

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

Е.Н. Кроткова

« 16 » 06 2021 г.

Регистрационный № 182-1221

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ЛОВУШЕК ПРИ ПОМОЩИ ДВОЙНОГО ОКРАШИВАНИЯ С
МИКРОСКОПИЕЙ В СВЕТЛОМ ПОЛЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: Генералов С.И., ст. преподаватель Жерулик С.В., д.м.н., профессор
Генералов И.И., д.м.н., доцент Ищенко О.В.

Витебск, 2021

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Оборудование

1. Световой иммерсионный микроскоп (Leica DM 500-2000 или аналогичные) с объективами 40/0,6, 63/1,25, иммерсионным объективом 100/1,25; окуляром 10/22.
2. Термостат (37°C).
3. Пипетки дозирующие, автоматические со сменными наконечниками на 0,01 – 1,0 мл.

Лабораторная посуда и принадлежности

1. Стекла предметные ГОСТ 9284-75.
2. Стандартные центрифужные пробирки емкостью по 10 мл П1-10 ГОСТ 1770-74.
3. Пробирки вакуумные с цитратом натрия 3,2%, 4,5 мл.
4. Колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 10394-72.

Материалы и реактивы

1. Рабочий раствор нафтол AS-D хлорацетата на ДМСО в концентрации 1 мг/мл.
2. Рабочий раствор 0,004% Fast Corinth V Salt на трис-малеиновом буфере, рН 6,3.
3. Фуксин основной.
4. Рабочий 5% раствор очищенного красителя метилового зеленого, приготовленного на 1% растворе уксусной кислоты, содержащий 5% этанола.
5. 0,01М натрий фосфатный буферный раствор, рН 7,4.
6. Вода дистиллированная по ГОСТ 7609-72.

7. Иммерсионное нелюминесцентное масло (с вязкостью при 200°C около 437 mPs) для микроскопии.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

Приготовление исходных растворов реагентов

Нафтол-AS-D-хлорацетатэстераза является специфическим ферментом нейтрофильных гранулоцитов. Данный энзим отсутствует в лимфоцитах, моноцитах и других клетках, что позволяет дифференцировать от них нейтрофилы в препаратах.

Рабочий раствор субстрата нафтол AS-D хлорацетата готовится посредством растворения 1 мг сухого вещества в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО).

Рабочий раствор субстрата с красителем Fast Corinth V Salt готовится ex tempore: к 5 мл Трис-малеинового буфера pH 6,3, подогретого до 37°C, добавляется при постоянном перемешивании 2 мг красителя Fast Corinth V Salt. После полного растворения соли добавляется 200 мкл рабочего раствора нафтол AS-D хлорацетата. Тщательно перемешивается в течение 15-30 секунд. Все манипуляции проводятся в термостате при температуре 37°C. Рабочий раствор годен в течение 15 минут.

Рабочий раствор гексаазотированного фуксина готовится следующим образом: 40 мг фуксина растворяется в 1 мл 2М подогретого до 37°C раствора соляной кислоты. Параллельно в 1 мл дистиллированной воды растворяется 40 мг NaNO_2 . Растворы фуксина и нитрита натрия объединяются на холоду и перемешиваются до приобретения красителем желто-коричневого цвета. Далее к 19 мл 0,02М ФБР pH 7,4 добавляется 100 мкл красителя и 1 мл раствора субстрата. О готовности красителя к использованию свидетельствует приобретение им малинового оттенка. Раствор годен к окрашиванию на

протяжении 30 минут. Об истечении пригодности красителя свидетельствует появление осадка.

Методика выполнения

Предметом анализа являются нейтрофильные внеклеточные ловушки в мазках культуры нейтрофилов, биологических жидкостей, мазках отпечатках и гистологических препаратах тканей, которые готовят по стандартным методикам.

Определение нейтрофильных внеклеточных ловушек при помощи микроскопии в проходящем свете

Для окраски препаратов при помощи Fast Corinth V Salt на стекло с материалом, находящееся в термостате при температуре 37°C, наносят рабочий раствор красителя, выдерживают 5 минут в темноте, промывают дистиллированной водой 3 минуты, высушивают на воздухе.

Окрашивание препаратов гексаазотированным фуксином проводят в течение 5 минут, после чего промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

Докрашивание ДНК нейтрофильных внеклеточных ловушек в обоих случаях проводят 5% раствором метилового зеленого в смеси 5% этанола и 1% уксусной кислоты. Краситель наносят на мазки на 5 мин, отмывают дистиллированной водой, мазки высушивают. Оценку результатов проводят с помощью светового микроскопа с использованием объектива 63/1,25 или 40/0,6; окуляра 10/22. Проводят подсчет 100 морфологических единиц и определяют процентное содержание нейтрофильных внеклеточных ловушек.

В итоговых мазках ядра нейтрофилов, лейкоцитов, эпителиальных и других клеток окрашиваются в зеленый цвет. Также в зеленый цвет окрашиваются два морфологических типа нейтрофильных внеклеточных ловушек: в форме тонких нитей экстраклеточной ДНК, занимающих

пространство в 2-3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила, и в форме «облака» равномерно прокрашенной внеклеточной ДНК, выходящей за пределы мембраны гранулоцита.

При окраске нафтол AS-D хлорацетатом в сочетании с Fast Corinth V Salt содержащие нафтол-AS-D-хлорацетат эстеразу нейтрофилы окрашиваются бордово-фиолетовым цветом, а в сочетании с гексаазотированным фуксином – ярко-малиновым.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МЕТОДА

При окрашивании НВЛ при помощи Fast Corinth V Salt необходимо убедиться в полном растворении красителя в буферном растворе, так как нерастворенные гранулы могут давать фоновое желто-коричневое окрашивание препарата. Также при несоблюдении температурного режима интенсивность реакции снижается.

При использовании гексаазотированного фуксина также необходимо следить за полным растворением фуксина в соляной кислоте. При добавлении фосфатного буфера нерастворившийся фуксин окрашивает раствор в темно-малиновый цвет. Также о недостаточном растворении фуксина свидетельствует выпадение осадка в итоговом растворе после добавления нафтол AS-D хлорацетата в срок до 30 минут. При данном нарушении методики окрашивания препаратов не произойдет.

Коммерческий раствор метилового зеленого перед использованием следует предварительно очистить от возможных примесей метилового фиолетового путем экстракции красителя хлороформом с последующим забором верхней водной фракции, не содержащей метиловый фиолетовый. Это связано с тем, что при избытке метилового фиолетового происходит дополнительное фоновое окрашивание клеток, мешающее оценке исследуемого образца.