

Quantification of Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation in Healthy Subjects

Donporn Riyapa*

*Center for Research and Innovation, Faculty of Medical Technology, Mahidol University,
Nakhon Pathom Province, Thailand*

Abstract

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) play a crucial role in the first line of host defense against foreign antigen or invading pathogen. It was discovered as a novel microbial killing mechanism of neutrophils, called neutrophil extracellular trap (NET) formation. NETs are identified as web-like extracellular structures composed of decondensed nuclear DNA, histones, and antimicrobial granules. Upon neutrophil activation, NETs are released as an antimicrobial activity that can entrap and kill microbes extracellularly. Nevertheless, NETs may function as double-edged swords, serving as an adverse pathological outcome in excessive NET formation such as in severe sepsis or auto-inflammatory diseases. The aim of this study was investigation of a potential technique for quantification of NETs (or extracellular DNA backbone) released by human neutrophils in culture supernatants using Hoechst 33258 staining. The results revealed that, in the range of 340 to 370 nm, Hoechst 33258 had maximum fluorescence intensity at 365 nm excitation wavelength in dsDNA solutions detected by spectrofluorometer. Additionally, Hoechst 33258 at 1 µg/mL was an optimal concentration to quantify the amount of NET releases *in vitro*. The level of NETs was significantly elevated in phorbolmyristate acetate (PMA)-stimulated neutrophils as compared to that in medium control, suggesting that NETs could be efficiently quantitated with Hoechst 33258. This work strengthens our understanding that Hoechst 33258 should prove useful as a simple method to apply in NET-DNA quantification *in vivo* in further studies.

Keywords: Neutrophil extracellular traps, Neutrophils, Hoechst 33258, DNA

*Corresponding author E-mail address: donporn.riy@mahidol.edu

Received: June 6, 2018

Revised: June 21, 2018

Accepted: July 24, 2018

การตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในอาสาสมัครสุขภาพดี

ดลพร ริยะป่า*

ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

บทคัดย่อ

นิวโทรฟิลหรือเม็ดเลือดขาวชนิดโพลีมอร์โฟนิวเคลียร์นิวโทรฟิล (polymorphonuclear neutrophils, PMNs) เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญในการป้องกันการรุกรานจากเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย ภายหลังได้มีการค้นพบกระบวนการกำจัดเชื้อจุลชีพรูปแบบใหม่ของนิวโทรฟิล ในรูปโครงสร้างเส้นใยร่างแห หรือ neutrophil extracellular traps (NETs) ซึ่งประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ โปรตีนฮิสโตน และแกรนูลที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ โดยจะถูกปล่อยออกมาเพื่อดักจับและทำลายเชื้อโรคภายนอกเซลล์ อย่างไรก็ตามโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลเปรียบเสมือนดาบสองคม ถ้ามีการสร้างในปริมาณที่มากเกินไปอาจทำให้พยาธิสภาพในบางโรครุนแรงขึ้นได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิล โดยวิธีการย้อมด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 จากผลการทดสอบตรวจวัดปริมาณสารละลายดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าในช่วง 340 ถึง 370 นาโนเมตร สารเรืองแสง Hoechst 33258 มีค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดอยู่ในช่วงความยาวคลื่น excitation ที่ 340 นาโนเมตร นอกจากนี้ได้นำนิวโทรฟิลที่แยกได้จากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 6 ราย มากระตุ้นด้วย phorbolmyristate acetate (PMA) ในหลอดทดลอง และตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ พบปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนิวโทรฟิลที่ถูกกระตุ้น แสดงว่าการย้อมด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถใช้ตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการวิจัยเบื้องต้นนี้ชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของการศึกษาวิธีการตรวจวัดโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลอย่างง่ายซึ่งอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงได้ในอนาคต

คำสำคัญ: โครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิล นิวโทรฟิล สารเรืองแสง Hoechst 33258 ดีเอ็นเอ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: donporn.riy@mahidol.edu

รับบทความ: 6 มิถุนายน 2561

แก้ไขบทความ: 21 มิถุนายน 2561

รับตีพิมพ์บทความ: 24 กรกฎาคม 2561

บทนำ

นิวโทรฟิลหรือเม็ดเลือดขาวชนิดโพลีมอร์ฟนิวเคลียร์นิวโทรฟิล (polymorphonuclear neutrophils) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันที่พบมากที่สุดในเลือด ทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อจุลชีพ ผ่านกระบวนการจับกิน (phagocytosis) และทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคด้วยโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ จากแกรนูลภายในเซลล์ (degranulation) รวมถึงการมีบทบาทเกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ⁽¹⁾ ภายหลังมีการค้นพบกระบวนการกำจัดเชื้อจุลชีพภายนอกเซลล์รูปแบบใหม่ของนิวโทรฟิลที่ใช้โครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลหรือ neutrophil extracellular traps (NETs) โดยเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อจุลชีพที่เข้ามาในร่างกาย นิวโทรฟิลจะปล่อยเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลซึ่งประกอบด้วย เส้นใยโครมาตินหรือดีเอ็นเอที่เคลือบด้วยโปรตีนต่อต้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial proteins) และเอนไซม์ต่างๆ ออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อดักจับและกำจัดเชื้อโรค เช่น แบคทีเรีย แกรมบวกและแกรมลบ รา ปรสิต และไวรัส^(2, 3) กลไกหลักในการเกิดโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิล มาจากการกระตุ้นผ่านเอนไซม์นิโคตินาไมด์ อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟตออกซิเดส (NADPH oxidase) ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species หรือ ROS) ขึ้นภายในไซโตพลาสซึม ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นปฏิกิริยาภายในเซลล์ สุดท้ายจึงเกิดเป็นโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลที่ปล่อยออกนอกเซลล์⁽⁴⁾

โครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลที่ถูกปล่อยออกมามีประโยชน์อย่างมากในด้านการกำจัดเชื้อจุลชีพหลากหลายชนิด แต่หากการสร้างและการสลายโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลของร่างกายเกิดความไม่สมดุล ก็สามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อร่างกายหรือส่งผลต่อความรุนแรงของโรคได้ เช่น เชื้อก่อโรค

ซูโดโมแนส ออริจินซ่า (*Pseudomonas aeruginosa*) สามารถกระตุ้นนิวโทรฟิลให้ปล่อยโครงสร้างเส้นใยร่างแหในระบบทางเดินอากาศภายในปอดของผู้ป่วยโรคซิสติก ไฟโบรซิส (cystic fibrosis) ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพที่ปอดรุนแรงมากขึ้น^(5, 6)

ปัจจุบันมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวัดโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ซึ่งทำได้โดยการตรวจหาดีเอ็นเอซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เช่น การย้อมด้วยสารเรืองแสง 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) และส่องดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์⁽⁷⁾ การย้อมด้วยสารเรืองแสง SYTOX green⁽⁸⁾ และการย้อมด้วยสารเรืองแสง PicoGreen⁽⁹⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการย้อมโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลด้วยสารเรืองแสง PicoGreen เป็นชุดตรวจดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่ได้รับความนิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัย แต่ชุดตรวจนี้มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเทียบต่อจำนวนการทดสอบ จากปัญหาดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยครั้งนี้ โดยผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาวิธีการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอหรือโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิล โดยใช้ Hoechst 33258 ซึ่งเป็นสารออร์แกนิก bisBenzimide ให้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์สีน้ำเงิน ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ bisbenzimidazole ที่จับกับ minor groove ของดีเอ็นเอ โดยเฉพาะบริเวณคู่กันของเบส A-T สารเรืองแสง Hoechst 33258 มีราคาไม่สูงมากนักเมื่อคำนวณเทียบต่อจำนวนการทดสอบและสามารถนำไปใช้ในงานวิจัยในหลอดทดลองได้จริง

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ศึกษา

เจาะเก็บเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดี อายุ 18-35 ปี ที่ไม่มีประวัติโรคประจำตัว ไม่มีภาวะการ

อีกเสบหรือเป็นไข และไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ การศึกษา
นี้ได้ผ่านการรับรองจาก คณะกรรมการจริยธรรมการ
วิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยมหิดล รหัสโครงการ
MU-CIRB 2017/057.0203

2. การแยกเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลโดยวิธี ปั่นเหวี่ยงที่ความถ่วงจำเพาะ 1.077

เจาะหลอดเลือดดำเพื่อเก็บเลือด โดยใช้
เฮพารินเป็นสารกันเลือดแข็ง นำเลือดมาผสมกับ
สารละลายเด็กซ์แทรน (3%, Pharmacosmos,
Denmark) เพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงตก เก็บส่วนใส
คือ leukocyte-rich plasma นำมาแยกชั้นของ
peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)
และนิวโทรฟิล โดยใช้ยา Ficoll-Paque (Sigma-
Aldrich, USA) ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.077 นำไป
ปั่นเหวี่ยง เก็บชั้นของนิวโทรฟิลที่อยู่ติดกับชั้น
เม็ดเลือดแดงบริเวณส่วนปลายของหลอดทดลอง
และกำจัดเม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนด้วยหลักการ
hypotonic lysis นิวโทรฟิลที่แยกได้นำมาเพาะเลี้ยง
ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 10% fetal
bovine serum (Invitrogen, USA) และแช่เย็นไว้

ในน้ำแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส⁽⁹⁾ ใน
การทดลองต้องใช้นิวโทรฟิลที่เตรียมใหม่ทุกครั้งและ
ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (viability) ด้วยวิธี
trypan blue exclusion ทดสอบความบริสุทธิ์
(purity) ด้วยวิธี Wright's stain ผลทดสอบการ
มีชีวิตและความบริสุทธิ์ของนิวโทรฟิลให้ผลมากกว่า
ร้อยละ 99 และร้อยละ 95 ตามลำดับ จากนั้นปรับ
ปริมาตรให้นิวโทรฟิล 2.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
เพื่อใช้ในการทดสอบ

3. การเตรียมกราฟมาตรฐาน dsDNA ด้วยวิธี spectrofluorometry

เจือจาง dsDNA (Thermo scientific,
USA) ด้วย TE buffer ให้มีความเข้มข้น 1, 10, 100,
1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ blank จากนั้นเติม
สารเรืองแสง Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich,
USA) ที่สามารถจับกับ dsDNA ได้โดยตรง และนำ
ไปวัด ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยเครื่อง
spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่น excitation
365 นาโนเมตร และความยาวคลื่น emission 460
นาโนเมตร (Table 1)

Table 1 Preparations of dsDNA standard

Volume of 2,000 ng/ml dsDNA (μ l)	Volume of TE buffer (μ l)	Volume of Hoechst 33258 (μ l)	Final concentration of dsDNA (ng/ml)
100	0	100	1,000
10	90	100	100
1	99	100	10
0.1	99.9	100	1
0 (Blank)	100	100	0 (Blank)

4. การทดสอบหาปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิล

เพาะเลี้ยงนิวโทรฟิล 2.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่มีและไม่มีตัวกระตุ้น phorbol-myristate acetate (PMA, Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้ 5% CO₂ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* (Thermo Scientific, USA) ที่ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการตัดลำดับเบสในสายดีเอ็นเออย่างจำเพาะเจาะจง จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย ในการตัดสายดีเอ็นเอหรือ NETs ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ให้สั้นลง⁽¹⁰⁻¹²⁾ และนำหลอดทดลองไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA: Merck Millipore, Germany) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ นำเซลล์ไปปั่นตกและเก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ โดยการย้อมด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 แล้วนำไปวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่อง spectrofluorometer ค่าที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน dsDNA

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้ได้ออกแบบการทดลอง เป็นการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเพื่ออิสระต่อกัน ใช้สถิติวิเคราะห์ unpaired *t* test เปรียบเทียบผลการทดลองในสภาวะที่ต่างกัน โดยใช้ซอฟต์แวร์คอมพิวเตอร์ คือ GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA,

USA) และกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *p*-value น้อยกว่า 0.05

ผลการวิจัย

1. การทดสอบหาความยาวคลื่น excitation ที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณ dsDNA

การทดสอบหาความยาวคลื่น excitation ที่เหมาะสมของสารเรืองแสง Hoechst 33258 มีความจำเป็นอย่างมากก่อนทำการตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลในตัวอย่างจริง หลังจากเตรียม dsDNA ที่ความเข้มข้น 0, 1, 10, 100 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปวัดค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วงความยาวคลื่น excitation ตั้งแต่ 300 ถึง 400 นาโนเมตร โดยเครื่อง spectrofluorometer ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าช่วงความยาวคลื่น excitation ที่ให้ค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดคือที่ 365 นาโนเมตร ซึ่งเหมาะสมที่สุดในการตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิล (Fig. 1)

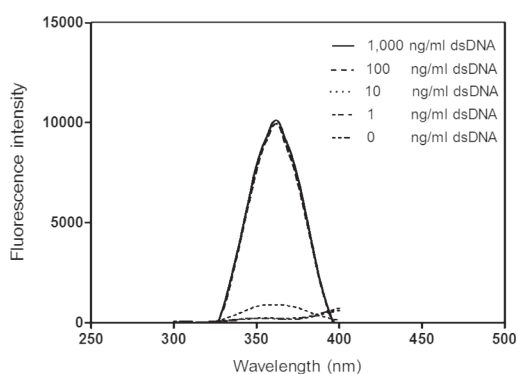


Fig. 1 Optimal excitation wavelength of Hoechst 33258 for detection of dsDNA at different concentrations of 0, 1, 10, 100 and 1,000 ng/mL

2. การทดสอบหาความเข้มข้นของสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่เหมาะสม

เตรียม dsDNA ที่ความเข้มข้น 0, 1, 10, 100 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นย้อม dsDNA ด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่น excitation 365 นาโนเมตร และความยาวคลื่น emission 460 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำมาสร้างกราฟ

มาตรฐานและคำนวณค่า R^2 ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่ 0.01, 0.1 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9584, 0.9812 และ 0.9997 ตามลำดับ แสดงว่าสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า R^2 สูงและมีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาตรวจหาปริมาณ dsDNA หรือโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลต่อไป (Fig. 2)

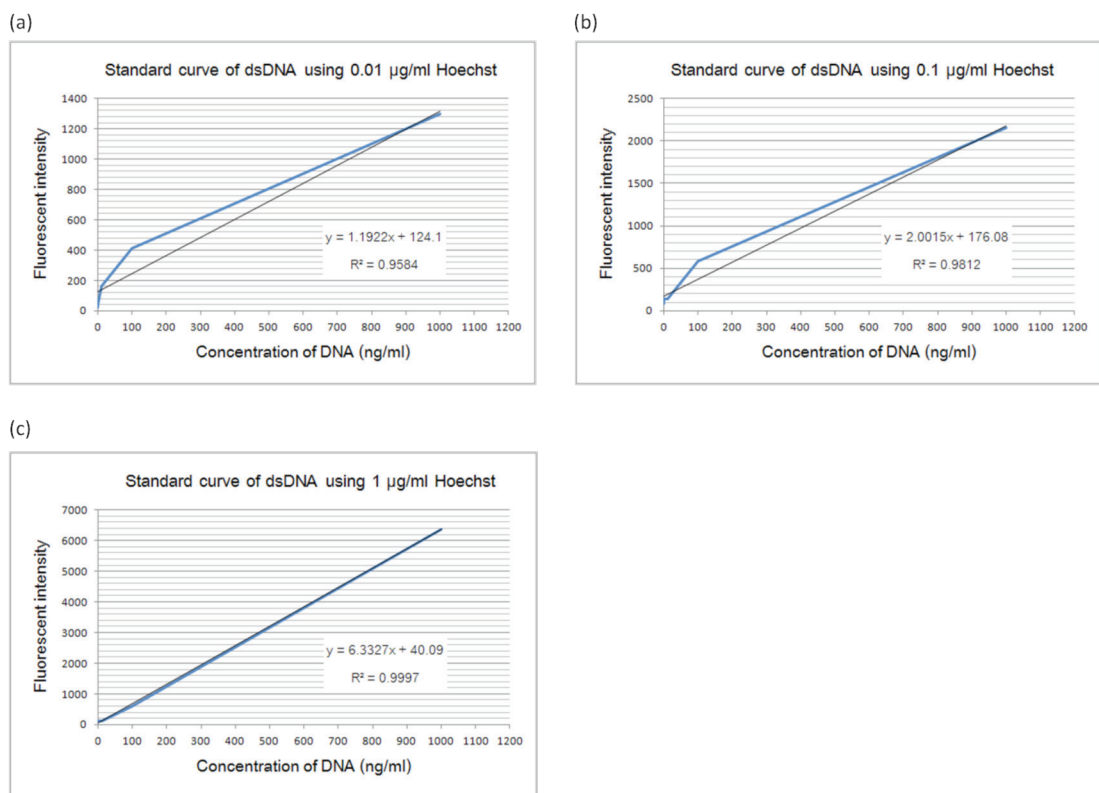


Fig. 2 Standard curves of dsDNA by using Hoechst 33258 at different concentrations of (a) 0.01 (b) 0.1 and (c) 1 µg/mL

3. การตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลในสถานะที่มีหรือไม่มีตัวกระตุ้น PMA

หลังจากเพาะเลี้ยงนิวโทรฟิลภายใต้สภาวะที่มีหรือไม่มีตัวกระตุ้น PMA เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำมาวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหที่นิวโทรฟิลปล่อยออกมาในเซลล์ โดยการย้อมด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้นำไปเทียบกับ

กราฟมาตรฐาน dsDNA เพื่อคำนวณเป็นปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลที่ได้ในหลอดทดลอง จากผลการทดลองพบว่าปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนิวโทรฟิลที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น PMA เมื่อเทียบกับนิวโทรฟิลในสภาวะที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว (Fig. 3)

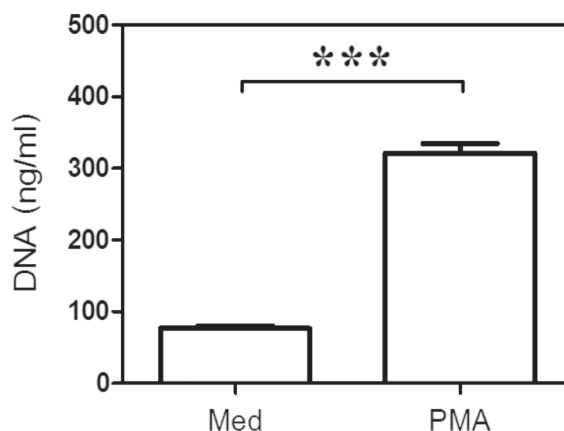


Fig. 3 Quantification of released NET. Human neutrophils were incubated in the presence or absence of 100 nM PMA for 90 minutes and culture supernatants were then collected to detect the amount of NET-DNA by using Hoechst 33258 at concentration of 1 μ g/mL. Error bar indicates SEM of three independent experiments ($n=6$). *** $p<0.001$ as compared with medium control

วิจารณ์และสรุป

การค้นพบกลไกการกำจัดเชื้อจุลชีพรูปแบบใหม่ของนิวโทรฟิลที่เรียกว่า neutrophil extracellular traps หรือ NETs เป็นโครงสร้างเส้นใยคล้ายร่างแหประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ โปรตีนฮิสโตนที่เคลือบด้วยเอนไซม์ และโปรตีนชนิดต่างๆ ซึ่งถูกปล่อยออกมาในเซลล์ เพื่อดักจับและทำลายเชื้อจุลชีพ^(2, 3) อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผ่านมาได้ตรวจพบปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลในโรค

ต่างๆ ซึ่งอาจเกิดจากความไม่สมดุลในการสร้างและกำจัดภายในร่างกาย เช่น โรคที่มีการติดเชื้อหรืออักเสบรุนแรง และโรคแพ้ภูมิตัวเอง (autoimmune diseases)⁽¹³⁾ หลังจากนั้นจึงเกิดการศึกษาและค้นคว้าอย่างแพร่หลายในการหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลกับการเกิดพยาธิสภาพในโรคต่างๆ

งานวิจัยนี้ได้สังเกตเห็นความสำคัญในการศึกษาและพัฒนาการตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใย

ร่างแหนิวโทรฟิล ให้สามารถทดสอบได้ง่าย ราคาต่อจำนวนการทดสอบไม่แพง เมื่อเทียบกับชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีราคาค่อนข้างสูง และมีความไวเทียบเท่ากับการตรวจวัดโดยวิธีการอื่นๆ⁽¹⁴⁾ ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารเรืองแสง Hoechst 33258 ในการตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิล สารเรืองแสง Hoechst 33258 มีสมบัติสามารถซึมผ่านผนังเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ได้โดยตรง เมื่อทดสอบหาความยาวคลื่น excitation ที่เหมาะสมของสารเรืองแสง Hoechst 33258 พบว่าในช่วงความยาวคลื่น excitation 365 นาโนเมตร สารเรืองแสง Hoechst 33258 ให้ค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดในการตรวจวัดสารละลาย dsDNA ที่ความเข้มข้นต่างๆ นอกจากนี้ผลการแสดงกราฟมาตรฐาน dsDNA พบค่า R^2 สูงในการใช้สารเรืองแสง Hoechst 33258 แต่ละความเข้มข้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลในหลอดทดลองได้เกินค่าขีดจำกัดการตรวจหา (limit of detection) จากกราฟมาตรฐาน dsDNA ดังนั้นเพื่อความเหมาะสมในการตรวจวัดจึงเลือกใช้สารเรืองแสง Hoechst 33258 ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำตัวอย่างทดสอบหรือ culture supernatants ที่ได้จากการกระตุ้นนิวโทรฟิลด้วยตัวกระตุ้น PMA จากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 6 ราย มาตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลที่ปล่อยออกมาออกเซลล์ โดยการย้อมด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 พบว่าค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างทดสอบอยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน dsDNA และพบว่าปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหจากนิวโทรฟิลที่ถูกกระตุ้นสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับนิวโทรฟิลที่ไม่ถูกกระตุ้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสง Hoechst 33258 ให้ความไวมากพอในการ

ใช้วัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหจากนิวโทรฟิลได้อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดในการตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหนิวโทรฟิลในตัวอย่างจริง เช่น ในเสมหะ สารคัดหลั่ง น้ำลาย เนื้อเยื่อ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ เพื่อแสดงถึงความไวและครอบคลุมในการตรวจวัดมากขึ้น

งานวิจัยนี้สรุปได้ว่าการตรวจวัดปริมาณโครงสร้างเส้นใยร่างแหที่ถูกปล่อยออกจากเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล โดยการย้อมด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 เป็นวิธีการที่ทำการทดสอบได้ง่าย ราคาไม่สูงมากเมื่อเทียบต่อจำนวนการทดสอบ อีกทั้งมีความไวต่อการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครสุขภาพดีในการบริจาคเลือดเพื่อใช้ทำการศึกษาวิจัย การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

1. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014; 15: 602-11.
2. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-5.
3. Lu T, Kobayashi SD, Quinn MT, DeLeo FR. A NET outcome. *Front Immunol* 2012; 3: 365.
4. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231-41.

5. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol* 2013; 60: 277-84.
6. Skopelja S, Hamilton BJ, Jones JD, *et al.* The role for neutrophil extracellular traps in cystic fibrosis autoimmunity. *JCI Insight* 2016; 1: e88912.
7. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012; 189: 2689-95.
8. Masuda S, Shimizu S, Matsuo J, *et al.* Measurement of NET formation *in vitro* and *in vivo* by flow cytometry. *Cytometry A* 2017; 91: 822-9.
9. Riyapa D, Buddhisa S, Korbsrisate S, *et al.* Neutrophil extracellular traps exhibit antibacterial activity against *Burkholderia pseudomallei* and are influenced by bacterial and host factors. *Infect Immun* 2012; 80: 3921-9.
10. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 6748-53.
11. Della Coletta AM, Bachiega TF, Silva JCDE, *et al.* Neutrophil extracellular traps identification in tegumentary lesions of patients with paracoccidioidomycosis and different patterns of NETs generation *in vitro*. *Plos Neglect Trop D.* 2015; 9: e0004037.
12. Wardini AB, Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, *et al.* Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Gen Virol* 2010; 91: 259-64.
13. Pruchniak MP, Kotula I, Manda-Handzlik A. Neutrophil extracellular traps (Nets) impact upon autoimmune disorders. *Cent Eur J Immunol* 2015; 40: 217-24.
14. von Kockritz-Blickwede M, Chow O, Ghochani M, Nizet V. Visualization and functional evaluation of phagocyte extracellular traps. *Method Microbiol* 2010; 37: 139-60.
15. Pedersen F, Marwitz S, Holz O, *et al.* Neutrophil extracellular trap formation and extracellular DNA in sputum of stable COPD patients. *Respir Med* 2015; 109: 1360-2.
16. Cedervall J, Zhang Y, Huang H, *et al.* Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals. *Cancer Res* 2015; 75: 2653-62.
17. Mohanty T, Sjogren J, Kahn F, *et al.* A novel mechanism for NETosis provides antimicrobial defense at the oral mucosa. *Blood* 2015; 126: 2128-37.