

С.Р. Рушковский
Е.С. Афанасьева
В.Ф. Безруков
С.В. Демидов
И.Ю. Карачарова
Г.И. Климяк

Киевский национальный
университет имени Тараса
Шевченко

Институт онкологии
АМН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: солидные
опухоли у детей, молекулярные
маркеры, цитогенетические
маркеры.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ У ДЕТЕЙ

Резюме. Среди злокачественных опухолей у детей наиболее распространенными являются нейробластома, опухоль Вильмса, остеогенная саркома, саркома Юинга, рабдомиосаркома и синовиальная саркома. Указанные злокачественные образования имеют сходные цитоморфологические признаки, следовательно, достаточно сложно установить точный диагноз на основании использования общепринятых гистологических методов, поэтому все большую актуальность приобретают молекулярно-генетические и цитогенетические методы. Описаны аномалии генома, характерные для определенного типа неоплазий, и оценены возможности использования их в качестве молекулярных и цитогенетических маркеров в диагностике детских опухолей. Саркома Юинга, альвеолярная рабдомиосаркома и синовиальная саркома характеризуются наличием специфических транслокаций, которые являются четкими диагностическими маркерами заболевания. Для остеогенной саркомы, нейробластомы, эмбриональной рабдомиосаркомы и опухоли Вильмса свойственны множественные аномалии генома как на молекулярном, так и на цитогенетическом уровне. Разработка методов молекулярной и цитогенетической диагностики должна базироваться на изучении комплекса геномных аномалий и отбора наиболее информативных цитогенетических и молекулярных маркеров, которые имеют как диагностическое, так и прогностическое значение.

ВВЕДЕНИЕ

Успех лечения пациентов с онкологическими заболеваниями в большой мере зависит от точности и своевременности установления диагноза. Согласно исследованиям закономерностей канцерогенеза трансформация клеток связана с множественными перестройками их генома [1]. Часть из них возникает на стадии инициации, большая же часть перестроек генома трансформированных клеток — на стадии прогрессирования. Выявлены специфические изменения кариотипа для ряда неоплазий, что обусловило развитие цитогенетических и молекулярных подходов в диагностике онкологических заболеваний [2].

Актуальным стал поиск информативных молекулярных и цитогенетических маркеров различных злокачественных опухолей. По своей информативности маркеры можно разделить на диагностические (дают возможность установить точный диагноз) и прогностические (позволяют оценить группу риска, прогнозировать течение заболевания и, в некоторой мере, эффективность лечения). Как правило, диагностическими маркерами могут служить изменения генома, возникающие на начальных стадиях канцерогенеза (первичные аномалии генома) [3], прогностическими — на последующих стадиях развития опухоли (вторичные аномалии генома) [2, 3].

Среди злокачественных опухолей у детей наиболее распространенными являются нейробластома (НБ), опухоль Вильмса, саркома Юинга, остеогенная (ОС), синовиальная саркома (СС) и рабдомиосаркома

(РМС) [4]. Частота этих заболеваний среди населения Украины составляет от 1 на 10 000 (опухоль Вильмса) до 0,6—1 на 1 000 000 (саркома Юинга) [5]. Указанные новообразования имеют сходные цитоморфологические характеристики, поэтому существует проблема установления точного диагноза, особенно на ранних стадиях развития заболевания [4]. Установление точного диагноза не являлось бы необходимым условием для лечения, если бы эти опухоли имели сходный прогноз течения заболевания и схему терапии. К сожалению, такая ситуация на практике не подтверждается. В подобных случаях при установлении диагноза могут быть более полезны молекулярно-генетические и цитогенетические подходы.

Цель нашей работы — оценка возможности использования молекулярно-генетических и цитогенетических маркеров в диагностике детских опухолей.

Опухоли с известными первичными аномалиями генома. Под первичными аномалиями генома понимают нарушения, которые специфичны для определенного типа неоплазий и отмечаются в большинстве случаев [3]. Принято считать, что первичные геномные аномалии (чаще всего это хромосомные перестройки) являются непосредственной причиной малигнизации [6]. Диагностика неоплазий по первичным перестройкам широко применяется для диагностики гемобластозов [7, 8]. Однако хромосомные перестройки, которые можно использовать в качестве диагностических маркеров, идентифицированы только для небольшой части солидных

ЗЛОЯКІСНІ НОВОУТВОРЕННЯ У ДІТЕЙ

опухолей [6, 9]. Среди детских опухолей к легко диагностируемому по первичным перестройкам генома относятся саркома Юинга и подобные ей саркомы (ESFT), альвеолярная РМС и СС.

Саркома Юинга и ESFT — злокачественные опухоли нейроэктодермального происхождения с преимущественным поражением костей, значительно реже локализируются в мягких тканях. Риск возникновения заболевания повышается в период активного роста скелета и полового созревания. Представляют единую группу. Составляют 10–22% всех первичных опухолей костей у детей. Возрастной пик заболеваемости — вторая декада жизни (64% случаев). Около 20% заболевших составляют дети в возрасте до 10 лет. Частота заболевания — 0,6–1 на 1 млн детского населения. Чаще отмечается среди мальчиков [4, 10]. В большинстве случаев опухолевые клетки характеризуются наличием транслокаций, в результате которых происходит слияние гена *EWS* (локус 22q12) с различными генами *ETS*-семейства (табл. 1).

При транслокации t(11;22)(q24;q12) могут образовываться 2 варианта химерных генов *EWS-FLI1*. Тип 1 коррелирует с благоприятным прогнозом и в основном отмечается у пациентов с локализованным заболеванием [16]. Существует ряд опухолей, не относящихся к ESFT, при которых также выявляют транслокации, затрагивающие ген *EWS* (табл. 2). Представленные в табл. 1 и 2 изменения генома являются четкими диагностическими маркерами, позволяющими точно определять тип опухоли.

Таблица 1
Транслокации при саркоме Юинга и ESFT [6, 11–15]

Транслокация	Химерный ген	Частота, %
t(11;22)(q24;q12)	<i>EWS-FLI1</i>	85
t(21;22)(q22;q12)	<i>EWS-ERG</i>	10
t(7;22)(p22;q12)	<i>EWS-ETV1</i>	Редко
t(17;22)(q12;q12)	<i>EWS-ETAF</i>	Редко
t(2;22)(q33;q12)	<i>EWS-FEV</i>	Редко

Таблица 2
Транслокации, затрагивающие локус 22q12, при не-ESFT [17–20]

Транслокация	Химерный ген	Тип опухоли
t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-AFT1</i>	Светлоклеточная саркома
t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS-WT1</i>	Десмопластическая мелкоклеточная опухоль
t(9;22)(q22;q12)	<i>EWS-CHN</i>	Миксоидная хондросаркома
t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-CHOP</i>	Миксоидная липосаркома

Альвеолярная РМС. РМС — наиболее часто возникающая саркома мягких тканей детского возраста. У лиц в возрасте до 15 лет среди всех злокачественных новообразований РМС занимает 7-е место, что составляет от 4 до 10%, или 8 случаев на 1 млн населения. Более часто отмечается у мальчиков, чем у девочек (соотношение 1,4 : 1) [10]. РМС представляет гетерогенную группу опухолей. Различают 2 основных морфологических подтипа РМС — эмбриональная и альвеолярная. Подтипы различаются по протеканию заболевания, причем альвеолярная РМС имеет менее благоприятный прогноз [10].

При альвеолярной РМС обнаружены 2 реципрокные транслокации, ассоциированные с боль-

шинством случаев, которые могут служить диагностическими маркерами данного типа РМС [21]: t(2;13)(q35;q14) — в формировании химерного гена участвуют гены *PAX3* (хромосома 2) и *FKHR* (хромосома 13); t(1;13)(p36;q14) — образуется химерный ген *PAX7-FKHR*. Оба химерных белка — *PAX3-FKHR* и *PAX7-FKHR* — являются онкогенными транскрипционными факторами [6].

Как СС классифицируют приблизительно 10% всех опухолей мягких тканей. Опухоль развивается чаще всего в возрасте от 15 до 40 лет. [10]. Болеют преимущественно мальчики. Опухоль может иметь разную локализацию и трудно диагностируется с помощью гистологических методов [10]. Более чем в 95% случаев при СС обнаруживают реципрокную транслокацию t(X;18)(p11.2;q11.2) [22]. В результате транслокации происходит слияние гена *SYT* (18q11) с одним из *SSX*-генов (*SSX1*, *SSX2* или *SSX4*), локализованных в Xp11 [23, 24]. Наиболее часто происходит образование химерных генов *SYT-SSX1* и *SYT-SSX2*. Установлена связь между вариантом химерного гена и гистологическим подтипом СС. Так, *SYT-SSX1* характерен в основном для бифазного подтипа СС, а *SYT-SSX2* — для монофазного. Кроме того, наличие химерного гена *SYT-SSX1* обуславливает более агрессивное течение заболевания и менее благоприятный прогноз [24]. Химерный ген *SYT-SSX4* отмечается крайне редко, и пока не известна связь между данным вариантом и клинической картиной заболевания [11, 23].

Опухоли с трудноопределяемыми первичными аномалиями генома. Большинство солидных опухолей имеют множественные аномалии генома как на молекулярном, так и на цитогенетическом уровне [2, 3, 9]. В таких случаях практически невозможно определить первичные аномалии генома. Разработка методов молекулярной и цитогенетической диагностики должна базироваться на изучении комплекса геномных аномалий и отбора наиболее информативных цитогенетических и молекулярных маркеров. К трудно диагностируемому опухолям можно отнести ОС, НБ, эмбриональную РМС и нефробластому (опухоль Вильмса).

ОС — первичная злокачественная опухоль кости, происходящая из примитивной костеобразующей мезенхимы и характеризующаяся продукцией остеонной ткани или незрелой кости со злокачественной пролиферирующей веретенноклеточной стромой. Для опухоли характерно раннее, преимущественно гематогенное, метастазирование. Частота ОС — приблизительно 5–6 на 1 млн детского населения. В США регистрируют 1000 новых случаев в год. Основной пик заболеваемости — вторая декада жизни [10]. При ОС возникают множественные изменения в кариотипе: комплекс как структурных, так и количественных аномалий хромосом. Наиболее распространенные аномалии, а также точки разрывов хромосом при образовании хромосомных aberrаций представлены в табл. 3. Иногда при ОС

отмечается характерная для саркомы Юинга транслокация t(11;22)(q24;q12) [25]. Дупликации и амплификации в локусах 1q21, 8q21.3-q22 и 8cen-q13 являются важными прогностическими маркерами, поскольку связаны с неблагоприятным течением заболевания [11, 25, 28]. Кроме нарушений кариотипа, при ОС определены молекулярно-генетические аномалии: потери гетерозиготности по специфическим хромосомным локусам или генам — супрессорам опухолей, амплификации и/или гиперэкспрессия онкогенов, мутации генов — супрессоров опухолей (табл. 4). Мутации и нарушение экспрессии в генах *c-fos*, *c-kit* и *Rb* можно использовать как негативные маркеры высокой вероятности рецидивов и метастазов [25, 31].

Таблица 3

Хромосомные аномалии при ОС [11, 25–29]

Тип аномалии	Хромосомы/локусы
Транслокации и инверсии	1p11-13, 1q10, 1q21-22, 11p15, 12q13, 17p12-13, 19q13, 22q11-13
Количественные аномалии	+1, -9, -10, -13, -17
Делеции (в том числе микроделеции)	2q, 3p, 6q16, 6q21-q22, 8p, 10p, 10q, 11p, 13q
Дупликации, амплификации (в том числе микродупликации и амплификации)	1q21, 1p21-31, 3q25, 3q26 6p12-21, 8cen-q13, 8q12, 8q21.3-q22, 8q24.1, 12p11-12, 12q12-15, 14q24-qter, 17p11-12, 20p, Xp11.2-p21, Xq12

Таблица 4

Молекулярные аномалии при ОС [11, 25, 30, 31]

Тип аномалии	Хромосомы/гены
Потеря гетерозиготности	3q, 13q, 17p, 18q
Амплификация/ гиперэкспрессия онкогенов	<i>MDM2</i> , <i>SAS</i> , <i>CDK4</i> , <i>erbB-2</i> , <i>c-myc</i> , <i>c-fos</i> , <i>c-raf-1</i> , <i>N-myc</i> , <i>c-kit</i>
Мутации генов – супрессоров опухолей	<i>Rb</i> , <i>P53</i> , <i>P16^{INK4A}</i> , <i>P19^{INK4D}</i> , <i>DCC</i>

НБ — одна из наиболее специфических для детского возраста солидных злокачественных опухолей. Составляет около 8% всех онкозаболеваний у детей, занимает 6-е место в структуре детской онкопатологии. Частота НБ составляет в среднем 8–10 случаев на 1 млн детского населения. Возрастные пики заболеваемости — до 1 года и от 2 до 4 лет. У детей старше 14 лет заболевание развивается редко. Среди заболевших соотношение мальчики : девочки составляет 1,2 : 1 [10]. Клетки НБ характеризуются комплексом цитогенетических и молекулярных аномалий (табл. 5). Среди аномалий генома наиболее показательными являются гиперпloidии и полипloidии, делеция в коротком плече хромосомы 1, добавочная хромосома 17, наличие «двойных минут» и гомогенно окрашенных регионов хромосом (указывают на амплификацию онкогенов, чаще всего *N-myc*).

Таблица 5

Молекулярные и цитогенетические аномалии при НБ [11, 32–36]

Тип аномалии	Хромосомы/гены
Количественные аномалии хромосом	Гипердиплоидия, 3n, 4n, +17, +17q21-pterm
Делеции	1p (1p36.3-p36.2), 11q23, 14q (14q23), 18q21.1
Дупликации и амплификации	1q21-q25, 17q, <i>N-myc</i> (2p24)
Потеря гетерозиготности	1p36, 14q32
Изменение экспрессии генов	<i>H-ras</i> , <i>MRP</i> , <i>CD44+</i> , <i>TrkA</i> , <i>ZF5-3</i> , тельомераза, тирозин гидролаза, <i>DOPA</i> -декарбоксилаза

Считается, что гиперэкспрессия генов *ZF5-3*, тельомераза, тирозингидролазы, *DOPA*-декарбоксилазы характерна именно для НБ. Таким образом, нарушение экспрессии этих генов может служить достаточно четким диагностическим маркером. Делеция в 1p дупликации или амплификации в 17p, амплификация *N-myc*, низкий уровень экспрессии *H-ras*, *CD44+* и отсутствие экспрессии *TRKA* связаны с неблагоприятным течением заболевания и могут быть использованы в качестве негативных прогностических маркеров. Агрессивное развитие свойственно также НБ с диплоидным и тетраплоидным набором хромосом [32, 35].

Эмбриональная РМС — второй основной подтип РМС. В отличие от альвеолярного подтипа, не обнаружено геномных аномалий, строго ассоциированных с эмбриональной РМС заболеванием. В основном описаны микродупликации и амплификации, делеции и случаи потери гетерозиготности (табл. 6). Потеря гетерозиготности в локусах 11p15.5 и 16q23-16qter связана с неблагоприятным прогнозом течения заболевания. Использование потери гетерозиготности в данных локусах в качестве диагностического маркера является в некоторых случаях проблематичным, поскольку она ассоциирована также с опухолью Вильмса [37].

Таблица 6

Аномалии генома при эмбриональной РМС [11, 37]

Тип аномалии	Хромосомы/локусы
Дупликации и амплификации (в том числе микродупликации и амплификации)	2; 7; 8; 11; 12; 13q21; 20
Делеции (в том числе микроделеции)	1p35-36.3, 6, 9q22, 14q21-32, 17
Потеря гетерозиготности	11p15.5, 16q23-16qter

Нефробластома (опухоль Вильмса). С точки зрения эмбриогенеза нефробластома представляет солидную злокачественную опухоль, состоящую из производных нефрогенной ткани на разной степени дифференцировки. Частота опухоли — 1 на 10 000 новорожденных. Пик заболевания приходится на первую декаду жизни (чаще в возрасте до 6 лет). Обычно поражается только одна почка (86%), у 6% больных опухоль двухсторонняя, у 8% больных — множественные опухоли, развивающиеся в одной почке [10]. Наиболее частые аномалии генома представлены в табл. 7. Нефробластома — генетически гетерогенное заболевание [38], поэтому невозможно выделить какой-либо цитогенетический или молекулярный маркер, строго ассоциированный с данным заболеванием. Приблизительно в 10–15% случаев при врожденной опухоли Вильмса отмечается мутация в гене — супрессоре опухоли *WT1* (11p13) или делеция, захватывающая данный локус. Мутации гена *WT1* ассоциированы с синдромом Дениса-Драша (риск развития опухоли — 90%), а делеция локуса — с *WAGR*-синдромом (риск развития опухоли — 30%) [38, 39]. Второй локус, связанный с опухолью Вильмса, обнаружен при исследовании спорадических нефробластом — делеция 11p15 (локус *WT2*). Делеция 11p15 также характерна для син-

ЗЛОЯКІСНІ НОВОУТВОРЕННЯ У ДІТЕЙ

дрома Беквита–Видеманна, при котором в 5% случаев развивается и опухоль Вильмса. Делеция должна происходить в материнской хромосоме, иногда наблюдается потеря гетерозиготности или дисомия по отцовской хромосоме 11. Причиной синдрома Беквита–Видеманна, как и опухоли Вильмса, является потеря импринтинга специфических генов: *IGF2*, *H19*, *p57^{KIP2}* [42]. В 1–2% случаев опухоли Вильмса являются наследственными формами. При анализе данных семей с наследственными формами нефробластомы выявлены дополнительные локусы, в которых, возможно, находятся гены-супрессоры опухолей, названные *FWT1* (17q12-q21) и *FWT2* (19q13.3-q13.4) [43, 44]. Кроме описанных выше локусов, ответственных за развитие опухоли Вильмса, при этом заболевании возникают и другие аномалии генома. Некоторые из них можно использовать в качестве дополнительных неблагоприятных прогностических маркеров: потеря гетерозиготности в 16q и гиперэкспрессия *p53* [38, 39].

Таблица 7

Цитогенетические и молекулярно-генетические аномалии при нефробластоме [38–44]

Тип аномалии	Гены/локусы
Делеции	11p13, 11p15, 12q11-13.11
Потеря гетерозиготности	11p15, 1p, 4q (4q24-q25), 7p, 11q, 14q, 16q, 17q, 19q
Хромосомные перестройки	17q12-q21
Мутации гена	<i>WT1</i> (11p13), * <i>FWT1</i> (17q12-q21), * <i>FWT2</i> (19q13.3-q13.4)
Нарушение экспрессии генов	<i>IGF2</i> , <i>H19</i> , <i>p57^{KIP2}</i> , <i>p53</i>

Примечание. * Гены не клонированы.

При диагностике необходимо проводить молекулярно-генетический анализ, позволяющий исключить опухоли почек, мимикрирующих под опухоль Вильмса. *Врожденную мезобластную нефрому*: характерная хромосомная аномалия t(12;15)(p13;q25) приводит к слиянию генов *ETV6* (транскрипционный фактор *ETS*-семейства) и *NTRK3* (ген рецептора нейротропина-3) [45]. *Периферическую примитивную нейроэктодермальную опухоль (PNET)* — см. саркома Юинга. *Злокачественную рабдоидную опухоль почки*: транслокация t(11;22)(p15.5;q11.23) нарушает функционирование гена — супрессора опухолей *INI1* [11]. Точка разрыва в хромосоме 11 лежит в непосредственной близости от места расположения генов, участвующих в развитии РМС, опухоли Вильмса, синдрома Беквита–Видеманна; отмечаются микроделеции 22q11.2 [46]. *НБ* почечной локализации, при которой возникает амплификация *N-myc*, что не характерно для нефробластомы [35].

Цитогенетические и молекулярные подходы к диагностике опухолей — использование цитогенетических и молекулярных методов, направленное на выявление молекулярных или цитогенетических аномалий, которые наиболее специфичны для данного типа опухолей.

Наличие транслокации можно определить с помощью G-метода [47] дифференциального окрашивания хромосом или разных вариантов многоцветовой флуоресцентной гибридизации *in situ* хромосом

опухоли (M-FISH или SKY-FISH) [48–50]. Данные методы позволяют определить непосредственно в одном анализе тип транслокации, а следовательно, — и класс опухоли. Многоцветовая флуоресцентная гибридизация *in situ*, несмотря на большие материальные затраты, имеет ряд преимуществ перед G-окраской: отсутствие необходимости получения качественных метафазных пластинок, что для опухолевых клеток является большой проблемой, быстрота анализа, анализ лучше поддается автоматизации, позволяет точнее определять вторичные хромосомные аномалии, которые можно использовать как прогностические маркеры [51, 52].

Наиболее часто при диагностике опухолей с характерным четким цитогенетическим маркером используют подходы для выявления химерных генов (FISH с использованием в качестве зонда ДНК химерного гена [49], полимеразную цепную реакцию (PCR) химерного участка [53] или RT-PCR для выявления транскрипта химерного гена [54, 55]). Эти подходы являются менее трудоемкими, поскольку нет необходимости вводить клетки опухоли в культуру и получать метафазные пластинки, и позволяют использовать архивный гистологический материал, сохраняемый в парафиновых блоках. Недостатком данных методов является невозможность одновременного анализа с целью выявления наличия разных аномалий генома. Данное ограничение частично устраняется, если необходимо подтвердить результаты гистологического анализа, то есть когда тип опухоли предварительно определен.

PCR-анализ (особенно RT-PCR) широко используется, когда важно подтвердить не только наличие соответствующей транслокации, но и определить вариант химерного гена. Определение типа химерного гена является важным с точки зрения прогноза протекания заболевания, что было показано при саркоме Юинга и СС [16, 24]. Однако для проведения RT-PCR необходимо получение РНК хорошего качества, что не всегда возможно, особенно при использовании архивных материалов. В качестве более перспективных в данных случаях предлагается использование модификаций FISH-метода, которые позволяют дифференцировать тип химерного гена [56].

Для выявления потери гетерозиготности, характерной для всех описанных опухолей с трудноопределяемыми первичными аномалиями генома, в последнее время активно используют подходы сравнительной геномной гибридизации [57] и PCR специфических локусов (VNTR- или STR-маркеров) [58]. Использование геномной гибридизации, кроме потери гетерозиготности, позволяет определять микроделеции и микродупликации, находящиеся за разрешающей способностью методов G-окрашивания хромосом или M-FISH [49, 59]. Этот подход также может быть полезен при поиске новых диагностических маркеров.

В случаях специфических нарушений экспрессии генов при заболевании используют методы RNA-FISH, RT-PCR и ДНК-микроматриц [60, 61]. Данные методы позволяют в одном эксперименте проанализировать уровень экспрессии от нескольких десятков до нескольких тысяч генов.

Из описанных методов, применяемых в диагностике опухолей, в первую очередь следует использовать те, которые сразу позволят определить заболевания в зависимости от обнаружения конкретного геномного нарушения (G-метод или M-FISH). В случае когда специфического нарушения не выявлено, применяют методы, характеризующие комплекс аномалий (определение потери гетерозиготности, изменение экспрессии соответствующих генов и т. д.).

Благодарности. Авторы выражают благодарность канд. хим. наук, В.И. Давидову за экспертную оценку перевода зарубежных литературных источников.

ЛИТЕРАТУРА

- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; **396**: 643–9.
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat genetics* 1997; (special issue): 417–74.
- Haim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. NY: Alan R. Liss Inc, 1991. 310 p.
- Stiller ChA. Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 2004; **23**: 6429–644.
- Шалимов СА, Гриневич ЮА, Мясоедов ДВ. Справочник по онкологии. К: Здоров'я, 2000. 558 с.
- Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 685–94.
- Swansbury J. The myeloid disorders: background. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 220: *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2003: 23–42.
- Swansbury J. Acute lymphoblastic leukemia: background. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 220: *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2003: 59–72.
- Polito P, Cin PD, Debiec-Rychter M, Hagemeijer A. Human solid tumors: Cytogenetic techniques. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 220: *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2003: 135–50.
- Дурнов ЛА. Руководство по детской онкологии. М: Миклош, 2003. 289 с.
- Letson DG, Muro-Cacho CA. Abnormalities in Tumors of the Bone and Soft Tissues. *Cancer Control* 2001; **8** (3): 239–51.
- Ida K, Kobayashi S, Taki T, et al. EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric mRNAs in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor. *Int J Cancer* 1995; **63**: 500–4.
- Jeon IS, Davis JN, Braun BS, et al. A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 1995; **10** (6): 1229–34.
- Urano F, Umezawa A, Yabe H, et al. Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, *EWS-ELAF*, available for diagnosis. *Jpn J Cancer Res* 1998; **89**: 703–11.
- Khoury J. Ewing sarcoma family of tumors. *Adv Anat Pathol* 2005; **12** (4): 212–20.
- de Alava E, Panizo A, Antonescu CR, et al. Association of EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. *Am J Pathol* 2000; **156**: 849–55.
- Speleman F, Delattre O, Peter M, et al. Malignant melanoma of the soft parts (clear-cell sarcoma): confirmation of EWS and ATF-1 gene fusion caused by a t(12;22) translocation. *Mod Pathol* 1997; **10** (5): 496–9.
- Brodie SG, Stocker SJ, Wardlaw JC, et al. EWS and WT-1 gene fusion in desmoplastic small round cell tumor of the abdomen. *Hum Pathol* 1995; **26** (12): 1370–4.
- Panagopoulos I, Mertens F, Isaksson M, et al. Molecular genetic characterization of the EWS/CHN and RBP56/CHN fusion genes in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **35** (4): 340–52.
- Panagopoulos I, Hoglund M, Mertens F, et al. Fusion of the EWS and CHOP genes in myxoid liposarcoma. *Oncogene* 1996; **12** (3): 489–94.
- Bennicelli JL, Advani S, Schafer BW, et al. PAX3 and PAX7 exhibit conserved cis-acting transcription repression domains and utilize a common gain of function mechanism in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 1999; **18**: 4348–56.
- Clark J, Rocques PJ, Crew AJ, et al. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nature Genetics* 1994; **7**: 502–8.
- Skytting B, Nilsson G, Brodin B, et al. A novel fusion gene, SYT-SSX4, in synovial sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 974–5.
- Antonescu CR, Kawai A, Leung DH, et al. Strong association of SYT-SSX fusion type and morphologic epithelial differentiation in synovial sarcoma. *Diagn Mol Pathol* 2000; **9**: 1–8.
- Bell WC, Siegal GP. Bone tumors (excluding Ewing's sarcoma). *Mol biol pathol paediatr cancer* 2003: 240–3.
- Fletcher JA, Gebhardt MC, Kozakewich HP. Cytogenetic aberrations in osteosarcomas. Nonrandom deletions, rings, and double-minute chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; **77** (1): 81–8.
- Bridge JA, Nelson M, McComb E, et al. Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; **95** (1): 74–87.
- Bayani J, Zielenska M, Pandita A, et al. Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; **36** (1): 7–16.
- Lau CC, Harris CP, Lu XY, et al. Frequent amplification and rearrangement of chromosomal bands 6p12-p21 and 17p11.2 in osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **39** (1): 11–21.
- Pellin A, Boix-Ferrero J, Carpio D, et al. Molecular alterations of the RB1, TP53, and MDM2 genes in primary and xenografted human osteosarcomas. *Diagn Mol Pathol* 1997; **6** (6): 333–41.
- Entz-Werle N, Marcellin L, Gaub MP, et al. Prognostic significance of allelic imbalance at the c-kit gene locus and c-kit overexpression by immunohistochemistry in pediatric osteosarcomas. *J Clin Oncol* 2005; **23** (10): 2248–55.
- Variend S, Burchill SA. Neuroblastoma. *Mol biol pathol paediatr cancer* 2003: 161–3.
- Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 2264–79.
- Hoshi M, Otagiri N, Shiwaku HO, et al. Detailed deletion mapping of chromosome band 14q32 in human neuroblastoma defines a 1.1-Mb region of common allelic loss. *Brit J Cancer* 2000; **82** (11): 1801–7.
- Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol* 2001; **54** (12): 897–910.
- Wan TS, Ma ES, Chan GC, Chan LC. Investigation of MYCN status in neuroblastoma by fluorescence in situ hybridization. *Int J Mol Med* 2004; **14** (6): 981–7.
- Leushner I. Rhabdomyosarcoma. *Mol biol pathol paediatr cancer* 2003: 186–93.
- Dome JS, Coppes MJ. Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr* 2002; **14** (1): 5–11.
- Argani P, Perlman EJ. Pediatric renal neoplasms. *Mol biol pathol paediatr cancer* 2003: 221–31.

40. **Crolla JA, van Heyningen V.** Frequent Chromosome Aberrations Revealed by Molecular Cytogenetic Studies in Patients with Aniridia. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 1138–49.
41. **Bown N, Cotterill SJ, Roberts P, et al.** Cytogenetic abnormalities and clinical outcome in Wilms tumor: a study by the U.K. cancer cytogenetics group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 2002; **38** (1): 11–21.
42. **Maher ER, Reik W.** Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 2000; **105**: 247–52.
43. **Rahman N, Abidi F, Ford D, et al.** Confirmation of *FWT1* as a Wilms' tumour susceptibility gene and phenotypic characteristics of Wilm's tumour attributable to *FWT1*. *Hum Genet* 1998; **103**: 547–56.
44. **McDonald JM, Douglass EC, Fisher R, et al.** Linkage of familial Wilms tumor predisposition to chromosome 19 and a two-locus model for the etiology of familial tumors. *Cancer Research* 1998; **58**: 1387–90.
45. **Watanabe N, Kobayashi H, Hirama T, et al.** Cryptic t(12;15)(p13;q26) producing the ETV6-NTRK3 fusion gene and no loss of IGF2 imprinting in congenital mesoblastic nephroma with trisomy 11: fluorescence in situ hybridization and IGF2 allelic expression analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; **136** (1): 10–6.
46. **Wieser R, Fritz B, Ullmann R, et al.** Novel rearrangement of chromosome band 22q11.2 causing 22q11 microdeletion syndrome-like phenotype and rhabdoid tumor of the kidney. *Hum Mutat* 2005; **26** (2): 78–83.
47. **Swansbury J.** Introduction to the Analysis of the Human G-Banded Karyotype. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 220: *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2003: 259–70.
48. **Hilgenfeld E, Montagna C, Padilla-Nash H, et al.** Spectral Karyotyping in Cancer Cytogenetics. In: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 68: *Molecular Analysis of Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press, 2001: 29–44.
49. **Mathew S, Raimondi SC.** FISH, CGH, and SKY in the Diagnosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 220: *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2003: 213–34.
50. **Sjogren H, Orndal C, Tingby O, et al.** Cytogenetic and spectral karyotype analyses of benign and malignant cartilage tumours. *Int J Oncol*. 2004; **24** (6): 1385–91.
51. **Zielenska M, Zhang ZM, Ng K, et al.** Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric Ewing sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. *Cancer* 2001; **91** (11): 2156–64.
52. **Taylor CPF, Bown NP, McGuckin AG, et al.** Fluorescence in situ hybridization techniques for the rapid detection of genetic prognostic factors in neuroblastoma. *Br J Cancer* 2000; **83** (1): 40–9.
53. **Jiang Y, Medeiros LJ, Sarris AH.** Detection of t(2;5)(p23;q35) Translocation by Long-Range PCR of Genomic DNA. In: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 68: *Molecular Analysis of Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press, 2001: 97–105.
54. **Downing JR, Head DR, Parham DM, et al.** Detection of the (11;22)(q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1993; **143** (5): 1294–300.
55. **Nikiforova MN, Groen P, Mutema G, et al.** Detection of SYT-SSX rearrangements in synovial sarcomas by real-time one-step RT-PCR. *Ped Develop Pathol* 2005; **8**: 162–7.
56. **Surace C, Panagopoulos I, Palsson E, et al.** A novel FISH assay for SS18–SSX fusion type in synovial sarcoma. *Lab Invest*. 2004; **84**: 1185–92.

57. **Balsara R, Pei J, Testa JR.** Comparative Genomic Hybridization Analysis In: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 68: *Molecular Analysis of Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press, 2001: 45–7.

58. **Ibbotson RE, Corcoran MM.** Detection of Chromosomal Deletions by Microsatellite Analysis. In: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 68: *Molecular Analysis of Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press, 2001: 59–65.

59. **Batanian JR, Cavalli LR, Aldosari NM, et al.** Evaluation of paediatric osteosarcomas by classic cytogenetic and CGH analyses. *Mol Pathol* 2002; **55** (6): 389–93.

60. **Fu Y.** Detection of Differentially Expressed Genes in Cancer Using Differential Display. In: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 68: *Molecular Analysis of Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press, 2001: 179–93.

61. **Khan J, Saal LH, Bittner ML, et al.** Gene Expression Profiling in Cancer Using cDNA Microarrays. In: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 68: *Molecular Analysis of Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press, 2001: 205–22.

MOLECULAR AND CYTOGENETIC MARKERS OF SOLID TUMORS IN CHILDREN

S.R. Rushkovsky, E.S. Afanas'eva, V.F. Bezrukov, S.V. Demidov, I.Y. Karacharova, G.I. Klimnyuk

Summary. *Most frequent children's malignancies include neuroblastoma, Wilms tumor, osteosarcoma, Ewing's sarcoma, rhabdomyosarcoma, and synovial sarcoma. The above-mentioned malignancies have similar cytomorphological features, and hence, are difficult to diagnose on the basis of common histological methods. Therefore, molecular and cytogenetic methods are deemed ever more appropriate. The paper describes genome abnormalities specific to the particular types of neoplasm and assesses the outlooks of using them as molecular and cytogenetic markers in diagnosing tumors in children. Ewing's sarcoma, alveolar rhabdomyosarcoma, and synovial sarcoma are characterized by specific translocations which are clear-cut diagnostic markers. Osteosarcoma, neuroblastoma, embryonic rhabdomyosarcoma, and Wilms tumor feature multiple genomic abnormalities at both molecular and cytogenetic levels. Methods of molecular and cytogenetic diagnostic should be based on a set of genomic abnormalities and selected informative cytogenetic and molecular markers that have both diagnostic and prognostic significance.*

Key Words: solid tumors in children, molecular markers, cytogenetic markers.

Адрес для переписки:
 Рушковский С.Р
 E-mail: rsr@ukr.net