

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ КОМБИНИРОВАННОГО ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЧИПА

*А.В. Шиликин<sup>1</sup>, Н.Г. Овчинина<sup>1</sup>, С.С. Бессмельцев<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> ГОУ ВПО Ижевская государственная медицинская академия, г. Ижевск

*e-mail: [Shishkin\\_lab@mail.ru](mailto:Shishkin_lab@mail.ru)*

<sup>2</sup> Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, г. Санкт-Петербург

*e-mail: [bsshem@hotmail.com](mailto:bsshem@hotmail.com)*

### Резюме

*Применение иммунологических биочипов, содержащих иммобилизованные антитела, дает возможность определения поверхностных антигенов клеток. При использовании биочипов, изготовленных на прозрачных и химически-стойких подложках связавшиеся клетки могут быть зафиксированы, окрашены и подвергнуты морфологическому исследованию. Данный подход значительно повышает информативность анализа, поскольку позволяет определить, какие именно морфологические субпопуляции клеток экспрессируют каждый из определяемых с помощью биочипа антигенов. В представленной работе описана усовершенствованная методика проведения подобного комбинированного исследования.*

**Ключевые слова:** иммунологические биочипы, поверхностные антигены клеток, иммуноморфологическое исследование клеток.

## IMPROVEMENT OF COMBINED IMMUNOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF CELLS WITH BIOCHIP

*IA.V. Shishkin, IN.G. Ovchinina, 2S.S. Bessmeltsev*

<sup>1</sup> *Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk*

<sup>2</sup> *Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St- Petersburg*

### Summary

Using the immunological biochips including immobilized antibodies allows detecting the surface cell antigens. The cells may be fixed and painted on pellucid and chemically resistant base of microarray and then cell morphology may be written. This method detects what antigens are

expressed with morphologically different subpopulations of cells. Advanced method of such combine analysis is reported in this article.

**Key words:** *immunological biochips, surface cell antigens, immunomorphological cell analysis.*

### **Введение.**

В последние годы ведутся работы по созданию различных типов иммунологических биочипов [1-14]. Биочипы содержащие иммобилизованные антитела могут быть с успехом применены для определения поверхностных антигенов клеток. Их преимущество заключается в низкой себестоимости проведения анализа вследствие минимального расхода антител. При этом возможно одновременное определение множества различных поверхностных антигенов на разных клетках. Биочипы данного класса должны стать весьма удобным средством для иммунологического исследования клеток и найти свое применение в области гематологии, онкологии, клинической иммунологии и других дисциплин.

Биочипы описанные в работах [1-14] представляли собой подложку, на которой в строго определенных участках были иммобилизованы антитела, способные специфически взаимодействовать с поверхностными антигенами исследуемых клеток. Базовая методика проведения анализа позволяет устанавливать содержание в исследуемом образце клеток, имеющих определяемые антигены. Она включает инкубацию биочипа с клеточной суспензией, отмывку биочипа от не связавшихся с антителами клеток, фиксацию препарата, считывание результата и определение плотности связывания клеток в области пятен биочипа (тестовых участков с иммобилизованными антителами). Исходя из значений плотности связывания клеток в области тестовых участков биочипа, в исследуемом образце может быть определено содержание клеток, имеющих соответствующие антигены.

Представляется весьма перспективной идея совмещения иммунологического исследования клеток с использованием биочипов и выполнения морфологического исследования тех же самых клеток. Это позволило бы значительно повысить информативность и доказательность результатов анализа. Необходимо отметить, что в работах разных исследователей данный подход не был реализован.

Целью данной работы являлось совершенствование методики фиксации и окрашивания связавшихся с биочипом клеток и решение проблемы защиты поверхности биочипа.

### **Материалы и методы.**

Для обеспечения возможности окрашивания связавшихся с биочипом клеток и их последующего исследования с использованием в проходящем свете, для изготовления биочипов нами были использованы подложки, которые обеспечивали не только прочную иммобилизацию антител, но также обладали прозрачностью, химической стойкостью и слабо адсорбировали красители. Вместе с тем нам пришлось столкнуться с проблемой грубых морфологических изменений клеток. При этом клетки, окрашенные на биочипе, существенно отличались от того привычного вида, который они имеют при окрашивании в мазке [11, 13, 14]. Это стало препятствием для практического использования предлагаемого подхода. Кроме того, возникла необходимость длительного сохранения биочипа после проведения анализа и возможности выполнения многократного микроскопического исследования связавшихся клеток с использованием иммерсионных объективов без их загрязнения и без повреждения поверхности биочипа.

#### *Изготовление биочипов.*

Для изготовления биочипов были использованы подложки из поливинилхлорида. Использовались мышинные моноклональные антитела (IgG), специфичные к следующим поверхностным антигенам лейкоцитов человека: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD27, CD29, CD31, CD36, CD38, CD41, CD44, CD45, CD45RA, CD56, CD71, CD72, CD95, CD98, HLA-DR, human IgM (ООО «Сорбент», Россия).

Капли растворов антител объемом 0,25 мкл наносили на подложки в заранее отмеченные участки. Далее подложки помещали в камеру со 100% влажностью и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего высушивали на воздухе и замораживали при  $-26^{\circ}\text{C}$  в герметичных контейнерах с осушителем. При таком хранении биочипы не теряли своих свойств, по меньшей мере, в течение 12 месяцев.

Устройство биочипа показано на рис. 1

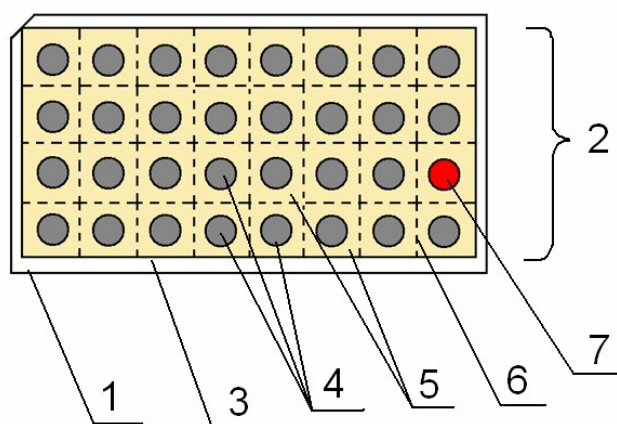


Рис. 1 Устройство биочипа.

Примечание. 1) подложка; 2) рабочая (функциональная) область биочипа; 3) край подложки; 4) тестовые участки (пятна) с иммобилизованными антителами; 5) фоновые участки подложки не содержащие иммобилизованных антител; 6) линии разметки; 7) контрольный участок.

### **Получение клеточной суспензии.**

Лейкоциты были выделены из периферической крови путем центрифугирования в градиенте плотности. Полученные клетки ресуспензировали в растворе, содержащем 0,1% сухого молока и 1,5мМ ЭДТА в PBS. Содержание клеток в суспензии определялось с помощью камеры Горяева.

### ***Подготовка биочипа к проведению анализа.***

После разморозки биочип закрепляли в кювете, ополаскивали 1% раствором BSA в буфере PBS, затем проводили трехкратную отмывку 0,05% раствором детергента Tween-20 на шейкере. После этого биочип инкубировали с 1% раствором BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 часа при перемешивании на шейкере. Затем вновь проводили трехкратную отмывку 0,05% раствором детергента Tween-20 и ополаскивали биочип буфером для удаления следов детергента.

### ***Инкубация биочипа с клеточной суспензией и его отмывка.***

В кювету с биочипом вносили клеточную суспензию и инкубировали в течение 60 минут без какого-либо перемешивания. Концентрация клеток и объем суспензии подбирались таким образом, чтобы при оседании клеток происходило полное заполнение ими поверхности биочипа. После завершения инкубации для устранения клеток, не связавшихся в участках с иммобилизованными антителами, биочипы несколько раз ополаскивали PBS. Качество отмывки оценивали при помощи стереомикроскопа МБС-1.

Отмывка считалась выполненной качественно, если клетки отсутствовали в участках подложки, не содержащих иммобилизованных антител.

***Фиксация и окрашивание связанных с биочипом клеток.***

Сразу же после завершения отмывки со стенок кюветы осторожно удаляли капли жидкости, не касаясь поверхности биочипа. При этом высушивания биочипа не допускалось. Для этого время выполнения данной манипуляции не должно было превышать 1 минуты, если работы проводились в помещении с обычной влажностью воздуха. В иных случаях данные манипуляции могли выполняться в отдельном помещении с повышенной влажностью воздуха.

После этого кювету с биочипом сразу же заполняли метанолом или этанол-формалиновым раствором (9 объемных частей 95% этанола, 1 объемная часть 40% формалина). Фиксацию клеток осуществляли в течение 12 минут. Затем фиксирующую жидкость сливали и высушивали биочип на воздухе под вытяжкой.

Затем осуществляли окрашивание клеток раствором азура и эозина (по Романовскому-Гимзе). Оптимальное время окрашивания подбиралось опытным путем при использовании каждой новой партии красителя. Для того, чтобы избежать «перекрашивания» клеток при незначительном превышении оптимального времени окрашивания желательно использовать более разбавленный окрашивающий раствор. Но при этом время, необходимое для окрашивания клеток увеличивается. Например, в данной работе мы использовали для окрашивания клеток рабочий раствор, содержащий 10 объемных частей раствора эозина, 13 объемных частей раствора азура и 25 частей воды. Обработку биочипа осуществляли в течение 35 минут.

После окрашивания биочип промывали проточной водой, ополаскивали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Все манипуляции указанные выше манипуляции выполнялись в кювете. После этого снимали дно кюветы и пинцетом осторожно отделяли от него биочип.

***Приготовление из биочипа долговременного препарата для микроскопического исследования.***

Биочип заключали в канадский бальзам или жидкость для приготовления гистологических препаратов между тщательно обезжиренными предметным и покровным стеклами. При этом рабочая поверхность биочипа должна быть обращена в сторону покровного стекла. Препарат помещали под пресс до затвердевания композиции.

***Считывание и обработка результата.***

Каждое пятно биочипа фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата через микроскоп на малом увеличении (рис. 2) .



**Рис. 2** Пятно биочипа со связанными клетками. Увеличение в 40 раз.

Для оценки плотности связывания клеток на поверхности пятен биочипа на микрофотографии каждого пятна выбирали участки, соответствующие участку подложки размерами 100 x 100 мкм. Определяли количество связанных клеток не менее чем в 3-4 таких областях: в центре каждого пятна, на краю пятна и между ними. Полученные значения усредняли.

Для удобства использования полученных результатов, значения плотности заполнения поверхности пятен связавшимися клетками выражали в процентах. За 100% принималась средняя плотность связывания клеток в области пятен с антителами анти-CD45. Исходя из этого, осуществлялся пересчет в проценты плотности связывания клеток в области других пятен. Ранее было показано [11-14], что при проведении инкубации биочипа с клеточной суспензией без перемешивания, получаемые значения плотности связывания клеток в области тестовых участков биочип оказываются пропорциональны фактическому содержанию в образце клеток, имеющих соответствующие антигены.

Морфологическое исследование связавшихся клеток осуществляли при проведении микроскопического исследования каждого пятна на большом увеличении.

### **Результаты и обсуждение.**

Окрашивание и морфологическое исследование клеток, связавшихся с иммунологическим биочипом, ранее уже было описано [11-14]. Это стало возможным благодаря использованию подложек из пластифицированного поливинилхлорида, обладающего достаточной механической и химической стойкостью, прозрачностью, оптической однородностью и слабо прокрашиваемому большинством цитологических красителей. Необходимо отметить, что выбор данного материала оказался очень удачным и с точки зрения его доступности, очень низкой стоимости и отсутствия необходимости проведения дополнительной обработки перед изготовлением биочипов описанным выше способом.

Но в процессе работы пришлось столкнуться с тем, что использование стандартных протоколов окрашивания мазков [11,13,14] применительно к связанным с биочипам клеткам не давало удовлетворительных результатов. После проведения фиксации и окрашивания значительная часть клеток была деформирована или полностью разрушена, часто отмечалась деформация и фрагментация их ядер, изменение структуры хроматина. Во многих случаях это существенно затрудняло проведение морфологического исследования (рис. 3).

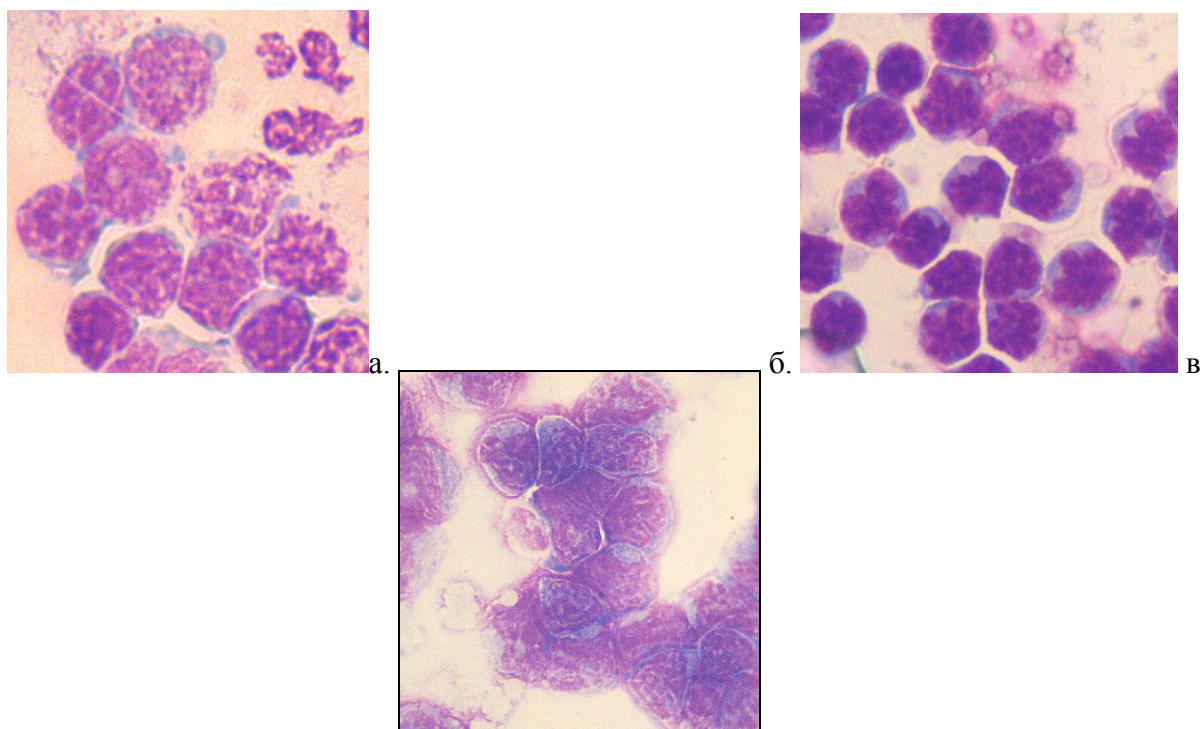


**Рис. 3.** Микрофотография лимфоцитов больного В-ХЛЛ, связавшихся в различных участках пятна с иммобилизованными антителами анти-CD19. Окраска по Романовскому-Гимзе, увеличение в 1350 и в 1000 раз. Перед проведением фиксации метанолом биочип был высушен на воздухе. При этом во многих случаях не удавалось добиться сохранения морфологических характеристик исследуемых клеток. Клетки деформированы (а,б), ядра подвержены фрагментированию (б,в), структура хроматина изменена (а,б), часть клеток разрушена (а, б, в).

Для решения данной задачи потребовалось изучить некоторые процессы, происходящие в процессе проведения анализа. Было установлено, что гидрофильность поверхности биочипа не однородна. При этом участки поверхности подложки, в которых были иммобилизованы антитела (пятна биочипа), более гидрофильны чем фоновые участки. Об этом свидетельствовало образование капель в данных областях после

извлечения биочипа из промывочного раствора на подготовительном этапе, а также после выполнения отмывки биочипа от не связавшихся клеток.

Отмывка биочипа от не связавшихся клеток осуществлялась изотоническим буферным раствором. Если после отмывки биочипа (перед проведением фиксации) биочип высыхивался, то происходили следующие процессы. Вода испарялась из образовавшихся капель, что приводило к повышению концентрации солей и значительному возрастанию осмотического давления. Это вызывало «сморщивание» клеток. Вероятно, имели место апоптотические процессы, о чем свидетельствует фрагментация ядер и изменение структуры хроматина клеток. При полном высыхании капель происходила кристаллизация солей, что также приводило к повреждению клеток.

Для устранения данной проблемы необходимо было не допустить высыхания образовавшихся капель буферного раствора, а также вызвать мгновенную гибель клеток, не допуская развития в них изменений, обусловленных апоптозом.

Решение оказалось простым и заключалось в том, что время между моментом завершения отмывки и началом проведения фиксации было максимально сокращено, либо в это время биочип находился при повышенной влажности воздуха, для того чтобы максимально уменьшить испарение воды. Избыток жидкости со стенок инкубационно-отмывочной кюветы убирался с помощью пипетки или полоски фильтровальной бумаги, после чего кювета с биочипом сразу же заполнялась фиксирующей жидкостью. Объем капель жидкости был мал. Поэтому сколько-нибудь существенного разбавления фиксирующей жидкости не происходило. Для фиксации связанных с биочипом клеток применялся метанол или смесь (9:1) 95% этанола и 40% раствора формалина. После завершения фиксации фиксирующая жидкость сливалась из кюветы, биочип высыхивался на воздухе и обрабатывался окрашивающим раствором.

Изменение методики позволило значительно улучшить качество окрашивания клеток и добиться сохранения их привычных морфологических характеристик (рис. 4). При этом сохранялись даже такие морфологические особенности, как например, «ворсинчатость» мембраны у клеток волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ) (рис. 4-а).

Приготовление из биочипа долговременного препарата позволило защитить его поверхность от повреждения при проведении микроскопического исследования с использованием иммерсионных объективов. При этом не происходило отделения клеток, не загрязнялись объективы, препарат не портился от попадания пыли и при случайном прикосновении к его поверхности. Таким образом, были устранены все основные препятствия для широкого использования данного метода.

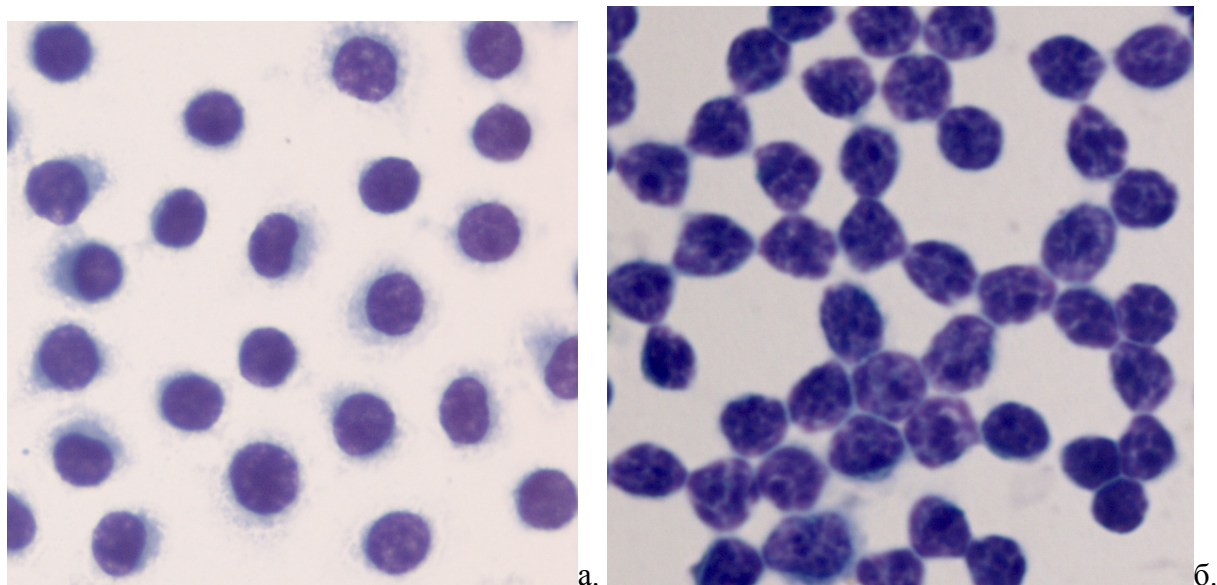


**Рис. 4.** а) Клетки больного В. 75 лет, страдающего ВКЛ, связавшиеся на биочипе в области тестового участка с иммобилизованными антителами специфичными к антигену CD20. б) Клетки больного И. 75 лет, страдающего В-ХЛЛ, связавшиеся на биочипе в области тестового участка с иммобилизованными антителами специфичными к антигену CD19. Фиксация метанолом, окраска по Романовскому-Гимзе, увеличение в 1350 раз

Проведение морфологического исследования дает возможность четко различать между собой субпопуляции клеток (рис. 5) связанных в пятнах биочипа.

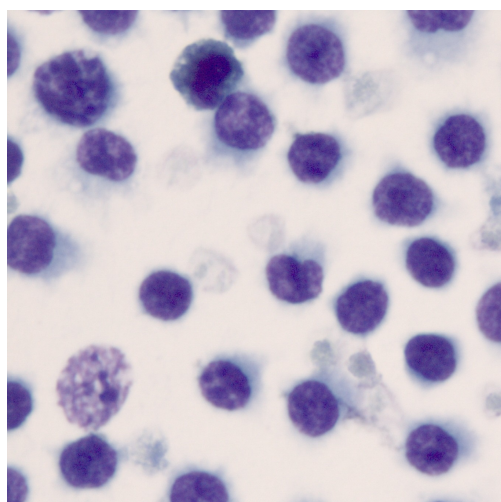


**Рис. 5.** Клетки больного ВКЛ, связавшиеся с биочипом в области пятна с антителами анти-CD45. Хорошо определяются различные типы клеток: клетки ВКЛ, лимфоциты, моноциты и базофильный гранулоцит. Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение в 1000 раз.

Окрашивание ни как не препятствовало определению плотности связывания клеток в тестовых участках биочипа (рис. 6). Примеры результатов оценки процентного содержания клеток, экспрессирующих определяемые антигены, представлены в таблицах 1 и 2. При этом приводятся результаты, полученные при исследовании образцов крови тех больных, чьи клетки были показаны на рис. 4-5.

**Таблица 1. Результат исследования с использованием биочипа клеток больного И. 75 лет, страдающего В-ХЛЛ.**

| Определяемый антиген | Содержание клеток (%) |
|----------------------|-----------------------|
| CD2                  | 2                     |
| CD3                  | 3                     |
| CD4                  | 2                     |
| CD5                  | 96                    |
| CD7                  | 2                     |
| CD8                  | 2                     |
| CD9                  | 31                    |
| CD10                 | 0                     |
| CD11a                | 7                     |
| CD11b                | 3                     |
| CD16                 | 3                     |
| CD19                 | 81                    |
| CD20                 | 83                    |
| CD21                 | 80                    |
| CD22                 | 77                    |
| CD23                 | 90                    |
| CD27                 | 34                    |
| CD29                 | 30                    |
| CD31                 | 88                    |
| CD36                 | 5                     |
| CD38                 | 8                     |
| CD41                 | 1                     |
| CD44                 | 89                    |
| CD45                 | 100                   |
| CD45RA               | 90                    |
| CD56                 | 3                     |
| CD71                 | 1                     |
| CD72                 | 38                    |
| CD95                 | 1                     |
| CD98                 | 92                    |
| HLA-DR               | 93                    |
| IgM                  | 0                     |

**Таблица 2. Результат исследования с использованием биочипа клеток больного В. 75 лет, страдающего ВКЛ.**

| Определяемый антиген | Содержание клеток (%) |
|----------------------|-----------------------|
| CD2                  | 11                    |
| CD3                  | 7                     |
| CD4                  | 3                     |
| CD5                  | 12                    |
| CD7                  | 7,5                   |
| CD8                  | 1                     |
| CD9                  | 82                    |
| CD10                 | 2                     |
| CD11a                | 64                    |
| CD11b                | 90                    |
| CD16                 | 3                     |
| CD19                 | 90                    |
| CD20                 | 90                    |
| CD21                 | 97                    |
| CD22                 | 95                    |
| CD23                 | 3                     |
| CD27                 | 12                    |
| CD29                 | 98                    |
| CD31                 | 99                    |
| CD36                 | 61                    |
| CD38                 | 89                    |
| CD41                 | 0                     |
| CD44                 | 92                    |
| CD45                 | 100                   |
| CD45RA               | 85                    |
| CD56                 | 3                     |
| CD71                 | 4                     |
| CD72                 | 6                     |
| CD95                 | 3                     |
| CD98                 | 4                     |
| HLA-DR               | 36                    |
| IgM                  | 6                     |

Проблема защиты поверхности биочипа от механических повреждений и проблема загрязнения оптики при проведении морфологического исследования с использованием масляных объективов была решена за счет приготовления из биочипа долговременного препарата. При этом были использованы широко применяемые в гистологии и цитологии композиции, содержащие толуол или ксилол, поскольку выбранный материал подложки не растворялся в них. Стало возможным длительное время

сохранять биочипы после проведения анализа, выполнять повторное микроскопическое исследование на большом увеличении и создавать архивы препаратов.

Таким образом, проведение дополнительного морфологического исследования клеток при условии использования усовершенствованной методики фиксации связанных клеток и приготовления долговременного препарата «доказало свое право на жизнь» и может быть с успехом использовано на практике при широком внедрении анализа с использованием биочипов.

### **Литература.**

1. Chang T.W. Binding of cells of distinct antibodies coated on solid surface// J. Of immunological methods. - 1983. - Vol. 65. - P. 217-223.
2. Belov L, de la Vega O, dos Remedios C.G., Mulligan S.P., Christopherson R.I. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray//Cancer research. - 2001. - Vol. 61. - P. 4483-4489.
3. Belov L., Huang P., Barber N. et al Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray //Proteomics.-2003.-Vol.3.-P.2147-2154.
4. Belov L., Huang P., Chrisp J.S. et al. Screening microarrays of novel monoclonal antibodies for binding to T-, B- and myeloid leukaemia cells B// Journal of Immunological Methods.-2005.-Vol.305-P.10-19.
5. White S.L., Belov L., Barber N. et al. Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate//Leukemia Research.- 2005.-Vol.29.- P.1141-1151.
6. Campbell C.J., O'Looney N., Chong Kwan M. et al. A cell interaction microarray for blood phenotyping// Anal.Chem.- 2006.-Vol.78.- P.1930-1938.
7. Ellmark P., Belov L., Huang P. et al. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers// Proteomics.- 2006.-Vol.6.-P.1791-1802.
8. Woolfson A., Stebbing J., Tom B. et al. Conservation of unique cell-surface CD antigen mosaics in HIV-1-infected individuals// Blood.- 2005.-Vol.106. 3.- P.1003-1007.
9. Ko I.K., Kato K. & Iwata H. Antibody microarray for correlating cell phenotype with surface marker //Biomaterials.- 2005.- Vol.26.- P.687-696.
10. Liu A.Y. Differential Expression of Cell Surface Molecules in Prostate Cancer Cells// Cancer Research.-2000.-Vol.60.-P.3429-3434.
11. Шишкин А.В., Шмырев И.И., Кузнецова С.А. и др. Иммунологические биочипы для параллельного определения поверхностных антигенов и морфологического исследования клеток// Биологические мембраны.- 2008.- №4.-С.277-284.

12. Шишкин А.В., Шмырев И.И., Кузнецова С.А. и др. Иммунологические биочипы для исследования эритроцитов человека. «Биологические мембраны».- 2008.- №4-С.267-276.
13. А.В. Шишкин Иммунологический биочип для определения иммунофенотипа клеток и их морфологического исследования// Морфологические ведомости. - 2008.- №1-2.- С. 135-137.
14. Шишкин А.В. Иммунологические биочипы для исследования клеток. Собственный опыт разработки. Некоторые новые подходы к проведению анализа// LAP Lambert Academic Publishing & Co. KG, 2010. – 158 с.