

УДК 57.083.3

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ БИОЧИПЫ ДЛЯ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНОВ И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОК

© 2008 г. А. В. Шишкин^{1,2*}, И. И. Шмырев¹, С. А. Кузнецова¹, Н. Г. Овчинина^{1,2},
А. А. Бутылин^{1,3}, Ф. И. Атауллаханов^{1,3,4}, А. И. Воробьев¹

¹ ГУ Гематологический научный центр РАМН, 125167 Москва, Новозыковский проезд 4-а;
факс (495) 612-4252; электронная почта: shishkin_lab@mail.ru

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

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

⁴ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
117977 Москва ГСП-1, ул. Косыгина, 4

Поступила в редакцию 05.04.2008 г.

Описано исследование лимфоцитов с помощью экспериментальных биочипов, позволяющих определять на поверхности клеток 26 различных CD-антигенов, а также антигены HLA-DR и IgM. Биочипы представляют собой прозрачные пластиковые подложки, на которые нанесены пятна антител (IgG), специфичных для данных антигенов. Диаметр каждого пятна составляет 1.5 мм. С помощью этих биочипов исследованы нормальные и опухолевые лимфоциты. Показана возможность использования биочипов для определения процентного содержания в суспензиях клеток, экспрессирующих различные поверхностные антигены. Полученные при этом результаты совпадают с данными проточной цитофлуориметрии. Использование прозрачной подложки позволяет применять к связавшимся на биочипе клеткам стандартные методы окраски и проводить их морфологическое исследование.

В настоящее время быстро развиваются новые методы анализа, основанные на применении биочипов – аналитических и диагностических систем нового поколения, использующих принцип молекулярного узнавания и позволяющих одновременно осуществлять множество однотипных исследований в небольшом количестве материала [1].

Биочип представляет собой носитель, в определенных участках которого иммобилизованы молекулы, способные специфически взаимодействовать с молекулами, присутствующими в исследуемом образце [2]. Все большее распространение получают биочипы на основе антител, позволяющие одновременно выявлять большое число различных антигенов [3]. Для изготовления биочипов используются подложки из различных материалов, обеспечивающих иммобилизацию антител за счет ковалентного связывания с поверхностью [1, 4–7] или за счет адсорбции [8, 9].

Впервые связывание клеток на биочипе с иммобилизованными антителами, специфичными к поверхностным антигенам, описал Чанг [10]. В последние годы несколькими группами исследователей разработаны биочипы, позволяющие определять поверхностные антигены клеток [5, 11–18].

* Автор для переписки.

Значительная часть этих работ посвящена созданию биочипов с иммобилизованными на них антителами, специфичными к поверхностным антигенам лейкоцитов [11–17].

Определение CD-антигенов, экспрессируемых на поверхности клеток, имеет большое значение для диагностики опухолей системы крови [19]. Для иммунофенотипирования клеток широко используется метод проточной цитофлуориметрии. К недостаткам этого метода можно отнести возможность одновременного определения лишь небольшого числа антигенов, в то время как количество клинически значимых антигенов достаточно велико. Биочипы позволяют одновременно определять очень большое число поверхностных антигенов, ограниченное только количеством пятен различных антител, которые могут быть нанесены на подложки.

Диагностически значимым показателем является доля клеток, несущих определенные антигены. Поэтому биочипы должны не только избирательно связывать клетки, экспрессирующие соответствующие антигены, но и позволять определять их процентное содержание.

Описаны биочипы с различным количеством иммобилизованных антител [6, 11–13, 20]. В ра-

боте Като и соавт. [6] описаны биочипы, содержащие 22 антитела, специфичные к различным CD-антигенам. С их помощью исследовали кровь больных острым Т-лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ), лимфомой Беркитта и острым промиелоцитарным лейкозом. Были установлены наборы CD-антигенов, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток, однако количественное определение процентного содержания клеток, экспрессирующих каждый из выбранных поверхностных антигенов не проводилось. В работе Белова и соавт. [11] с помощью биочипов с антителами, специфичными к 48 различным CD-антигенам, определены наборы антигенов, встречающихся на поверхности лимфоцитов здоровых доноров, больных хроническим В-клеточным лимфолейкозом (В-ХЛЛ), волосатоклеточным лейкозом, лимфомой из клеток мантийной зоны и Т-ОЛЛ. Содержание клеток с различными CD-антигенами определено в крови здоровых доноров и больных В-ХЛЛ. В более поздних работах той же группы [12, 13] с помощью биочипов, позволяющих определять до 82 различных CD-антигенов, проведено аналогичное исследование клеток нескольких опухолей (острого В-лимфобластного лейкоза, Т-ОЛЛ, Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, и острого промиелоцитарного лейкоза).

В клинической практике одним из важнейших методов диагностики опухолей системы крови наряду с иммунофенотипированием является морфологическое исследование клеток. Существующие диагностические методы не позволяют проводить эти два вида исследований на одних и тех же клетках, что иногда приводит к противоречиям при постановке диагноза. Поэтому весьма привлекательной представляется возможность морфологического исследования связанных на биочипе клеток. Для реализации данной возможности необходимо изготовление биочипов на прозрачных подложках.

Задача данной работы состояла в создании биочипа, позволяющего совместить определение содержания в суспензии клеток, экспрессирующих различные поверхностные антигены, и их морфологическое исследование.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Для создания биочипов использовали мышинные моноклональные антитела (IgG), специфичные к антигенам человека: CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD27, CD29, CD31, CD36, CD38, CD44, CD45, CD45RA, CD56, CD71, CD72, CD95, CD98, HLA-DR, IgM (ООО "Сорбент", Москва). В работе использовали также обезжиренное сухое молоко ("Kroger", США), раствор для градиентного центрифугирования Ficoll-raque, EDTA,

фосфатный буфер (PBS) pH 7.4, детергент Tween-20, метанол (все "Sigma Aldrich", США).

Приготовление клеточной суспензии. Лимфоциты выделяли из периферической крови путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-raque. Клетки ресуспендировали в растворе PBS, содержащем 0.1% сухого молока, 10% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки и 1.5 мМ EDTA. Содержание клеток в суспензии определяли с помощью камеры Горяева.

Изготовление биочипов. В качестве подложек для изготовления биочипов использовали покровные стекла (22 × 22 мм) из пластифицированного поливинилхлорида ("Fisher Scientific", США). Капли (0.5 мкл) растворов антител с различным разведением наносили на подложки автоматической пипеткой в заранее отмеченные участки. Подложки с адсорбированными антителами помещали в камеру со 100% влажностью 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 мес. Диаметр пятен иммобилизованных на биочипе антител составлял 1.5 мм.

Подготовка биочипов к работе. После размораживания биочипы закрепляли в чашках Петри (35 мм), ополаскивали 1% раствором обезжиренного сухого молока в PBS и трижды отмывали 0.05% раствором Tween-20. После этого чашки вновь заполняли 1% раствором обезжиренного сухого молока в PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со слабым перемешиванием на шейкере. Затем биочипы снова 3 раза отмывали 0.05% раствором Tween-20 и ополаскивали буфером для удаления следов детергента.

Инкубация биочипов с клеточной суспензией. Клеточную суспензию вносили в чашки Петри с закрепленными в них биочипами. Клетки инкубировали при комнатной температуре без перемешивания в течение 30–40 мин. Концентрация клеток и объем суспензии были подобраны так, чтобы при полном оседании клеток на дне чашки образовался их монослой (Оптимально 2.5 мл суспензии с концентрацией 5.5×10^6 клеток/мл, при использовании чашек Петри диаметром 35 мм). После завершения инкубации биочипы несколько раз ополаскивали PBS для устранения не связанных с антителами клеток. Качество отмывки оценивали при помощи инвертированного микроскопа: клетки должны были отсутствовать вне пятен биочипа (областей с нанесенными антителами).

Окраска связанных клеток флуоресцентно мечеными антителами. На предметное стекло параллельно друг другу наклеивали две ограничительные пластины толщиной 0.2 мм. Между ними наносили 80 мкл раствора флуоресцентно мечен-

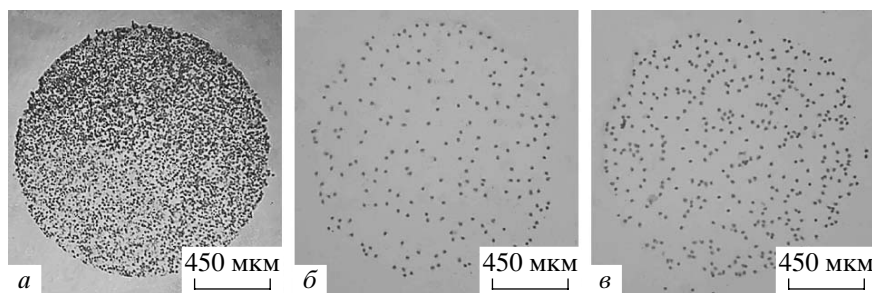


Рис. 1. Плотность заполнения связавшимися клетками поверхности пятен биочипа с антителами анти-CD45 (а), анти-CD16 (б) и анти-CD8 (в). Увеличение $\times 37.5$.

ных антител, смешанных с инактивированной нагреванием человеческой сывороткой (10% по объему). Сверху помещали биочип таким образом, чтобы его края опирались на ограничительные пластины; при этом сторона биочипа со связанными клетками была обращена вниз. Биочип мог быть дополнительно закреплен полосками скотча, наклеенными поверх него. После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре биочип отделяли от предметного стекла, трижды ополаскивали PBS и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа. Каждое пятно фотографировали при обычном и ультрафиолетовом освещении с помощью цифрового фотоаппарата Kodak DC260, смонтированного на флуоресцентном микроскопе Leica DM/RBE ("Leica", Германия).

Окраска и морфологическое исследование клеток. Препараты высушивали, фиксировали метанолом (10 мин) и окрашивали по Романовскому–Гимзе. После завершения окраски биочипы промывали водой, высушивали и наклеивали на предметные стекла. С помощью светового микроскопа проводили морфологическое исследование клеток, связанных в области каждого пятна биочипа.

Определение содержания клеток, экспрессирующих различные поверхностные антигены. Каждое пятно биочипа фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата "Olimpus SP-350", смонтированного на микроскопе "OPTON" ("OPTON", Германия).

Для определения плотности связывания клеток на микрофотографии каждого пятна выбирали не менее трех участков установленной площади (например, 100×100 мкм), в которых проводили подсчет клеток. Рассчитывали среднее арифметическое значение плотности связывания клеток в пятне.

Для сравнения этих результатов с данными, полученными методом проточной цитофлуориметрии (проточный цитофлуориметр FACS Calibur ("Becton Dickinson", США), плотность заполнения поверхности пятен связавшимися клетками выражали в процентах. За 100% принимали среднюю

плотность связывания клеток в области пятен с антителами анти-CD45.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение с помощью биочипов процентного содержания лимфоцитов, экспрессирующих различные CD-антигены, в крови здорового донора. С помощью биочипа, содержащего указанные выше антитела, исследовали суспензию лимфоцитов, выделенных из крови здорового донора. После инкубации биочипа с суспензией лимфоцитов, отмывки неспецифически связанных клеток, фиксации и окраски на подложке было отчетливо видно связывание клеток в области пятен с иммобилизованными антителами. Вне пятен связывание клеток практически отсутствовало. Плотность связывания клеток на поверхности пятен с различными антителами существенно различались (рис. 1).

Полученные данные позволяют предположить, что плотность связывания клеток в области пятен биочипа отражает концентрацию в образце клеток, экспрессирующих различные CD-антигены. Для проверки данного предположения мы подсчитали клетки в области пятен с различными антителами и вычислили относительную плотность заполнения пятен клетками (%). Как и следовало ожидать, максимальная плотность связывания клеток наблюдалась в пятне с антителами анти-CD45, поскольку все исследуемые клетки несут на поверхности антиген CD45.

Относительную плотность связывания клеток в области пятен с различными антителами, сравнивали с содержанием в крови того же донора лимфоцитов, экспрессирующих соответствующие поверхностные антигены, определенным с помощью проточной цитофлуориметрии. Следует заметить, что при анализе на биочипах количество определяемых поверхностных антигенов было значительно больше, чем в случае клинических анализов, выполненных с помощью проточной цитофлуориметрии. Можно видеть (рис. 2), что результаты определения относительного содержания клеток, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD16,

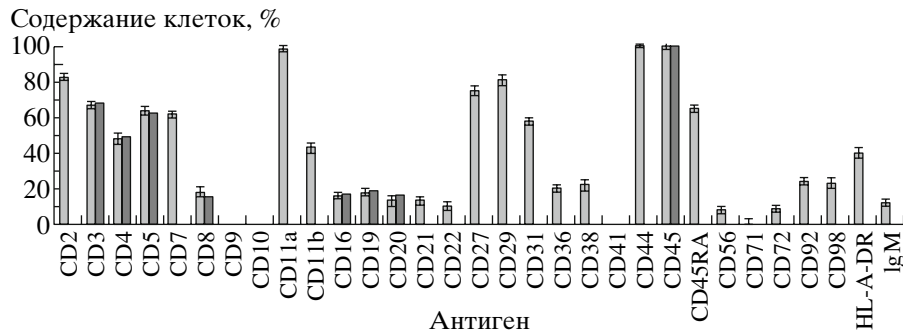


Рис. 2. Сопоставление результатов анализа лимфоцитов здорового донора с помощью биочипов (светлые столбики) и проточной цитофлуориметрии (темные столбики).

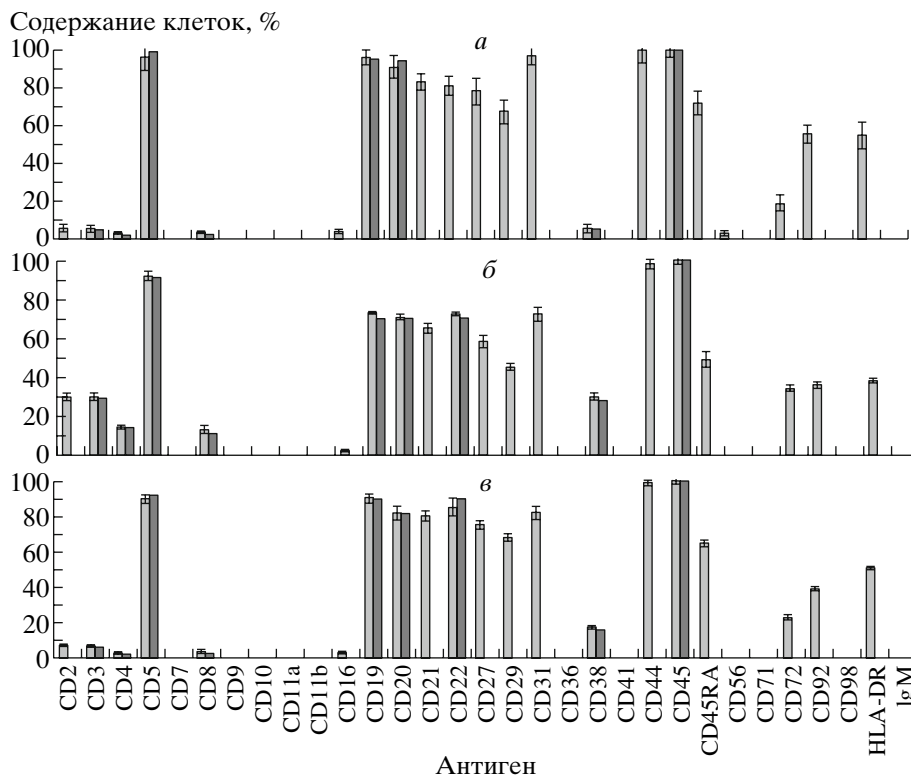


Рис. 3. Сопоставление результатов анализа клеток троих больных хроническим В-лимфолейкозом, проведенного с помощью биочипов (светлые столбики) и проточной цитофлуориметрии (темные столбики). Больной А (а); больная К (б); больная С (в).

CD19, CD20, CD45, двумя различными методами, хорошо совпадают между собой [21].

Таким образом, плотность (%) заполнения лимфоцитами пятен биочипа с антителами, специфичными к каждому из CD-антигенов, соответствует процентному содержанию в суспензии клеток, экспрессирующих эти антигены.

Определение с помощью биочипов процентного содержания лимфоцитов, экспрессирующих различные CD-антигены, в крови больных хроническим В-лимфолейкозом. Изменение нормально-

го соотношения клеток, экспрессирующих различные CD-антигены, является одним из важнейших признаков в диагностике опухолей системы крови. С помощью биочипов исследованы лимфоциты, выделенные из периферической крови троих больных В-ХЛЛ. Полученные результаты сравнивали с данными клинических исследований, проведенных методом проточной цитофлуориметрии (рис. 3). Видно, что полученные с помощью биочипов и проточной цитофлуориметрии данные, представленные на рис. 3, хорошо соответствуют друг другу. Анализ на биочипах также позволяет определять

значительно большее количество поверхностных антигенов.

Окраска и морфологическое исследование клеток, связанных на биочипах. Использование для изготовления биочипов прозрачных подложек позволяет применять к связанным на биочипах клеткам стандартные методы окрашивания и проводить морфологическое исследование, что дает возможность определить, клетки какого типа экспрессируют тот или иной антиген. Это особенно существенно, когда один и тот же антиген присутствует на клетках разных типов. На рис. 4а показаны лимфоциты здорового донора, связавшиеся на биочипе с антителами анти-CD45, окрашенные по Романовскому–Гимзе. На микрофотографии хорошо различимы большие и малые зрелые лимфоциты.

На рис. 5 представлены лимфоциты больного В-ХЛЛ, связавшиеся в области пятен биочипа с антителами анти-CD5 и анти-CD19. Высокое (до 90%) содержание лимфоцитов, одновременно экспрессирующих антигены CD5 и CD19, типично для В-ХЛЛ. Клетки, связавшиеся с антителами анти-CD5 и анти-CD19, морфологически являются зрелыми лимфоцитами, что также характерно для ХЛЛ.

Определение коэкспрессии антигенов с помощью окраски связанных клеток флуоресцентно меченными антителами. Определение одного антигена далеко не всегда позволяет однозначно установить тип клетки. Поэтому в тех случаях, когда требуется точная идентификация клетки, необходимо определять коэкспрессию двух или более антигенов. С этой целью можно использовать дополнительную окраску связанных на биочипе клеток флуоресцентно меченными антителами.

Лимфоциты здорового донора, связавшиеся на трех разных биочипах, содержащих антитела анти-CD4, анти-CD8, анти-CD19, анти-CD45 и анти-CD56, были окрашены FITC-мечеными антителами анти-CD3, анти-CD16 и анти-CD20, позволяющими идентифицировать Т-, В- и NK-лимфоциты соответственно. При исследовании с помощью флуоресцентной микроскопии не выявлено неспецифического связывания лимфоцитов (таблица, рис. 6в, г). Хорошо определялась нормальная коэкспрессия антигенов CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD45, CD19/20, CD20/CD45, CD16/CD45 и CD16/CD56.

На рис. 6а, б представлены микрофотографии лимфоцитов, связанных на биочипе в области пятна с антителами анти-CD19. Лимфоциты окрашены флуоресцентно меченными антителами анти-CD20. При сравнении микрофотографий, выполненных при обычном (рис. 6б) и ультрафиолетовом (рис. 6а) освещении, видно, что флуоресцентно меченными антителами анти-CD20 окрасились все клетки, связавшиеся на данном участке пятна биочипа. Коэкспрессия CD19 и CD20 типична для В-лимфоцитов.

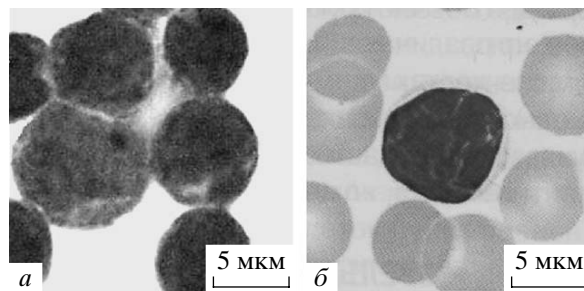


Рис. 4. Большие и малые зрелые лимфоциты здорового донора, связавшиеся на биочипе в области пятна с антителами анти-CD45 (а) Окраска по Романовскому–Гимзе. Увеличение $\times 1350$. Зрелый лимфоцит, окрашенный в мазке (микрофотография из атласа [22]) (б).

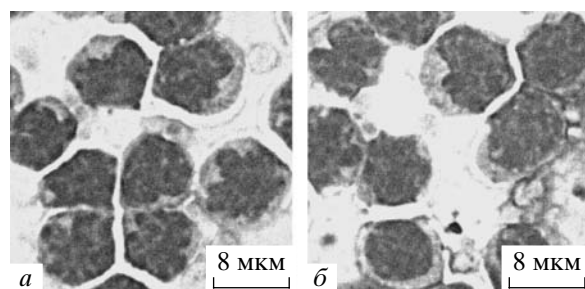


Рис. 5. Лимфоциты больного хроническим В-клеточным лимфолейкозом, связавшиеся в области пятен с антителами анти-CD5 (а) и анти-CD19 (б). Окраска по Романовскому–Гимзе. Увеличение $\times 1350$.

Лимфоциты, связавшиеся в области пятна с антителами анти-CD4 (рис. 6г), не окрашивались флуоресцентно меченными антителами анти-CD20 (рис. 6в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение с помощью биочипов процентного содержания клеток, экспрессирующих различные CD-антигены. Хорошее соответствие результатов определения процентного содержания клеток с различными CD-антигенами, полученных с помощью биочипов и методом проточной цитофлуориметрии (рис. 2 и 3), свидетельствует об адекватности данной методики. При инкубации с клетками и последующей отмывке биочипа на его поверхности остаются только связавшиеся с антителами клетки. Плотность заполнения клетками пятен с антителами пропорциональна содержанию в суспензии клеток, имеющих соответствующие этим антителам антигены.

При исследовании лимфоцитов, выделенных из крови больных, отмечено резкое уменьшение количества клеток, экспрессирующих поверхностные антигены, типичные для Т-клеток (CD2, CD3, CD4, CD7). Количество же клеток, экспрессирую-

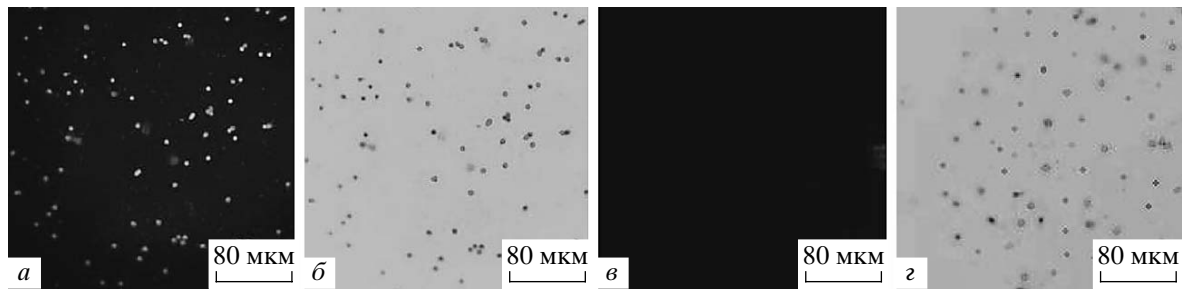


Рис. 6. Окрашивание FITC-мечеными антителами анти-CD20-лимфоцитов здорового донора, связавшихся с биочипом. Увеличение $\times 150$. *а* – Окрашивание клеток, связавшихся в области пятна с антителами анти-CD19 (коэкспрессия CD19/CD20); микрофотография выполнена при ультрафиолетовом освещении. *б* – Тот же фрагмент пятна с антителами анти-CD19 (микрофотография выполнена в проходящем белом свете). *в* – Отсутствие окраски клеток, связавшихся в области пятен с антителами анти-CD4 (микрофотография выполнена при ультрафиолетовом освещении). *г* – Тот же фрагмент пятна с антителами анти-CD4 (микрофотография выполнена в проходящем белом свете).

щих В-клеточные поверхностные антигены (CD19, CD20, CD21, CD22), напротив, повышено, что свидетельствует о В-клеточной природе исследуемых опухолей. Поскольку у всех троих больных около 90% клеток экспрессировали CD5, а доля CD19 + клеток составляла от 73 до 97%, можно утверждать, что большинство лимфоцитов коэкспрессировали CD5 / CD19.

Анализ с применением биочипов позволяет одновременно определять гораздо больше разных поверхностных антигенов (на разных клетках) по сравнению с проточной цитофлуориметрией. Кроме того, проведение анализа на биочипах не требует дорогостоящего оборудования. Следует заметить, однако, что с помощью биочипа (без дополнительной окраски флуоресцентно мечеными антителами) на каждой отдельно взятой клетке (по факту связывания) можно определить только один антиген, в то время как методом проточной цитофлуориметрии можно одновременно определять несколько антигенов на каждой клетке.

Из рис. 4 и 5 видно, что к связанным на биочипе клеткам могут быть применены стандартные протоколы фиксации и окрашивания, используемые для окраски клеток в мазке. Получаемые изображения позволяют надежно различать основные типы клеток. Следует заметить, что структура хроматина несколько различается у клеток, окрашенных в мазке (рис. 4б) и на биочипе (рис. 4а). По всей вероятности, это связано с тем, что при приготовлении мазка происходит более выраженное распластывание клеток. Возможно, в дальнейшем при усовершенствовании протокола эксперимента эти различия удастся уменьшить или полностью устранить.

Клетки, связанные с иммобилизованными антителами, специфичными к одному из антигенов, могут быть затем окрашены флуоресцентно мечеными антителами, специфичными к другому антигену. Сравнение фотографий пятен биочипа, сделанных при обычном и ультрафиолетовом освещении (рис. 6), позволяет определить, какая

Определение коэкспрессии антигенов с помощью окрашивания флуоресцентно мечеными антителами лимфоцитов здорового донора, связанных в области различных пятен биочипов

FITC-меченые антитела, использованные для окраски связанных клеток	Антитела, иммобилизованные на биочипе				
	анти-CD4	анти-CD8	анти-CD19	анти-CD45	анти-CD56
Анти-CD3 FITC	+	+	–	+	–
Анти-CD16 FITC	–	–	–	+	+
Анти-CD20 FITC	–	–	+	+	–

Примечание. Знаком (+) отмечено наличие окрашивания; знаком (–) отсутствие окрашивания.

часть связанных в области данного пятна клеток экспрессирует второй антиген.

Данный подход может быть использован для выявления диагностически значимых вариантов коэкспрессии антигенов в клетках различных опухолей системы крови. В перспективе возможно использование окраски клеток смесью нескольких антител, меченных различными флуоресцентными метками. Это позволит определять экспрессию нескольких антигенов одновременно. Данный подход в перспективе может быть использован для определения ядерных и цитоплазматических антигенов у связавшихся с биочипом клеток.

Таким образом, описанные в данной работе биочипы позволяют совместить определение поверхностных антигенов лимфоцитов с морфологическим исследованием.

Морфологическое исследование позволяет установить, какие именно клетки связались в области каждого из пятен биочипа.

При дополнительной окраске флуоресцентно меченными антителами можно выявить коэкспрессию нескольких антигенов на каждой из связанных клеток.

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. *Haab B.B.* Antibody arrays in cancer research // *Mol. Cell. Proteomics*. 2005. V. 4. P. 377–383.
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., Chong Kwan 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. *Angenedt P., Glökler 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.
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. *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.
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 leukemia 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. *Campana D., Behm F.G.* Immunophenotyping of leukemia // *J. Immunol. Methods*. 2000. V. 243. P. 59–75.
20. *Abdo M., Irving B., Hudson P., Zola H.* Development of a cluster of differentiation antibody-based protein microarray // *J. Immunol. Methods*. 2005. V. 305. P. 3–9.
21. *Шшишкин А.В., Овчинина Н.Г.* Разработка иммунологических биочипов для исследования нормальных и опухолевых клеток крови // *Материалы конференции “Биомедицинская инженерия-2007”*. Пушкино, 2007. С. 11–16.
22. *Опухоли лимфатической системы / Под ред. Воробьева А.И. и Кременецкой А.М. М.: Ньюдиамед, 2007. 32 с.*

Immunological Biochips for Parallel Studies of Cell Morphology and Surface Antigens

**A. V. Shishkin^{1,2}, I. I. Shmyrev¹, S. A. Kuznetsova¹, N. G. Ovchinina^{1,2}, A. A. Butylin^{1,3},
F. I. Ataulhanov^{1,3,4}, A. I. Vorobyev¹**

¹ *National Research Center for Hematology, Novozykovskiy proezd, 4a, 125167 Moscow, Russia,
fax: (495) 612-42-52; e-mail: shishkin_lab@mail.ru*

² *Izhevsk State Medical Academia, ul. Kommunarov 2812, Izhevsk, Russia,
fax: 8-(3412) 65-81-67*

³ *Lomonosov Moscow State University, Physical Department, Leninskie gory, 119991 Moscow, Russia,
fax: (495) 939-01-26*

⁴ *Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, ul. Kosygina 4, 117977 Moscow, Russia*

In the present work we describe a biochip that allows the detection of 26 cluster differentiation (CD) antigens, HLA-DR, and IgM antigens on lymphocyte surface. The biochip consists of antibodies (IgG) specific for the selected antigens, immobilized on transparent plastic surfaces in 1.5-mm spots. We have used these biochips to investigate normal and tumor lymphocytes. We demonstrate that these biochips can be used to determine the percentage of the cells expressing different surface antigens in the lymphocyte suspension. The data obtained are in a good agreement with the results of the flow cytometry. The transparent biochip support permits to apply standard staining methods to the cells bound to the biochip and to study their morphology.