



ХИРУРГИЯ

УДК: 575.22:616.721.1:636.7

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2020.1.128

АНАЛИЗ КОРРЕЛЯЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И ГЕНОТИПА У СОБАК С ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ МЕЖПОЗВОНОЧНЫХ ДИСКОВ

Кузнецова Т. Ш. (ORCID: 0000-0002-8981-0696) – к.б.н., доцент кафедры ветеринарной генетики и животноводства, Семенов Б. С. (ORCID 0000-0003-0149-9360), д. в. н., профессор кафедры акушерства и оперативной хирургии, Михайлова А. С. (ORCID 0000-0002-7312-1052), аспирант кафедры акушерства и оперативной хирургии (ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»), Марков А. В., генеральный директор Центра ветеринарной генетики Зооген, Филиппова Е. А., лаборант-исследователь Центра ветеринарной генетики Зооген, Бычкова Э. О., руководитель научного отдела Центра ветеринарной генетики Зооген

Ключевые слова: хондродисплазия, хондродистрофия, дегенеративное заболевание межпозвоночных дисков собак. **Keywords:** chondrodysplasia, chondrodystrophy, intervertebral disk disease in dogs.



РЕФЕРАТ

Множество современных видов домашних животных имеет широкую вариабельность

пород. Генетический аспект играет значимую роль в развитии отдельных патологий. Ретроген, кодирующий фактор роста фибробластов 4 (FGF4), при встраивании в хромосому 18 собаки (CFA18) приводит к хондродисплазии, фенотипически проявляющейся как укороченные конечности у собак. Встраивание ретрогена FGF4 в хромосому 12 (CFA12) приводит к сходному фенотипу, но ассоциированному с повышенным риском дегенерации межпозвоночных дисков. Хотя многие ретрогены считаются молчащими псевдогенами, ретроген FGF4 в случаях хондродисплазии и хондродистрофии транскрипционно активен и приводит к гиперактивации рецептора фактора роста фибробластов 3 (FGFR3). Обе мутации доминантны, но связь с проблемами с позвоночником выявлена только для одной, где ретроген встроен в хромосому 12. Таким образом, собаки с фенотипом коротких конечностей находятся в группе риска по дегенеративному заболеванию межпозвоночных дисков, однако, данное заболевание регистрируют и среди животных, не относящихся к хондродистрофоидам. Генетическая предрасположенность собак хондродистрофийных пород к дегенерации межпозвоночных дисков не является патогномичным критерием наличия таковой. В данном исследовании проведено генетическое тестирование собак разных пород, которые были обследованы на предмет ком-

прессионной миелопатии в результате дегенерации межпозвонковых дисков. При тестировании, цель которого заключалась в верификации соответствий породной предрасположенности и клинической манифестации дегенеративного заболевания межпозвонковых дисков среди 20 собак (14 хондродистрофоидных и 6 нехондродистрофоидных), в 14 случаях (то есть 70%) при томографии были выявлены дискогенные компрессии.

ВВЕДЕНИЕ

Множество современных видов домашних животных имеет широкую вариативность пород. Известно, что многие собаки ввиду породных особенностей предрасположены к различным заболеваниям. Генетический аспект играет значимую роль в развитии отдельных патологий. Так, например, было выяснено, что ретроген, кодирующий фактор роста фибробластов 4 (FGF4), при встраивании в хромосому 18 собаки (CFA18) приводит к хондродисплазии, фенотипически проявляющейся как укороченные конечности у собак [8]. Встраивание ретротгена FGF4 в хромосому 12 (CFA12) приводит к сходному фенотипу, но ассоциированному с повышенным риском дегенерации межпозвоночных дисков [7]. Дегенерация межпозвоночных дисков является хроническим процессом, характеризующимся прогрессирующей потерей протеогликанов и гидратацией в пульпозном ядре диска, что приводит к потере механической устойчивости и амортизирующей функции, образованию остеофитов и снижению движения в сегментах позвоночника [5, 11]. Известно, что FGF-сингалинг играет важную роль в раннем эмбриональном развитии [6, 10], а его участник FGF4 необходим для нормального формирования конечности [9]. Ретрогены – это ДНК-копии процессированной РНК (комплементарной ДНК), встроенные в геном в новых местах, что приводит к увеличению копийности родительского гена. Хотя многие ретрогены считаются молчащими псевдогенами, ретроген FGF4 в случаях хондродисплазии и хондродистрофии транскрипционно активен и приводит к гиперактивации рецептора фактора роста фибробластов 3 (FGFR3). Обе мутации доминантны, но связь с проблемами с позвоночником выявлена только для

одной, где ретроген встроен в хромосому 12 [4, 7, 8, 12]. Таким образом, собаки с фенотипом коротких конечностей находятся в группе риска по дегенеративному заболеванию межпозвонковых дисков, однако, данное заболевание регистрируют и среди животных, не относящихся к хондродистрофоидам.

В настоящее время дегенеративное заболевание межпозвонковых дисков является одним из самых распространенных поводов для нейрохирургического вмешательства. Так как данное заболевание характерно для хондродистрофоидных пород [1], представители данной группы наиболее часто подвергаются хирургическому лечению [2, 3]. Тем не менее дискогенные компрессии могут возникать и у собак нехондродистрофоидных пород. Таким образом, собака любой породы может обладать дискогенной компрессией. В связи с этим целесообразно учитывать косвенные признаки, указывающие на вероятность данного заболевания. Цель представленной работы заключалась в сравнении значимости прямых и косвенных факторов риска у различных пород собак. Согласно данной цели были выполнены следующие задачи: определено наличие дискогенной компрессии (при проведении одного из видов томографии) и определен генетический статус по мутациям хондродистрофии ассоциированной с предрасположенностью к дегенерации межпозвонковых дисков и хондродисплазии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В период с мая по август 2019 года проводилось обследование 20 собак различных пород (14 хондродистрофоидов, в т. ч. 6 такс, 2 вельш-корги пемброк, 2 бассет-хаунда, 1 бигль, 1 китайская хохлатая, 1 американский кокер-спаниель, 1 чихуахуа и 6 нехондродистрофоидов, в т.



Диаграмма 1. Распределение породного состава и окончательного диагноза среди исследованных животных – в левой колонке представлены 14 собак хондродистрофических пород, из них 10 с дегенерацией межпозвонковых дисков, в правой – 6 нехондродистрофических, из них 4 с дегенерацией межпозвонковых дисков.

ч. 2 бернских зенненхунда, 1 американская акита, 1 лабрадор-ретривер, 1 немецкая овчарка, 1 беспородная). Обследование включало в себя сбор анамнеза, клинический осмотр, оценку гематологического и биохимического анализов крови, анализ результатов КТ (определение основного заболевания) при использовании аппарата Philips MX 16-slice CT (Нидерланды) или МРТ на высокопольном МР-томографе PHILIPS Achieva с напряженностью магнитного поля 1,5 Тесла (Нидерланды) для постановки окончательного диагноза. В качестве биоматериала для генетического тестирования использовали буккальный эпителий собак. Выделение ДНК проводили при помощи коммерческого набора «Рибосорб» (ЦНИИЭ, Россия). Генотипирование было проведено с использованием праймеров, приведенных ранее [1]. Полимеразную цепную реакцию проводили в 30 мкл смеси, содержащей ×1 буфер для Taq-Мполимеразы с MgCl, 0,25 мМ дНТФ,

20 pM каждого праймера, 2,5 ед. а. Taq-Мполимеразы («АлкорБио», Россия) и 2 мкл геномной ДНК. Амплификацию осуществляли на приборе MyCycler (Bio-Rad Laboratories, США) при следующих условиях: денатурация при 95 °C в течение 15 мин, далее 30 циклов: 30 с при 94 °C, 30 с при 60 °C, 60 с при 72 °C, завершающий шаг – 5 мин при 72 °C. Электрофорез продуктов ПЦР был проведен в агарозном геле (концентрация агарозы 2 %) в присутствии бромистого этидия, визуализацию ДНК проводили UV-трансиллюминацией. При вставке ретротгена FGF4 в хромосому 18 ожидаемый размер фрагмента составлял 388 полинуклеотидных оснований (п.о.), в случае нормы – 168 п.о. Вставка ретротгена FGF4 в хромосому 12 приводила к образованию амплификата размером 654 п.о., в случае отсутствия вставки – 333 п.о.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди 14 собак с дискогенными компрессиями 11 относились к хондродистро-

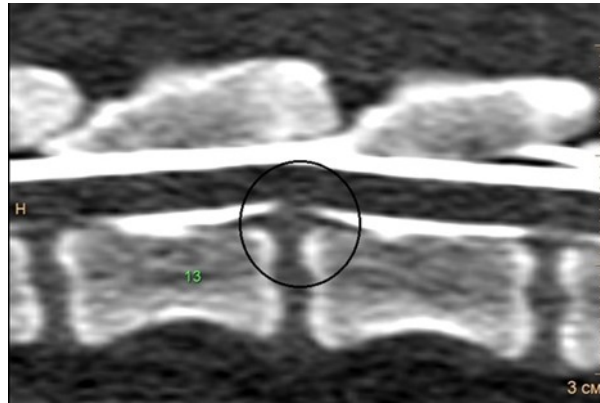


Рис. 1. Сакральное изображение дискогенной компрессии спинного мозга на уровне тринадцатого грудного позвонка и первого поясничного (T13-L1) у кобеля породы вельш корги при проведении миелографии и компьютерной томографии.

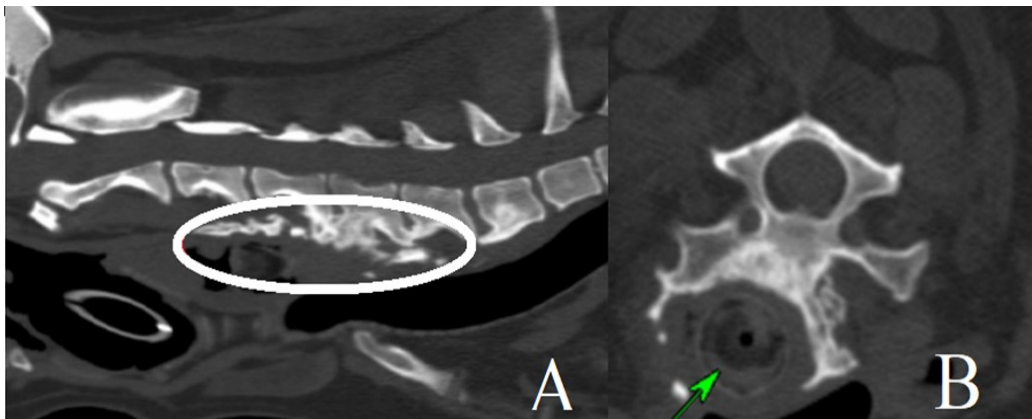


Рис. 2. Сакитальный (А – эллипсом выделен спондилез в шейном отделе) и аксиальный (В – стрелка указывает на инородный предмет в просвете пищевода) срезы суки породы вельш корги при проведении компьютерной томографии.

фойдным породам (в т. ч. 5 такс, 2 бассет-хаунда, бигль, вельш-корги пемброк, чихуахуа и китайская хохлатая) и имели мутацию, характеризующую предрасположенность к дегенерации межпозвоночных дисков. Но только 9 из них имели мутацию, отвечающую за хондродисплазию (те же породы, кроме бигля и китайской хохлатой). Из 6 собак, у которых не было выявлено дискогенных компрессий, 3 относились к хондродистрофоидам (а именно такса, американский кокер-спаниель и вельш-корги пемброк), обла-

дали мутацией, характеризующей предрасположенность к дегенерации межпозвоночных дисков (диаграмма 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным, полученным в ходе представленного исследования (как отмечают и зарубежные авторы [1]), следует, что подавляющее большинство собак с дегенерацией межпозвоночного диска относится к хондродистрофоидным породам и имеет генетическую мутацию, обуславливающую предрасположенность к ней. Тем не менее генетически предрас-



Рис. 3. STIR-взвешенное изображение шейного отдела позвоночного столба восьмилетнего кобеля породы чихуахуа с дискогенной компрессией на уровне шестого-седьмого шейных позвонков (С6-7). Окружностью выделен дегенерировавший диск, сместившийся в вентральное субарахноидальное пространство.

положенные особи не всегда обладают клинически значимыми дискогенными компрессиями, а значит, в каждом случае требуется диагностика, верифицирующая факт дегенерации межпозвонкового диска, несмотря на наличие косвенных признаков. Таким образом, можно предполагать высокую степень вероятности наличия дискогенных компрессий у собак из списка групп риска, относящихся к носителям ретрогенаFGF4 в хромосоме 12, таким как такса, бассет-хаунд, бигль, бишон-фризе, кавалер-кинг-чарльз-спаниель, чихуахуа, американский кокер-спаниель, французский бульдог, джек-рассел-терьер, пекинес, вельш-корги пемброк.

Но стоит учитывать, что породная предрасположенность не всегда коррелирует с дефинитивным диагнозом. Так при проведении компьютерной томографии у двух представителей пятилетнего возраста (кобель 5 лет 5 месяцев и сука 5 лет) породы вельш корги, которые оба имеют мутации, обеспечивающие не только хондродисплазию, но и хондродистрофию с риском дегенерации меж-

позвонковых дисков, были выявлены различные причины болевого синдрома (рис. 1, 2).

Из двух собак пятилетнего возраста одной и той же породы, обследованных по поводу болевого синдрома, для которых по результатам генетического тестирования был выявлен повышенный риск дегенерации межпозвонковых дисков, лишь у одной причина была в дискогенной компрессии спинного мозга груднопоясничной области.

Также по данным нашей работы, несмотря на породную предрасположенность, не у всех представителей хондродистрофических пород было выявлено наличие мутации хондродистрофии с риском дегенерации межпозвонковых дисков (например, восьмилетней кобель породы чихуахуа, у которого ретроспективно выявлено лишь наличие хондродисплазии при обнаружении дискогенной компрессии спинного мозга в шейном отделе (рис. 3)), что может быть обусловлено статистической погрешностью. В противном случае, оправдано проводить скрининговые генетические исследова-

ния, позволяющие предполагать вероятность манифестации дегенеративного заболевания межпозвонковых дисков.

Таким образом, полученные нами сведения соотносимы с данными зарубежных коллег о положительной корреляции дегенеративного заболевания межпозвонковых дисков среди хондродистрофических пород [7, 8, 9].

Для аналитических заключений, имеющих значение в отношении практики генетического тестирования в будущем, следует продолжать исследования при наличии контрольных групп, использовании случайных выборок, учитывая статистическую проверку гипотез.

ВЫВОДЫ

При тестировании, цель которого заключалась в верификации соответствия породной предрасположенности и клинической манифестации дегенеративного заболевания межпозвонковых дисков среди 20 собак (14 хондродистрофических и 6 нехондродистрофических), в 14 случаях (70%) при томографии были выявлены дискогенные компрессии. Из этих 14 случаев на генетическом уровне была выявлена предрасположенность лишь у 8 представителей (5 такс, бигль, вельш корги и китайская хохлатая). И наоборот, при наличии предрасположенности, выявленной в ходе генетического тестирования, дегенеративного заболевания межпозвонковых дисков не было выявлено у 3 из 14 представителей хондродистрофических пород (вельш корги, таксы, бассетхаунда).

Таким образом, на данный момент генетическое тестирование можно использовать в качестве метода, позволяющего с большой долей вероятности выявлять особей, склонных к дегенерации межпозвонковых дисков, но не являющегося патогномичным фактором для постановки диагноза.

Correlation analysis of clinical features and genotype in dogs with intervertebral disc degeneration

Kuznetsova T., PhD of Biological Sciences, docent, cher veterinary genetics and livestock; Semenov B., DVetMed, professor of the cher Obstetrics and operative surgery; Mikhailova A., Phd student,

Markov A., Director General of the Center for Veterinary Genetics 'Zoogen'; Filipova E. Laboratory Assistant, Center for Veterinary Genetics Zoogen; Bychkova E. Head of the Scientific Department of the Center for Veterinary Genetics 'Zoogen'

ABSTRACT

Most modern pet species have a wide breed variability. The genetic aspect plays a significant role in the development of individual pathologies. A retrogene encoding fibroblast growth factor 4 (FGF4), when inserted into the chromosome 18 of dogs (CFA18), leads to chondrodysplasia, phenotypically manifesting itself as shortened limbs in dogs. The incorporation of the FGF4 retrogene into chromosome 12 (CFA12) leads to a similar phenotype, but associated with an increased degeneration of the intervertebral discs. Although many retrogenes are considered "silent" pseudogenes, the FGF4 retrogene in cases of chondrodysplasia and chondrodystrophy is transcriptionally activated and leads to hyperactivation of the fibroblast growth factor 3 receptor (FGFR3). Mutations are dominant, but links with spinal problems have been identified only for one, where the retrogene is integrated into chromosome 12. Thus, dogs with the phenotype of short limbs are at risk for degenerative disease of the intervertebral discs, however, the disease recorded among animals is not related to chondrodystrophoids. The genetic predisposition of dogs of chondrodystrophoid breeds to degeneration of intervertebral discs is not a pathognomonic criterion for its presence. The study included genetic tests of dogs of different breeds, which were examined for compression myelopathy as a result of degeneration of the intervertebral discs. During testing, the purpose of which was to find correlation, the corresponding pedigree predispositions and clinical manifestations of degenerative diseases of the intervertebral discs among 20 dogs (14 chondrodystrophoid and 6 non-chondrodystrophoid) were confirmed, in 14 cases (i.e. 70%) discogenic compression was revealed during tomography.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Баттарай, Б. Гемиламинэктомия с резекцией фиброзного кольца (анулэктомии), versus частичная дискэктомия при хронических протрузиях межпозвонковых дисков в грудно-поясничном отделе у собак / Б. Баттарай // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана - 2019. - Т. 237, № 1. - С. 35-40.
2. Слесаренко, Н. А. Морфофункциональное обоснование дископатий у собак / Н. А. Слесаренко, Н. А. Козлов, М. Е. Обухова // Вестник Воронежского государственного аграрного университета - 2014. - № 1/2 (40/41). - С. 149-155.
3. Сотников, В. В. Диагностика и оперативное лечение дископатий грудно-поясничного отдела позвоночника собак : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук / Москов. гос. акад. ветеринар. медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина. - Москва, 2008. - 19 с.
4. An expressed Fgf4 retrogene is associated with breed-defining chondrodysplasia in domestic dogs / H. G. Parker, B. M. VonHoldt, P. Quignon [et al.] // Science. - 2009. - Vol. 325, iss.5943. - P. 995-998.
5. Boni, M. Anatomico-clinical correlations in cervical spondylosis / M. Boni, V. Denaro // Cervical spine / ed. P. Kehr, A. Weidner. - Springer-Verlag, 1987. - P. 3-20.
6. Boulet, A. M. Signaling by FGF4 and FGF8 is required for axial elongation of the mouse embryo / A. M. Boulet, M. R. Capecchi // Developmental Biology. - 2012. - Vol. 371. - P. 235-245.
7. Dog as a model for osteoarthritis: the FGF4 retrogene insertion may matter / A. R. Tellegen, A. J. Dessing, K. Houben [et al.] // Journal of Orthopaedic Research. - 2019. - Vol.12. - P.2550-2560.
8. FGF4 retrogene on CFA12 is responsible for chondrodystrophy and intervertebral disc disease in dogs / E. A. Brown, P. J. Dickinson, T. Mansoura [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2017. - Vol. 114, № 43. - P. 11476-11481.
9. Minowada, G. Increasing Fgf4 expression in the mouse limb bud causes polysyndactyly and rescues the skeletal defects that result from loss of Fgf8 function / G. Minowada, G. R. Martin // Development. - 2006. - Vol. 133, № 1. - P.33-42.
10. Niswander, L. Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse // L. Niswander, G. R. Martin // Development. - 1992. - Vol. 114. - P. 755-768.
11. Phenotypic effects of FGF4 retrogenes on intervertebral disc disease in dogs / K. Batcher, P. Dickinson, M. Giuffrida [et al.] // Genes (Basel). - 2019. - Vol. 10, № 6. - E435.
12. Understanding the molecular biology of intervertebral disc degeneration and po-