

Летуновская Анна Владимировна

**Клинико-морфологическая оценка эффективности
определения церулоплазмينا при ранней диагностике
новообразований молочной железы у собак**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена на кафедре акушерства и оперативной хирургии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

Научный руководитель: **Племяшов Кирилл Владимирович,**
доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

Официальные оппоненты: **Салаутин Владимир Васильевич,**
доктор ветеринарных наук, профессор кафедры морфологии, патологии животных и биологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова»;
Дилекова Ольга Владимировна,
доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии имени С. Н. Никольского ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Защита диссертации состоится «14» июня 2022 г. В 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.05 на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д.5, тел/факс: 8(812)388-36–31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5 и на официальном сайте: <https://www.spbguvm.ru>

Автореферат размещен на сайтах: ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ: <http://vak.minobrnauki.gov.ru> «13» апреля 2022 г. и ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» <https://www.spbguvm.ru> «13» апреля 2022 г.

Автореферат разослан « » 2022 года

Ученый секретарь
диссертационного совета:

Кузнецова Татьяна Шамильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Новообразования молочной железы – патологический процесс, характеризующийся аномальной чрезмерной пролиферацией клеточного компонента тканей молочных желез. Возникновение опухолей обусловлено сложным взаимодействием между системами организма, которые воздействуют на трансформированные под влиянием различных канцерогенов клетки. Причины развития опухолей молочной железы в каждом конкретном случае установить сложно.

Молочные железы, в силу своих физиологических особенностей, находятся в состоянии постоянной смены процессов пролиферации и инволюции (Племяшов, К. В., Конопатов, Ю. В., Соколов, В. И., 2007). Частота встречаемости опухолевых поражений молочных желез занимает второе место после опухолей кожи у собак среди онкологических заболеваний и третье место по распространенности среди наиболее часто встречающихся нозологических единиц (Withrow, S. J., 2007). Наибольшее количество пациентов приходится на период от среднего возраста до 10 лет, после 10 лет процент заболеваний уменьшается. Было отмечено, что после двух эстральных циклов риск развития опухолей сильно увеличивается. Классические исследования показали, что у сук, кастрированных перед первой течкой, фактор риска составляет 0,05%, а у собак, кастрированных после второй течки, он возрастает до 25%. Породной предрасположенности не существует, однако существуют данные о тенденции к повышению риска развития опухолей молочных желез у собак мелких пород, таких как пудели, чихуахуа, спаниели, таксы, йоркширские терьеры, мальтезе. Кроме того, высок риск и у некоторых крупных пород, таких как английские спрингер спаниели, британские сеттеры, британские спаниели, немецкие овчарки, пойнтеры, доберманы и боксеры (Morris, J. S., 2010).

Диагностика патологий молочной железы слагается из большого количества методов. К ним относятся рентгенография и ультразвуковое исследование, компьютерная и магнитно-резонансная томографии (КТ, МРТ), гистологическое исследование материала. Для разработки тактики лечения необходимы результаты всех исследований, включая гистологическое, которое является инвазивным и проводится только после оперативного вмешательства. Цитологическое исследование не обладает достаточным уровнем чувствительности и не рекомендовано для предоперационной оценки краев резекции и необходимости проведения неoadъювантной химиотерапии (Withrow, S. J., 2007).

Отсутствие онкологических маркеров для диагностики новообразований молочных желез у животных, а также недостатки существующих методов диагностики вынуждают искать новые и более точные методы выявления опухолевого процесса молочных желез.

Опухоль в организме способствует развитию окислительного стресса – свободнорадикального процесса, сопровождающегося подавлением активности большинства компонентов антиоксидантной системы защиты

организма и накоплением продуктов перекисного окисления липидов в крови. Активированные кислородные метаболиты принимают участие в прогрессии опухолевых клеток, поддерживая рост опухоли, ее инвазивность и метастатический потенциал (Gregyrio, H., 2012). В многочисленных экспериментальных и клинических работах показано, что развитие злокачественных новообразований приводит к значительным изменениям в липидном составе и интенсивности процессов перекисного окисления липидов в опухоли и на уровне организма в целом (Viola-Rhenals, M., 2007). Снижение уровня перекисного окисления липидов по мере возрастания распространенности опухолевого процесса, связано с увеличением активности компонентов антиоксидантной системы. Нередко окислительный стресс, протекающий на организменном уровне, приводит к возникновению опухоли, в т. ч. новообразований молочной железы (Волков, А. А., 2006, Goldsmidt, M., 2011). Изменения окислительно-восстановительного потенциала могут способствовать развитию и прогрессированию опухоли молочной железы, путем изменения внутриклеточной сигнализации и связи между клетками. В ответ на возникновение окислительного стресса также активируются эндогенные защитные системы. Когда производство активного кислородного метаболита происходит в небольшой концентрации, связанные с гипоксией, сигналы передаются для модификации фенотипа в анаэробные состояния, что инициирует ангиогенез, новый рост и пролиферацию клеток. Реактивные формы кислорода, образующиеся в небольших концентрациях, играют роль в механизмах сигнализации, способствуя изменению клеточного фенотипа в направлении неоваскуляризации. Последний механизм приводит к пролиферации и клеточному росту (Карпенко, Л. Ю., Бахта, А. А., Суховольский, О. К., 2008). Увеличение, в данном случае, уровня церулоплазмينا описывается как возможность эндогенной защиты антиоксидантными системами. В исследованиях показано, что прогрессирование злокачественного процесса у больных новообразованием молочной железы характеризуется снижением уровня свободных радикалов на фоне увеличения оксидантной активности церулоплазмينا (Filippis, L., 2013). Увеличение экспрессии некоторых белков острой фазы, в том числе церулоплазмينا, который часто сопровождает неопластический процесс, вызвано активностью интерлейкина-1 и фактором некроза опухоли, высвобождаемым макрофагами.

Мы проанализировали имеющиеся данные о церулоплазмине как маркере при неопластических процессах для оценки возможности его использования в качестве метода диагностики опухолевых поражений молочных желез.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день новообразования молочных желез у собак являются актуальной проблемой в ветеринарной медицине, ввиду высокого уровня заболеваемости и гибели животных. Следуя единому алгоритму диагностики и лечения новообразований молочных желез у собак, при отсутствии метастатических

поражений и при определенном размере опухолей, показаний к использованию неoadъювантной химиотерапии нет. Так же на данный момент есть много споров о границах опухолевой резекции. Размер опухоли не всегда коррелирует со степенью ее злокачественности и возможным распространением в организме (Sabatucci, A., 2007). Химиотерапевтическое лечение новообразований молочной железы необходимо начинать в ранний период, когда пул опухолевых клеток наиболее чувствителен к цитостатику. Поэтому предоперационная оценка уровня злокачественности важна для повышения эффективности терапии.

Цель и задачи исследования. На основе комплексного обследования выявить взаимосвязь между содержанием церулоплазмينا в сыворотке крови и степенью злокачественности новообразования молочной железы у сук. Научно обосновать необходимость определения содержания церулоплазмينا в сыворотке крови для ранней диагностики опухолей молочной железы у сук.

Задачи:

1. определить уровень биохимических, гематологических показателей крови у сук контрольной и экспериментальных групп;
2. оценить состояние внутренних органов и тканей с помощью методов визуальной диагностики у сук контрольной и экспериментальных групп;
3. определить уровень церулоплазмينا в сыворотке крови у сук контрольной и экспериментальных групп;
4. сравнить показатели результатов обследования сук контрольной и экспериментальных групп;
5. выявить зависимость уровня церулоплазмينا в сыворотке крови у сук со степенью злокачественности новообразований молочных желез;
6. дополнить алгоритм ранней диагностики для сук с новообразованиями молочных желез с целью повышения эффективности лечения;
7. определить клиническую значимость метода определения церулоплазмينا с целью диагностики степени злокачественности опухоли молочной железы.

Научная новизна. В ходе нашей работы получены новые данные о функционировании антиоксидантной системы у клинически здоровых сук и у сук с опухолевой патологией молочной железы. Определены патогенетические механизмы, характеризующие корреляцию между уровнем церулоплазмينا и степенью злокачественности опухоли. Предоставлены результаты исследований, доказывающие необходимость комплексной диагностики для сук с новообразованиями молочных желез. Метод исследования церулоплазмينا впервые использован в качестве диагностического критерия у данной категории животных при новообразованиях молочной железы. Преимущество использования метода исследования церулоплазмينا состоит в простоте, низких затратах материальных и временных ресурсов, в отличие доступных ныне методов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данная работа направлена на изучение одного из компонентов опухолевого патогенеза,

характеризующего интенсивность ангиогенеза при новообразованиях различной степени злокачественности у сук. Полученная в экспериментальном исследовании информация позволяет предположить положительную экстраполяцию экспериментальных методов диагностики и лечебной тактики изучаемого заболевания на животных другого вида. Выявленные нами данные о состоянии антиоксидантной системы у клинически здоровых животных и ее изменения при новообразованиях молочной железы будут полезны для разработки тактики лечения данной патологии.

Методология и методы исследований. В ходе исследований мы использовали следующие методики: сбор анамнеза *morbi* и *vitae*; клинический осмотр животного; проведение клинико-морфологического и биохимического исследований крови; исследование церулоплазмينا сыворотки крови, рентгенологическое и ультразвуковое исследования; гистологическое исследование новообразований.

Гистологическая оценка новообразований проводилась в соответствии с действующими критериями по Элстону и Эллису (Elston, C.W., 2002) и классифицировалась согласно данным международного общества ветеринарных патологов (Withrow, S.J., 2007).

Методом исследования концентрации церулоплазмينا был выбран спектрофотометрический метод с использованием парафенилендиамина в качестве субстрата.

Статистически обрабатывали данные по методике Большева Л. Н. и Смирнова Н. В. в соответствии с правилами оценки результатов наблюдения на базе Microsoft Office Excel 2007.

Критерий достоверности был определен с помощью расчета U-критерия Манна-Уитни. Полученные данные анализировались статическими методами, представленными в пакете программ Microsoft Office Excel 2007.

Степень достоверности и внедрение результатов работы. Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методов исследования, проведенных на сертифицированном оборудовании и применением статистической обработки данных. Результаты исследований опубликованы в рецензируемых источниках и апробированы на внутренних и международных конференциях (Международная научная конференция профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГАВМ (Санкт-Петербург, 2017 г.); European veterinary conference Voorjaarsdagen (Гаага, 2017 г.); Современный взгляд на будущее науки: приоритетные направления и инструменты развития (Санкт-Петербург, 2017 г.); Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017 г.); Конференция «Эндокринология, дерматология в современной ветеринарной медицине» (Санкт-Петербург, 2018 г.); Санкт-Петербургский ветеринарный хирургический конгресс (Санкт-Петербург, 2019 г.); Международная научно-

практическая конференция, посвященная 95-летию кафедры общей, частной и оперативной хирургии «Тенденции развития ветеринарной хирургии» (Витебск, 2021 г.).

Материалы диссертации используются в научно-исследовательской работе и учебном процессе при проведении практических занятий и чтении лекций на кафедре акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВО СПбГУВМ, а также используется в работе ветеринарных клиник Санкт-Петербурга и Москвы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 работ, из них 2 в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации (Международный вестник ветеринарии, Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии), а также в сборниках всероссийских и международных конференций, центральных журналах и отдельных изданиях (Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XX Международной медикобиологической конференции молодых исследователей, Санкт-Петербург, 2017 г., European Journal of Biomedical and Life Sciences, Вена, 2017 г., сборник научных статей по итогам международной научно-практической конференции Санкт-Петербург, 2017 и Витебск, 2021 гг.).

Личный вклад. Диссертация является результатом исследований автора в период с 2016–2022 гг. Автором самостоятельно поставлена цель и определены задачи исследования, план проводимых исследований по изучению и контролю рассматриваемой патологии, а также анализ и обобщение полученных результатов. Личный вклад составляет 85%.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 129 страницах компьютерного текста. Состоит из обзора литературы, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 164 источника, из которых 119 иностранных. Диссертация содержит 13 таблиц и 47 рисунка.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Концентрация церулоплазмينا в сыворотке крови у здоровых собак и у собак с новообразованиями молочных желез.
2. Зависимость уровня церулоплазмينا в сыворотке крови у сук со степенью злокачественности новообразований молочных желез.
3. Критерии для начала наиболее эффективного лечения и для принятия решения об объеме оперативного вмешательства.
4. Оценка клинической значимости метода определения церулоплазмينا с целью диагностики степени злокачественности опухоли молочной железы.
5. Уточнение диагностического алгоритма для комплексного подхода к животным с опухолями молочных желез.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Работа выполнялась на кафедре акушерства и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Клинические обследования, визуальную диагностику, лабораторные исследования проводили на базе ветеринарных клиник города Санкт-Петербург. Анализ сыворотки крови на содержание церулоплазмينا осуществлялся на сертифицированном оборудовании в лаборатории кафедры зоологии Российского государственного педагогического университета имени Герцена А.И.

Материалом для исследования служила сыворотка крови, взятая из периферических вен конечностей у собак-компаньонов после 8-часовой голодной диеты.

При выполнении данной работы был проведен анализ историй болезни 60 собак (рисунок 1). Клинических признаков других заболеваний у животных не было. В первую очередь исследовались собаки с поражениями молочных желез (48 сук). Контрольную группу составляли здоровые животные (12 сук).

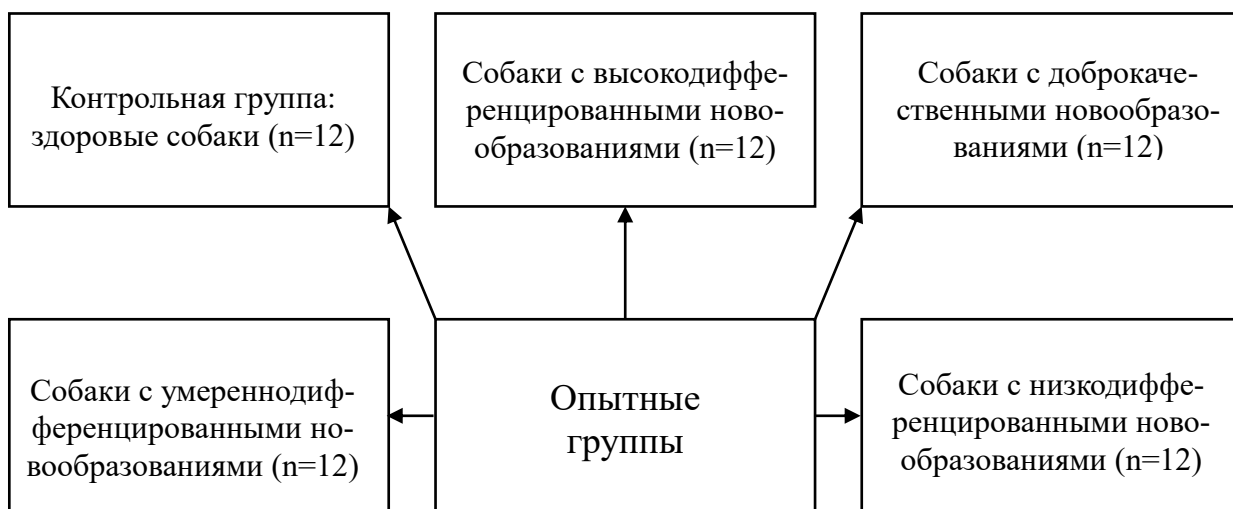


Рисунок 1 – Схема эксперимента, методы исследований

Некастрированные собаки мелких (йоркширский терьер, мальтийская болонка, такса, китайская хохлатая, фокстерьер, той терьер), средних (кокер-спаниель, бигль, цвергшнауцер, английский бульдог, бостон терьер) и крупных (немецкая овчарка, ретривер, доберман, маламут, бульмастиф, ризеншнауцер, бобтейл, южноафриканский бурбуль) пород и возрастной группы от 7 до 13 лет содержались в домашних условиях и проходили систематические обработки от эндо- и эктопаразитов, а также ежегодную вакцинацию. Собаки получали готовые сбалансированные корма.

В ходе исследования использовали следующие методики: сбор анамнеза *morbi* и *vitae*, клинический осмотр животного, проведение клинико-морфологического и биохимического исследований крови, исследование уровня церулоплазмينا в крови, рентгенологическое и ультразвуковое исследования, гистологическое исследование новообразований (рисунок 2).



Рисунок 2 – Распределение собак по группам

Критерии распределения животных в группы: в группах животных основным отличием являются характеристики новообразований, которые обуславливают степень злокачественности. Соответственно критерии злокачественности новообразований являются критериями формирования групп животных.

Результаты исследований

В анамнезе животные контрольной группы не имели патологий. Ранее признаков заболеваний у животных группы не наблюдалось.

При клиническом осмотре положение тела в пространстве естественное. Шерстный покров в норме. Реакция на внешние раздражители адекватная. Видимые слизистые оболочки бледно-розовые. В ротовой полости патологических изменений не обнаружено. Скорость наполнения капилляров – 1 сек. Слуховые проходы чистые, выделения из глаз отсутствуют. Выделения из влагалища отсутствуют, наружные половые органы развиты правильно.

Дыхательные движения естественные, выделения из носовых ходов отсутствуют. При аускультации грудной клетки патологических изменений не выявлено, дыхательные шумы ясные везикулярные.

Пальпация живота патологических изменений не выявила. Костяк животного сформирован правильно, суставы не изменены, патологических изменений, деформаций, вывихов не обнаружено. Пальпируемые лимфатические узлы не изменены.

Животные контрольной группы – клинически здоровы.

Показатели биохимического и клинического анализов крови у животных в пределах допустимых значений.

По данным методов визуальной диагностики отклонений от нормы у собак данной группы выявлено не было: при проведении ультразвуковой диагностики исследовались органы брюшной полости (печень, желчный пузырь с протоками, селезенка, желудок, кишечник, поджелудочная железа, надпочечники, почки, мочеточники, мочевого пузырь, матка, яичники, сосуды и лимфатические узлы); при рентгенографии грудной полости исследовались структуры костного аппарата и органы грудной полости (мягкие ткани, сердце, пищевод, трахея, бронхи, легкие, сосуды, лимфатические узлы, диафрагма).

Животные групп с новообразованиями молочной железы различной степени злокачественности имели новообразования молочных желез, появившиеся в течение последнего года. Ранее признаков заболеваний у животных не наблюдалось.

При клиническом осмотре положение тела в пространстве естественное. Шерстный покров в норме. Реакция на внешние раздражители адекватная. Видимые слизистые оболочки бледно-розовые. В ротовой полости патологических изменений не обнаружено. Скорость наполнения капилляров – 1 сек. Слуховые проходы чистые, выделения из глаз отсутствуют. Выделения из влагалища отсутствуют, наружные половые органы развиты правильно. Дыхательные движения естественные, выделения из носовых ходов отсутствуют. При аускультации грудной клетки патологических изменений не выявлено, дыхательные шумы ясные везикулярные.

Пальпация живота патологических изменений не выявила. Костяк животного сформирован правильно, суставы не изменены, патологических изменений, деформаций, вывихов не обнаружено. Пальпируемые лимфатические узлы не изменены. Согласно классификации tumor, nodus, metastasis (TNM), животные группы имели новообразования молочных желез T1N0M0.

Показатели биохимического и клинического анализов крови у животных в пределах допустимых значений.

По данным методов визуальной диагностики отклонений от нормы у собак данной группы выявлено не было: при проведении ультразвуковой диагностики исследовались органы брюшной полости (печень, желчный пузырь с протоками, селезенка, желудок, кишечник, поджелудочная железа, надпочечники, почки, мочеточники, мочевого пузырь, матка, яичники, сосуды и лимфатические узлы); при рентгенографии грудной полости исследовались структуры костного аппарата и органы грудной полости (мягкие ткани, сердце, пищевод, трахея, бронхи, легкие, сосуды, лимфатические узлы, диафрагма).

Гистоморфологическая характеристика новообразований молочных желез у экспериментальных групп

В данном разделе представлены результаты гистологических исследований новообразований молочных желез у исследуемых животных по 6 основным патологиям: эктазия протоков молочной железы, аденома молочной железы, внутрипротоковая аденома молочной железы, фибroadенома молочной железы, высокодифференцированная аденокарцинома молочной железы, умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, низкодифференцированная аденокарцинома молочной железы; относимые к трем группам: простые, комплексные и смешанные.

Рисунки 3, 4 – эктазия протоков молочной железы. Стрелками обозначены расширенные протоки молочной железы, на рисунках 18-20 – с кистозной трансформацией. Расширенные протоки различного диаметра, часто неправильной, «складчатой» формы, с утолщенными стенками, образованными фиброзной соединительной тканью. Клетки эпителия протоков мелкие, кубические, расположены в один-два слоя, со слабовыраженным полиморфизмом, цитоплазма узкая, эозинофильная, ядра мелкие, округлые, нормохромные и гиперхромные. Митозы не определяются.

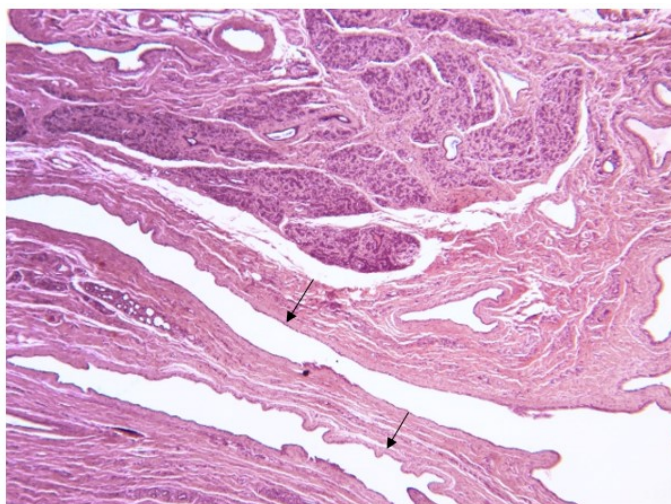


Рисунок 3 – Эктазия протоков молочной железы, микропрепарат (черные стрелки – расширенные протоки молочной железы). Сука, № 39. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 40



Рисунок 4 – Эктазия протоков молочной железы, макропрепарат (белые стрелки – расширенные протоки молочной железы). Сука, № 39

Рисунки 5, 6 – аденома молочной железы. Опухоль с узловым (нодулярным) типом роста, тубулярного строения. Клетки небольших размеров, кубические, со слабовыраженным полиморфизмом, цитоплазма узкая, эозинофильная, ядра мелкие, округлые, нормохромные и гиперхромные. Митозы редкие, единичные.

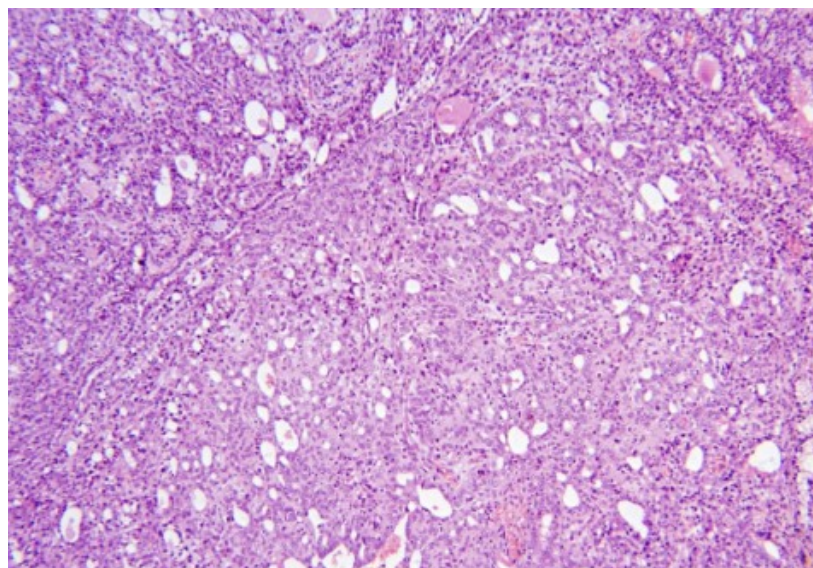


Рисунок 5 – Аденома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 16. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100

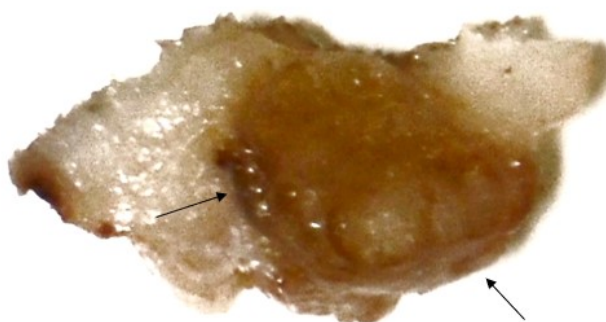


Рисунок 6 – Аденома молочной железы, макропрепарат (черные стрелки – опухолевая ткань). Сука, № 16.

Рисунки 7, 8 – внутрипротоковая аденома молочной железы. Опухоль расположена внутри кистозно расширенного протока, с узловым (нодулярным) типом роста, преимущественно папиллярного, местами тубулярного строения. Клетки небольших размеров, кубические, расположены в один-два слоя, со слабовыраженным полиморфизмом, цитоплазма узкая, темно-эозинофильная, ядра мелкие, округлые, нормохромные и гиперхромные. Митозы редкие, единичные.

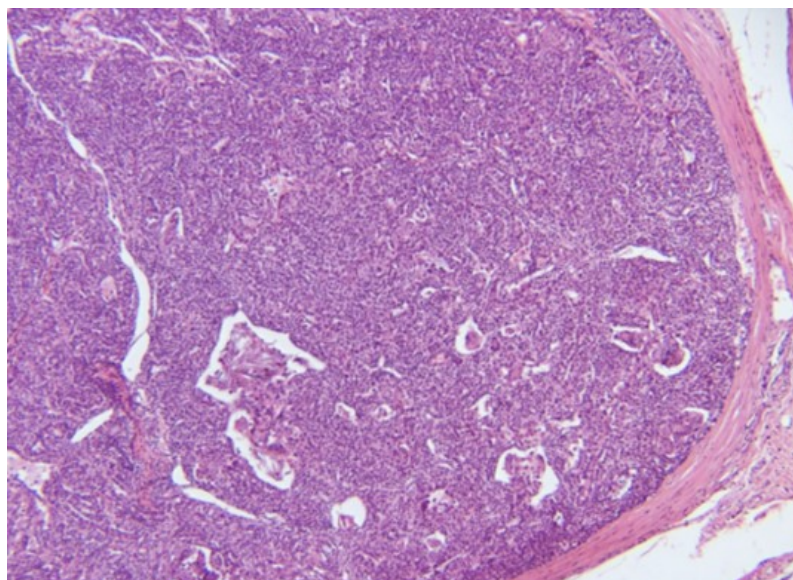


Рисунок 7 – Внутрипротоковая аденома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 27. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100

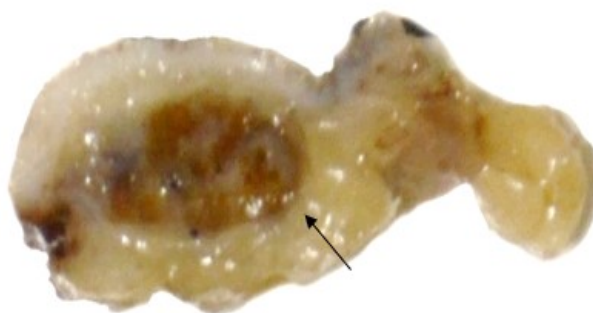


Рисунок 8 – Внутрипротоковая аденома молочной железы, макропрепарат (черная стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 27

Рисунки 9, 10 – фиброаденома молочной железы. Опухоль сформирована множественными, в т. ч. ветвящимися тубулярными структурами различного диаметра, окруженными обильной плотной неоформленной соединительной тканью. Тубулярные структуры выстланы многорядным призматическим, на отдельных участках уплощенным, эпителием. Клетки эпителия средних размеров, с эозинофильной, светлой цитоплазмой, с неразличимыми клеточными границами, ядра небольших размеров, округлые, немного вытянутой формы, нормохромные с мелко- и грубодисперсным хроматином. Клетки эпителия с признаками слабо выраженного полиморфизма, определяется небольшое количество митозов. В соединительной ткани выявляются большое количество зрелых фиброцитов и многочисленные, разрозненные фибробласты с небольшими монотрофными овальными и немного вытянутыми нормохромными ядрами. Цитоплазма фиброцитов и фибробластов эозинофильная, с неразличимыми границами, сливающимися с внеклеточным эозинофильным матриксом.

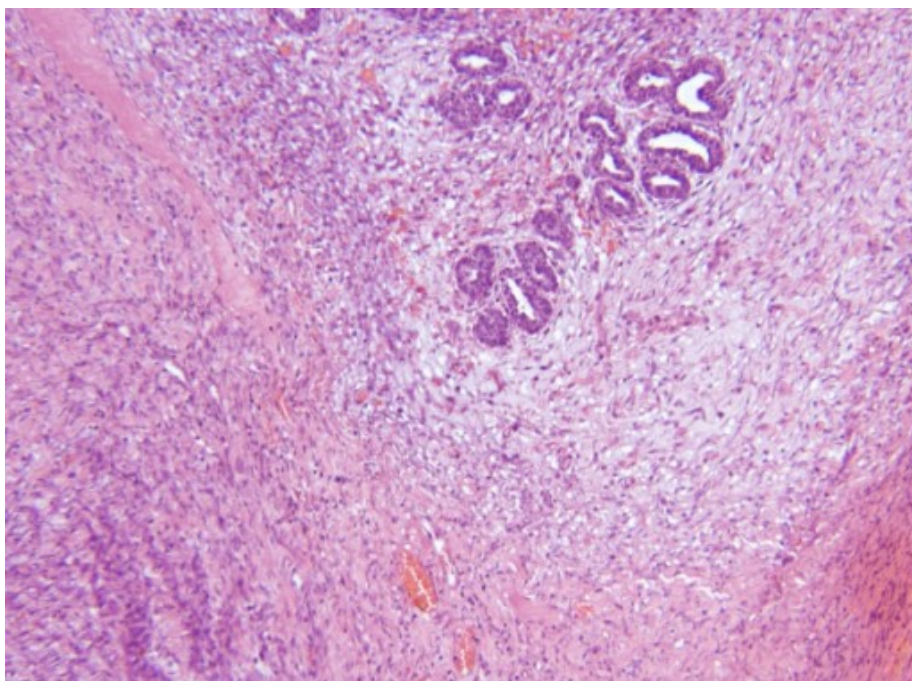


Рисунок 9 – Фиброаденома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 14.
Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100



Рисунок 10 – Фиброаденома молочной железы, макропрепарат. Сука, № 14

Рисунки 11, 12 – высокодифференцированная аденокарцинома молочной железы. Опухоль преимущественно тубулярного строения. Клетки средних размеров, плотно расположены друг к другу, округлые, полигональные, с умеренно выраженным полиморфизмом, с неразличимыми клеточными границами, с умеренно выраженной, эозинофильной цитоплазмой. Ядра средних размеров, слабо полиморфные, округлые, светлые с мелкодисперсным хроматином, во многих ядрах хорошо заметны мелкие ядрышки. Митотическая активность низкая (до 9 митозов в 10 полях зрения при увеличении 400). Строма в опухоли слабо развита, представлена тонкими прослойками фиброзной соединительной ткани с очаговым гиалинозом. Наблюдаются обширные очаги некроза с умеренно выраженной полиморфноклеточной инфильтрацией. Опухоль не имеет капсулы. Отмечаются очаги инвазивного роста.

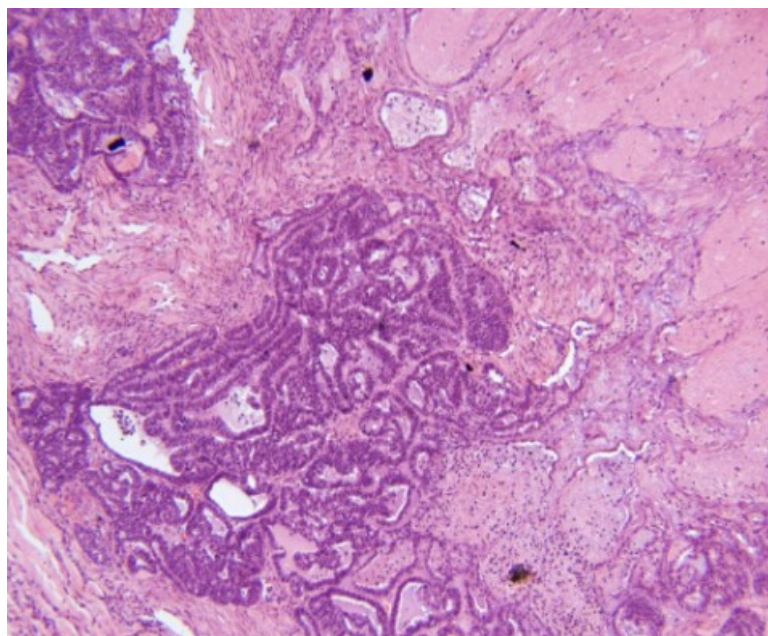


Рисунок 11 – Высокодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 19. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100

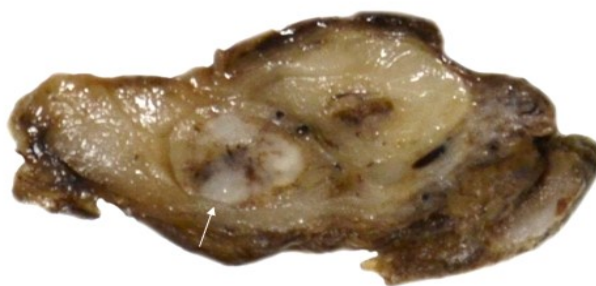


Рисунок 12 – Высокодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (белая стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 19

Рисунки 13, 14 – умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы. Опухоль тубулярно-папиллярного, местами альвеолярно-трабекулярного строения. Клетки средних размеров, плотно расположены друг к другу, округлые, полигональные, с умеренно выраженным полиморфизмом, с неразличимыми клеточными границами, с умеренно выраженной, эозинофильной цитоплазмой. Ядра средних размеров, умеренно полиморфные, округлые, светлые с мелкодисперсным хроматином, во многих ядрах хорошо заметны мелкие ядрышки. Митотическая активность умеренная (от 10 до 19 митозов в 10 полях зрения при увеличении 400). Строма в опухоли слабо развита, представлена тонкими прослойками фиброзной соединительной ткани с очаговым гиалинозом. Наблюдаются обширные очаги некроза с умеренно выраженной полиморфноклеточной инфильтрацией. Опухоль не имеет капсулы. Отмечаются очаги инвазивного роста.

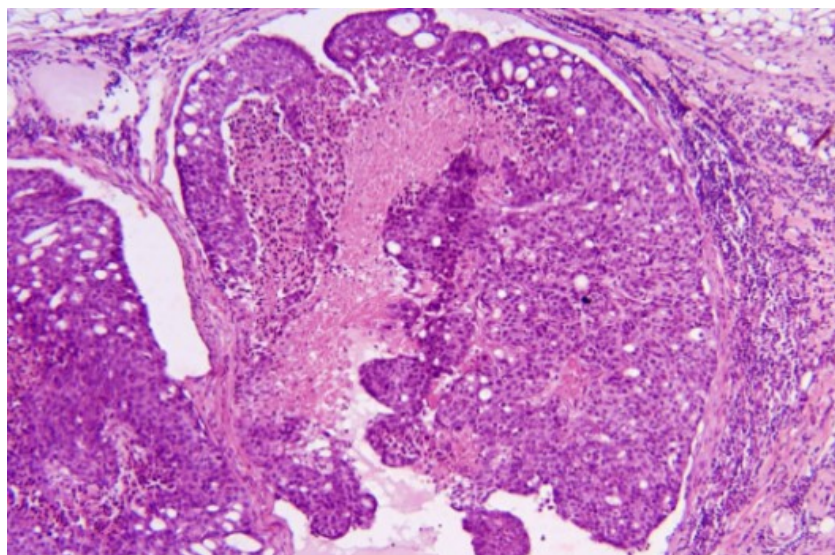


Рисунок 13 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 17. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100



Рисунок 14 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (белая стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 17

Рисунки 15, 16 – низкодифференцированная аденокарцинома молочной железы. Опухоль альвеолярно-солидного, местами тубулярно-папиллярного строения. Клетки средних и крупных размеров, относительно плотно расположены друг к другу, округлые, полигональные, неправильной формы, часто с выраженным полиморфизмом, с неразличимыми клеточными границами, с умеренно выраженной, эозинофильной цитоплазмой. Ядра средних и крупных размеров, с выраженным полиморфизмом, округлые, светлые с мелкодисперсным хроматином, во многих ядрах хорошо заметны мелкие и крупные ядрышки. Митотическая активность высокая (более 19 митозов в 10 полях зрения при увеличении 400). Строма в опухоли слабо развита, представлена тонкими прослойками фиброзной соединительной ткани. Наблюдаются обширные очаги некроза. Опухоль не имеет капсулы. Отмечаются очаги инвазивного роста. На рисунке Г стрелками обозначены очаги эндолимфатической инвазии.

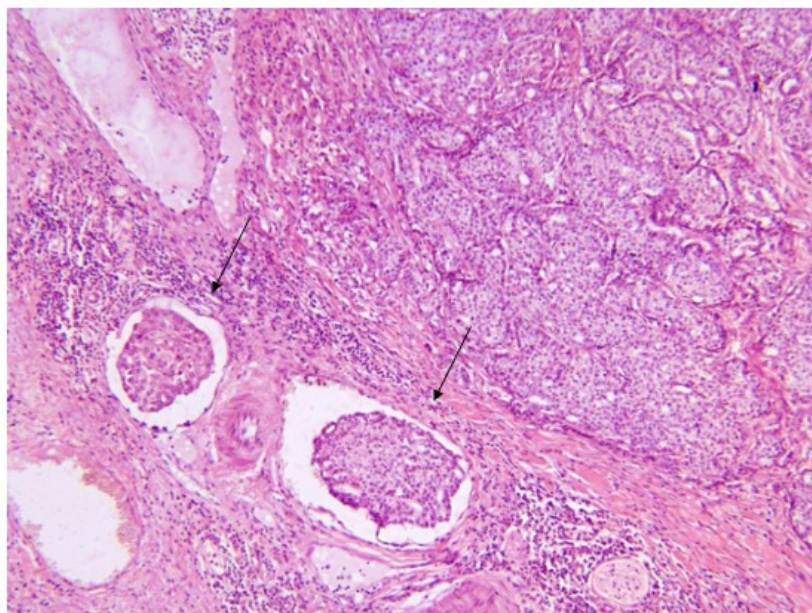


Рисунок 15 – Низкодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат (черная стрелка – очаги эндолимфатической инвазии). Сука, № 10. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100

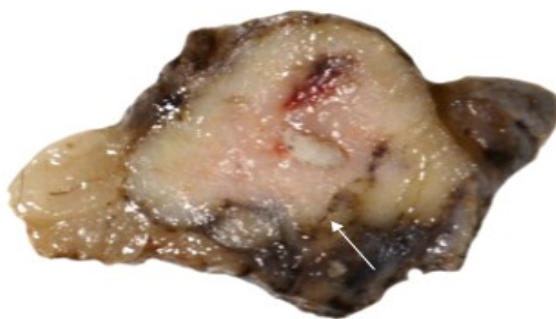


Рисунок 16 – Низкодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (белая стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 10

Доказано, что более 50% опухолей молочных желез — злокачественные. Они классифицированы как эпителиальные – аденомы, карциномы, мезенхимальные – доброкачественные (название по типу ткани), злокачественные и смешанные опухоли. Эти опухоли можно далее классифицировать по типам клеток на сложные и простые. Сложные опухоли содержат как эпителиальные секреторные, так и миоэпителиальные компоненты, простые аденокарциномы могут содержать компоненты протоков, кистозные и папиллярные компоненты. Простые карциномы могут быть солидными, веретеночлеточными, анапластическими, плоскоклеточными (аденосквамозный рак), секретирующими или муцинозными (Morris, J. S., 2009).

Результаты исследования церулоплазмينا в сыворотке крови у собак различных групп

В ходе исследования сыворотки крови от подопытных животных спектрофотометрическим методом с использованием парафенилендиамина, получили следующие результаты: среднее значение содержания уровня

церулоплазмина у здоровых животных, животных с доброкачественными/неопухолевыми, высокодифференцированными и умереннодифференцированными новообразованиями составило 428,8 мг/л. Средний уровень церулоплазмина при низкодифференцированных высокозлокачественных новообразованиях составляет 1032,5 мг/л.

Клинические диагнозы и результаты содержания церулоплазмина представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Средние значения результатов исследований сыворотки крови у собак на содержание церулоплазмина, мг/л

Группа животных	Содержание церулоплазмина, мг/л, М±m
Клинически здоровые животные	367,5±130,2
Животные с неопухолевыми/доброкачественными новообразованиями	411,3±87,5**
Животные с высокодифференцированными новообразованиями	507,5±78,8×, □
Животные с умереннодифференцированными новообразованиями	533,8±87,5*, ××, +
Животные с низкодифференцированными новообразованиями	1032,5±245*, ++, □□

Примечания:

** - $p \geq 0,05$ по сравнению с группой клинически здоровых животных

× - $p = 0,05$ по сравнению с группой клинически здоровых животных

* - $p \leq 0,01$ по сравнению с группой клинически здоровых животных

□ - $p \leq 0,01$ по сравнению с группой животных с неопухолевыми/доброкачественными новообразованиями

++ - $p \leq 0,01$ по сравнению с группой животных с высокодифференцированными новообразованиями

×× - $p = 0,05$ по сравнению с группой животных с неопухолевыми/доброкачественными новообразованиями

+ - $p \geq 0,05$ по сравнению с группой животных с высокодифференцированными новообразованиями

□□ - $p \leq 0,01$ по сравнению с группой животных с умереннодифференцированными новообразованиями

Таким образом, анализ данных показывает достоверное различие между уровнем церулоплазмина в сыворотке крови у собак с низкодифференцированными новообразованиями и остальными группами, в которых различия уровня церулоплазмина незначительное. При проведении исследования мы получили следующие результаты: среднее значение содержания уровня церулоплазмина у здоровых животных составил 367,5

мг/л, у животных с доброкачественными новообразованиями – 411,3 мг/л, с высокодифференцированными – 507,5 мг/л и умереннозлокачественными новообразованиями 533,8 мг/л. Уровни белка у данных категорий животных не являлись клинически значимыми, однако средний уровень церулоплазмينا при низкодифференцированных высокозлокачественных новообразованиях составил 1032,5 мг/л, что дало возможность отдифференцировать эту категорию животных для проведения более радикального лечения. Эти данные позволяют улучшить результаты лечения. При анализе результатов минимальный уровень церулоплазмينا, являющийся показанием к проведению дополнительного лечения составил 787,5 мг/л. (рисунок 17).

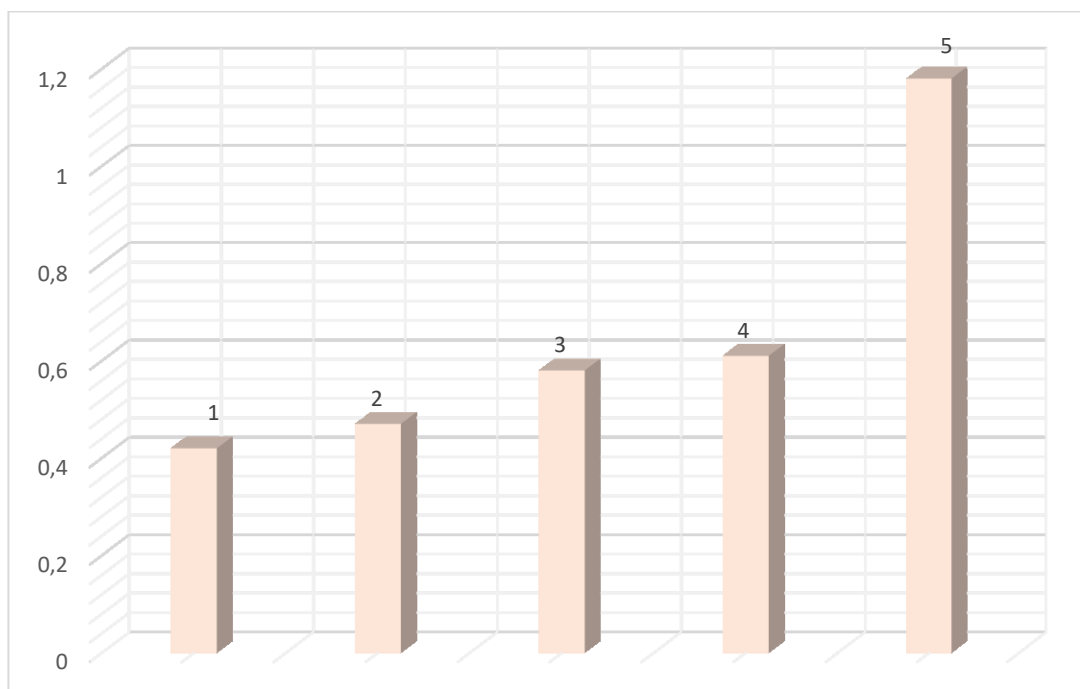


Рисунок 17 – Уровни церулоплазмينا у собак исследуемых групп, где: 1 – клинически здоровые животные; 2 – собаки с неопухолевыми/доброкачественными новообразованиями; 3 – собаки с высокодифференцированными новообразованиями; 4 – собаки с умереннодифференцированными новообразованиями; 5 – собаки с низкодифференцированными новообразованиями.

Мы определили уровень церулоплазмينا в сыворотке крови как показатель прогрессирующего рака молочной железы у животных и определили, что уровень острофазного белка отражает уровень опухолевой нагрузки на организм. Самый высокий уровень белка при состоянии, не требующем предварительное лечение и широких хирургических границ составил 717,5 мг/л. Самый низкий уровень церулоплазмينا, при новообразованиях, нуждающихся в химиотерапии, составил 787,5 мг/л. Эти данные позволили разделить животных на терапевтические группы, т. е. животные с новообразованиями молочной железы T1-T2, без лейкоцитарного

сдвига и уровнем церулоплазмينا от 787,5 мг/л нуждались в неоадьювантном химиотерапевтическом лечении и более широких границах резекции, соответственно, собаки остальных 3-х групп могли обойтись минимальным оперативным вмешательством без риска последующего рецидива.

Исходя из проанализированных данных, церулоплазмин повышается при опухолевых процессах за счет участия в антиоксидантных реакциях и посредством стимуляции ангиогенеза, указывая на степень злокачественности опухоли и распространенность поражения тканей молочной железы. Также, ввиду особенностей взаимоотношения церулоплазмينا и неопластической ткани, он может являться ранним предиктором развития опухоли молочной железы. Полученные нами в ходе исследования данные показали повышение уровня церулоплазмينا при новообразованиях молочной железы, гистологически характеризующиеся более злокачественными критериями. При расчете доверительного интервала, отмечено, что только уровень церулоплазмينا у животных с низкодифференцированными новообразованиями является достоверно значимым относительно всех групп животных.

Повышение уровня церулоплазмينا при низкодифференцированных опухолях позволило вовремя принять решение о радикальном лечении с дополнительным использованием нео- и адьювантной химиотерапии, когда клетки опухоли являлись наиболее чувствительными к цитостатикам, что значительно улучшило результаты лечения, повысило качество жизни и увеличило ее продолжительность. Все результаты лечения не расходились со статистическими данными литературных руководств.

Заключение

Согласно проведенным нами исследованиям, уровень церулоплазмينا менялся в зависимости от состояния молочной железы при опухолевых процессах за счет повышения его в крови для стимуляции ангиогенеза. Стимуляторы ангиогенеза прямого действия, которые индуцируют рост сосудов вне зависимости от взаимодействия их с клетками других типов, делят на митогены, инициирующие пролиферацию эндотелиальных клеток и хемотаксические стимуляторы, которые вызывают направленную миграцию эндотелиоцитов. Кроме специфических стимуляторов роста, в ангиогенезе, обычно участвуют три важных компонента: простагландин E1, ионы меди и гепарин. Церулоплазмин – естественный переносчик ионов меди в плазме крови обладает свойствами индуктора ангиогенеза в опухолевых.

Результаты наших исследований показали корреляцию между уровнем церулоплазмينا и степенью злокачественности новообразований. При высокозлокачественных опухолях минимальный уровень церулоплазмينا достигал 787,5 мг/л. Мы предполагаем, что высокоагрессивные новообразования значительно влияют на уровень церулоплазмينا напрямую за счёт изменения содержания активных форм кислорода.

Выводы

Исходя из полученных результатов были сделаны следующие выводы:

1. определен уровень биохимических, гематологических показателей крови у клинически здоровых сук. Все показатели крови находились в пределах референсных значений. Определен уровень биохимических, гематологических показателей крови у сук с новообразованиями молочных желез разной степени злокачественности. Все показатели крови сук экспериментальных групп соответствовали значениям показателей крови контрольной группы;

2. проведена оценка состояния внутренних органов и тканей с помощью методов визуальной диагностики у сук контрольной и экспериментальных групп. Анатомические, структурные характеристики органов и тканей отклонений не имели;

3. определен уровень церулоплазмينا в сыворотке крови у клинически здоровых сук. Среднее значение составило 367,5 мг/л. Определен уровень церулоплазмينا в сыворотке крови у сук с поражениями молочных желез различной степени злокачественности. Среднее значение содержания уровня церулоплазмينا у животных с доброкачественными новообразованиями – 411,3 мг/л, с высокодифференцированными – 507,5 мг/л и умереннозлокачественными новообразованиями 533,8 мг/л;

4. проведено сравнение показателей результатов обследования клинически здоровых и экспериментальных групп собак. Результаты показали незначительное повышение уровня церулоплазмينا у сук с доброкачественными, высокодифференцированными и умереннодифференцированными новообразованиями молочных желез относительно результатов уровня церулоплазмينا сук контрольной группы и значительную разницу между уровнем церулоплазмينا у сук контрольной группы и сук с низкодифференцированными новообразованиями;

5. выявлена зависимость уровня церулоплазмينا в сыворотке крови у сук со степенью злокачественности новообразований молочных желез. Статистически достоверно обнаруживается связь между новообразованиями, идентифицированными гистологически как низкодифференцированные, и повышенным уровнем экспрессии церулоплазмينا;

6. дополнен алгоритм ранней диагностики для сук с новообразованиями молочных желез с целью повышения эффективности лечения. Исследование уровня церулоплазмينا в сыворотке крови сук с новообразованиями молочной железы позволяет определить степень злокачественности новообразования до момента инвазивного вмешательства;

7. определена клиническая значимость метода определения церулоплазмينا с целью диагностики степени злокачественности опухоли молочной железы. Клинические испытания показали, что определение степени злокачественности новообразований молочной железы до момента инвазивного вмешательства позволяет правильно разработать тактику лечения, определить объем оперативного вмешательства, впоследствии вылечить животное

от опухолевого процесса, увеличить продолжительность жизни и улучшить ее качество.

Практические рекомендации

Используя предложенный нами способ диагностики опухолей, можно получать косвенную информацию о степени злокачественности опухоли, генерализации процесса. Опираясь на полученные данные об уровне церулоплазмينا в сыворотке больных животных, в сочетании с данными других методов исследования, можно получить более полную картину состояния организма, определить прогноз, раньше начать лечение и получить лучшие результаты терапии в целом.

Данный метод прост и быстр в проведении, не требует сложного оборудования и больших материальных затрат. Обосновано использование данного метода для комплексной диагностики онкологического процесса молочной железы.

Представленный метод исследований может быть рекомендован для практикующих ветеринарных врачей в качестве комплексной и сопутствующей диагностики опухолевого процесса молочной железы, т. к. найдены критерии для определения сроков начала лечения и определения объемов оперативного вмешательства.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Сведения, полученные в ходе выполнения экспериментальной работы по изучению корреляции уровня церулоплазмينا в крови с гистологическими критериями степени злокачественности опухолевых поражений дополняют теоретические знания о компонентах антиоксидантной системы и патогенезе опухоли молочной железы у собак.

Практические предложения по дальнейшей разработке темы, вытекающие из всего вышеизложенного, могут быть следующие:

- Изучить корреляцию церулоплазмينا со степенью злокачественности опухолей молочных желез у животных других видов;
- Расширить спектр компонентов антиоксидантной системы и оценить возможность их практического использования с целью диагностики или терапии новообразований;
- Изучить способы влияния на опухолевый васкулогенез и микроциркуляторное русло, ассоциированные с компонентами антиоксидантной системы;
- Изучить корреляцию церулоплазмينا со степенью злокачественности опухолей других типов у различных видов животных.

Список опубликованных работ по теме диссертации
Статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ

1. Летуновская, А. В. Церулоплазмин как компонент патогенеза при злокачественных новообразованиях молочной железы у собак / А. В. Летуновская // – Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2018. – № 4. – С. 263-266.
2. Летуновская, А. В. Церулоплазмин в качестве метода диагностики при оценке злокачественности новообразований молочной железы у животных / А. В. Летуновская, П. С. Бабич // – Международный вестник ветеринарии. – 2019. – № 1. – С. 149-153.

Статьи в других изданиях

3. Letunovskaja, A. V. Ceruloplasmin oscillation in non-inflammatory diseases of mammary gland in dogs / A. V. Letunovskaja // – European Journal of Biomedical and Life Sciences. – East West Assotiation for Advanced Studies. – 2017. – № 1. – С. 63-66.
4. Летуновская, А. В. Церулоплазмин при патологиях молочной железы невоспалительного характера у сук / А. В. Летуновская, П. С. Бабич // Сборник научных статей по итогам международнародной научно-практической конференции. – Издательство «КультИнформПресс». – 2017 г. – С. 12-14.
5. Летуновская, А. В. Церулоплазмин при патологиях молочной железы невоспалительного характера у собак / А. В. Летуновская // – Сборник научных статей XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье». – 2017 г. Т. 20. – С. 325-326.
6. Летуновская, А. В. Церулоплазмин как диагностический критерий при опухолях молочной железы у сук / А. В. Летуновская, К. В. Племяшов // – Сборник научных статей по итогам международной научно-практической конференции «Тенденции развития ветеринарной хирургии». – 2021 г. – С. 92-94.

Список сокращений и условных обозначений

TNM – tumor, nodus, metastasis (опухоль, узлы, метастазы)

КТ – компьютерная томография

МРТ – магнитно-резонансная томография