

ТЕМА 6. ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ ІМУННИЙ АНАЛІЗ

Імунофлуоресцентний аналіз (ІФЛА). Основи. Типи ІФЛА. Використання

В основі методів люмінесцентного аналізу лежить спільне явище – збуджені будь-яким чином молекули або атоми віддають всю енергію збудження або її частину у вигляді світла. Розбурхувати з'єднання можна ультрафіолетовим випромінюванням, наприклад, ртутної лампи. Люмінесценцію, викликану світловими квантами, називають фотолюмінесценція або флуоресценція. Саме флуоресценцію найчастіше і використовують для аналітичних цілей, хоча нерідко застосовують і люмінесценцію, що виникає при хімічних реакціях, – хемілюмінесценцію.

Флуоресценція – випускання світла, спостерігається тільки в присутності збуджуючого світла. Поняття «флуоресценція» ввів Стокс, він же сформулював закон: довжина хвилі люмінесценції (флуоресценції) більше, ніж довжина хвилі збуджуючого світла. Досліджують флуоресценцію за допомогою люмінесцентного мікроскопу.

Імунофлуоресцентний аналіз поєднує специфічність взаємодії антиген-антитіло з виявленням імунного комплексу, що утворився, за допомогою мітки, флуорохрому.

Імунофлуоресцентний аналіз використовується для:

- ідентифікації збудників інфекції у клінічних зразках – визначення антигенів;
- ідентифікація серотипу вірусів в культурі; визначення концентрації антитіл;
- визначення антигенних детермінант на клітинах; ідентифікація різних клітин;

Завдання імунофлуоресцентного аналізу – виявлення локалізації та відносного вмісту будь-якого білку для якого є

специфічні антитіла. Антитіло специфічно зв'язується з шуканим білком, а флуоресцентна мітка дозволяє за допомогою флуоресцентного мікроскопа побачити імунний комплекс.

Флуоресцентний барвник ковалентно пришивається до антитіла. Він абсорбує світло певної довжини хвилі, а випромінює світло другої хвилі, світло що випускається, є видимим дослідникові.

Існують три модифікації імунофлуоресцентного аналізу.

Метод прямої імунофлуоресценції, заснований на зв'язуванні антитіл, мічених флуорохромом (наприклад, флуоресцеїном), з антигенами на поверхні або всередині мікроорганізмів. Антитіла, що зв'язались, виявляють під люмінесцентним мікроскопом (флуорохром поглинає ультрафіолетові промені і випромінює хвилі видимого діапазону).

Метод непрямой імунофлуоресценції включає два етапи: спочатку об'єкт обробляють антитілами до антигенів, характерним для даного мікроорганізму, а потім вторинними антитілами, специфічними до перших. Вторинні антитіла, мічені флуорохромами, зв'язуються з першими і виявляються під люмінесцентним мікроскопом; оскільки ж до кожного з перших антитіл можуть приєднуватися кілька вторинних, корисний сигнал підсилюється. Обидва методи застосовують для виявлення вірусів у культурі клітин (наприклад, цитомегаловірусу, вірусу простого герпесу), а також для виявлення бактерій, що погано піддаються культивуванню (наприклад, *Legionella pneumophila*).

Проточна цитофлуориметрія

В основі методу проточної цитометрії лежить вимірювання параметрів кожної окремо взятої клітини. Суспензію попередньо пофарбованих флуоресціюючими барвниками (як правило, в ролі барвників виступають моноклональні антитіла, кон'юговані з флуорохромом) клітин під тиском проганяють через капіляр. Клітини, підхоплені потоком рідини, шикуються одна за одною, утворюючи "ланцюжок" – принцип гідродинамічного фокусування, завдяки якому створюються умови ламінарного потоку без перемішування суспензії клітин з рідиною, що обтікає, забезпечується збереження життєздатності клітин.

Коли такий струмінь перетинає сфокусований лазерний промінь, в точці перетину потоку і променя одночасно виявляється, як правило, тільки одна клітина, що дозволяє уникнути артефактів, пов'язаних з різною віддаленістю клітин від точки перетину лазерного променя з потоком. Високо чутливі датчики, розташовані поблизу проточної осередку, фіксують розсіювання світла під кутом від 2 до 19 °, яке називається прямим або малокутовим світлорозсіюванням (FSC) і під кутом 90° – бічне світлорозсіювання (SSC). Одночасно з цим реєструється випромінювання флуоресцентних міток (FL1, FL2, і т.д.), що має строго визначену для кожного флуорохрому довжину хвилі.

У проточному цитофлуориметрії світло перетворюється в електричні сигнали, які обробляються, і в остаточному підсумку визначається кількісна величина кожного вимірюваного параметра. Ці величини дискретизуються і передаються в комп'ютер для виведення аналізу на дисплей. Використання багатобарвного флуориметричного дослідження дозволяє одночасно отримати інформацію про декілька антигенів на поверхні клітин.

Основні компоненти проточного цитометру

1. Струменева автоматика – капіляр для рідини, гідродинамічне фокусування
2. Оптична автоматика – лазери, лінзи, діхроїчні дзеркала (кольорові біркові дзеркала), детектори (датчики)
3. Комп'ютер – управління та аналіз.

Параметри, за якими проводиться імунофлуориметричний аналіз

Імуноцитофлуориметричний аналіз клітин проводиться за наступними основними параметрами:

FSC (forward side scatter) – показник прямого світлорозсіювання, який характеризує розміри клітин;

SSC (side scatter) – показник бічного світлорозсіювання, який відображає оптичну неоднорідність цитоплазми клітин, характер клітинних включень і гранулярність клітини. Термін "гранулярність" має специфічне цитофлуориметричне навантаження: розуміється вся сукупність утворень, що формують клітину, включаючи будь-які клітинні органели і ядро. Використання цього параметра дозволяє судити про співвідношення розмірів ядра та цитоплазми.

FL1, FL2 – канали детекції специфічного флуоресцентного сигналу барвника на різній довжині хвилі.

Аналіз інформації, що отримується по каналах світлорозсіювання, дає можливість розділити лейкоцити периферичної крові на три популяції – лімфоцити, моноцити і гранулоцити. Лімфоцити характеризуються найменшими розмірами, найбільш великі клітини – гранулоцити, моноцити займають проміжне положення за параметрами FSC. Найбільш низькі характеристики SSC мають лімфоцити, проміжні – моноцити і високі показники SSC – у гранулоцитів.

Використання декількох флуоресцентних міток дозволяють проводити одночасний двох-, триколірний і більше аналіз, так як кожен флуорохром при проходженні через промінь лазера випромінює світло різної довжини хвилі. Найбільш часто в якості фарбувальної мітки застосовується флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC), який вловлюється FL-1-детектором (перший канал флуоресценції) (зелений спектр), фікоеритрин (PE) – FL-2-детектором (жовтий спектр), менш часто – тандем ціанін-5/фікоеритрин і піридин хлорофіл (PerCp, Cy5/PE) – FL-3-детектором та алофікоціанін (APC) – FL-4-детектором. Сучасні моделі приладів можуть бути оснащені двома або більше лазерами і чотирма і більше фотопомножувачами, що дозволяє реєструвати різні флуорохроми на різних довжинах хвиль. При виборі сполучень флуорохромів для одночасного визначення декількох клітинних маркерів слід враховувати довжину хвилі джерела світла і здатність оптичної системи приладу розділяти і одночасно реєструвати сигнали від використовуваних флуорохромів.

Імунофенотипування клітин та визначення їхньої функціональної активності

Імунофенотипування клітин з різного біоматеріалу має величезне значення для клініциста. Дані аналізи в першу чергу дозволяють судити про морфологічну складову імунітету, тобто відповісти на запитання: "Чи достатня кількість клітин у крові та тканинах для реалізації необхідних функцій". Друге питання: "чи готові функціонально клітини до виконання тієї чи іншої задачі". Одним з найбільш частих видів досліджень в у лабораторіях імунології є визначення популяційного і субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові. Це дослідження включає визначення вмісту Т - лімфоцитів, їх субпопуляцій: CD4⁺ (Т-хелперів) і CD8⁺ (цитотоксичних Т-лімфоцитів), а також В - лімфоцитів і NK - клітин. Додатково може бути досліджено зміст активованих Т-лімфоцитів (CD3⁺ HLA-DR⁺) та регуляторних Т-клітин з супресорною активністю (CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺). Оцінка функціональної активності імунокомпетентних клітин характеризує їх здатність до проліферації у відповідь на стимуляцію антигеном, секретувати цитокіни, що впливають на активацію або, навпаки, інгібування інших клітин, а також здатність вбивати інфіковані вірусом клітини.

Секреція цитокінів може бути оцінена за допомогою проточної цитометрії (внутрішньоклітинне фарбування) або методом ELISAPOT. Проліферацію Т-клітин вивчають у відповідь на автоспецифічні, пухлинні антигени, алоантигени. Це дозволяє охарактеризувати силу імунної відповіді хворого, імунологічну пам'ять і здатність відповідати на специфічні та неспецифічні антигени.

Аналіз змісту В-лімфоцитів в крові та імуноглобулінів у сироватці крові дозволяє охарактеризувати відхилення гуморального імунітету.

Застосування проточної цитометрії

Коло проблем, що вирішуються за допомогою проточної цитометрії включає:

1. Якісні дослідження

імунофенотипічний аналіз:

діагноз і контроль злоякісних гематологічних захворювань

діагноз і диференціальний діагноз імунодефіцитів

контроль активності автоімунних захворювань

контроль перед- та посттрансплантаційних станів,

HLA-типування;

аналіз пухлинних клітин: антигени проліферації;

виявлення експресії молекул адгезії

виявлення, діагноз і контроль перебігу інфекційних хвороб (HBV, ВІЛ)

2. Кількісні визначення

1) Кількісне визначення мічених клітин і клітин з поверхневими молекулами

2) Визначення вмісту ДНК і РНК в клітинах аналіз клітинного циклу визначення

апоптозу

3) Вимірювання функціональної активності клітин:

визначення фагоцитарної і хемотаксичної активності клітин

визначення внутрішньоклітинної концентрації кальцію та внутрішньоклітинних

сигнальних молекул, внутрішньоклітинного рН

визначення активності ферментів та їх локалізація

4) Виділення / поділ клітин.