

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ МАРКЕРОВ НА СРЕЗАХ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЛИМФОУЗЛОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК

© *Е. П. Рафаловская-Орловская*,¹ *Л. А. Горгидзе*,¹ *А. А. Gladких*,¹
С. М. Таугер,¹ *И. А. Воробьев*^{1—3, *}

¹ *Федеральное государственное бюджетное учреждение Гематологический научный центр
Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Москва,*

² *Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

³ *Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;*

** электронный адрес: ivorobjev@mail.ru*

В работе исследовали возможности иммунофлуоресцентного выявления поверхностных антигенов на лимфоидных клетках с помощью квантовых точек. Для оптимизации выявления квантовых точек была проведена модернизация флуоресцентного микроскопа, что позволило получать изображения от различных квантовых точек с одного среза. Получаемые препараты сохраняют стабильную флуоресценцию свыше 2 нед. и практически не выцветают при непрерывном облучении ртутной лампой в течение десятков минут. Получены прямые конъюгаты первых антител с квантовыми точками, которые при использовании в двойном окрашивании срезов, полученных с замороженной ткани, показали высокую специфичность и чувствительность. Благодаря высокой стабильности флуоресценции нанокристаллов данный метод позволяет использовать его в диагностических целях для исследования коэкспрессии поверхностных антигенов на срезах при лимфомах. Показано, что «затекание» флуоресцентного сигнала от квантовых точек в соседние каналы, максимум которых различается всего на 40 нм, не превосходит 8 %, что делает практически ненужной спектральную компенсацию.

Ключевые слова: иммуногистохимические исследования, иммунофлуоресцентный метод, квантовые точки, дифференциальная диагностика лимфом.

Принятые сокращения: ЛКМЗ — лимфома из клеток мантийной зоны.

Имуногистохимическое окрашивание срезов ткани лимфатических узлов при поражении различными формами лимфопролиферативных заболеваний проводят различными способами. Для диагностических целей в основном используют метод непрямого окрашивания с использованием антител, конъюгированных с ферментативным комплексом (пероксидазным или фосфатазным), который при взаимодействии с хромогеном дает окрашенный продукт. Данный метод позволяет получать постоянные препараты для световой микроскопии (Sinclair et al., 1986), однако он позволяет выявлять только один антиген на одном срезе. В некоторых случаях для определения локализации двух антигенов в одной клетке проводят двойное окрашивание с использованием двух этих реакций и получают двухцветный препарат с коричневой и красной окрасками (Pereira et al., 2006). Данный метод двойного окрашивания неприменим в случаях, когда определяемые антигены локализируются в одной и той же области клетки, так как цветные продукты окрашивания накладываются друг на друга и не могут быть зарегистрированы в виде отдельных цветов (Van der Loos et al., 1993).

Наиболее широко используемый метод двойного окрашивания — выявление антигенов с помощью флуоресцирующих красителей, выполняемый на основе метода Кунса — антителами, конъюгированными с флуорохромом (Weller, Coons, 1954). Используется также способ визуализации антигена с помощью флуорохромов в сочетании с ферментативными реакциями, катализирующими депонирование флуоресцирующего субстрата, что позволяет значительно усилить сигнал (Roth, Baskin, 2005). Ограничения использования методов иммунофлуоресценции при анализе коэкспрессии связаны с коротким временем жизни сигнала, испускаемого органическими флуорохромами, а также с непродолжительным сроком хранения препаратов (Schrock et al., 1996).

В отличие от органических флуорохромов полупроводниковые нанокристаллы (квантовые точки) значительно более стабильны (Sukhanova et al., 2002), поэтому их возможно применять для одновременной детекции в многопараметрических (многоцветных) системах и соответственно для одновременного мечения нескольких мишеней внутри клеток или на их поверхностях (Wu et al., 2003; Fountaine et al., 2006; Xing et al., 2006; Sweeney et al.,

2008; Liu et al., 2010). Основное применение в медицине квантовые точки нашли в исследованиях злокачественных опухолей для выявления отдельных опухолевых клеток в биопсийных образцах, где была показана диагностическая значимость их использования (Marchal et al., 2008; Sukhanova, Nabiev, 2008).

В настоящей работе продемонстрирована возможность проведения двойного окрашивания с помощью квантовых точек на срезах лимфоузлов со злокачественной опухолью и получены комбинированные изображения двойного окрашивания с демонстрацией наличия или отсутствия коэкспрессии двух маркеров, колокализующихся на поверхности опухолевых клеток. Одновременная детекция двух маркеров и более на одном срезе дает широкие возможности для использования этого метода в целях диагностики лимфопролиферативных заболеваний.

Материал и методика

Иммуногистохимическое окрашивание опухолевого материала проводили на парафиновых срезах и криосрезах. Для изготовления парафиновых срезов был взят биопсийный материал (подчелюстные лимфоузлы) от 5 больных с диагнозом лимфома из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ, 4 больных с центроцитарным вариантом ЛКМЗ и 1 — с бластоидным вариантом, возраст больных от 55 до 70 лет). Лимфоузлы фиксировали в 4%-ном забуференном формалине, обезвоживали в изопропиловом спирте, в который добавляли октилфенокси-полиэтоксигидроксиэтанол (Тритон X15, Helicon, Россия) в соотношении 1 : 10 000 (Извозчиков и др., 1997), и заключали в парафин. Срезы толщиной 4—5 мкм депарафинизировали в толуоле и спиртах понижающейся концентрации. Демаскирование антигена проводили путем тепловой обработки при высоком давлении в скороварке 4 мин в 0.01 М Трис-НСl буферном растворе с ЭДТА (рН 8.9) или цитратном буферном растворе (рН 6.0). Буферный раствор выбирали в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя по использованию антител.

Все типы окрашивания парафиновых срезов в целях прямого сравнения, а также для исследования фотостабильности конъюгатов антител с наночастицами проводили на одном лимфоузле с центроцитарным вариантом ЛКМЗ.

Для непрямого иммуногистохимического окрашивания парафиновых срезов использовали следующие антитела. Первые антитела, специфичные к клеточным антигенам: CD45 (mouse anti-human CD45, клон 2B11 + PD7/26; Dako, Дания), CD20 (mouse anti-human CD20, клон L26; Dako, Дания), CD3 (rabbit anti-human CD3, поликлональные; Dako, Дания) и CD5 (rabbit anti-human CD5, клон SP19; Labvision, США); антитела были использованы в разведении 1 : 100. Вторые антитела: козы антимышинные IgG, конъюгированные с Alexa-Fluor 488 (Invitrogen, США), разведение 1 : 100, конъюгаты с квантовыми точками — козы антикроличьи IgG с Qdot 565 (Invitrogen, США) и козы антимышинные IgG с Qdot 605 (Invitrogen, США), разведение 1 : 50.

Иммунопероксидазное окрашивание парафиновых срезов проводили по стандартной системе EnVision™ с использованием растворов UltraVision LP Value Detection System (LabVision Inc., США) (Sabattini et al., 1998).

Иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов проводили по стандартной методике (Сафитдинова, 2008).

Для иммунопероксидазного окрашивания на CD45, иммунофлуоресцентного одиночного окрашивания на CD20 и двойного иммунофлуоресцентного окрашивания на CD20 и CD3 демаскирование осуществляли в 0.1 М Трис-НСl буферном растворе с ЭДТА (рН 9.0). Для двойного ммунофлуоресцентного окрашивания на CD20 и CD5 демаскирование осуществляли в 0.1 М цитратном буферном растворе, рН 6.0. После демаскирования срезы охлаждали до комнатной температуры и помещали в 0.01 М PBS, рН 7.4.

Для иммуногистохимического исследования на криосрезах использовали лимфоузлы пациентов с диагнозом метастазы рака в лимфоузлы и центрофолликулярная лимфома. С диагнозом метастазы рака были исследованы лимфоузлы от 3 больных: 1-й больной — аденокарцинома толстой кишки, мужчина, 63 года, внутрибрюшинный лимфоузел; 2-й больной — аденокарцинома молочной железы, женщина, 40 лет, подмышечный лимфоузел; 3-й больной — аденокарцинома предстательной железы, мужчина, 53 года, подмышечный лимфоузел. Во всех трех случаях наблюдалась низкая дифференциация опухоли. С диагнозом центрофолликулярная лимфома были исследованы лимфоузлы от 5 больных, все больные имели первую морфологическую градацию заболевания. Локализация лимфоузлов в трех случаях — шейная, в двух случаях — надключичная, возраст больных составлял от 33 до 68 лет.

Пластинку лимфоузла толщиной 2 мм замораживали в охлажденном с помощью жидкого азота n-гексане. Замороженный блок примораживали к криокассете и изготавливали из него криостатные срезы толщиной 4—5 мкм. Срезы фиксировали в растворе Glyo-Fixx (Thermo Shandon, Великобритания) в течение 3 мин, а затем отмывали в растворе PBS 3 раза по 4 мин.

Для окрашивания замороженных срезов были выбраны два лимфоузла: подмышечный лимфоузел с метастазами аденокарциномы предстательной железы, с четкой визуализацией опухолевого очага на срезе, и шейный лимфоузел с поражением центрофолликулярной лимфомой.

Для прямого иммунофлуоресцентного окрашивания криосрезов с применением квантовых точек были выбраны Qdot 565, Qdot 655 и первые антитела, специфичные к клеточным антигенам: mouse anti-human CD45 (клон H7; BD Biosciences, США), mouse anti-human CD19 (клон LT19; Abcam, Великобритания) и Keratin, Pan Ab-1 (смесь клонов AE1 и AE2; LabVision Inc., США) — антитела к суперсемейству кислых кератинов (56.5/50/50'/48/40 кДа) и антитела к суперсемейству щелочных кератинов (65—67/64/59/58/56/52 кДа). Антитела к CD45 конъюгировали с Qdot 565 (CD45/Qdot 565), антитела к CD19 — с Qdot 655 (CD19/Qdot 655), антитела к кератину (Keratin, Pan) — с Qdot 655 (Keratin/Qdot 655). Титр конъюгатов антител составил для CD45/Qdot565 и Keratin/Qdot 655 1 : 100, для CD19/Qdot 655 — 1 : 50.

Конъюгацию осуществляли на основе коммерческого набора Qdot® Antibody Conjugation Kits (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом, модифицированным в нашей лаборатории. Модифицирование протокола конъюгации проводили для стабилизации конъюгатов и предотвращения их слипания в растворе. Так как инкубация в PBS приводит к появлению крупных агрегатов квантовых точек, вместо PBS был использован буферный

раствор TBE с более высоким значением pH — 8.3, что привело к снижению количества агрегатов наночастиц и повышению уровня «сигнал—шум» при анализе изображения. Далее конечный конъюгат концентрировали на колонке с отсечкой для фильтра 50 кДа до объема 20 мкл и для окрашивания разводили в 200 мкл буфера TBE с 0.1 % BSA и 0.01 % NaN_3 .

Прямое иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов ткани лимфоузла двумя специфическими первыми антителами, конъюгированными с квантовыми точками, осуществляли последовательно при комнатной температуре в соответствии с протоколом Invitrogen, модифицированным в нашей лаборатории, с целью получения стабильной двойной окраски прямыми конъюгатами антител и квантовых точек. Преимущество модифицированного протокола заключается в получении равномерно окрашенных срезов и повышении уровня «сигнал—шум», что соответственно приводит к улучшению качества получаемого изображения. Препараты отмывали 0.5%-ным BSA на PBS 3 раза по 4 мин, блокировали неспецифическое связывание 2%-ным BSA на PBS 1 ч, повторяли отмывку 0.5%-ным BSA и инкубировали с первыми конъюгатами антител 1 ч. Далее отмывки и блокировку повторяли и инкубировали срезы со вторыми конъюгатами антител 1 ч, после чего отмывали 0.5%-ным BSA, затем PBS 6 раз по 5 мин и заключали в Мовиол.

Изображения препаратов, окрашенных конъюгатами антител с органическим флуорофором Alexa-Fluor 488, были получены с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse E600 (Япония) с объективами Plan 4×/0.10, Plan 10×/0.25, Plan 20×/0.40, Plan Fluor 40×/0.75, Plan 100×/1.25 oil. В качестве источника освещения использовали ртутную лампу HBO-103W2. Для анализа препаратов, окрашенных конъюгатами антител с Alexa-Fluor 488 и конъюгатами антител с флуоресцентными квантовыми точками, была произведена модернизация данного микроскопа. Для возбуждения флуоресценции квантовых точек использовали блок светофильтров, состоящий из возбуждающего фильтра 435/40, дихроического зеркала 510RLP и запирающего светофильтра 500LP (Semrock Inc., США), что позволило детектировать люминесценцию всех типов квантовых точек. Перед охлаждаемой ПЗС-камерой на тубусе было установлено моторизированное колесо Standa 10MWA168 со сменными запирающими узкополосными светофильтрами BP525/20, BP565/24, BP605/15, BP655/15 и BP712/20, каждый из которых пропускал к матрице камеры свет люминесценции только от одного типа квантовых точек. На созданную экспериментальную установку получен патент на полезную модель № 103653. Запись изображения проводили с помощью охлаждаемой ПЗС-камеры Photometrix CoolSnap HQ2 (Photometrics Ltd., США), управляемой программой NIS-Elements BR 3.0 (Nikon, Япония). Максимально допустимую экспозицию определяли по насыщению матрицы камеры в соответствующем канале флуоресценции. Для оценки эффекта «затекания» сигналов съемку производили с одинаковыми выдержками последовательно с тремя запирающими светофильтрами. Полученные 16-битные изображения обрабатывали в программе MetaMorph (Metamorph Inc., США), окончательную обработку и монтаж изображений проводили в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc., США).

Для сравнения стабильности флуоресценции органических флуорохромов с наночастицами

были выбраны парафиновые срезы биопсийного материала от большого с ЛКМЗ, окрашенные на CD45 непрямой иммунофлуоресцентным методом с применением вторых антител, конъюгированных с Alexa-Fluor 488 или квантовыми точками Qdot 605 и Qdot 565. Срезы непрерывно выжигали под лучом ртутной лампы в течение 2 ч под объективом Plan 20×/0.40. Наборы светофильтров для упомянутых выше красителей были следующими. Для Alexa-Fluor 488 : возбуждающий светофильтр 485/22, запирающий светофильтр 535/35, дихроическое зеркало 505RLP (XF23 filter set, Omega Optical Inc., США); для Qdots: возбуждающий светофильтр 435/40, запирающий светофильтр 500LP, дихроическое зеркало 510RLP (Qdots Semrock standard set). Съемку производили автоматически с интервалом в 30 с, для подбора оптимального режима съемку вели при различных фотоэкспозициях — 1.5 с для Qdot 605 и Qdot 565 и 9 с для Alexa-Fluor 488. По полученным в программе NIS-Elements BR гистограммам яркости изображений выбирали экспозиции, которые затем использовали для исследования динамики интенсивности флуоресценции. Полученные данные обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel, графики фотостабильности для Alexa-Fluor 488, Qdot 605 и Qdot 565 строили в программе SigmaPlot.

Результаты

Анализ «затекания» сигналов (spillover). Использование узкополосных фильтров, установленных перед камерой, позволяет эффективно записать индивидуальный сигнал от каждого типа квантовых точек. Для оценки эффекта «затекания» сигналов была проведена съемка препаратов с использованием различных запирающих светофильтров. Поскольку квантовые точки обладают высокой фотостабильностью, поправку на обесцвечивание препарата не проводили. Последовательные кадры делали при одинаковой экспозиции, которая составляла несколько секунд. Для измерения интенсивности флуоресценции в изображении выбирали квадрат размером 200 × 200 пикселей, в котором находилось несколько окрашенных клеток. Среднюю интенсивность флуоресценции рассчитывали после вычитания темного фона. Так, для QD655 «затекание» составляло 5 % для фильтра 605/15 BP и около 1.4 % для фильтра 712/20. Для более коротковолновых квантовых точек QD565 эффект «затекания» был выражен в большей степени и составлял около 8 %. Результаты измерений представлены в таблице.

Сравнение окраски иммуноферментным и флуоресцентным методами. При иммунофлуоресцентном выявлении антигена CD20 с использованием квантовых точек наблюдается окрашивание на большинстве лимфоидных клеток в виде четкого периферического ободка (рис. 1, а). При иммунопероксидазном методе выявления того же антигена при том же увеличении окрашивание также наблюдается в большинстве клеток и представляет собой коричневый ободок по периферии каждой клетки на фоне синих (окрашенных гематоксилином) ядер (рис. 1, б). Таким образом, при небольшом увеличении микроскопа характер окрашивания препарата при иммуноферментном и иммунофлуоресцентном методах сходен. При выявлении поверхностного антигена CD45 с использованием объектива 100× на срезе наблюдается окрашивание в виде ободка вокруг каждой клетки (рис. 2, а). Ободок одинаково узкий на клетках различной

Измерение «затекания» флуоресцентных сигналов от квантовых точек

Интенсивность флуоресценции, отн. ед.	Свето-фильтр	«Затекание» (spillover), в %	QD, образец
83	712/20	1.40	CD45-QD 655, криосрез, прямая окраска
5911	655/15	—	То же
299	605/15	5.06	» »
716	605/15	7.75	CD20-QD 565, парафиновый срез, непрямая окраска
9239	565/24	—	То же
774	525/20	8.37	» »

величины, что позволяет говорить о локализации антигена только на мембране клеток. Картины, выявляемые с помощью Alexa-Fluor 488 (рис. 2, а) и квантовых точек Qdot 605 (рис. 2, б), аналогичны. При иммунопероксидазном методе характер окрашивания варьирует в разных клетках (рис. 2, в). Так, в узкоплазменных лимфоцитах коричневый ободок плотно примыкает к контуру ядра (*стрелка*). В клетках с более объемной цитоплазмой окрашивание может располагаться отчетливо по периферии цитоплазмы (*двойная стрелка*). Встречаются также клетки, где окрашивание распространяется по всей цитоплазме (*головка стрелки*).

Было проведено двойное не прямое окрашивание парафинового среза лимфоузла при ЛКМЗ антителами, конъюгированными с квантовыми точками (нано-

частицами). При наложении двух изображений получено комбинированное изображение, отображающее распределение двух антигенов CD20/Qdot 605 и CD3/Qdot 565 на одном срезе (рис. 3, а). Среди преобладающей популяции CD20-положительных В-клеток (*красный цвет*) встречаются единичные CD3-положительные клетки (*зеленый цвет*), соответствующие Т-лимфоцитам.

При двойном окрашивании на CD20 и CD5 (рис. 3, б) на преобладающей части клеток окрашивание представлено в виде ободка. Это свидетельствует о мембранной локализации двух антигенов на одних и тех же клетках. Встречаются единичные клетки, несущие на поверхности только антиген CD5. Таким образом, можно заключить, что большую часть лимфоцитов на срезе представляют опухолевые клетки, которые наряду с маркером В-клеток CD20 коэкспрессируют маркер Т-клеток CD5.

Было проведено двойное прямое окрашивание криосрезом метастаза рака в лимфоузле прямыми конъюгатами антител Keratin, Pan Ab-1 и CD45 с квантовыми точками Qdot 655 и Qdot 565. Окрашенные клетки (рис. 3, в) делятся на две популяции. Одна популяция крупных и средних клеток коэкспрессирует Keratin, Pan/Qdot 565 (*красное* цитоплазматическое окрашивание). Другая популяция мелких клеток экспрессирует CD45 (*зеленое* мембранное окрашивание). Кератин-позитивные клетки являются злокачественными и растут пластом (метастатический очаг), CD45-позитивные клетки — нормальные лимфоциты, которые располагаются по периферии метастатического очага, не проникая в него. На срезе отсутствует коэкспрессия двух исследуемых маркеров.

Было проведено также двойное прямое окрашивание замороженного среза лимфоузла при центрофоликулярной лимфоме прямыми конъюгатами антител CD19 и

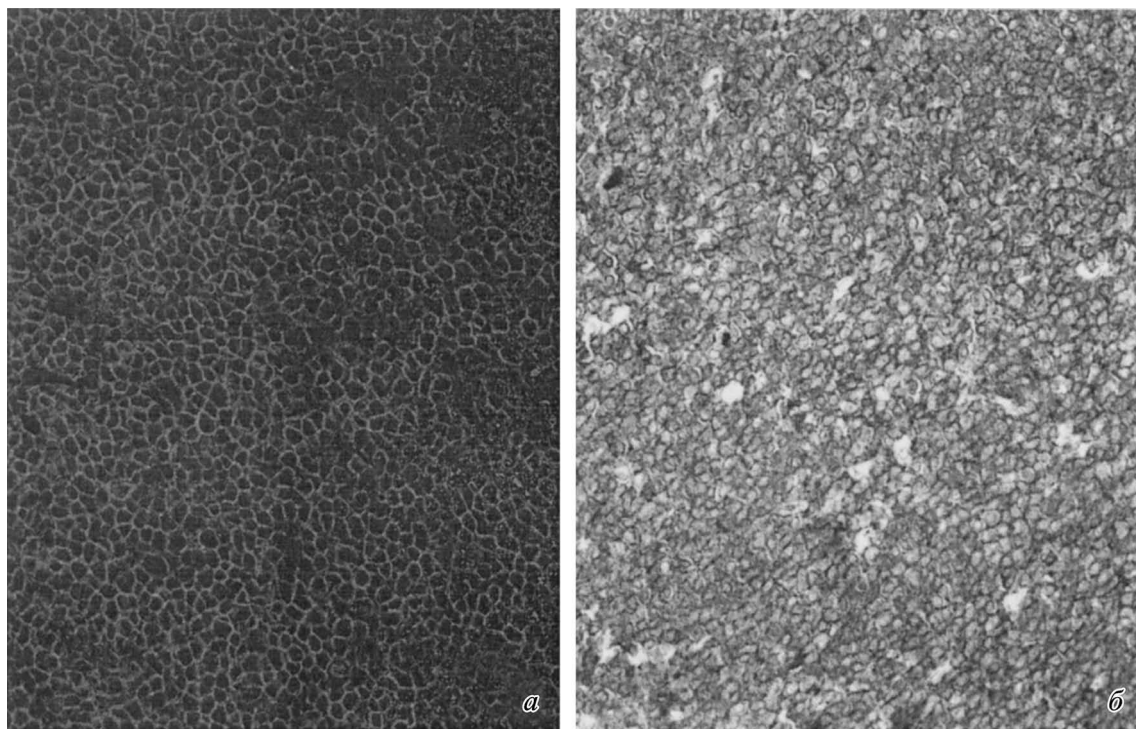


Рис. 1. Иммуногистохимическое выявление антигена CD20 на поверхности клетки (парафиновый срез лимфоузла от больного с лимфой из клеток мантийной зоны).

а — иммунофлуоресцентное окрашивание с применением квантовых точек Qdot 605, б — иммунопероксидазный метод с использованием HRP-полимера. Оба не прямых метода дают аналогичные картины. Об. 20×.

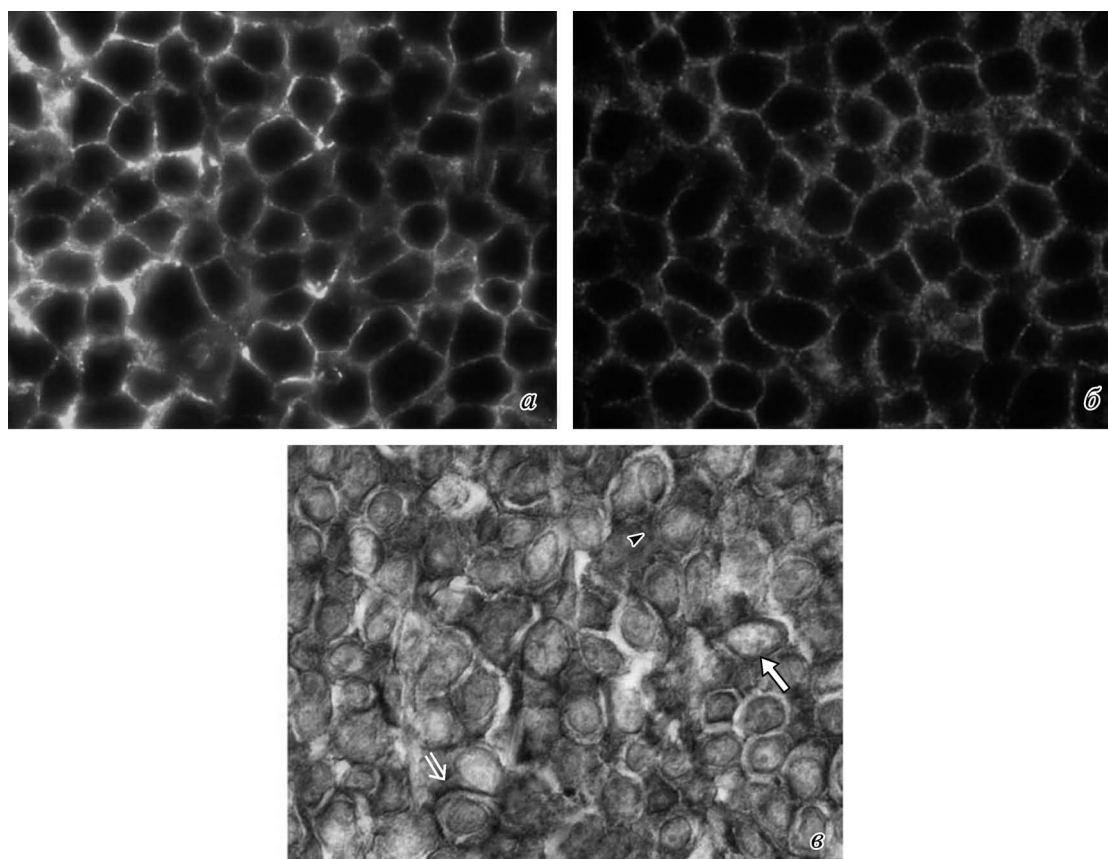


Рис. 2. Выявление поверхностного антигена CD45 с помощью стандартного флуорохрома Alexa-Fluor 488 (а), квантовых точек Qdot 605 (б) и иммунопероксидазного метода (парафиновый срез лимфоузла от больного с лимфой из клеток мантийной зоны) (в).

Мембранная локализация антигена отчетливо видна только при иммунофлуоресцентной окраске. Стрелкой показан узкоплазменный лимфоцит, окрашенная цитоплазматическая мембрана которого плотно примыкает к ядру; двойной стрелкой показан лимфоцит с широкой цитоплазмой, окрашенный ободок в этом случае располагается по периферии цитоплазмы; головкой стрелки отмечена клетка, где окрашивание распространяется по всей цитоплазме. Об. 100×.

CD45 с квантовыми точками Qdot 655 и Qdot 565 соответственно. На поверхности большинства клеток (рис. 3, з) наблюдается коэпрессия обоих антигенов — желтое окрашивание.

Анализ фотостабильности квантовых точек и органических флуорохромов. На рис. 4 показаны изменения интенсивности флуоресценции во времени для использованных в работе Qdot 605, Qdot 565 и Alexa-Fluor 488. Видно, что изменение интенсивности флуоресценции всех трех красителей происходит по убывающей экспоненте. Наиболее яркими являются Qdot 565; вторые антитела, конъюгированные с ними, через 1 ч прямого выжигания теряют примерно 26 % своей интенсивности. Интенсивность свечения антител, конъюгированных с Qdot 605, через этот же период времени падает примерно на 30 %. Антитела, конъюгированные с Alexa-Fluor 488, через 1 ч выжигания теряют примерно 55 % свечения. Через 2 ч постоянного выжигания на срезе, окрашенном Alexa-Fluor 488, флуоресцентный сигнал падал на 70 %, в то время как антитела, конъюгированные с наночастицами, сохраняли почти 60 % интенсивности флуоресценции.

Полученные нами конъюгаты антител с флуоресцирующими наночастицами сохраняли способность к окраске срезов в течение 4 мес. Препараты, окрашенные конъюгатами антител с наночастицами (непрямая и прямая окраски), пригодны для ретроспективного анализа через полго-

да. На аналогичных препаратах, окрашенных конъюгатами вторых антител с Alexa-Fluor 488, флуоресцентный сигнал не визуализируется уже через неделю.

Обсуждение

Модернизация микроскопа для дифференциальной записи изображений в различных каналах. Для записи многоцветных изображений во флуоресцентной микроскопии, как правило, используются различные блоки светофильтров. Однако широкий спектр поглощения квантовых точек позволяет возбуждать их с помощью одной и той же длины волны и для регистрации флуоресценции использовать только различные запирающие светофильтры. Поэтому мы использовали минимальную модификацию флуоресцентного микроскопа. В качестве возбуждающего набора использовали светофильтры, которые пропускают флуоресцентный сигнал от всех квантовых точек, а дополнительные запирающие светофильтры установили непосредственно перед ПЗС-камерой. Такая схема позволяет одновременно сохранить все, кроме одного, гнезда для установки блоков светофильтров для стандартных органических красителей (DAPI, FITC и TRITC), что значительно расширяет возможности использования микроскопа. Последовательное применение двух запирающих светофильтров не приво-

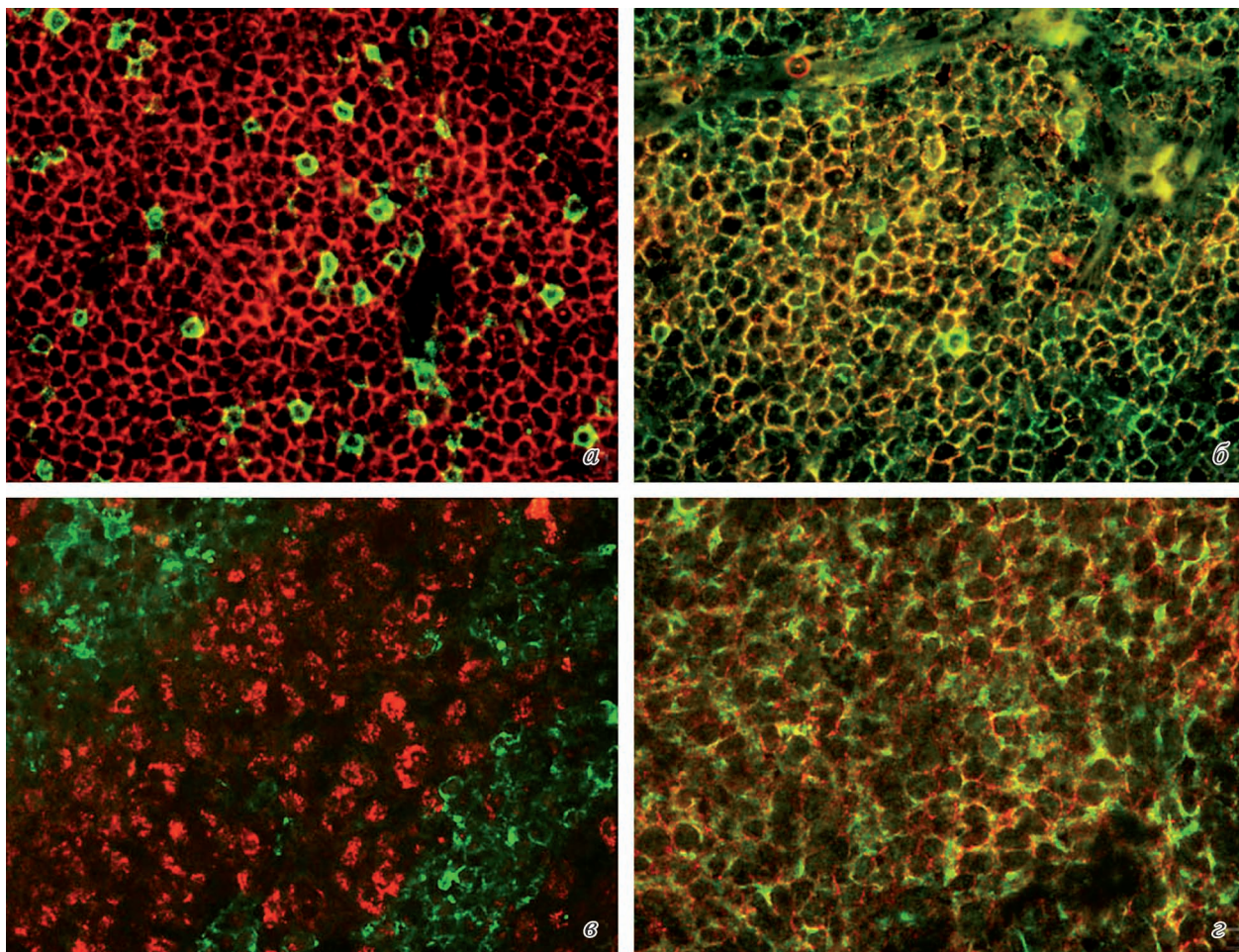


Рис. 3. Одновременная детекция двух антигенов с помощью квантовых точек на парафиновых срезах лимфоузла от больного с ЛКМЗ (а, б), на криосрезах лимфоузла с метастазом рака (в) и центрофолликулярной лимфомы (з).

а — выявление CD20 квантовыми точками Qdot 605 (красное мембранное окрашивание опухолевых клеток) и CD3 — Qdot 565 (зеленое мембранное окрашивание реактивных клеток), отсутствие коэкспрессии антигенов; б — красное мембранное окрашивание то же, что и на фото а, и выявление CD5 с помощью Qdot 565 (зеленое мембранное окрашивание опухолевых клеток), коэкспрессия двух антигенов дает желтое и оранжевое окрашивания большинства клеток; в — окрашивание на кератин конъюгатами с Qdot 655 (красное цитоплазматическое окрашивание средних и крупных раковых клеток) и на CD45 конъюгатом с Qdot 565 (зеленое мембранное окрашивание мелких лимфоидных клеток), коэкспрессии антигенов нет; з — реакция с антителами CD45/Qdot 565 (зеленое мембранное окрашивание опухолевых клеток), колокализация двух антигенов дает желтое окрашивание большинства клеток. Об. 40×.

дит к сколько-нибудь значительному ослаблению сигнала от квантовых точек и не затрудняет съемку препаратов.

Проблема «затекания» сигналов в соседние каналы флуоресценции является существенной в проточной цитометрии, где для борьбы с этим эффектом используется так называемая компенсация, аналоговая или цифровая (Shapiro, 2003). В принципе, компенсация возможна и в микроскопии, однако специализированное программное обеспечение для этого поставляется только для специальных лазерных сканирующих микроскопов (Pozarowski et al., 2006). В данной работе мы использовали цифровую компенсацию в виде вычитания кадров, снятых в соседних каналах флуоресценции :

$$I^*_{(k,j,i)} = I_{(k,j,i)} - k_1 \cdot I_{(k,j,i-1)} - k_2 \cdot I_{(k,j,i+1)},$$

где $I^*_{(k,j,i)}$ — компенсированное значение интенсивности пикселя с координатами k,j и спектральным каналом i ; $I_{(k,j,i)}$ — исходное значение интенсивности пикселя с координатами k,j и спектральным каналом i ; $I_{(k,j,i-1)}$, $I_{(k,j,i+1)}$ — абсолютные величины интенсивности пиксе-

лей с координатами k,j на снимках, снятых в соседних спектральных каналах; k_1, k_2 — эмпирически установленные коэффициенты затекания сигнала (см. таблицу), что позволяет практически полностью избавиться от засветки из соседних каналов. Данный метод соответствует аналоговой компенсации, которая применяется в проточных цитометрах (Shapiro, 2003). Поскольку максимумы флуоресценции для использованных квантовых точек располагаются на расстоянии 40—50 нм друг от друга, вопрос о величине «затекания» сигнала представляет практический интерес. Для органических красителей расстояние между максимумами флуоресценции обычно составляет более 50 нм (например, для набора DA-PI-FITC-Cy3), а применяемые светофильтры имеют расстояние между краями пропускания не менее 40 нм. В случае использованных нами квантовых точек расстояние между краями пропускания составляло всего 20—30 нм. Однако величина «затекания» сигналов оказалась на удовлетворительно низком уровне (менее 10%).

Имунофлуоресцентное окрашивание с использованием квантовых точек. В настоящей

работе продемонстрирована возможность применения квантовых точек для иммунофлуоресцентного окрашивания опухолевой лимфоидной ткани. Иммунофлуоресцентный метод показал свои преимущества перед иммуноферментным методом с точки зрения точности локализации антигена. В случае иммунофлуоресцентного сигнала локализация наиболее точно совпадает с мембранным расположением антигена, тогда как при иммунопероксидазном методе окрашивания распространяется также за пределы клеточной мембраны (внутри клетки).

Непрямое окрашивание применялось для выявления как одного антигена, так и одновременно двух антигенов при двойном окрашивании. В предыдущих работах было показано, что при одновременном выявлении нескольких антигенов на срезах (множественном окрашивании) в случае использования клонов первых антител одного вида животного наблюдался неспецифический продукт связывания (Sweeney et al., 2008). Во избежание этого при двойном окрашивании мы использовали первые антитела двух различных видов животных (мыши и кролика), а также перед каждым этапом инкубации с антителами обрабатывали срезы 2%-ным раствором BSA для блокирования неспецифического связывания антител. Таким образом, мы свели к минимуму вероятность неспецифического окрашивания, что особенно важно для выявления колокализующихся антигенов. Отсутствие неспецифического связывания было подтверждено контрастной окраской на CD20 и CD3.

Впервые нами было проведено двойное окрашивание криосрезов прямыми конъюгатами антител с квантовыми точками. Специфичность данного метода подтвердилась четким распределением антигенов между двумя клеточными популяциями — опухолевой и нормальной.

Прямой метод окрашивания предпочтителен для выявления трех и более антигенов, так как данный метод значительно менее трудоемок по сравнению с известными способами иммуногистохимии с использованием квантовых точек — двойной и тройной «сэндвич» (Sweeney et al., 2008). Кроме того, прямое окрашивание высокоспецифично благодаря уменьшению вероятности неспецифической реакции антител, которая наблюдается при последовательном многоцветном окрашивании по типу «сэндвич».

Применение квантовых точек при множественном иммунофлуоресцентном окрашивании лимфоидной ткани ранее проводилось на парафиновых срезах лимфатических узлов и миндалин (Zahavy et al., 2005; Fountaine et al., 2006). В этих работах рассматривалась только реактивно измененная ткань, где с помощью квантовых точек была продемонстрирована различная локализация В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов (Zahavy et al., 2005). Также применялась окраска на множество маркеров лимфоидных клеток, расположенных во вторичном фолликуле. Здесь авторы охарактеризовали экспрессию клеточных маркеров в клетках, расположенных в различных зонах фолликула, и показали коэкспрессию маркеров, специфичную для этих зон (Fountaine et al., 2006). Многоцветное иммуногистохимическое окрашивание с использованием квантовых точек недавно было применено при исследовании лимфогранулематоза (лимфомы Ходжкина) (Liu et al., 2010). Авторы выявляли редкие опухолевые клетки по коэкспрессии специфичных для лимфогранулематоза маркеров (CD15, CD30 и PAX-5). Однако антигены локализовались в разных частях клетки: CD15 — преимущественно в районе комплекса Гольджи, CD30 — в цитоплазме, PAX-5 — в ядре.

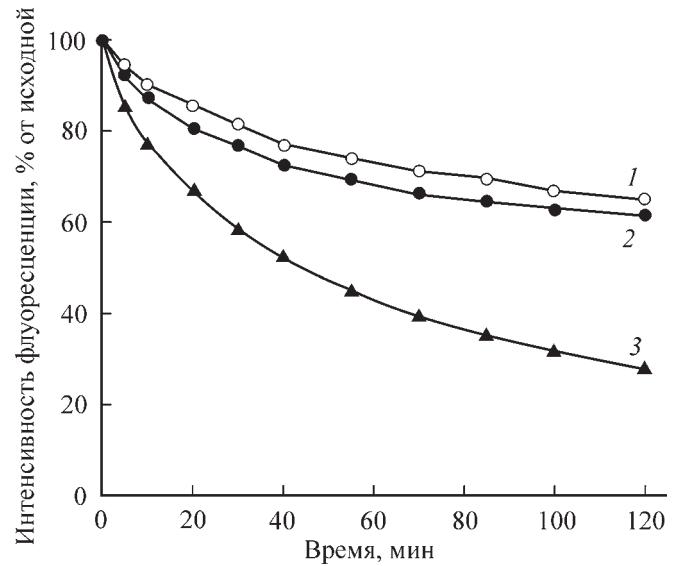


Рис. 4. Сравнение интенсивности флуоресценции наночастиц Qdot 565 и Qdot 605 с Alexa-Fluor 488 во времени при иммуногистохимическом окрашивании парафиновых срезов антителами к CD45.

Показаны кривые выжигания срезов при использовании конъюгатов вторых антител с Qdot 565 (1), Qdot 605 (2) и Alexa-Fluor 488 (3).

В нашей работе двойное окрашивание с помощью непрямого и прямого методов позволило выявить коэкспрессию маркеров с мембранной локализацией. Коэкспрессия CD20 и CD5 на поверхности лимфоцитов — важный диагностический признак, характеризующий хронический лимфолейкоз и лимфому из клеток мантийной зоны (Belaud-Rotureau et al., 2002), который с помощью квантовых точек был нами продемонстрирован впервые.

Сравнение фотостабильности наночастиц и органических флуорохромов. Одна из важнейших характеристик наночастиц, отличающих их от органических флуорохромов, — это яркость и фотостабильность (Sukhanova et al., 2002), что делает их весьма перспективными для использования в иммунофлуоресцентных исследованиях в гистологии. В результате такого окрашивания интенсивность флуоресценции полученных препаратов на протяжении нескольких часов выжигания остается практически неизменной (Ness et al., 2003; Zahavy et al., 2005; Fountaine et al., 2006). При сравнении окрашивания Qdot 525, конъюгированными со стрептавидином, с прямыми конъюгатами антител с Qdot 525 оказалось, что первые конъюгаты дают окраску в 3 раза ярче (Fountaine et al., 2006). В нашем случае при окрашивании парафиновых срезов вторыми антителами, конъюгированными напрямую с наночастицами (козы антикроличьи IgG с Qdot 565 и антимышинные IgG с Qdot 605), без авидинового или биотинового комплекса через 2 ч выжигания препарата интенсивность свечения падала на 40 %, что соответствует данным Фаунтейн с соавторами (Fountaine et al., 2006). Вторые антитела, конъюгированные с органическим флуорохромом (козы антимышинные IgG с Alexa-Fluor 488), в наших экспериментах демонстрировали 70%-ную потерю интенсивности свечения. Учитывая то, что флуорохром Alexa-Fluor 488 в несколько раз стабильнее других органических флуорохромов (Panchuk-Voloshina et al., 1999), конъюгаты вторых антител с наночастицами даже без авидин-стрептавидинового комплекса представляют собой достаточно ста-

бильный флуорохром, пригодный для дифференциальных иммунофлуоресцентных исследований.

Таким образом, в работе мы показали преимущества использования квантовых точек при двойном иммунофлуоресцентном окрашивании, которое позволяет детектировать коэкспрессию клеточных маркеров в случае их колокализации на мембране, чего в предыдущих работах не было описано. Такая возможность предполагает широкие перспективы в использовании множественного окрашивания в диагностике неходжкинских лимфом, поскольку многие из них характеризуются определенным сочетанием экспрессии ряда маркеров с мембранной локализацией. Необходимо также учитывать высокую стабильность получаемых препаратов, что позволяет проводить многократный просмотр препарата для диагностического анализа.

Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов лимфоузлов с лимфомами с помощью квантовых точек открывает широкие возможности для применения данного метода в ускоренных диагностических исследованиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (Государственный контракт 02.512.11.2296) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-01517а и 11-04-01749а).

Список литературы

- Извозчиков И. Б., Ключкова О. В., Криволапов Ю. А., Ермилов А. Н. 1997. Способ подготовки биологического образца к гистологическому исследованию. Патент № 208971.
- Сафитдинова А. Ф. 2008. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие. СПб.: СОЛЮ. 72 с.
- Belaud-Rotureau M. A., Parrens M., Dubus P., Garroste J. C., De Mascarel A., Merlio J. P. 2002. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immuno-histochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Mod. Pathol.* 15 : 517—525.
- Fontaine T. J., Wincivitch S. M., Geho D. H., Garfield S. H., Pittaluga S. 2006. Multispectral imaging of clinically relevant cellular targets in tonsil and lymphoid tissue using semiconductor quantum dots. *Mod. Pathol.* 19 : 1181—1191.
- Liu J., Lau S. K., Varma V. A., Kairdolf B. A., Nie S. 2010. Multiplexed detection and characterization of rare tumor cells in Hodgkin's lymphoma with multicolor quantum dots. *Anal. Chem.* 82 : 6237—6243.
- Marchal F., Pic E., Pons T., Dubertret B., Bolotine L., Guillemin F. 2008. Quantum dots in oncological surgery : the future for surgical margin status. *Bull. Cancer.* 95 : 1149—1153.
- Ness J. M., Akhtar R. S., Latham C. B., Roth K. A. 2003. Combined tyramide signal amplification and quantum dots for sensitive and photostable immunofluorescence detection. *J. Histochem. Cytochem.* 51 : 981—987.
- Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P., Bishop-Stewart J., Bhalgat M. K., Millard P. J., Mao F., Leung W. Y., Haugland R. P. 1999. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* 47 : 1179—1188.
- Pereira F. M., Ferreira E., Leitão D. R. A., Cassali G. D. 2006. Double-staining immunohistochemistry of canine mammary neoplasms. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58 : 681—684.
- Pozarowski P., Holden E., Darzynkiewicz Z. 2006. Methods in molecular Biology. In : Laser scanning cytometry: principles and applications. New Jersey: Humana Press Inc. 165—192.
- Roth R. A., Baskin D. G. 2005. Enzyme-based fluorescence amplification for immunohistochemistry and *in situ* hybridization. In: Molecular morphology in human tissues: techniques and applications. Washington: CRC Press. 65—80.
- Sabattini E., Bisgaard K., Ascani S., Poggi S., Piccioli M., Ceccarelli C. 1998. The EnVision™ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAA P, ChemMate™, CSA, LABC techniques. *J. Clin. Pathol.* 51 : 506—511.
- Schrock E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M. A., Ning Y., Ledbetter D. H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science.* 273 : 494—497.
- Shapiro H. M. 2003. Compensation. In: practical flow cytometry. New York: John Wiley & Sons Inc. 736 p.
- Sinclair R. A., Bourne C. A. J., Jose D. G., Barr I. G., Toh B. H. 1986. Lymphoma immunotyping by paraffin immunoperoxidase and cell suspension methods — a comparative study. *Pathology.* 18 : 321—327.
- Sukhanova A., Nabiev I. 2008. Fluorescent nanocrystal-encoded microbeads for multiplexed cancer imaging and diagnosis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68 : 39—59.
- Sukhanova A., Venteo L., Devy J., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Nabiev I. 2002. Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections. *Lab. Invest.* 82 : 1259—1261.
- Sweeney E., Ward T. H., Gray N., Womack C., Jayson G., Hughes A., Dive C., Byers R. 2008. Quantitative multiplexed quantum dot immunohistochemistry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374 : 181—186.
- Van der Loos C. M., Becker A. E., Van den Oord J. J. 1993. Practical suggestions for successful immunoenzyme double-staining experiments. *Histochemistry.* 25 : 1—13.
- Weller T. H., Coons A. H. 1954. Fluorescent antibody. Studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86 : 789—794.
- Wu X., Liu H., Liu J., Haley K. N., Treadway J. A., Larson J. P., Ge N., Peale F., Bruchez M. P. 2003. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnol.* 21 : 41—46.
- Xing Y., Smith A. M., Agrawa A., Ruan G., Nie S. 2006. Molecular profiling of single cancer cells and clinical tissue specimens with semiconductor quantum dots. *Int. J. Nanomed.* 1 : 473—481.
- Zahavy E., Freeman E., Lustig S., Keysary A., Yitzhaki S. 2005. Double labeling and simultaneous detection of B- and T-cells using fluorescent nanocrystal (q-dots) in paraffin-embedded tissues. *J. Fluoresc.* 15 : 661—665.

Поступила 27 V 2011

IMAGING OF SURFACE CELL ANTIGENS ON THE TUMOR SECTIONS OF LYMPH NODES
USING FLUORESCENCE QUANTUM DOTS

E. P. Raphaelovskaya-Orlovskaya,¹ L. Gorgidze,¹ A. A. Gladkin,¹ S. M. Tauger,¹ I. A. Vorobjev^{1-3,}*

¹ National Research Center for Hematology, Moscow,

² A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University,
and ³ Chair of Cell Biology and Histology of Biological Faculty, M. V. Lomonosov Moscow State University;
* e-mail: ivorobjev@mail.ru

The usefulness of quantum dots for the immunofluorescent detection of surface antigens on the lymphoid cells has been studied. To optimize quantum dots detection we have upgraded fluorescent microscope that allows obtaining multiple images from different quantum dots from one section. Specimens stained with quantum dots remained stable over two weeks and practically did not bleach under mercury lamp illumination during tens of minutes. Direct conjugates of primary mouse monoclonal antibodies with quantum dots demonstrated high specificity and sufficient sensitivity in the case of double staining on the frozen sections. Because of the high stability of quantum dots' fluorescence, this method allows to analyze antigen coexpression on the lymphoid tissue sections for diagnostic purposes. The spillover of fluorescent signals from quantum dots into adjacent fluorescent channels, with maxima differing by 40 nm, did not exceed 8 %, which makes the spectral compensation is practically unnecessary.

Key words: immunohistochemical investigations, immunofluorescent method, quantum dots, differential diagnostics of lymphoma.