

На правах рукописи

Вакуленко Майя Юрьевна

**ПРЕДИКТОРЫ РАКА
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КОШЕК**

06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных,
патология, онкология и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Южный федеральный университет»

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Шкурат Татьяна Павловна

доктор биологических наук, профессор
Ермаков Алексей Михайлович

Официальные оппоненты: *Салаутин Владимир Васильевич*,
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО "Саратовский государственный
аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,
профессор кафедры «Морфология, патология
животных и биология»

Горошинская Ирина Александровна,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБУ "Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии", старший
научный сотрудник лаборатории изучения
патогенеза злокачественных опухолей

Ведущая организация: ФГАОУ ВО "Российский университет
дружбы народов"

Защита состоится «17» декабря 2021 г. в 13 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д220.062.02 на базе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: 355035, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12, ауд. № 1, тел. 8 (8652) 35-22-82, 35-22-83. E-mail ydiash@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» и на сайте: <http://www.stgau.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г. и размещен на сайтах: ВАК Министерства науки и высшего образования РФ <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru> «__» _____ 2021 г.; ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ» <https://www.stgau.ru> «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Дьяченко Юлия Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. В Ростовской области проживают около полутора миллиона домашних кошек. 0,44 % популяции имеют новообразования молочной железы, из них злокачественные новообразования составляют 87 % (Вакуленко М.Ю. и др., 2019; Vakulenko M. Y. et al., 2018). Успех лечения данного заболевания напрямую зависит от ранней диагностики. В гуманной медицине для этой цели широко используют онкомаркеры. К онкомаркерам относят вещества различной природы, но все они являются предикторами перерождения здоровой ткани. Домашние кошки живут вместе с человеком и подвергаются схожим факторам риска при развитии рака. Возникновение и развитие раковых опухолей молочной железы у кошек во многом схоже с канцерогенезом у людей. Наблюдаются похожая гистопатология и различные прогностические аспекты, такие как: местоположение, размер, метастазирование в лимфатические узлы, а также побочен и ответ организма на противораковую терапию (Radmehr S., 2013; Garden O.A. et al., 2018). Любое заболевание ведёт к определённым изменениям на молекулярном уровне в клетках организма. Изучение молекул, которые подвергаются модификации в процессе канцерогенеза, поможет целенаправленно подбирать лекарственные препараты в будущем.

Изучение предикторов рака у домашних животных важно не только для улучшения понимания природы рака, но и даёт возможность использовать рак домашних животных как модель для изучения рака человека (Farshid K., 2013; Garden O.A. et al., 2018). В гуманной медицине активно ведётся поиск новых предикторов рака молочной железы (РМЖ), в частности проводят исследования активности фермента аденозиндезаминазы (*АДА*) в крови женщин с аденокарциномой молочной железы (Барсукова М. А., 2017; Вакуленко М.Ю. и др., 2017). *АДА* является ферментом пуринового метаболизма. Активность *АДА* изменяется во время клеточного деления и иммунного ответа. Активность аденозиндезаминазы у кошек, больных раком молочной железы, не изучена. Кроме этого, было замечено резкое повышение уровня полиаминов в биологических жидкостях при различных онкологических заболеваниях у человека (Сунграпова К.Ю., 2017). Полиамины (путресцин, спермидин и спермин) имеют важное значение для роста эукариотических клеток, так как эти молекулы участвуют во многих ключевых процессах, в том числе генной транскрипции, регуляции функции белка и стабильности клеточной мембраны (Igarashi K. et al., 2018). Высокий уровень полиаминов способствует пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток (Bachrach U., 2004). Данных об изучении обмена полиаминов у кошек, больных РМЖ, нет. Любой процесс перерождения ткани, а тем более малигнизация, связан с нарушением работы определённых генов. Гены, работа которых подвергается изменению при малигнизации ткани, называются онкогенами, но процесс канцерогенеза не всегда связан с мутациями в онкогенах. Важную роль в возникновении и развитии опухоли играет изменение активности генов без возникновения мутации.

Существует множество работ, подтверждающих изменение экспрессии различных генов в раковых опухолях человека, но работ, проведённых на кошках, немного. Опухоли молочной железы у домашних кошек являются одной из основных нозологических единиц в структуре онкологических заболеваний (Якунина М.Н., 2011; Трещалина Е.М. и др., 2015), но в ветеринарных клиниках отмечается отсутствие стандартизации осмотра, диагностики и лечения РМЖ у кошек. Это сильно затрудняет реальную оценку проблемы РМЖ. На 2019 г. около 30 % злокачественных новообразований, диагностированных цитологическим методом, остались

не выявленными (Вакуленко М.Ю. и др., 2019; Vakulenko M.Y. et al., 2019). Данных о встречаемости этого заболевания внутри популяции домашних кошек в Ростовской области нет.

Цель исследования. Выявить предикторы инвазивной неспецифической карциномы молочной железы у кошек.

Задачи исследования:

1. Выявить частоту встречаемости новообразований молочной железы в популяции домашних кошек Ростовской области и определить клиноморфологические формы новообразований.

2. Определить экспрессию гена *АДА* в тканях раковых опухолей молочной железы у кошек.

3. Оценить клиническую значимость и возможность использования в качестве предикторов рака молочной железы активность аденозиндезаминазы и уровень полиаминов в крови кошек.

Предмет исследования: ткани опухолей молочной железы; активность *АДА* в плазме животных; экспрессия гена *АДА* в тканях опухоли молочной железы; полиамины в крови животных.

Объект исследования: домашние кошки (*Felis catus*) с новообразованиями молочной железы.

Научная гипотеза: возможно изменение активности аденозиндезаминазы и содержания полиаминов в периферической крови кошек, больных раком молочной железы.

Научная новизна. Впервые получены данные о встречаемости и распределении клино-морфологических форм рака молочной железы и проведена сравнительная оценка диагностической ценности гистологических и цитологических анализов среди кошек Ростовской области. Впервые были исследованы показатели активности фермента аденозиндезаминазы и содержание полиаминов в крови кошек с новообразованиями молочной железы. Впервые была доказана возможность применения анализа содержания в крови кошек таких полиаминов, как спермин, спермидин и путресцин в качестве предикторов, которые позволяют оценить тяжесть течения инвазивной неспецифической карциномы молочной железы. Впервые была показана активность аденозиндезаминазы в плазме крови и была проанализирована экспрессия гена *АДА* в тканях опухоли молочной железы кошек. Также нами были впервые разработаны ДНК-праймеры на ген *АДА*, кодирующий фермент аденозиндезаминазу, и получены рекомендации оценки экспрессии данного гена в тканях опухоли молочной железы у кошек.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы вносят вклад в понимание основ канцерогенеза и в поиск молекулярно-генетических подходов диагностики рака молочной железы у кошек. Представлены данные о частоте встречаемости новообразований молочной железы. Предложены методики определения предикторов, которые могут быть использованы как для диагностики и мониторинга лечения инвазивной неспецифической карциномы молочной железы у кошек, так и в дальнейших научно-исследовательских работах. Полученные в работе результаты могут служить научным обоснованием разработки новых подходов к диагностике и лечению рака молочной железы у кошек.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Уровень экспрессии гена *АДА* в тканях злокачественных и доброкачественных опухолей выше, чем в тканях здоровой молочной железы. Результаты

проведённого исследования подтверждают участие гена *АДА* в патогенезе опухолей молочной железы.

2. Уровень активности аденозиндезаминазы в крови животных с раком молочной железы не отличается от уровня активности аденозиндезаминазы в крови здоровых животных, следовательно активность аденозиндезаминазы не является предиктором рака молочной железы у кошек.

3. В крови кошек, больных раком молочной железы, достоверно увеличивается уровень полиаминов. Измерение уровня спермина, спермидина и путресцина может быть использовано в качестве предиктора рака молочной железы.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность исследования подтверждена результатами статистической обработки и объёмом выборки обследованных животных, результатами гистологических, биохимических и генетических исследований. Все исследования были выполнены на сертифицированном оборудовании, результаты обработаны современными статистическими методами. Основные положения диссертационной работы докладывались на конференциях разного уровня: на Всероссийской конференции «50 лет ВОГиС. Успехи и перспективы» (Москва, 2016); на Внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Механизмы тератогенного воздействия окружающей среды» (Ростовна-Дону, 2016); на внутривузовской межкафедральной научнопрактической конференции студентов и молодых ученых «Молекулярная биология, химия и медицина» (Ростов-на-Дону, 2017); на XV межрегиональной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфологии» (Ростов-наДону, 2018); на 72-й Итоговой научной конференции студентов и аспирантов Ростовского государственного медицинского университета (Ростов-на-Дону, 2018); на II внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Молекулярная биология, химия и медицина» (Ростов-на-Дону, 2018); на V межвузовской научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Молодёжь здоровью молодёжи» (Ростов-на-Дону, 2018), на Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы патологии» (Ростов-на-Дону, 2018); на XVI межрегиональной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфологии» (Ростов-на-Дону, 2019); на Международной научно-практической конференции «Теория и практика клинической биохимии и лабораторной диагностики», посвящённой 100-летию кафедры биохимии и физиологии СПбГАВМ (Санкт-Петербург, 2019); на 73-й итоговой научной конференции студентов и аспирантов Ростовского государственного медицинского университета (Ростов-на-Дону, 2019); на III внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Молекулярная биология, химия и медицина» (Ростов-на-Дону, 2019); на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектива – 2019» (Нальчик, 2019); на VIII научно-практической конференции с международным участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 2019); на IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, 2019).

Личный вклад. Диссертационная работа является результатом многолетних исследований (2015–2019 гг.), выполненных лично автором. Автором диссертации были поставлены цели и задачи, согласно которым проводились исследования. Автором проводился отбор и хранение образцов, приготовление гистологических образцов опухолей, измерение активности ферментов и выделение полиаминов, выделение РНК из опухолей, ПЦР анализ. Представленные в диссертационной работе

экспериментальные исследования, теоретический и практический анализ полученных результатов проведены автором самостоятельно. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 95 %.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликованы 19 научных работ, в которых изложены основные положения выполненной работы, в том числе 4 опубликованы в периодических изданиях, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени («Ветеринарная патология», «Ветеринария Кубани», «Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии»). Две работы опубликованы в журнале, входящем в Международную базу SCOPUS. Остальные работы опубликованы в сборниках по материалам конференций для аспирантов и молодых ученых.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, приложения. Иллюстративный материал включает 21 таблицу и 60 рисунков. Список использованной литературы включает 103 источников, из которых 38 отечественных и 65 зарубежных.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе собраны данные научной литературы о современных представлениях о раке молочной железы у кошек. Описаны перспективы использования генетических онкомаркеров и молекулярной диагностики в ветеринарной онкологии, референсные гены, активность ферментов обмена аденозина в крови онкологических больных и метаболизм полиаминов при раке молочной железы.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал и методы исследований

Биологическим материалом для изучения предикторов РМЖ у кошек послужили кровь и фрагменты тканей РМЖ. В качестве контроля использовали кровь и фрагменты тканей молочной железы клинически здоровых животных, владельцы которых обратились в клинику по поводу стерилизации, и были подобраны по принципу пар аналогов. Всего было исследовано 30 кошек с новообразованиями молочной железы и 10 здоровых животных. Гистологические исследования проводились на базе учебной лаборатории кафедры «Биология и общая патология» ДГТУ (г. Ростов-на-Дону). Биохимические исследования осуществлялись на базе биохимической лаборатории кафедры биохимии в РостГМУ (г. Ростов-на-Дону). Генетические исследования проводились на базе лаборатории Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ (г. Ростов-на-Дону).

Животные подбирались для исследования среди пациентов, поступивших в ветеринарные клиники по поводу спонтанно возникших опухолей в области молочных пакетов.

Анализ частоты встречаемости новообразований молочной железы в популяции домашних кошек Ростовской области

Для установления частоты встречаемости новообразований молочной железы у кошек в Ростовской области были проанализированы 73247 историй болезни ко-

шек, предоставленных ветеринарными клиниками г. Ростова-на-Дону и области. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Clopper-Pearson (Расчет точного доверительного интервала в MS Excel).

Анализ клинико-морфологических форм новообразований молочной железы кошек Ростовской области

Диагнозы, установленные с помощью цитологических методов исследования, были заимствованы из историй болезней. Для гистологического анализа операционный материал, полученный от 30 животных, поступивших в ветеринарные клиники по поводу спонтанно возникших опухолей в области молочных пакетов, фотографировали, производили его морфометрию, описание и фиксацию в 10% забуференном формалине. Проводку осуществляли на аппарате Tero scientific в автоматическом режиме. После фиксации производили вырезку и изготовление гистологических препаратов (парафиновых блоков и стекол) по стандартной методике (Семченко В. В. и др., 2006).

Диагноз инвазивная неспецифическая карцинома молочной железы и гиперпластические изменения ставили согласно номенклатуре и критериям гистологической классификации опухолей молочной железы ВОЗ 2012 г. (Франк Г.А., 2013; Marx A. et al., 2015; Overly-Adamson B., 2016), с указанием степени дифференцировки.

Выделение РНК, проведение реакции обратной транскрипции и анализ уровня транскрипции генов

Отбор тканевого материала для анализа РНК проводился под морфологическим контролем объёма опухолевого материала. Выделение РНК проводили по стандартной методике ExtractRNA (Евроген, Россия).

Уровни мРНК генов *B2M*, *GAPDH* и *ADA* определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени в присутствии красителя SYBRGreen I. Работу проводили на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США). Для подбора праймеров и зондов к мРНК генов использовали программу Primer 3 (<http://hebi.praimerblast/primer3/>). Синтез праймеров осуществлен фирмой «Евроген» (Россия). Последовательность использованных праймеров приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Название	Последовательность 5'-3'
B2M forward	TTTGTGGTCTTGGTCCTGCTCG
B2M reverse	TTCTCTGCTGGGTGACGGGA
GAPDH forward	AGTATGATTCCACCCACGGCA
GAPDH reverse	GATCTCGCTCCTGGAAGATGGT
ADA forward	TTCGACAAGCCCAAAGTGGAG
ADA reverse	AACGCACCTCCACATACACC

Образцы кДНК нормировали по контрольному гену B2M, являющемуся «геном домашнего хозяйства», так как B2M экспрессируется практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне на всех стадиях жизненного цикла организма. Кроме того, в предварительных экспериментах установлено, что разброс уровней транскрипции для гена «домашнего хозяйства» B2M наименьший по сравнению с другим контрольным геном – GAPDH.

Статистический анализ данных по уровню экспрессии генов проводили методом 2-ΔΔCt. Данный метод показывает кратность изменений уровня экспрессии гена в сравниваемых образцах. ΔΔCt и ΔCt рассчитывали согласно Livak и Schmittgen (Livak K.J. et al, 2001). Все значения экспрессии генов (ΔCt) в группах образцов сравнивали между собой как две выборки. Для подтверждения статистически зна-

чимых отличий между выборками образцов применяли критерий Манна–Уитни. Для определения взаимосвязи изучаемых показателей при их нормальном распределении в совокупности использовали линейную корреляцию Пирсона (r).

Определение активности аденозиндезаминазы в плазме крови кошек

Активность фермента определяли по методу Kalear (Березин И.В., 1976) на спектрофотометре NanoProtometr Implen.

Измерение содержания полиаминов в крови животных с новообразованиями молочной железы

Содержание полиаминов определяли в эритроцитах венозной крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Lichrospher RP18.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Statistica 6.0». Для оценки достоверности обнаруженных изменений применяли следующие статистические критерии: тест Уилкоксона (сравнение параметров, измеренных у контрольной группы и у животных с новообразованиями молочной железы) и тест Стьюдента (сопоставление двух независимых групп данных).

2.2. Результаты исследования и их обсуждение

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

2.2.1. Частота встречаемости новообразований молочной железы в популяции домашних кошек Ростовской области и их клиникоморфологические формы

Таблица 2 – Анализ историй болезни кошек, поступивших на прием в клиники Ростовской области в 2018 году

Кол-во проанализированных историй болезни	Кол-во кошек прооперированных по поводу Н.О. молочной железы	Кол-во Н.О. подвергшихся цитологическому исследованию	Кол-во Н.О. подвергшихся гистологическому исследованию
73247	321	61	5

Анализ 73247 историй болезни кошек, предоставленных ветеринарными клиниками г. Ростова – на - Дону и области, показал, что 321 животному была проведена операция по удалению новообразований (НО) молочной железы, что составляет 0,44 % от всех обратившихся пациентов (таблица 2). Соответственно, животные с новообразованиями молочной железы составили примерно 400 особей на каждые 100 000 кошек. Далее был проведен анализ распределения клинко-морфологических форм новообразований на основании цитологических исследований, имеющих в предоставленных нам историях болезни. Только в 61 истории болезни из 321 имелись данные о проведении цитологических исследований вырезанных новообразований, и из них только 5 животным был поставлен диагноз на основании гистологического исследования. В соответствии с классификацией опухолей молочной железы (ВОЗ, 2012) карцинома и саркома были отнесены к злокачественным новообразованиям молочной железы, а к доброкачественным и опухолеподобным образованиям – фиброаденома и фиброэпителиальная гиперплазия. У 32 животных из 61 было диагностировано злокачественное новообразование, что составило 53 % (Вакуленко М.Ю., 2019; Vakulenko M.Y. 2019) (рисунок 1).

На момент исследования в ветеринарных клиниках отмечалось отсутствие стандартизации осмотра, диагностики и лечения РМЖ у кошек, что затрудняет ре-

альную оценку проблемы РМЖ. Большинство НО было прооперировано без соблюдения правил абластики и антиблаستي, и вырезанные НО не подвергались дальнейшему исследованию.



Рисунок 1 – Распределение различных форм новообразований по данным цитологических исследований

В основную группу исследования были включены 30 домашних кошек, поступивших в ветеринарную клинику по поводу спонтанно возникших опухолей в области молочных пакетов. После оперативного удаления новообразований были собраны и проанализированы данные анамнеза, операционный материал и кровь животных.

В результате патоморфологического исследования тканей опухоли установлено, что у 3-х животных опухоль представляла собой фиброэпителиальную гиперплазию. Это были молодые животные, в возрасте от 8 месяцев до 2-х лет, в анамнезе у всех был отмечен приём гормональных препаратов на основе экзогенных прогестиннов. Хозяева животных отмечали резкий интенсивный рост одновременно нескольких опухолей, симметрично расположенных вдоль гряды молочных желёз. Макроскопически большинство опухолей представляли собой новообразования бобовидной формы, от 2 до 4 см в диаметре, эластичной консистенции. Границы определялись чётко, от близлежащих тканей опухоли отделялись самопроизвольно и имели собственную капсулу. На разрезе тела опухоли некрозов и кровоизлияний не наблюдалось, отмечалась гладкая блестящая ткань розового цвета. Микроскопически установлено разрастание плотной соединительной ткани, в которой наблюдались чётко оформленные, разветвлённые протоки, сформированные эпителиальной железистой тканью. Обычно пролиферирующие протоки были выстланными двумя-тремя слоями мономорфных призматических эпителиальных клеток с гиперхромными округлыми ядрами. Митозы наблюдались в единичных клетках. При этом просветы ацинусов были сохранены, глубоких структурных изменений ядра и цитоплазмы не наблюдалось.

У одного животного была диагностирована периканаликулярная фибroadенома. У данного животного уже проводилась операция по удалению НО молочной железы, которая представляла собой фибroadеноматозную гиперплазию, но хозяин вместо рекомендованной стерилизации продолжил применение прогестинновых препаратов. Удаленный макропрепарат представлял собой конгломерат узлов бобовидной формы, диаметром от 2 до 8 мм. Узлы были четко отграниченными, в капсуле, подвижными, не связанными с окружающими тканями, плотноэластической консистенции, с гладкой поверхностью. На разрезе они были представлены светлорозовой однородной мелкозернистой тканью. Участков некроза и кровоизлияний не выявлено. Ткань опухоли состояла из множества пролиферирующих мелких тубул, выстланных одним-двумя слоями мономорфных призматических и вытянутых (миоэпителий) клеток со слабоэозинофильной цитоплазмой, округлыми гиперхромными ядрами. Ядерный полиморфизм не выражен. Митозы единичные в препарате. Тубулы окружены фибробластической стромой.

У 26 животных был диагностирован РМЖ различной степени злокачественности. Возраст животных варьировал от 8 до 19 лет. Макроскопически опухоли не имели общих закономерностей. Они отличались размерами и локализацией. Обычно на срезе ткани опухолей были значительно светлее прилежащих тканей, цвет варьировал от бледно-розового до серо-желтого. Микроскопически карцинома молочной железы у кошек характеризовалась признаками злокачественности: инвазивный рост, клеточный и ядерный полиморфизм, высокий митотический индекс. Эпителиальные клетки располагались преимущественно в скоплениях, похожих на просветы каналов. Обычно опухоль была представлена нечетко оформленными протоками, выстланными одним или несколькими слоями полиморфных округлых и призматических клеток с округлыми гиперхромными ядрами. Строма опухоли была представлена рыхлой и плотной соединительной тканью. Соотношение между эпителиальной и соединительной тканью варьировало в разных опухолях, иногда встречались разрозненно лежащие клетки рака. При низкодифференцированных формах рака, соответствующих высокой степени злокачественности, наблюдались: неправильная форма ядра, неровные и нечёткие контуры ядерной мембраны, глыбчатый хроматин, крупные чётко выраженные ядрышки, высокий митотический индекс. В подавляющем большинстве случаев мы регистрировали протоковый рак (Вакуленко М.Ю., 2019; Vakulenko M. Y., 2019).

Таким образом, злокачественные новообразования составили 87 % от всех прооперированных нами животных, что существенно превышало процент злокачественных новообразований, диагностированных с помощью цитологических исследований, но соответствовало литературным данным (Якунина М.Н., 2011) (рисунок 2).

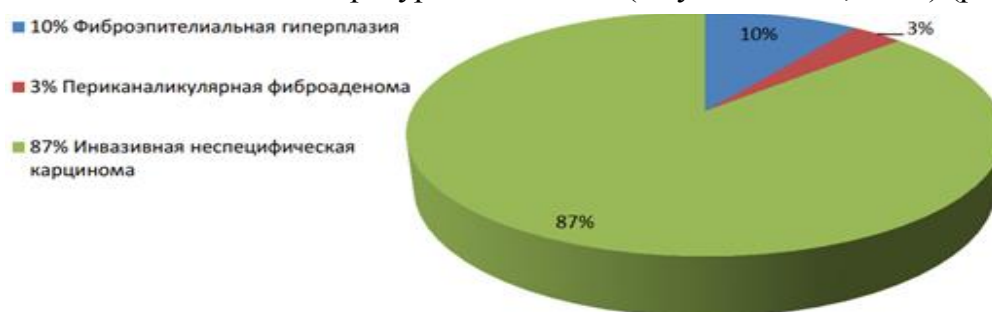


Рисунок 2 – Распределение различных форм новообразований, диагностированных гистологически

В проведенном исследовании наблюдалась чёткая зависимость злокачественности опухоли от возраста животного. Случаи фиброэпителиальной гиперплазии наблюдались у животных не старше 2 лет, средний возраст животных с протоковым раком составил 12,9 лет. Таким образом, в группу риска можно отнести кошек в возрасте от 8 лет, средний возраст животного, в котором у них развивается злокачественный рак молочной железы, находится в диапазоне 9-15 лет. Самое большое количество животных с диагнозом рака молочной железы наблюдалось в возрастной группе 10, 13 и 15 лет. 90% животных в исследуемой группе были не стерилизованы, у 3 животных стерилизация была проведена во взрослом возрасте за несколько лет до развития опухоли. У 80% процентов животных в анамнезе хозяева указывали применение гормональных препаратов в виде капель или уколов пролигеснона и т.д.

Выживаемость после операции по удалению опухоли молочной железы среди животных с диагностированной фиброэпителиальной гиперплазией составила 100 %. Животные хорошо себя чувствовали на протяжении 3 лет проведения исследования. У двух кошек появилось потомство, после чего животным была проведена стерили-

зация. В группе животных со злокачественными новообразованиями 11 % погибло в течение 3 недель из-за послеоперационных осложнений или было усыплено по просьбе владельцев; 14 % прожило после операции более 2 лет и погибло по естественным причинам. У 18 % животных наблюдался рецидив, и они погибли в течение 3-8 месяцев после операции.

Исследуемые животные были разбиты на группы по признаку злокачественности опухоли и степени дифференциации. В группу контроля вошли клинически здоровые животные, попавшие в клинику по поводу стерилизации. Группу животных с доброкачественными и опухолеподобными новообразованиями составили животные с фиброэпителиальной гиперплазией и фибroadеномой молочной железы. Группы животных со злокачественными новообразованиями составили животные с инвазивной неспецифической карциномой низкой, умеренной и высокой степени дифференциации.

2.2.2. Уровень экспрессии гена АДА

Нами были разработаны ДНК-праймеры на ген *АДА* кодирующий фермент аденозиндезаминазу. Смоделированные мРНК специфичные ДНК-праймеры были опробованы в трех различных концентрациях в режиме real-time PCR (125, 250 и 500 Нм) прямого и обратного праймеров. Все образцы содержали конечную концентрацию ДНК 0,2 НГ/мкл. Анализ кривой плавления проводили при температуре от 60 до 99 °С. Реакции ПЦР были линейными в диапазоне восьми log10 синтетического шаблона и давали один пик в анализе кривой плавления. Амплификация мРНК, выделенной из биологических образцов, дала такие же кривые амплификации, что и для синтетических шаблонов. Анализ кривой плавления показал наличие только одного ампликона. Кроме того, при использовании биологических образцов наблюдалась хорошая корреляция между *St* и концентрацией шаблона в четырех разведениях, что подтвердило высокую специфичность и чувствительность разработанных праймеров. При выборе референсных генов, ген *B2M* показал высокую экспрессию во всех образцах тканей и имел низкий коэффициент вариации в отличие от гена *GAPDH*. Кроме того, по данным литературы (Penning L.C., 2007), обычно при изучении экспрессии генов, связанных с развитием рака молочной железы, в качестве референсного используют ген *B2M*. Поэтому экспрессию генов *АДА* рассчитывали по отношению к экспрессии гена *B2M*. Уровень экспрессии гена *АДА* значительно увеличивался в тканях новообразований молочной железы по сравнению со здоровой молочной железой. Результаты исследования представлены в таблицах 3-4.

Таблица 3 – Показатели ΔSt для гена *АДА* в группах животных с новообразованиями и в контрольной группе

Исследуемые группы <i>АДА</i>	Контрольная группа n =10	Инвазивная неспецифическая карцинома n =26	Фиброэпителиальная гиперплазия и фибroadенома
ΔSt (M±m)	0,4±0,07	5,57±0,31	7,44±0,59

Таблица 4 – Показатели уровня экспрессии *АДА* в тканях опухолей по отношению к показателям в здоровых тканях молочной железы

Исследуемые группы	$\Delta \Delta St$	2 - $\Delta \Delta St$	U-критерий Манна-Уитни(p)
Группа инвазивная неспецифическая карцинома	5,17	36	p<0,001
Группа фиброэпителиальная гиперплазия и фибroadенома	7,04	131	p<0,001

По данным литературы, аденозиндезаминаза осуществляет гидролитическое дезаминирование аденозина до инозина, и в быстро пролиферирующих тканях, например в лимфоцитах и в клетках кишечника, активность данного фермента обычно изменяется (Vu Hong-Diep, 2017; Abbed K.M., 2018). Перерождение здоровых клеток молочной железы в опухолевые всегда сопровождается неконтролируемым ростом ткани, следовательно экспрессия гена *АДА* должна изменяться. Для подтверждения правильности сделанных выводов было проведено попарное сравнение средних показателей ΔC_t исследуемых мРНК контрольной группы с группами инвазивной неспецифической карциномы и фиброэпителиальной гиперплазии с помощью U-критерия Манна–Уитни, данные которого также приведены в таблицах 6-7. Получены результаты, которые подтверждают, что уровень экспрессии гена *АДА* в ткани опухолей инвазивной неспецифической карциномы и в ткани фиброэпителиальной гиперплазии статистически значимо отличаются от соответствующего показателя в контрольной группе ($p < 0,001$). Уровень экспрессии гена *АДА* в тканях опухолей инвазивной неспецифической карциномы и в тканях фиброэпителиальной гиперплазии резко повышается по сравнению с тканью здоровой молочной железы (в 36 раз в тканях инвазивных карцином и в 131 раз в тканях фиброэпителиальных гиперплазий). Результаты проведённого исследования подтверждают участие гена *АДА* в патогенезе онкологических заболеваний. Учитывая вышесказанное, выявление изменения количества определённых мРНК можно использовать для понимания как патофизиологических основ канцерогенеза, так и для поиска молекулярно-генетических подходов к его ранней диагностике (Вакуленко М.Ю., 2019). Учитывая увеличение экспрессии гена, кодирующего фермент аденозиндезаминазу, мы ожидали увидеть увеличение активности данного фермента в периферической крови животных с РМЖ.

2.2.3. Определение активности аденозиндезаминазы

Согласно полученным результатам, между активностью *АДА* в плазме крови здоровых животных и в плазме крови животных со злокачественными новообразованиями молочной железы достоверных отличий не наблюдалось (таблица 5).

Таблица 5 – Активность *АДА* в плазме крови здоровых кошек и кошек с новообразованиями ($M \pm m$, нмоль / с/ мл плазмы крови)

Группы	Активность фермента <i>АДА</i>
Контроль n=10	67±5
Все новообразования n=30	54±15 (t =1,00, p = 0,212)
Фиброэпителиальная гиперплазия и фибroadенома n=4	45±2 (t = 5,00, p = 0,007)
Высокодифференцированная инвазивная неспецифическая карцинома n=10	50±10 (t =1,271, p = 0,261)
Умеренно дифференцированная инвазивная неспецифическая карцинома n=9	47±2 (t =1,33, p = 0,22)
Низкодифференцированная инвазивная неспецифическая карцинома n=7	68±2 (t =0,278, p = 0,79)

В зависимости от степени дифференциации опухоли достоверных различий активности фермента также не обнаружено. По всей видимости, этот факт связан с тем, что обследованные животные были прооперированы на 1-2 стадии рака молочной железы и патологические процессы были недостаточно существенными, чтобы повлиять на метаболизм организма в целом. Другим возможным объяснением отсутствия увеличения активности *АДА* в крови больных животных может являться

тот факт, что в основном АДА в крови содержится в лимфоцитах. При иммунодефицитных состояниях обычно наблюдается недостаточность АДА, следовательно падение выработки АДА лимфоцитами может компенсировать рост активности АДА синтезируемой тканью опухоли (Вакуленко М.Ю., 2019; Vakulenko M. Y., 2019).

Поскольку анализ активности АДА показал, что измерение активности этого фермента в крови животных с РМЖ не может быть использовано в качестве предиктора РМЖ, нами было принято решение проанализировать содержание полиаминов в крови этих же животных.

2.2.4. Содержание полиаминов в крови кошек с новообразованиями молочной железы

Впервые были получены показатели уровня полиаминов в крови здоровых кошек: путресцина – 0,04 мкг/мл, спермидина – 5,94 мкг/мл и спермина – 1,63 мкг/мл.

При доброкачественных и опухолеподобных новообразованиях молочной железы содержание путресцина в крови кошек статистически значимо увеличивалось в 5 раз ($p < 0,0001$) по сравнению с показателями контрольной группы. При злокачественных новообразованиях молочной железы (инвазивной неспецифической карциноме) содержание путресцина и спермина в крови значительно превышало контрольные значения в 6 ($p < 0,0001$) и в 10 раз ($p < 0,02$) соответственно. При этом содержание спермидина в крови кошек, наоборот, снижалось в 8 раз ($p < 0,02$) по сравнению с контролем. Снижение содержания спермидина, по-видимому, связано с образованием различных ацетильных производных (Вакуленко М.Ю., 2019; Акинина Н.И., 2019; Vakulenko M. Y., 2019) (таблица 6).

Таблица 6 – Содержание полиаминов в крови кошек с новообразованиями молочной железы ($M \pm m$, мкг/мл крови)

Группы	Полиамины мкг/мл		
	Путресцин	Спермидин	Спермин
Клиническая норма	0,4±0,01	5,94±1,13	1,63±0,30
Фиброэпителиальная гиперплазия и фибroadенома	2,15±0,22 **	4,00±0,40	2,68±1,00
Инвазивная неспецифическая карцинома	2,45±0,67*	0,76±0,14*	15,56 ±3,76*

Примечание: * - $p < 0,02$ – достоверность различий величин у больных по сравнению с нормой.

** - $p < 0,0001$ – достоверность различий величин у больных по сравнению с нормой.

2.2.5. Сопоставление экспрессии гена АДА с основными клинико-морфологическими параметрами

В заключение объединили все параметрические значения с клинико-морфологическими параметрами и провели корреляционный анализ всех признаков. Перед проведением корреляционного анализа полученных показателей была проведена проверка нормальности выборки для соответствующего выбора метода статистической обработки. Нормальность выборки была оценена с помощью критериев Шапиро–Уилка, Андерсона–Дарлинга и Лиллифорса. По всем критериям выборка отличалась от нормального распределения ($p < 0,05$). Далее была оценена нормальность группы с неспецифической инвазивной карциномой. В группе с неспецифической инвазивной карциномой, за исключением показателя активности АДА, все переменные в плазме имели нормальное распределение ($p > 0,05$). В контрольной группе все переменные, за исключением путресцина, имели нормальное распреде-

ление ($p > 0,05$). Для межгруппового сравнения использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили в программе статистической обработки Past 4.2. Когда данные не соответствовали нормальному распределению, использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для оценки величины коэффициента корреляции использовали шкалу Чеддока.

В результате анализа установлено, что экспрессия гена *АДА* умеренно коррелирует с основными клинико-морфологическими параметрами. Обратная взаимосвязь между экспрессией гена *АДА* в тканях новообразований и *АДА* в плазме крови ($r_s = -0,73$) может быть объяснена тем фактом, что основным источником *АДА* в крови являются лимфоциты. Существует множество работ, доказывающих взаимосвязь активности *АДА* в крови и уровнем иммунитета. *АДА* является ферментом пуринового метаболизма, а пуриновые нуклеотиды непосредственно участвуют в процессах гуморального иммунитета и антивирусной защите (Милашенко В.А., 2001). Кроме того, доказана роль *АДА* в модуляции процесса репликативного старения Т-лимфоцитов (Stanley et al., 2013). По данным литературы, при онкопатологии нарушается гомеостаз аденозина, что проявляется различной степенью иммуносупрессирующего действия. Снижение активности аденозиндезаминазы в лимфоцитах у онкобольных коррелирует с увеличением содержания малоактивных клеток иммунной системы, что обусловлено накоплением внеклеточного аденозина и способствует иммуносупрессорному эффекту (Барсукова М.А., 2017). Полученные нами данные показали уменьшение содержания *АДА* в плазме крови, что указывает на ослабление иммунитета у животных, больных раком молочной железы. Увеличение экспрессии гена *АДА* в тканях опухоли говорит о процессах пролиферации, характерных для роста любого новообразования. В то же время увеличение синтеза *АДА* в тканях опухоли не влияет на содержание *АДА* в крови животных. Это можно объяснить тем, что фермент работает в клетках опухолей и в кровь попадает только в случае повреждения целостности мембраны. Также надо учитывать тот факт, что в нашем эксперименте участвовали животные на 1 и 2 стадии рака, следовательно размер опухоли по отношению ко всему организму был относительно незначителен.

Как повышение экспрессии гена *АДА* в процессе опухолевого роста, так и снижение активности *АДА* в плазме с возрастом ($r_s = -0,77$) можно объяснить высоким уровнем пролиферации. Во-первых, у молодых животных до 2-3 лет идет рост организма, и пуриновый обмен более активен. Во-вторых, у молодых животных более высокий уровень иммунитета, в процессах формирования которого *АДА* принимает непосредственное участие. Поэтому уровень *АДА* в плазме крови с возрастом должен уменьшаться, что и было показано в данном исследовании.

Важно отметить, что установлена сильная прямая взаимосвязь между содержанием путресцина в эритроцитах и размером опухолей ($r_s = 0,78$). Полиамины (путресцин, спермидин и спермин) имеют важное значение для роста эукариотических клеток, так как эти молекулы участвуют во многих ключевых процессах, в том числе генной транскрипции, регуляции функции белка и стабильности клеточной мембраны (Igarashi K. et al., 2018). Высокий уровень полиаминов способствует пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток (Bachrach U., 2004). При злокачественных новообразованиях молочной железы (инвазивной неспецифической карциноме) содержание путресцина и спермина в крови значительно превышало контрольные значения в 6 ($p < 0,0001$) и в 10 раз ($p < 0,02$) соответственно. Тот факт, что уровень спермина в эритроцитах не коррелировал с размером опухоли, указывает на начальные этапы развития онкологического процесса. Сильная прямая взаимосвязь между спермидином и возрастом животных ($r_s = 0,72$) может быть объяснена тем фактом, что спермидин является индуктором аутофагии, и снижение его содер-

жания при старении может способствовать накоплению дефектных молекул и развитию онкологического процесса (Zhang H, 2020).

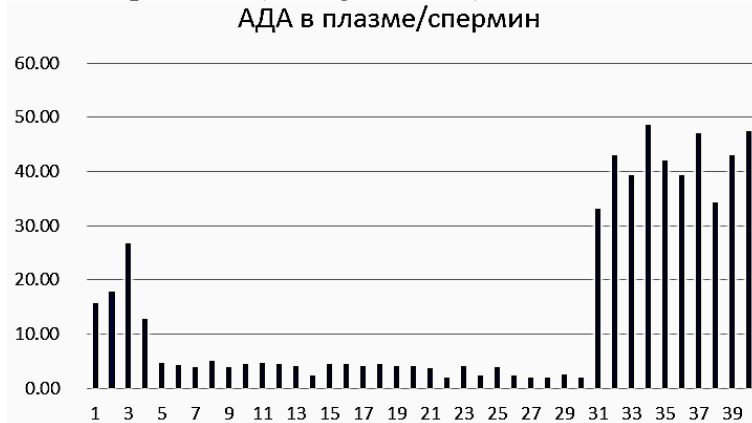


Рисунок 3 – Отношение активности АДА в плазме крови к содержанию спермина (1–4 – доброкачественные; 5–30 – злокачественные; 31–40 – контроль)

Поскольку при использовании метода главных компонент ни один из параметров не показал однозначных результатов, нами были просчитаны индексы-онкомаркеры (рисунок 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог проделанной работы, следует указать на то, что впервые была выявлена частота встречаемости рака молочной железы, которая составила 0,4 % популяции домашних кошек в Ростовской области. Соответственно, животные с новообразованиями молочной железы составили примерно 400 особей на каждые 100 000 кошек. Был проведен анализ клинико-морфологических форм новообразований, в результате которого установлено, что в 87 % случаев новообразования молочной железы у кошек являлись неспецифической инвазивной карциномой. Было проанализировано 73247 истории болезни кошек, предоставленных ветеринарными клиниками г. Ростова-на-Дону и Ростовской области, а также прооперировано 30 домашних кошек, обратившихся в ветеринарную клинику по поводу спонтанно возникших опухолей в области молочных пакетов. В результате анализа диагнозов, взятых из историй болезни и поставленных на основании цитологических исследований и диагнозов, полученных в результате гистологического анализа, выявлено, что в 30 % случаев злокачественные новообразования не диагностируются и животное остается без соответствующего лечения. Также был собран и проанализирован анамнез животных с новообразованиями молочной железы и установлено, что в группу риска по развитию рака молочной железы следует отнести кошек в возрасте от 8 лет. Средний возраст животных, в котором у них развивается рак молочной железы, составляет 12,9 лет. 90 % животных в исследуемой группе были не стерилизованы. У 80 % животных в анамнезе хозяева указывали применение гормональных препаратов в виде капель или уколов пролигеснона. Выживаемость после операции по удалению опухоли молочной железы среди животных с диагностированной фибroadеноматозной гиперплазией составила 100 %, животные хорошо себя чувствовали на протяжении 3 лет проведения исследования. У двух кошек появилось потомство, после чего животным была проведена стерилизация. В группе животных со злокачественными новообразованиями 11 % погибло в течение 3 недель из-за послеоперационных осложнений или было усыплено по просьбе владельцев. 14 % прожило после операции более 2 лет и погибло по естественным причинам. У 18 % животных наблюдался рецидив, и они погибли в течение 3-8 месяцев после операции.

С целью выявления предикторов РМЖ был проведен поиск его молекулярных предикторов у кошек. В том числе была изучена экспрессия гена *АДА* в тканях опухолей молочной железы и активность данного фермента в плазме, а также было проанализировано содержание полиаминов в крови кошек с раком молочной железы. Результаты исследований показали, что уровень экспрессии гена *АДА* в тканях опухолей инвазивной неспецифической карциномы и в тканях фиброэпителиальной гиперплазии резко повышается по сравнению с тканью здоровой молочной железы (в 36 раз в тканях инвазивных карцином и в 131 раз в тканях фиброэпителиальных гиперплазий). При этом достоверных отличий между активностью *АДА* в плазме крови здоровых животных и в плазме крови животных со злокачественными новообразованиями молочной железы выявлено не было. Измерение уровня полиаминов в крови животных показало, что содержание путресцина в эритроцитах крови кошек с доброкачественными и опухолеподобными новообразованиями молочной железы (фиброэпителиальная гиперплазия) значимо увеличивалось (в 5 раз) по сравнению с показателями контрольной группы. При злокачественных новообразованиях молочной железы (инвазивной неспецифической карциноме) содержание путресцина и спермина в крови значительно превышало контрольные значения в 6 и в 10 раз соответственно.

Далее был проведен корреляционный анализ данных показателей и клинико-морфологических параметров (размер опухоли, возраст животного) и выявлены следующие закономерности: выявлена сильная прямая взаимосвязь между спермином и путресцином и прямая взаимосвязь между спермином и возрастом. В группе с РМЖ наблюдалась прямая взаимосвязь между путресцином и размером опухоли. В группе контрольных животных была выявлена сильная обратная взаимосвязь между экспрессией *АДА* и активностью *АДА* в плазме, обратная взаимосвязь между *АДА* в плазме и возрастом животного, прямая взаимосвязь между спермидином и возрастом кошек. Также был разработан индекс-онкомаркер, представляющий собой отношение уровня активности *АДА* к содержанию спермина в крови; по этому индексу можно разделять между собой группы с фиброэпителиальной гиперплазией, инвазивной неспецифической карциномой и здоровых животных. Таким образом, данный индекс-онкомаркер может быть внедрен в реальную клиническую ветеринарную практику для постановки дифференциальных диагнозов рака молочной железы и мониторинга рецидивов данного заболевания.

В данной работе впервые были исследованы показатели активности фермента аденозиндезаминазы и содержание полиаминов в крови кошек с новообразованиями молочной железы. Также нами были впервые разработаны ДНК праймеры на ген *АДА*, кодирующий фермент аденозиндезаминазу, и получены рекомендации оценки экспрессии данного гена в тканях опухолей молочной железы у кошек.

Результаты данной работы вносят вклад в понимание патофизиологических основ развития канцерогенеза и в развитие молекулярно-генетических подходов ранней диагностики рака молочной железы у млекопитающих.

ВЫВОДЫ

1. Встречаемость новообразований молочной железы у кошек Ростовской области составляет 400 особей на каждые 100 000 кошек. На 2018 год 0.44% популяции кошек Ростовской области имели новообразования молочной железы, из них злокачественные новообразования составили 87 %.

2. Уровень экспрессии гена *АДА* в тканях злокачественных и доброкачественных опухолей статистически значимо выше, чем в тканях здоровой молочной железы (в 36 раз в тканях инвазивных карцином и в 131 раз в тканях фиброэпителиальных ги-

перплазий). Уровень активности аденозиндезаминазы в крови при этом не меняется. Активность АДА в группе здоровых животных составляет 67 ± 5 нмоль / с/мл плазмы крови, в группе животных, больных раком молочной железы $,54 \pm 15$ нмоль / с/ мл плазмы крови.

3. В крови кошек, больных раком молочной железы, достоверно увеличивается уровень полиаминов. Содержание полиаминов в крови здоровых животных составляет: путресцина $0,04 \pm 0,01$ мкг/мл, спермидина $5,94 \pm 1,13$ мкг/мл, спермина $15,56 \pm 3,76$ мкг/мл.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Данные о частоте встречаемости новообразований молочной железы у кошек в Ростовской области могут быть использованы при планировании ветеринарных санитарно-эпидемиологических мероприятий в Ростове-на-Дону и области.

2. Методики определения предикторов РМЖ могут быть использованы для диагностики и мониторинга лечения инвазивной неспецифической карциномы молочной железы у кошек в рутинной клинической диагностике в условиях ветеринарной клиники и в научно-исследовательской работе.

3. Всем кошкам после 10 лет рекомендовано проходить скрининговое обследование по поводу новообразований молочной железы.

4. При назначении противоопухолевой терапии (химиотерапии, гормонотерапии, хирургическом удалении опухоли) рекомендовано проводить биопсию опухолевой ткани с дальнейшим гистологическим исследованием для дифференцирования опухоли. В случаях проведения оперативного вмешательства на пораженной молочной железе следует учитывать микроскопический характер роста.

5. Рекомендовано разъяснять владельцам кошек преимущества ранней стерилизации кошек, до наступления полной половозрелости, что способствует снижению риска развития рака молочной железы.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

– Обобщение теоретического материала, результаты экспериментальных исследований определили направление дальнейшей разработки темы исследования;

– изучение патофизиологических основ канцерогенеза при возникновении рака молочной железы у кошек;

– изучение встречаемости новообразований молочной железы у кошек на территории г. Ростова-на-Дону и близлежащих поселений;

– разработка молекулярно-генетических методов ранней диагностики.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

Министерства науки и высшего образования РФ

1. Вакуленко, М.Ю. Перспективы использования онкомаркеров в ветеринарной онкологии / М.Ю. Вакуленко // Ветеринарная патология. – 2016. – №4 (58). – С.23-29.

2. Вакуленко, М.Ю. Оценка качества жизни домашних животных больных раком молочной железы / М.Ю. Вакуленко, Н.М. Добаева, В.В. Сухомлинов и др. // Ветеринария Кубани. – 2018. – №5. – С.21-25.

3. Вакуленко, М.Ю. Изменение содержания полиаминов в крови кошек с различными типами новообразований молочной железы / М.Ю. Вакуленко, Н.М. Добаева, Н.И. Акинина и др. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2019. - №1. - С.230-233.

4. Вакуленко, М.Ю. Преvalентность и нозологические формы новообразований молочной железы у кошек в Ростовской области / М.Ю. Вакуленко, Н.С. Карнаухов, Н.М. Добаева и др. // Ветеринарная патология. - 2019. - №2. - С.28-36.

Статьи, опубликованные в изданиях, индексируемых в SCOPUS

5. Vakulenko, M.Y. Changes in the activity of adenosine deaminase and the content of polyamines in the blood of cats with breast cancer / M.Y. Vakulenko, N.I. Akinina, N.M. Dobaeva et al. // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 12th International Scientific Conference on Agricultural Machinery Industry, Interagromash. -2019. - С.134-142.

6. Vakulenko, M.Y. Breast cancer in the population of cats in Rostov region / M.Y. Vakulenko, N.I. Akinina, N.M. Dobaeva et al. // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 12th International Scientific Conference on Agricultural Machinery Industry, Interagromash. -2019. - С.142-151.

Статьи и материалы конференций в зарубежных изданиях

7. Vakulenko, M.Y. The estimation of the size of domestic cat population in Rostov region / M.Y. Vakulenko, S.B. Milnikova, V.F. Ponomareva et al. // European Scientific Journal. - 2018. - №11 (39). - P.4-7.

Другие статьи и материалы конференций

8. Вакуленко, М.Ю. Сравнение онкомаркеров человека с онкомаркерами собак и кошек / М.Ю. Вакуленко, Н.И. Акинина // Материалы внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Молекулярная биология, химия и медицина» / РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2017. - С.15-17.

9. Vakulenko, M.Y. Breast cancer in cats as a model for studying breast cancer in women / M.Y. Vakulenko, V.F. Ponomareva, M.A. Kulishova, A.A. Segeeva // Материалы XV научной межвузовской конференции студентов, молодых ученых и специалистов с международным участием «Актуальные вопросы морфологии» / РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2018. - С. 51-53.

10. Вакуленко, М.Ю. Патоморфологические формы рака молочной железы у кошек / М.Ю. Вакуленко, В.Ф. Пономарева, А.А. Сергеева // Материалы II внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Молекулярная биология, химия и медицина» // РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2018. - С. 22-24.

11. Вакуленко, М.Ю. Морфологические формы рака молочной железы у кошек / М.Ю. Вакуленко, В.Ф. Пономарева, А.А. Сергеева М.А. Кулишова // Материалы V межвузовской научно-практической конференции студентов и молодых ученых.

«Молодёжь здоровью молодежи» (26 мая 2018 г.) // РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2018. - С. 4-6.

12. Вакуленко, М.Ю. Плоскоклеточный рак кожи у домашних животных / М.Ю. Вакуленко, В.Н. Демидов, А.В. Финаев // Материалы научно-практической межвузовской конференции студентов и молодых учёных «Кожа и ее производные» (28 сентября 2018 г.) // РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2018. - С.8-11.

13. Вакуленко, М.Ю. Морфологические формы рака молочной железы у кошек / М.Ю. Вакуленко, В.Ф. Пономарева, А.А. Сергеева М.А. Кулишова // Сборник материалов XVII Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении. Дни молекулярной медицины на Дону». - 2018. - С.148-149.

14. Вакуленко, М.Ю. Опухоли молочных желёз у кошек и у женщин / М.Ю. Вакуленко, В.Н. Демидов, А.П. Ракитянская // Материалы XVI международной научно-практической конференция «Актуальные вопросы патологии» секция научно-исследовательская работа (25 декабря 2019 г.) // РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2019. - С. 38-45.

15. Вакуленко, М.Ю. Сколько кошек живёт в Ростовской области / М.Ю. Вакуленко, М.А. Кулишова, А.М. Ермаков и др. // Молодой исследователь Дона. - 2019. - №2(17). - С.81-84.

16. Вакуленко, М.Ю. Рак молочной железы в популяции кошек Ростовской области / М.Ю. Вакуленко, В.Н. Демидов, А.П. Ракитянская, Н.М. Добаева // Результаты Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектива 2019» / КБГУ. – Нальчик, 2019. - Т.3. - С. 202-204.

17. Вакуленко, М.Ю. Исследование уровня экспрессии гена *ADA* в опухолях молочной железы кошек / М.Ю. Вакуленко, В.Н. Демидов, Е.В. Бутенко и др. // Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции». – 2019. - Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ. - С. 152-154.

18. Акинина, Н.И. Содержание ацетильных производных полиаминов в крови кошек при злокачественных новообразованиях молочной железы / Н.И. Акинина, М. Ю. Вакуленко, Н.М. Добаева // Acta Naturae. – 2019. – Т.26. – С. 219-220.

19. Вакуленко, М.Ю. Исследование уровня экспрессии гена *ADA* в опухолях молочной железы кошек / М.Ю. Вакуленко, В.Ф. Пономарева, Е.Р. Миронова // Материалы IV внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Молекулярная биология, химия и медицина» / РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 2020. - С. 3-5.

В печать 14.10.2021. Формат 60×84/16.
Объем 1,0 усл. п. л. Тираж 100 экз. Заказ № 276

Отпечатано в издательском центре ДГТУ
Адрес университета и полиграфического предприятия:
344000, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1