

УДК 57.083.3

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ БИОЧИПЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2008 г. А. В. Шишкин<sup>1, 2\*</sup>, И. И. Шмырев<sup>1</sup>, С. А. Кузнецова<sup>1</sup>, Н. Г. Овчинина<sup>1, 2</sup>, А. А. Бутылин<sup>1, 3</sup>, Ф. И. Атауллаханов<sup>1, 3, 4</sup>, А. И. Воробьев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ Гематологический научный центр РАМН, 125167 Москва, Новозыковский проезд, 4а; факс (495) 612-4252; электронная почта: shishkin\_lab@mail.ru

<sup>2</sup> Ижевская государственная медицинская академия, 426034 Ижевск, ул. Коммунаров, 281; факс: 8-(3412) 65-81-67

<sup>3</sup> Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва ГСП-1, Ленинские горы; факс: (495) 939-01-26

<sup>4</sup> Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 117977 Москва ГСП-1, ул. Косыгина, 4  
Поступила в редакцию 06.04.2008 г.

Описаны иммунологические биочипы для определения поверхностных антигенов эритроцитов, относящихся к системам АВ0 и Rh (D, E, e, C, c). Биочипы представляют собой прозрачные пластиковые подложки, на которые нанесены пятна (диаметром 1.5 мм) иммобилизованных антител IgM, специфичных к соответствующим антигенам. Для проведения анализа с помощью этих биочипов достаточно 1–2 мкл крови. Показано избирательное связывание эритроцитов с иммобилизованными на биочипе антителами, и продемонстрирована возможность морфологического исследования связавшихся клеток. С помощью проточной камеры исследована зависимость отрыва связанных с антителами эритроцитов от сдвиговой скорости потока при отмывке биочипа. Показано, что в сочетании с проточной камерой биочип может быть использован для концентрирования клеток, имеющих те или иные антигены, из смешанной суспензии, даже если их содержание в смеси невелико.

Белковые микроматрицы (биочипы) все более широко используются как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. Их основным достоинством является возможность одновременного проведения множества однотипных реакций, причем для этого достаточно небольшого объема исследуемого материала [1].

Белковый биочип представляет собой твердую поверхность (подложку) с иммобилизованными на ней в строго определенных участках белками, которые способны специфически связывать молекулы, присутствующие в образце [2].

В качестве подложек для белковых биочипов чаще всего используют нитроцеллюлозу и химически модифицированное стекло [1, 3, 4], реже золото [5, 6], полистирол [7] или тефлон [8].

Один из наиболее распространенных видов белковых микроматриц – биочипы с иммобилизованными антителами. Такие биочипы могут быть использованы для одновременного обнаружения большого числа антигенов [9].

Чанг [10] впервые продемонстрировал связывание клеток на биочипе с иммобилизованными антителами, специфичными к поверхностным антигенам. В последние годы подобные биочипы созданы несколькими группами исследователей [5, 11–18].

Большинство этих работ посвящено созданию биочипов, предназначенных для определения поверхностных антигенов лейкоцитов [11–17]. Однако в некоторых работах с помощью биочипов изучена возможность иммунофенотипирования эритроцитов. Квин и соавт. [19] впервые показали связывание эритроцитов на биочипе с антителами, специфичными к их поверхностным антигенам. Созданы биочипы для определения поверхностных антигенов, относящихся к системам АВ0 [18] и Rh [5, 18].

Большинство методов определения поверхностных антигенов эритроцитов основано на их способности к агглютинации при добавлении антител [20]. Помимо агглютинации в объеме используется агглютинация на твердой подложке [21, 22] и в геле [23]. Преимущество иммунофенотипирования эритроцитов с помощью биочипа перед упомянутыми выше методами состоит в возможности одновременного анализа присутствия антигенов системы АВ0 и системы Rh (C, c, E, e). При этом значительно снижается расход антител и становится возможным использование меньшего количества биологического материала.

Тем не менее подобные биочипы предназначены скорее для исследовательских целей (определения закономерностей взаимодействия клеток с антителами, иммобилизованными на твердой поверхности), чем для практического использования

\* Автор для переписки.

в диагностических целях. Эритроциты являются очень удобной биологической моделью, поскольку их значительно проще выделять из крови, чем клетки других типов, а количество молекул различных антигенов на их поверхности хорошо изучено [24].

При работе с описанными выше биочипами неспецифически связавшиеся клетки отмывали, ополаскивая биочипы буферным раствором. Лишь в работе [17] с помощью проточной камеры исследовали зависимость количества лимфоцитов, связавшихся на твердой подложке с иммобилизованными антителами, от тангенциального сдвигового напряжения.

Использование непрозрачных подложек при изготовлении большинства описанных биочипов, предназначенных для определения поверхностных антигенов, не позволяло проводить морфологическое исследование связавшихся клеток. В то же время иммунофенотипирование и морфологическое исследование клеток являются важнейшими методами в диагностике гематологических заболеваний. Поэтому создание биочипа, позволяющего совместить определение поверхностных антигенов с последующей окраской и морфологическим исследованием клеток, весьма актуально. Это совмещение может стать особенно полезным, например, при анализе клеток лимфоидных и миелоидных опухолей. В данном случае при работе с эритроцитами мы хотим лишь продемонстрировать такую возможность.

Задачей работы было создание биочипа для иммунофенотипирования эритроцитов человека по поверхностным антигенам групп АВО и Rh (D, E, e, C, c), позволяющего проводить морфологическое исследование связавшихся на биочипе клеток, а также определение зависимости плотности заполнения клетками поверхности пятен биочипа от скорости потока жидкости при отмывке.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Мышинные моноклональные антитела (IgM) анти-А, анти-В, анти-D, анти-С, анти-Е, анти-с и анти-е (диагностикумы марки ЦОЛИК-ЛОН™, ООО “Гематолог”, Россия) использовали без дополнительной очистки. В работе использовали также обезжиренное сухое молоко (“Kroger”, США), раствор для градиентного центрифугирования Ficoll-раque, EDTA, фосфатный буфер (PBS) pH 7.4, 0.05% раствор Tween-20, метанол (все “Sigma Aldrich”, США).

**Изготовление биочипов.** В качестве подложек для изготовления биочипов использовали пластиковые покрывные стекла (“Fisher Scientific”, США).

Капли растворов (0.5 мкл) с различным разведением антител наносили на подложки автомати-

ческой пипеткой в заранее отмеченные участки. Затем биочипы помещали в емкость, где поддерживалась 100% влажность воздуха, и инкубировали при +4°C в течение ночи, после чего высушивали на воздухе и замораживали при -26°C в герметичных контейнерах с осушителем (силикагель). При таком хранении биочипы не теряли своих свойств по меньшей мере в течение 12 месяцев.

Для экспериментов с использованием проточной камеры были изготовлены биочипы, на подложки которых наносили капли растворов антител одного вида в разведении от 1 до 1/32 и располагали в один ряд. Такие биочипы имели по шесть пятен.

Для экспериментов, проводившихся без использования проточной камеры, были изготовлены биочипы, где капли растворов с различными разведениями антител (анти-А, анти-В, анти-D (1/4–1/256), анти-с, анти-С, анти-е и анти-Е (1–1/256)) наносили рядами на одну и ту же подложку. Такие биочипы имели по 57 пятен.

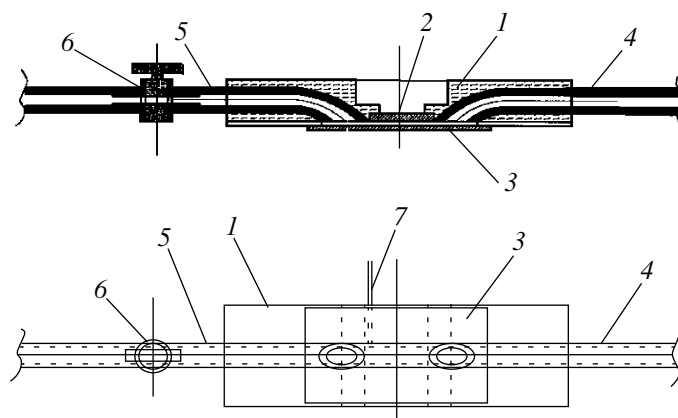
**Связывание эритроцитов на биочипах.** Биочипы закрепляли в чашках Петри, ополаскивали 1% раствором обезжиренного сухого молока в PBS, затем сразу же отмывали 3 раза 0.05% раствором Tween-20. После этого вновь заполняли чашки 1% раствором обезжиренного сухого молока в PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со слабым перемешиванием на шейкере. Затем биочипы отмывали 3 раза 0.05% раствором Tween-20 и ополаскивали PBS для удаления следов детергента. После этого биочипы инкубировали с суспензией эритроцитов в PBS при комнатной температуре. Концентрацию эритроцитов и объем суспензии подбирали так, чтобы при полном оседании клеток на дне чашки образовался их монослой. (Оптимально 2.5 мл суспензии с концентрацией  $5.5 \times 10^6$  клеток/мл при использовании чашек Петри диаметром 35 мм.) Для проведения анализа требовалось 1–2 мкл крови.

В части экспериментов для отмывки от неспецифически связавшихся клеток биочипы несколько раз ополаскивали PBS. Качество отмывки оценивали при помощи инвертированного микроскопа: вне пятен биочипа (областей с нанесенными антителами) клетки должны были отсутствовать. Биочипы высушивали на воздухе.

В ряде экспериментов инкубацию с клетками и отмывку биочипов осуществляли в проточной камере.

В работе использовали как отмывтые эритроциты, полученные из гепаринизированной периферической крови, так и цельную кровь. Предварительные эксперименты не выявили при этом каких-либо отличий.

**Морфологическое исследование связавшихся клеток.** Связавшиеся на биочипе клетки фиксировали метанолом в течение 8 мин и окрашивали по



**Рис. 1.** Чертеж проточной камеры. 1 – Корпус камеры, 2 – стекло, 3 – биочип, 4 – приводящая трубка, 5 – отводящая трубка, 6 – кран, 7 – трубка для дополнительного введения жидкости в капилляр камеры. Общая длина канала проточной камеры 33 мм, ширина 6 мм, глубина 1.3 мм. Внутренний диаметр приводящей и отводящих трубок 3 мм. Расстояние между краями отверстий трубок 21 мм.

Романовскому–Гимзе, после чего биочип промывали водой и высушивали. Затем биочипы извлекали из чашек Петри, наклеивали на предметные стекла и осуществляли морфологическое исследование связавшихся клеток.

**Оценка плотности связывания клеток в области пятен биочипа.** Каждое пятно биочипа фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата “Olimpus SP-350”, смонтированного на микроскопе “ОРТОН” (“ОРТОН”, Германия). Для определения плотности связывания клеток на поверхности пятен биочипа на каждой микрофотографии выбирали участки  $100 \times 100$  мкм и подсчитывали клетки не менее чем в трех участках: в центре пятна, на краю пятна и между ними. Полученные при этом значения плотности связывания клеток усредняли.

**Проточная камера.** Зависимость плотности связывания клеток на биочипе от скорости отмывки изучали с помощью проточной камеры с поперечным сечением капилляра  $8 \text{ мм}^2$  (рис. 1).

Камеру подключали к шприцевому насосу “Syringe pump Model 11 plus”, “Harvard Apparatus, Inc.” (США), позволяющему получить объемную скорость потока жидкости до 40 000 мкл/мин.

Проточную камеру помещали на предметный столик микроскопа таким образом, чтобы биочип, образующий одну из стенок ее канала, располагался внизу. Камеру заполняли предварительно дегазированным 1% раствором бычьего сывороточного альбумина или обезжиренного сухого молока в PBS и инкубировали в течение 1 ч. Затем через камеру в течение 5 мин пропускали PBS с объемной скоростью 200 мкл/мин. После этого в капилляр камеры через дополнительную трубку вводили 0.3 мл разбавленной PBS гепаринизированной крови с концентрацией эритроцитов не менее  $1.5 \times 10^7$  клеток/мл и инкубировали в течение 10–20 мин в от-

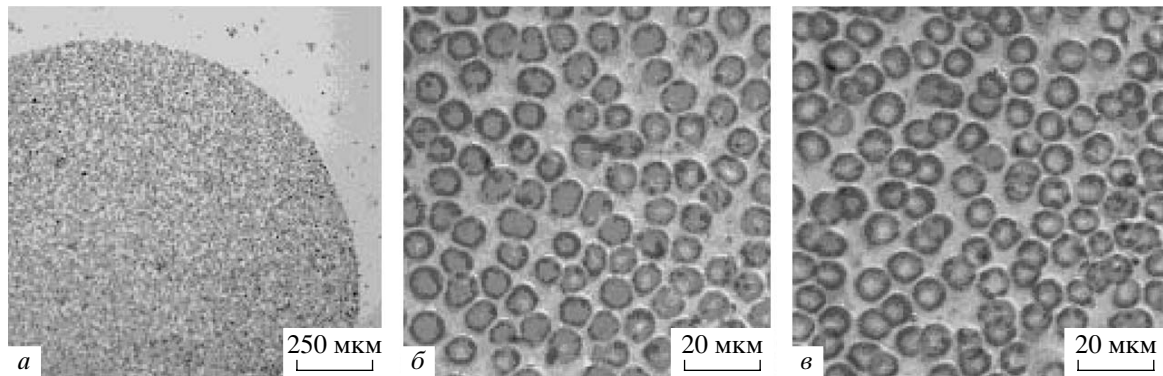
сутствие потока. Неспецифически связавшиеся клетки затем смывали с поверхности биочипа потоком PBS. Фотографировали пятна биочипа. При исследовании прочности связывания клеток с биочипом скорость потока увеличивали на определенную величину и после пропускания потока жидкости в течение 1 мин фотографировали каждое пятно.

Количество клеток на единице площади пятна определяли, как описано выше.

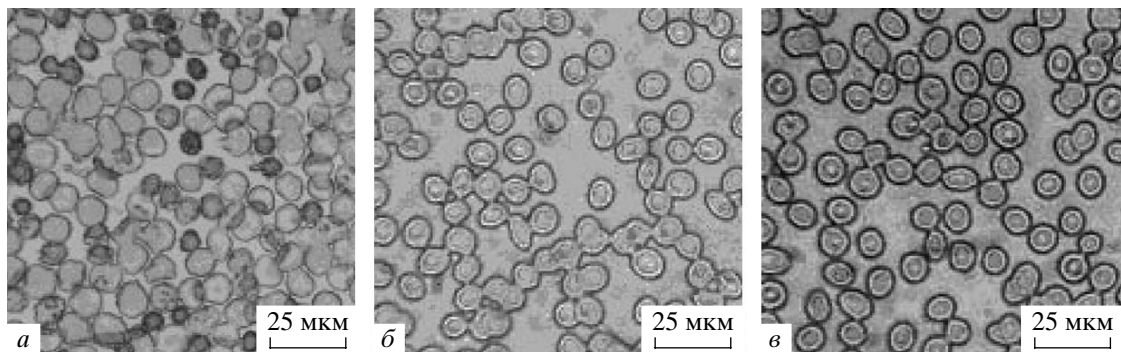
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Морфологические исследования клеток, связанных на биочипе.** Биочипы с иммобилизованными антителами (IgM), специфичными к антигенам А, В и D, инкубировали с суспензиями эритроцитов групп О(I), А(II), В(III) АВ(IV) как с положительным, так и с отрицательным резус-фактором (Rh(D)+ и Rh(D)-). После отмывки неспецифически связавшихся клеток связанные эритроциты фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому–Гимзе (рис. 2). В области пятен с антителами, специфичными к антигену А, связанными оставались только эритроциты групп А(II) и АВ(IV); в области пятен с антителами, специфичными к антигену В – эритроциты групп В(III) и АВ(IV). В области пятен с антителами анти-D связывались только Rh-положительные эритроциты. Таким образом, перекрестной активности используемых антител не наблюдалось.

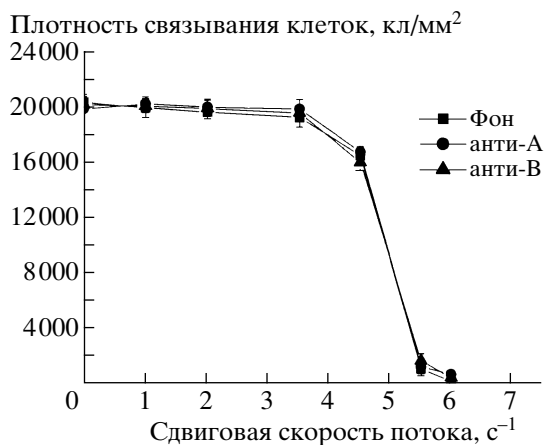
На рис. 2 представлены микрофотографии эритроцитов здорового донора группы А(II)Rh+ в мазке (рис. 2в) и эритроцитов того же донора, связанных на биочипе с иммобилизованными антителами анти-D (рис. 2а, б). Видно, что качество окраски эритроцитов в мазке и на биочипе практически не отличалось. На микрофотографиях связавшихся на биочипах эритроцитов, полученных из крови



**Рис. 2.** Эритроциты здорового донора с группой крови A(II)Rh+, связавшиеся на биочипе в области пятна с антителами анти-D, и эритроциты того же донора в мазке крови. Окраска по Романовскому–Гимзе. *а* – Микрофотография пятна биочипа со связавшимися эритроцитами, увеличение  $\times 37.5$ ; *б* – то же пятно, увеличение  $\times 600$ ; *в* – микрофотография эритроцитов того же донора в мазке крови на стекле, увеличение  $\times 600$ .



**Рис. 3.** Патологически измененные эритроциты, связавшиеся на биочипах. Окраска по Романовскому–Гимзе. *а* – Эритроциты больного с хронической почечной недостаточностью, длительно находившегося на гемодиализе, связавшиеся в области пятна с антителами анти-A. *б* – Эритроциты больного наследственным овалоцитозом, связавшиеся в области пятна биочипа с антителами анти-B. Приблизительно 7% клеток имеют характерную овальную форму. *в* – Эритроциты больного талассемией, связавшиеся в области пятна с антителами анти-A. Увеличение  $\times 600$ .

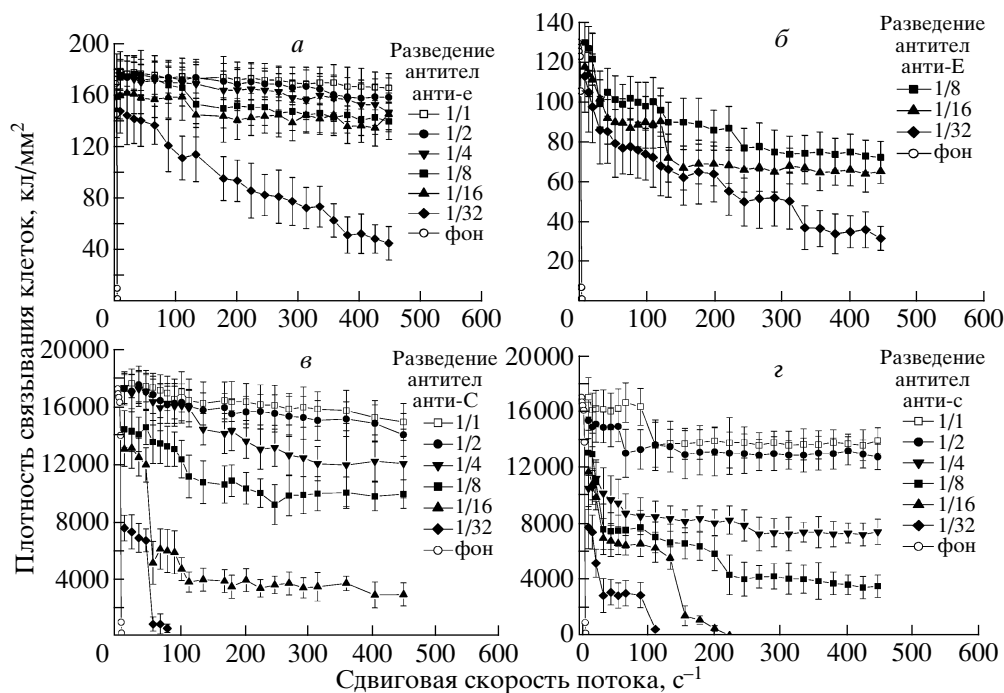


**Рис. 4.** Зависимость от сдвиговой скорости потока отмывающей жидкости плотности связывания эритроцитов группы O(I)Rh+, неспецифически связавшихся с подложкой биочипа в области пятен с антителами анти-A и анти-B, а также вне этих пятен (фон). На представленных кривых обозначены ошибки среднего (по результатам трех измерений).

больных (рис. 3), можно видеть морфологические особенности, характерные для этих заболеваний: пойкилоцитоз и анизоцитоз у эритроцитов больного с хронической почечной недостаточностью, длительно находившегося на гемодиализе (рис. 3а), овальные эритроциты больного наследственным овалоцитозом (рис. 3б), мишеневидные эритроциты больного талассемией (рис. 3в).

Таким образом, показана возможность параллельного определения иммунофенотипа и морфологического исследования эритроцитов с помощью иммунологических биочипов, изготовленных на прозрачных подложках.

**Зависимость плотности связавшихся клеток от скорости потока жидкости при отмывке.** С помощью проточной камеры определены условия отмывки биочипов (предварительно инкубированных с эритроцитами), при которых с их поверхности удаляются только неспецифически связавшиеся с подложкой эритроциты, а клетки, связавшиеся с антителами, остаются в области пятен.



**Рис. 5.** Зависимость от сдвиговой скорости потока отмывающей жидкости количества эритроцитов с иммунофенотипом ssDEe, остающихся связанными в области пятен биочипа с антителами анти-е (*а*); количества эритроцитов с иммунофенотипом ssDEe, остающихся связанными в области пятен с антителами анти-Е (*б*); количества эритроцитов с иммунофенотипом CCDee, остающихся связанными в области пятен с антителами анти-С (*в*); количества эритроцитов с иммунофенотипом ssDEe, остающихся связанными в области пятен с антителами анти-с (*г*). На представленных кривых обозначены ошибки среднего (по результатам трех измерений).

Для этого исследовали зависимость количества эритроцитов, связанных в области пятен биочипа, от сдвиговой скорости потока жидкости.

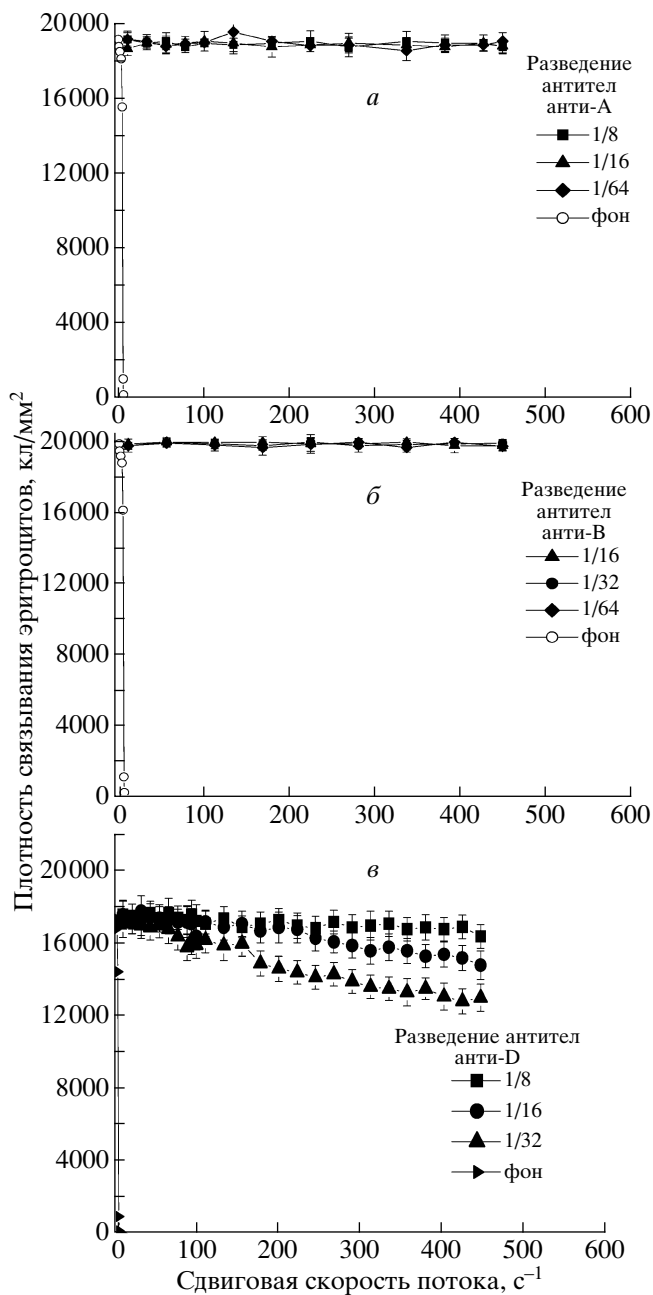
В наших условиях отрыв неспецифически связавшихся клеток происходил при сдвиговой скорости потока жидкости  $4.5\text{--}6\text{ с}^{-1}$ , что соответствует действующему на эритроцит напряжению сдвига  $18\text{--}24\text{ мПа}$ . При этом эритроциты, не имеющие соответствующих поверхностных антигенов, и, следовательно, неспецифически связавшиеся на поверхности пятен с соответствующими антителами, отрывались при тех же скоростях, что и эритроциты, связавшиеся вне пятен биочипа (фон) (рис. 4).

На рис. 5 представлены зависимости плотности заполнения эритроцитами пятен с антителами анти-с, анти-С, анти-е, анти-Е от сдвиговой скорости потока, создаваемой при отмывке биочипа. Каждая кривая соответствует связыванию эритроцитов на пятнах с одним разведением антител. Использовали эритроциты двух доноров с иммунофенотипами ssDEe и CCDee.

Кривые, отражающие зависимость плотности связывания эритроцитов с иммунофенотипом ssDEe в области пятен с иммобилизованными антителами, специфичными к антигенам е и Е, от скорости потока, представлены на рис. 5*а, б*. Можно видеть, что максимальная наблюдаемая плотность

заполнения пятна эритроцитами (для минимальной скорости потока) в обоих случаях практически не зависит от разведения антител и лишь незначительно отличается от максимально возможной плотности заполнения пятна биочипа ( $20000 \pm 1000\text{ кл/мм}^2$ ). Для каждого разведения антител плотность заполнения пятна связанными эритроцитами уменьшается с увеличением сдвиговой скорости потока смывающей жидкости. Плотность заполнения клетками пятен с антителами анти-е (рис. 5*а*) мало зависит от скорости потока для разведений до 1/16, а для разведения 1/32 уменьшается с увеличением сдвиговой скорости потока. Для антител анти-Е (рис. 5*б*) в пятнах с разведениями 1/8 и 1/16 плотность связывания клеток после начального уменьшения стабилизируется и остается практически постоянной вплоть до максимальной сдвиговой скорости  $450\text{ с}^{-1}$ . Начальная плотность заполнения эритроцитами пятен с антителами анти-е и анти-Е практически не зависит от концентрации иммобилизованных антител.

На рис. 5 представлены кривые зависимости плотности связывания эритроцитов (иммунофенотип CCDee) с иммобилизованными антителами анти-С (рис. 5*в*), а также клеток другого донора (иммунофенотип ssDEe) с иммобилизованными антителами анти-с (рис. 5*г*) от сдвиговой скорости потока отмывающей жидкости. В этом случае



**Рис. 6.** Зависимость от сдвиговой скорости потока отмывающей жидкости количества эритроцитов группы А(II), остающихся связанными в области пятен биочипа с антителами анти-А (а); количества эритроцитов группы В(III), остающихся связанными в области пятен с антителами анти-В (б); количества эритроцитов группы I(0)Rh + с иммунофенотипом CCDee, остающихся связанными в области пятен с антителами анти-D (в). На представленных кривых обозначены ошибки среднего (по результатам трех измерений).

максимальная плотность связывания клеток существенно различалась при различных разведениях антител. В то же время начальные плотности заполнения пятен для одинаковых разведений анти-С и анти-с практически совпадали. В области пятен с

антителами анти-С с разведениями до 1/8 и пятен с антителами анти-с с разведениями до 1/4 плотность связывания эритроцитов остается практически неизменной при увеличении сдвиговой скорости потока. Плотность связывания клеток в области пятен с указанными антителами в больших разведениях значительно уменьшается с увеличением скорости потока смывающего раствора.

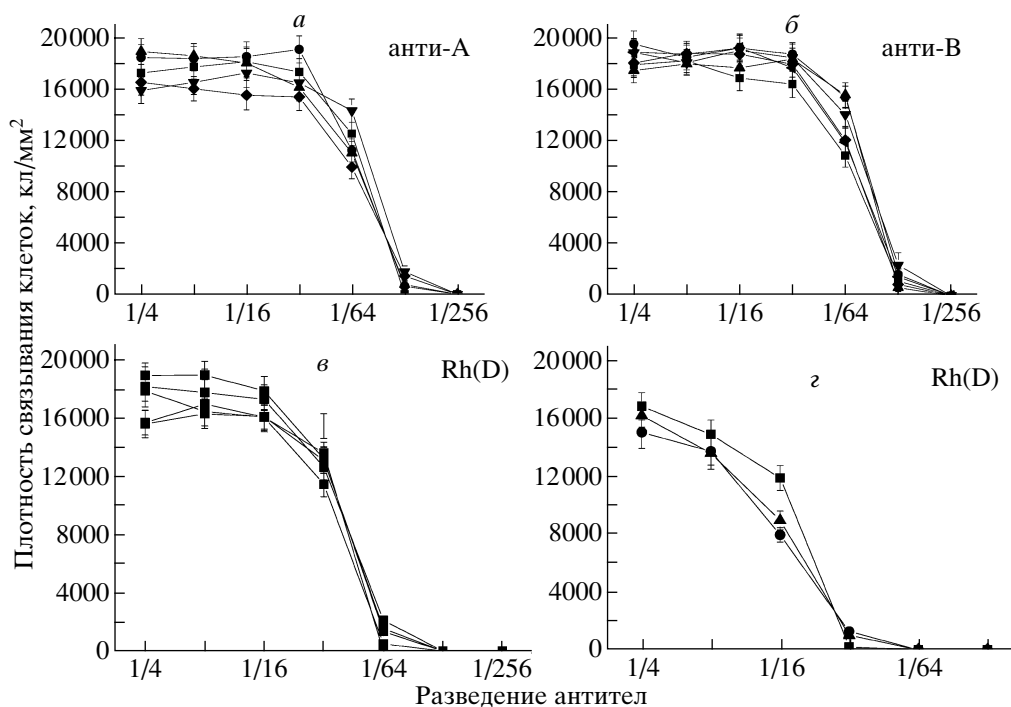
Для антител анти-А и анти-В (рис. 6а, б) плотность связывания эритроцитов в области пятен с разведениями до 1/64 оставалась постоянной при сдвиговых скоростях потока от 0 до 450 с<sup>-1</sup> (максимально возможной скорости потока в данной проточной камере), а для антител анти-D в разведениях до 1/32 лишь незначительно уменьшалась (рис. 6в). Поэтому мы исследовали зависимость плотности связывания клеток на биочипе с иммобилизованными анти-А, анти-В и анти-D от разведения соответствующих антител (от 1/4 до 1/256) при отмывке биочипа от неспецифически связавшихся клеток ополаскиванием. Исследовали эритроциты различных групп, полученные от 12 доноров. Эритроциты 10 доноров были положительными по антигену D. Полученные результаты представлены на рис. 7.

Представленные данные (рис. 7а, б) показывают, что плотность связывания эритроцитов в области пятен с антителами анти-А и анти-В постоянна для разведений до 1/32, а при увеличении разведения уменьшается.

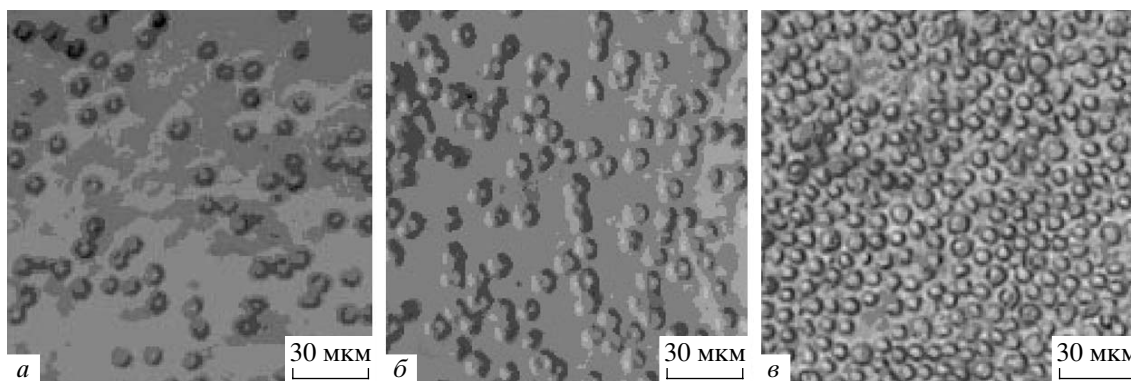
При исследовании 10 образцов крови, полученных от разных Rh(D)+-доноров, обнаружено, что разведения антител анти-D, при которых начинается уменьшение плотности связывания эритроцитов, различаются (рис. 7в, г). Возможно, это связано со значительным отличием количества молекул антигена D на поверхности эритроцитов разных людей [20, 24].

В области пятен с антителами, специфичными к поверхностным антигенам С, с, Е и е, после отмывки биочипов путем ополаскивания, связанных клеток практически не оставалось. Этот результат скорее всего объясняется тем, что связывание эритроцитов с антителами, специфичными к антигенам С, с, Е и е, существенно слабее, чем с антителами анти-А, анти-В и анти-D, и при отмывке ополаскиванием отрываются все связавшиеся клетки. Похожие результаты получены в работе [5], где плотность связывания клеток на биочипах с антителами (IgG), специфичными к антигенам С, с, Е, е, была очень низкой.

**Определение процентного содержания различных видов клеток в смешанной суспензии.** С помощью биочипов можно измерить процентное содержание клеток, экспрессирующих определяемые антигены, в исследуемой суспензии (рис. 8). Биочип с иммобилизованными антителами анти-D инкубировали с суспензией Rh(D)+ и Rh(D)-



**Рис. 7.** Зависимость плотности заполнения эритроцитами поверхности пятен от разведения растворов антител, нанесенных на подложку при изготовлении биочипа. *а* – Заполнение пятен с антителами анти-А эритроцитами А(II) и АВ(IV) групп. *б* – Заполнение пятен с антителами анти-В эритроцитами В(III) и АВ(IV) групп. *в, г* – Заполнение пятен с антителами анти-D Rh(D)-положительными эритроцитами. Каждая кривая соответствует эритроцитам одного донора. На представленных кривых обозначены ошибки среднего (по результатам трех измерений). Биочипы отмывали путем ополаскивания буферным раствором.



**Рис. 8.** Заполнение Rh(D)+ эритроцитами поверхности пятен с антителами анти-D при инкубации биочипа в проточной камере со смешанной клеточной суспензией, содержащей Rh(D)+ и Rh(D)-эритроциты, полученные от двух разных доноров. *а* – Частичное заполнение поверхности пятен. Соотношение Rh(D)+ и Rh(D)-эритроцитов 1 : 4. Выполнен один цикл инкубации/отмывки. *б* – Частичное заполнение поверхности пятна. Соотношение Rh(D)+ и Rh(D)-эритроцитов 1 : 1. Выполнен один цикл инкубации/отмывки. *в* – Близкое к максимальному заполнение поверхности пятна связавшимися эритроцитами поверхности после проведения 15 циклов инкубации/отмывки. Соотношение Rh(D)+ и Rh(D)-эритроцитов 1 : 4. Увеличение  $\times 300$ .

эритроцитов (полученных от двух разных доноров), смешанных в соотношениях 1 : 4 и 1 : 1. Клетки инкубировали в отсутствие потока жидкости и какого-либо перемешивания. После отмывки неспецифически связавшихся клеток заполнение пятен было неполным. Отношение плотности связы-

вания клеток в области пятна к максимально возможной плотности связывания ( $20000 \text{ кл/мм}^2$ ), принятой за 100%, составляло соответственно  $20 \pm 2$  и  $50 \pm 2\%$  (рис. 8а, б).

**Концентрирование в области пятен биочипа клеток, экспрессирующих определяемые антиге-**

**ны.** С помощью проточной камеры возможно концентрирование в области пятен биочипа клеток, имеющих соответствующие поверхностные антигены. Если в процессе взаимодействия биочипа с полиморфной клеточной суспензией чередовать периоды инкубации без потока (5–10 мин) с кратковременной подачей потока жидкости (3–5 с) со скоростью, достаточной для отрыва неспецифически связавшихся клеток, то после нескольких таких циклов можно добиться максимально возможного заполнения поверхности пятна клетками, имеющими данный антиген. На рис. 8*в* представлено заполнение поверхности пятна с антителами анти-D при инкубации биочипа в проточной камере с клеточной суспензией, содержащей Rh(D)+ и Rh(D)– эритроциты в соотношении 1 : 4, после 15 циклов инкубации и отмывки. Тот же образец после одного цикла инкубации и отмывки показан на рис. 8*а*.

При содержании в суспензии 50% эритроцитов, имеющих соответствующий антиген, для заполнения поверхности пятна, близкого к максимальному, требовалось четыре–пять циклов инкубации/отмывки, а при их 20% содержании в суспензии – 10–15 таких циклов. Концентрирование клеток в области пятен биочипа могло также осуществляться при пропускании над биочипом потока разбавленной клеточной суспензии (в концентрации  $10^5$  клеток/мл) со сдвиговой скоростью  $0.6–1.3 \text{ с}^{-1}$ , подобно тому, как это сделано в работе [17], где таким образом концентрировали клетки на твердой поверхности с иммобилизованными антителами. В этом случае максимальное заполнение клетками поверхности пятна достигалось за 1–1.5 ч.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование прозрачных подложек позволяет применять к связавшимся на биочипе клеткам стандартные методы окрашивания и проводить морфологическое исследование. Представленные на рис. 2 и 3 результаты показывают, что качество окраски эритроцитов в мазке и на биочипе практически одинаково. На микрофотографиях связавшихся на биочипах эритроцитов, полученных из крови больных хронической почечной недостаточностью, овалоцитозом и талассемией, хорошо видны морфологические особенности, характерные для данных заболеваний (пойкилоцитоз, анизоцитоз, овалоцитоз, мишеневидные эритроциты).

Таким образом, показана возможность проведения морфологического исследования параллельно с определением поверхностных антигенов при анализе клеток на биочипе. Этот подход может оказаться весьма полезным при исследовании других типов клеток. В будущем он может найти свое применение, например, при исследовании клеток лимфоидных и миелоидных опухолей.

На рис. 4–6 представлены результаты, показывающие, как изменяется количество эритроцитов, остающихся связанными в области пятен биочипа с разными разведениями антител, в зависимости от скорости потока отмывающей жидкости. Рисунок 4 показывает, что неспецифически связавшиеся клетки полностью отрываются от подложки при сдвиговой скорости  $7 \text{ с}^{-1}$ . Данные, приведенные на рис. 5, показывают, что при сдвиговых скоростях, меньших  $10–20 \text{ с}^{-1}$ , практически не происходит отрыва специфически связавшихся эритроцитов.

Количество клеток, остающихся связанными в области пятна с определенными антителами при заданной скорости потока, зависит от трех параметров: концентрации нанесенных антител, их аффинности и количества соответствующих антигенов на поверхности клетки. При сравнении пятен биочипов с одинаковыми антителами, нанесенными в различном разведении, можно видеть, что чем меньше концентрация антител, тем при меньшей скорости потока происходит отрыв клеток из области соответствующего пятна. Полученные результаты позволяют определить оптимальное для иммобилизации на биочипе разведение антител анти-с, анти-С, анти-е и анти-Е. Использование антител в разведениях, меньших чем  $1/16$  для анти-е и анти-Е,  $1/4$  – для анти-с и  $1/8$  – для анти-С, нецелесообразно, поскольку при дальнейшем увеличении концентрации антител количество эритроцитов, остающихся связанными в области пятен, практически не возрастает (рис. 5).

В то же время результаты измерения концентрации связанных клеток, полученные при использовании разных антител в одинаковом разведении, отличались между собой. Следовательно, клетки связывались в области пятен с разными антителами с неодинаковой прочностью. Такое различие в прочности связывания может быть вызвано либо различием в аффинности используемых нами антител, либо различием в уровне экспрессии соответствующих антигенов на поверхности эритроцитов.

Экспрессия антигенов группы Rh на поверхности эритроцитов существенно ниже, чем антигенов А и В (810–1170 тыс. на эритроцит [20, 24]). На поверхности эритроцитов с иммунофенотипом CCDee количество антигенов С составляет 46–56 тыс., антигенов е – 18–24 тыс., антигенов D – 14–19 тыс. на клетку. На поверхности эритроцита с иммунофенотипом ccDEe находятся 70–85 тыс. антигенов с, 13–14 тыс. антигенов е и 14–16 тыс. антигенов D [20, 24]. Этим может объясняться тот факт, что плотность связывания эритроцитов с иммобилизованными на биочипе антителами анти-А и анти-В остается практически неизменной при увеличении разведения антител от 1 до  $1/32$  (рис. 6*а*, *б*), в то время как плотность связывания клеток в пятнах с антителами, специфичными к антигенам с, С, е и Е, уменьшается уже при разведениях  $1/4–1/16$  (рис. 5).



Количество антигенов D на эритроцитах с иммунофенотипами CCDee и ccDEe сопоставимо с количеством антигенов c, C, e, E [20, 24]. В то же время для отрыва эритроцитов, связавшихся с антителами анти-D (рис. 6в), требовались гораздо более высокие скорости потока, чем для отрыва клеток, связавшихся с антителами, специфичными к антигенам c, C, e, E (рис. 5). Более того, эритроциты, связавшиеся с антителами анти-D, удерживались на поверхности биочипа даже при его отмывке ополаскиванием (рис. 7в, з). При тех же условиях даже в области пятен с неразведенными антителами анти-c, анти-C, анти-e и анти-E не оставалось связанных клеток. Эти результаты, скорее всего, свидетельствуют о том, что у антител анти-D аффинность выше, чем у антител анти-C, анти-c, анти-E и анти-e.

На рис. 8 показано заполнение эритроцитами поверхности пятен с антителами анти-D при инкубации биочипа с клеточной суспензией, содержащей Rh(D)+ и Rh(D)- эритроциты в различных соотношениях. Заполнение клетками пятна с иммобилизованными антителами, специфичными к выбранному поверхностному антигену, пропорционально доле эритроцитов, содержащих данный антиген.

При инкубации биочипа с полиморфной клеточной суспензией без перемешивания клетки оседают на его поверхность в количествах, соответствующих их процентному содержанию в суспензии. С антителами при этом связываются только те клетки, которые имеют соответствующие поверхностные антигены. Клетки без данных поверхностных антигенов не связываются с антителами, но экранируют их от тех клеток, которые могли бы с ними связаться. Таким образом, после отмывки неспецифически связавшихся эритроцитов плотность заполнения клетками пятна с антителами, специфичными к определенному антигену, пропорциональна процентному содержанию в смешанной суспензии клеток, имеющих соответствующий антиген.

Рисунок 8в показывает, что при исследовании суспензии, содержащей клетки, отличающиеся по иммунофенотипу, проточная камера позволяет не только выделять клетки, экспрессирующие определяемый антиген, но и концентрировать их. Концентрирование на биочипе клеток определенного типа может быть полезным при проведении последующих дополнительных исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Angenedt P. Progress in protein and antibody microarray technology // *Drug Discovery Today*. 2005. V. 10. P. 503–511.
2. Lal S.P., Christopherson R.I., dos Remedios C.G. Antibody arrays: an embryonic but rapidly growing technology // *Drug Discovery Today*. 2002. V. 7. P. 143–149.
3. Angenedt P., Glokler J., Murphy D., Lehrach H., Cahill D.J. Biological microchip for multiple parallel immunoassay of compounds and immunoassay methods using said microchip // *Anal. Biochem*. 2002. V. 309. P. 253–260.
4. Arenkov P., Kukhtin A., Gemmell A., Voloshchuk S., Chupeeva V., Mirzabekov A. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions // *Anal. Biochem*. 2000. V. 278. P. 123–131.
5. Campbell C.J., O'Looney N., ChongKwan M., Robb J.S., Ross A.J., Beattie J.S., Petrik J., Ghazal P. A cell interaction microarray for blood phenotyping // *Anal. Chem*. 2006. V. 78. P. 1930–1938.
6. Kato K., Toda M., Iwata H. Antibody arrays for quantitative immunophenotyping // *Biomaterials*. 2007. V. 28. P. 1289–1297.
7. Silzel J.W., Cercek B., Dodson C., Tsay T., Obrenski R.J. Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection // *Clin. Chem*. 1998. V. 44. P. 2036–2043.
8. Liu B., Huang L., Sihlbom C., Burlingame A., Marks J.D. Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display // *J. Mol. Biol*. 2002. V. 315. P. 1063–1073.
9. Haab B.B. Antibody arrays in cancer research // *Mol. Cell. Proteomics*. 2005. V. 4. P. 377–383.
10. Chang T.W. Binding of cells of distinct antibodies coated on solid surface // *J. Immunol. Methods*. 1986. V. 65. P. 217–223.
11. 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 Res*. 2001. V. 61. P. 4483–4489.
12. Belov L., Huang P., Barber N., Mulligan S.P., Christopherson R.I. Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray // *Proteomics*. 2003. V. 3. P. 2147–2154.
13. Belov L., Huang P., Chrisp J.S., Mulligan S.P., Christopherson R.I. Screening microarrays of novel monoclonal antibodies for binding to T-, B- and myeloid leukaemia cells B // *J. Immunol. Methods*. 2005. V. 305. P. 10–19.
14. Ellmark P., Belov L., Huang P., Lee C.S., Morgan D.K., Christopherson R.I. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers // *Proteomics*. 2006. V. 6. P. 1791–1802.
15. Ko I.K., Kato K., Iwata H. Antibody microarray for correlating cell phenotype with surface marker // *Biomaterials*. 2005. V. 26. P. 687–696.
16. Liu A.Y. Differential expression of cell surface molecules in prostate cancer cells // *Cancer Res*. 2000. V. 60. P. 3429–3434.
17. Murthy S.K., Sin A., Tompkins R.G., Toner M. Effect of flow and surface conditions on human lymphocyte isolation using microfluidic chambers // *Langmuir*. 2004. V. 20. P. 11649–11655.
18. Robb J.S., Roy D.J., Ghazal P., Allan J., Petrik J. Development of non-agglutination microarray blood grouping // *Transfusion Medicine*. 2006. V. 16. P. 119–129.
19. Quinn J.G., O'Kennedy R., Smyth M., Moulds J., Frame T. Detection of blood group antigens utilising immobilised antibodies and surface plasmon resonance // *J. Immunol. Methods*. 1997. V. 206. P. 87–96.

20. Petrik J., Robb J.S. Microarrays and blood diagnostics // BioArrays: From Basics to Diagnostics. Totowa NJ: Humana Press Inc., 2006. P. 215–230.
21. Sinor L.T., Rachel J.M., Beck M.L., Bayer W.L., Coenen W.M., Plapp F.V. Solid-phase ABO grouping and Rh typing // Transfusion. 1985. V. 25. P. 21–23.
22. Llopis F., Carbonell-Uberos F., Planelles M.D., Montoro M., Puig N., Atienza T., Alba E., Montoro J.A. A monolayer coagglutination microplate technique for typing red blood cells // Vox Sanguinis. 1997. V. 72. P. 26–30.
23. Lapierre Y., Rigal D., Adam J., Josef D., Meyer F., Greber S., Drot C. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions // Transfusion. 1990. V. 30. P. 109–113.
24. Донсков С.И. Группы крови системы Rhesus. Теория и практика. М.: Союзинформбиология, 2005. С. 62–67.

## Immunological Biochips for Studies of Human Erythrocytes

A. V. Shishkin<sup>1,2</sup>, I. I. Shmyrev<sup>1</sup>, S. A. Kuznetsova<sup>1</sup>, N. G. Ovchinina<sup>1,2</sup>, A. A. Butylin<sup>1,3</sup>,  
F. I. Ataulhanov<sup>1,3,4</sup>, A. I. Vorobyev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Research Center for Hematology, Novozykovskiy proezd 4a, Moscow, 125167 Russia,  
fax: (495) 612-42-52; e-mail: shishkin\_lab@mail.ru

<sup>2</sup> Izhevsk State Medical Academy, ul. Kommunarov 281, Izhevsk, Russia,  
fax: 8-(3412) 65-81-67

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Physical Department, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia,  
fax: (495) 939-01-26

<sup>4</sup> Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, ul. Kosygina 4, Moscow, 117977 Russia

Here we describe a biochip for detection of red blood cell surface antigens, such as blood group antigens (A, B, O) and the Rhesus system antigens (D, E, e, C, and c). The biochip contains a set of spots of immobilized IgM antibodies specific for this antigen in different dilutions; each spot, 1.5 mm in diameter, is placed (OR: put) on a transparent plastic surface. One to two microlitres of blood is enough for the analysis. We demonstrate that binding of erythrocytes to antibodies immobilized on the biochip is specific. Moreover, the red blood cells bound to the biochip can be used for further morphological studies. Using a flow chamber, we have studied the dynamics of the cell detachment from the biochip spots for different flow rates of the washing solution. We have shown also that the biochip in combination with the flow chamber can be used to concentrate cells of a certain immunophenotype even when their content in the cell mixture is low.