иммунологических исследованиях, так как требуют применения люминесцентной микроскопии с использованием флуоресцентных высокочувствительных красителей к ДНК [4, 10]. Большинство клинико-диагностических лабораторий городского и районного звена не оснащены люминесцентной микроскопической техникой.

Выявление НВЛ микроскопией в проходящем свете пока активно не применяется. Так, окрашивание по Романовскому-Гимзе не является специфическим на ДНК и выявляет все продукты распада клеток крови независимо от их происхождения. В свою очередь известно, что краситель метиловый зеленый способен специфически связываться с ДНК и может применяться для количественного определения ДНК и фермента ДНКазы в биологических жидкостях [11, 12, 13, 14]. Поэтому световая микроскопия с применением метилового зеленого может использоваться для определения НВЛ как альтернатива люминесцентной микроскопии.

Цель данной работы заключалась в сравнении воспроизводимости результатов определения НВЛ при люминесцентной и световой микроскопии с использованием ДНК-селективных красителей.

Методы

За период с марта по июнь 2014 года в УЗ «Витебская городская акушерско-гинекологическая поликлиника», филиал №1, женская консультация №1 были обследованы 20 здоровых беременных женщин в возрасте 28,5 (25-30) лет. Срок гестации при обследовании составил 217 (206-230) дней. Первобеременными были 9 (45%) женщин, повторнобеременными – 11 (55%), из них 2 пациенткам предстояли первые роды, 9 – вторые роды. Акушерский анамнез был отягощен у 6 (30 %) женщин.

В исследование не включались пациенты, имевшие острые и хронические воспалительные процессы с клиническими и/или лабораторными проявлениями заболевания, а также с иммунопатологическими и ревматическими заболеваниями.

Биоматериалом для исследования была выбрана венозная кровь. Для выделения нейтрофилов 5-6 мл венозной крови забирали натощак в пластиковые пробирки с гепарином

в количестве 10-15 Ед на 1 мл крови, отстаивали при 37°С в течение 30 минут под углом 45°, затем в вертикальном положении 15 минут при комнатной температуре. Плазму с клеточными элементами наслаивали на двойной градиент плотности стерильных растворов фиколла-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляла 1,075-1,077 г/см^3, нижнего – 1,093-1,095 г/см^3. Объем градиента для каждого образца равнялся 1,5 мл. Через 35 минут центрифугирования при 1500 оборотах в минуту на границе между градиентами появлялось кольцо гранулоцитов. Последние собирали в стерильную центрифужную пробирку, трижды отмывали от градиента стерильным физиологическим раствором хлорида натрия путем центрифугирования при 1000 оборотах в минуту в течение 5 минут и доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Для оценки чистоты лейкозвеси использовали окраску по Романовскому – Гимзе, для оценки жизнеспособности клеток – окраску 0,1% раствором трипанового синего. Производили подсчет 100 клеток, результат выражали в процентах. Лейковзвесь содержала не менее 98% нейтрофилов, жизнеспособность клеток была не менее 90%. К 0,1 мл суспензии клеток в концентрации 5×10^6 клеток/мл добавляли 10 мкл микробной взвеси Staphylococcus aureus в концентрации 1×10^8 бактериальных клеток в 1 мл. Проводили инкубацию смеси в течение 180 мин при температуре 37°С. Пробы для определения базального уровня НВЛ инкубировали в тех же условиях, но без микроорганизмов. Через 180 мин инкубации из реакционной смеси забирали 20 мкл содержимого и готовили мазки. После высушивания мазки фиксировали одним из стандартных фиксаторов (96% этанолом, 4% параформальдегидом или коммерческими фиксаторами). Для люминесцентной микроскопии использовали краситель Hoechst 33342 в концентрации 5 мкг/мл, Sytox Green 1 мкМ, DAPI 300 нМ, акридиновый оранжевый 4 мкг/мл [15], для световой микроскопии – 5% раствор метилового зеленого, приготовленного на 1% растворе уксусной кислоты. Экспозиция составляла 5 мин. Красители отмывали дистиллированной водой, мазки высушивали. Учет результатов проводили с помощью люминесцентного микроскопа, используя соответствующие светофильтры, иммерсионный объектив 100/1,25; окуляр 10/22 и при помощи светового микроскопа с использованием иммерсионного объектива 100/1,25; окуляра 10/22. Проводили подсчет 100 морфологических единиц и определяли процентное содержание НВЛ. Ядра нейтрофилов, нейтрофильные внеклеточные ловушки, представленные тонкими нитями, занимающими пространство, в 2-3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила (рис. 1, 2), в зависимости от красителя окрашивались в голубой (Hoechst 33342, DAPI), зеленый цвет (Sytox Green, акридиновый оранжевый, метиловый зеленый). Цитоплазма гранулоцитов не окрашивалась.

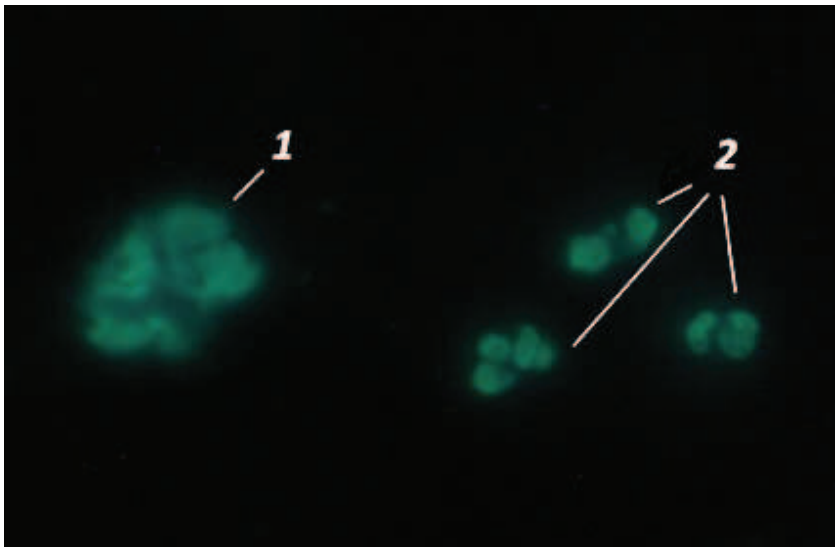

Рисунок 1 – Люминесцентная микроскопия с использованием Hoechst 33342, x100: 1 – НВЛ, 2 – сегментированные ядра нейтрофилов.

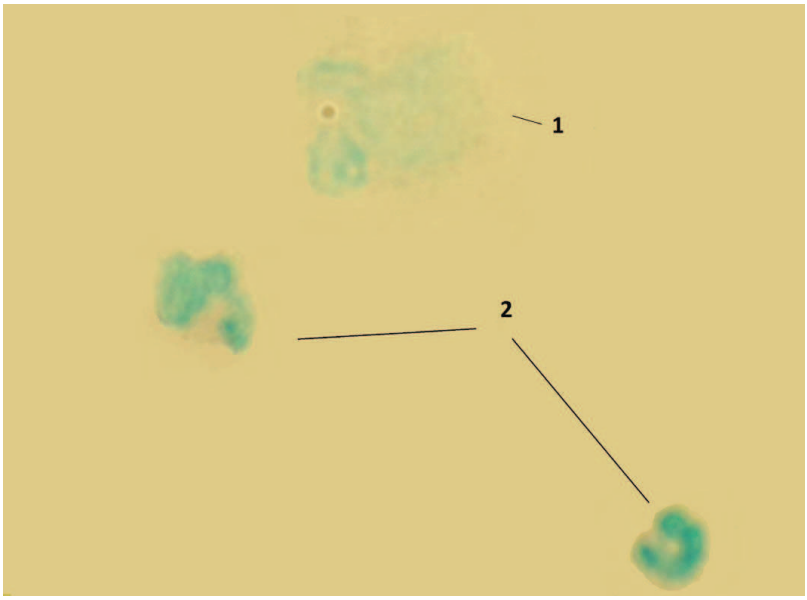

Рисунок 2 – Световая микроскопия с использованием метилового зеленого, x100: 1 – НВЛ, 2 – сегментированные ядра нейтрофилов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных компьютерных программ Statistica for Windows (v. 10.0; Statsoft Inc.). Полученные данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1-Q3). О достоверности межгрупповых различий судили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Проверка статистических гипотез осуществлялась при критическом уровне значимости $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведен анализ воспроизводимости результатов различных вариантов микроскопии и окраски фиксированных мазков при определении нейтрофильных внеклеточных ловушек. В настоящее время большинство способов определения ловушек базируется на выявлении внеклеточной ДНК активированных лейкоцитов в реакции со специфическими красителями на ДНК. После обработки последними лейкоциты и ДНК ловушки определяют с помощью люминесцентной микроскопии с использованием соответствующих источников излучения и наборов светофильтров или спектральных детекторов. При этом все эти способы используют высокочувствительные флуоресцентные красители, которые избирательно связывают ДНК ловушек. В нашем исследовании были использованы Sytox Green, DAPI, акридиновый оранжевый и Hoechst 33342. Все красители являются мембранопроникающими, поэтому возможно их использование для окраски как фиксированных, так и нативных препаратов [15].

По результатам проведенного исследования оказалось, что оптимальным красителем для флуоресцентной оценки ловушкообразования является краситель Hoechst 33342. Известно, что данный флюорохром является производным бензимидазола, окрашивает только ДНК, связываясь с аденин-тиминовыми участками в малой бороздке [15]. Hoechst 33342 хорошо растворялся в воде и не изменял свою окраску в зависимости от pH среды. Акридиновый оранжевый, DAPI способны окрашивать не только ДНК, но и РНК, что затрудняет определение НВЛ. Акридиновый оранжевый в зависимости от pH изменял цвет окраски клеточных структур с зеленого до красного. Sytox Green является ДНК-селективным красителем, при окраске не изменял цвет микропрепарата в зависимости от pH среды, хорошо растворялся в водных растворителях. Однако Sytox Green отличается высокой стоимостью в сравнении с красителем Hoechst 33342.

Таким образом, красители Hoechst 33342 явились оптимальными для флюоресцентной оценки ловушкообразования. Тем не менее, до сих пор большинство клинико-диагности-

Таблица 1 – Содержание нейтрофильных внеклеточных ловушек при выбранных способах окраски, Me (Q1-Q3)

Пробы	Количество НВЛ, %	
	Hoechst 33342, фиксированный препарат, люминесцентный микроскоп, n=17	Метиловый зеленый, фиксированный препарат, световой микроскоп, n=20
Нейтрофилы, инкубированные с физиологическим раствором	13 (7-16)	13 (7-25)
Нейтрофилы, инкубированные со Staphylococcus aureus	16 (10-19)	19 (15-29)

ческих лабораторий городского и районного звена не оснащены флюоресцентной микроскопической техникой, поэтому проведен сравнительный анализ световой микроскопии с использованием метилового зеленого и люминесцентной микроскопии с применением Hoechst 33342 (табл. 1).

Как видно из таблицы, при люминесцентной микроскопии с использованием красителя Hoechst 33342 количество НВЛ после инкубации нейтрофилов в течение 180 мин с физиологическим раствором составило 13% (7-16%), при световой микроскопии с окраской метиловым зеленым – 13% (7-25%), (p>0,05).

После инкубации нейтрофилов со Staphylococcus aureus количество НВЛ статистически значимо увеличилось в сравнении с пробами без индуктора при использовании обеих методик (13% (7-16%) и 16% (10-19%), p=0,04; 13% (7-25%) и 19% (15-29%), p=0,01). При этом результаты, полученные при использовании люминесцентной и световой микроскопии, не различались. Так, количество НВЛ при люминесцентной микроскопии составило 16% (10-19%), а при световой – 19% (15-29%), (p>0,05).

Заключение

Полученные результаты показали, что Hoechst 33342 является оптимальным по соотношению цены и качества ДНК-селективным красителем при использовании люминесцентной микроскопии для выявления НВЛ. При этом количество обнаруженных НВЛ методом люминесцентной микроскопии с использованием красителя Hoechst 33342 статистически не различалось с количеством последних при световой микроскопии с применением метилового зеленого. Из этих данных следует, что световая микроскопия с использованием красителя метилового зеленого не уступает по чувствительности люминесцентной микроскопии с применением красителя Hoechst 33342 для выявления НВЛ. Кроме того, инактивированная культура Staphylococcus aureus оказалась эффективным естественным индуктором образования НВЛ нейтрофилами. В целом, предложенная нами методика определения нейтрофильных внеклеточных ловушек методом световой микроскопии является экономичной альтернативой флуоресцентной микроскопии и может применяться в иммунологических лабораториях любого уровня.

Литература

1. Gura, T. Innate immunity: ancient system gets new respect / T. Gura // Science. – 2001 Mar. – Vol. 291, N 5511. – P. 2068–2070.
2. Долгушин, И. И. Нейтрофилы и гомеостаз / И. И. Долгушин, О. В. Бухарин. – Екатеринбург : Изд-во УрОРАН, 2001. – 256 с.
3. Пинегин, Б. В. Нейтрофилы: структура и функция / Б. В. Пинегин, А. Н. Маянский // Иммунология. – 2007. – № 6. – С. 374-382.
4. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann [et al.] // Science. – 2004 Mar. – Vol. 303, N 5663. – P. 1532–1535.
5. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis / A. Hakkim [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010 May. – Vol. 107, N 21. – P. 9813–9818.
6. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age / V. S. Baker [et al.] // Malar J. – 2008 Feb. – Vol. 7. – P. 41.
7. Extracellular neutrophil traps in periodontitis / L. Vitkov [et al.] // Journal of Periodontal Research. – 2009 Oct. – Vol. 44, N 5. – P. 664-672.
8. Fuchs, T. A. Neutrophil extracellular trap (NET)

impact on deep vein thrombosis / T. A. Fuchs, A. Brill, D. D. Wagner // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2012 Aug. – Vol. 32, N 8. – P. 1777–1783.
9. Neutrophil nets in reproduction: from Infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss / S. Hahn [et al.] // Front Immunol. – 2012 Nov. – Vol. 3. – P. 362.
10. Долгушин, И. И. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И. И. Долгушин, Ю. С. Андреева, А. Ю. Савочкина. – М. : РАМН, 2009. – 208 с.
11. Kurnick, N. B. Methyl green-pyronin; stoichiometry of reaction with nucleic acids / N. B. Kurnick, A. E. Mirsky // J. Gen. Physiol. – 1950 Jan. – Vol. 33, N 3. – P. 265–274.
12. Kurnick, N. B. Methyl green. III. Reaction with desoxyribonucleic acid, stoichiometry, and behavior of the reaction product / N. B. Kurnick, M. Foster // J. Gen. Physiol. – 1950 Nov. –Vol. 34, N 2. – P. 147–159.
13. Colorimetric determination of DNase I activity with a DNA-methyl green substrate / D. Sinicropi [et al.] // Anal. Biochem. – 1994 Nov. – Vol. 222, N 2. – P. 351–358.
14. Peters, D. L. A method of DNA quantitation for localization of DNA in metrizamide gradients / D. L. Peters, M. E. Dahmus // Anal. Biochem. – 1979 Mar. – Vol. 93, N 2. – P. 306-311.
15. Johnson, I. D. The molecular probes handbook : a guide to fluorescent probes and labeling technologies / I. D. Johnson, Michelle T.Z. Spence. – 11th ed. – Life Technologies Corporation, 2010. – 1060 p.

Поступила 23.10.2014 г.
Принята в печать 05.12.2014 г.

Сведения об авторах:
Дядичкина О.В. – аспирант кафедры акушерства и гинекологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
Коротина О.Л. – аспирант кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
Радецкая Л.Е. – д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
Генералов И.И. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра акушерства и гинекологии. Тел.раб.: +375 (212) 55-07-72, e-mail: vitebsk1508@gmail.com – Дядичкина Ольга Васильевна.