

На правах рукописи



Митенко Василиса Васильевна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ РАКА
МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ У ПЛОТОЯДНЫХ**

4.2.1. – «Патология животных, морфология, физиология,
фармакология и токсикология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном
бюджетном образовательном учреждении высшего образования
«Ставропольский государственный аграрный университет»

- Научный руководитель:** доктор биологических наук, доцент,
Дилекова Ольга Владимировна
- Официальные
оппоненты:** **Пудовкин Николай Александрович,**
доктор биологических наук, доцент,
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный
университет генетики, биотехнологии и ин-
женерии имени Н. И. Вавилова», заведующий
кафедрой морфологии, патологии животных и
биологии
- Родин Игорь Алексеевич,**
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
аграрный университет им. И. Т. Трубилина»
профессор кафедры анатомии, ветеринарного
акушерства и хирургии
- Ведущая организация:** **ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский госу-
дарственный университет ветеринарной
медицины»**

Защита состоится 7 июля 2023 г. в 10 часов 00 минут на заседа-
нии диссертационного совета 35.2.036.02 на базе ФГБОУ ВО «Ставро-
польский государственный аграрный университет» по адресу: 355017,
г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО
«Ставропольский государственный аграрный университет».

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г. и размещен
на сайтах: ВАК Министерства науки и высшего образования РФ [http://
www.vak.minobrnauki.gov.ru](http://www.vak.minobrnauki.gov.ru) «___» _____ 2023 г.; ФГБОУ
ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» [https://
stgau.ru/](https://stgau.ru/) «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Шулунова Ангелина Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы и степень ее разработанности.

На сегодняшний день согласно отчету Европейской федерации производителей зоотоваров (FEDIAF) самая большая популяция животных-компаньонов зафиксирована в России и составляет 23 млн кошек и 17,5 млн собак, из которых более 20 млн занимают онкологические пациенты.

В структуре онкологической заболеваемости на первом месте стоит рак молочной железы (РМЖ), который является глобальной проблемой современного мира с высокой смертностью не только людей, но и животных. Ежегодно в мировой медицине регистрируется более 1 млн случаев онкологических заболеваний молочных желез у женщин, однако в ветеринарии нет точных статистических показателей по данной проблематике в связи с трудным определением степени новообразования и тяжелым клиническим состоянием животного. Несмотря на многочисленные клинические, патофизиологические и патоморфологические исследования, до сих пор остается открытым вопрос канцерогенеза, его сигнатурных путей, инициирующих перепрограммирование клетки в раковую (Любченко Л. Н. и соавт., 2013; Ali H. R. et al., 2020; Cassetta L. et al., 2019; Wu S. Z. et al., 2020).

Канцерогенез является многоступенчатым процессом, в основе которого происходит продукция новых белковых компонентов, нарушение межклеточных взаимодействий, передача разнообразной сигнальной информации между клеточными структурами, а также генетическая нестабильность на уровне как отдельных генов, так и целых хромосом. Поэтому уточнение и детализация молекулярно-генетической идентификации опухолевых клеток способствуют пересмотру практических аспектов данного заболевания (Должиков А. А. и соавт., 2015; Лаптиев С. А. и соавт., 2017; Панченко И. С. и соавт., 2022; Lima Z. S. et al., 2019; Rios A. C. et al., 2019).

В настоящее время определено, что опухоли молочных желез являются гетерогенным заболеванием с различным молекулярным взаимодействием эпителиального и мезенхимального компонентов. Проводимые научные изыскания по фундаментальным и прикладным исследованиям в области изучения роли канцерогенеза в медицине напрямую зависят от морфологической, иммуногистохимической и молекулярно-генетической диагностики, которые могут существенно влиять на интегральную оценку данного заболевания (Апанович Н. В. и соавт., 2011; Гришина К. А. и соавт., 2016; Nguyen K. H. et al., 2018).

Отсюда следует, что изучение взаимосвязи различных морфологических типов неоплазий с определением генетической структуры злокачественных клеток в опухолях молочных желез у собак и кошек имеет научную новизну не только в морфологии, онкологии, диагностике и терапии животных, но и в прикладной и фундаментальной биологии.

Цель исследования – изучение морфологических и генетических закономерностей развития рака молочных желез у плотоядных (собака и кошка).

Задачи исследования:

1. Провести анализ возрастного, породного и гендерного различий у собак и кошек с опухолями молочных желез.
2. Выявить закономерности морфологической организации эпителиального и стромального компонентов при разных гистологических типах злокачественных неоплазий молочной железы у собак и кошек.
3. Определить локализацию и функциональные особенности нуклеолярных белков (нуклеолин/NCL, нуклеофозмин/NPM1, фибрилларин/FBL) и белков промежуточных филаментов мезенхимального (виментин/vimentin, альфа-гладкомышечный актин/ α -SMA) и эпителиального компонентов (высокомолекулярный цитокератин/HMWCK) при разных гистологических типах злокачественных неоплазий молочной железы у собак и кошек.
4. Установить молекулярно-генетические изменения в опухолевых клетках сигнатурного паттерна с помощью ДНК-зонда с меткой рецептора фактора роста фибробластов (FGFR1) у животных.

Объект исследований – домашние кошки и собаки со злокачественными новообразованиями молочных желез.

Предмет исследований – основные гистотипы злокачественных опухолей молочной железы у плотоядных (собака и кошка), активация программы эпителиально-мезенхимального перехода, эктопическая экспрессия сигнатурного паттерна в клетках фибробластического дифферона.

Научная новизна. Впервые в г. Ставрополе проведен анализ встречаемости опухолей молочных желез по возрастному, породному и гендерному показателям у кошек и собак.

Выявлены основные гистологические типы и морфологические особенности клеточного ландшафта в злокачественных опухолях молочных желез у плотоядных.

Впервые у домашних кошек и собак установлен процесс эпителиально-мезенхимального перехода, при котором происходит изменение цитоскелета эпителиальной клетки, потеря межклеточных контактов и обретение более пластичного и подвижного фибропластического типа. Установлено, что в опухолях молочных желез у собак происходит прозопластическая метаплазия миоэпителиальных клеток в сторону структурной организации в хрящевую или костную ткань.

Получены новые данные об экспрессии маркеров транскрипционного фактора нуклеолин/NCL, нуклеофозмин/NPM1, фибрилларин/FBL, участвующих в процессах биогенеза рибосом.

Впервые представлены сведения по белкам промежуточных филаментов мезенхимального типа (виментин/vimentin, альфа-гладкомышечный

актин/ α -SMA), которые участвуют в пластичности, сократимости и мобильности клеток, а также белка эпителиального компонента (высокомолекулярный цитокератин/НМWСК), который участвует в поддержании основного цитоскелетного каркаса и межклеточной адгезии клеток.

Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование с помощью флюоресцентной *in situ* гибридизации на рецептор фактора роста фибробластов FGFR1, выполняющего паракринную регуляцию на эпителиальный компонент в мезенхимальный фенотип, посредством эктопической экспрессии рецептора.

Новизна исследований подтверждена 2 патентами на изобретения Российской Федерации (№ 2755392 от 15.09.2021; № 2777238 от 01.08.2022).

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в результате научного исследования данные о морфологических и генетических закономерностях развития рака молочных желез у плотоядных обогащают и дополняют теоретические сведения о развитии канцерогенеза. Они могут быть использованы при чтении лекций и проведении практических занятий в высших учебных заведениях биологического профиля, при составлении учебных пособий и справочных руководств по онкологии в качестве фактического материала, а также необходимы ветеринарным специалистам для постановки верного диагноза в области онкологии и будут полезны для разработки тактики таргетного лечения данной патологии.

Научно-практическая значимость диссертационной работы заключается в совершенствовании молекулярного метода исследования опухолей молочных желез у собак и кошек, получены патенты РФ на изобретения: «Способ флюоресцентной гибридизации *in situ* при применении ДНК-зонда FGFR1 у разных видов млекопитающих на цитологических препаратах» (№ 2755392 от 15.09.2021); «Способ флюоресцентной гибридизации *in situ* при применении ДНК-зонда с меткой FGFR1 у разных видов млекопитающих на гистологических препаратах» (№ 2777238 от 01.08.2022).

Методология и методы исследования. Методологической основой проведенных исследований является необходимость изучения канцерогенеза в молочных железах у домашних плотоядных животных для научного прогнозирования и оценки злокачественного опухолевого процесса. Результаты исследований получены с использованием гистологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетического (FISH) методов исследований. Особенностью работы является получение новых данных по морфологическим особенностям опухолей молочных желез, экспрессии маркеров транскрипционного фактора и промежуточных филаментов клеток с анализом сравнительно-видового, возрастного и гендерных аспектов, а также выявление молекулярных изменений сигнатурного паттерна в опухолевых клетках.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Морфологическая характеристика пролиферативной активности и степени злокачественности клеток в опухолях молочных желез у собак и кошек обусловлена биосинтетической экспрессией нуклеолярных белков (NCL, NPM1, FBL).
2. В определённых гистотипах злокачественных опухолей молочных желез у собак и кошек происходит активация программы эпителиально-мезенхимального перехода, обусловленного экспрессией ключевых структурных белков, участвующих в поддержании цитоскелета клеток (vimentin, α -SMA, HMWCK).
3. Эктопическая экспрессия сигнатурного паттерна в геноме клеток фибробластического дифферона обуславливает изменения структурной организации эпителиального компонента в процессе эпителиально-мезенхимального перехода.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность проведенных исследований основана на том, что все гистологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические данные получены с использованием современных методов на сертифицированном оборудовании.

Основные результаты научных исследований вошли в отчеты по научно-исследовательской работе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» за 2019–2023 годы. Основные положения диссертации были доложены, обсуждены и получили положительную оценку на научных конференциях профессорско-преподавательского состава ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ (2019–2023 гг.), Всероссийском конкурсе Минсельхоза России (Москва, 2019), Международном ветеринарном конгрессе «Серебряный микроскоп» (Москва, 2021), 24-й Всероссийской агропромышленной выставке «Золотая осень – 2022» (Москва, 2022), 30-м Международном ветеринарном конгрессе Moscow Veterinary Congress (Москва, 2022), Международной научно-практической конференции «Проблемы продовольственной безопасности» (EPFS 2023) (Минск, 2023).

Исследования выполнены в рамках гранта Всероссийского конкурса «УМНИК-2020» (договор № 16027ГУ/2020 от 24.12.2020), тема «Разработка метода определения статуса генов FGFR1 при раке молочной железы с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации».

Материалы исследований используются в учебном процессе и научных исследованиях в ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Вятский государственный агротехнологический университет», ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина», ФГБОУ ВО «Оренбургский государ-

ственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», а также в ветеринарных клиниках г. Ставрополя: ИП Шаламова Е. В. «Колибри», ИП Заиченко И. В. «Ветеринарный центр им. Пирогова».

Личный вклад соискателя. Постановка научной задачи, формулирование цели и задач, организация и проведение исследований выполнены лично автором. В ходе работы проведены гистологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы исследования. Доля участия соискателя при выполнении диссертации составляет 90%.

Публикация. По материалам исследований опубликовано 17 научных работ, в которых отражены основные положения и выводы по теме диссертации, в том числе 3 статьи в изданиях, включенных в Перечень Российских рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ («Ипнология и ветеринария», «Известия Оренбургского государственного аграрного университета»), 1 научная работа, индексируемая в международной базе цитирования Scopus («Гены и клетки»). Получены 2 патента РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 207 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения и списка литературы. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 136 рисунками. Список литературы содержит 245 источников, в том числе 202 зарубежных.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлен анализ научной литературы по механизмам канцерогенеза молочной железы, морфологическим особенностям клеточного ландшафта опухолей у собак и кошек, основным процессам эпителиально-мезенхимального перехода, биосинтетической роли ядрышковых организаторов в клетках, структурообразованию белков цитоскелета клеток эпителиального и мезенхимального происхождения, влияние эктопической экспрессии рецептора фактора роста фибробластов мезенхимальных клеток на эпителиальный компонент опухолей молочных желез у животных.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

При выполнении диссертационной работы проведен анализ встречаемости опухолей молочных желез по возрастному, породному и гендерному показателям у собак и кошек. Выявлены основные гистологические типы, морфологические и генетические особенности клеточного ланд-

шафта в злокачественных опухолях молочных желез с помощью гистологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов исследований.

2.1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научные исследования по диссертационной работе проведены на кафедре паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им. профессора С. Н. Никольского, в Научно-диагностическом и лечебно-ветеринарном центре ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», а также на базе ветеринарных клиник ИП Шаламова Е. В. «Колибри», ИП Заиченко И. В. «Ветеринарный центр им. Пирогова» с 2019 по 2023 г.

Объектами при выполнении диссертационного исследования служили собаки ($n = 100$) и кошки ($n = 100$) разных пород и возрастных групп со спонтанно возникшими новообразованиями молочных желез. Для анализа заболеваемости онкологической патологией собак и кошек были использованы данные электронных амбулаторных журналов «VetAIS» и «VetDesk» ветеринарных клиник г. Ставрополя.

Материалом для настоящей работы являлась молочная железа. У каждого животного была проведена унилатеральная или билатеральная мастэктомия, после чего из видоизменённых участков молочных желез был отобран биопсионный материал не позднее чем за 20 мин до фиксации. Далее из изучаемого биоптата вырезались области патологической ткани с участками здоровой кожи размером 1 см^3 . Кусочки фиксировали в течение 48 ч в 10% забуференном растворе формалина (БиоВитрум, Россия) для гистологических и иммуногистохимических исследований.

После пройденной фиксации кусочки проводили через спирты возрастающей концентрации (50^0 , 60^0 , 70^0 , 80^0 и 96^0) и ксилол, которые заливали в гистологическую среду «Гистомикс Экстра» (БиоВитрум, Россия), с использованием гистологического процессора замкнутого типа Tissue-Tek VIP™ 5 Jr и станции парафиновой заливки Tissue-Tek® TEC™ 5 (Sakura, Япония). Из полученных блоков при помощи ротационного микротомы (Accu-Cut® SRM™ 200, Япония) и стола для подготовки гистологических срезов (Bio-Optica, Италия) делали срезы толщиной 3–4 мкм, которые окрашивали красителями гематоксилином и эозином и по методике Маллори (БиоВитрум, Россия) на автоматическом мультитейнере Prisma™ (Sakura, Япония), согласно рекомендациям В. В. Семченко, С. А. Барашковой, В. Н. Ноздрин и В. Н. Артемьева (2006).

При патогистологическом исследовании определяли критерии злокачественности новообразований с помощью классификации Elston & Ellis (1991) и L. Peña et al. (2010).

Для иммуногистохимической реакции использовали поликлональные кроличьи антитела к Anti-Nucleolin antibody, Anti-Nucleophosmin antibody

(SP236), Anti-Fibrillarin [28F2] antibody (Abcam plc, Великобритания) и моноклональные кроличьи антитела к Vimentin (SP20), моноклональные мышинные антитела к Actin-Smooth Muscle (1A4) и HMWCK (Keratin, HMW Ab-3) (Richard-Allan ScientificCo, США).

Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител раствором для разведения (TermoScientific, США).

При проведении иммуногистохимических реакций по методике Е. Г. Сухорукова с соавт. (2012) депарафинизацию и дегидратацию осуществляли классическим методом. Демаскировку антигенов выполняли высокотемпературной обработкой в пароварке в течение 20 мин путем погружения гистологических срезов в 5% раствор Trilogy™ (CELL MARQUE, Нидерланды). После этого стекла со срезами ополаскивали в 5% буфере TBS IHC Wash Buffer+Tween 20 (TBS (Tween 20x) (CELL MARQUE, Нидерланды), затем смывали буфер в течение 10 с в дистиллированной воде. После этого стекла обрабатывали в 3% растворе аптечной H₂O₂ с добавлением 1 мл Peroxide Block (CELL MARQUE, Нидерланды) в течение 10 мин с целью блокировки эндогенной пероксидазы, затем стекла со срезами ополаскивали в дистиллированной воде в течение 10 с и помещали в 5% буфер TBS на 5 мин. После буфера вокруг срезов делали гидрофобный слой гидрофобным барьерным карандашом-маркером pen-pen (SpringBioScience, США). На срезы наносили блокировочный раствор Background Block™ (CELL MARQUE, Нидерланды) на 10 мин, после чего со срезов удаляли излишки раствора и наносили первичные антитела Anti-Nucleolin, Nucleophosmin, Fibrillarin, Vim, α-SMA, HMWCK – antibody. Далее выполняли инкубацию срезов во влажной камере при температуре 27 °С в термостате в течение 24 ч, смывали первичные антитела в 5% буфере TBS 5 мин. Наносили раствор № 1 полимерной системы детекции HiDef Detection™ Amplifier (Mouse and Rabbit) (CELL MARQUE, Нидерланды) и инкубировали в течение 60 мин во влажной камере в термостате при температуре 27 °С. Смывали раствор № 1, помещая в 5% буфер TBS на 5 мин, наносили раствор № 2 полимерной системы детекции HiDef Detection™ HRP Polymer Detector (CELL MARQUE, Нидерланды) и инкубировали в течение 60 мин во влажной камере при температуре 27 °С. После инкубации раствор № 2 смывали 5% буфером TBS в течение 5 мин. После буфера на срезы наносили хромоген DAB Substrate Kit (CELL MARQUE, Нидерланды) на 3–5 мин. Интенсивность связи хромогена с исследуемым антителом контролировали под микроскопом. По достижении интенсивного коричневого окрашивания срезы промывали в двух сменах дистиллированной воды по 5 мин в каждой. Далее проводили докраску ядер гематоксилином Майера в течение 3 мин, после чего их снова промывали в буфере и погружали в 1% аммиачную воду. Затем проводили дегидратацию в спиртах восходящей концентрации, погружали в ксилол и заключали в монтирующую среду (БиоВитрум, Россия).

Оценку интенсивности экспрессии иммунореактивного материала проводили визуально с учетом процента активных клеток, суммы площади иммунопозитивных структур согласно рекомендациям Американского общества клинической онкологии/Колледжа американских патологов (ASCO/CAP, 2018г).

При проведении молекулярно-генетического исследования с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* на цитологическом и гистологическом материале руководствовались универсальным протоколом S. O. Richardson et al. (2019) и патентами О. В. Дилековой, В. В. Митенко (2021, 2022).

Цитологический материал отбирали с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии (ТИАБ) с опухолевого очага и наносили клеточный субстрат на предметное стекло с последующей его фиксацией в 96% спирте.

Для проведения FISH-гибридизации гистологический материал обрабатывали по стандартному протоколу. На каждый материал наносили 200 мкл раствора пепсина (Kreatech, США) и инкубировали 15 мин, затем промывали в дистиллированной воде и помещали в раствор 2×SSC (Kreatech, США) на 5 мин. После препараты дегидратировали в 70% спирте – 1 мин, в 1-й порции 96% спирта – 1 мин, во 2-й порции 96% спирта – 1 мин, и высушивали на воздухе в течение 20 мин. Далее на каждый гистологический/цитологический материал наносили по 1,5 мкл гибридационной смеси FGFR1 (CytoCell, США) при помощи 1-канальной автоматической пипетки (Eppendorf, Германия) и накрывали покровным стеклом 24×24 мм². Для полной герметизации по краям стекла наносили универсальный резиновый клей Момент «Кристалл» (LAB Industries, Россия), и материал переносили на пластину в автоматическую FISH-гибридизационную систему ThermoBrite (StatSpin, США) и устанавливали программу «Денатурация и Гибридизация». Денатурацию материала проводили при 80°C в течение 5 мин, гибридизацию в течение 18 ч при температуре 37°C. После этого доставали стекла и удаляли клей с краев, затем отмывали 2 мин в предварительно нагретом до 72°C отмывочном буфере Prewarm Wash Buffer 1 (Kreatech, США). Затем на материал наносили 20 мкм буфера Wash Buffer 2 (Kreatech, США) на 1 мин. Далее препараты промакивали фильтровальной бумагой и наносили 15 мкл контрастирующего красителя DAPI Counterstain (Leica Biosystems, США), содержащего флюорохром, материал накрывали покровным стеклом и оставляли в термостате при температуре 25°C на 15 мин.

Оценку амплификации гена FGFR1 проводили визуально с учетом количества активных клеток согласно рекомендациям Американского общества клинической онкологии/Колледжа американских патологов (ASCO/CAP, 2018 г.).

Микроскопические исследования выполнены с помощью флуоресцентного микроскопа OLYMPUS BX53 со встроенным фотоаппаратом

SC50 (Япония) с применением окуляра $\times 10$, $\times 15$ и объективов $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$ с использованием флюоресцентных фильтров FITC/DAPI/Texas Red.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ АНАЛИЗ

В разделе изложены результаты научных исследований, опубликованные в научных статьях самостоятельно и в соавторстве, которые содержат уточненные, расширенные и новые сведения.

2.2.1. Количественная характеристика взаимосвязи развития новообразований между двумя видами плотоядных

В результате исследований было установлено, что с новообразованиями молочных желез регистрировали 96% самок и 4% самцов от общего количества кошек. Из общего количества собак кастрированных самок – 27%, а из кошек – 33%. По возрастным показателям среди животных было выявлено, что у кошек встречаемость опухолей регистрировалась в возрасте от 9 до 13 лет, у собак от 7 до 11 лет.

По породной принадлежности наиболее подвержены возникновению новообразований: британская короткошёрстная – 12%, персидская – 10%, сиамская – 7%, скоттиш-фолд – 5%, беспородные животные – 29% и метисы – 20%. У собак: йоркширский терьер – 18%, такса – 7%, немецкая овчарка – 7%, американский стаффордширский терьер – 7% и беспородные – 13%.

При патогистологическом исследовании у кошек определили следующие типы опухолей: протоковая карцинома *in situ* – 10%, тубулярная аденокарцинома – 9%, тубулярная карцинома – 16%, инвазивный рак – 15%, недифференцированный рак – 7%. По степени злокачественности были определены следующие типы: высокодифференцированные (G1) – 14%, умереннодифференцированные (G2) – 24%, низкодифференцированные (G3) – 62%.

При патогистологическом исследовании у собак выявили типы опухолей: протоковая карцинома *in situ* – 15%, папиллярная карцинома – 14%, смешанная опухоль с хрящевой метаплазией – 22%. По степени злокачественности были определены следующие типы: высокодифференцированные (G1) – 47%, умереннодифференцированные (G2) – 26%, низкодифференцированные (G3) – 27%.

2.2.2. Гистологическая характеристика опухолей молочных желез у плотоядных

Проанализировав опухолевую картину молочных желез у собак и кошек согласно степеням дифференцировки и злокачественности, мы определили следующие характерные признаки.

Аденокарциномы у животных состояли из плеоморфного многослойного эпителия, у кошек отмечалась метаплазия эпителиального компонента в плоскоклеточный тип. У собак был выявлен активный рост миоэпителиальных клеток, формирующих спиралевидные структуры.

Тубулярные карциномы кошек имели превалирующий метастатический потенциал, это обусловлено окклюзией лимфатических сосудов опухолевыми эмболами и наличием в поверхностном паховом лимфатическом узле макрометастаза. В низкодифференцированных типах наблюдалась инвазия эпителиальных клеток с разрушением базальной основы, что характеризует, по нашему мнению, проявление процесса эпителиально-мезенхимального перехода (рисунок 1).

Медуллярная карцинома кошек морфологически имела черты агрессивной опухоли с высокой прогрессией к метастазированию. У собак обнаружили редкий тип данной опухоли с перстневидноклеточной дифференцировкой, характеризующийся плеоморфными клетками с обширной цитоплазмой, заполненной прозрачной каплей, за счет которой ядро сдвинуто на периферию (рисунок 2).

К инвазивному раку относили редкий тип с апокриновой дифференцировкой, характерной особенностью которого являлись клетки с обширной цитоплазмой, обладающей зернистыми оксифильными включениями. Был определен отдельный тип – с медуллярными признаками, характеризующийся отличительными клетками медуллярного типа в инвазивном компоненте опухолевой ткани (рисунок 3).

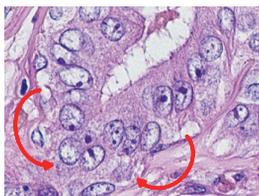


Рис. 1. Тубулярная карцинома (G3). Инвазия опухолевых клеток (↑). Кошка, беспородная, 14 лет. Окраска гематоксилином и эозином, ув. ×400

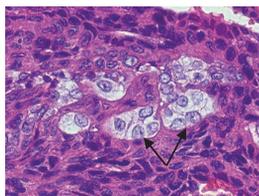


Рис. 2. Медуллярная карцинома (G3). Многоядерные клетки (↑). Кошка, порода персидская, 11 лет. Окраска гематоксилином и эозином, ув. ×400

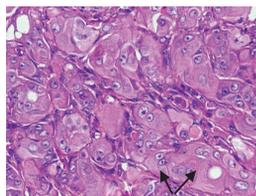


Рис. 3. Инвазивный рак с апокриновой дифференцировкой – G3. Зернистые включения в цитоплазме (↑). Собака, беспородная, 12 лет. Окраска гематоксилином и эозином, ув. ×200

Карцинома смешанного типа в 9% случаев регистрировалась у собак, для нее характерно наличие видоизменённого эпителиального компонента, присутствие интерстициальных миоэпителиальных клеток с дальнейшей их прозопластической метаплазией в зрелый гиалиновый хрящевой матрикс.

Смешанные опухоли в 29% случаев регистрировали у собак. Эпителиальный компонент состоял из мономорфных структур, под которыми располагались миоэпителиальные клетки в стадии формирования спиральных образований в миксоидном веществе (рисунок 4). Данные образования служили зачатком для формирования хондроцитов с последующей их дифференцировкой в гиалиновый матрикс (рисунок 5). После чего происходило энхон-

дральное окостенение с формированием костных трабекул, внутри которых зарождались клетки красного костного мозга (рисунок 6).

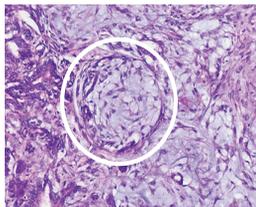


Рис. 4. Смешанная опухоль с хрящевой метаплазией (G1). Звездчатые миоэпителиальные клетки в миксоидном веществе (○). Собака, беспородная, 4 года. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$

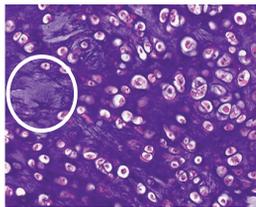


Рис. 5. Смешанная опухоль с хрящевой метаплазией (G1). Изогенные формы хондроцитов. Рост коллагеновых волокон (○). Собака, порода бивер йоркширский терьер, 9 лет. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 200$

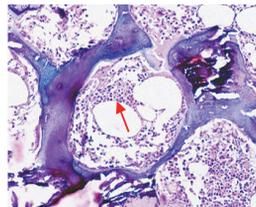


Рис. 6. Смешанная опухоль с костной метаплазией (G1). Клетки миелоидного ряда (↑). Собака, порода американский стаффордширский терьер, 10 лет. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$

Плоскоклеточная карцинома обуславливалась метаплазией эпителия в плоскоклеточный вид. Клетки имели широкую оксифильную цитоплазму с включениями гранул кератогиалина. В центре данных структур формировались «раковые жемчужины».

2.2.3. Экспрессия нуклеолярных белков и промежуточных филаментов мезенхимального и эпителиального типов в клетках опухолей молочных желез у кошек

Исследование маркера у кошек NCL областей ядрышковых организаторов показало, что иммунопозитивные участки занимали $\geq 50\%$ от общей площади опухолевой ткани, паттерн присутствовал тотально в эпителиальном компоненте. В тубулярной, папиллярной, медуллярной, плоскоклеточной карциномах и инвазивном раке отмечали три типа расположения маркера: ядрышковый, ядерный и цитоплазматический.

Иммунопозитивные участки с экспрессией биомаркера NPM1 занимали $\geq 50\%$ от общей площади опухолевой ткани, паттерн локализовался в ядрышковом аппарате, наблюдались структуры с выраженным анизо-нуклеозом. В тубулярной, папиллярной, медуллярной, плоскоклеточной карциномах и инвазивном раке присутствовали макро- и микроядрышки (рисунок 7).

Иммунопозитивные участки с экспрессией паттерна FBL занимали $\geq 50\%$ от общей площади опухолевой ткани, маркер отмечался в ядерной зоне эпителиальных клеток, однако в папиллярной, медуллярной и плоскоклеточной карциномах визуализировался цитоплазматический вид маркера. В инвазивном раке отмечалось структурирование ядрышек в виде нуклеолярных мостиков.

Нами было выявлено, что в тубулярной, папиллярной, медуллярной карциномах и инвазивном раке экспрессия маркера VIM отмечалась в цитоплазме видоизмененных эпителиальных и миоэпителиальных клеток.

Наши исследования показали, что в папиллярном и инвазивном раке регистрировалась экспрессия маркера α -SMA в фибробластоподобных клетках, формировавших закручивающиеся структуры, внутри которых находились эпителиоциты (рисунок 8).

При изучении экспрессии маркера HMWCK было установлено, что в основном паттерн локализовался в цитоплазме эпителиальных клеток и имел слабую экспрессию, что свидетельствовало об изменении структуры цитоскелета эпителиоцитов. В папиллярной карциноме отмечалась сильная экспрессия в фибробластоподобных клетках (рисунок 9).

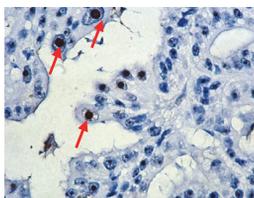


Рис. 7. NPM1⁺ маркер в эпителиальных клетках. Анизонуклеоз (∇). Папиллярная карцинома (G3). Кошка, метис, 11 лет. ИГХ реакция на NPM1. Продукт реакции коричневого цвета. Ув. $\times 600$

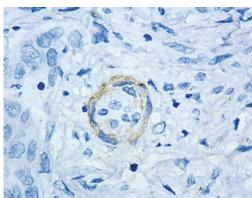


Рис. 8. α -SMA⁺ маркер в фибробластах. Папиллярная карцинома (G3). Кошка, порода британская короткошерстная, 14 лет. ИГХ реакция на α -SMA. Продукт реакции коричневого цвета. Ув. $\times 600$

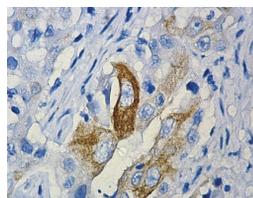


Рис. 9. HMWCK⁺ маркер в фибробластоподобных клетках. Папиллярная карцинома (G3). Кошка, метис, 11 лет. ИГХ реакция на HMWCK. Продукт реакции коричневого цвета. Ув. $\times 600$

Таким образом, изменения экспрессии биомаркеров цитоскелета клеток характеризовались модификацией молекулярного типа данных структур в более подвижный и сократительный фенотип с миграционными свойствами, характерными для клеток в процессе эпителиально-мезенхимального перехода.

2.2.4. Экспрессия нуклеолярных белков и промежуточных филаментов мезенхимального и эпителиального типов в клетках опухолей молочных желез у собак

Исследование локализации у собак маркера NCL областей ядрышковых организаторов показало, что иммунореактивный материал занимал $\geq 50\%$ от общей площади опухолевой ткани, присутствовал тотально в эпителиальном компоненте. В тубулярной, папиллярной карциномах и инвазивном раке наблюдалось три типа локализации паттерна: ядрышковый, ядерный и цитоплазматический (рисунок 10).

Иммунопозитивные участки с экспрессией биомаркера NPM1 занимали $\geq 40\%$ от общей площади опухолевой ткани, паттерн локализовался в ядрышковом аппарате опухолевых клеток. В плоскоклеточной карциноме и в инвазив-

ном раке наблюдалось интенсивное окрашивание белка в виде макроядрышка. В карциномах смешанного типа и смешанных опухолях отмечалась высокая экспрессия маркера в миоэпителиальных и фибробластических клетках.

При исследовании экспрессии маркера FBL было установлено, что иммунопозитивные участки занимали $\geq 40\%$ от общей площади опухолевой ткани. В тубулярных аденокарциномах и папиллярных карциномах паттерн локализовался в ядерном типе миоэпителиальных клеток. Экспрессия белка в карциномах смешанного типа и в смешанных опухолях имела цитоплазматическую локализацию в эпителиальных, миоэпителиальных и фибробластических клетках.

Наше исследование показало, что в инвазивном раке цитоплазматическая локализация белка VIM наблюдалась в атипичных фибробластах, расположенных рядом с эпителиальным компонентом (рисунок 11). В карциноме смешанного типа маркер отмечался в супрабазальных миоэпителиоцитах, в смешанных опухолях визуализировался в интерстициальных веретенообразных и звездчатых миоэпителиоцитах (рисунок 12).

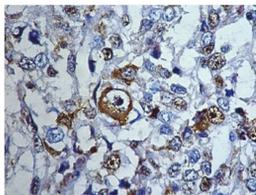


Рис. 10. NCL⁺ маркер в эпителиоцитах тубулярной карциномы (G3). Собака, порода йоркширский терьер, 9 лет. ИГХ реакция на NCL. Продукт реакции коричневого цвета. Ув. $\times 600$

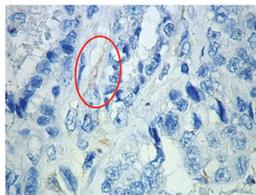


Рис. 11. VIM⁺ маркер в фибробластах (○). Инвазивный рак неспецифического типа (G3). Собака, порода немецкая овчарка, 13 лет. ИГХ реакция на VIM. Продукт реакции коричневого цвета. Ув. $\times 600$

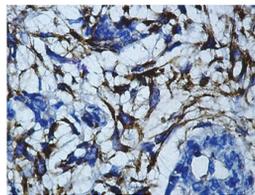


Рис. 12. VIM⁺ маркер в звездчатых миоэпителиальных клетках. Смешанная опухоль с костной метаплазией (G1). Собака, порода лабрадор ретривер, 12 лет. ИГХ реакция на VIM. Продукт реакции коричневого цвета. Ув. $\times 600$

Иммуногистохимическое исследование показало, что его экспрессия α -SMA наблюдалась в большинстве типов опухолей в клетках фибробластического дифферона, миоэпителиоцитах и в эндотелиоцитах кровеносных сосудов.

Иммуногистохимическое исследование показало, что экспрессия HMWCK отмечалась в тубулярной карциноме в видоизмененных фибробластоподобных клетках, а в карциномах смешанного типа и смешанных опухолях регистрировалось ослабление экспрессии биомаркера в эпителиальных клетках, которые были расположены рядом с хрящевой либо костной тканью.

Таким образом, изменения экспрессии биомаркеров цитоскелета клеток характеризовались модификацией молекулярного типа данных структур в более подвижный и сократительный фенотип с миграционными свойствами, характерными для клеток в процессе эпителиально-мезенхимального

перехода. В смешанных опухолях гиперэкспрессия vimentin в миоэпителиальных клетках приводила к их трансформации в мезенхимальный фенотип с последующим образованием хрящевого матрикса.

2.2.5. Рецептор фактора роста фибробластов (FGFR1) и основная его биологическая роль в управлении эпителиального компонента молочных желез у плотоядных

FISH с меткой FGFR1 на образцах опухолей молочных желез у кошек

При исследовании статуса гена FGFR1 на цитологическом материале опухолей у кошек под фильтрами Texas Red (красного) и FITC (зеленого) было обнаружено, что в тубулярных и папиллярных карциномах, инвазивном и медуллярном раке отмечались флюоресцирующие метки в клетках фибробластического дифферона, что свидетельствовало об активизации рецептора к гену FGF. В аденокарциномах и плоскоклеточном раке флюоресцирующие сигналы не регистрировались (рисунок 13).

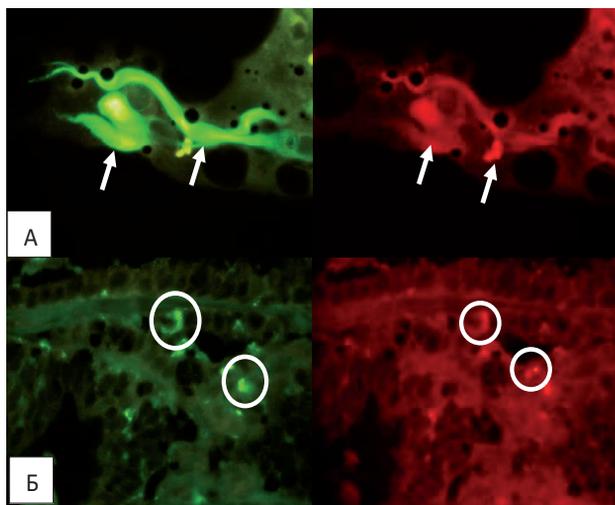


Рис. 13 – Флюоресцентная *in situ* гибридизация FGFR1. А – цитологический материал, экспрессия сигнала в клетках фибробластического дифферона (↑), Папиллярная карцинома. Кошка, беспородная, 12 лет. Б – гистологический материал, экспрессия сигнала в клетках фибробластического дифферона (○). Тубулярная карцинома. Кошка, порода бенгальская, 12 лет. FISH, фильтры FITC/Texas Red. Ув. ×1500

Исследование статуса рецептора FGFR1 на гистологическом материале опухолей показало, что в тубулярных и папиллярных карциномах отмечались флюоресцирующие метки в фибробластических клетках, экспрессия сигналов имела интенсивное свечение и находилась в цито-

плазме клеток. Среднее количество копий гена на клетку регистрируется ≥ 6 , что свидетельствовало о выраженной амплификации гена FGF. В инвазивном и медуллярном раке паттерн экспрессии локализовался в цитоплазме мезенхимальных клеток, сигнал имел интенсивное свечение, среднее количество копий гена на клетку регистрировалось ≥ 6 , что свидетельствовало о положительной амплификации гена FGF.

При исследовании паттерна экспрессии рецептора FGFR1 в клетках аденокарцином и плоскоклеточного рака было выявлено, что флюоресцирующие сигналы слабо визуализировались в клетках мезенхимального типа, среднее количество копий гена на клетку регистрировалось ≥ 4 . Поэтому степень амплификации гена являлась неопределенной.

FISH с меткой FGFR1 на образцах опухолей молочных желез у собак

При исследовании статуса гена FGFR1 на цитологическом материале опухолей у собак было обнаружено, что в тубулярных, папиллярных карциномах, инвазивном раке и карциноме смешанного типа отмечались флюоресцирующие метки в фибробластических клетках, что указывало на активизацию рецептора к гену FGF. В аденокарциномах, плоскоклеточном раке и смешанных опухолях флюоресцирующие сигналы в мезенхимальных клетках не визуализировались (рисунок 14).

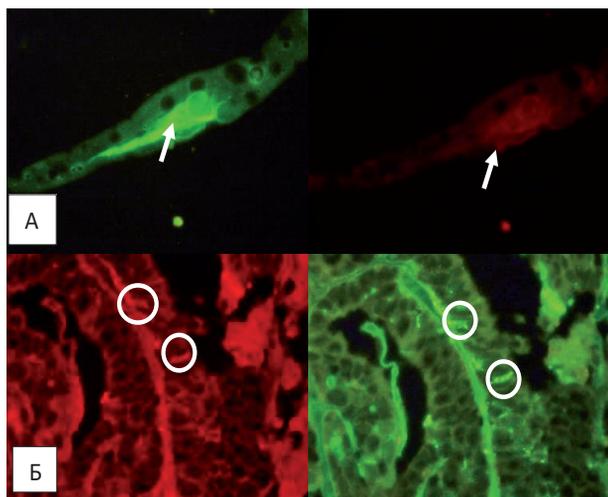


Рис. 14. Флюоресцентная *in situ* гибридизация FGFR1. А – цитологический материал, экспрессия сигнала в клетках фибробластического дифферона (\uparrow). Тубулярная карцинома. Собака, порода йоркширский терьер, 9 лет. Б – гистологический материал, экспрессия сигнала в клетках фибробластического дифферона (\circ). Папиллярная карцинома. Собака, беспородная, 10 лет. FISH, фильтры FITC/Texas Red. Ув. $\times 1500$

Исследование статуса гена FGFR1 на гистологическом материале опухолей показало, что в тубулярных и папиллярных карциномах, инвазивном раке и карциноме смешанного типа отмечались флюоресцирующие метки в клетках фибробластического дифферона, экспрессия сигналов имела интенсивное свечение и находилась в цитоплазме клеток. Среднее количество копий гена на клетку регистрировалось ≥ 6 , что указывало на выраженную амплификацию гена FGF.

В исследовании паттерна экспрессии рецептора FGFR1 в клетках мезенхимального типа аденокарцином, плоскоклеточного рака и смешанных опухолях слабо визуализировались флюоресцирующие метки. Среднее количество копий гена на клетку регистрировалось < 4 , что свидетельствовало о неопределенной амплификации гена FGF.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных комплексных исследований изучены морфологические особенности клеточного ландшафта злокачественных опухолей у домашних плотоядных.

Исследованиями уточнены данные о пролиферативной активности и степени злокачественности клеточных элементов в опухолях молочных желез у собак и кошек, обусловленных биосинтетической экспрессией нуклеолярных белков.

В процессе выполнения диссертационной работы впервые изучена взаимосвязь эпителиальных и мезенхимальных клеточных элементов, которые изменяют свой цитоскелет, приобретают фибробластоподобный тип в процессах эпителиально-мезенхимального перехода и усиливают метастатический потенциал опухолей.

В результате гистологического и иммуногистохимического анализа было установлено, что в опухолях молочных желез у собак происходит прозопластическая метаплазия миоэпителиальных клеток в сторону структурной организации в хрящевую или костную ткани.

В результате молекулярно-генетического исследования было установлено, что активные фибробласты, находящиеся рядом с эпителиальным компонентом, усиливают онкогенную передачу сигналов через эктопическую экспрессию сигнатурного паттерна рецептора фактора роста фибробластов (FGFR1), это обуславливает изменения в генетической структурной организации эпителиального компонента в процессе эпителиально-мезенхимального перехода.

ВЫВОДЫ

1. У кошек новообразования молочных желез злокачественного типа регистрируются в возрастном периоде от 9 до 13 лет, у собак с 7 до 11 лет, что является признаком возрастной периодизации от зрелости животного к геронтологическому возрасту.

2. Наиболее подвержены развитию опухолей такие породы кошек, как британская короткошёрстная – 12%, персидская – 10%, сиамская – 7%, шотландская фолд – 5%, беспородные животные – 29% и метисы – 20%. У собак: йоркширский терьер – 18%, такса – 7%, немецкая овчарка – 7%, американский стаффордширский терьер – 7%, беспородные – 13%. Распространенность пород в ареале обитания обусловлена популяризацией видов животных.

3. Согласно патогистологическим исследованиям опухолей молочных желез у кошек наибольший процент занимают: протоковая карцинома *in situ* – 10%, тубулярная аденокарцинома – 9%, тубулярная карцинома – 16%, инвазивный рак – 13%, недифференцированный рак – 7%. По степени злокачественности ОМЖ установили следующие типы: высокодифференцированные (G1) – 14%, умереннодифференцированные (G2) – 24%, низкодифференцированные (G3) – 62%.

4. При патогистологическом исследовании опухолей молочных желез у собак установили, что наибольший процент занимают: протоковая карцинома *in situ* – 15%, папиллярная карцинома – 14%, смешанная опухоль с хрящевой дифференцировкой – 22%. По степени злокачественности ОМЖ были определены следующие типы: высокодифференцированные (G1) – 47%, умереннодифференцированные (G2) – 26%, низкодифференцированные (G3) – 27%.

5. У плотоядных гиперэкспрессия биомаркеров областей ядрышковых организаторов стимулирует синтез новых белковых компонентов, которые приводят к ремоделированию и нестабильности генома, что влияет на высокий уровень метастатического потенциала опухолевых клеток.

6. Экспрессия промежуточных филаментов эпителиального и мезенхимального происхождения в клетках опухолевой ткани молочных желез у собак и кошек обусловлена гетерогенными клетками, которые стимулируют развитие эпителиально-мезенхимальной трансформации.

7. У кошек злокачественные опухоли подвергаются процессам эпителиально-мезенхимального перехода, что приводит к высокому метастатическому потенциалу за счет инвазии опухолевых клеток групповым методом. У собак опухолевый канцерогенез эпителиально-мезенхимального перехода направлен на трансформацию миоэпителиальных клеток в мезенхимальный тип, что обуславливает низкий метастатический потенциал.

8. Паракринная передача сигнала от клеток фибробластического дифферона на эпителиальный компонент связана с эктопической экспрессией и амплификацией гена *FGFR1*, что приводит к изменению сигнатурного паттерна клеток и изменению цитоскелета эпителия в фибропластический тип при эпителиально-мезенхимальном переходе.

Практические предложения

1. Представленные новые данные о взаимодействии эпителиального и стромального компонента, а также развитию микроокружения опухолей молочных желез у разных видов животных рекомендуется использовать для разработки новых типов классификаций в ветеринарной онкологии.

2. Результаты исследований экспрессии маркеров областей ядрышковых организаторов (NCL, NPM1, FBL), а также белков промежуточных филаментов мезенхимального (vimentin, α -SMA) и эпителиального (HMWCK) компонентов в опухолевых клетках позволят разработать новые методы диагностики и лечения с использованием клеточных технологий.

3. Результаты исследований по амплификации гена FGFR1 в клетках фибробластического дифферона в опухолевых клетках молочных желез у млекопитающих позволят определить точные молекулярно-генетические механизмы канцерогенеза и создать более эффективные методы таргетной терапии, направленные на точечные мишени.

4. Результаты исследований могут быть использованы при проведении научных исследований, в учебном процессе вузов и колледжей биологического профиля, а также при составлении монографий, учебных и справочных пособий возрастной, видовой, морфофункциональной и молекулярной морфологии различных видов животных.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Проведенные исследования позволили получить новые данные по гистологическим типам и морфологическим особенностям клеточного ландшафта в злокачественных опухолях молочных желез у собак и кошек, процессу эпителиально-мезенхимального перехода, паракринной регуляции мезенхимальных клеток на эпителиальный компонент посредством эктопической экспрессии рецептора фактора роста фибробластов FGFR1. Дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение канцерогенеза опухолей молочных желез для постановки верного диагноза в области онкологии, а также для разработки тактики таргетного лечения данной патологии.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных
ВАК Министерства науки и высшего образования РФ*

1. Митенко, В. В. Принцип организации фибробластов при развитии эпителиально-мезенхимальной трансформации рака молочных желез у собак / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Иппология и ветеринария. – 2022. – № 4 (46). – С. 205–217.
2. Митенко, В. В. Экспрессия ядрышковых организаторов в опухолевых клетках молочных желез у кошек / **В. В. Митенко**, Д. Б. Галустян // Иппология и ветеринария. – 2023. – № 1 (47). – С. 70–76.

3. Взаимосвязь метрических показателей с гистологическими типами опухолей молочных желез у животных-компаньонов / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова, Д. Б. Галустян // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2023. – Т. 100. – № 2. – С. 210–216.

Патенты

4. Патент № 2755392 Российская Федерация, МПК G01N 33/58, C12Q 1/6841. Способ флюоресцентной гибридизации in situ при применении ДНК-зонда FGFR1 у разных видов млекопитающих на цитологических препаратах : № 2021105108 : заявл. 25.02.2021 : опубл. 15.09.2021 / Митенко В. В., Дилекова О. В. ; заявитель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 26. – 10 с.
5. Патент № 2777238 Российская Федерация, МПК МПК G01N 1/28, G01N 33/53, C12Q 1/6813, C12Q 1/6841. Способ флюоресцентной гибридизации in situ при применении ДНК-зонда с меткой FGFR1 у разных видов млекопитающих на гистологических препаратах : № 2021137753 : заявл. 20.12.2021 : опубл. 01.08.2022 / Митенко В. В., Дилекова О. В. ; заявитель ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». – Бюл. № 22. – 10 с.

Публикации, индексируемые в Scopus

6. Митенко, В. В. Экспрессия онкомаркерного белка V23 в опухолевых клетках молочной железы у плотоядных / В. В. Митенко, О. В. Дилекова // Гены и Клетки. – 2022. – Т. 17. – № 3. – С. 73–74.

Публикации в материалах конференций и других научно-практических изданиях

7. Митенко, В. В. Морфологическая характеристика рака молочной железы у кошек / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Инновационные технологии в сельском хозяйстве, ветеринарии и пищевой промышленности : материалы научно-практической конференции. – Ставрополь : АГРУС Ставропольского гос. аграрного ун-та, 2019. – С. 421–426.
8. Митенко, В. В. Мониторинг опухолей молочных желез у плотоядных в условиях г. Ставрополя и результаты химиотерапевтического метода лечения / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Приоритетные и инновационные технологии в животноводстве – основа модернизации агропромышленного комплекса России : материалы научно-практической конференции. – Ставрополь : АГРУС Ставропольского гос. аграрного ун-та, 2019. – С. 352–356.
9. Митенко, В. В. Патогистология опухолевых новообразований молочной железы у собак / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Приоритетные и инновационные технологии в животноводстве – основа модернизации агропромышленного комплекса России : материалы научно-практической конференции. – Ставрополь : АГРУС Ставропольского гос. аграрного ун-та, 2019. – С. 348–351.
10. Особенности патогистологического строения злокачественных новообразований молочной железы кошек / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова, К. С. Павлова // Достижения молодых учёных в АПК : материалы научно-практической конференции. – Махачкала : ИП «Магомедалиева С. А.», 2019. – С. 263–270.
11. Митенко, В. В. Ретроспективный анализ распространения новообразова-

- ний молочной железы домашних плотоядных в условиях городской урбанизированной территории / **В. В. Митенко** // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки : материалы научно-практической конференции. – Владикавказ : Веста, 2019. – С. 214–216.
12. Митенко, В. В. Статистико-клинические данные новообразований молочной железы у плотоядных / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Морфология. – 2020. – Т. 157. – № 2–3. – С. 69.
 13. Митенко, В. В. Клинические показатели при новообразованиях молочной железы у кошек / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : материалы научно-практической конференции. – 2020. – С. 71–76.
 14. Митенко, В. В. Патоморфология эпителиальных опухолей молочных желез кошек / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Актуальные вопросы патологии, морфологии и терапии животных : материалы научно-практической конференции. – Кокни : Брянский гос. аграрный ун-т, 2020. – С. 78–83.
 15. Митенко, В. В. Предикторы паранеопластического синдрома опухолей молочных желез у плотоядных / **В. В. Митенко** // Материалы научно-практической конференции : сборник научных работ победителей и призеров Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России. – Москва : Российский научно-исследовательский институт информации и технико-экономических исследований по инженерно-техническому обеспечению агропромышленного комплекса (Правдинский), 2020. – С. 55–58.
 16. Митенко, В. В. Патоморфологическая оценка новообразований молочных желез у собак / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Аграрная наука – Северо-Кавказскому федеральному округу : материалы научно-практической конференции. – Уфа : Башкирский гос. аграрный ун-т, 2020. – С. 293–296.
 17. Митенко, В. В. Исследование статуса амплификации FGFR1 при раке молочной железы у кошек и собак с помощью флюоресцентной *in situ* гибридизации на цитологических препаратах / **В. В. Митенко** // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки : материалы научно-практической конференции. – Владикавказ : Веста, 2021. – С. 173–176.
 18. Митенко, В. В. Экспрессия онкомаркерных белков в опухолевых клетках молочных желез у кошек / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Ветеринарная патология. – 2022. – Т. 81. – № 3. – С. 45–50.
 19. Митенко, В. В. Протоковая карцинома *in situ* у кошек / **В. В. Митенко**, О. В. Дилекова // Морфология в XXI веке: теория, методология, практика : материалы научно-практической конференции. – Москва : ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина», 2021. – С. 137–140.

Подписано в печать 28.04.2023

Формат 60x84 ¹/₁₆. Гарнитура «Гаймс». Бумага офсетная.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,0. Заказ № 170. Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии издательско-полиграфического комплекса СтГАУ «АГРУС», г. Ставрополь, ул. Пушкина, 15.

