МИКРОЧИПЫ: НОВЫЙ ЭТАП В РАЗВИТИИ ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

Е.А. Никитин[1], А.Б Судариков[1], А.В. Баранова[2]

[1]Гематологический научный центр РАМН, Москва; [2]Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

Появление иммунофенотипирования в 70—80-х годах прошлого века привело к радикальному изменению представлений о гемобластозах, к созданию более совершенной классификации. Новой вехой в развитии медицины, и в частности онкогематологии, стала функциональная геномика. Задача этого раздела молекулярной гематологии — изучение функций новых генов и генных сетей в нормальном развитии и жизнедеятельности тканей, а также при различных заболеваниях. Информация, полученная в ходе расшифровки генома человека, носит статичный характер. Функциональная геномика изучает динамические аспекты функционирования генов, такие как транскрипция, трансляция мРНК, белковые взаимодействия. Одним из методов функциональной геномики является технология биологических микрочипов, позволяющая одновременно анализировать уровень активности тысяч генов в одном эксперименте, причем масштаб измерений может приближаться к геномному. В данном обзоре мы рассматриваем технологию микрочипов, ее клинические приложения и кратко суммируем результаты экспериментов с микрочипами при лимфатических опухолях.

Ключевые слова: *микрочипы, лимфомы, лейкозы*

MICROARRAYS: A NEW ERA IN DEVELOPMENT OF ONCOHEMATOLOGY

Ye.A. Nikitin, A.B. Sudarikov, A.V. Baranova

Research Center for Hematology of Russian Academy of Medical Sciences;
Medical Genetic Research Center of Russian Academy of Medical Sciences

Introduction of the immunophenotyping in 70-ties and 80-ties of the past century has led to significant revision of conception of hematological malignancies. A new era in developement of medicine and oncology in particular is related to functional genomics. This field of molecular biology attempts to make use of the vast wealth of data produced by genomic projects for studying gene functions and interactions. Functional genomics focus on the dynamic aspects such as gene transcription, mRNA translation, and protein-protein interactions, as opposed to the static aspects of the genomic information such as DNA sequence or structure. Several genomic technologies have been developed to study gene expression. Gene expression profiling on DNA microarrays has been particularly useful in analyzing expression of thousands genes in parallel. Modern microarrays contain comprehensive probe sets which are able to measure the majority of genes encoded in human genome. Here we focus on microarray technology, discuss its clinical applications and briefly review some results obtained by this method in researches of hematological malignancies.

Key words: *microarrays, lymphoma, leukemia*

Появление иммунофенотипирования в 70—80-х годах прошлого века привело к радикальному изменению представлений о гемобластозах, к созданию более совершенной классификации. Новой вехой в развитии медицины, и в частности онкогематологии, стала функциональная геномика. Предпосылкой этого научного направления стала расшифровка генома человека, в результате которой к настоящему времени идентифицировано и картировано большинство генов человека. Однако это лишь первый этап исследования генома. Информация о нуклеотидной последовательности гена и его положении в геноме не имеет практического значения, если мы не знаем, какие он выполняет функции, как осуществляется его регуляция и как его активность сказывается на других генах. Задача функциональной геномики — изучение функций новых генов и генных сетей в нормальном развитии и жизнедеятельности тканей, а также при различных заболеваниях.

Исследование тонкой взаимной регуляции генов и их продуктов является одной из наиболее фундаментальных задач молекулярной биологии нормальной и опухолевой клетки. До последнего времени основная составляющая нормального научного процесса заключалась в постепенном «разборе» клеточного механизма путем независимых экспериментальных исследований регуляции каждого отдельного гена, выполняемых отдельными научными группами. Процесс начинается с идентификации повреждений данного гена при определенной опухоли. Далее необходимо воспроизвести повреждение потенциального протоонкогена или тумор-супрессорного гена в культуре клеток или в эксперименте с мышами и исследовать полученный фенотип, что позволяет оценить функцию гена. Последовательная оценка функции одного за другим каждого из генов цепочки создает представление о взаимодействии продуктов генов в цепи и ее нарушениях в онкогенезе [1].

В настоящее время разработан более современный исследовательский подход, основанный на технологии биологических микрочипов, позволяющий одновременно анализировать уровень активности каждого гена клетки в одном эксперименте. Передача генетической информации осуществляется в процессе транскрипции (в результате чего образуется мРНК) и трансляции (превращение мРНК в белки). В каждый данный момент времени клетке нужны не все гены, имеющиеся в геноме. Совокупность экспрессии всех актуальных для жизнедеятельности клетки в данный момент времени генов называется «транскриптом». Транскриптом зависит от линейной принадлежности клетки, функции клетки, активности в ней сигнальных путей, ответа на внешние сигналы. Микрочипы позволяют измерить количество мРНК, соответствующей разным генам, причем масштаб измерений может приближаться к геномному. Иными словами, в одном эксперименте с микрочипами можно исследовать уровень экспрессии всех известных генов в данном образце. Анализ транскриптома выборки образцов позволяет увидеть характерный для опухоли фенотип (профиль экспрессии), чего практически невозможно достичь при последовательном анализе генов-участников процесса.

Получаемые в экспериментах с микрочипами данные высоковоспроизводимы и представляют собой цифры. В связи с этим их можно анализировать с помощью многовариантных статистических методов. Различные биологические фенотипы, такие как уровень пролиферативной активности, состояние сигнальных путей, сходство с нормальным аналогом, примесь и природа тумор-инфильтрирующих клеток, теперь можно измерить количественно: все фенотипы отражены в генетическом профиле экспрессии. С этой точки зрения биология опухолей становится привлекательной областью для математики. Каждый биологический фенотип ассоциируется с экспрессией определенного набора генов. Группа генов, имеющая биологическое или клиническое значение, называется «генетическая экспрессионная роспись», или «генетический профиль экспрессии». Экспрессия генов этой группы служит количественной характеристикой фенотипа [2]. Вычленение определенного генетического профиля экспрессии дает возможность сопоставить его с выживаемостью и другими клиническими параметрами.

В настоящее время биологические микрочипы — главный инструмент определения состояния экспрессии генов в разнообразных биологических образцах.

Технологическая цепочка

Микрочип представляет собой нанесенный на твердый носитель (стекло, мембрана) упорядоченный набор тысяч различающихся фрагментов ДНК, каждый из которых соответствует определенному гену. Чтобы измерить экспрессию генов, необходимо выделить из образца опухолевой или другой ткани РНК, пометить ее в процессе превращения в комплементарную ДНК (кДНК) флюоресцентной краской или радиоактивным веществом и поместить на микрочип. Во время гибридизации меченая мРНК соединяется по принципу комплементарности с ген-специфичными фрагментами ДНК на микрочипе. Несвязанную мРНК затем отмывают и проводят анализ гибридизационных сигналов. Интенсивность сигнала, поступающего с точки, соответствует количеству меченой мРНК, связавшейся с данным ген-специфичным фрагментом ДНК. Анализ гибридизационных сигналов позволяет сделать вывод о состоянии экспрессии каждого из исследуемых генов, не разбирая «клеточную машину» на составные элементы и не «вырывая» гены из клеточного контекста. Последовательность экспериментов, проводимых с помощью микрочипов, представлена на рисунке.

Схема эксперимента с микрочипами

Микрочипы

Активно развивающаяся технология микрочипов позволяет организовать упорядоченную посадку большого числа различающихся фрагментов ДНК на каком-либо твердом носителе, что дает возможность подвергать все исследуемые фрагменты ДНК одновременной гибридизации пробой с меченой ДНК (или РНК). В настоящее время разработаны упорядоченные наборы генов двух типов:

1) с использованием относительно небольших, но в то же время ген-специфичных фрагментов ДНК — олигонуклеотидов размеров 20—25 нуклеотидов [3];

2) с использованием крупных фрагментов ДНК (300—500 нуклеотидов), получаемых с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4].

В литературе термин expression chip (экспрессионный чип), или expression array (экспрессионный упорядоченный набор зондов), или microarray (микрочип), применяется к обеим разновидностям упорядоченных наборов генов, однако к олигонуклеотидным наборам этот термин подходит лучше, поскольку их можно создавать в том числе и с помощью фотолитографического метода, сходного с тем, что используется для производства компьютерных чипов. При каждом методе можно напечатать тысячи фрагментов ДНК на сравнительно небольшой площадке. Так, размеры олигонуклеотидного чипа, содержащего все 6000 генов дрожжей *S. Cerevisae*, составляют 1,28 × 1,28 см, а чип из крупных ПЦР-фрагментов тех же 6000 дрожжевых генов размещается на стеклянном слайде размером 1,8 × 1,8 см. Таким образом, масштабы вполне сопоставимы [5].

Олигонуклеотидные микрочипы

Олигонуклеотидные экспрессионные чипы создаются фотолитографическим способом (Affymetrix, Santa Clara, CA) [6, 7], путем синтеза олигонуклеотидов *in situ* [3] и загрузки готовых олигонуклеотидов в плотные гели толщиной 20 мкм [7, 8]. Основное достоинство олигонуклеотидных чипов заключается в потенциальной возможности еще большей миниатюризации. Так, в настоящее время типичный размер площадки, содержащей 1 олигонуклеотид, составляет 10 мкм, но уже разработаны подходы, позволяющие уменьшить размеры чипа еще сильнее [6]. Например, компания Luminex (Остин, Техас) разработала метод ковалентной пришивки олигонуклеотидов на специальные микросферы, степень флюоресценции каждой из которых после гибридизации с меченой пробой может быть оценена с помощью проточного цитофлуориметра [9], что позволяет анализировать экспрессию до 512 генов одновременно [10]. Разрабатывается метод иммобилизации отдельных микросфер на твердой прозрачной подложке и подведения к каждой площадке посадки отдельного регистрирующего оптоволокна, что позволит уменьшить размер ячейки чипа до субмикрометрического [11].

Основной недостаток олигонуклеотидных чипов состоит в том, что эффективность гибридизации таких коротких фрагментов ДНК значительно зависит от нуклеотидного состава этих фрагментов и их вторичной структуры (шпилек). Специфичность гибридизации каждого отдельного олигонуклеотида недостаточно велика. Именно поэтому на таких олигонуклеотидных чипах каждый ген должен быть представлен несколькими (как правило, 20) различными олигонуклеотидами. Кроме того, каждый входящий в состав микрочипа ген-специфичный олигонуклеотид сопровождается сходным олигонуклеотидом, отличающимся от ген-специфичного всего одним нуклеотидным основанием, расположенным в центре, — этот олигонуклеотид служит внутренним гибридизационным контролем. Таким образом, для однозначного описания каждого гена на олигонуклеотидном экспрессионном микрочипе требуется 40 площадок, в то время как чипы, созданные на основе фрагментов кДНК, подчиняются правилу «один ген — одна площадка» [5].

Чипы, созданные на основе фрагментов ДНК

Чипы, созданные на основе фрагментов кДНК, в англоязычной литературе называют cDNA microarrays (микроэрреи), или просто arrays (эрреи). Технология, лежащая в основе таких чипов, была выработана в результате логического развития популярной технологии dot blot, с тем отличием, что в стандартном дот-блоттинге сложные смеси ДНК или РНК ковалентно пришиваются к мембране и в качестве пробы служит единичный меченый фрагмент ДНК, а cDNA microarrays, напротив, содержат уникальные последовательности ДНК (отдельные гены), зафиксированные на подложке и подвергающиеся гибридизации со сложной пробой, состоящей из меченых молекул кДНК, образованных на матрице всех мРНК, выделенных из исследуемого образца.

Фрагменты кДНК, соответствующие известным генам, могут быть упорядочены как на обычных нейлоновых фильтрах, так и на специальных стеклянных слайдах. Оба подхода имеют свои преимущества и недостатки. Создание cDNA microarrays посредством упорядоченной посадки фрагментов кДНК на обычные нейлоновые фильтры возможно в молекулярно-биологической лаборатории, оборудованной ПЦР-машинами и специальным роботом, обеспечивающим высокую плотность площадок посадки фрагментов ДНК. Этот процесс требует синтеза

большого количества олигонуклеотидных праймеров для ПЦР, а также синтеза и очистки характеристических ПЦР-продуктов. Однако после того как этот трудоемкий этап пройден, тиражирование большого числа одинаковых фильтров с cDNA microarray уже не представляет технической сложности. Неудивительно, что многие компании пошли именно по этому пути. Чипы, созданные с помощью этой технологии, просты в использовании, не требуют дорогостоящей техники, но их нельзя назвать микроскопическими.

Приготовление меченой пробы

Для исследования экспрессии генов с помощью микрочипов необходима меченая проба, которая должна быть приготовлена на основе мРНК, выделенной из интересующего биологического образца. Однако именно эта стадия является труднопреодолеваемым «бутылочным горлышком», сдерживающим широкое использование технологии. Качественный и количественный состав клеточной мРНК может претерпевать резкие и быстрые изменения в ответ на резкую смену условий окружающей среды (к примеру, перепад температуры при изъятии опухолевого образца из организма пациента). Кроме того, в нефизиологических условиях мРНК быстро деградирует, и эта деградация сильнее всего захватывает короткоживущие мРНК, кодирующие регуляторные гены, которые чаще всего и являются объектом исследования. Поэтому биологические образцы, из которых предполагается выделять мРНК для исследования экспрессии генов, должны как можно быстрее погружаться в жидкий азот (охлаждение до температуры —70—80°С при помещении в низкотемпературный холодильник происходит с недостаточной скоростью), а последующие стадии выделения мРНК проводиться осторожно и быстро. Огромное значение имеет однородность исследуемого биологического образца, например, присутствующие в каждой опухоли нормальные ткани кровеносных сосудов должны тщательно удаляться. Для приготовления биологических образцов часто используется микродиссекция, в том числе лазерная [12]. Большое внимание должно быть уделено химической чистоте препарата РНК [13].

Способы распознавания сигнала

Самым распространенным способом детекции индуцируемого лазером флюоресцирующего сигнала является использование конфокального микроскопа [14]. Применяются и другие методы детекции [15—17].

Микрочипы, размещенные на нейлоновых мембранах, как правило, гибридизируют с пробами, помеченными с помощью включения ^{33}P-dCTP. Радиоактивное мечение позволяет регистрировать гибридизационные сигналы с помощью стандартных фосфоимиджеров, производимых компаниями Molecular Dynamics, Packard Instruments и Fuji, а во многих случаях и посредством обычной радиоавтографии на рентгеновской пленке высокого разрешения.

Анализ данных

В экспериментах с микрочипами на каждый испытуемый образец получаются тысячи и десятки тысяч цифр. Количество данных настолько велико, что анализировать их «вручную» невозможно. Для интерпретации результатов экспериментов с микрочипами разработан целый ряд аналитических методик [18, 19]. Эти методы можно подразделить на две категории: неконтролируемые и контролируемые. При неконтролируемом анализе статистическую программу «просят» независимо найти какие-либо группы в исследуемой выборке образцов. Никаких внешних данных при этом не используется, никаких гипотез не выдвигается: все результаты основаны только на измерении экспрессии генов. При контролируемом анализе с помощью статистических методов устанавливают, есть ли связь между генетической экспрессией и заданным параметром, например выживаемостью.

Методы неконтролируемого анализа

Чаще всего для анализа полученных с помощью микрочипов данных используется иерархическое кластерирование [18]. Кластерный анализ позволяет разбить совокупность объектов на однородные группы. В литературе часто применяют термин «аналитическое и агломеративное иерархическое кластерирование». При агломеративном иерархическом кластерировании процесс идет «снизу», т.е. начинается со многих кластеров и следует путем их объединения в более крупные с использованием разных математических критериев. При аналитическом иерархическом кластерировании процесс идет «сверху»: работа ведется с одним кластером, содержащим все случаи. Затем он разбивается на меньшие кластеры.

Иерархическое кластерирование выявляет гены со сходной экспрессией во всех образцах. Например, иерархическое кластерирование объединит вместе все гены, которые сильно экспрессируются в одной группе образцов и слабо экспрессируются в другой группе образцов. Кластеры генов со сходной экспрессией часто отвечают за единую клеточную функцию. Таким образом, вычленяется генетическая роспись, характеризующая определенный биологический процесс [2]. Например, при делении в клетке одновременно экспрессируются группы генов клеточного цикла, репликации ДНК и метаболизма. Иерархическое кластерирование позволяет увидеть эту пролиферативную роспись.

Генетические экспрессионные росписи могут быть связаны с разными биологическими характеристиками, в том числе линейной принадлежностью, стадией созревания клетки, активностью сигнальных путей. По сути дела, генетический профиль экспрессии, полученный неконтролируемым способом, и есть тот продукт, та единица измерения, которая позволяет связать многообразный результат эксперимента с микрочипами с биологическими и клиническими параметрами. Генетический профиль экспрессии дает предварительное представление о том, какие биологические процессы активны в данном образце, позволяет выработать гипотезу и направляет дальнейший поиск.

Алгоритм иерархического кластерирования позволяет решить и обратную задачу: выявить и сгруппировать образцы со сходными профилями экспрессии. В этом случае сначала выбирают группы генов, по которым программе задается рассортировать образцы. Поэтому результат радикально зависит от выбора генов.

Методы контролируемого анализа

Контролируемые аналитические методы позволяют установить связь между биологическим или клиническим показателем и экспрессией генов. Таким способом обнаруживаются различия в генетической экспрессии, которые дискриминируют диагностические или прогностические группы. Чтобы разработать молекулярный предиктор выживаемости, можно использовать, например, модель пропорциональных интенсивностей Кокса и с ее помощью выявить экспрессионные характеристики, ассоциированные с прогнозом. В зависимости от объема выборки и значимости избранных рубежных значений таким образом выявляют до нескольких сотен актуальных генов. Далее можно снова прибегнуть к иерархическому кластерному анализу и пытаться выявить специфические экспрессионные росписи, характеризующие биологические процессы, которые ассоциируются с выживаемостью. Профиль экспрессии, имеющий предсказующее значение, и число генов зависят от эксперимента и болезни. Например, при В-ККЛ найдено 17 генов, предсказывающих прогноз [20]. При В-ХЛЛ группы лучше всего дискриминировались с помощью всего лишь одного гена — *ZAP-70* [21].

Воспроизводимость данных: опытная и валидационная группы

Огромное количество данных, получаемых в экспериментах с микрочипами, повышает вероятность выявления устойчивых ассоциаций между клиническими и молекулярными параметрами. Тем не менее полученная в эксперименте модель может не работать в другой или большей выборке больных. Эту проблему разрешают путем случайного распределения образцов на две группы: опытную и валидационную. Первая используется для построения модели, вторая — для независимого тестирования модели. Такой подход требует большого числа образцов. В связи с этим в клинических исследованиях часто применяют другой метод «перекрестной валидации». В соответствии с этим методом предсказующая модель разрабатывается для всей совокупности образцов, кроме одного. Далее образец, не включенный в опытный эксперимент, тестируют с помощью разработанной модели. Так поступают с каждым образцом и устанавливают количество образцов, которые были правильно классифицированы. Число верно или неверно классифицированных образцов дает представление о воспроизводимости модели.

Практические результаты экспериментов с микрочипами

Одна из наиболее важных целей экспрессионного анализа с помощью микрочипов состоит в том, чтобы с помощью молекулярных характеристик вычленять гомогенные нозологические формы. Подразумевается, что в пределах гомогенной нозологической формы все образцы данной опухоли возникли из одной и той же популяции клеток, развивались по тому же патогенетическому механизму, в них активированы одинаковые сигнальные пути и они обладают сходной чувствительностью к токсинам.

Несмотря на то что экспрессионный анализ с помощью микрочипов появился как исследовательский метод относительно недавно, уже получены результаты, которые позволили существенно изменить представления о патогенезе многих опухолей. Самый главный результат состоит в демонстрации гетерогенности лимфатических опухолей, характеристике «чистых» нозологических форм, выделении прогностически разных вариантов болезней. Эти результаты уже имеют практическое значение. Однако большинство опубликованных до сих пор исследований ретроспективно. Результаты проспективных исследований еще впереди. Ключевые эксперименты с микрочипами, изменившие представления о лимфомах, обобщены в таблице.

Заключение

Анализ опухолей с помощью микрочипов, по-видимому, войдет в рутинную киническую практику. Вполне возможно, что существенная часть информации, получаемой с помощью микрочипов, может быть выявлена с помощью иммуногистохимии или проточной цитофлуориметрии. Однако список генов, экспрессионный уровень которых имеет клиническое значение при различных опухолях, быстро растет. Только микрочипы позволяют в реальном времени исследовать экспрессионный уровень десятков

Результаты экспериментов с микрочипами при лимфомах

Автор	Опухоль, вариант чипа	Основной результат
Yeoh et al. [23]	В-ОЛЛ, Affymetrix	Идентифицирован характерный экспрессионный профиль для каждой цитогенетической подгруппы В-ОЛЛ. Эксперимент сделан на образцах, полученных от 360 детей с В-ОЛЛ. Разработаны молекулярные предикторы, которые точно классифицируют пациентов в ту или иную группу. Выделен новый вариант В-ОЛЛ, который ранее не удавалось охарактеризовать с помощью цитогенетических данных
Ferrando et al. [25]	Т-ОЛЛ, Affymetrix	Эксперимент сделан на 59 образцах. Показано, что аберрантная экспрессия ключевых транскрипционных факторов является центральным патогенетическим механизмом Т-ОЛЛ. Профиль экспрессии генов соотнесен с определенными стадиями Т-клеточной дифференцировки; показано, что такая связь существует и может быть определена по гиперэкспрессии *HOX11*, *TAL1* и *LYL1*. Показано, что гиперкэспрессия *HOX11* идентифицирует отдельную прогностическую подгруппу в пределах Т-ОЛЛ
Rosenwald et al. [26]	ХЛЛ, Lymphochip	Показано, что, несмотря на клиническую гетерогенность, хронический лимфолейкоз представляет собой одну болезнь, обладающую уникальным генетическим профилем экспрессии. Варианты В-ХЛЛ с разным мутационным статусом генов вариабельного региона также обладают сходным профилем экспрессии. Тем не менее идентифицировано несколько сотен генов, в том числе *ZAP-70*, экспрессирующихся при этих вариантах по-разному
Wiestner et al. [21]	ХЛЛ, Lymphochip	На выборке из 107 образцов, полученных от больных В-ХЛЛ, подтверждено, что *ZAP-70* лучше всего дискриминирует варианты В-ХЛЛ с разным мутационным статусом. Предложен прогностический тест
Alizadeh et al. [27]	В-ККЛ, Lymphochip	В пределах В-крупноклеточной лимфомы идентифицировано 2 варианта болезни. Генетический профиль экспрессии этих вариантов отражает стадии созревания В-лимфоцитов. Один вариант, возникающий из клеток герминального центра по профилю экспрессии близок к клеткам зародышевого центра вторичных фолликулов. Он характеризуется благоприятным прогнозом. Для второго варианта, возникающего из активированных клеток, характерна экспрессия генов, которые активируются при митогенной стимуляции В-лимфоцитов периферической крови. При лечении по программе CHOP прогноз этого варианта хуже
Shipp et al. [28]	В-ККЛ, Affymetrix	С помощью контролируемого кластерного анализа определен молекулярный предиктор прогноза на выборке из 58 больных В-ККЛ, получавших лечение по программе CHOP. Идентифицировано 2 группы больных: 5-летняя выживаемость в одной группе составила 70%, во второй — 12%. Другой формат микрочипа не позволил авторам подтвердить биологически разные подгруппы, идентифицированные Alizadeh и соавт.
Rosenwald et al. [20]	В-ККЛ, Lymphochip	На выборке из 240 больных В-ККЛ воспроизведены ранее полученные закономерности. Показано, что варианты из активированных и герминальных клеток развиваются по разным патогенетическим механизмам. Разработан молекулярный предиктор прогноза, основанный на экспрессии 17 генов. Показано, что генетический профиль экспрессии не зависит от международного прогностического индекса. Общая 5-летняя выживаемость в группе В-ККЛ из герминальных клеток составляет 73%, в группе В-ККЛ из активированных клеток — 15%.
Wright et al. [22]	В-ККЛ, Lymphochip и Affymetrix	Предложен дианостический алгоритм для классификации В-ККЛ по генетическому профилю экспрессии. На выборке из 274 больных, исследованных с помощью лимфочипа, а также 58 больных, исследованных с помощью микрочипа Affymetrix, подтверждены существование и различие герминального и автивированного вариантов В-ККЛ
Rosenwald et al. [24]	ЛМЗ, Lymphochip	Дана молекулярная характеристика лимфомы мантийной зоны. Показано, что ведущим патогенетическим механизмом является нарушение регуляции клеточного цикла. Выделен вариант ЛМЗ без гиперэкспрессии циклина D1. Разработан способ оценки пролиферативной активности опухоли, основанный на генетическом профиле экспрессии. Идентифицированы группы больных с разных прогнозом. В благоприятной группе медиана выживаемости составляет 6,7 года, в неблагоприятной — 0,8 года
Zhan et al. [29, 30]	ММ, Affymetrix	На выборке из 79 больных с множественной миеломой в пределах этой болезни идентифицировано 4 варианта. Проведена корреляция вариантов ММ со стадиями созревания плазматических клеток
Rosenwald et al. [31]	ПМ В-ККЛ, Lymphochip	Показано, что первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома представляет собой отдельный вариант В-ККЛ с благоприятным прогнозом и существенно отличным генетическим профилем экспрессии. Предложен диагностический алгоритм, основанный на экспрессии 46 генов. Показана связь между ПМ В-ККЛ и лимфомой Ходжкина

тысяч генов. Ни одна существующая в настоящее время методика даже не приближается к этому. Подобная задача теоретически может быть решена и на уровне белка, однако стоимость чипа, на который нанесены десятки тысяч вариантов антител, превосходит стоимость ДНК-чипа на огромную величину. Иммуногистохимия дает качественную или, в лучшем случае, полуколичественную оценку, в то время как результат эксперимента с микрочипами — количественный. Очень важно, что огромный объем информации может быть получен в едином формате. Например, прогноз В-ХЛЛ в настоящее время достовернее всего определяется при использовании разных методов — кариологии, интерфазной цитогенетики, молекулярного анализа, анализа растворимых сывороточных белков. Микрочипы позволяют получить больший или, по меньшей мере, сопоставимый объем информации в едином формате. Результат исследования с помощью микрочипов может анализироваться с помощью компьютерного алгоритма, без участия человека, что делает анализ более надежным.

Литература

1. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer.Cell 2000 Jan 7;100(1):57—70.
2. Shaffer A.L., Rosenwald A., Hurt E.M. et al. Signatures of the immune response. Immunity 2001 Sep; 15(3):375—85.
3. Blanchard A.P., Kaiser A.J. and Hood L.E. High-density oligonucleotide arrays. Biosens Bioelectron 1996;11:687.
4. The Microarray Home Page. http://cmgm.stanford.edu/pbrown/aaray.html.
5. Johnston M. Array of hope for understanding gene regulation. Current Biol 1998;8:171—4.
5. Fodor S.P.A., Rava R., Huang X.C. et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 1991;251:767—73.
6. McGall G., Labadie J., Brock P. et al. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotida arrays using semiconductor photoresist. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:13555—60.
7. Cheng J., Sheldon S.L., Wu L. et.al. Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from E.coli on microfabricated biolelctronic chips. Nat Biotechnol 1998;16:541—6.
8. Guschin D., Yersov G., Zaslavsky A. et al. Manual manufacturing of oligonucleotide, cDNA, and protei microchips. Anal Biochem 1997;250:203—11.
9. Fulton R.J. McDade R.L., Smith P.L. et.al. Advanced multiplexed analysis with FlowMetrix system. Clin Chem 1997;43:1749—56.
10. Chandler V.S., Denton D., Pempsell P. Biomolecular multiplexing of up to 512 assays on a new solid-state 4 color flow analyzer. Cytometry 1998;(9):40.
11. Michael K.L., Taylor L.C., Shultz S.L., Walt D.R. Randomly ordered addressable high-density optical sensor arrays. Anal Chem 1998;70:1242—8.
12. Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D., et.al. Laser capture microdissection. Science 1996;274:998—1001.
13. Duggan D.J., Bittner M., Chen Y. et al. Expression profiling using cDNA microarrays. Nature Genet 1999;21:10—4.
14. Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C. et al. Expression monitoring by hybridizaton to high-density oligonucleotide array. Nat Biotechnol 1996;14:1675—80.
15. Thiel A.J., Frutos A.G., Jordan C.E. et al. In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces. Anal Chem 1997;69:4948—56.
16. Healy B.G., Matson R.S., Walt D.R. Fiberoptic DNA sensor array capable of detecting point mutation. Anal Biochem. 1997;251:270—9.
17. Stimpson D.I., Hoijer J.V., Hsieh W.T. et al. Real time detection of DNA hybridization and melting on oligonucleotide arrays using optical wave guides. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:6379—83.
18. Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O. et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95(25):14863—8.
19. Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P. et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999;286(5439):531—7.
20. Rosenwald A., Wright G., Chan W.C., et al. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002;346(25):1937—47.
21. Wiestner A., Rosenwald A., Barry T.S. et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. Blood 2003;101(12):4944—51.
22. Wright G., Tan B., Rosenwald A. et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(17):9991—6.
23. Yeoh E.J., Ross M.E., Shurtleff S.A. et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer Cell 2002;1(2):133—43.
24. Rosenwald A., Wright G., Wiestner A. et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. Cancer Cell 2003;3(2):185—97.
25. Ferrando A.A., Armstrong S.A., Neuberg D.S. et al. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. Blood 2003;102(1):262—8.
26. Rosenwald A., Alizadeh A.A., Widhopf G. et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med 2001;194(11):1639—47.
27. Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000;403(6769):503—11.
28. Shipp M.A., Ross K.N., Tamayo P. et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. Nat Med 2002;8(1):68—74.
29. Zhan F., Tian E., Bumm K. et al. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. Blood 2003;101(3):1128—40.
30. Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B. et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. Blood 2002;99(5):1745—57.
31. Rosenwald A., Wright G., Leroy K. et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. J Exp Med 2003;198(6):851—62.