

А.В. Шишкин¹, Н.Г. Овчинина¹, С.С. Бессмельцев², А.В. Козлов³

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЧИПОВ ДЛЯ ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

¹ ГБОУ ВПО Ижевская государственная медицинская академия,

² Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург,

³ ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Иммунологические биочипы (иммунобиочипы) на основе антител — тест-системы, позволяющие одновременно определять в исследуемом материале наличие различных антигенов. Биочип данного класса обычно представляет собой пластину (подложку), на которой в строго определенных участках иммобилизованы молекулы антител с известной специфичностью. Преимуществом использования биочипов является возможность определения большого числа антигенов при очень низком расходе антител. Биочипы могут применяться для решения многих задач, в том числе, для иммунофенотипирования опухолевых клеток. Приводятся результаты апробации биочипов, изготовленных в лабораторных условиях, для определения поверхностных антигенов клеток у больных хроническим лимфолейкозом. Показано хорошее соответствие результатов иммунофенотипирования клеток больных хроническим лимфолейкозом с применением биочипов с данными проточной цитофлуориметрии.

Ключевые слова: иммунологические биочипы, поверхностные антигены клеток, иммунофенотипирование, хронический лимфолейкоз.

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) является одной из наиболее распространенных лимфопролиферативных опухолей. Иммунохимическая верификация диагноза ХЛЛ основывается на установлении типичного иммунофенотипа неоплазированных лимфоцитов (CD19+, CD5+, CD23+, CD20+/-, CD22-/+ , CD10-, низкий уровень экспрессии поверхностных молекул иммуноглобулинов (sIg), клональность по легким цепям иммуноглобулинов) [1]. Тем не менее, опухолевые клетки могут экспрессировать на своей поверхности и другие молекулы из большого числа известных CD-антигенов, которые также могут иметь диагностическое значение. В связи с этим представляется перспективным применение технологий, позволяющих

расширить спектр одновременно определяемых антигенов.

В настоящее время иммунофенотипирование клеток осуществляют с использованием иммунофлуоресцентных, иммуноцитохимических (иммуоферментных) методов, а также метода проточной цитофлуориметрии. Все они являются дорогостоящими, требуют высокого расхода антител и позволяют одновременно определять лишь небольшое число антигенов.

Этих недостатков лишен метод анализа, основанный на использовании биочипов, позволяющих одновременно определять десятки поверхностных антигенов (на разных клетках) при крайне низком расходе антител [2–7]. Тест-система данного класса представляет собой подложку, на которой в строго определенных тестовых участках («пятнах») иммобилизованы молекулы антител, специфичных к поверхностным антигенам клеток. В процессе проведения анализа биочип инкубируют с суспензией исследуемых клеток, которые оседают на поверхности биочипа. Клетки, несущие на себе определяемые антигены, связываются со специфичными к ним антителами, иммобилизованными в тестовых участках. Несвязавшиеся с антителами клетки удаляют при последующей отмывке биочипа. При определенных условиях проведения анализа плотность связывания клеток в области тестовых участков оказывается пропорциональной концентрации клеток, имеющих данные антигены.

Цель работы заключается в том, чтобы продемонстрировать практическую применимость и перспективность использования биочипов в диагностике ХЛЛ.

Материалы и методы

В исследование было включено 75 пациентов, страдающих ХЛЛ [в стадии А — 32 пациента (42,7%), в стадии В — 30 (40,0%), в стадии С — 13 (17,3%) (классификация Binet, 1977)]. Возраст обследованных пациентов колебался в пределах 44–86 лет (в среднем — 67,3±1,2 гг.), среди больных было 36 мужчин и 39 женщин. Диагноз был установлен в соответствии с клиническими и лабораторными

критериями [1], в том числе подтверждался характерным иммунофенотипом клеток (CD19+, CD5+, CD23+, CD10–) по данным проточной цитофлуориметрии.

У всех 75 больных было проведено иммунофенотипирование лимфоцитов с помощью оригинальных иммунобиочипов. Параллельно в те же сроки у 21 пациента было выполнено иммунофенотипирование клеток с помощью проточной цитофлуориметрии (проточный цитофлуориметр — FACS Canto II, Becton Dickinson, США), при этом (в несколько этапов) анализировалось от 8 до 13 антигенов в клетках каждого пациента.

Контрольная группа была представлена 15 практически здоровыми донорами, среди которых было 8 мужчин и 7 женщин. Определение поверхностных антигенов у клеток данной группы людей проводилось только с использованием биочипов.

Панель биочипов включала мышиные 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, sIgM. Использовались подложки из прозрачного химически стойкого пластика. Биочипы были изготовлены путем нанесения капель растворов антител объемом 0,25 мкл в строго определенные участки подложек и последующей инкубации при 100% влажности в течение 1 часа при комнатной температуре. При этом происходила иммобилизация молекул антител на поверхности подложки за счет адсорбции. Затем биочипы были высушены, помещены в герметичные емкости и заморожены при –26°C. В таком виде они могли храниться в течение нескольких месяцев.

Непосредственно перед исследованием биочип размораживали, закрепляли в кювете, ополаскивали раствором (10 г/л) бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатном буфере (PBS) и проводили трехкратную отмывку 0,05% раствором детергента Tween-20 в PBS при перемешивании. Далее биочип инкубировали с раствором BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 часа при перемешивании и вновь проводили трехкратную отмывку раствором детергента и ополаскивание буферным раствором.

В кювету с биочипом вносили суспензию мононуклеаров, выделенных из периферической крови на градиенте плотности (фиколл-урографин; плотность 1077 г/мл) и ресуспендированных в растворе, содержащем 0,1% сухого молока, 15–20% (по объему) инактивированной нагреванием человеческой сыворотки и 1,5 ммоль/л этилендиаминотетраацетата натрия (ЭДТА) в PBS. Выполняли инкубацию в течение 60–90 минут без перемешивания. Для удаления не связавшихся клеток биочип несколько раз ополаскивали PBS. Качество отмывки контролировали с помощью микроскопа. Отмывка считалась выполненной качественно, если клетки отсутствовали в фоновых участках.

Сразу же после завершения отмывки биочип со связанными клетками фиксировали метанолом в течение 12 минут, высушивали на воздухе и окрашивали по Романовскому-Гимзе, размещали на предметном стекле и готовили из него микропрепарат.

Каждый тестовый участок фотографировали при малом ($\times 80$, рис. 1-а) и большом ($\times 1000$, рис. 1-б) увеличении микроскопа. При изучении микрофотографий, сделанных на большом увеличении, оценивали морфологию клеток. Микрофотографии, сделанные на малом увеличении, использовались для определения плотности связывания клеток — отношения количества клеток к площади поверхности, на которой они связались. Плотность связывания клеток в области пятен с антителами, специфичными к антигену CD45, принимали за 100%. Исходя из этого,

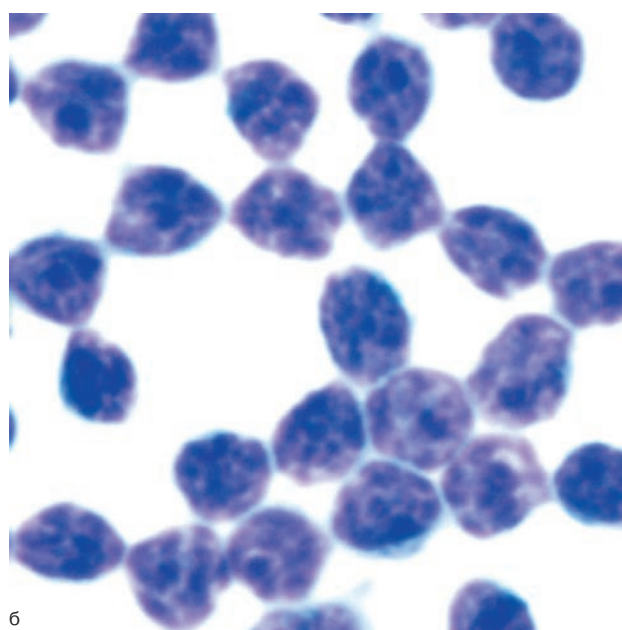
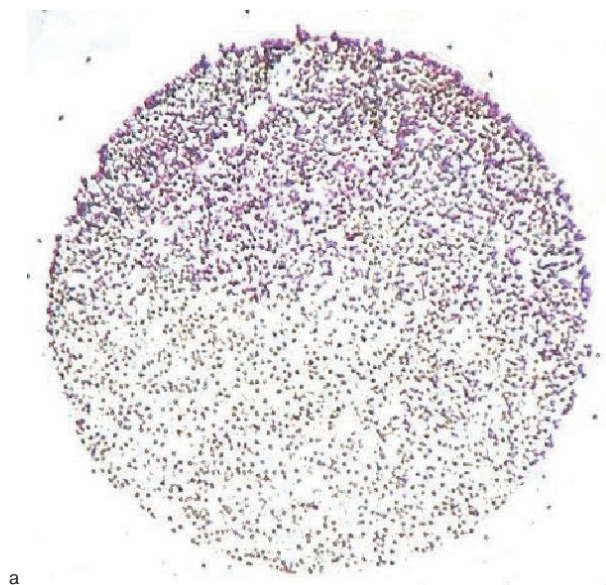


Рис. 1. Микрофотографии клеток, связавшихся с биочипом.

а) Тестовый участок («пятно») со связавшимися клетками. Увеличение $\times 80$.

б) Лимфоциты больного ХЛЛ, связавшиеся в области тестового участка с антителами, специфичными к антигену CD19. Увеличение $\times 1000$. Окраска по Романовскому-Гимзе.

выражали в процентах плотность связывания клеток в других пятнах биочипа. Ранее было показано, что получаемые значения относительной плотности связывания клеток численно соответствуют фактическому процентному содержанию в образце клеток, имеющих соответствующие антигены [2, 3].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью компьютерной программы Biostat-2008.

Результаты и обсуждение

С помощью биочипов были, как отмечалось выше, изучены лимфоциты 15 практически здоровых людей, а также 75 пациентов, стра-

дающих ХЛЛ. Параллельно с определением поверхностных антигенов проводили окрашивание и морфологическое исследование тех же клеток. Субстрат опухоли был представлен морфологически зрелыми малыми лимфоцитами (см. рис. 1-б.), которые экспрессировали антигены CD5, CD19, CD23.

При оценке среднего содержания субпопуляций клеток получены значения, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Содержание лимфоцитов (%), экспрессирующих определяемые поверхностные антигены, у больных ХЛЛ и здоровых людей.

Определяемые антигены	Больные ХЛЛ (n=75)	Контрольная группа (n=15)	Достоверность различий
CD2	14,4±1,3	79,7±1,9	p < 0,001
CD3	15,5±1,4	68,2±1,7	p < 0,001
CD4	8,4±0,8	44,7±2,3	p < 0,001
CD5	85,6±1,7	71,7±2,8	p < 0,001
CD7	10,5±1,1	74,1±2,5	p < 0,001
CD8	7,6±0,8	26,9±1,3	p < 0,001
CD9	46,7± 4,0	11,1±1,3	p < 0,001
CD10	1,0±0,2	6,1±1,5	p < 0,001
CD11a	41,3±3,7	94,0±1,6	p < 0,001
CD11b	23,9±2,5	27,2±2,4	p > 0,05
CD16	4,8±0,4	12,0±1,0	p < 0,001
CD19	80,6±1,3	11,1±1,5	p < 0,001
CD20	76,5±1,9	12,1±1,9	p < 0,001
CD21	65,7±2,9	11,3±1,5	p < 0,001
CD22	53,2±3,4	11,7±1,7	p < 0,001
CD23	68,7±2,2	2,2±0,4	p < 0,001
CD27	60,2±3,9	56,2±1,8	p > 0,05
CD29	83,2±2,2	59,3±3,0	p < 0,001
CD31	77,6±2,5	23,2±3,8	p < 0,001
CD36	16,2±2,6	7,7±1,9	p > 0,05
CD38	35,1±3,6	33,7±3,5	p > 0,05
CD44	98,4±0,5	99,3±0,3	p > 0,05
CD45RA	84,4±1,5	71,7±2,8	p < 0,001
CD56	2,3±0,5	9,8±1,0	p < 0,001
CD71	12,2±2,9	3,4±0,4	p > 0,05
CD72	50,3±4,0	9,2±1,7	p < 0,001
CD95	28,3±3,5	39,0±5,8	p > 0,05
CD98	67,7±3,8	39,0±6,6	p < 0,05
HLA-DR	78,0±2,1	21,3±1,9	p < 0,001
IgM	1,3±0,4	3,0±1,2	p > 0,05

У здоровых людей и больных ХЛЛ содержание в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD29, CD31, CD45RA, CD72, CD98, HLA-DR, достоверно различалось (табл. 1). Соответственно, анализ

с применением биочипов позволяет с уверенностью выявлять различия в содержании клеток, экспрессирующих различные антигены.

Одновременно у 21 больного нами было проведено сопоставление результатов, полученных с использованием биочипов, с данными определения некоторых антигенов методом проточной цитофлуориметрии. При иммунофенотипировании методом проточной цитофлуориметрии проводилось одновременное определение только 3–4 антигенов. Поэтому анализ выполнялся в несколько этапов. При использовании биочипов определялось значительно большее число антигенов, что позволяло проводить анализ в один этап. Примеры исследования клеток двух больных приводятся на рис. 2.

Исследование корреляционной зависимости результатов, полученных с помощью обоих методов у каждого пациента, выявило достоверную (p<0,01) позитивную сильную взаимосвязь (табл. 2). Различия между результатами, полученными с помощью биочипов и проточной цитофлуориметрии, были недостоверными (p>0,05).

Таким образом, результаты определения иммунофенотипа опухолевых лимфоцитов у боль-

Таблица 2

Сравнение результатов иммунофенотипирования клеток больных ХЛЛ с помощью биочипов и проточной цитофлуориметрии

№	Коэффициент Спирмена (R)	Уровень значимости (p)	Количество антигенов, по которым проводилось сравнение
1	0,9476	0,000009	12
2	0,8949	0,001114	10
3	0,9481	0,000029	11
4	0,9063	0,000119	12
5	0,8928	0,006807	8
6	0,8810	0,000755	11
7	0,9192	0,000455	10
8	0,9439	0,000129	10
9	0,9612	0,000002	12
10	0,9388	0,000057	11
11	0,9581	0,000178	9
12	0,8986	0,000169	12
13	0,9403	0,000005	13
14	0,9908	0,000000	12
15	0,8632	0,001293	11
16	0,7397	0,009261	12
17	0,9562	0,000001	13
18	0,9579	0,000001	13
19	0,8532	0,000837	12
20	0,8468	0,016197	8
21	0,9700	0,000065	9

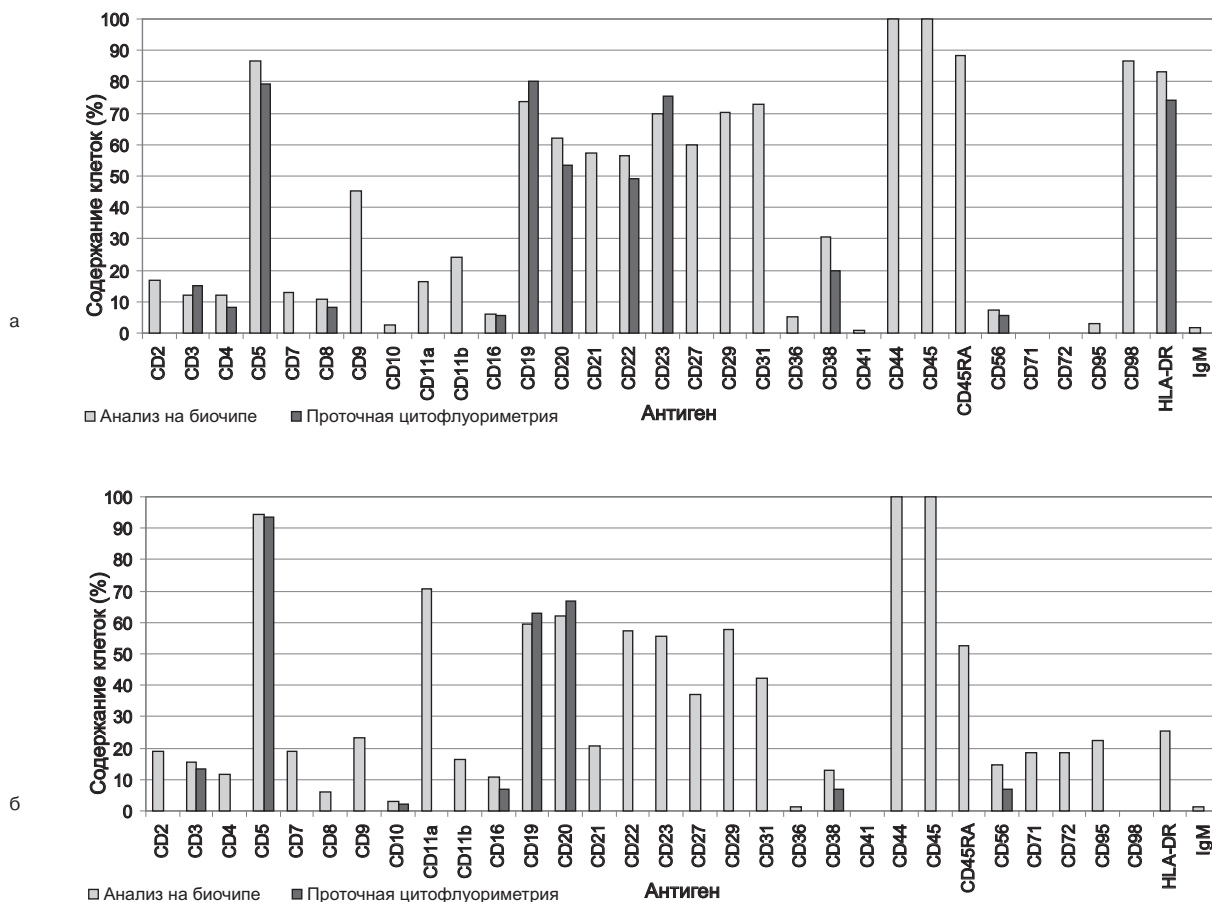


Рис. 2. Примеры исследования клеток больных ХЛЛ с использованием биочипов и методом проточной цитофлуориметрии. а) больная К., 78 лет; б) больной Г., 58 лет

ных ХЛЛ, полученные с помощью обоих методов хорошо совпадали друг с другом. Как известно, метод проточной цитофлуориметрии в настоящее время высоко стандартизирован и широко используется в различных областях медицины, в частности, в онкогематологии, при диагностике ХЛЛ и других опухолей лимфо-пролиферативных тканей. Тем не менее, по нашему мнению, использование биочипов может служить важным дополнением при проведении иммунофенотипирования, поскольку за счет возможности одновременного определения большего набора антигенов метод позволяет выявить индивидуальные особенности иммунофенотипа опухолевых клеток у каждого больного.

Другим достоинством использования биочипов является возможность визуализации клеток, экспрессирующих определяемые антигены. В данном случае это подтвердило, что связавшиеся с биочипом опухолевые клетки принадлежат к лимфоидному ряду (см. рис. 1-б) и позволило отличить их от других типов клеток, которые присутствовали в исследуемом материале. Кроме того, подобные исследования могут выполняться даже с использованием наиболее доступного общелабораторного оборудования.

После проведения официальных испытаний и внедрения в широкую практику, тест-системы данного класса можно будет использовать в тех лабораториях, которые не располагают дорогостоящими проточными цитофлуориметрами. Методика проведения анализа с помощью биочипов достаточно проста. Себестоимость анализа при использовании описанного варианта методики в несколько раз ниже по сравнению с проточной цитофлуориметрией.

Достоинством метода проточной цитофлуориметрии является возможность определения ко-экспрессии нескольких антигенов на каждой отдельно взятой клетке. При анализе с помощью биочипов множество антигенов одновременно определяется на разных клетках, но на каждой отдельно взятой клетке по факту ее связывания в том или ином тестовом участке может быть определен только один антиген. Тем не менее, ко-экспрессия антигенов на связанных с биочипом клетках может быть установлена различными способами, например путем их дополнительной обработки флуоресцентно-мечеными антителами [2, 3, 4, 7] или антителами, конъюгированными с молекулами ферментов или другими метками.

ЛИТЕРАТУРА

1. 1. Атлас. Опухоли лимфатической системы. Под ред. А.И. Воробьева и А.М. Кременецкой. — М.: НЫУДИАМЕД, 2007. — С. 294.
2. 2. Шишкин А.В., Шмырев, И.И., Кузнецова С.А. и др. Иммунологические биочипы для параллельного определения поверхностных антигенов и морфологического исследования клеток // Биол. мембраны. — 2008. — № 4. — С. 277–284.
3. 3. Шишкин А.В. Иммунологические биочипы для исследования клеток. Собственный опыт разработки. Некоторые новые подходы к проведению анализа-Saarbrücken, Lambert Academic Publishing & Co. KG. — 2010. — С.158.
4. 4. Belov L, de la Vega O, dos Remedios C.G. et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray // Cancer Res. — 2001. — Vol. 61. — P. 4483–4489.
5. 5. 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.
6. 6. Chang T.W. Binding of cells of distinct antibodies coated on solid surface // J. Immunol. Methods. — 1983. — Vol. 65. — P. 217–223.
7. 7. Ellmark P., Belov L., Huang P. et al. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers // Proteomics. — 2006. — Vol. 6. — P. 1791–1802.

*A.V. Shishkin¹, N.G. Ovchinina¹,
S.S. Bessmeltsev², A.V. Kozlov³*

**THE USE OF BIOCHIPS
FOR IMMUNOMORPHOLOGICAL DIAGNOSIS
OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA**

¹ State Medical Academy, Izhevsk

² Research Institute of Hematology
and Blood Transfusion, St. Petersburg

³ I.I. Mechnikov North-West State Medical
University, St. Petersburg

Immunological biochips (immunobiochips) based on antibodies — test-systems, allowing simultaneously to determine an existence of different antigens in the material. Biochip of this class is usually a plate (substrate), on which antibody molecules with known specificity are immobilized within well-defined areas. The advantage of the use of biochips is the ability to define a large number of antigens at very low flow rates of antibodies. Biochips can be used for many tasks, including immunophenotyping for tumor cells. There are presented the results of testing of biochips made in laboratory conditions to determine surface antigens of cells in patients with chronic lymphocytic leukemia. It is showed a good agreement between the results of immunophenotyping of cells in chronic lymphocytic leukemia patients with the use of biochips with data of flow cytometry.

Поступила в редакцию 20.12.2012