

УДК 616-006.34

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОПУХОЛЯХ КОСТЕЙ

© Н.Е. Кушлинский, Ю.С. Тимофеев

Ключевые слова: опухоли костей; генетика; нуклеотидные полиморфизмы.

Опухоли костей – группа онкологических заболеваний, в большинстве случаев трудная в диагностике и лечении. Согласно современным представлениям в основе развития опухолей костей лежат генетические причины. В обзоре представлены данные ряда молекулярно-генетических и цитогенетических исследований при новообразованиях костей. Рассматриваются данные, полученные как на преคลินิกеских моделях, так на пациентах со злокачественными, доброкачественными и пограничными новообразованиями костей. Помимо обзора литературных данных, в работе приводятся авторские данные, посвященные исследованиям одиночных нуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с развитием опухолей костей.

ВВЕДЕНИЕ

Опухоли костей являются сравнительно редкой, но клинически значимой группой онкологических заболеваний. Так, ряд заболеваний этой группы, в т. ч. остеогенная саркома, саркома Юинга и некоторые доброкачественные новообразования, характерны для лиц детского и юношеского возраста. Для опухолей костей, таких как остеогенная саркома, саркома Юинга, злокачественная фиброзная гистиоцитома, хондросаркома, характерна высокая степень злокачественности, высокая скорость прогрессирования, метастазирования, резистентность к терапии, низкие показатели безрецидивной и общей выживаемости.

Диагностика опухолей костей сопряжена с рядом трудностей. Так, пункционная биопсия часто бывает неинформативной в связи с трудностью доступа, неоднородностью опухоли и другими причинами. В свою очередь, открытая биопсия – достаточно инвазивная процедура. Лабораторные методы диагностики опухолей костей в настоящее время играют вспомогательную роль и не обладают особенной специфичностью. Таким образом, разработка менее инвазивных лабораторных методик, а также дальнейшее развитие методик, направленных на более точный анализ характеристик опухолей (иммуногистохимические методы, цитогенетические методы, реал-тайм ПЦР), является актуальной задачей для клинической лабораторной диагностики.

Генетические аспекты онкологических заболеваний привлекали внимание с 30-х гг. XX в., однако детальное изучение молекулярно-генетической природы злокачественных новообразований стало возможным в последние десятилетия в результате колоссального прогресса в области молекулярной биологии и генетики. Знание генетических особенностей конкретных новообразований открывает большой простор для дальнейших исследований. Генетические особенности новообразований костей не исключение – несмотря на имеющиеся успехи, остается большое количество неясных вопросов.

Молекулярно-генетические и цитогенетические исследования смогут открыть новые перспективы для

скрининга, диагностики, подбора терапии, а также в прогнозе опухолей костей. Также понимание природы наследственных или приобретенных генетических аномалий при опухолях костей сможет помочь в изучении этиологии и патогенеза этой группы заболеваний. Уже сейчас патологические транслокации при саркоме Юинга являются одним из критериев в постановке диагноза. Изучение геномных вариаций (например, нуклеотидных полиморфизмов) может прояснить этиологию опухолей костей, помочь в разработке предикативных тестов. В свою очередь, изучение соматических мутаций в клетках опухолей сможет прояснить их патогенез, выявить точки для приложения таргетной терапии.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наиболее распространенными методами изучения хромосомных изменений являются классические цитогенетические методы. Карiotипирование позволяет проводить общегеномный скрининг структурных и количественных изменений, ассоциированных с опухолевым процессом. Эти тесты могут быть использованы для выявления опухоль-ассоциированных хромосомных нарушений. К сожалению, карiotипирование является достаточно сложным исследованием, имеющим ряд ограничений, таких как необходимость использования живых, делящихся клеток и ограниченное разрешение при детекции. Разумеется, что в большинстве клинических условий применение подобных методик затруднительно. Ситуацию улучшило введение для карiotипирования многоцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* – M-FISH (multicolor fluorescent *in situ* hybridization) с использованием специфического набора проб для каждой хромосомы. Эта методика позволила увеличить чувствительность детекции хромосомных нарушений и получила ряд усовершенствований, например COBRA-FISH (Combined binary ratio labeling fish) [1]. Однако ввиду высокой цены подобных исследований, а также трудоемкости проведения и необходимости специального лабораторного оборудования

эти методы также не стали широко использоваться в клинике.

В последнее десятилетие стала развиваться методика компаративной (сравнительной) геномной гибридизации (CGH), которая стала мощным инструментом для выявления геномных нарушений. В данной методике конкурирующие за связывание образцы геномной ДНК помечаются различными цветовыми маркерами. В результате можно отличить хромосомные регионы, эквивалентно гибридизующиеся с двумя образцами, и те, которые делетированы или амплифицированы. Например, CGH позволила идентифицировать ген *PIK3CA*, кодирующий каталитическую субъединицу фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3A), как онкоген рака яичников [2]. Широко используемые методики CGH были предназначены для общегеномного сканирования изменений и поэтому позволяют получать ограниченную информацию об изменениях внутри отдельного гена на уровне экзонов-интронов. Для преодоления этого ограничения был разработан основанный на олигонуклеотидах подход для проведения CGH, который позволил проводить выявление и картирование геномных изменений на уровне экзона целевого гена [3]. С использованием новых технических решений стал возможен анализ ДНК из декальцинированных, зафиксированных формалином и залитых парафином образцов костной ткани [4].

Существуют такие альтернативные техники, как CGH на микрочипе или мультиплексная лигазозависимая амплификация зондов (MLPA), которая позволяет определять микроделецию хромосом [5].

Детекция транслокаций может быть важна для подтверждения диагноза в случаях с необычной морфологией или клинической картиной.

Одним из методов изучения специфических транслокаций является FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*. Преимущество данного метода – транслокации могут быть изучены и в неделящихся клетках, что дает возможность использовать свежие образцы тканей, замороженный или зафиксированный формалином и залитый парафином опухолевый материал.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (RT-PCR) является методом выбора, когда доступны свежзамороженные образцы. Большинство транслокаций могут быть выявлены методом RT-PCR. Для постановки данной реакции используется РНК, выделенная из образцов замороженной опухоли. Преимуществом данной техники является малое количество требуемого опухолевого материала, что позволяет использовать материал, полученный при тонкоигольной биопсии. Секвенирование полученного с помощью RT-PCR результата позволяет идентифицировать транслокационные варианты на уровне экзона.

Следующим уровнем изучения является распознавание точечных мутаций. Наиболее распространенным путем для детектирования вариаций в последовательности нуклеотидов является подход, согласно которому изучаются «горячие точки» мутаций, что обычно используется для скрининга одиночных нуклеотидных изменений в онкогенезе. Специфические нуклеотидные изменения могут быть обнаружены при помощи следующих основных методов: ПЦР в реальном времени [6], пиросеквенирование [7], масс-спектрометрия, KASPar генотипирование (генотипирование на основе аллель-специфической амплификации) [8]. Представим некоторые методы более подробно.

Полное секвенирование. Метод полного секвенирования позволяет получить полную информацию о последовательности нуклеотидов важного участка ДНК и включает следующие этапы: денатурация ДНК, гибридизация со специфическим праймером, удлинение праймера в присутствии полного набора dNTP и четырех неудлиняемых аналогов нуклеотидов (ddNTP), каждый из которых содержит флуоресцентную метку. В ходе этих манипуляций получается смесь продуктов разной длины, причем отдельный аналог будет окрашен флюорохромом, соответствующим конкретному нуклеотиду. Далее производится разделение смеси с помощью капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией, в результате чего определяется нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК [9].

Пиросеквенирование. Метод позволяет производить секвенирование участка ДНК, и в его основе лежит реакция удлинения праймера под действием фермента ДНК-полимеразы, определение продуктов которой происходит следующим образом. К исследуемому образцу ДНК, заранее гибридизованной с праймером, добавляются последовательно один за другим dNTP. В случае некомплементарности dNTP и нуклеотида, идущего за местом гибридизации праймера, праймер не удлиняется, и никаких изменений не происходит. В случае комплементарности dNTP и нуклеотида, идущего за местом присоединения праймера, произойдет присоединение праймера к нужному участку, и при этом выделится пирофосфат. Детекция появившегося пирофосфата производится при помощи реакций с сульфурилазой и люциферазой, которые дают эффект свечения [10].

Удлинение праймера на один нуклеотид с детекцией флуоресценции. Подобная методика используется, если необходимо изучить полиморфизм, заключающийся в замене только одного нуклеотида, при этом определяется только ближайший к месту отжига праймера нуклеотидный остаток. Вначале к гибридизованному ДНК и праймеру добавляют терминаторные нуклеотиды ddNTP с флуоресцентной меткой. Таким образом, удлинение праймера на определенный включенный нуклеотид будет приводить к соответствующей окраске продуктов [11]. Разделение смеси осуществляется при помощи капиллярного электрофореза.

Удлинение праймера на один нуклеотид с масс-спектрометрической детекцией. Продукты удлинения праймера на один нуклеотид могут быть детектированы при помощи масс-спектрометрии. Используется схема, аналогичная детекции продуктов методом капиллярного электрофореза, однако не используются флуоресцентные метки. При использовании нескольких наборов праймеров и зондов возможно применение мультиплексных систем, однако необходимо, чтобы продукты имели отличия по молекулярной длине [12].

Детекция полиморфизмов с помощью аллель-специфического ПЦР. Суть методики заключается в использовании ПЦР, как метода детекции полиморфизмов в ДНК. Эффективность ПЦР может зависеть от эффективности гибридизации и удлинения праймеров, при этом имеет место особенная чувствительность к некомплементарным нуклеотидам в 3'-концевой области праймера. Одним из методов оценки эффективности является проверка эффективности ПЦР по конечной точке – детектируется наличие или отсутствие продукта. Другим методом является количественная ПЦР, при которой происходит детекция количества продукта на всех циклах амплификации [13].

Детекция нуклеотидных полиморфизмов с помощью гибридизации на микрочипах. Одним из наиболее современных методов исследования нуклеотидных полиморфизмов является метод гибридизации на микрочипах. Основу метода составляет менее эффективная гибридизация ДНК с олигонуклеотидным зондом в случае неидеальной комплиментарности, имеющей место при наличии полиморфизма. Основным преимуществом микрочипов является их высокая производительность, а также возможность одновременной детекции огромного количества полиморфизмов [14].

Генетические изменения при остеогенной саркоме. Остеогенная саркома является самой распространенной первичной злокачественной опухолью костей, возникает наиболее часто у лиц молодого возраста, характерной ее особенностью является остеобластная дифференцировка и продукция опухолевыми клетками остеоида. Остеогенная саркома является наиболее распространенной злокачественной опухолью костей и шестой по распространенности злокачественной опухолью у подростков. Это крайне агрессивное заболевание, которое характеризуется бурным течением и склонностью к раннему гематогенному метастазированию преимущественно в легкие. Остеогенная саркома является крайне нестабильной в генетическом плане опухолью, с большим количеством транслокаций, амплификаций и делеций в генах, которые обладают онкогенной активностью [15]. Возможным механизмом подобной нестабильности может являться хромотрипис – одномоментный клеточный кризис, ведущий к образованию сложных комплексных хромосомных перестроек, при котором хромосомы фрагментируются и впоследствии аберрантно собираются [16].

Например, имеются данные о двух генах супрессорах опухоли, которые изменены при остеогенной саркоме – *TP53*, локализованы в плече хромосомы 17p, а также гене *RB1*, расположенном в 13q. Как соматические, так и генеративные мутации этих генов выявлялись при потере гетерозиготности другого аллеля и во множестве случаев в оставшейся части плеча хромосомы. *RB1* является важным геном, контролирующим передачу сигнала в клеточном цикле. Исследование, проведенное G.P. Nilsen et al., показало наличие мутаций в гене *CDKN2A*, расположенном в 9p у пациентов с остеогенной саркомой, у которых не было мутаций *RB1* [17]. Другой компонент RB-пути, под названием *CDK4*, негативно влияет на функцию *RB1*. В исследовании, проведенном G. Wei et al., были получены данные об амплификации *CDK4* при остеогенных саркомах [18].

При остеогенных саркомах также скомпрометирован путь p53. По данным J.S. Wunder et al., в 22 % наблюдений высокозлокачественной центральной остеогенной саркомы ген *TP53* имел мутации, однако наличие мутаций не ассоциировалось с клиническим исходом, как при других типах опухолей [19]. Другими авторами показано, что мутации в гене *TP53* ассоциированы с повышением генетической нестабильности при остеогенных саркомах [20]. Амплификация гена *MDM2* действует таким же образом. *MDM2* кодирует E3-лигазу, специфичную к белку p53, которая приводит его к убиквитин-опосредованной протеосомальной деградации. Частота амплификаций *MDM2* при остеогенных саркомах высокой степени злокачественности равняется приблизительно 6 % [21].

В другом направлении изучения аномалий при остеогенной саркоме рассматривался ген *CHK2*, который в норме предназначен для блокирования клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК или другое стрессовое воздействие. C.W. Miller et al. выявили наличие мутаций *CHK2* в 4 из 57 остеогенных сарком [22]. Таким образом, большинство этих генов вовлечены в регуляцию клеточного цикла, и их «поломка» отражается на комплексном кариотипе данных опухолей и обуславливает их хромосомальную нестабильность. Данные генетические изменения не являются постоянными и специфичными, и их потенциальное использование в диагностике носит ряд ограничений. Прогностическое значение при остеогенных саркомах носит делеция в локусе, в котором расположен ген *CDKN2A*. Исследование A.B. Mohseny et al. продемонстрировало, что выживаемость пациентов с данным нарушением крайне низкая [23].

Другой важной молекулярно-генетической особенностью остеогенных сарком является ALT (alternative lengthening of telomeres), частота которого при остеогенной саркоме выше, чем при других типах опухолей. Рассмотрим данное явление подробнее. Раковые клетки обладают механизмом, с помощью которого они сохраняют свои теломеры, в т. ч. при помощи активации теломеразной обратной транскриптазы TERT или посредством ALT – альтернативного удлинения теломеров, которое в настоящий момент еще мало изучено. В литературе имеются данные о том, что пациенты с экспрессируемой TERT имеют более плохой прогноз, чем пациенты, у которых реализуется механизм ALT [24]. Однако другие источники утверждают, что присутствие обоих механизмов сохранения теломераз приводит к плохому исходу [25].

В настоящее время актуальным является исследование молекулярно-генетических изменений с использованием ДНК-микрочипов – техника, которая позволяет анализировать экспрессию множества генов. Эта методика была применена к остеогенным саркомам. Анализ обычно проводился двумя способами [26]:

- 1) идентификация кластеров генов, которые могут иметь прогностическое значение как группа. Такие прогностические кластеры могут идентифицировать гены, экспрессия которых повышена или уменьшена, в различных группах сравнения: например, в группах с метастазами и без метастазов или в группах пациентов, чувствительных к химиотерапии и нечувствительных к ней;
- 2) идентификация клеточных сигнальных путей, которые могут влиять на этиологию или могут быть мишенями таргетной терапии.

Исследование с помощью ДНК-микрочипа планируется проводить также для идентификации пациентов, у которых ответ на химиотерапию будет незначительным. Подобная работа была проведена M.B. Mintz et al. [27]. При анализе результатов исследования образцов тканей пациентов с остеогенной саркомой применяли кластерный анализ, сравнивавший группы пациентов, у которых ответ на химиотерапию был незначительным, и пациентов с хорошим ответом на химиотерапию, помог идентифицировать 104 гена, которые статистически значимо отличались между этими группами. Группа, у которой был слабый ответ на химиотерапию, имела изменения в сигнальных путях, отвечающих за стимуляцию развития остеокластов и их активность, ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса и ре-

зистентность к апоптозу. Среди генов, в которых были выявлены отличия, имеются такие, как *annexin 2*, *SMAD*, *PLA2G2A*, *TGFB1*, *ECM*, *SPARCL1*, *biglycan*, *PECAM*.

В другом исследовании, проведенном K. Ochi et al., ДНК-микрочип, предназначенный для изучения профиля экспрессии около 23000 генов, использовался для сравнения групп пациентов, ответивших на химиотерапию, состоящую из 6 пациентов, и группу резистентных к химиотерапии, состоящую из 7 пациентов. Было идентифицировано 60 генов, которые отличались в двух группах. Наиболее значимыми среди этих генов были те, которые вовлечены в механизмы формирования резистентности к химиотерапии, такие как *AKR1C4*, *GPX1*, *GSTTLp28* [28].

ДНК-микрочип использовали для определения разницы в экспрессии генов до и после химиотерапии. В исследовании, проведенном P. Leonard et al., включающем 22 пациента с остеогенной саркомой, получены данные, которые свидетельствуют о повышенной экспрессии генов, отвечающих за восстановление ДНК после химиотерапии [29].

Исследование при помощи ДНК-микрочипа также используется для идентификации характеристик опухоли, отвечающих за метастазирование. В результате работы T. Nekano et al. с использованием ДНК-микрочипа были идентифицированы клеточные линии, которые обладают высоким или низким метастатическим потенциалом. Также обнаружены различия в экспрессии 7 генов метастатической клеточной линии, включая *AXL*, *TGFA*, *GOLL7A1*, *WNT5A*. Три гена были чрезмерно экспрессированы в клеточной линии с низкой активностью к метастазированию – *IL-6*, *MKK6*, *BRAG* [30].

Среди предклинических исследований интерес представляют данные по изучению модели остеогенной саркомы на мышах, проведенные C. Khanna et al. с использованием клеточных линий, различных по метастатическому потенциалу, при этом выявлены отличия в показателях экспрессии гена *p53* между группами. Эти гены могут быть разделены на 6 основных групп согласно их функциям: гены, отвечающие за апоптоз и пролиферацию, подвижность клеток и цитоскелет, инвазию, иммунное выживание, адгезию и ангиогенез [31].

Исследования на ДНК-микрочипе также могут быть использованы для анализа эффектов отдельных генов в клеточной линии остеогенной саркомы человека. В работе C. Zucchini et al. проведено трансфекционное гена щелочной фосфатазы в данную клеточную линию и получены клоны с его высокой и низкой экспрессией. Высокая экспрессия щелочной фосфатазы была ассоциирована с низким метастатическим потенциалом. Добавление этого единственного гена привело к изменениям экспрессии 79 генов. Гены, экспрессия которых была изменена, можно разделить на категории: гены, отвечающие за клеточный рост и обмен веществ, клеточный цикл, передачу сигналов, метаболизм ДНК, метаболизм РНК, цитоскелет и клеточную подвижность [32].

В исследовании M. Wolf et al. проводили сравнение клеточной линии остеогенной саркомы человека с нормальными остеобластами. Подобный анализ показал различия в 35 отдельно экспрессируемых генах, среди которых часть имела повышенную экспрессию, а часть – пониженную. Например, при остеогенной саркоме наблюдали повышенную экспрессию *PAB1*, *HSP90B*, *ARC41*, а пониженную – *FN1*, *THBS1*, *FGFR4*, *CSRP2*, *FMO5*, *FMOD*, *FBLN2* [33].

Проведено исследование для сравнения выборки из 29 пациентов и клеточных линий остеогенной саркомы при помощи методов Genome-Wide Human SNP 6.0 и Illumina Human-6 v2.0 Expression BeadChip. В результате анализа данных авторы выявили ряд генов, связанных с развитием остеогенной саркомы, и среди них гены *MCM4* и *LATS2* [34].

Целью исследования, проведенного J. Both et al., была идентификация новых «кандидатных» онкогенов в p11.2-p12 локусах 17 хромосомы. Данный регион амплифицирован в 25 случаях остеогенных сарком, и поэтому его исследование представляет значительный интерес. Исследовали 26 образцов остеогенной саркомы, в которых изучаемый регион был амплифицирован. Анализ проводили с помощью чипа высокого разрешения для исследования одиночных нуклеотидных полиморфизмов, а также методику идентификации наиболее значимых амплифицированных регионов (GISTIC). В результате идентифицировали 11 генов, экспрессия которых повышалась в связи с амплификацией изучаемого региона в 50 % случаев [35].

Среди геномных исследований интересно исследование одиночных нуклеотидных полиморфизмов, поставленное L. Mirabello et al. при помощи чипа «Custom Infinium BeadChip», в ходе которого получены данные о 4836 точечных нуклеотидных полиморфизмах в 255 кандидатных генах на выборке из 96 случаев остеогенной саркомы. Наличие достоверных полиморфизмов получено для генов: *MDM2*, *MPG*, *FGF2*, *FGFR3*, *GNRH2*, *IGFI* [36].

В исследовании D. Caronia et al., в которое включили 102 пациента с диагнозом остеогенная саркома, изучены 346 одиночных нуклеотидных полиморфизмов. В результате проведенной работы авторами найдены полиморфизмы, связанные с общей выживаемостью: один полиморфизм в гене *ABCC3* и три полиморфизмы в гене *ABCB1* [37].

Задачей другого исследования было изучение 52 нуклеотидных полиморфизмов в 13 генах, которое проводили на 104 пациентах с диагнозом остеогенная саркома. В ходе исследования выявлено 2 полиморфизма в гене *IGF2R*, ассоциированных с риском развития остеогенной саркомы, в сравнении с контрольной группой практически здоровых людей [38].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ САРКОМЫ ЮИНГА

Саркома Юинга – кругло-мелкоклеточная опухоль с различной степенью нейроэктодермальной дифференцировки. Ключевым моментом в развитии саркомы Юинга являются хромосомные изменения в виде транслокации между участками 22-й хромосомы и, как правило, 11-й хромосомы, вызывающие нарушение месторасположения и функции определенных генов.

Известно, что в 85 % наблюдений саркомы Юинга присуща хромосомная аномалия – транслокация t(11;22)(q24;q12). Данная транслокация переносит ген *EWSR1* с 22-й хромосомы на ген *FL1* 11-й хромосомы и кодирует белок EWS/FL1, обладающий онкогенной функцией.

EWS/FL1 действует как измененный транскрипционный фактор, и некоторые из его нижележащих цепей вовлечены в туморогенез. Ранние исследования показывали значение EWS/FL1 как сильного активатора транскрипции [39], однако более поздние работы по-

звolyют предполагать о способности *EWS/FL1* выступать как репрессор транскрипции ряда целевых генов [40]. Анализ клеточной линии саркомы Юинга с использованием микрочипа позволил идентифицировать более 1000 генов, которые регулируются посредством *EWS/FL1*, причем интересно, что около 80 % генов подавлялись в результате действия данного фактора [41]. Последующие исследования, сравнивающие множество клеточных линий саркомы Юинга и образцы опухолей, выявили, что *EWS/FL1* в одинаковой степени индуцирует и подавляет активность целевых генов [42]. Разумеется, не все эти гены вовлечены в процесс опухолевой трансформации, однако некоторые из них играют критическую роль в онкогенезе. К таким генам относятся *NKX2.2*, *NROB1*, *GLI1*. Интересно, что продукты данных генов играют роль в регуляции транскрипции, однако точные механизмы их действия остаются не до конца изученными [43]. С другой стороны, *EWS/FL1* имеет ряд целевых генов, онкогенные свойства которых хорошо изучены. Например, экспрессия *hTERT* (человеческой теломеразной обратной транскриптазы) [44] и *VEGF* (вазоэндотелиального фактора) [45], отвечающих, соответственно, за репликативное бессмертие опухолевых клеток и онкогенез, индуцируется посредством *EWS/FL1*. В ряде исследований было показано, что *EWS/FL1* вовлечен в регуляцию пути PI3K-AKT посредством воздействия на промотор гена *CAV1*, приводящую к его высокой экспрессии при саркоме Юинга [46]. Представлены данные о воздействии *EWS/FL1* на систему инсулиноподобного фактора роста, влияющего на IGF-I и его рецептор (IGF-IR), а также подавлении им экспрессии *IGFBP-3* [47].

Менее чем в 5 % случаев саркомы Юинга фузия включает в себя ген *ERG*, расположенный в хромосоме 21q22. Существует ряд альтернативных транслокаций с фузией гена *EWSR1* на гены *FEV*, *ETV1*, *ETV4*, *E1AF* [48].

Специфические транслокации при саркоме Юинга представлены в табл. 1.

В последнее время разработаны диагностические тесты на основе метода ПЦП с обратной транскриптазой, задачей которых является детекция двух наиболее распространенных типов фузии (*EWSR1/FLI1*, *EWSR1/ERG*). К сожалению, в случае редких транслокационных вариантов данный тест давал ложно-отрицательный результат. В свою очередь, FISH метод позволяет проводить детекцию любых транслокационных вариантов локуса *EWSR1* [49].

Помимо исследований, связанных с транслокациями при саркоме Юинга, интерес представляют исследования нуклеотидных полиморфизмов. Например, в исследовании J. Wang et al. изучали полиморфизм в

гене *CD86*, влияющем на Т-клеточный ответ. Исследование проводилось на китайской популяции и включало 158 пациентов с саркомой Юинга. Результаты исследования показали ассоциацию полиморфизма +1057 G/F в гене *CD86* с повышенной предрасположенностью к саркоме Юинга в случае наличия генотипа А или АА [50].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ХОНДРОСАРКОМЫ

Хондросаркома – гетерогенная группа злокачественных новообразований, основой которой является хрящевая ткань. Хондросаркомы составляют около 25 % первичных сарком костей. В 38–70 % случаев первичной и 86 % случаев вторичной центральной хондросаркомы, а также в 100 % случаях исследованных хондросарком выявлены мутации гена изоцитратдегидрогеназы (*IDH1* и *IDH2*) [51].

Генетические и эпигенетические изменения, лежащие в основе прогрессирования хондросаркомы, остаются до сих пор малоизученными. В ряде исследований изучены некоторые изменения, затрагивающие сигнальные пути, которые активны при центральной хондросаркоме: *pRB*, *IHH/PTHLH/Bcl-2*, *Src*, *Akt*, *PDGFR*.

Экспрессия *CDK4* и *MDM2* ассоциирована с высокозлокачественной хондросаркомой. Также повышенная экспрессия *CDNK2A* выявлена на клеточных линиях хондросаркомы [52]. Интересно исследование, посвященное потере гетерозиготности (LOH) в локусе t 9p21, в котором находятся гены *CDKN2A/p16/INK4A* и *INK4A-p14ARF*. Данная особенность обнаружена в 15 из 39 случаев хондросарком [53]. J.V.M.G. Bovee et al. было показано, что при хондросаркоме присутствует реэкспрессия генов *FGF2*, *FGFR1*, *PTHrP*, *Bcl-2* и *p21*, причем уровень экспрессии возрастает с увеличением степени ее злокачественности [54]. Достаточно интересно исследование, в котором проводили количественный PCR-RT для генов *IHH*, *PTCH*, *SMO*, *GLI2*, а также иммуногистохимическое исследование экспрессии генов *PTHrP*, *PTHrP*, *Bcl-2*, *p21*, *cyclin D1*, *cyclin E* на 26 хондросаркомах и 35 энхондромах. Данные показали, что при хондросаркомах и энхондромах отсутствует активность *IHH*, в то время как *PTHrP* остается активным. При этом высокая экспрессия *PTHrP* и *Bcl-2* соответствует увеличению злокачественности при хондросаркомах [55].

Получены противоречивые результаты при изучении теломеразной активности при хондросаркоме. Так, в работе J.V. Bovee et al. не обнаружено увеличения теломеразной активности при хондросаркоме в сравнении с доброкачественными новообразованиями, более того, в лизатах опухоли выявлено ингибирование теломеразы [56].

В других исследованиях теломеразная активность при хондросаркоме имела место [57]. В последующих работах также показано наличие экспрессии теломеразы, ассоциированной со степенью и злокачественностью опухоли [58].

Генетические исследования злокачественной фиброзной гистиоцитомы. Злокачественная фиброзная гистиоцитома (ЗФГ) является редкой, но высокоагрессивной опухолью кости. Она составляет менее 2 % всех первичных сарком костей. Генетические особенности ЗФГ в настоящее время остаются малоизученными. В исследовании, проведенном M. Tarkkanen

Таблица 1

Специфические транслокации при саркоме Юинга

Транслокация	Вовлеченный ген
t(11;22)(q24;q12)	<i>EWSR1-FLI1</i>
t(21;22)(q22;q12)	<i>EWSR1-ERG</i>
t(7;22)(p22;q12)	<i>EWSR1-ETV1</i>
t(17;22)(q12;q12)	<i>EWSR1-ETV4</i>
t(2;22)(q33;q12)	<i>EWSR1-FEV</i>
t(16;21)(p11;q22) FUS	<i>ERG</i>
t(2;16)(q35;p11) FUS	<i>FEV</i>

et al. методом компаративной геномной гибридизации (CGH), было обследовано 26 пациентов с ЗФГ костей. Исследование показало наличие изменений в числе копий некоторых последовательностей ДНК в таких участках, как 8q21, 9q32-qter, 7q22-q31, 1q21-q23, 7p12-pter, 7cen-q11.26, 15q21, 13q21-q22 и 18q12-q22 [59]. Изменения теломеразной активности при ЗФГ изучали T. Matsuo et al. на выборке из 10 пациентов с ЗФГ костей с использованием ПЦР методики TRAP (протокол амплификации теломерных повторов), а также при помощи измерения длины теломеров методом гибридизации в геле и количественной детекции человеческой теломеразной обратной транскриптазы hTERT при помощи ПЦР в реальном времени. Теломеразная активность и экспрессия hTERT были выявлены в 100 % опухолевых образцов, а в 50 % образцов имелись свидетельства о включении механизма альтернативного удлинения теломеров (ALT). Интересно, что ALT являлось достоверным фактором неблагоприятного прогноза у пациентов с ЗФГ кости [60].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ХОРДОМЕ

Хордома – редкая, злокачественная опухоль, с характерной морфологией и иммуногистохимическим профилем. Хордома локализуется в основном в костях свода черепа, позвонков или крестца. Общегеномные исследования с использованием CGH (компаративной геномной гибридизации) показали высокую частоту гомозиготных делеций в локусе 9p21, включающем такие гены, как *CDKN2A/2B* в 70 % анализируемых случаев, а также изменения в локусе 6q27 с геном *T* [61]. Редкие случаи семейной хордомы связаны с дупликацией гена *T* (локус), у членов 4 из 7 изученных семей – с историей семейной хордомы [62]. Эти наблюдения привели к детальным исследованиям, посвященным действию гена *T* и его экспрессии как на уровне РНК, так и на уровне белка. Примерно в половине исследованных образцов приобретение Т-региона имело место. Однако одинаковые уровни экспрессии гена *T* были обнаружены как на уровне РНК, так и на уровне белка, независимо от количества копий. Экспрессия Т-протеина, за исключением гемангиобластомы, является специфичным для хордомы и является ее специфичным и чувствительным маркером. Механизм, ответственный за повышенную экспрессию гена *T* в отсутствии копий, до сих пор остается неясным. Попытки показать влияние промотора гена или генной мутации на выше- и нижележащие регуляторные элементы оказались unsuccessfulными [63].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГИГАНТОКЛЕТОЧНОЙ ОПУХОЛИ КОСТИ

Гигантоклеточная опухоль кости (ГКО) является доброкачественной по своей природе, однако приводит к остеолитической деструкции, а также обладает неясным биологическим поведением и непредсказуемым клиническим течением [64]. В исследовании, проведенном E. Babeto et al., участвовало 43 пациента с ГКО. Был идентифицирован ряд новых генов, экспрессия которых при ГКО имеет ряд отличий в сравнении с нормальной тканью. К этим генам относятся *NEB*, *ROCK1*, *ZAK*, *KTN1*. Данные были подтверждены методом PCR-RT и иммуногистохимически [65]. В дру-

гом исследовании, которое проводили на материале от 21 пациента с ГКО, при помощи ДНК-микрочипа изменения в экспрессии были выявлены для 12 генов. Наиболее значимые различия получены для гена *UCHL1*. В опухолевых клетках методами чувствительного к метилированию ПЦР и бисульфатного секвенирования обнаружено сильное метилирование промотора *UCHL1*, притом что в нормальных клетках (производные от кости стромальные клетки) метилирование данного участка полностью отсутствовало. Таким образом, ген *UCHL1* инактивирован в клетках ГКО [66].

Другим геном, который изучали у больных ГКО, является ген-супрессор опухоли *RUNX3*, расположенный в регионе 1p36. При различных опухолях этот регион часто бывает инактивирован посредством гиперметилирования, гистонных модуляций или других процессов. Исследование, проведенное Y.X. Han и D.Y. Liang, показало, что частота экспрессии *RUNX3* у пациентов с ГКО достоверно ниже, чем в нормальной костной ткани. У 30 из 47 пациентов с ГКО отмечена супрессия данного гена. Снижение экспрессии *RUNX3* в клеточной линии ГКО было ассоциировано с метилированием данного гена. Интересно, что в поставленном *in vitro* эксперименте экзогенная экспрессия *RUNX3* значительно подавляла клеточный рост в линии ГКО, а также индуцировала апоптоз. Таким образом, можно говорить о значении *RUNX3*, как супрессора ГКО [67].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОСТИ НА ПРИМЕРЕ АНЕВРИЗМАЛЬНОЙ КОСТНОЙ КИСТЫ

Первичная аневризмальная костная киста – кистозное поражение кости, состоящее из заполненных кровью полостей, разделенных соединительной тканью, состоящей из фибробластов, остеокластов и непосредственно костной ткани.

Аневризмальная костная киста может возникать как первичная опухоль обычно в метаэпифизе у пациентов в первые два десятилетия жизни или как вторичная опухоль по отношению к другим опухолям кости, таким как остеобластома или хондробластома. Еще в 1999 г. была обнаружена рекуррентная транслокация (t(16;17), которая выявлялась в ряде случаев аневризмальной костной кисты [68]. Позже было показано, что данная транслокация перемещает промотор гена *CDH11*, обильно экспрессируемого в костях, в область перед геном *USP6* (*TRE2*, *TRE17*) [69]. В последние годы выявлено множество различных транслокаций при аневризмальной костной кисте, причем все они были связаны с активацией гена *USP6* в локусе 17p13 [70]. Специфические транслокации при аневризмальной костной кисте представлены в табл. 2.

Таким образом, патогенез большинства первичных аневризмальных костных кист включает в себя усиление экспрессии гена *USP6* при помощи более активного промотора [71]. Продукт гена *USP6* ответственен за ремоделирование актина [72], а также индуцирует экспрессию матриксных металлопротеаз [73], запускает сигнализацию костного морфогенетического белка (BMP – bone morphogenetic protein) и при этом ингибирует дифференцировку преостеобластов [74].

Изменения в *USP6* также выявлены в ГКО и телеангиэктатической остеогенной саркоме, что дает потен-

Таблица 2

Специфические транслокации
при аневризальной костной кисте

Транслокация	Вовлеченный ген
t(16;17)(q22;p13)	<i>CDH11-USP6 (Tre2)</i>
t(1;17)(p34.1e34.3;p13)	<i>TRAP150-USP6</i>
t(3;17)(q21;p13)	<i>ZNF9-USP6</i>
t(9;17)(q22;p13)	<i>OMD-USP6</i>
t(17;17)(q12;p13)	<i>COL1A1-USP6</i>

циальную возможность для использования его в диагностике, когда морфологические или клинические проявления атипичны [75].

АВТОРСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

К сожалению, в нашей стране молекулярно-генетические исследования опухолей костей практически не проводили. Также стоит отметить, что для генетических исследований важно изучение популяционных особенностей – таким образом, молекулярно-генетические исследования пациентов с опухолями костей из российской популяции являются актуальной задачей.

Нами проведен сравнительный анализ 6 наиболее значимых кандидатных полиморфизмов, выявленных L. Mirabello et al. в группе российских пациентов с различными опухолями костной и хрящевой ткани и в группе популяционного контроля [36]. Для этого взяты образцы цельной крови у 119 пациентов со злокачественными и пограничными новообразованиями костей, поступивших в отделение общей онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН. Контрольную группу составили 93 чело-

века без онкологических заболеваний. В табл. 3 перечислены полиморфизмы, включенные в исследование.

Для проведения генетического анализа использовали геномную ДНК, выделенную из 5 мл лейкоцитарной фракции крови при помощи набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя. Определение аллелей полиморфизмов проводили в ходе реакции минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим анализом продуктов реакции на времяпролетном масс-спектрометре (MALDI-TOF минисеквенирование). Для этого первоначально амплифицировали участки генов, несущие анализируемые полиморфизмы, в ходе ПЦР. Далее проводили дефосфорилирование концевых фосфатных групп дНТФ в пост-амплификационной смеси, реакцию минисеквенирования с использованием олигонуклеотидных зондов, а далее проводили очистку продуктов. Спектры получали с использованием MALDI-времяпролетного масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия). Статистическую обработку данных производили в программе RStudio. Для обработки данных применялся пакет SNPAssoc для R. Проведенный анализ сравнения частот генотипов в соответствии с указанными генетическими моделями выявил достоверные ассоциации со следующими полиморфизмами:

– **IGF1.rs7956547** (Рецессивная модель наследования, аллель риска – С, отношение шансов 3,28);

– **GNRH2.rs3761243** (Доминантная модель наследования, протективный аллель – С, отношение шансов 0,54);

– **FGFR3.rs6599400** (Доминантная модель наследования, аллель риска А, отношение шансов 2,15).

Выявленные нами ассоциации представлены в табл. 4.

Данные полиморфизмы находятся в промоторных областях генов, не вызывают аминокислотных замен в

Таблица 3

Исследованные полиморфизмы в опухолях костей

Функциональная группа	Ген (символ гена)	Идентификатор полиморфизма в базе данных dbSNP NCBI
Гены, участвующие в росте и формировании кости	<i>Гормон роста 1 типа (GH1)</i>	rs7921
	<i>Инсулиноподобный фактор роста 1 типа (IGF1)</i>	rs7956547
	<i>Гонадотропин релизинг гормон 2 типа (GNRH2)</i>	rs3761243
	<i>Фактор роста фибробластов 2 типа (FGF2)</i>	rs11737764
	<i>Рецептор фактора роста фибробластов 3 типа (FGFR3)</i>	rs6599400
Контроль клеточного цикла	<i>Гомолог мышечного MDM2 p53 связывающего белка (MDM2)</i>	rs1690916

Таблица 4

Ассоциации полиморфизмов с развитием злокачественных и пограничных опухолей костей

Полиморфизм	Модель	Генотипы	Контроль, %	Злокачественные, %	Отношение шансов [доверительный интервал]	p-value
IGF1.rs7956547	Rec	t/t-c/t	87,5	68,1	3,28[1,42–7,54]	0,003
		c/c	12,5	31,9		
GNRH2.rs3761243	Dom	a/a	35,7	50,5	0,54[0,3–0,99]	0,04
		a/c-c/c	64,3	49,5		
FGFR3.rs6599400	Dom	c/c	45,3	27,9	2,15[1,06–4,34]	0,03
		a/c-a/a	54,7	72,1		

белках, но могут влиять на уровень экспрессии, изменяя участки связывания регуляторных элементов генома. Дальнейшие исследования на больших выборках помогут выделить ассоциации с гистологическим типом опухоли, ответом на химиотерапию и связью с прогнозом.

ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ ОПУХОЛЕЙ КОСТЕЙ

Дифференциальный диагноз между некоторыми случаями саркомы Юинга/PNET, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, синовиальной саркомы, мелко-клеточной остеогенной саркомы и мезенхимальной хондросаркомы может представлять трудности в результате ряда морфологических сходств. Помимо иммуногистохимических и гистохимических методов имеется перспектива использования методов молекулярной диагностики подобных нозологий. Методы молекулярно-генетических исследований можно использовать для детекции специфических транслокаций при саркоме Юинга с помощью методов PCR-RT или флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Прогноз течения заболеваний, таких как саркома Юинга, может осуществляться при помощи молекулярных методов. В ретроспективных исследованиях получены данные, согласно которым прогноз опухоли зависит от типа транслокации [76]. Помимо специфических транслокаций имеются множественные хромосомные аномалии, такие как делеция региона p16 или появление мутаций в гене p53 [77]. Эти аномалии могут быть выявлены при помощи PCR-RT. Важную роль в прогрессировании опухолей и их прогнозе играет их резистентность к терапии, например, ответ на терапию ингибиторами тирозинкиназы зависит от наличия мутаций в *KIT* и *PRGFRA*. Некоторые специфические изменения при саркомах, такие как ряд транслокаций, могут указать на возможности таргетной терапии. Таким образом, молекулярные и цитогенетические следования последних десятилетий могут внести вклад в диагностику, идентификацию и в ряде случаев в прогнозирование течения ряда опухолей кости и сарком в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Szuhai K., Tanke H. COBRA: combined binary ratio labeling of nucleic acid probes for multi-color fluorescence in situ hybridization karyotyping // *Nature. Protocols*. 2006. V. 1. P. 264-275.
2. Trask B.J. Human Cytogenetics: 46 Chromosomes, 46 Years and Counting // *Nature reviews*. 2002. V. 3. P. 769-778.
3. Szuhai K., Jennes I., de Jong D. et al. Tiling resolution array-CGH shows that somatic mosaic deletion of the EXT gene is causative in EXT gene mutation negative multiple osteochondromas patients // *Hum. Mutat*. 2011. V. 32. P. 2036-2049.
4. De Jong D., Verbeke S.L., Meijer D. et al. Opening the archives for state of the art tumour genetic research: sample processing for array-CGH using decalcified, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue-derived DNA samples // *BMC Res. Notes*. 2011. V. 4. P. 1.
5. Savola S., Nardi F., Scotlandi K. et al. Microdeletions in 9p21.3 induce false negative results in CDKN2A FISH analysis of Ewing sarcoma // *Cytogenet. Genome Res*. 2007. V. 119. P. 21-26.
6. van Eijk R., Licht J., Schrupf M. et al. Rapid KRAS, EGFR, BRAF and PIK3CA mutation analysis of fine needle aspirates from non-small-cell lung cancer using allele-specific qPCR // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. P. 17791.
7. Setty P., Hammes J., Rothamel T. et al. A pyrosequencing-based assay for the rapid detection of IDH1 mutations in clinical samples // *J. Mol. Diagn*. 2010. V. 12. P. 750-756.
8. Cuppen E. Genotyping by Allele-Specific Amplification (KASPar) // *CSH Protoc*. 2007: pdb.prot4841.
9. Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B., Hood L.E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis // *Nature*. 1986. V. 321 (6071). P. 674-679.
10. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate // *Science*. 1998. V. 281 (5375). P. 363, 365.
11. Sokolov B.P. Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA // *Nucleic Acids Res*. 1990. V. 18 (12). P. 3671.
12. Haff L.A., Smirnov I.P. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry // *Genome Res*. 1997. V. 7 (4). P. 378-388.
13. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions // *Biotechnology (NY)*. 1993. V. 11 (9). P. 1026-1030.
14. Yershov G., Barsky V., Belgovskiy A., Kirillov E., Kreindlin E., Ivanov I., Parinov S., Guschin D., Drobishev A., Dubiley S. et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93 (10). P. 4913-4918.
15. Sandberg A.A., Bridge J.A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: chondrosarcoma and other cartilaginous neoplasms // *Cancer Genet. Cytogenet*. 2003. V. 143. P. 1-31.
16. Stephens P.J., Greenman C.D., Fu B. et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development // *Cell*. 2011. V. 144. P. 27-40.
17. Nielsen G.P., Burns K.L., Rosenberg A.E. et al. CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations // *Am. J. Pathol*. 1998. V. 153. P. 159-163.
18. Wei G., Lonardo F., Ueda T. et al. CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons // *Int. J. Cancer*. 1999. V. 80. P. 199-204.
19. Wunder J.S., Gokgoz N., Parkes R. et al. TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study // *J. Clin. Oncol*. 2005. V. 23. P. 1483-1490.
20. Overholtzer M., Rao P.H., Favis R. et al. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 11547-11552.
21. Overholtzer M., Rao P.H., Favis R. et al. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 11547-11552.
22. Miller C.W., Ikezoe T., Krug U. et al. Mutations of the CHK2 gene are found in some osteosarcomas, but are rare in breast, lung, and ovarian tumors // *Genes Chromosomes Cancer*. 2002. V. 33. P. 17-21.
23. Mohseny A.B., Tiekens C., Van der Velden P.A. et al. Small deletions but not methylation underlie CDKN2A/p16 loss of expression in conventional osteosarcoma // *Genes Chromosomes Cancer*. 2010. V. 49. P. 1095-1103.
24. Sanders R.P., Drissi R., Billups C.A. et al. Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma // *J. Clin. Oncol*. 2004. V. 22. P. 3790-3797.
25. Ulaner G.A., Huang H.Y., Otero J. et al. Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma // *Cancer. Res*. 2003. V. 63. P. 1759-1763.
26. Hayden J.B., Hoang B.H. Osteosarcoma: Basic Science and Clinical Implications // *Orthop. Clin. N. Am*. 2006. V. 37. P. 1-7.
27. Mintz M.B., Sowers R., Brown K.M. et al. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma // *Cancer Res*. 2005. V. 65. P. 1748-1754.
28. Ochi K., Daigo Y., Katagiri T. et al. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma by gene-expression profiles // *Int. J. Oncol*. 2004. V. 24. P. 647-655.
29. Leonard P., Sharp T., Henderson S. et al. Gene expression array profile of human osteosarcoma // *Br. J. Cancer*. 2003. V. 89. P. 2284-2288.
30. Nakano T., Tani M., Ishibashi Y. et al. Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma // *Clin. Exp. Metastasis*. 2003. V. 20. P. 665-674.
31. Khanna C., Khan J., Nguyen P. et al. Metastasis associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma // *Cancer Res*. 2001. V. 61. P. 3750-3759.
32. Zucchini C., Bianchini M., Valvassori L. et al. Identification of candidate genes involved in the reversal of malignant phenotype of osteosarcoma cells transfected with the liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene // *Bone*. 2004. V. 34. P. 672-679.
33. Wolf M., El-Rifai W., Tarkkanen M. et al. Novel findings in gene expression detected in human osteosarcoma by cDNA microarray // *Cancer Genet. Cytogenet*. 2000. V. 123. P. 128-132.
34. Kuijjer M.L., Rydbeck L.H., Kresse S.H. et al. Identification of Osteosarcoma Driver Genes by Integrative Analysis of Copy Number and Gene Expression Data // *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2012. V. 51. P. 696-706.

35. Both J., Wu T., Bras J., Schaap G.R., Baas F. *et al.* Identification of Novel Candidate Oncogenes in Chromosome Region 17p11.2-p12 in Human Osteosarcoma // PLoS ONE. 2012. V. 7 (1): e30907. doi:10.1371/journal.pone.0030907.
36. Mirabello L., Yu K., Berndt S.I., Burdett L., Wang Z., Chowdhury S., Teshome K., Uzoka A., Hutchinson A., Grotmol T., Douglass C., Hayes R.B., Hoover R.N., Savage S.A. A comprehensive candidate gene approach identifies genetic variation associated with osteosarcoma // BMC Cancer. 2011. V. 11. P. 209.
37. Caronia D., Patiño-García A., Peréz-Martínez A., Pita G., Moreno L.T., Zalacain-Díez M., Molina B., Colmenero I., Sierrasesúmaga L., Benítez J., González-Neira A. Effect of ABCB1 and ABCC3 polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy: a pharmacogenetic study // PLoS One. 2011. 6(10): e26091. Epub 2011. Oct 7.
38. Savage S.A., Woodson K., Walk E. *et al.* Analysis of Genes Critical for Growth Regulation Identifies Insulin-like Growth Factor 2 Receptor Variations with Possible Functional Significance as Risk Factors for Osteosarcoma // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2007. V. 16. P. 1667-1674.
39. Lessnick S.L., Braun B.S., Denny C.T., May W.A. Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/ FLI-1 fusion gene // Oncogene. 1995. V. 10. P. 423-431.
40. Nakatani F., Tanaka K., Sakimura R., Matsumoto Y., Matsunobu T., Li X. *et al.* Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-FLI1 oncogenic fusion protein // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 15105-15115.
41. Prieur A., Tirode F., Cohen P., Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3 // Mol. Cell Biol. 2004. V. 24. P. 7275-7283.
42. Hancock J.D., Lessnick S.L. A transcriptional profiling metaanalysis reveals a core EWS-FLI gene expression signature // Cell Cycle. 2008. V. 7. P. 250-256.
43. Toomey E.C., Schiffman J.D., Lessnick S.L. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma // Oncogene. 2010. V. 29. P. 4504-4516.
44. Fuchs B., Inwards C., Scully S.P., Janknecht R. hTERT is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins // Clin. Orthop. Relat. Res. 2004. V. 426. P. 64-68.
45. Fuchs B., Inwards C.Y., Janknecht R. Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS-ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing's sarcoma // Clin. Cancer Res. 2004. V. 10. P. 1344-1353.
46. Gangwal K., Sankar S., Hollenhorst P.C., Kinsey M., Haraldsen S.C., Shah A.A. *et al.* Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 10149-10154.
47. Herrero-Martin D., Osuna D., Ordonez J.L., Sevillano V., Martins A.S., Mackintosh C. *et al.* Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target // Br. J. Cancer. 2009. V. 101. P. 80-90.
48. Sankar S., Lessnick S.L. Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma // Cancer Genet. 2011. V. 204. P. 351-365.
49. Suzhai K., Cleton-Jansen A.M., Hogendoorn P.C., Bovée J.V. Molecular pathology and its diagnostic use in bone tumors // Cancer Genet. 2012. V. 205. P. 193-204.
50. Wang J., Zhou Y., Feng D., Yang H., Li F., Cao Q., Wang A., Xing F. CD86 +1057G/A polymorphism and susceptibility to Ewing's sarcoma: a case-control study // DNA Cell Biol. 2012. V. 31(4). P. 537-540.
51. Amary M.F., Bacci S., Maggiani F. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours // J. Pathol. 2011. V. 224. P. 334-343.
52. Schrage Y.M., Lam S., Jochemsen A.G. *et al.* Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations; CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth *in vitro* // J. Cell Mol. Med. 2008. V. 13. P. 2843-2852.
53. van Beerendonk H.M., Rozeman L.B., Taminiau A.H.M. *et al.* Molecular analysis of the INK4A/INK4A-ARF gene locus in conventional (central) chondrosarcomas and enchondromas: indication of an important gene for tumour progression // J. Pathol. 2004. V. 202. P. 359-366.
54. Bovee J.V.M.G., Van den Broek L.J.C.M., Cleton-Jansen A.M. *et al.* Up-regulation of PTHrP and Bcl-2 expression characterizes the progression of osteochondroma towards peripheral chondrosarcoma and is a late event in central chondrosarcoma // Lab. Invest. 2000. V. 80. P. 1925-1933.
55. Rozeman L.B., Hameetman L., Cleton-Jansen A.M. *et al.* Absence of IHH and detection of PTHrP signalling in enchondromas and central chondrosarcomas // J. Pathol. 2005. V. 205. P. 476-482.
56. Bovee J.V., van Den Broek L.J., Cleton-Jansen A.M. *et al.* Chondrosarcoma is not characterized by detectable telomerase activity // J. Pathol. 2001. V. 193 (3). P. 354-360.
57. Rofstad E.K. Microenvironment-induced cancer metastasis // Int. J. Radiat. Biol. 2000. V. 76 (5). P. 589-605.
58. Martin J.A., DeYoung B.R., Gitelis S. *et al.* Telomerase reverse transcriptase subunit expression is associated with chondrosarcoma malignancy // Clin. Orthop. Relat. Res. 2004. V. 426. P. 117-124.
59. Tarkkanen M., Larramendy L.L., Bohling T. *et al.* Malignant fibrous histiocytoma of bone: Analysis of genomic imbalances by comparative genomic hybridization and C-MYC expression by immunohistochemistry // Eur. J. Cancer. 2006. V. 42. P. 1172-1180.
60. Matsuo T., Shimose S., Kubo T. Alternative lengthening of telomeres as a prognostic factor in malignant fibrous histiocytomas of bone // Anticancer Res. 2010. V. 30. P. 4959-4962.
61. Hallor K.H., Staaf J., Jonsson G. *et al.* Frequent deletion of the CDKN2A locus in chordoma: analysis of chromosomal imbalances using array comparative genomic hybridisation // Br. J. Cancer. 2008. V. 98. P. 434-442.
62. Yang X.R., Ng D., Alcorn D.A. *et al.* T (brachyury) gene duplication confers major susceptibility to familial chordoma // Nat. Genet. 2009. V. 41. P. 1176-1178.
63. Presneau N., Shalaby A., Ye H. *et al.* Role of the transcription factor T (brachyury) in the pathogenesis of sporadic chordoma: a genetic and functional-based study // J. Pathol. 2011. V. 223. P. 327-335.
64. Mak I.W., Cowan R.W., Popovic S., Colterjohn N., Singh G., Ghert M. Upregulation of MMP-13 via Runx2 in the stromal cell of giant cell tumor of bone // Bone. 2009. V. 45 (2). P. 377-386.
65. Babeto E., Conceição A.L.G., Valsechi M.C. Differentially expressed genes in giant cell tumor of bone // Virchows Arch. 2011. V. 458. P. 467-476.
66. Fellenberg J., Lehner B., Witte D. Silencing of the UCHL1 gene in giant cell tumors of bone // Int. J. Cancer. 2010. V. 127. P. 1804-1812.
67. Han Y.X., Liang D.Y. The role of the tumor suppressor RUNX3 in giant cell tumor of the bone // Int. J. Oncol. 2012. V. 40. P. 673-678.
68. Panoutsakopoulos G., Pandis N., Kyriazoglou I. *et al.* Recurrent t(16;17)(q22;p13) in aneurysmal bone cysts // Genes Chromosomes Cancer. 1999. V. 26. P. 265-266.
69. Oliveira A.M., Hsi B.L., Weremowicz S. *et al.* USP6 (Tre2) fusion oncogenes in aneurysmal bone cyst // Cancer Res. 2004. V. 64. P. 1920-1923.
70. Oliveira A.M., Perez-Atayde A.R., Dal Cin P. *et al.* Aneurysmal bone cyst variant translocations upregulate USP6 transcription by promoter swapping with the ZNF9, COL1A1, TRAP150, and OMD genes // Oncogene. 2005. V. 24. P. 3419-3426.
71. Oliveira A.M., Chou M.M., Perez-Atayde A. *et al.* Aneurysmal bone cyst: a neoplasm driven by upregulation of the USP6 oncogene // J. Clin. Oncol. 2006. V. 24. P. e1.
72. Masuda-Robens J.M., Kutney S.N., Qi H. *et al.* The TRE17 oncogene encodes a component of a novel effector pathway for Rho GTPases Cdc42 and Rac1 and stimulates actin remodeling // Mol. Cell Biol. 2003. V. 23. P. 2151-2161.
73. Ye Y., Pringle L.M., Lau A.W. *et al.* TRE17/USP6 oncogene translocated in aneurysmal bone cyst induces matrix metalloproteinase production via activation of NF-kappaB // Oncogene. 2010. V. 29. P. 3619-3629.
74. Lau A.W., Pringle L.M., Quick L. *et al.* TRE17/ubiquitin-specific protease 6 (USP6) oncogene translocated in aneurysmal bone cyst blocks osteoblastic maturation via an autocrine mechanism involving bone morphogenetic protein dysregulation // J. Biol. Chem. 2010. V. 285 (47). P. 37111-37120.
75. Sukov W.R., Franco M.F., Erickson-Johnson M. *et al.* Frequency of USP6 rearrangements in myositis ossificans, brown tumor, and cherubism: molecular cytogenetic evidence that a subset of "myositis ossificans-like lesions" are the early phases in the formation of soft-tissue aneurysmal bone cyst // Skeletal Radiol. 2008. V. 37. P. 321-327.
76. Ed Kawai A., Healy J.H. *et al.* EWS-FL11 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma // J. Clin. Oncol. 1998. V. 16. P. 1248-1255.
77. Bovée J.V.M.G., Hogendoorn P.C.W. Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications // Virchows Arch. 2010. V. 456. P. 193-199.

Поступила в редакцию 18 ноября 2013 г.

Kushlinskii N.E., Timofeev Yu.S. GENETIC STUDIES IN BONE TUMORS

Bone tumors are group of oncologic diseases, very difficult in diagnostic and treatment in most cases. According to the recent representations at the basis of bone tumors development are the genetic causes. In this review the data from several molecular-genetic and cytogenetic studies in bone neoplasms are represented. The evidences from preclinical models, and also data from studies in patients with malignant, borderline and benign bone tumors are considered. Besides, we represent our own results of investigation of single nucleotide polymorphisms, associated with bone tumors.

Key words: bone tumors; genetic; nucleotide polymorphisms.