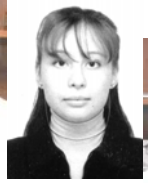
# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ВЕТЕРИНАРНОЙ ОНКОЛОГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

***О.Г. ПЕТРОВА,***
***доктор ветеринарных наук, профессор,***
***А.И. ХАИРОВА,***
***студент, Уральская ГСХА***
***Е.Н. БЕСПАМЯТНЫХ,***
***кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Уральский НИВИ РАСХН***

***Ключевые слова: онкология, диагностика, генетические аномалии.***

**620075, г. Екатеринбург,**
**ул. Карла Либкнехта, 42;**
**тел.: 8 (343) 257-47-42, 219-55-86**



**620142, г. Екатеринбург,**
**ул. Белинского, 112а;**
**тел. 8 (343) 257-79-71**

*Без молекулярной биологии онкология может рассматриваться как дескриптивная наука, описывающая различные биологические феномены без объяснения механизмов их появления и их биологической сути.*

*R.A. Weinberg, 2007*

Онкологические заболевания относятся к числу наиболее распространённых болезней мелких домашних животных, и встречаемость их продолжает расти. Несмотря на достижения последних лет как в хирургических методиках, так и в применении лучевой и химиотерапии летальность по-прежнему высока, составляя, к примеру, до 45% всех смертей собак старше 10 лет. Становится очевидной необходимость в новых более рациональных методах терапии онкологических болезней, повышающих эффективность лечения и при этом снижающих побочные эффекты для организма животного в целом. Экспериментально-теоретические исследования фундаментальных основ канцерогенеза и достижения молекулярной биологии на сегодняшний день изменили многое в клинической гуманитарной онкологии. Молекулярно-генетические подходы нашли применение в профилактике, лечении и последующем мониторинге пациентов [1]. В течение последних 30 лет новые данные теоретической онкологии человека также немало поспособствовали развитию ветеринарной онкологической науки [2].

Рак представляет собой широкую гетерогенную группу заболеваний, каждое из которых являет собой комплекс генетических нарушений. В отличие от большинства болезней, вызываемых дефектом в одном или нескольких строго определённых генах, опухоли возникают в процессе накопления множества разнообразных даже для каждого типа неоплазий генетических нарушений, обусловленных как наследуемыми (герминативными) либо приобретенными (соматическими) мутациями, так и фенотипическими изменениями (эпигенетическая модификация), не затрагивающими напрямую ДНК, но играющими большую роль в регуляции экспрессии генов. На сегодняшний день известны десятки и сотни генов, ответственных в той или иной степени за онкогенез, но все опухоли в той или иной мере обладают шестью важными

***Oncology, diagnostics, genetic abnormities.***

свойствами, отличающими поражённую клетку от нормальной:

· самодостаточность в пролиферативных сигналах;

· пониженная чувствительность к рост-ингибирующим сигналам;

· ослабление или ограничение индукции апоптоза;

· отсутствие репликативного старения (иммортализация);

· способность стимулировать ангиогенез;

· способность к инвазивному росту и метастазированию.

Эти особенности приобретаются клеткой за счёт ряда последовательных мутаций. Набор этих мутаций индивидуален для каждой опухоли и как раз обусловливает гетерогенность неоплазий как по генетическим особенностям, так и по биологическим свойствам, таким как скорость роста, способность к метастазированию, чувствительность к химиотерапевтическим агентам и т.д. Зачастую мутации в различных генах могут приводить к сходному результату и, наоборот, мутация одного и того же гена может вызывать различные типы новообразований с далекими друг от друга свойствами [3]. Усовершенствование профилактических и терапевтических мероприятий требует чёткого представления генетической основы злокачественных опухолей и предполагает подавление опухолевой трансформации и прогрессии.

Исторически наиболее ранним методом, позволяющим оценить степень и характер генетических аномалий, является цитогенетическое исследование, однако будучи достаточно трудоёмкими традиционные технологии цитогенетических исследований в настоящее время постепенно заменяются альтернативными методиками. Одной из них является разновидность FISH – сравнительная геномная гибридизация (comparative genomic hybridization, CGH), позволяющая получить быстрые и достаточно надёжные результаты. При этом смесь одинаковых количеств ДНК, выделенной из опухолевых и контрольных клеток и меченной соответственно красными и зелеными флюорохромами, гибридизируется с метафазами нормальных клеток. Участки генома, копийность которых повышена, выглядят красными, а участки генома, копийность которых ниже нормы, окрашиваются в зелёный цвет. Этот метод был использован в исследовании хромосомных аномалий в онкологических болезнях кроветворной системы у мелких домашних животных [4]. Для повышения производительности в практической деятельности применяется панельная CGH, в которой смесь ДНК опухолевых и нормальных клеток гибридизируется с панелью клонов ДНК, представляющих разные разведения целого генома или его частей.

Когда будет накоплено больше данных о хромосомных аберрациях, характерных для различных онкологических заболеваний животных, возможно, будет упрощение диагностических приёмов, а также применение диагностики методом ПЦР. Так, в гуманитарной медицине диагностика опухолей с известными хромосомными транслокациями при помощи ПЦР в большой степени заменила цитогенетический подход [3]. В случае с ветеринарной медициной на сегодняшний момент праймеры для ПЦР существуют только для лимфопролиферативных заболеваний у кошек и собак, а также (в случае с вирусным онкогенезом) для лейкоза крупного рогатого скота. ПЦР-диагностика позволяет определить клональные свойства образца и таким образом отличить иммунологически сходные новообразования лимфоидной ткани от воспалительной реакции. Тем не менее, имеется некоторая вероятность ложноположительных результатов, поэтому требуется подтверждение результатов исследования с использованием прочих методик [3].

Помимо изменений в собственно генетическом коде опухолевая клетка характеризуется изменениями в степени экспрессии тех или иных генов, оценить которые помогают исследования мРНК. К методикам оценки РНК относится северный блоттинг, основанный на разделении фрагментов РНК при помощи электрофореза и переноса на бумажный фильтр, после чего выполняется гибридизация с меченным РНК-зондом. Особенно полезен метод северного блоттинга в тех случаях, когда в опухолевой ткани имеет место повышенная экспрессия какого-либо гена, но по какой-либо причине невозможно применение антител к соответствующему ему белку [3].

Более широкое применение в клинической практике находит обратнотранскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР). ОТ-ПЦР позволяет в том числе оценивать экспрессию микро-РНК, фрагментов РНК, играющих роль в регуляции трансляции мРНК. M. Mortano et al [5] приводят результаты сравнительного исследования экспрессии микро-РНК у здоровых собак и собак с гематопоэтическими неоплазиями. В частности, было показано, что уровень экспрессии микро-РНК miR-155 повышен у большинства пациентов с хронической формой лимфоцитарного лейкоза В-клеток и острым миелогенным лейкозом. Ещё одним низко разрешающим методом скрининга генной экспрессии является CESH (Chromosome Expressed Sequence Hybridization – гибридизация экспрессирующихся участков хромосом). Методика данного исследования сходна с панельной CGH: исследуемый и контрольный материал метят различными флуоресцентными красителями, смешивают и после этого наносят на микропанель для гибридизации.

Немаловажной мишенью для диагностики помимо нуклеиновых кислот являются специфические белки опухоли. Для обнаружения таких белков наиболее рационально использование специфических антител (аналогично методу ИФА). В настоящее время широкому внедрению ИФА в онкологическую практику препятствует отсутствие достаточно специфичных и чувствительных антител [3]. Более надёжные результаты при меньшей требовательности к чувствительности и специфичности антител даёт сходный с ним западный блоттинг, сочетающий в себе реакцию антиген – антитело с предварительным разделением белков в образце при помощи электрофореза в геле.

Тот же принцип обнаружения специфических белков в патологическом материале при помощи антител применяется в иммуноцитохимическом и иммуногистохимическом исследованиях и проточной цитометрии. В ветеринарной онкологии эти методики применяются для иммунофенотипирования лимфопролиферативных заболеваний у собак [6]. Маркеры, определяемые для диагностики лимфом собак, приведены в таблице. Применение многоцветной проточной цитометрии позволяет, кроме того, с большой чувствительностью обнаруживать опухолевые клетки в периферической крови, что применяется в гуманитарной медицине для определения минимального остаточного заболевания. Та же методика осуществима и для мелких домашних животных.

Прикладное значение для онкологии также имеют методы, используемые в

Таблица

Маркеры, применяемые для иммунофенотипирования лимфом собак [6]

| Антиген | Экспрессирующие клетки |
|---|---|
| CD3, CD5 | все Т-лимфоциты |
| CD4 | Т-хелперы, нейтрофилы |
| CD8 | цитотоксические Т-лимфоциты, NK-клетки |
| CD11d | NK-клетки, большие цитотоксические зернистые Т-лимфоциты |
| CD14 | моноциты, макрофаги |
| CD21 | В-лимфоциты |
| CD34 | клетки – предшественники гемопоэза |
| CD45 | все лейкоциты |
| CD79a | В-лимфоциты |
| CD90 (Thy1) | моноциты, макрофаги, Т-лимфоциты и некоторые В-лимфоциты |
| MPO | нейтрофилы и их предшественники |
| MAC387 | моноциты, макрофаги, нейтрофилы и их предшественники |

протеомике, позволяющие ускорить идентификацию новых белков и установление их значения в онкогенезе, что, соответственно, упростит обнаружение мишеней для будущей терапии. Основное количество исследований в протеомике использует двумерный полиамидный гель-электрофорез (2D-PAGE), при котором белки сортируются по изоэлектрической точке и массе. Путём сравнения картин двумерного электрофореза, выделенных из разных опухолей, можно изолировать белки, экспрессия которых закономерно повышается или понижается в клетках определённых новообразований. Производительность и точность диагностики опухолевых белков могут обеспечить методы масс-спектрометрии, такие как MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time-of-flight). В гуманитарной онкологии MALDI-TOF применяется для идентификации всех дифференциально экспрессирующихся белков, а, следовательно, даёт возможность понять, что именно определяет фенотипические различия, такие как чувствительность к химиотерапевтическим агентам, а также дифференцировать протеомы, характерные для воспалительных заболеваний от онкологической патологии. Неинвазивность этого метода в сочетании с высокой точностью позволяет применять исследование протеомики плазмы для скрининга, ранней диагностики и стадирования злокачественных новообразований.

Методы молекулярной диагностики онкологических болезней имеют большое значение не только для фундаментальных исследований в области сравнительной онкологии, но и для усовершенствования и индивидуализации терапевтических подходов в клинической практике. Новые методики позволяют определять неопластический процесс точнее и на более ранней стадии, что обеспечивает повышение эффективности проводимой терапии. Анализ особенностей генома и фенотипа опухоли обеспечивает индивидуализацию терапии за счёт подбора лекарственных средств или минимизации негативных побочных эффектов, а относительно меньшая инвазивность делает возможным мониторинг терапевтического эффекта. Кроме того, диагностические данные предоставляют информацию для создания новых методик целевой (или таргетной) терапии, ориентированной на потенциальные ключевые элементы развития онкологического заболевания.

**Литература**

1. Имянитов Е. Н., Хансон К. П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб. : СПбМАПО, 2007. 211 с.

2. Уайт Р. А. С. Онкологические заболевания мелких домашних животных. М. : Аквариум, 2002. 350 с.

3. Withrow S. J., Vail D. M. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology 4th Ed. Elsevier, 2007. 846 p.

4. Breen M. Development of Molecular Cytogenetic Resources for the Dog and Application to the Study of the Comparative Pathology of Canine Myeloid Neoplasms / 56th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 40th Annual Meeting of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP). Boston, MA, USA, ACVP and ASVCP (Eds.), 2005.

5. Mortarino M., Gioia G., Gelain M. E., Comazzi S. MicroRNAs as Candidate Molecular Markers for Canine Hematopoetic Tumor Diagnosis: Proceedings of the Genes, Dogs and Cancer: 5th International Canine Cancer Conference, Orlando, Florida, USA, 2009.

6. Blackwood L. Canine Leukaemia: Are We Any Further Forward? Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress, Dublin, Ireland, 2008. P. 515-517.