

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

**СЕМЕНОВ В.М., ПАШИНСКАЯ Е.С., ПОБЯРЖИН В.В., СУББОТИНА И.А.,
ШЛЯХТУНОВ Е.А., ВЕРЕМЕЙ И.С., СЕМЕНОВ С.В.**

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск,
Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2017. – Том 16, №2. – С. 15-25.

IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR-GENETIC METHODS OF THE ONCOLOGIC DISEASES DIAGNOSING (LITERATURE REVIEW)

**SEMENOV V.M., PASHINSKAYA E.S., POBYARZHIN V.V., SUBBOTINA I.A.,
SHLYAKHTUNOV E.A., VEREMEY I.S., SEMENOV S.V.**

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2017;16(2):15-25.

Резюме.

Известно, что для проведения научных и клинических исследований в современной биологии и медицине применяют огромный набор всевозможных методов и методик, а иногда и их сочетание. Иммуногистохимические (ИГХ) и молекулярно-генетические методы являются одними из преобладающих в изучении патологоанатомических, морфофизиологических, онкоморфологических и биологических аспектов жизнедеятельности организмов. В современной диагностической практике можно выделить несколько основных областей применения ИГХ. В первую очередь, это исследования опухолей человека с целью определения гистогенеза недифференцированных опухолевых образований, отдаленных метастазов, а также для дифференцировки различных тканевых компонентов, составляющих комплексные опухоли. Во-вторых, с целью прогностической оценки дальнейшего течения заболевания и при назначении терапии.

Молекулярно-генетическими маркерами (МГМ) называют полиморфные признаки, выявляемые с использованием ДНК- и РНК-технологий на уровне нуклеотидной последовательности ДНК для определенного гена или любого другого участка хромосомы. Исследование молекулярно-генетических маркеров представляет собой обширное поле научно-исследовательской деятельности и имеет принципиальное значение для клиники. МГМ часто определяют при подозрении на структурные и функциональные повреждения в геноме опухолевой клетки потому, что нестабильность генома является основным свойством опухолей. Подобные повреждения приводят к изменению экспрессии генов, которые регулируют клеточный цикл, метастатическую и инвазивную активность клеток. В результате изменяется экспрессия генов, кодирующих адгезионные белки и факторы активности неоплазии, возникает инактивация генов-супрессоров, активируется теломераза в клетках опухолей. Повреждения генома могут приводить к развитию как наследственных онкологических синдромов, так и спорадических опухолей.

Ключевые слова: опухоли, методы, онкоген, тест-системы.

Abstract.

It is known that for conducting scientific and clinical researches in modern biology and medicine a great variety of methods and techniques and sometimes their combinations are used. Immunohistochemical (IHC) and molecular-genetic methods belong to those ones that prevail in the studying of pathoanatomical, morphophysiological, oncomorphologic and biological aspects of the organism's vital activity. Several main fields for the IHC methods use may be singled out in modern diagnosing practice. Primarily, these are the studies of human tumors aimed at the determination of histogenesis of undifferentiated neoplasms, distant metastases as well as the differentiation of different tissue components, making up

complex tumors. Secondly, they are used with the aim of prognostic evaluation of the further course of the disease and the treatment administration.

Molecular-genetic markers (MGM) are called polymorphic signs, revealed by means of DNA- and RNA- technologies at the level of nucleotide DNA sequence for a definite gene or any other chromosome site. The investigation of molecular-genetic markers is a wide field of scientific-research activity and has a paramount importance for the clinical picture. MGM are often determined when structural and functional damages in the genome of the tumor cell are suspected, because genome instability is the main tumoral property. Such damages lead to the change in the expression of genes, regulating cell cycle, metastatic and invasive activity of the cells. As a result, the expression of genes, coding adhesive proteins and neoangiogenesis activity factors changes, inactivation of genes-suppressors occurs, telomerase in tumoral cells activates. Genome damages can lead to the development of both hereditary oncologic syndromes and sporadic tumors.

Key words: tumors, methods, oncogene, test-systems.

Революция в методологических аспектах молекулярно-генетического анализа по праву может считаться одним из самых заметных достижений биотехнологий прошедшего десятилетия. Что касается настоящего времени, то с уверенностью можно отметить появившиеся принципиально новые подходы, которые позволяют в разы увеличить скорость накопления информации о структуре ДНК, РНК и белковых структур.

К методам, широко применяющимся в различных направлениях молекулярного анализа, можно отнести следующие: высокопроизводительные технологии (high throughput technologies), изучение «профилей» биомолекул (profiling), массивы данных (arrays), микрочипирование (microchips) и т. д [1, 2]. Известно, что онкология, иммунология, генетика являются лидерами по применению вышеперечисленных методов.

МГМ (молекулярно-генетические методы), используемые при диагностике новообразований, можно разделить на иммуногистохимические, молекулярно-генетические и биохимические [1, 2, 3]. Биохимические онкомаркеры, наиболее часто используемые в клинической практике, такие как РЭА, СА199, СА724, являются белками. Они с легкостью определяются в плазме крови пациента, а забор материала является малоинвазивным. Однако удаленность маркера от опухолевого очага определенно может повлиять на достоверность результата за счет снижения чувствительности и специфичности. Показано также, что концентрация МГМ в крови изменяется при доброкачественных опухолях, воспалительных процессах или при сочетанных новообразованиях [3, 4]. Не вызывает сомнения, что определённая часть исследований в этой области имеет непосредственное клиническое значение, если не сейчас, то в недалёком будущем. Однако адекватная интерпретация результатов мульти-

генных тестов возможна при условии высокого уровня взаимопонимания между специалистами по молекулярной генетике, биоинформатике, патологической анатомии, клинической онкологии, и, по понятным причинам, зачастую вызывает значительные затруднения.

В последние годы все больше возрастает роль морфолога в онкологической практике. Достижения в развитии методов молекулярной биологии, приведшие к открытию онкогенов и генов-супрессоров, потребовали интеграции результатов молекулярно-генетических исследований при постановке онкологического диагноза. Нельзя сказать, что традиционно используемые критерии диагностики не нужны, но, вне всякого сомнения, будущее определяет новое направление онкоморфологии, в котором будут учитываться не только структурные особенности опухолевого процесса, но и экспрессия специфических участков ДНК, так называемых онкогенов, которые позволят подойти к решению глобального вопроса на молекулярном уровне [4, 5].

Целью настоящей статьи является проведение сравнительного анализа иммуногистохимического и молекулярно-генетического методов, применяемых в медицине и молекулярной биологии.

Преимущества и недостатки иммуногистохимических методов

В настоящее время иммуногистохимические методы являются одними из превалирующих в изучении патологоанатомических, морфофизиологических, онкоморфологических и биологических аспектов жизнедеятельности организмов [5, 6, 7]. Иммуногистохимия (ИГХ) – метод, позволяющий выявить точную локализацию как клеточного, так и тканевого антигена с единов-

ременным иммунологическим анализом тканей или клеток при сохранении морфологии изучаемых объектов. Для этого применяют иммуногистохимические маркеры - молекулы белковой природы, синтезируемые в процессе экспрессии генов, принимающие участие в канцерогенезе. Чаще всего их визуальное определение проводит патологоанатом непосредственно в опухолевом материале, но этого недостаточно в связи с чувствительностью и специфичностью образцов. По нашему мнению, необходимо учитывать и молекулярно-биологические аспекты.

Известно, что в классическом канцерогенном процессе механизм активной экспрессии онкогенов является конечным звеном «патологической цепи», итогом которого является запуск опухолевых процессов. Воздействие негативных факторов различной природы на геном эукариотической клетки может привести к возникновению мутации в ДНК или РНК. В свою очередь, экспрессия мутантного участка геномной нуклеиновой кислоты приводит к последующему биосинтезу онкобелков по классической схеме.

Таким образом, учитывая вышеизложенное, в практике диагноста необходимо использовать ИГХ для полного подтверждения диагноза с целью определения гистогенетического анализа недифференцированных образований, метастазов, а также при прогностической оценке дальнейшего течения заболевания и назначении терапии [8, 9].

В научной и клинической лабораторной практике используют различные иммуногистохимические методы. Однако наиболее распространенным является не прямое иммуноокрашивание с использованием биотин-авидинового комплекса. Если сравнивать прямой и непрямой методы, то второй предпочтительней. Непрямой метод предполагает использование двух различных антител (первичных и вторичных). Первичные антитела реагируют с антигенами ткани, а меченые вторичные антитела специфически чувствительнее первичных потому, что с каждой молекулой первичных антител связывается несколько молекул вторичных антител, содержащих метку [10, 11].

При проведении ИГХ применяют биотин. Это соединение, которое хорошо переносит высокие температуры, адаптируется к кислой и щелочной среде, а также является неотъемлемым компонентом в реакции карбоксилирования. Известно, что биотин образует стойкое соединение с белковыми структурами, к которым относятся

ферменты и иммуноглобулины. В природе биотин молекулярной массой 68 кДа, связанный с гликопротеидом авидином, найден в белке яиц птиц. В таком комплексе авидин + биотин образуется очень стойкое соединение, которое разрушается только при температурной обработке. Хотелось бы отметить, что у авидина имеются 4 места присоединения, с которыми с успехом связываются как биотин, так и другие белки. Таким образом, свойство комплекса биотин + авидин может облегчить связь между антителами и ферментами, что с успехом используется учеными современности как АВС метод (Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex) [10, 11, 12].

Однако, несмотря на имеющиеся преимущества, вышеуказанный метод имеет существенные недостатки. Так как авидин может присоединять эндогенный биотин, который в норме содержится в печени и почках, а также захватывать лектин, возможны ошибки в интерпретации результатов.

Во избежание неточностей в настоящий момент создана новая технология (SaBC-метод), которая основана на замене авидина на стрептавидин. Стрептавидин также имеет белковую природу и обладает такими же способностями связывать биотин. Плюсом стрептавидина является то, что он не имеет заряда в нейтральной среде, не связывается с эндогенными ферментами и биотином. Такое новшество позволило значительно уменьшить фоновое окрашивание и повысило чувствительность метода приблизительно в 8 раз.

Новые методы визуализации иммуногистохимической реакции с использованием конъюгатов полимеров все чаще и чаще используются в практике. Они основаны на том, что к длинной молекуле полимера можно присоединить большое количество фермента или первичных антител. Это приводит к повышению чувствительности метода [12, 13, 14].

Необходимо также отметить, что популярность получили и иммуногистохимические методы, в основе которых, для лучшей визуализации реакции, используют такие ферменты, как пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза с использованием стрептавидинбиотинового комплекса. На первом этапе метода проводят нанесение неокрашенных первичных антител; на втором - биотинилированных вторичных антител, а на третьем – добавляют связанный с молекулами фермента стрептавидин. Зачастую получение

качественных результатов применяемого ИГХ-метода зависит от используемых реагентов и особенностей проведения реакции и методических приемов [14, 15]. Кроме того, одним из важных условий для успешного проведения иммуногистохимической реакции является грамотный подбор титра антител (максимальное разведение сыворотки, при котором наблюдается выраженное специфическое окрашивание без неспецифического фонового окрашивания окружающих тканей). Коммерчески доступные антитела всегда сопровождаются подробной инструкцией, описывающей процесс оптимального разведения. Однако часто подбор титра осуществляется экспериментально. В большинстве случаев это связано с длительностью инкубации первичной сыворотки, нестабильностью окружающей температуры, плохо подобранной системой визуализации распределения первичных антител и т.д. [8, 14, 15, 24].

К числу отрицательных сторон иммунофлуоресцентной микроскопии также можно отнести непостоянство окраски субстрата в тканях, необходимость в дорогостоящем оборудовании, а также трудности, связанные с распознаванием и изучением тонких структур в ткани замороженного среза, которые не окрашиваются флуорохромами и остаются в «темном поле».

Подводя итог данного раздела, необходимо отметить, что в настоящее время исследование иммуногистохимических маркеров является процедурой, позволяющей определить наличие опухоли, ее злокачественный потенциал и прогноз, что является перспективным методом диагностики и определения в целесообразности проведения химиотерапии. Достоинством этого метода может быть неплохая специфичность и чувствительность. Однако существенным недостатком является то, что этот метод нельзя использовать для скрининга, так как для исследования берется биопсийный материал [16, 18, 19, 20].

Сравнение и применение молекулярно-генетических методов в биологии и медицине

Наиболее ярким событием биологии прошедшего десятилетия стало открытие роли микроРНК в регуляции экспрессии генов. МикроРНК представляют собой короткие молекулы, способные связываться с комплементарными участками матричной РНК. В отличие от длин-

ных молекул РНК, микроРНК обладают относительной устойчивостью и неплохо сохраняются в различных биологических образцах. В настоящее время идентифицировано около тысячи различных микроРНК, оцениваемых как молекулярно-генетические маркеры [17, 21, 22].

Молекулярно-генетическими маркерами (МГМ) называют полиморфные признаки, выявляемые с использованием ДНК- и РНК-технологий на уровне нуклеотидной последовательности ДНК для определенного гена или любого другого участка хромосомы. Исследование молекулярно-генетических маркеров представляет собой обширное поле научно-исследовательской деятельности и имеет принципиальное значение для клиники. МГМ часто определяют при подозрении на структурные и функциональные повреждения в геноме опухолевой клетки потому, что нестабильность генома является основным свойством опухолей [23, 27]. Подобные повреждения приводят к изменению экспрессии генов, которые регулируют клеточный цикл, метастатическую и инвазивную активность клеток. В результате изменяется экспрессия генов, кодирующих адгезионные белки и факторы активности неоангиогенеза, возникает инактивация генов-супрессоров, активируется теломераза в клетках опухолей. Повреждения генома могут приводить к развитию как наследственных онкологических синдромов, так и спорадических опухолей [25, 26, 28].

Учитывая вышеперечисленные аспекты, в 2016 году Всемирная организация здравоохранения (WHO) рекомендовала несколько иной подход к опухолевой классификации. Кроме того, организацией была подчеркнута необходимость использования молекулярно-генетических методов для диагностики и точного прогноза заболеваний онкологической направленности. Так, в основу новой классификации положено не только гистологическое строение того или иного новообразования, но и, в обязательном порядке, его наиболее значимая молекулярно-генетическая характеристика или хромосомная aberrация. В частности, вышеперечисленные нововведения касаются трех позиций: нейроэктодермальных опухолей, эмбриональных blastom и лимфом [29, 45].

Но даже без рекомендаций WHO в Республике Беларусь с конца 20 века начато внедрение молекулярно-диагностических аспектов в различных отраслях. На данный момент существует

несколько направлений в клинической онкологии, где активно применяются молекулярно-генетические методы [30, 31, 32]. Первым, несомненно, стоит назвать диагностику наследственных форм рака и определение маркеров последующего прогноза. Однако не менее важным является определение маркеров, свидетельствующих о начальных стадиях опухолевого процесса или о наличии микрометастазов. Если диагноз подтверждается, то следующим направлением является диагностика ДНК-маркеров, определяющих чувствительность к лекарственным препаратам, особенно к таргетной терапии [32, 33].

К наиболее известным методам молекулярно-генетического анализа можно отнести: классический цитогенетический анализ (кариотипирование), цитогенетический анализ с использованием флуоресцентных красителей (FISH), ПЦР (полимеразная цепная реакция), микрочипирование [33, 34, 35].

Кариотипом называют совокупность морфологических особенностей хромосомного набора единичной клетки живого организма [36, 44]. В свою очередь, процесс кариотипирования включает анализ числа и структуры метафазных хромосом соматических клеток с помощью цитогенетических методов. В результате кариотипирования получают описание кариотипа с указанием общего числа хромосом и набора половых хромосом. Для обозначения численных и структурных хромосомных аномалий используются специальные знаки, символы и сокращения, рекомендованные международной цитогенетической номенклатурой хромосом человека [37, 44].

Кариотипирование является обязательным компонентом постнатальной диагностики тех форм врожденной патологии, которые обусловлены аномалиями кариотипа. Аномалии кариотипа могут быть обусловлены изменениями как числа, так и структуры хромосом. Известно, что геномные мутации, включающие полиплоидию и анеуплоидию, могут возникать *de novo* в процессе гаметогенеза или в раннем эмбриогенезе, либо наследуются от родителей [37, 44].

Однако рутинность выполнения, высокие экономические затраты на проведение и часто затянутые сроки не могут поставить этот метод на первое место.

Метод FISH-анализа используют как в научной деятельности, так и в классической медицине: пре- и постнатальной диагностике, в мониторинге зигот (бластомеров) при экстракор-

поральном оплодотворении (ЭКО), в гематологической и онкологической практике, а также при наблюдении за эффектом воздействий факторов внешней среды на наследственный материал человека. Он основан на гибридизации известной по нуклеотидному составу ДНК-пробы с участком тестируемой хромосомы. Результат оценивают по метке – флуоресцентному сигналу в ожидаемом участке. В качестве ДНК-зонда могут служить относительно небольшие фрагменты ДНК, комплементарные анализируемой последовательности хромосомной ДНК (мишени) обследуемого. Размер проб может варьировать от 90 тысяч до нескольких миллионов пар нуклеотидов. Мишенью могут служить не только отдельные гены или хромосомные участки, но и целая хромосома [37, 38, 44].

К достоинствам метода можно отнести: неинвазивный забор материала и небольшой объем; непродолжительное время проведения (1–3 суток), а вот к проблемам внедрения относятся следующие: узкая коммерческая доступность; необходима подготовка узких специалистов для работы с FISH; метод не имеет единого стандарта в интерпретации результатов; утомительный ручной процесс пробоподготовки.

Диагностика с использованием биологических микрочипов в настоящее время еще нечасто применяется на практике. Не вызывает ни малейшего сомнения, что «микрочиповые» технологии, будучи описательными по своей сути, принципиально увеличили возможности экспериментальной медицины. Многие области биологических исследований получили неопределимые инструменты для генерирования новых направлений, идей, гипотез.

Биологические микрочипы – это набор молекул ДНК (реже белков), упорядоченно размещенных на специальном носителе – «платформе» (пластинка из стекла, пластика из кремния или полимерная мембрана). На каждом микрочипе может располагаться от нескольких десятков до сотен тысяч упорядоченно нанесенных микротестов или проб. ДНК-пробы могут быть нанесены на кремниевую, стеклянную, нитроцеллюлозную подложку, выращены на кварцевой подложке методом имульсионной фотолитографии или внесены в гель [33, 40, 41].

Механизм действия микрочипов основан на способности комплементарных оснований нуклеиновых кислот образовывать химические связи. Одна из комплементарных цепей ДНК (проба)

находится на «платформе», а другая – одноцепочечная ДНК-мишень (зонд), меченная флуоресцентной меткой, вносится в ДНК-чип. Наличие того или иного вещества или гена в образце определяют по люминесцентному свечению на прореагировавшем чипе. Анализ прореагировавших чипов производится автоматически с помощью чип-детектора (анализатора), который представляет собой либо флуоресцентный широкопольный микроскоп, либо специальное считывающее лазерное устройство, соединенное с видеокамерой и компьютером.

К преимуществам микрочипирования относят то, что в одном образце может быть проанализирована экспрессия сразу большого количества диагностически значимых генов; воспроизводство результатов автоматизирована; процедура занимает непродолжительное время (от 4-6 часов до суток); метод теоретически допускает неинвазивный забор материала, анализ кариотипа единичной клетки.

Проблемы внедрения метода также существуют: коммерчески доступных наборов практически нет; не представлена линейка диагностических микрочипов, сертифицированных для клинических исследований; малое число специалистов, подготовленных для работы с микрочипами; требует обязательной амплификации анализируемого материала.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – метод избирательного синтеза нуклеиновых кислот *in vitro*. С его помощью можно получить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в несколько миллионов раз [13, 16, 19, 42]. Дело в том, что все вышеперечисленные методы, кроме ПЦР, выявляют в исследуемой пробе то количество искомого объекта, которое имеется, а ПЦР позволяет за счет повторяющихся циклов синтеза увеличить количество выявляемого биообъекта, после чего проводится его детекция. Для обнаружения продуктов, полученных после амплификации, применяют гель-электрофорез, гибридационно-ферментный анализ (ГиФА), флуоресцентную детекцию после проведения реакций (FLASH) и флуоресцентную детекцию во время проведения реакций (Real-Time PCR). Чаще всего преимущество отдается Real-Time PCR, поскольку этот способ позволяет избежать проблемы с контаминацией ампликонами. Неотъемлемым плюсом Real-Time PCR является сокращение времени проведения анализа [38, 43, 45]. Простота, высокая чувствительность

и специфичность метода ПЦР позволили ему получить широкое распространение как при проведении научных исследований, так и в лабораторно-клинической практике [10, 11, 18, 19].

К настоящему времени такое направление, как молекулярная онкология, имеет около 400 новых диагностических и прогностических показателей, которые используются в клинической практике. Уже в начале 90-х гг. XX века стали рутинно применяться ПЦР-методы для определения специфических транслокаций.

Нами была разработана тест-система для определения экспрессии гена *m-bcr/t* (9;22). Данный комплект предназначен для количественного определения слияния *bcr-abl* и транскриптов кДНК, содержащей (Ph⁺) транслокации *t*(9; 22) в главных критических точках кластера региона (*m-bcr*) *b2a2* и *b3a2*, соответственно, а также в РНК или мРНК образцах, приготовленных из нативных или очищенных человеческих белых кровяных клеток, полученных из крови или костного мозга путем аспирации. Ген *bcr* (Breakpoint Cluster Region), или зона ложного точкового кластера, известен также как антиген рака почки NY-REN. *Bcr* является одним из двух генов в комплексе *bcr-abl*, который связан с Филадельфийской хромосомой. Нормальный ген *bcr* локализован в длинном плече 22 хромосомы. В настоящее время известно, что он кодирует два основных белка, которые обладают серин-треенин киназной активностью, а также являются ГТФ-активирующими белками. В настоящее время созданная тест-система зарегистрирована в Республике Беларусь, организовано промышленное производство на Научно-производственном предприятии «Сивитал» и начато клиническое применение. Проведение количественного определения с помощью *real time PCR m-bcr* и *mi-bcr* как в образцах цельной крови, так и очищенных лейкоцитов или аспирата костного мозга является одним из диагностических приемов для установления диагноза, эффективности лечения и определения минимальной остаточной болезни, такой как хронический миелоидный лейкоз, ассоциированный с Филадельфийской хромосомой, и острый В-лимфобластный лейкоз. Необходимо подчеркнуть, что ПЦР-тест на транслокацию генов *bcr-abl* примерно в 10 000 раз чувствительнее и значительно специфичнее кариотипического определения «Филадельфийской хромосомы».

Что касается клиники солидных опухолей, то наибольшее признание получили молекуляр-

но-генетические тесты на амплификацию онкогенов N-мус и erbB-2. Рецепторы эпидермального фактора роста – EGFR включают группы протоонкогенов: her-1 (erbB-1), her-2/neu (erbB-2), her-3 (erbB-3) и her-4 (erbB-4). Замечено, что при раке желудка, молочной железы, поджелудочной железы и почек наблюдается максимальная экспрессия her-2/neu (erbB-2).

Нами создана, зарегистрирована в Республике Беларусь и внедрена тест-система для определения экспрессии гена her-2/neu. Комплект предназначен для количественного определения her-2/neu транскриптов. Гиперэкспрессия her-2/neu выявляется в 25-30% случаев рака молочной железы, причем в 90-95% случаев гиперэкспрессия her-2/neu является прямым результатом амплификации гена erbB-2. В доклинических и клинических исследованиях было установлено, что амплификация и/или гиперэкспрессия her-2 имеет ключевое значение в онкотрансформации и туморогенезе рака молочной железы. Гиперэкспрессия her-2/neu в опухолевой клетке коррелирует с рядом неблагоприятных факторов прогноза, а именно: размером опухоли, высокой степенью злокачественности, уменьшением рецепторов эстрогена и прогестерона в опухоли. В результате проведения исследований нами показано, что гиперэкспрессия her-2/neu является независимым прогностическим фактором для рака молочной железы с N⁺ и N⁻. Избыточная экспрессия также определяется при раке яичников, желудка, агрессивных форм рака тела матки и особенно серозного рака эндометрия.

При раке молочной железы амплификация гена erbB-2 не только является прогностическим индикатором, но и указывает на специфический спектр чувствительности опухоли к химиопрепаратам. Вовремя полученные результаты такого лабораторного исследования могут подчеркнуть необходимость увеличить интенсивность терапевтических и диспансерных мероприятий.

Известно, что в настоящее время ведутся интенсивные клинические испытания специфических ингибиторов данного рецептора для erbB-2-положительных неоплазм [23, 24, 45].

Важнейшим направлением в развитии медицины на современном этапе является индивидуализация терапии опухолей, основанная на уточнении молекулярно-генетических особенностей новообразований. Данное направление пока ещё находится на начальных этапах своего развития, однако есть все основания полагать,

что молекулярные подходы к индивидуализации противоопухолевой терапии получат бурное развитие в самое ближайшее время.

Огромный интерес вызывают клинические испытания протоколов генотерапии рака. Наиболее логичными представляются попытки «исправить» повреждения онкогенов и антионкогенов в опухолевой клетке. Однако осуществление этой идеи сталкивается с серьёзными трудностями. Они связаны не только с комплексной, множественной природой генетических повреждений в опухолях, но и с неспособностью существующих методов переноса генов поразить 100 % клеток-мишеней. Тем не менее, существует ряд научных подходов, одним из которых является стратегия, направленная на перенос в клетки костного мозга гена множественной лекарственной устойчивости – mdr1. При достижении позитивного результата это позволит существенно понизить побочные эффекты химиотерапии и, следовательно, увеличить ее интенсивность.

На современном этапе исследования некоторых ученых нацелены также на трансфекцию клеток опухоли генами, активирующими биологически интактные формы цитостатических препаратов. Такой подход обеспечит направленное антипролиферативное действие антинеопластических агентов. Уже сейчас известны генотерапевтические результаты, подразумевающие увеличение эффективности противоопухолевого иммунного ответа за счёт переноса в клетки опухоли генов комплекса HLA [1, 2, 40, 44,].

Заключение

Перспективность молекулярно-генетических диагностических подходов отрицают только самые отъявленные ретрограды. Тем не менее, вопрос о немедленном и широкомасштабном клиническом использовании предлагаемых тестов вызывает жаркие дебаты. Большинство скептиков справедливо отмечают, что практически все исследования, лежавшие в основе разработки мультигенных прогностических тестов, проигнорировали необходимость статистической поправки на статус традиционных прогностических параметров (уровень экспрессии гормональных рецепторов, степень дифференцировки опухоли, количество митозов, пролиферативный индекс Ki67 и т.д., и т.п.).

В то же время, полимеразная цепная реакция – широко применяемый метод в молекуляр-

ной биологии. Нам уже удалось доказать, что ПЦР-анализ ничем не уступает методу ИГХ. Полученные нами результаты совпадают с результатами ИГХ-исследования на 80%. Кроме того, мы считаем, что иммуногистохимия имеет свои недостатки: есть научные публикации, подтверждающие, что такой метод анализа может «пропускать» до 15% всех гормонально-зависимых опухолей.

Литература

- Иванцов, А. О. Возможности иммуногистохимического исследования в диагностике опухолей / А. О. Иванцов, Д. Е. Мацко // *Практ. онкология*. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 185–193.
- Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под ред. С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – Казань : Титул, 2000. – 451 с.
- Первый опыт проведения внешнего контроля качества иммуногистохимических исследований в диагностике лимфопролиферативных заболеваний / Ю. А. Криволапов [и др.] // *Арх. патологии*. – 2011. – Т. 73, № 2. – С. 23–32.
- Криволапов, Ю. А. Применение тканевых матриц в иммуногистохимии / Ю. А. Криволапов, А. И. Храмов // *Арх. патологии*. – 2005. – Т. 67, № 2. – С. 48–49.
- Мацко, Д. Е. Современные методы в практической онкоморфологии / Д. Е. Мацко, К. В. Шелихова // *Практ. онкология*. – 2007. – Т. 8, № 4. – С. 182–187.
- Al-Nafussi, A. Tumor diagnosis: practical approach and pattern analysis / A. Al-Nafussi. – London : CRC Press, 2005. – 1344 p.
- Бабиченко, И. И. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста : учеб. пособие / И. И. Бабиченко, В. А. Ковязин. – М. : РУДН, 2008. – 109 с.
- Имуногистохимические методы : руководство / ed. G. L. Kumar, L. Rudbeck ; пер. с англ. под ред. Г. А. Франка, П. Г. Малькова. – М., 2011. – 224 с.
- Клиническое значение некоторых иммуногистохимических маркеров при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря / К. Н. Сафиуллин [и др.] // *Онкоурология*. – 2010. – № 4. – С. 36–41.
- Стаффорд, В. В. Применение иммуногистохимического метода в диагностике / В. В. Стаффорд // *RJOAS*. – 2016 Aug. – Vol. 8, N 56. – P. 18–21.
- Гулюкин, А. М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза / А. М. Гулюкин // *Вопр. вирусологии*. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 5–10.
- Имуногистохимическое исследование ушиба сердца / Ю. В. Збруева [и др.] // *Судебно-мед. экспертиза*. – 2013. – Т. 56, № 1. – С. 54–55.
- Torp, S. H. Diagnostic and prognostic role of Ki67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies / S. H. Torp // *Clin. Neuropathol.* – 2002 Nov-Dec. – Vol. 21, N 6. – P. 252–257.
- Coons, A. H. Immunological properties of an antibody containing a fluorescence group / A. H. Coons, H. J. Creech, R. N. Jones // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1941 Jun. – Vol. 47, N 2. – P. 200–202.
- Fisher, C. Immunohistochemistry in diagnosis of soft tissue tumours / C. Fisher // *Histopathology*. – 2011 Jun. – Vol. 58, N 7. – P. 1001–1012.
- Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (Delta Delta C(T)) / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. – 2001 Dec. – Vol. 25, N 4. – P. 402–408.
- Enhanced detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in fixed tissues by in situ hybridization following tyramide signal amplification / N. T. Trang [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2015 May. – Vol. 27, N 3. – P. 326–331.
- Шагинян, И. А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций / И. А. Шагинян // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия*. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 82–95.
- Имянитов, Е. Н. Высокопроизводительные молекулярно-генетические методы нового поколения в диагностике и лечении новообразований / Е. Н. Имянитов // *Практ. онкология*. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 194–202.
- Genomic signatures of cancer: basis for individualized risk assessment, selective staging and therapy / F. L. Baehner [et al.] // *J. Surg. Oncol.* – 2011. – Vol. 103, N 6. – P. 563–573.
- Microarray: an instrument for cancer surgeons of the future / M. L. Broadhead [et al.] // *ANZ. J. Surg.* – 2010 Jul-Aug. – Vol. 80, N 7/8. – P. 531–536.
- Chon, H. S. Microarray based gene expression studies in ovarian cancer / H. S. Chon, J. M. Lancaster // *Cancer Control*. – 2011 Jan. – Vol. 18, N 1. – P. 8–15.
- Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study / E. Espinosa [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2005 Oct. – Vol. 23, N 29. – P. 7278–7285.
- American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer / M. E. Hammond [et al.] // *J. Oncol. Pract.* – 2010 Jul. – Vol. 6, N 4. – P. 195–197.
- Molecular epidemiology and its current clinical use in cancer management / M. Hartman [et al.] // *Lancet. Oncol.* – 2010 Apr. – Vol. 11, N 4. – P. 383–390.
- Kaufmann, M. L. Expert Panel Members. Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy: Consensus recommendations from an International Expert Panel / M. L. Kaufmann, L. Pusztai // *Cancer*. – 2011 Apr. – Vol. 117, N 8. – P. 1575–1582.
- Имянитов, Е. Н. Молекулярная генетика в клинической онкологии / Е. Н. Имянитов, К. П. Хансон // *Сибир. онкол. журн.* – 2004. – № 2/3. – С. 40–47.
- Молекулярная генетика опухолей человека / Е. Н. Имянитов [и др.] // *Вопр. онкологии*. – 1997. – Т. 43, № 1. – С. 95–101.
- Имянитов, Е. Н. Молекулярные аспекты патогенеза первично-множественных опухолей / Е. Н. Имянитов, К. П. Хансон // *Рос. онкол. журн.* – 1998. – № 5. – С. 47–51.
- Хансон, К. П. Современные тенденции в развитии биологической терапии злокачественных опухолей / К. П. Хансон, Б. В. Афанасьев, А. Н. Берштейн // *Вопр. онкологии*. – 1996. – Т. 42, № 5. – С. 7–12.

31. Торопова, Н. Е. Молекулярно-генетические исследования в практике онкологической клиники / Н. Е. Торопова [и др.] // Изв. Самар. науч. центра Рос. акад. наук. – 2015. – Т. 17, № 2. – С. 690–696.
32. Немцова, М. В. Молекулярно-биологические маркеры в практической онкологии / М. В. Немцова, Н. Е. Кушлинский // Лаборатор. служба. – 2014. – № 1. – С. 14–22.
33. Никоненко, Т. А. Методы молекулярно-генетической диагностики сегодня / Т. А. Никоненко // Лаборатор. медицина. – 2008. – № 9. – С. 27–30.
34. Бабиченко, И. И. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста / И. И. Бабиченко // Вестн. РУДН. Сер. Медицина. – 2008. – № 4. – С. 94–99.
35. Опыт внедрения результатов молекулярно-генетических исследований в онкологическую клиническую практику / В. А. Горбунова [и др.] // Вестн. Москов. онкол. об-ва. – 2013. – № 2. – С. 4–5.
36. Молекулярно-генетические маркеры и персонализация лечения / И. А. Демидова [и др.] // Вестн. Москов. онкол. об-ва. – 2013. – № 2. – С. 5–6.
37. Молекулярно-генетические исследования в онкологии / Н. Н. Мазуренко [и др.] // Вестн. Москов. онкол. об-ва. – 2013. – № 2. – С. 3–4.
38. Современные молекулярно-генетические методы исследования в эпидемиологическом надзоре за вирусными инфекциями (аналитический обзор) / Н. Н. Зайцева [и др.] // МедиАль. – 2014. – № 2. – С. 122–134.
39. Зборовская, И. Б. Современные стратегии исследования маркеров опухолевого роста в клинической практике / И. Б. Зборовская // Успехи молекуляр. онкологии. – 2014. – № 2. – С. 4–15.
40. A translational view of themolecular pathogenesis of lung cancer / M. Sato [et al.] // J. Thorac. Oncol. – 2007 Apr. – Vol. 2, N 4. – P. 327–343.
41. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // Cell. – 2011 Mar. – Vol. 144, N 5. – P. 646–674.
42. Langley, R. R. The seed and soil hypothesis revisited – the role of tumorstroma interactions in metastasis to different organs / R. R. Langley, I. J. Fidler // Int. J. Cancer. – 2011 Jun. – Vol. 128, N 11. – P. 2527–2535.
43. Копнин, Б. П. Современные представления о механизмах злокачественного роста: сходства и различия солидных опухолей и лейкозов / Б. П. Копнин // Клин. онкогематология. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 165–183.
44. Головатая, Е. И. Сравнительная характеристика методов пренатального кариотипирования / Е. И. Головатая // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2006. – № 2. – С. 39–44.
45. Новая классификация ВОЗ опухолей центральной нервной системы – вызов нейрохирургам, нейроморфологам и нейроонкологам / Д. Е. Мацко [и др.] // Рос. нейрохирург. журн. им. проф. А. Л. Поленова. – 2016. – Т. 8, № 3. – С. 5–9.

Поступила 30.12.2016 г.

Принята в печать 04.04.2017 г.

References

1. Ivantsov AO, Matsko DE. Possibilities of an immunohistochemical research in diagnostics of tumors. Prakt Onkologiya. 2011;12(4):185-93. (In Russ.)
2. Petrov SV, Raykhlin NT, red. Guide to immunohistochemical diagnostics of tumors of the person. Kazan, RF: Titul; 2000. 451 p. (In Russ.)
3. Krivolapov YuA, Peshkov MV, Leenman EE, Matsionis AE, Kovrigina AM. First experience of carrying out external quality control of immunohistochemical researches in diagnostics limfoproliferativnykh of diseases. Arkh Patologii. 2011;73(2):23-32. (In Russ.)
4. Krivolapov YuA, Khrantsov AI. Use of fabric matrixes in an immunohistochemistry. Arkh Patologii. 2005;67(2):48-9. (In Russ.)
5. Matsko DE, Shelikhova KV. Modern methods in a practical onkomorfologiya. Prakt Onkologiya. 2007;8(4):182-7. (In Russ.)
6. Al-Nafussi A. Tumor diagnosis: practical approach and pattern analysis. London: CRC Press; 2005. 1344 p.
7. Babichenko II, Kovyazin VA. New methods of immunohistochemical diagnostics of tumoral body height: ucheb posobie. Moscow, RF: RUDN; 2008. 109 p. (In Russ.)
8. Kumar GL, Rudbeck L, Frank GA, Mal'kov PG, red. Immunohistochemical methods: rukovodstvo. Moscow, RF; 2011. 224 p. (In Russ.)
9. Safullin KN, Gorban' NA, Karyakin OB, Pugachev VV. Clinical value of some immunohistochemical markers at not muscularly - invasive cancer of a bladder. Onkourologiya. 2010;(4):36-41. (In Russ.)
10. Stafford VV. Use of an immunohistochemical method in diagnostics. RJOAS. 2016 Aug;8(56):18-21. doi: 10.18551/rjoas.2016-08.03. (In Russ.)
11. Gulyukin AM. The importance of modern methods of laboratory diagnostics and identification of the originator of a rabies for immunologic monitoring of this zoonosis. Vopr Virusologii. 2014;59(3):5-10. (In Russ.)
12. Zbrueva YuV, Kul'bitskiy BN, Kabakova SS, Dzhuvalyakov PG, Bogomolov DV, Fedulova MV. Immunohistochemical research of a bruise of heart. Sudebno-med Ekspertiza. 2013;56(1):54-5. (In Russ.)
13. Torp SH. Diagnostic and prognostic role of Ki67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies. Clin Neuropathol. 2002 Nov-Dec;21(6):252-7.
14. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescence group. Proc Soc Exp Biol Med. 1941 Jun;47(2):200-2.
15. Fisher C. Immunohistochemistry in diagnosis of soft tissue tumours. Histopathology. 2011 Jun;58(7):1001-12. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03707
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (Delta Delta C(T)). Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
17. Trang NT, Hirai T, Ngan PH, Lan NT, Fuke N, Toyama K, et al. Enhanced detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in fixed tissues by in situ hybridization following tyramide signal amplification.

- J Vet Diagn Invest. 2015 May;27(3):326-31. doi: 10.1177/1040638715579260
18. Shaginyan IA. Role and the place of molecular and genetic methods in the epidemiological analysis of intrahospital infections. *Klin Mikrobiologiya Antimikrob Khimioterapiia*. 2000;2(3):82-95. (In Russ.)
 19. Imyanitov EN. High-performance molecular and genetic methods of new generation in diagnostics and treatment of neoplasms. *Prakt Onkologiya*. 2011;12(4):194-202. (in Russ.)
 20. Bachner FL, Lee M, Demeure MJ, Bussey KJ, Kiefer JA, Barrett MT. Genomic signatures of cancer: basis for individualized risk assessment, selective staging and therapy. *J Surg Oncol*. 2011;103(6):563-73. doi: 10.1002/jso.21838
 21. Broadhead ML, Clark JC, Dass CR, Choong PF. Microarray: an instrument for cancer surgeons of the future. *ANZ J Surg*. 2010 Jul-Aug;80(7-8):531-6. doi: 10.1111/j.1445-2197.2010.05379.x
 22. Chon HS, Lancaster JM. Microarray based gene expression studies in ovarian cancer. *Cancer Control*. 2011 Jan;18(1):8-15.
 23. Espinosa E, Vara JA, Redondo A, Sánchez JJ, Hardisson D, Zamora P, et al. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. *J Clin Oncol*. 2005 Oct;23(29):7278-85. doi: 10.1200/JCO.2005.01.4746
 24. Hammond MEH, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract*. 2010 Jul;6(4):195-7. doi: 10.1200/JOP.777003
 25. Hartman M, Loy EY, Ku CS, Chia KS. Molecular epidemiology and its current clinical use in cancer management. *Lancet Oncol*. 2010 Apr;11(4):383-90. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70005-X
 26. Kaufmann ML, Pusztai L. Expert Panel Members. Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy: Consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer*. 2011 Apr;117(8):1575-82. doi: 10.1002/cncr.25660
 27. Imyanitov EN, Khanson KP. Molecular genetics in a clinical oncology. *Sibir Onkol Zhurn*. 2004;(2-3):40-7. (In Russ.)
 28. Imyanitov EN, Kalinovskiy VP, Knyazev PG, Lyshchev AA, Novikov LB. Molecular genetics of tumors of the person. *Vopr Onkologii*. 1997;43(1):95-101. (In Russ.)
 29. Imyanitov EN, Khapson KP. Molecular aspects of a pathogenesis of primary and multiple tumors. *Ros Onkol Zhurn*. 1998;(5):47-51. (In Russ.)
 30. Khapson KP, Afanas'yev BV, Bershteyn AN. Current trends in development of biological therapy of malignant tumors. *Vopr Onkologii*. 1996;42(5):7-12. (In Russ.)
 31. Toropova NE, Zakamova EV, Teterina YuYu, Kozlov SV, Timofeeva NV, Moroshkina GP, i dr. Molecular and genetic researches in practice of oncologic clinic. *Izv Samar Nauch Tsentra Ros Akad Nauk*. 2015;17(2):690-6. (In Russ.)
 32. Nemtsova MV, Kushlinskiy NE. Molecular and biological markers in a practical oncology. *Laborator Sluzhba*. 2014;(1):14-22. (In Russ.)
 33. Nikonenko TA. Methods of molecular and genetic diagnostics today. *Laborator Meditsina*. 2008;(9):27-30. (In Russ.)
 34. Babichenko II. New methods immunohistochemical diagnostikiopukholevy body height. *Vestn RUDN Ser Meditsina*. 2008;(4):94-9. (In Russ.)
 35. Gorbunova VA, Kolomeytseva AA, Breder VV, Besova NS, Marenich AF, Reutova EV, i dr. Experience of introduction of results of molecular and genetic researches in oncologic clinical practice. *Vestn Moskov Onkol Ob-va*. 2013;(2):4-5. (In Russ.)
 36. Demidova IA, Barinov AA, Gagarin IM, Savelov NA, Stroyakovskiy DL, Popov MI, i dr. Molecular and genetic markers and personalisation of treatment. *Vestn Moskov Onkol Ob-va*. 2013;(2):5-6. (In Russ.)
 37. Mazurenko NN, Tsyganova IV, Mochal'nikova VV, Anurova OS. Molecular and genetic researches in an oncology. *Vestn Moskov Onkol Ob-va*. 2013;(2):3-4. (In Russ.)
 38. Zaytseva NN, Efimov EI, Nosov NN, Parfenova OV, Peksheva OYu. Modern molecular and genetic methods of a research in epidemiological surveillance behind HIV infection (state-of-the-art review). *MediAl'*. 2014;(2):122-34. (In Russ.)
 39. Zborovskaya IB. The modern strategy of a research of markers of tumoral body height in clinical practice. *Uspekhi Molekuliar Onkologii*. 2014;(2): 4-15.
 40. Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007 Apr;2(4):327-43. doi: 10.1097/01.JTO.0000263718.69320.4c
 41. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
 42. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited – the role of tumorstroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 2011 Jun;128(11):2527-35. doi: 10.1002/ijc.26031
 43. Kopnin BP. Modern ideas of mechanisms of malignant body height: similarities and differences of solid tumors and leukoses. *Klin Onkogematologiya*. 2012;5(3):165-83. (In Russ.)
 44. Golovataya EI. Comparative characteristic of methods of a prenatal karyotyping. *Vestn BGU Ser 2 Khimii Biologiya Geografiya*. 2006;(2):39-44. (In Russ.)
 45. Matsko DE, Matsko MV, Ulitin AYU, Imyanitov EN. The new WHO classification of tumors of the central nervous system – a call to neurosurgeons, neuromorphologists and neurooncologists. *Ros Neurokhirurg Zhurn im prof AL Polenova*. 2016;8(3):5-9. (In Russ.)

Submitted 30.12.2016

Accepted 04.04.2017

Сведения об авторах:

Семенов В.М. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Пашинская Е.С. – к.б.н., доцент кафедры медицинской биологии и общей генетики, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Побяржин В.В. – к.б.н., доцент, докторант кафедры инфекционных болезней, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Субботина И.А. – к.в.н., доцент, докторант кафедры инфекционных болезней;
Шляхтунов Е.А. – к.м.н., доцент кафедры онкологии с курсами лучевой диагностики и лучевой терапии ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Веремей И.С. – старший лаборант кафедры инфекционных болезней;
Семенов С.В. – аспирант кафедры эпизоотологии, Витебская государственная академия ветеринарной медицины.

Information about authors:

Semenov V.M. – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Infectious Diseases, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Pashinskaya E.S. – Candidate of Biological Sciences, associate professor of the Chair of Medical Biology & General Genetics, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Pobyarzhin V.V. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, doctoral candidate of the Chair of Infectious Diseases, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Subbotina I.A. – Candidate of Veterinary Sciences, associate professor, doctoral candidate of the Chair of Infectious Diseases, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Shlyakhtunov E.A. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Oncology with the courses of Radiation Diagnosing & Radiation Therapy of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Veremey I.S. – senior laboratory assistant of the Chair of Infectious Diseases, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Semenov S.V. – postgraduate of the Chair of Epizootology, Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра инфекционных болезней. E-mail: tulovo22@rambler.ru – Побяржин Вячеслав Войтехович.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210023, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Infectious Diseases. E-mail: tulovo22@rambler.ru – Vyacheslav V. Pobyarzhin.