

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Летуновская Анна Владимировна

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

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

**Научный руководитель:**

доктор ветеринарных наук,

профессор, член-корреспондент РАН

**Кирилл Владимирович Племяшов**

Санкт-Петербург, 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Общая характеристика церулоплазмينا .....	11
1.2 Патогенетическая роль церулоплазмينا при новообразованиях молочной железы .....	16
1.3 Общая характеристика тканей молочной железы .....	20
1.3.1 Анатомические особенности молочных желез .....	20
1.3.2 Гистологические и иммуногистохимические особенности ткани молочных желез.....	22
1.4 Новообразования молочной железы .....	25
1.4.1 Этиология, эпидемиология опухолей молочных желез .....	25
1.4.2 Патогенез опухолей молочных желез .....	26
1.4.3 Классификации опухолей молочных желез .....	31
1.4.4 Клинические признаки опухолей молочных желез.....	36
1.4.5 Диагностика опухолей молочных желез.....	37
1.4.6 Лечение опухолей молочных желез .....	39
1.4.7 Прогнозы при злокачественных новообразованиях у сук .....	41
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1 Материалы, методы.....	43
2.2 Результаты исследований.....	50
2.2.1 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук контрольной группы .....	50
2.2.2 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук с неопухолевыми/доброкачественными новообразованиями .....	54
2.2.3 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук с высокодифференцированными новообразованиями .....	58

2.2.4 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук с умереннодифференцированными новообразованиями .....	63
2.2.5 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук с низкодифференцированными новообразованиями .....	67
2.2.6 Гистоморфологическая характеристика новообразований у сук всех экспериментальных групп.....	76
2.2.7 Результаты исследования церулоплазмينا у животных всех групп ..	91
3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	102
4. ВЫВОДЫ .....	107
5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ .....	109
6. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	110
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

## ВВЕДЕНИЕ

**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.

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 [156]. Наибольшее количество пациентов приходится на период от среднего возраста до десяти лет, после этого возраста процент заболеваний уменьшается [155]. 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 уже 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 [96, 155]. Кроме того, высок риск и у некоторых крупных пород, таких как английские спрингер спаниели, британские сеттеры, британские спаниели, немецкие овчарки, пойнтеры, доберманы и боксеры [155].

Диагностика патологий молочной железы складывается из большого количества методов. К ним относятся рентгенография и ультразвуковое исследование, компьютерная и магнитно-резонансная томографии (КТ, МРТ), гистологическое исследования 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 неоадьювантной химиотерапии.

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 [151, 160].

Опухоль в организме способствует развитию окислительного стресса – свободнорадикального процесса, сопровождающегося изменением 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 [26]. 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 [153]. 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 [5, 75].

**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 [127]. 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**

**Цель:** 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 клинически здоровых и экспериментальных сук;

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 зависимость 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 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 [64] и классифицировалась согласно данным международного общества ветеринарных патологов [155].

Методом исследования концентрации церулоплазмينا был выбран спектрофотометрический метод с использованием парафенилендиамина в качестве субстрата [19].

Статистически обрабатывали данные по методике Большева Л. Н. и Смирнова Н. В. в соответствии с правилами оценки аномальных 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 -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 42 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.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общая характеристика церулоплазмينا

В настоящее время круг заболеваний воспалительного генеза неуклонно расширяется, в т. ч. за счет форм, традиционно рассматриваемых как не воспалительные. Представление о воспалении как о системном процессе, всегда индуцирующем комплекс ответных реакций на уровне макроорганизма даже при наличии четко ограниченного очага, во многом связано с открытием комплекса белков острой фазы; С-реактивного белка; церулоплазмينا; фибриногена; протромбина; гаптоглобина и иммуноглобулинов [110]. Синтез этих белков, активирующийся под действием провоспалительных цитокинов, представляет собой универсальную защитную реакцию и наблюдается не только при инфекционных процессах, но и при травмах, опухолевых процессах и интоксикациях [23, 74]. Многообразие белков острой фазы связано с многокомпонентностью формирования воспалительного ответа, поэтому в их число входят не только протеины, относящиеся к разным семействам пентраксинов (С-реактивный белок), транспортные белки (церулоплазмин, трансферрин) и ингибиторы протеаз ( $\alpha$ 1-антитрипсин,  $\alpha$ 1-макроглобулин), но и факторы коагуляции и фибринолиза (фибриноген) [6, 78, 116].

Острофазные белки характеризуют ранний ответ, предшествующий изменениям показателей клинического анализа крови при патологических процессах в организме [103]. При развитии воспаления происходит индукция синтеза ряда белков, называемых положительными белками острой фазы воспаления. Концентрация в плазме крови некоторых из них, например, С-реактивного белка и сывороточного амилоида, возрастает в первые дни воспалительной реакции во много раз. К белкам острой фазы воспаления относят более 20 протеинов, в т. ч. и медьсодержащий гликопротеид церулоплазмин [2, 28, 63, 108, 146].

Одним из белков острой фазы воспаления является церулоплазмин. Его концентрация в сыворотке крови при развитии воспалительной реакции повышается значительно, что сравнимо с увеличением концентрации таких белков острой фазы воспаления, как фибриноген и гаптоглобин [77, 88]. Известно, что церулоплазмин, благодаря многочисленным эффектам проявляемой им функциональной активности, обладает рядом защитных свойств, которые связаны, в частности, с его антиоксидантной активностью, особенно актуальной при воспалении и опухолевом процессе, способностью повышать устойчивость организма к гипоксии [9, 157], стимулировать эритропоэз [43] и снижать токсический эффект антибиотиков [19].

Церулоплазмин – это альфа-2-гликопротеид, синтезируемый в печени и некоторыми клетками крови, головного мозга, легких, содержит 6-8 атомов меди. Ген церулоплазмина расположен на 3-й хромосоме.

Впервые он был получен из плазмы крови и охарактеризован в 1948 г. шведскими учёными К. Хольмбергом и К. Лауреллем [144].

Как известно, у млекопитающих медь выполняет ряд функций. Безопасный перенос меди осуществляет метаболическая система меди [48]. В соответствии с ролью белка в метаболизме меди и железа [19], тканевом ангиогенезе [70], антиоксидантной защите [24] и каскаде системы коагуляции [34] в организме, церулоплазмин представляет собой белок острой фазы, синтезируемый при воспалительных процессах, повреждениях тканей и некоторых злокачественных процессах [18]. Церулоплазмин является структурным и ферментным компонентом жизненно важных медьсодержащих ферментов [38]. От медь-опосредованного стимулирования эндотелиального фактора роста зависит процесс формирования сосудов [110]. В макрофагах взрослых млекопитающих сигнальная система, в которой одним из звеньев является медь, участвует в ранних этапах формирования иммунного ответа [1, 89].

Кроме того, медь участвует в регуляции клеточного цикла через индукцию апоптоза [34], контролирует баланс между гликолизом и дыханием, изменение которого ведет к перепрограммированию нормального энергетического метаболизма на специфичный для опухолевых клеток [81]. При этом свойство меди связывать и активировать молекулярный кислород в условиях патологии, может приводить к образованию активных форм кислорода [52-60, 141].

Учитывая огромную роль меди в жизненно важных процессах организма и структурную организацию церулоплазмينا, недостаток или избыток ее прямым образом отражается на кроветворении [14, 102, 149].

Существует много важных компонентов ангиогенеза, медь остается одним из важнейших, что доказывают многочисленные исследования эндотелиального компонента, пролиферации, образования кровеносных сосудов и роста опухоли с разрушением меди [61, 82, 92, 150]. Медь является необходимым кофактором в экспрессии, активации и секреции ключевых активаторов ангиогенеза через множественные механизмы. Медь является ключевым компонентом ферментов, включающих супероксиддисмутаза-1, протеин-1 сосудистой адгезии, и лизилоксидазы, участвующие в прайминге опухоли [16, 121].

У животных, находящихся на медьдефицитной диете, развивалась анемия, явившаяся прямым следствием нарушения продукции церулоплазмينا. Согласно многочисленным исследованиям, церулоплазмин регулирует процесс окисления железа, что позволяет железу связываться с трансферрином и переносить его тканям, таким образом, церулоплазмин обеспечивает равновесие между депонированием и использованием железа. Также значимой функцией является регуляция содержания железа в тканях организма, участие в окислительно-восстановительных реакциях, нейтрализации свободных радикалов, опосредованное участие в ангиогенезе [47, 71, 158]. Церулоплазмин

активирует процессы окисления липопротеидов низкой плотности, что позволяет его расценивать как маркер риска сердечно-сосудистых, печеночных, онкологических заболеваний и воспалительных процессов [3, 92].

Кроме того, отмечены изменения уровня церулоплазмينا в сыворотке крови во время беременности и в послеродовой период, хотя механизмы этих изменений не были раскрыты [68, 112].

Хотя печень считается основным источником церулоплазмينا, наблюдалось внепеченочная секреция, поэтому функции и регуляции церулоплазмينا должны рассматриваться в контексте внепеченочной экспрессии. Предыдущая работа указала на некоторые другие источники церулоплазмينا в синовиальной ткани [40], клетках сертоли крысы [94], крысином семеннике и сосудистом сплетении, беременной матке крысы [160]. В недавних исследованиях экспрессия печеночного церулоплазмينا была продемонстрирована у грызунов и человека тканями легких как клинически здоровых, так и во время воспаления и индуцированного гипероксией повреждения тканей [11, 104]. Из-за изменений активности церулоплазмينا, обусловленных метаболизмом во время беременности и лактации, а также недавнее исследование, демонстрирующее экспрессию гена церулоплазмينا, Jenifer L. Jaeger в своей работе описали проведенное исследование, рассматривающее ткань молочной железы как источник церулоплазмينا. В данном исследовании клеточно-специфическую экспрессию церулоплазмينا в ткани молочной железы определяли путем гибридизации. Исследование демонстрирует, что церулоплазминспецифическая матричная рибонуклеиновая кислота (мРНК) была ограничена полностью эпителием протоков молочной железы, без каких-либо признаков экспрессии окружающими мезенхимальными тканями [8]. Выявив экспрессию гена церулоплазмينا молочной железой у крыс, исследователи проанализировали линии клеток

нормальной и патологической ткани молочной железы в качестве источника церулоплазмин-специфического содержания мРНК и биосинтеза белка [33, 97 147]. Клеточные линии были биосинтетически маркированы и подвергнуты иммуноферментному анализу с конкретными антителами к церулоплазмину человека. Как видно из данных, обильный синтез церулоплазмина был найден в человеческой линии клеток аденокарциномы молочной железы. Эти данные свидетельствуют о том, что молочная железа также является одним из источников внепеченочного церулоплазмина. Присутствие церулоплазмина в молочных железах у самцов и небеременных самок животных, а также в тканях молочной железы во время препубертатного периода, предполагает, что этот белок играет роль в функции молочной железы, независимо от периодов беременности и лактации. [20, 156].

Роль церулоплазмина в организме представлена в виде схемы Рутницким А. Ю. (рисунок 1) [27].



Рисунок 1 – Роль церулоплазмина в организме по Рутницкому А. Ю.

Церулоплазмин, являясь составной частью нормальной сыворотки, как уже было написано, имеет тенденцию к повышению в острую фазу воспаления, во время беременности, после введения эстрогена. Также имеются данные, что пациенты с различными злокачественными процессами имеют повышенный уровень данного белка [35], особенно это проявляется при новообразованиях молочных желез.

## **1.2 Патогенетическая роль церулоплазмينا при новообразованиях молочной железы**

Высокие уровни церулоплазмينا у человека были косвенно связанных с высоким риском злокачественности опухолей молочной железы в эпидемиологическом исследовании [38, 51]. Плазменная медь, как правило, отражает уровень церулоплазмينا, поскольку этот белок содержит почти всю медь в плазме [107].

В исследованиях Jinong L. был проведен подобный анализ уровня сывороточного белка у пациентов с новообразованиями молочных желез. Автор отметил корреляцию между степенью злокачественности опухоли и уровнем церулоплазмينا. Корреляция также была обнаружена со степенью ответа на лечение [85].

В исследованиях Robert A. было обнаружено, что уровень церулоплазмينا повышен у пациентов с различными опухолями включая опухоль молочной железы [122]. Уровень белка был повышен у 89 из 103 пациентов с метастатической опухолью молочной железы. Более того, у 27 пациентов, которые ответили на лечение, средний уровень церулоплазмينا снизился на 35% ( $p < 0,001$ ), а у 22 пациентов, заболевание которых прогрессировало даже при лечении, средний уровень церулоплазмينا повышался на 44% ( $p < 0,001$ ). Также отмечено, что у пациентов при рецидивировании новообразования молочной железы уровень церулоплазмينا повышался за 16-34 недели до любых клинических симптомов [110]. В том же исследовании обнаружено, что при развитии



метастатического процесса, уровень церулоплазмина повысился даже после первоначального падения у пациентов, получавших адъювантную химиотерапию. При отсутствии адъювантного лечения первоначально повышенный уровень церулоплазмина не снижался вовсе. Проведенные исследования доказывают о необходимости адекватного лечения при борьбе с распространением опухоли [7, 36, 71, 120, 144].

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 [43]. Окислительный стресс является фактором риска развития опухоли молочной железы и может способствовать развитию этого заболевания [79, 127, 133, 139], в особенности это демонстрируется на ранней стадии заболевания [56, 162]. Это доказывает и Hongjun J. в своей работе по определению возможности окисленных модифицированных белков быть потенциальными биомаркерами для раннего выявления злокачественного новообразования молочной железы независимо от основного механизма [155]. Активные формы кислорода, которые отвечают за модификации окисленного белка, регулируют важные процессы в эпителиальных опухолях, такие как активация путей митоген-активируемой протеинкиназы – киназы, регулируемой внеклеточным сигналом (MAPK/Erk) и серин/треониновой протеинкиназы (PI3K/Akt) [52]. В культивируемых эпителиальных клетках молочной железы человека обнаружено, что оба эти пути передачи сигналов и внутриклеточные активные формы кислорода регулируют секрецию различных аутокринных факторов, паракринных факторов и матричных металлопротеаз [121].

Большинство опухолевых клеток запрограммированы на увеличенное поглощение глюкозы в цикле Кребса (Эффект Варбурга). Кстати, аннулирование эффекта Варбурга путем ингибирования

эпидермального фактора роста (EGFR) привело к значительному уменьшению опухоли и подчеркивает потенциал терапевтической модификации гликолиза [134].

В одном исследовании состояние организма с наличием опухоли сравнивали с состоянием при «незаживающей ране», подразумевая, что хронический окислительный стресс, ассоциированный с раневым поражением, имеет важное значение для развития опухоли. Кроме того, связанные с этим процессы могут увеличить количество активных форм кислорода в опухолях молочных желез, потенциально изменяя экспрессию генов и клеточной функции [37]. Стресс возникает, когда окислительный/антиокислительный баланс смещен в противоположную сторону в тканях и органах. Эти изменения приводят к множественным генетическим нарушениям [12], таким как облегчение мутаций и/или инактивация опухолевых генов-супрессоров и активация онкогенов [96, 145].

Окислительный компонент является физиологическим в тканях организма и во время метаболических, и воспалительных процессов активно участвует в компенсаторных реакциях. Может действовать на нескольких этапах малигнизации, трансформации, индукции изменений постоянных последовательностей дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) плазме [4]. Активность антиоксидантных ферментов, главным образом клеточных, играет решающую роль в канцерогенезе. [93]. Прогрессирование злокачественного процесса у больных новообразованием молочной железы характеризуется снижением уровня свободных радикалов на фоне увеличения оксидантной активности церулоплазмينا. [13].

Увеличение экспрессии некоторых белков острой фазы, в том числе церулоплазмينا, который часто сопровождает неопластический процесс, вызвано активностью интерлейкина-1 и фактором некроза опухоли.

В одном исследовании, наблюдалась повышенная активность оксидазы у пациентов с патологией молочной железы, легких, желудочно-кишечного тракта и опухолями репродуктивной системы [125]. Это говорит о том, что увеличение активности оксидазы церулоплазмينا связано с злокачественным процессом, возможно, без учета локализации. Повышенная концентрация церулоплазмينا в плазме обеспечит дополнительный источник меди для функционирования клеток нормальных тканей и опухолевых клеток. Опухолевые клетки характеризуются относительно высокими концентрациями меди [99, 154, 83]. Несколько видов опухолей, особенно молочной железы, легкого, печеночного, гинекологического рака [75, 100, 109] показывали повышенные концентрации меди в плазме. В исследованиях Marinescu S. была определена серия окислительных параметров стресса, в том числе ангиогенетический фенотип при окислительной деструкции в группе пациентов с новообразованиями [45]. Уровень перекисного окисления липидов ввиду наличия в организме неопластической ткани был увеличен.

Корреляция между уровнем церулоплазмينا и опухолевой нагрузкой был также отмечен Orrenius S. [114]. Церулоплазмин может служить полезным маркером оценки распространения опухолевого процесса и ответа на лечение у пациентов. Onizuka K. отметил, что уровни церулоплазмينا были повышены у 15 пациентов, у которых был рецидив опухоли молочной железы по сравнению с 13 пациентами, которые клинически были без прогрессирования опухоли молочной железы [113]. Он также отметил, что уровень церулоплазмينا повышался до клинических свидетельств рецидивирующего заболевания. Поэтому это может быть полезно в качестве прогностического фактора при принятии решения об использовании и выборе адъювантной терапии [36].

Чтобы определить, может ли быть использована конкретная модификация белка в качестве биомаркера, были происследованы

отдельные окислительные модификации белков, секретируемых тканью молочной железы. Уровни отдельных посттрансляционных белковых модификаций увеличены в опухолевой ткани молочной железы, о чем свидетельствуют некоторые исследования [9, 66, 130, 137, 141, 163].

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

### **1.3 Общая характеристика тканей молочной железы**

#### **1.3.1 Анатомические особенности молочных желез**

Молочная железа собаки множественная, состоит чаще всего из пяти пар молочных желез, среди которых, в зависимости от расположения, на вентральной поверхности тела с каждой стороны различают две грудных, две абдоминальных и одну паховую молочные железы. Независимо от породной принадлежности собак и размера животных могут развиваться шесть пар молочных желез, а иногда четыре пары, или число молочных желез на разных сторонах может быть неравным [39].

Каждая молочная железа имеет хорошо выраженный, имеющий форму тупого конуса сосок, который только в основании имеет тонкие волоски.

Между кожей и поверхностью паренхимы молочных желез у сук с каждой стороны располагаются тонкие волокна поперечно-исчерченных мышц.

Артерии к обеим грудным молочным железам у собак идут от ветвей внутренней грудной артерии, от латеральных кожных ветвей латеральной грудной артерии и каудально располагающихся дорсальных межреберных артерий, а также ветвей поверхностной краниальной надчревной артерии. Последняя прободает с каждой стороны вентральную стенку тела между мечевидным отростком и дугой ребра. Обе

абдоминальных грудных железы, а также паховая молочная железа получают артерии от каудально лежащих дорсальных межреберных артерий, а также поверхностной каудальной надчревной артерии. С латеральной стороны дополнительно идут ветви от краниальной брюшной и глубокой окружной подвздошной артерий. Поверхностные надчревные артерии ориентированы вдоль и проходят поверхностно около сосков, а их анастомозы чаще всего располагаются в области краниальной абдоминальной молочной железы. Отток венозной крови осуществляется через вены, которые проходят параллельно артериям. Разветвлений и соединений вен друг с другом больше, чем у артерий.

Лимфа отходит от обеих грудных и передних абдоминальных молочных желез к собственному подмышечному лимфатическому узлу и частично – к добавочному обеих сторон тела. Отдельные лимфатические сосуды могут проходить через вентральную грудную стенку к краниальному грудинному лимфоузлу. От каудальной абдоминальной и паховой молочных желез лимфа отходит в поверхностный паховый лимфатический узел. В области передней абдоминальной молочной железы краниально и каудально идущие лимфатические сосуды часто соединяются друг с другом. [39].

Иннервируют молочную железу, соски и кожу многочисленные чувствительные нервные волокна. Симпатические волокна иннервируют гладкую мускулатуру сосков, а также кровеносные сосуды, но не миоэпителиальные клетки [25]. Отдельные ветви от латеральных кожных ветвей от третьего грудного до второго поясничного нервов достигают молочной железы посегментно латерально и от вентральных кожных ветвей от третьего до десятого грудных нервов медиально. Паховая молочная железа включает ветви от половобедренного нерва [88, 128].

У собак с карциномой молочной железы имеются аномальные связи пораженных опухолью абдоминальных или паховой молочных желез с подмышечным лимфатическим узлом [10, 11].

У племенных сук были обнаружены две отдельные лимфатические сети, которые соединяют грудные железы, абдоминальные и паховую, соответственно [10].

### **1.3.2 Гистологические и иммуногистохимические особенности ткани молочных желез**

Основные изменения в гистологической структуре молочной железы у собак выявляются на следующих этапах: пре-пубертатный, эструс, ранний и поздний диэструс, ранний и поздний анэструс.

Строма (соединительная и жировая ткань, кровеносные сосуды, лимфатические узлы и нервы) молочной железы, которая формирует эпителиальные структуры, происходит от специализированной мезодермы [75].

Интерстициальная ткань может иногда содержать гистиоциты, плазматические клетки и мелкие лимфоциты. Подразделяется на две разные части: интралобулярная строма – состоит из свободно расположенных и более тонких коллагеновых пучков, тогда как межлобулярная соединительная ткань разделяет дольки и состоит из более толстого и более плотно организованного коллагена. Как эпителиальные, так и миоэпителиальные клетки находятся на базальной мембране и образуют ее, которая в основном состоит из коллагена типа IV, ламининов и протеогликанов сульфата гепарина. Удлинение и разветвление во время роста протоков достигаются за счет пролиферации эпителиальных клеток, которые проникают через разрывы между миоэпителиальными клетками [78].

Количество жировой ткани варьируется. В нескольких публикациях отмечены изменения в гистологии молочных желез у сук во время цикла эструса и при лактации [78].

Крупные межлобулярные протоки впадают в дистальный синус соска: эти межлобулярные протоки являются двухслойными, выстланы кубовидным эпителием с наружным слоем веретенообразных миоэпителиальных клеток. Меньшие дистальные межлобулярные протоки выстланы монослоем кубовидного эпителия с меньшим количеством миоэпителиальных клеток. Терминальные межлобулярные протоки продолжают в интралобулярные протоки, которые выстланы одним слоем кубовидного эпителия, окруженного прерывистыми веретенообразными миоэпителиальными клетками. Альвеолы выстланы одним слоем эпителиальных клеток, а снаружи - миоэпителиальными клетками звездчатой формы. Секретирующий альвеолярный эпителий высокий, от кубовидного до столбчатого с внутрицитоплазматическими липидными каплями, которые накапливаются внутри альвеолярного просвета [90].

Сосок покрыт эпидермисом и является конечной частью секреторной системы молочной железы. В дерме соска и вдоль большей протоковой системы расположены продольные и поперечные гладкомышечные волокна и эластическими волокна. Многочисленные папиллярные протоки (соски или собирательные протоки) открываются на поверхности сосков у собак. Протоки сосков выстланы многослойным плоским эпителием и окружены сфинктером гладких мышц. Каждый проток соска открывается в синус соска, который выстлан двухслойным кубическими или столбчатым эпителием с уплощенными миоэпителиальными клетками на внешней стороне протока. Между базальными эпидермальными кератиноцитами могут находиться меланоциты [90].

Маркеры клеточной дифференцировки.

В ткани нормальной молочной железы существуют две разные клеточные популяции, выстилающие протоки и альвеолы. Их специфическая морфология и функции могут незначительно отличаться в зависимости от местоположения и гормонального статуса.

Как правило, существует внутренний слой клеток эпителия просвета, который имеет многоугольную форму и защитную/секреторную функцию, и внешний слой, называемый базальными/миоэпителиальными клетками, поскольку обладает иммунофенотипом как эпителиальных клеток, так и гладкомышечных клеток, рядом с базальной мембраной. Они обычно имеют веретенообразную морфологию и сократительную функцию.

Дифференциация между эпителиальными клетками и базальными/миоэпителиальными клетками может быть выполнена с использованием антител к цитокератину.

У собак нормальные эпителиальные клетки молочной железы экспрессируют низкомолекулярные цитокератины [237], а базальные/миоэпителиальные клетки экспрессируют высокомолекулярные цитокератины [295].

Идентифицировать данные маркеры возможно только с помощью иммуногистохимии. Основные фенотипы поверхностных маркеров, связанные с характеристиками стволовых клеток, включают CD133 и CD44.

Также клетки-предшественники со свойствами стволовых клеток были обнаружены в молочной железе собак. В частности, клетки со свойствами, подобными стволовым клеткам (CD44+/CD24- и альдегиддегидрогеназная активность), были выделены из нормальной и неопластической ткани молочной железы собаки.



## 1.4 Новообразования молочной железы

### 1.4.1 Этиология, эпидемиология опухолей молочных желез

Новообразования молочной железы – патологический процесс, характеризующийся аномальной чрезмерной пролиферацией клеточного компонента тканей молочных желез [66].

Новообразования молочной железы очень распространены у собак, кошек и людей. У собак уровень заболеваемости зависит от географического положения и напрямую связан с проведением овариэктомии и ее сроками. В основном, поражаются суки, не кастрированные до первой течки [138]. Опухоли молочной железы являются наиболее распространенным новообразованием у половозрелых сук. Период возникновения колеблется в пределах от 7 до 13 лет.

Почти 50% всех этих новообразований являются злокачественными и более чем 95% из них являются карциномами. Степень злокачественности опухолей молочной железы собак можно оценить из ряда литературных данных, в которых сообщалось об увеличении частоты заболеваемости популяций собак во всем мире [24].

Как и у человека, причины возникновения карциномы молочной железы в каждом конкретном случае трудно определимы. Основными этиологическими факторами, способствующими возникновению онкологических заболеваний у животных, считаются:

- химические канцерогены (деготь, скипидар, креозот, асбест, бензол и др.);
- физические канцерогены (ионизирующее облучение, ультрафиолет);
- механическое раздражение;
- биологические факторы (вирусы, бактерии, наследственность и породная принадлежность, эндокринопатии);
- географические факторы.

На клеточном уровне причинами возникновения опухолевых патологий являются, в первую очередь, различные нарушения структуры хромосом в процессе деления, повреждения генома в виде точечных мутаций.

#### **1.4.2 Патогенез опухолей молочных желез**

Значимую роль в патогенезе этого заболевания играет измененная в результате особенностей племенного использования и заболеваний гуморальная регуляция, ведущая к патологической пролиферации эпителия молочных желез. Малое число родов и последующих лактаций, ложные щенности, заболевания половых органов могут являться факторами, обуславливающими возникновение опухолей молочных желез. Молочные железы, в силу своих физиологических особенностей, находятся в состоянии постоянной смены процессов пролиферации и инволюции. На процессы пролиферации эпителия молочных желез оказывают влияние эстроген и прогестерон, вырабатываемые яичниками и корой надпочечников, а также гонадотропные гормоны передней доли гипофиза, в первую очередь фолликулостимулирующий гормон [22]. В период беременности на процессы гиперплазии молочных желез большое влияние оказывают гормоны, вырабатываемые организмом матери и плацентой (пролактин). Под влиянием гормональных сдвигов нарушаются процессы физиологической эволюции и инволюции в молочных железах, развиваются очаги патологической пролиферации эпителия на фоне коллаgenoза и гиалиноза стромы и образования кист. На протяжении длительного времени, эти изменения ведут к развитию различных форм мастопатии, на фоне которых в ряде случаев происходит малигнизация.

Характерными свойствами опухолевой клетки является пониженная потребность во внешних сигналах для инициации и поддержания клеточной пролиферации – так называемая самодостаточность в пролиферативных сигналах [21, 86]. Оказалось, что многие типы

опухолевых клеток способны размножаться в среде с 1% и даже 0,1% сыворотки, т.е. при содержании ростовых факторов в десятки и сотни раз меньшем, чем необходимо для стимуляции размножения нормальных клеток [41, 120, 159]. Такая пониженная потребность в растворимых ростовых факторах достигается изменениями в системах внутриклеточной сигнализации, которые либо вызывают секрецию необходимых факторов роста самими трансформированными клетками, либо резко увеличивают количество рецепторов для необходимых факторов роста, либо запускают в отсутствие ростового фактора каскад событий, аналогичный тому, который в норме инициируется связыванием ростового фактора со своим рецептором [37, 72].

Получаемые извне сигналы роста способствуют возникновению митотической активности. К носителям подобных сигналов относятся растворимые факторы роста, некоторые компоненты экстрацеллюлярного матрикса, молекулы, осуществляющие межклеточную связь. Многие онкогены функционируют, продуцируя белки, маскирующиеся под нормальные сигналы роста [127, 131]. Соответственно, механизмом, запускающим патологические изменения, является: изменение внеклеточных сигналов роста, изменение трансмембранных передатчиков этих сигналов или внутриклеточных схем, запускающих митоз при участии этих сигналов [49, 50]. Это способствует непрерывной стимуляции пролиферативного процесса.

Нечувствительность к антипролиферативным сигналам. Вероятно, опухолевые клетки используют различные способы избежать терминальную дифференциацию клеток, включающую регуляцию клеточного цикла, в частности, переход к G1-фазе цикла.

Устойчивость к апоптозу опухолевых клеток часто обусловлена потерей гена-супрессора опухолевого роста – белка p53. Инактивация белка p53 наблюдается более чем при 50% неопластических заболеваний у

человека и животных. Это обуславливает остановку p53-зависимого каскада апоптоза. Сигналы, которые инициируемые такими факторами, как гипоксия, также вызывают апоптоз через p53.

Описанные выше особенности биологического поведения опухолевых клеток обеспечивают безграничный репликативный потенциал. В отличие от нормальных, неопластические клетки не имеют конечного репликативного потенциала, а процессы старения после определенного числа удвоений отсутствуют [101, 151]. Восстановление теломер выявлено практически во всех типах злокачественных клеток [106]. Старение культивируемых клеток может быть устранено путем отключения их белков pRb, p53 и других, что позволяет этим клеткам продолжать делиться, пока они не вступят в состояние так называемого кризиса, т.е. массовой гибели клеток, «кариотипическим хаосом», связанного со слиянием и разрушением хромосом.

Для выживания и функционирования клеток необходимы кислород и питательные вещества, поставляемые по сосудистому руслу. Развитие кровеносных сосудов контролируют факторы плазмы и их рецепторы, расположенные на поверхности эндотелиальных клеток. Каждый из них связывается с трансмембранными рецепторами специфических тирозинкиназ эндотелиальных клеток [84, 123]. Также в ангиогенезе участвует большое количество протеаз, влияющие как на ингибиторы, так и на стимуляторы пролиферации сосудистого эндотелия [133].

Условия для прогрессирования и метастазирования обеспечиваются микроокружением опухоли, к которому относятся экстрацеллюлярный матрикс, лейкоциты, тромбоциты и факторы системы коагуляции. Активируясь, они формируют преметастатическую нишу на ранних этапах перестройки матрикса и в дальнейшем обеспечивают необходимую защиту от иммунной системы при диссеминации опухоли [163].

Внутри паренхимы ткани молочной железы метастазирование зависит от эффективной навигации через ткань к сосудистой сети, успешной инвазии в систему кровообращения и лимфообращения, посредством чего опухолевая клетка может распространяться по всему организму (рисунок 2). В процессе инвазии и метастазирования, опухолевые клетки тесно взаимодействуют с базальной мембраной, что является первым шагом на пути метастазирования. Прикрепление реализуется соединением рецепторов поверхности опухолевых клеток с такими белками как фибронектин и ламинин. Во время второй стадии происходит локальная деградация базальной мембраны и матрикса протеиназами, секретруемыми опухолевыми клетками. Такие протеиназы могут разрушать в первую очередь структурные коллагеновые белки матрикса. На третьем этапе миграции опухолевые клетки проникают через базальную мембрану, где произошёл протеолиз. Направление миграции обусловлено хемотаксическими сигналами.

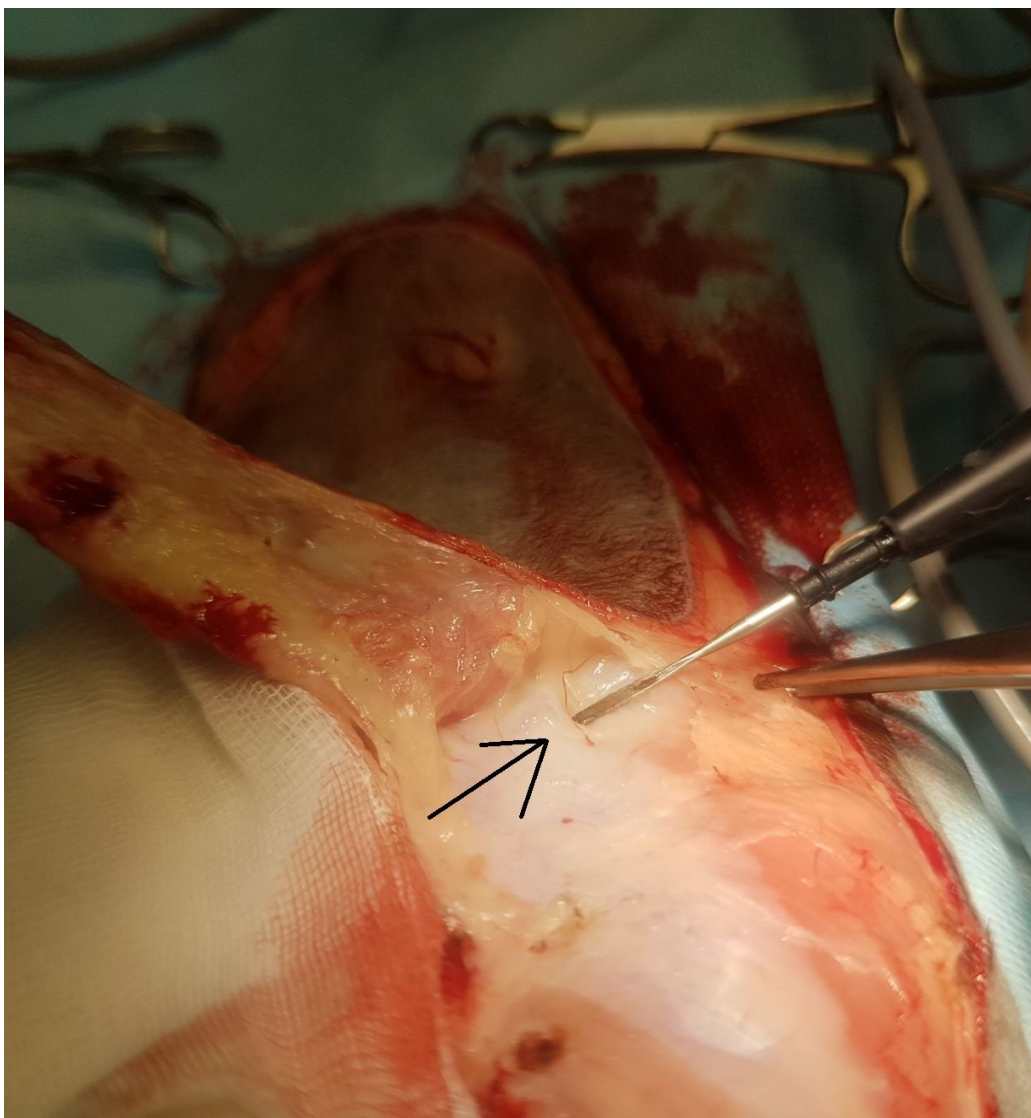


Рисунок 2 – Опухолевый ангиогенез (сосуд показан стрелкой) у 6-летней суки с умереннодифференцированной аденокарциномой молочной железы

Метастазирование осуществляется путем циклического повторения этих трех этапов [132, 160]. Метастазы могут распространяться как через кровь и/или лимфу, так и путем прямой инфильтрации. Чаще всего происходит распространение опухоли в соседние лимфатические узлы, гематогенное же распространение встречается реже. В соответствии с анатомическим строением системы лимфообращения собак опухоли, локализованные в первых, вторых и третьих парах молочных желез метастазируют в подмышечные и добавочные аксиллярные лимфатические

узлы, опухоли, локализованные в четвертых и пятых парах молочных желез – в паховые лимфоузлы.

Гематогенный путь метастазирования при новообразованиях молочной железы у собак также встречается. Гематогенные метастазы поражают в первую очередь легкие, реже – печень, значительно реже – селезенку, почки, надпочечники, сердце и в единичных случаях – кости и головной мозг [132]. При первичном поступлении метастазы молочной железы диагностируются у 16% собак.

Согласно литературным данным, метастазы опухоли появляются задолго до ее клинического проявления. Следовательно, возможность распространения опухолевых клеток появляется уже с ранним началом ангиогенеза в опухоли. Прежде считалось, что ангиогенез начинается после того, как количество опухолевых клеток превысит  $10^3$  (только 1000 клеток), а диаметр опухоли будет 0,5 мм. Однако процесс формирования в опухоли сосудов может начинаться еще раньше – при числе клеток, равном 100-200. С этого момента неопластические клетки уже могут попадать в кровяное русло [148].

Каждое из изменений является биологической адаптацией неопластических клеток к условиям живого организма. Считается, что данные превращения являются общими для большинства, а возможно, и всех видов опухолей животных и человека [160].

### **1.4.3 Классификации опухолей молочных желез**

Опухоли молочной железы собак являются биологически неоднородными новообразованиями, предполагающими несколько способов классификации на основе гистопатологических характеристик или экспрессии молекулярных маркеров. Несмотря на различия между опухолями молочной железы человека и собаки, в ряде исследований сообщается, что в обоих случаях имеется большое сходство в отношении экспрессии молекулярных маркеров, зависимости от гормонов и фенотипа

новообразования [17, 111]. Поэтому важно классифицировать опухоли молочной железы, чтобы определить связь между клиническими фенотипами, инвазией или степенью прогрессирования для разработки прогностических маркеров.

По гистологической классификации выделяют доброкачественные и злокачественные опухоли молочных желез. По статистике процент доброкачественных новообразований составляет 32%, злокачественных – 68% [94].

К основным категориям при гистологической классификации относятся:

- простые опухоли – относятся к новообразованиям, состоящим только из одного типа клеток, напоминающие либо эпителиальные клетки, либо миоэпителиальные клетки. Термины «аденома» или «рак», используемые без прилагательных «сложный» или «смешанный» обычно подразумевают простой тип;
- комплексные опухоли – относятся к новообразованиям, состоящим из двух типов клеток, морфологически напоминающих эпителиальные клетки и клетки, напоминающие миоэпителиальные клетки;
- смешанные опухоли – относятся к новообразованиям, которые состоят частично из клеток морфологически сходных с эпителиальными клетками или миоэпителиальными клетками, или и то и другое и частично морфологически напоминающих элементы соединительной ткани, обычно хряща и/или кости [106].

Гистологическая классификация поражений молочных желез представлены в таблице 1.

По клиническому течению различают 2 основные формы опухолей молочной железы:

- узловая
- диффузная



При прогрессировании новообразования молочной железы одна форма роста может переходить в другую [85].

Узловая форма составляет до 67% наблюдений у собак от всех случаев опухолей молочной железы. Из них 70% приходится на многоузловую и только 30% - на формы новообразований с единичными узлами. Клинически узловая форма характеризуется наличием одного или нескольких опухолевых узлов на фоне неизменной ткани молочной железы.

Диффузная форма встречается примерно в 33% случаев у собак. Клинически этот процесс может сопровождаться, как образованием опухолевого узла, так и его отсутствием. Подразделяется на инфильтративно-отечную, маститоподобную и панцирную формы опухолей молочной железы.

Инфильтративно-отечная (воспалительная) форма роста агрессивным течением с метастазированием в кожу и подкожную жировую клетчатку. Имеет неблагоприятный прогноз. У собак составляет 24% от всех диффузных опухолей молочной железы, носит первичный характер и значительно реже возникает вторично. При данном типе опухоли молочной железы проведение мастэктомии не рекомендуется ввиду высокой вероятности тромбоэмболии сосудов.

Маститоподобная форма роста характеризуется быстрым темпом роста. При этой форме можно наблюдать объемное образование в молочной железе, не имеющее четких контуров, малоподвижное или неподвижное относительно подлежащих тканей.

Всегда увеличены регионарные лимфатические узлы, поражение которых чаще носит характер реактивного лимфаденита, верифицированного патоморфологически. У собак составляет 74% среди всех диффузных опухолей молочной железы [159]

Таблица 1 – Гистологическая классификация поражений молочных желез [106, 156, 163]

Гиперплазия/дисплазия	Эктазия протока Дольковая гиперплазия (обычная, с секреторной активностью, с фиброзом, с атипией) Эпителиоз Папилломатоз Фиброаденоматозные изменения Гинекомастия
Доброкачественные опухоли	Простая аденома Внутрипротоковая аденома Протоковая аденома (с плоскоклеточной дифференциацией) Фиброаденома Миоэпителиома Комплексная аденома (аденомиоэпителиома) Доброкачественная смешанная опухоль
Злокачественные эпителиальные опухоли	Карцинома in situ Простая карцинома (тубулярная, тубулопапиллярная, кистозно-папиллярная, крибриформная) Инвазивная микропапиллярная карцинома Солидная карцинома Комедокарцинома Анапластическая карцинома Карцинома, возникающая в комплексной аденоме/смешанной опухоли Карцинома комплексного типа Карцинома и злокачественная миоэпителиома Карцинома смешанного типа Протоковая карцинома Внутрипротоковая папиллярная карцинома
Злокачественные эпителиальные опухоли – особенные типы	Плоскоклеточная карцинома Аденосквамозная карцинома Муцинозная карцинома Липидсодержащая карцинома Веретеночклеточная карцинома (злокачественная миоэпителиома, плоскоклеточная карцинома-веретеночклеточный вариант, карцинома-веретеночклеточный вариант) Воспалительная карцинома
Злокачественные мезенхимальные опухоли – саркомы	Остеосаркома Хондросаркома Фибросаркома Гемангиосаркома Другие саркомы
Карциносаркомы – злокачественные смешанные опухоли	
Опухоли соска	Аденома Карцинома Карцинома с эпидермальной инфильтрацией
Гиперплазия/дисплазия соска	Меланоз кожи соска

Панцирная форма роста – редкая разновидность, к основным признакам которой относятся выраженная гиперемия и утолщение кожи железы, внешне напоминающие рожистое воспаление. Заболевание протекает остро и сопровождается повышением температуры тела. Опухоль быстро метастазирует в регионарные лимфатические узлы и в отдаленные органы. Заболевание плохо поддается лечению и всегда имеет неблагоприятный прогноз. У собак такая форма встречается в 4% случаев от всех диффузных опухолей молочной железы [202].

В связи с тем, что злокачественные новообразования характеризуются местной инфильтрацией и метастазированием лимфогенным и/или гематогенным путем, основана анатомическая классификация солидных опухолей, которая включает в себя:

Первичную опухоль – tumor (T)

Метастазы в регионарные лимфатические узлы – nodus (N)

Отдаленные метастазы во всех тканях организма – metastasis (M)

При использовании в практической работе TNM классификации первым моментом является определение размеров новообразования. Таким образом: T0 – опухоль менее 0,5 см, T1 – опухоль менее 3-х см, T2 – опухоль 3-5 см, T3 – опухоль более 5 см, T4 – воспалительная карцинома. N0 – нет метастазов в регионарных лимфоузлах; N1 – имеется поражение регионарных лимфоузлов. M0 – нет данных о наличии отдаленных метастазов; M1 – есть отдаленные метастазы (легкие, кости, печень, другие органы) [39].

Клиническая классификация позволяет стадировать опухоли:

0 – опухоль in situ T0N0M0

I – T1N0M0

II – T2N0M0

III – T3N0M0

IV – T<sub>x</sub>N1M0 или T4N<sub>x</sub>M<sub>x</sub>

V – TхNхM1

Также разработана гистопатологическая классификация [156]:

Gх – степень дифференцировки ткани не может быть установлена.

G1 – высокая степень дифференцировки.

G2 – средняя степень дифференцировки.

G3 – низкая степень дифференцировки.

G4 – недифференцированная опухоль.

Использование данной классификации для стадирования онкологического процесса дает возможность уточнить диагноз, определить прогноз и разработать оптимальную схему лечения опухолей молочной железы [106].

#### **1.4.4 Клинические признаки опухолей молочных желез**

Клиническими проявлениями опухолей молочных желез могут быть как поражение единичных желез, так и множественное поражение с одной или обеих сторон. Несмотря на то, что у сук имеется пять пар молочных желез, большинство опухолей развивается на двух каудальных парах желез. При исследовании, как правило, определяется плотный узел с четкими границами, подвижный относительно кожных покровов и подлежащих тканей. Поражение может носить как множественный, так и одиночный характер. В некоторых случаях опухоль может быть изъязвлена и спаяна с кожей и подлежащими тканями. При пальпации и наружном осмотре не сложно диагностировать диффузные опухоли. Как правило, подобная форма характеризуется выраженным перифокальным воспалением, отсутствием четких контуров, быстрым ростом, и клинически ее непросто отличить от воспалительных процессов в молочной железе (абсцесс, мастит и т.д.) [31].

Существует множество моделей роста опухолей молочных желез. Некоторые — локальные, хорошо инкапсулированные — растут только локализованно. Другие инфильтрируют окружающие ткани как на микро-,

так и на макроуровне. Клиническое течение болезни может быть, как продолжительным, так и быстрым. Большинство опухолей молочных желез являются случайными находками во время обычного общего осмотра, который проводится по другим причинам.

Прогрессирование опухолей молочной железы включает:

- инвазивный рост с прорастанием в окружающие фасции, мышцы и кожу;
- инфильтративный рост с образованием кожных метастазов, наиболее характерный для первичных опухолей собак;
- рецидивирующие опухоли;
- метастазирование лимфогенным путем [163].

#### **1.4.5 Диагностика опухолей молочных желез**

При диагностике новообразований молочной железы у собак необходимо проводить следующие манипуляции [29]:

- Сбор анамнеза – длительность течения заболевания, темпы роста опухоли, этапы развития заболевания (например, эпизоды активного роста после течки), дополнительные факторы, которые могут влиять на темпы роста опухоли (прием гормональных препаратов для подавления течки). Обращают внимание на наличие псевдолактаций и их число, частоту родов у животного. Также необходима информация о состоянии животного на момент осмотра, наличии сопутствующих патологий, заболеваний, по поводу которых животное когда-либо проходило лечение [20].
- Клинический осмотр проводят в положении животного лежа на спине и стоя. Опухоли молочных желез обнаруживаются с помощью пальпации. Во время исследования отмечают размер образований, их число, форму роста опухоли, ее подвижность относительно окружающих тканей и кожных покровов, наличие воспаления, отека, выделений из сосков, язв, кист и т.д. Для сравнения поочередно пальпируют обе груды

молочных желез. Отдельное внимание уделяют регионарным лимфатическим узлам и кожным покровам по ходу регионарного лимфооттока. При осмотре важно обращать внимание на следующие клинические признаки, характерные для злокачественного роста: язвенно-некротический дефект на поверхности опухоли, спаянность опухоли с кожными покровами, отсутствие четких границ между опухолью и здоровой тканью, наличие перифокального воспаления, инфильтрацию кожи и лимфатических путей, рецидивный рост, наличие кожных метастазов. При аускультации пристальное внимание уделяется наличию шумов у собаки. При проведении бимануальной пальпации брюшной стенки можно определить размер матки и обнаружить наличие метастазов в органах брюшной полости [159].

- Морфологические методы исследования – цитологическое исследование проводится на начальном этапе для определения направления лечения. По последним данным цитологическое исследование в предоперационный период не целесообразно, ввиду низкой информативности при диагностике степени злокачественности [156]. Алгоритм оперативного вмешательства при любом результате исследования не меняется, а показания к химиотерапии новообразований молочных желез определяются исключительно по гистологическому исследованию. Далее проводится гистологическое исследование – исследование образца ткани опухоли – для постановки окончательного диагноза. Однако проведение гистологического исследования занимает длительный период времени. Вспомогательный иммуногистохимический метод применяется для исследования слабо дифференцированных новообразований [15, 156].

- Дополнительные методы диагностики – рентгенологическое исследование на предмет метастатического поражения органов грудной полости и костей. Ультразвуковое исследование проводится с целью

обнаружения метастазов в органах брюшной полости и лимфатических узлах. Компьютерная и магнитно-резонансная томографии в некоторых случаях необходимы для выявления отдаленных метастазов. Также нужны дополнительные лабораторные исследования: клинический, биохимический анализы крови, чтобы проверить наличие/отсутствие воспалительного процесса, анемии и лейкопении, на основе которых определяется возможность проведения операции и/или химиотерапии [159].

Если противопоказания для оперативного вмешательства отсутствуют, то с целью исключения патологий сердечно-сосудистой системы и подтверждения безопасности проведения общей анестезии, необходим стандартный прием кардиолога, который может включать в себя электрокардиографию (ЭКГ), эхокардиографию (ЭхоКГ) [159].

После получения данных клинического и морфологического исследования для окончательной классификации опухолевого процесса используется система TNM для единичных неоплазм.

#### **1.4.6 Лечение опухолей молочных желез**

Основным методом лечения опухолей молочной железы является хирургическое удаление. При невозможности хирургического вмешательства основным лечением становится химиотерапия [94, 102].

Для выбора хирургических границ требуется учитывать размер, изъязвление, прикрепление к брюшной стенке, подвижность покрывающей кожи, свидетельство распространения опухоли через кожные лимфатические каналы и вовлечение лимфатических узлов.

Поверхностные паховые лимфатические узлы удаляют вместе с паховыми молочными железами, потому что они лежат в одной с ней жировой ткани, а подмышечные лимфатические узлы удаляют, только если они увеличены или есть цитологические доказательства присутствия в них

метастазов. Однако лимфодиссекция не влияет на состояние организма [44, 125].

Доброкачественные новообразования требуют лишь хирургического иссечения. Злокачественные новообразования, в основном, нужно лечить комплексно, прибегнув к хирургическому и консервативному лечению [115, 161].

При первично-операбельном новообразовании молочной железы (узловатая форма роста) первым этапом лечения является операция, с последующим наблюдением за состоянием животного. Показаниями к проведению химиотерапии являются некоторые критерии гистологической злокачественности, которые будут указаны ниже [119, 138, 152].

Первично-неоперабельными опухолями являются местно-распространенные опухоли, диффузные и воспаленные формы, рецидивы. При таких новообразованиях показана как неоадьювантная (дооперационная), так и адьювантная (послеоперационная) химиотерапия.

Неоперабельные опухоли молочной железы (генерализованные новообразования, метастазирование) лечатся консервативно.

Химиотерапевтическое лечение. Этот метод лечения является основным из консервативных. Современные противоопухолевые препараты дают возможность продлить жизнь пациентов с операбельными новообразованиями после проведенной операции и улучшить качество жизни животных с неоперабельными новообразованиями. Основной мишенью противоопухолевых препаратов являются клетки, находящиеся в стадии активного деления, что определяет эффективность воздействия не только на первичную опухоль, но и на процессы метастазирования и рецидивирования [32].

Цитотоксические лекарства убивают опухолевые клетки в соответствии с первым правилом химической кинетики: данная доза лекарства убивает определенный процент опухолевых клеток лекарств



[117]. Из этого можно сделать следующие выводы: во-первых, лекарство действует на все опухолевые клетки; во-вторых, скорость роста у всех опухолей одинакова; в-третьих, соотношение чувствительных и устойчивых клеток одинаково по всей массе опухоли [142, 143].

Об успешности проведенной терапии патологий молочной железы судят по ряду факторов. К ним относятся: общее состояние пациента, рецидивирование процесса, появление и рост метастазов. Для этого используют рентгенологические и ультразвуковые методы диагностики, лабораторные исследования, а также можно использовать определение уровня церулоплазмينا как онкомаркера, снижение до нормы последнего может говорить об эффективности лечения.

Химиотерапия направлена на ограничение метастатического потенциала первичной опухоли (при карциноме молочных желез).

Лучевая терапия. В ветеринарной онкологии пока отсутствуют данные об успешном применении этого метода лечения. Но есть клинические свидетельства об ограниченном успехе облучения. В основном оно использовалось перед операцией для уменьшения опухолевой массы.

Гормональная терапия. Практически не используется, однако у сук были выявлены случаи неоплазии молочных желез, когда рост опухолевых клеток управлялся эстрогеном и прогестероном, на которые реагировали клеточные рецепторы этих гормонов [39].

#### **1.4.7 Прогнозы при злокачественных новообразованиях у сук**

Прогноз при опухолях молочных желез зависит от множества факторов. Это гистологический тип, инвазия (хирургические границы), размер и объем опухоли, активность рецепторов. В одном обширном исследовании было показано, что послеоперационная продолжительность жизни сук, страдающих различными типами карцином, составляет 70 недель. И тем не менее продолжительность жизни животных зависит от

гистологического типа опухоли. Так, у сук с хорошо дифференцированными карциномами, наличие опухоли не влияют на продолжительность жизни, в то время как средняя продолжительность жизни животных с солидными и анапластическими карциномами составляет соответственно 36 и 11 недель. Если хирургические границы инфильтрированы, то послеоперационная продолжительность жизни намного снижается. При саркомах в основном очень неблагоприятный прогноз — средняя продолжительность жизни составляет 6 месяцев [94].

Размер и объем опухоли являются важными прогностическими показателями, по крайней мере в двух исследованиях была показана зависимость прогноза от первоначального размера опухоли. Например, опухоль объемом 3 см<sup>3</sup> рецидивирует каждые 24 месяца в 30-40% случаев. При оценке объема опухоли всегда следует помнить о ее гистологическом типе, потому что от маленькой анапластической карциномы животные умирают в течение 16 недель [77, 91].

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы, методы

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 3). 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).

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.

## Материалы исследований



Рисунок 3 – Распределение собак по группам

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 4).

### Сбор анамнеза

В анамнез болезни включали данные о длительности течения заболевания, темпах роста опухоли, этапах развития заболевания, лечении. В анамнез жизни – данные о наличии псевдолактаций и их число, частоту родов у животного, о состоянии животного на момент осмотра, наличии сопутствующих патологий, заболеваний, по поводу которых животное когда-либо проходило лечение.

### Клинический осмотр

Общий осмотр и пальпация включали оценку упитанности, положения тела в пространстве, походки и поведения, внешние слизистые обо-

лочки, скорость наполнения капилляров, размер лимфатических узлов, их подвижность, болезненность.

При осмотре и пальпации образований оценивали размер, их число, форму роста опухоли, ее подвижность относительно окружающих тканей и кожных покровов, наличие воспаления, отека, выделений из сосков, язв, кист. Аускультировали наличие патологических шумов. Пальпировали брюшную полость на наличие возможных анатомических изменений.

### Схема эксперимента, методы



Рисунок 4 – Схема эксперимента, методы исследований

#### Анализ крови

Для оценки общего состояния организма, выявления функциональных патологий внутренних органов, воспаления исследовали кровь по биохимическим и клиническим показателям. В состав биохимического исследования обязательно входили:

аланинаминотрансфераза, альбумин, щелочная фосфатаза, аспаратаминотрансфераза, желчные кислоты (общие), билирубин, холестерин, калий, кальций, хлориды, креатинкиназа, гаммаглутамилтрансфераза, креатинин, мочевины, глюкоза, натрий, фосфор, белок (общий), триглицериды, липаза. В состав клинического исследования – гематокрит, гемоглобин, эритроциты, эритроцитарные индексы: средняя концентрация гемоглобина в эритроците, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средний корпускулярный объем эритроцита, тромбоциты, лейкоциты, лейкоцитарные индексы: лимфоциты, нейтрофилы (палочкоядерные, сегментоядерные), моноциты, базофилы, эозинофилы.

Ультразвуковое исследование, рентгенография.

При проведении ультразвукового исследования брюшной полости следовали плану: печень, селезенка, поджелудочная железа, кишечник, почки, мочеточники, надпочечники, мочевого пузыря, уретра, матка, яичники, лимфатические узлы, оценка наличия свободной жидкости и объемных новообразований.

При рентгенографии оценивали: состояние бронхов и легких, сердца и сосудов, костных структур, наличие свободной жидкости и объемных новообразований, косвенно – анатомическое расположение органов брюшной полости.

Морфологические исследования

Гистологическая оценка новообразований проводилась в соответствии с действующими критериями по Элстону и Эллису [119] и классифицировалась согласно данным международного общества ветеринарных патологов [156].

Исследование церулоплазмина

Для исследования концентрации церулоплазмина был выбран спектрофотометрический метод с использованием парафенилендиамина

в качестве субстрата. Метод основан на регистрации оптической плотности окрашенных продуктов (соединений органической меди), образующихся при ферментативном окисления церулоплазмином солянокислого парафенилендиамина при 530 нм.

Парафенилендиамин окисляется церулоплазмином с образованием окрашенного в фиолетовый цвет продукта конденсации с субстратом. Реакционная смесь включала 3,9 мл 0,5 М  $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$  буфера  $\text{pH}=5.5$ , 0,5 мл свежеприготовленного раствора парафенилендиамина (0,5%) и 0,1 мл пробы, содержащей церулоплазмин (сыворотка крови). Реакцию проводили при  $37^\circ\text{C}$  на водяной бане в течение 1 часа. Останавливали реакцию, путем добавления к пробе 0,5 мл 0,5%  $\text{NaN}_3$ . Контрольной пробой служила реакционная смесь с 0,5 мл 0,5%  $\text{NaN}_3$ , добавленная до инкубации. Измерения проводили спектрофотометрически, против контрольной пробы при 530 нм ( $A_{530}$ ) [19].

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.

Критерии злокачественности опухолей молочной железы у сук [106]:

1. Гистотип опухоли: структура клетки указывает на злокачественность: утраченная структура канальцев, плюристратификация или формирование гнезд.

2. Значительный ядерный или клеточный плеоморфизм: при злокачественных опухолях молочной железы наблюдается выраженный анизокариоз II типа и анизоцитоз. В непROTOКОВЫХ опухолях гиперхромаические клетки и потеря цитоплазмы рассматривается как признак злокачественного новообразования.

3. Митотический индекс: повышенное число митозов является показателем злокачественности. Пороговым значением митотического числа является больше 6 на  $2,37 \text{ мм}^2$ .

4. Наличие хаотично расположенных очагов некроза в ткани новообразования, которые отличны от очагов ишемического некроза в центре новообразования доброкачественных опухолей в том числе.

5. Инфильтрация неопластических клеток в окружающую ткань, которая может быть ассоциирована с десмоплазией и ошибочно приниматься за инвазию.

6. Плюристратификация с дисплазией и ядерной атипией: скопление эпителиальных клеток не является критерием злокачественности, однако, когда оно связано с потерей ориентации клеток на базальную мембрану и ядерным плеоморфизмом, следует рассматривать новообразование как злокачественное.

7. Лимфатическая инвазия.

8. Метастазы в регионарные лимфатические узлы.

Критерии 7 и 8 всегда указывают на злокачественность. Критерии 1–6 могут использоваться, когда 7 и 8 не очевидны. Критерии 1–3 также используются для выставления оценок. При пограничных поражениях количество митозов может быть решающим фактором.

Критерии гистологического стадирования опухолей молочной железы у сук [106]:

Образование тубулярных структур

Тубулярные структуры составляют > 75% опухоли 1 балл

Тубулярные структуры составляют 10–75% опухоли  
(умеренное образование трубчатых структур, смешанное с участками не тубулярных паттернов) 2 балла

Тубулярные структуры составляют <10% (минимум или не тубулярная структура) 3 балла



## В. Ядерный плеоморфизм

Однородные или правильные маленькие ядра с редкими небольшими ядрышками	1 балл
Умеренная степень вариации размера и формы ядер, гиперхроматическое ядро, наличие ядрышек	2 балла
Заметное изменение ядра, гиперхроматическое ядро, часто с одним или более ядрышком	3 балла

## С. Митотический индекс

0–9 митозов на 10 полей зрения	1 балл
10–19 митозов на 10 полей зрения	2 балла
> 19 митозов на 10 полей зрения	3 балла

## Гистологическое стадирование (суммация А+В+С)

I (низкозлокачественная, хорошо дифференцированная)	3–5 баллов
II (среднезлокачественная, умеренно дифференцированная)	6–7 баллов
III (высокозлокачественная, низко дифференцированная)	8–9 баллов

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

При обработке данных использовались два интервала: интервал математического ожидания при анализе результатов с небольшим разбросом данных и доверительный интервал случайных величин при существенном различии данных.

Интервал математического ожидания определялся по формуле:

$$\bar{m} \pm \frac{u_{\alpha} \cdot \sigma}{\sqrt{n}}, \quad \text{где} \quad \sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_i (\bar{m} - m_i)^2}$$

$\bar{m}$  - среднее арифметическое;  $\sigma$  - среднее квадратическое отклонение;  $n$  - количество результатов;  $m$  - значение результата;  $\alpha$  - уровень значимости (принятый в расчетах уровень значимости равен 0,05);

*U<sub>crit</sub>* – квантиль распределения, табличная величина, зависящая от количества результатов и принятого уровня значимости.

Критерий значимости был определен с помощью расчета U-критерия Манна-Уитни.

## **2.2 Результаты исследований**

### **2.2.1 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук контрольной группы**

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.

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 пузыря, 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) (рисунок 5).



Рисунок 5 – Рентгенограмма грудной полости клинически здоровой 7-летней суки английского бульдога (боковая проекция)

Результаты биохимического анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты биохимического анализа крови сук контрольной группы, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	38,50±12,39	10,00-58,00
Аспартатаминотрансфераза, Ед/л	32,00±6,94	8,00-42,00
Щелочная фосфатаза, Ед/л	42,33±14,89	10,00-70,00
Белок (общий), г/л	66,33±4,03	55,00-73,00
Альбумин, г/л	32,50±4,50	25,00-39,00
Билирубин, мкмоль/л	8,66±2,02	<13,50
Креатинкиназа, Ед/л	188,66±45,78	0,00-500,00
Гаммаглутамилтрансфераза, Ед/л	8,33±2,50	0,00-12,00
Холестерин, ммоль/л	3,83±1,02	3,50-7,00
Калий, ммоль/л	4,00±0,89	3,60-5,50
Кальций, ммоль/л	2,33±0,22	2,30-3,00
Хлориды, ммоль/л	110,10±2,75	109,00-122,00
Липаза, Ед/л	57,50±14,31	10,00-200,00
Креатинин, мкмоль/л	92,00±14,65	54,00-138,00
Мочевина, ммоль/л	7,50±1,04	3,50-9,20
Триглицериды, ммоль/л	0,50±0,12	0,00-1,50
Фосфор, ммоль/л	1,90±0,60	1,10-2,30
Натрий, ммоль/л	155,00±3,56	144,00-158,00
Глюкоза, ммоль/л	5,50±1,51	3,30-6,30

\*Референсные значения предоставлены ветеринарной лабораторией «Поиск», 2018.

Результаты клинического анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты клинического анализа крови у сук контрольной группы, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Гематокрит, %	36,33±11,27	29,00-48,00
Гемоглобин, г/л	124,83±22,43	90,00-150,00
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	6,50±1,37	5,6-10,00
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	34,16±2,57	32,00-36,00
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	23,33±1,50	22,00-27,00
Средний корпускулярный объем эритроцита, фл	65,83±4,49	62,00-74,00
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	271,00±45,24	160,00-630,00
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	8,33±1,36	5,50-18,50
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	6,83±2,06	2,95-11,67
Палочкоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	0,20±0,04	00,00-0,30
Сегментоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	7,50±2,01	2,50-12,50
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	3,50±0,37	1,50-7,00
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,86±0,13	0,00-0,90
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,06±0,02	0,00-0,10
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,83±0,11	0,10-1,50

\*Референсные значения предоставлены ветеринарной лабораторией «Поиск», 2018.

Общепринятые показатели крови сук контрольной группы в пределах референсных значений.

### 2.2.2 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук с неопухолевыми/доброкачественными новообразованиями

Животные данной исследуемой группы имели новообразования молочных желез, появившиеся в течение последнего года. Пример новообразования представлен на рисунке 6. Ранее признаков заболеваний у животных группы не наблюдалось.



Рисунок 6 – Новообразование молочной железы (черная стрелка) у 10-летней беспородной суки из 2-й группы с фибroadеномой молочной железы

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 группы имели новообразования молочных желез T1, согласно классификации TNM.

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

Результаты биохимического анализа представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты биохимического анализа крови группы сук с неопухолевыми/доброкачественными новообразованиями, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	33,85±8,29	38,50±12,39
Аспартатаминотрансфераза, Ед/л	34,14±7,37	32,00±6,94
Щелочная фосфатаза, Ед/л	48,28±9,35	42,33±14,89
Белок (общий), г/л	65,00±9,25	66,33±4,03
Альбумин, г/л	35,14±7,22	32,50±4,50
Билирубин, мкмоль/л	5,71±1,79	8,66±2,02
Креатинкиназа, Ед/л	247,28±53,78	188,66±45,78

Продолжение таблицы 4

Гаммаглутамилтрансфераза, Ед/л	8,85±1,86	8,33±2,50
Холестерин, ммоль/л	4,42±0,71	3,83±1,02
Калий, ммоль/л	3,85±0,89	4,00±0,89
Кальций, ммоль/л	2,35±0,15	2,33±0,22
Хлориды, ммоль/л	115,15±3,75	110,10±2,75
Липаза, ЕД/л	68,57±13,41	57,50±14,31
Креатинин, мкмоль/л	73,00±14,35	92,00±14,65
Мочевина, ммоль/л	7,42±1,51	7,50±1,04
Триглицериды, ммоль/л	0,67±0,07	0,50±0,12
Фосфор, ммоль/л	1,87±0,17	1,90±0,60
Натрий, ммоль/л	154,00±7,14	155,00±3,56
Глюкоза, ммоль/л	5,57±1,90	5,50±1,51

\*Референсные значения соответствуют показателям крови контрольной группы собак.

Результаты клинического анализа представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты клинического анализа крови группы сук с неопухолевыми/доброкачественными новообразованиями, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Гематокрит, %	47,00±7,65	36,33±11,27
Гемоглобин, г/л	149,42±9,36	124,83±22,43
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	6,14±1,06	6,50±1,37
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	34,42±0,48	34,16±2,57
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	23,00±1,63	23,33±1,50



Продолжение таблицы 5

Средний корпускулярный объем эритроцита, фл	66,28±4,27	65,83±4,49
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	248,14±62,70	271,00±45,24
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	7,85±1,77	8,33±1,36
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	7,57±1,10	6,83±2,06
Палочкоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	0,05±0,01	0,20±0,04
Сегментоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	7,42±1,51	7,50±2,01
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	3,14±0,21	3,50±0,37
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,84±0,11	0,86±0,13
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,02±0,00	0,06±0,02
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,75±0,12	0,83±0,11

\*Референсные значения соответствуют показателям крови контрольной группы собак.

Общепринятые показатели крови не отражали наличие патологического процесса у сук с неопухолевыми/доброкачественными новообразованиями.

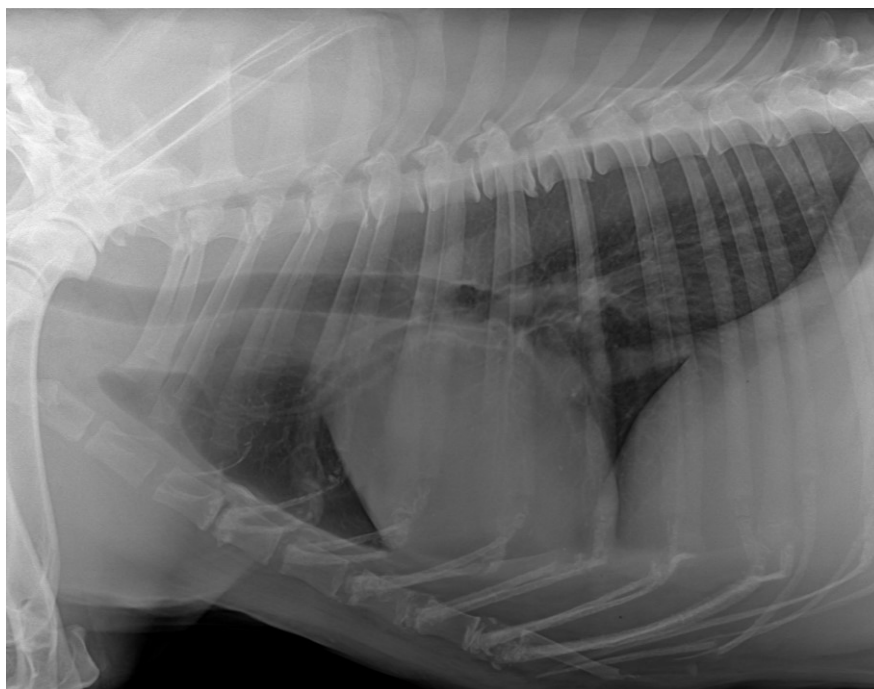


Рисунок 7 – Рентгенограмма грудной полости 10-летней суки кокер-спаниеля с аденомой молочной железы (боковая проекция)

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, мочевой 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) (рисунок 7).

### **2.2.3 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук с высокодифференцированными новообразованиями**

Животные данной исследуемой группы имели новообразования молочных желез, появившиеся в течение последнего года. Пример новообразования представлен на рисунке 8. 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.

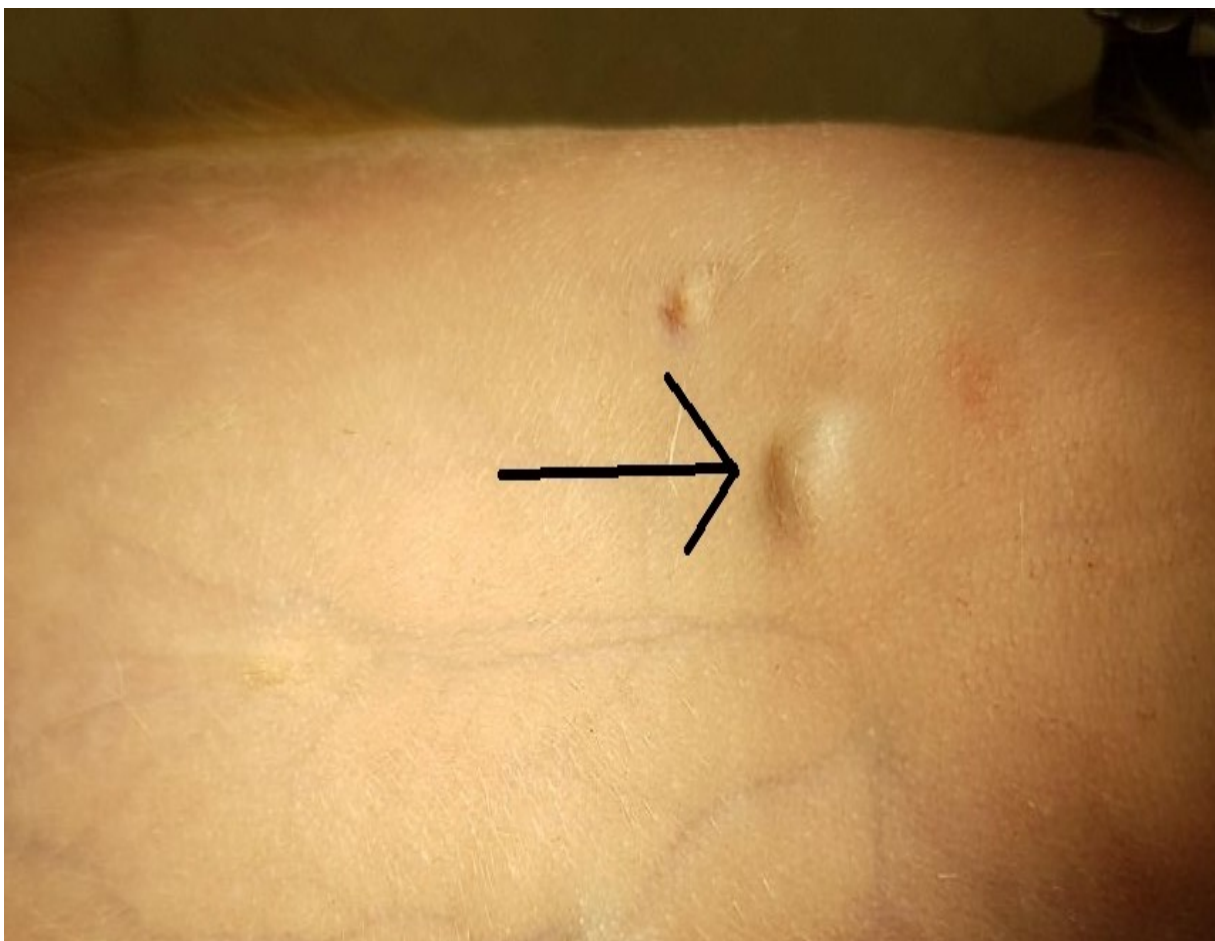


Рисунок 8 – Новообразование молочной железы (черная стрелка) у 7-летней суки фокстерьера из 3-й группы с высокодифференцированной аденокарциномой молочной железы

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 группы имели новообразования молочных желез T1, согласно классификации TNM.

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

Результаты биохимического анализа представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты биохимического анализа крови группы животных с высокодифференцированными новообразованиями, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	38,00±5,51	38,50±12,39
Аспартатаминотрансфераза, Ед/л	33,83±8,70	32,00±6,94
Щелочная фосфатаза, Ед/л	58,16±17,93	42,33±14,89
Белок (общий), г/л	66,50±10,67	66,33±4,03
Альбумин, г/л	33,83±6,36	32,50±4,50
Билирубин, мкмоль/л	3,66±1,87	8,66±2,02
Креатинкиназа, Ед/л	311,16±58,01	188,66±45,78
Гаммаглутамилтрансфераза, Ед/л	7,33±1,86	8,33±2,50
Холестерин, ммоль/л	4,00±1,89	3,83±1,02
Калий, ммоль/л	4,00±0,89	4,00±0,89
Кальций, ммоль/л	2,28±0,18	2,33±0,22
Хлориды, ммоль/л	116,88±0,79	110,10±2,75
Липаза, Ед/л	84,00±11,81	57,50±14,31
Креатинин, мкмоль/л	86,16±15,45	92,00±14,65
Мочевина, ммоль/л	8,33±1,36	7,50±1,04
Триглицериды, ммоль/л	0,68±0,11	0,50±0,12
Фосфор, ммоль/л	2,23±0,81	1,90±0,60
Натрий, ммоль/л	155,00±7,26	155,00±3,56
Глюкоза, ммоль/л	5,66±1,86	5,50±1,51

\*Референсные значения соответствуют показателям крови контрольной группы собак.

Результаты клинического анализа представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты клинического анализа крови группы животных с высокодифференцированными новообразованиями, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Гематокрит, %	33,80±2,12	36,33±11,27
Гемоглобин, г/л	124,20±6,48	124,83±22,43
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	6,50±1,04	6,50±1,37
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	33,16±0,42	34,16±2,57
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	23,16±1,72	23,33±1,50
Средний корпускулярный объем эритроцита, фл	66,00±4,85	65,83±4,49
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	203,16±83,03	271,00±45,24
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	8,33±1,36	8,33±1,36
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	7,50±1,64	6,83±2,06
Палочкоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	0,10±0,02	0,20±0,04
Сегментоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	5,85±1,60	7,50±2,01
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	3,24±0,30	3,50±0,37
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,60±0,12	0,86±0,13
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,00±0,00	0,06±0,02
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,63±0,13	0,83±0,11

Общепринятые показатели крови не отражали наличие опухолевого процесса у сук с высокодифференцированными новообразованиями.

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, мочевой пузырь, матка, яичники, сосуды и лимфатические узлы).



Рисунок 9 – Рентгенограмма грудной полости 7-летней суки бигля с высококодифференцированной аденокарциномой молочной железы (прямая проекция)

При рентгенографии грудной полости исследовались структуры костного аппарата и органы грудной полости (мягкие ткани, сердце,

пищевод, трахея, бронхи, легкие, сосуды, лимфатические узлы, диафрагма) (рисунок 9).

#### **2.2.4 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук с умереннодифференцированными новообразованиями**

Животные данной исследуемой группы имели новообразования молочных желез, появившиеся в течение последнего года. Пример новообразования представлен на рисунке 10. Ранее признаков заболеваний у животных группы не наблюдалось.



Рисунок 10 – Новообразование молочной железы (черная стрелка) у 11-летней суки йоркширского терьера из 4-й группы с умереннодифференцированной аденокарциномой молочной железы

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 группы имели новообразования молочных желез T1, согласно классификации TNM.

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 пузыря, 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) (рисунок 11).



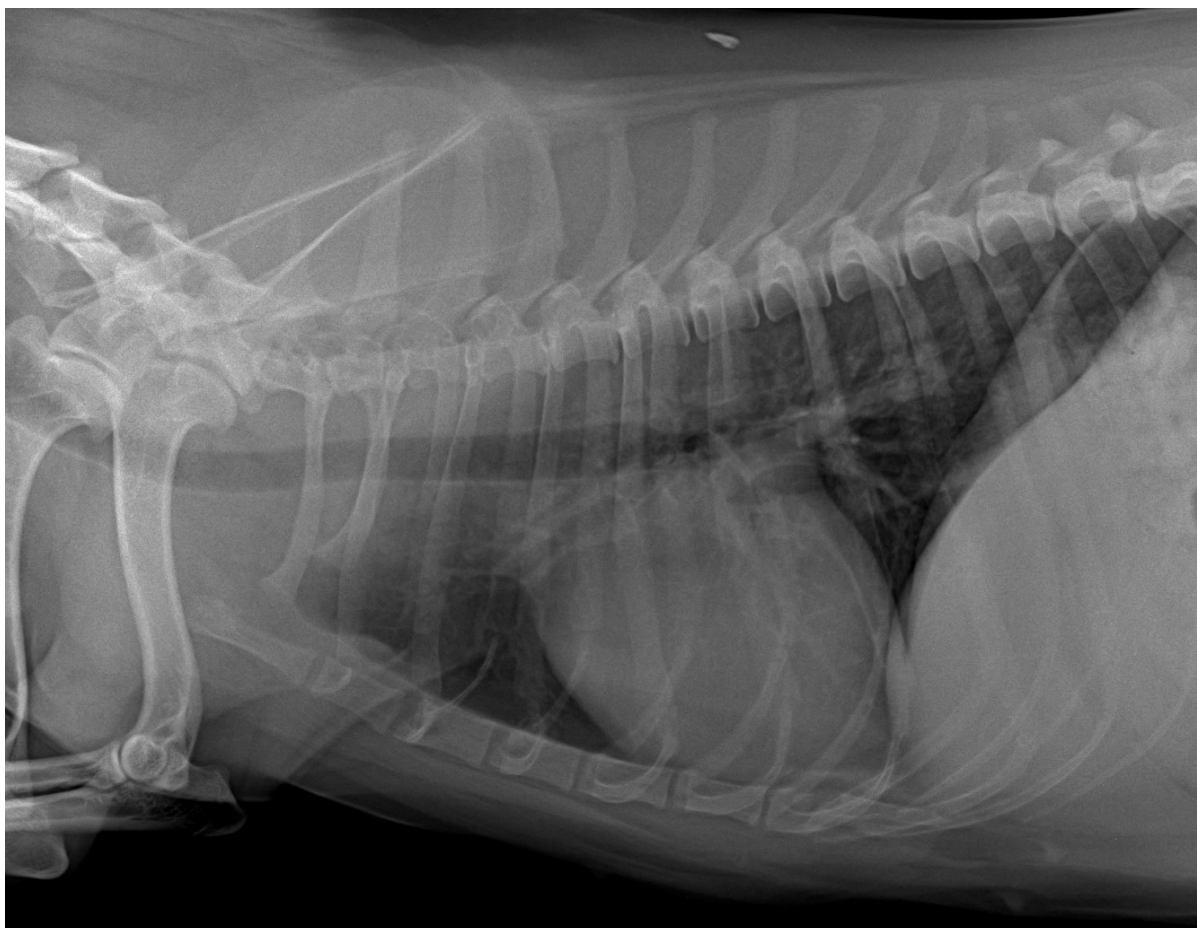


Рисунок 11 – Рентгенограмма грудной полости 11-летней суки цвергшнауцера с умереннодифференцированной аденокарциномой молочной железы (боковая проекция)

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

Результаты биохимического анализа представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты биохимического анализа крови группы животных с умереннодифференцированными новообразованиями, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	51,30±15,23	38,50±12,39
Аспартатаминотрансфераза, Ед/л	31,50±6,26	32,00±6,94
Щелочная фосфатаза, Ед/л	40,80±12,09	42,33±14,89
Белок (общий), г/л	71,80±10,07	66,33±4,03

Продолжение таблицы 8

Альбумин, г/л	31,50±5,29	32,50±4,50
Билирубин, мкмоль/л	4,60±1,05	8,66±2,02
Креатинкиназа, Ед/л	282,40±73,21	188,66±45,78
Гаммаглутамилтрансфераза, Ед/л	7,80±1,39	8,33±2,50
Холестерин, ммоль/л	4,00±1,30	3,83±1,02
Калий, ммоль/л	3,90±0,87	4,00±0,89
Кальций, ммоль/л	2,44±0,25	2,33±0,22
Хлориды, ммоль/л	115,63±0,21	110,10±2,75
Липаза, Ед/л	66,80±13,72	57,50±14,31
Креатинин, мкмоль/л	87,90±19,53	92,00±14,65
Мочевина, ммоль/л	7,60±1,50	7,50±1,04
Триглицериды, ммоль/л	0,71±0,01	0,50±0,12
Фосфор, ммоль/л	2,13±0,71	1,90±0,60
Натрий, ммоль/л	155,30±7,24	155,00±3,56
Глюкоза, ммоль/л	5,60±1,50	5,50±1,51

\*Референсные значения соответствуют показателям крови контрольной группы собак.

Результаты клинического анализа представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты клинического анализа крови группы животных с умереннодифференцированными новообразованиями, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Гематокрит, %	39,90±6,93	36,33±11,27
Гемоглобин, г/л	158,70±17,02	124,83±22,43
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	6,30±1,33	6,50±1,37
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	34,80±0,83	34,16±2,57

Продолжение таблицы 9

Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	22,70±1,63	23,33±1,50
Средний корпускулярный объем эритроцита, фл	66,20±4,21	65,83±4,49
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	180,40±27,73	271,00±45,24
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	8,10±1,42	8,33±1,36
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	6,80±1,34	6,83±2,06
Палочкоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	0,09±0,01	0,20±0,04
Сегментоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	7,20±1,29	7,50±2,01
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	1,90±0,27	3,50±0,37
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,87±0,18	0,86±0,13
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,02±0,00	0,06±0,02
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,73±0,10	0,83±0,11

\*Референсные значения соответствуют показателям крови контрольной группы собак.

Общепринятые показатели крови не отражали изменений, ассоциированных с наличием опухолевого процесса у сук с умереннодифференцированными новообразованиями.

### **2.2.5 Результаты клинического, гематологического, биохимического и инструментального исследований у сук с низкодифференцированными новообразованиями**

Животные данной исследуемой группы имели новообразования молочных желез, появившиеся в течение последнего года. Пример новообразования представлен на рисунке 12. 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 ка-

пилляров – 1 сек. Слуховые проходы чистые, выделения из глаз отсутствуют. Выделения из влагалища отсутствуют, наружные половые органы развиты правильно.



Рисунок 12 – Новообразование молочной железы (черная стрелка) у 12-летней беспородной суки из 5-й группы с низкодифференцированной аденокарциномой молочной железы

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 группы имели новообразования молочных желез T1, согласно классификации TNM.

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) (рисунок 13).



Рисунок 13 – Рентгенограмма грудной полости 13-летней суки ротвейлера с низкодифференцированной аденокарциномой молочной железы (прямая проекция)

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

Результаты биохимического анализа представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты биохимического анализа крови группы сук с низкодифференцированными новообразованиями, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	32,08±8,24	38,50±12,39
Аспартатаминотрансфераза, Ед/л	31,25±9,25	32,00±6,94
Щелочная фосфатаза, Ед/л	59,58±15,46	42,33±14,89
Белок (общий), г/л	73,83±10,65	66,33±4,03
Альбумин, г/л	30,83±5,30	32,50±4,50
Билирубин, мкмоль/л	4,50±0,27	8,66±2,02
Креатинкиназа, Ед/л	183,00±57,47	188,66±45,78
Гаммаглутамилтрансфераза, Ед/л	6,83±1,66	8,33±2,50
Холестерин, ммоль/л	3,66±0,49	3,83±1,02
Калий, ммоль/л	3,75±0,86	4,00±0,89
Кальций, ммоль/л	2,40±0,15	2,33±0,22
Хлориды, ммоль/л	112,28±0,67	110,10±2,75
Липаза, Ед/л	62,08±14,67	57,50±14,31
Креатинин, мкмоль/л	94,75±20,75	92,00±14,65
Мочевина, ммоль/л	7,75±1,42	7,50±1,04
Триглицериды, ммоль/л	0,57±0,14	0,50±0,12
Фосфор, ммоль/л	1,86±0,03	1,90±0,60
Натрий, ммоль/л	153,41±6,72	155,00±3,56
Глюкоза, ммоль/л	5,75±1,60	5,50±1,51

\*Референсные значения соответствуют показателям крови контрольной группы собак.

Результаты клинического анализа представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты клинического анализа крови группы сук с низкодифференцированными новообразованиями, n=12

Показатель	M±m	Референсные значения*
Гематокрит, %	36,58±8,73	36,33±11,27
Гемоглобин, г/л	102,16±19,62	124,83±22,43
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	6,08±1,31	6,50±1,37
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	34,33±0,55	34,16±2,57
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	22,91±1,56	23,33±1,50
Средний корпускулярный объем эритроцита, фл	66,50±4,62	65,83±4,49
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	215,58±29,05	271,00±45,24
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	8,00±1,53	8,33±1,36
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	6,50±1,90	6,83±2,06
Палочкоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	0,06±0,01	0,20±0,04
Сегментоядерные, 10 <sup>9</sup> /л	6,91±1,50	7,50±2,01
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	2,00±0,04	3,50±0,37
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,73±0,08	0,86±0,13
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,04±0,01	0,06±0,02
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,71±0,10	0,83±0,11

\*Референсные значения соответствуют показателям крови контрольной группы собак.

Общепринятые показатели крови не отражали изменений, ассоциированных с наличием опухолевого процесса у сук с низкодифференцированными новообразованиями.

Таким образом, все собаки в эксперименте не имеют параллельных заболеваний.

При сравнении показателей анализов крови (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, белок, альбумин, липаза, креатинин) между группами достоверной разницы не выявлено (рисунок 14).

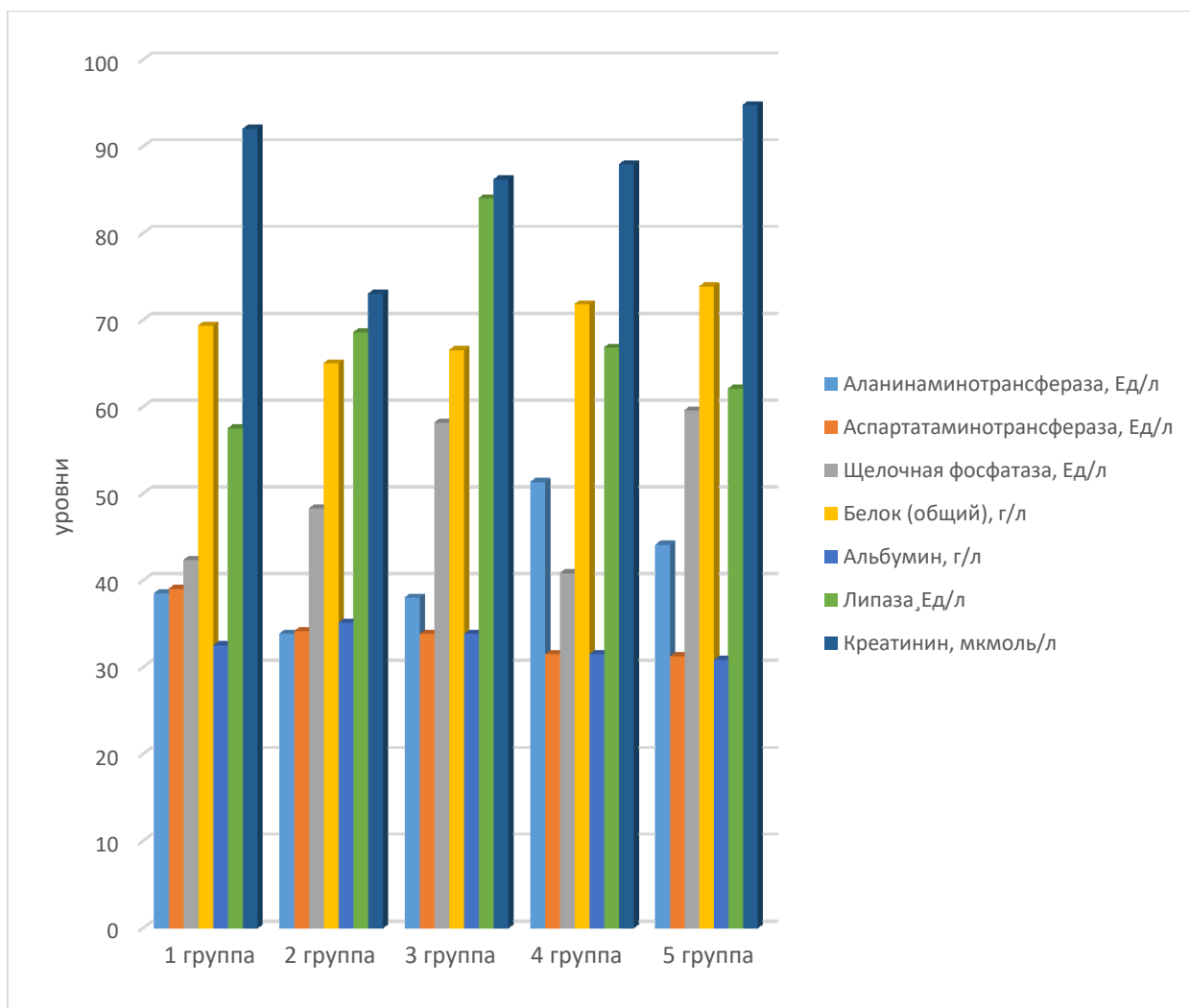


Рисунок 14 – Уровни некоторых показателей крови у сук исследуемых групп

При сравнении показателей анализов крови (билирубин, гаммаглутамилтрансфераза, холестерин, калий, кальций, мочеви́на, триглицериды, фосфор, глюкоза) между группами достоверной разницы не выявлено (рисунок 15).



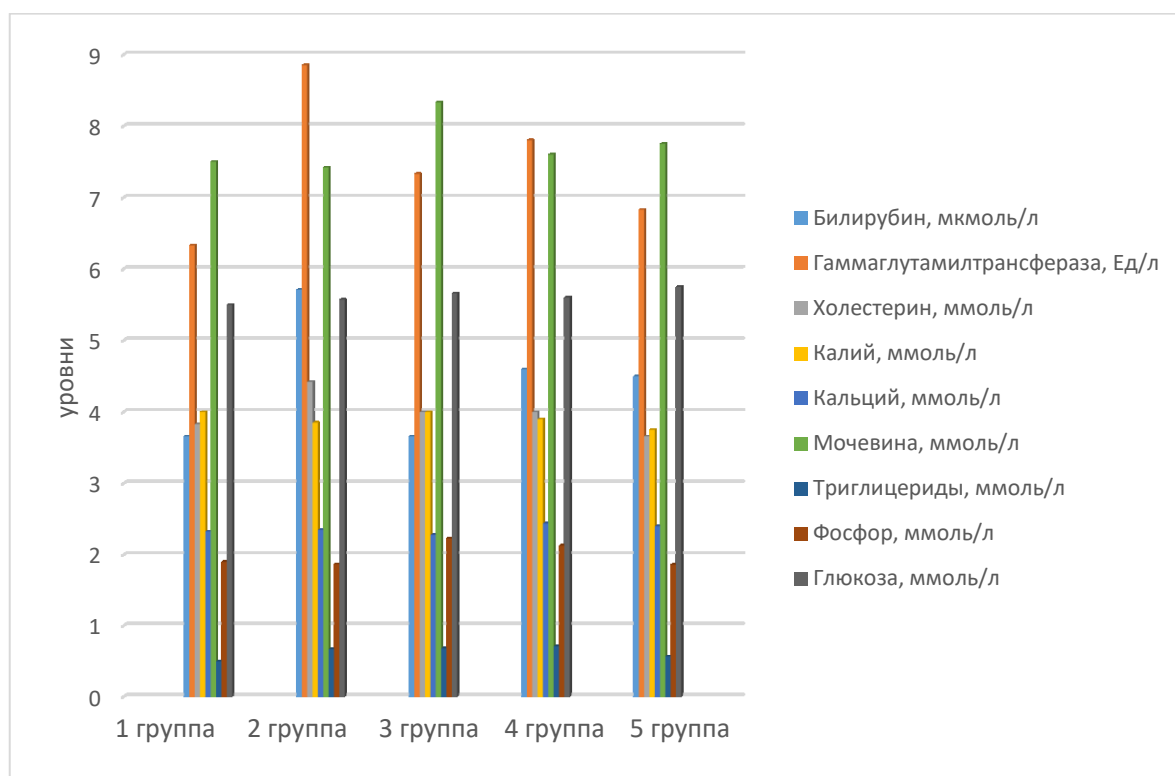


Рисунок 15 – Уровни некоторых показателей крови у сук исследуемых групп

При сравнении показателей анализов крови (креатинкиназа, хлориды, натрий) между группами достоверной разницы не выявлено (рисунок 16).

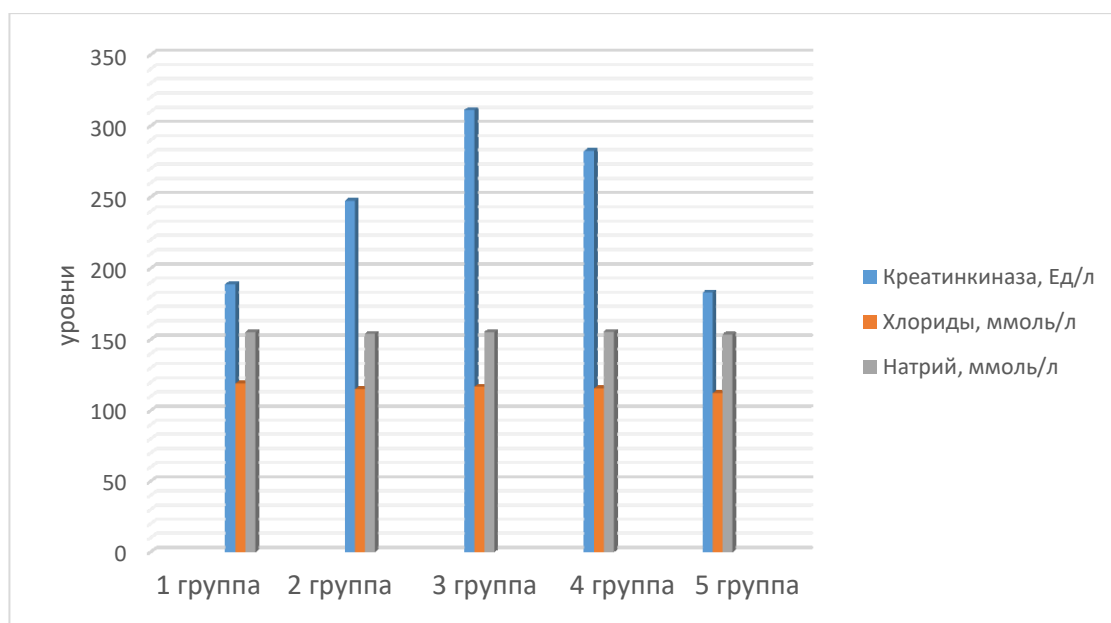


Рисунок 16 – Уровни некоторых показателей крови у сук исследуемых групп

При сравнении показателей анализов крови (гематокрит, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средний корпускулярный объем эритроцита) между группами достоверной разницы не выявлено (рисунок 17).

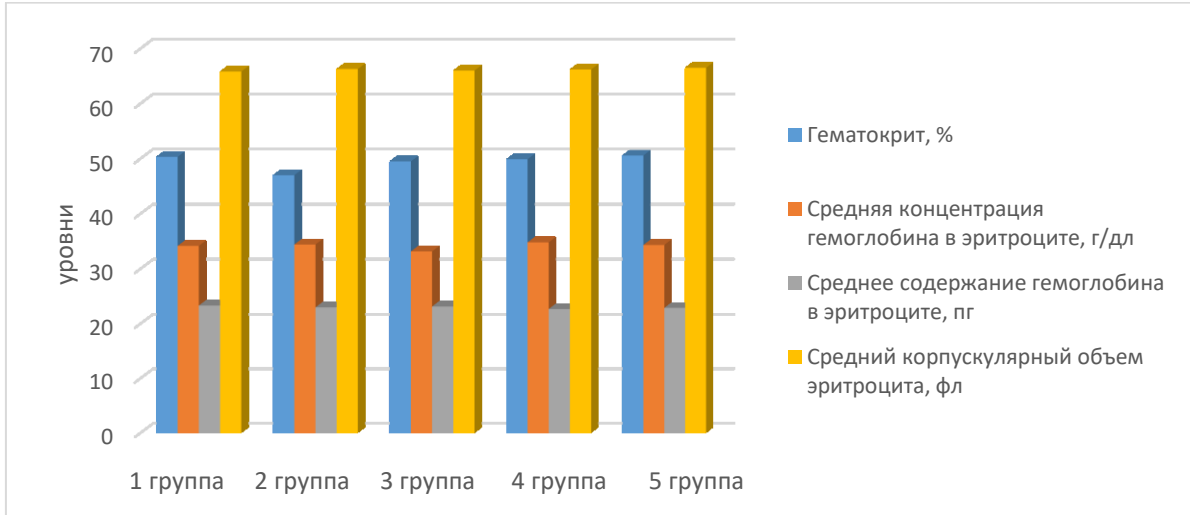


Рисунок 17 – Уровни некоторых показателей крови у сук исследуемых групп

При сравнении показателей анализов крови (моноциты, палочкоядерные нейтрофилы, базофилы, эозинофилы) между группами достоверной разницы не выявлено (рисунок 18).

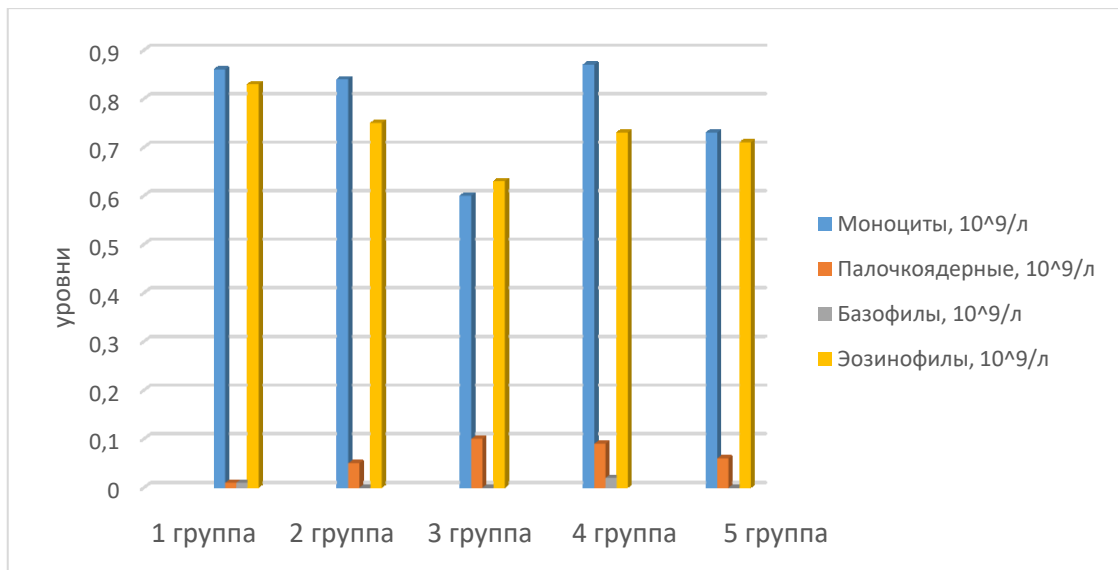


Рисунок 18 – Уровни некоторых показателей крови у сук исследуемых групп

При сравнении показателей анализов крови (гемоглобин, тромбоциты) между группами достоверной разницы не выявлено (рисунок 19).

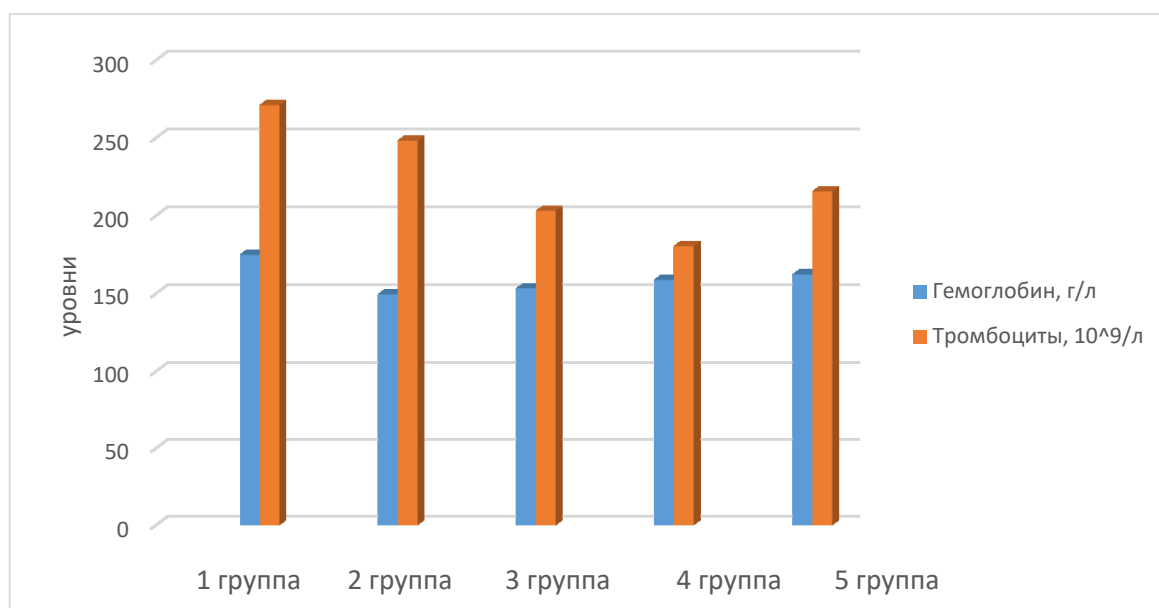


Рисунок 19 – Уровни некоторых показателей крови у сук исследуемых групп

При сравнении показателей анализов крови (эритроциты, лейкоциты, нейтрофилы, сегментоядерные нейтрофилы, лимфоциты) между группами достоверной разницы не выявлено (рисунок 20).

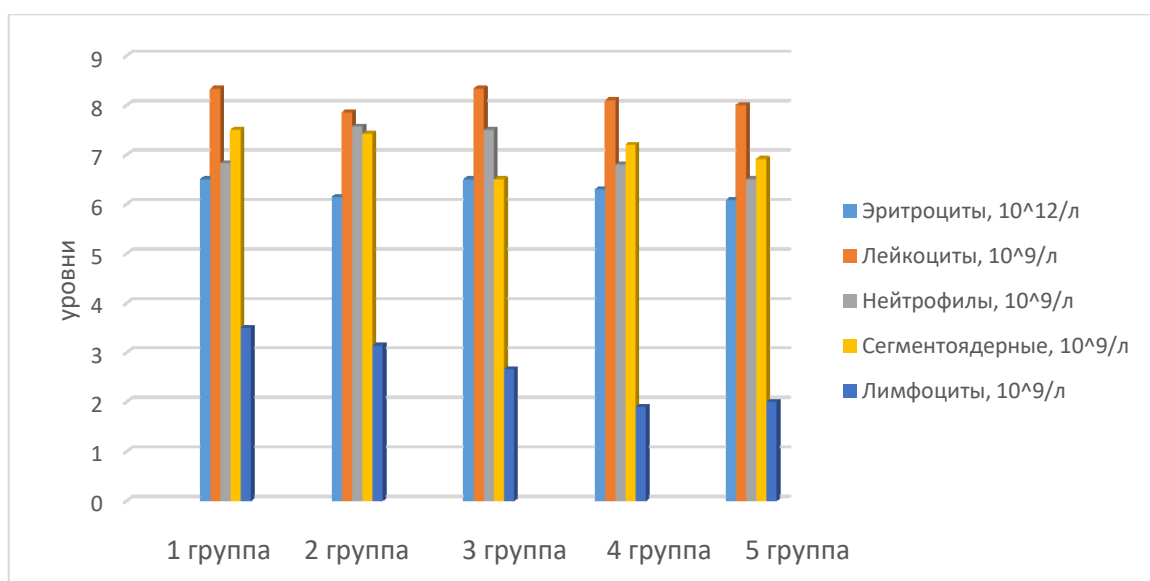


Рисунок 20 – Уровни некоторых показателей крови у сук исследуемых групп

Таким образом, полученные результаты стандартных анализов крови показали невозможность определения степен прогрессии опухоли молочной железы 1 стадии конвенциональными методами исследования.

### **2.2.6 Гистоморфологическая характеристика новообразований у сук всех экспериментальных групп**

Результаты гистологических исследований новообразований молочных желез у исследуемых животных разделены по 6 основным патологиям: эктазия протоков молочной железы, аденома молочной железы, внутрипротоковая аденома молочной железы, фиброаденома молочной железы, высокодифференцированная аденокарцинома молочной железы, умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, низкодифференцированная аденокарцинома молочной железы; относимые к трем группам: простые, комплексные и смешанные.

Простые – относятся к новообразованиям, состоящим только из одного типа клеток, напоминающие либо эпителиальные клетки, либо миоэпителиальные клетки. Термины «аденома» или «рак», используемые без прилагательных «сложный» или «смешанный» обычно подразумевают простой тип

Комплексные – относятся к новообразованиям, состоящим из двух типов клеток, морфологически напоминающих эпителиальные клетки и клетки, напоминающие миоэпителиальные клетки.

Смешанные – относятся к новообразованиям, которые состоят частично из клеток морфологически сходных с эпителиальными клетками или миоэпителиальными клетками, или и то и другое и частично морфологически напоминающих элементы соединительной ткани, обычно хряща и/или кости.

Рисунки 21–26 – эктазия протоков молочной железы. 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.

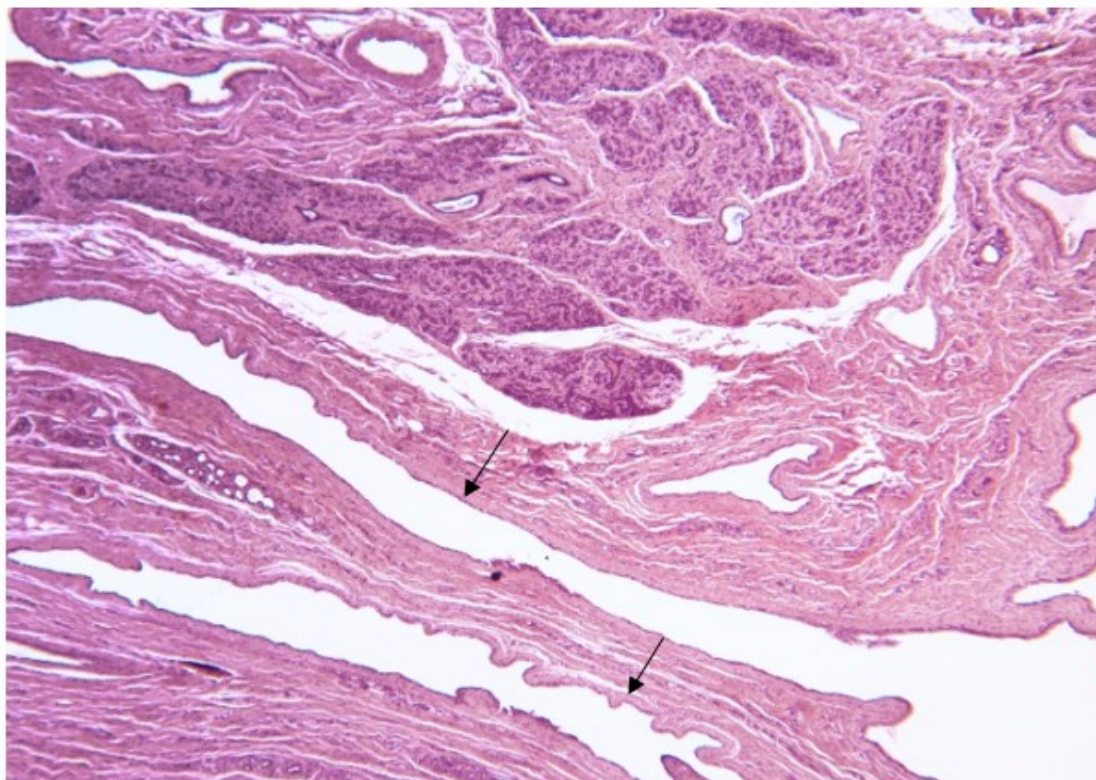


Рисунок 21 – Эктазия протоков молочной железы, микропрепарат (черные стрелки – расширенные протоки молочной железы). Сука, № 39. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 40

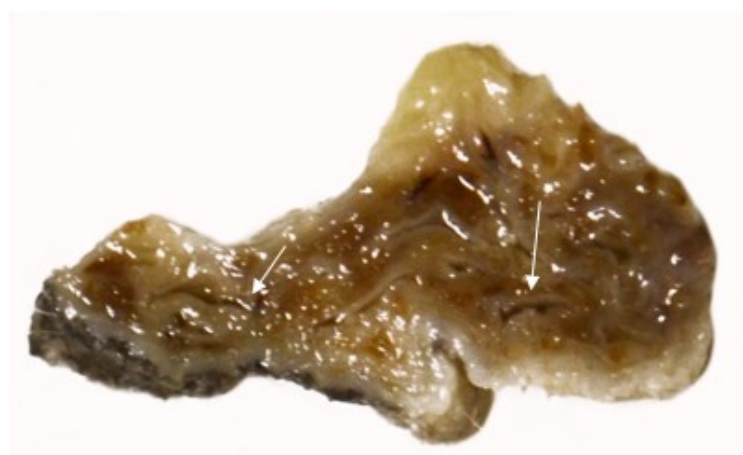


Рисунок 22 – Эктазия протоков молочной железы, макропрепарат (белые стрелки – расширенные протоки молочной железы). Сука, № 39

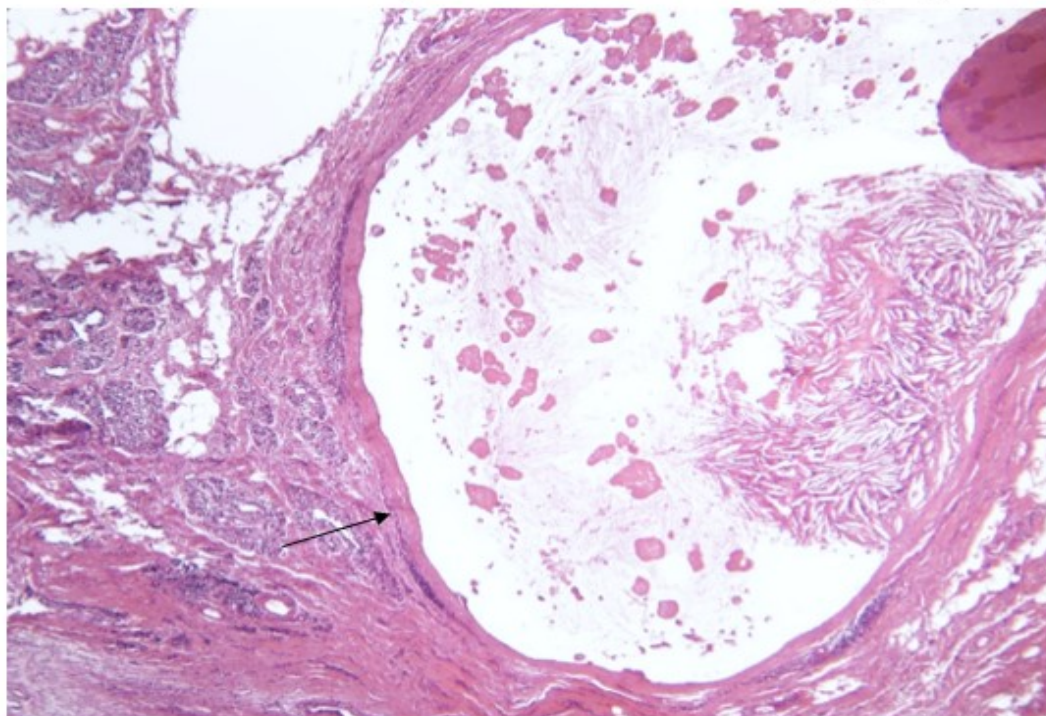


Рисунок 23 – Эктазия протоков молочной железы, микропрепарат (черные стрелки – расширенные протоки молочной железы с кистозной трансформацией). Сука, № 26. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 40



Рисунок 24 – Эктазия протоков молочной железы, макропрепарат (белые стрелки – расширенные протоки молочной железы с кистозной трансформацией). Сука, № 26

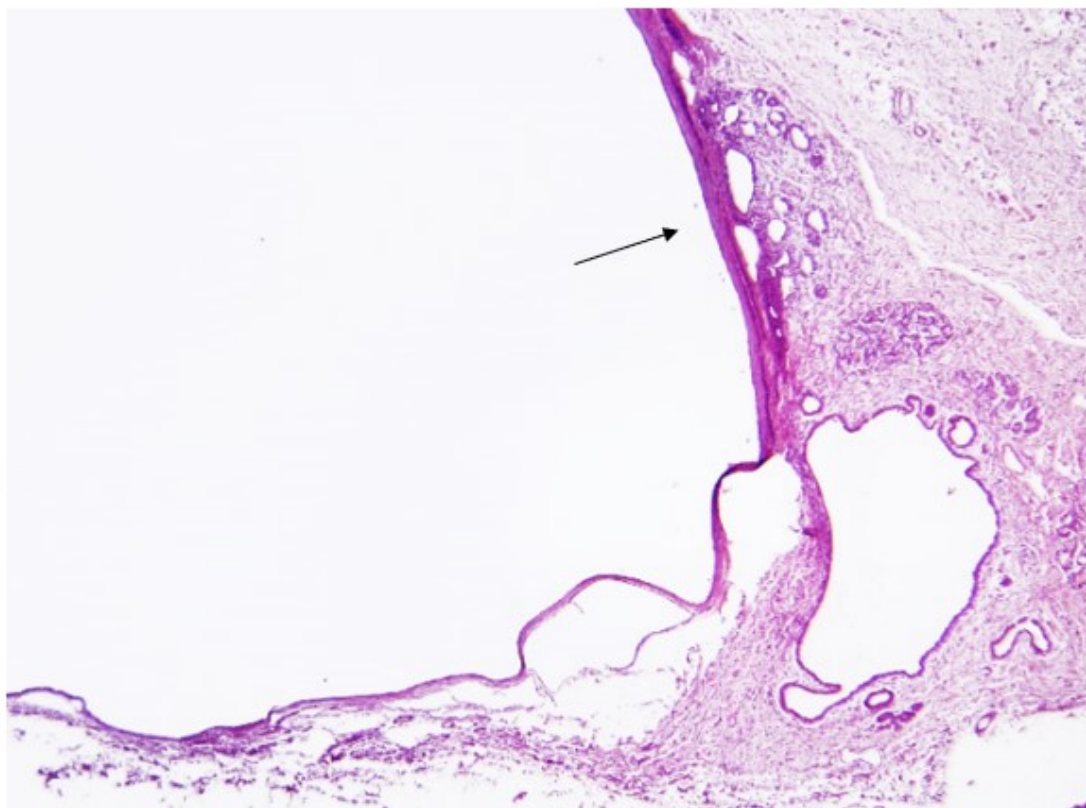


Рисунок 25 – Эктазия протоков молочной железы, микропрепарат (черные стрелки – расширенные протоки молочной железы с кистозной трансформацией). Сука, № 43. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 40



Рисунок 26 – Эктазия протоков молочной железы, макропрепарат (черные стрелки – расширенные протоки молочной железы с кистозной трансформацией) Сука, № 43

Рисунки 27, 28 – 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.

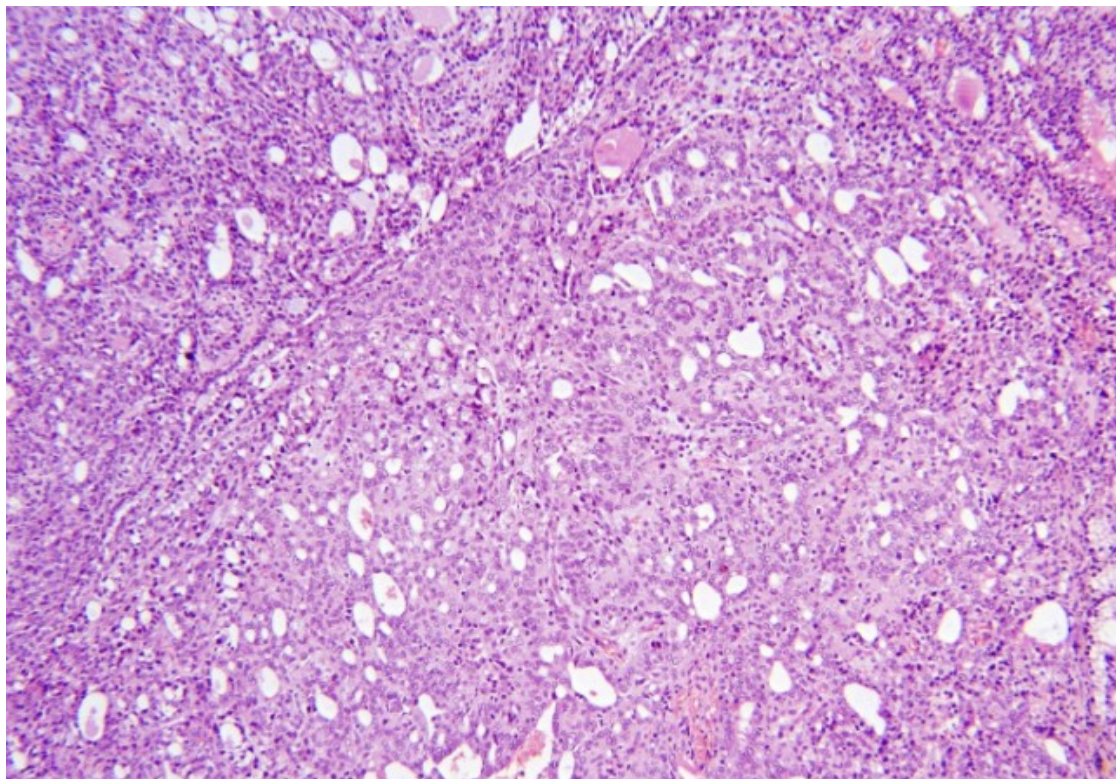


Рисунок 27 – Аденома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 16.

Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100

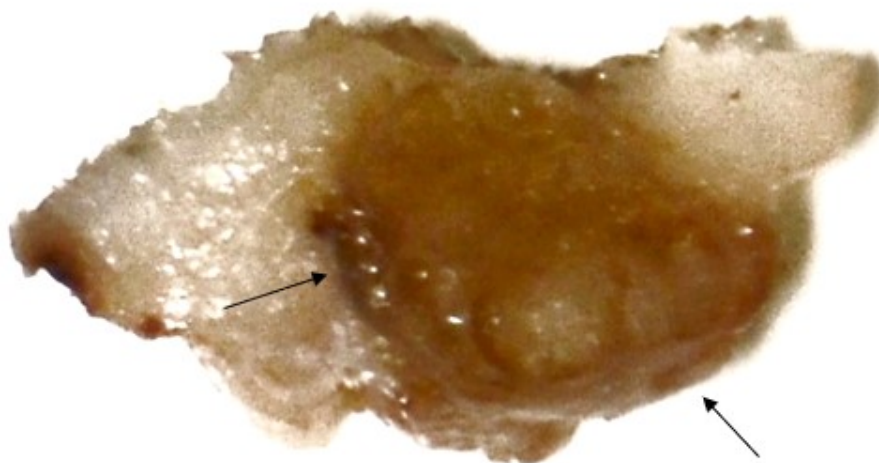


Рисунок 28 – Аденома молочной железы, макропрепарат (черная стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 16.



Рисунки 29, 30 – 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.

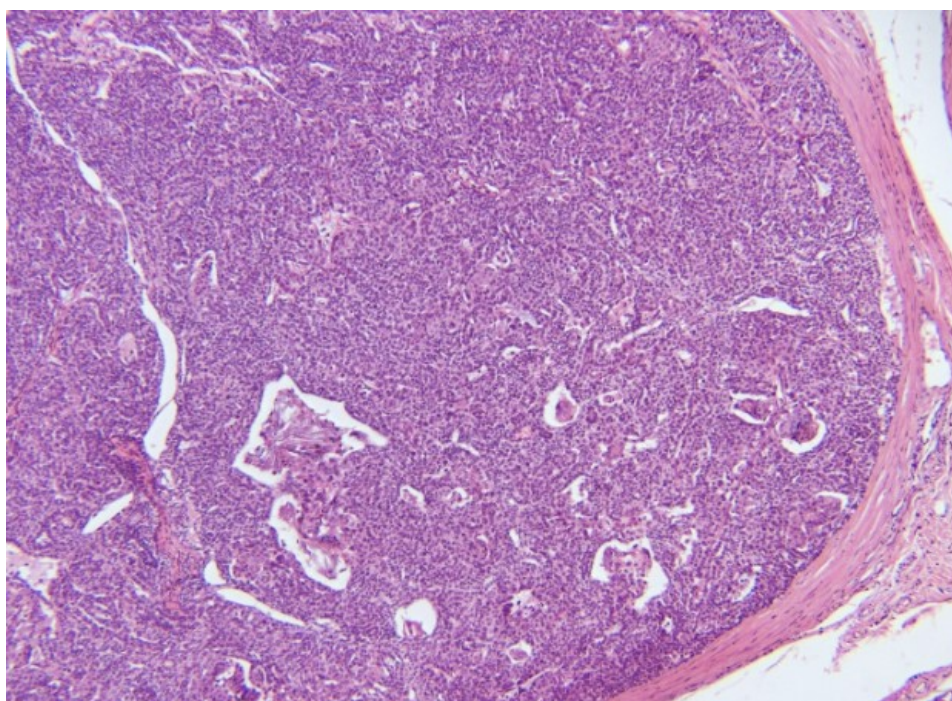


Рисунок 29 – Внутрипротоковая аденома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 27. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100

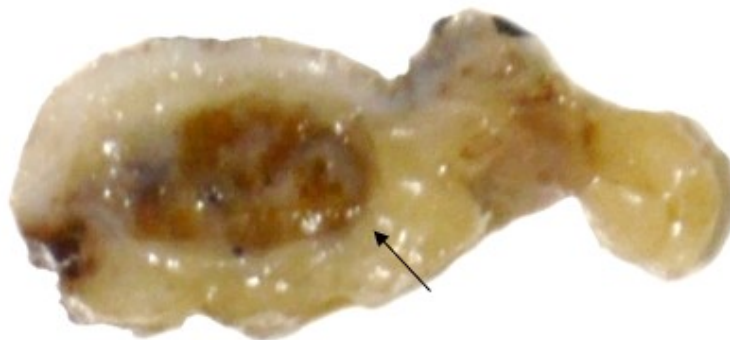


Рисунок 30 – Внутрипротоковая аденома молочной железы, макропрепарат (черная стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 27

Рисунки 31, 32 – 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 мономорфными овальными и немного вытянутыми нормохромными ядрами. Цитоплазма фиброцитов и фибробластов эозинофильная, с неразличимыми границами, сливающимися с внеклеточным эозинофильным матриксом.

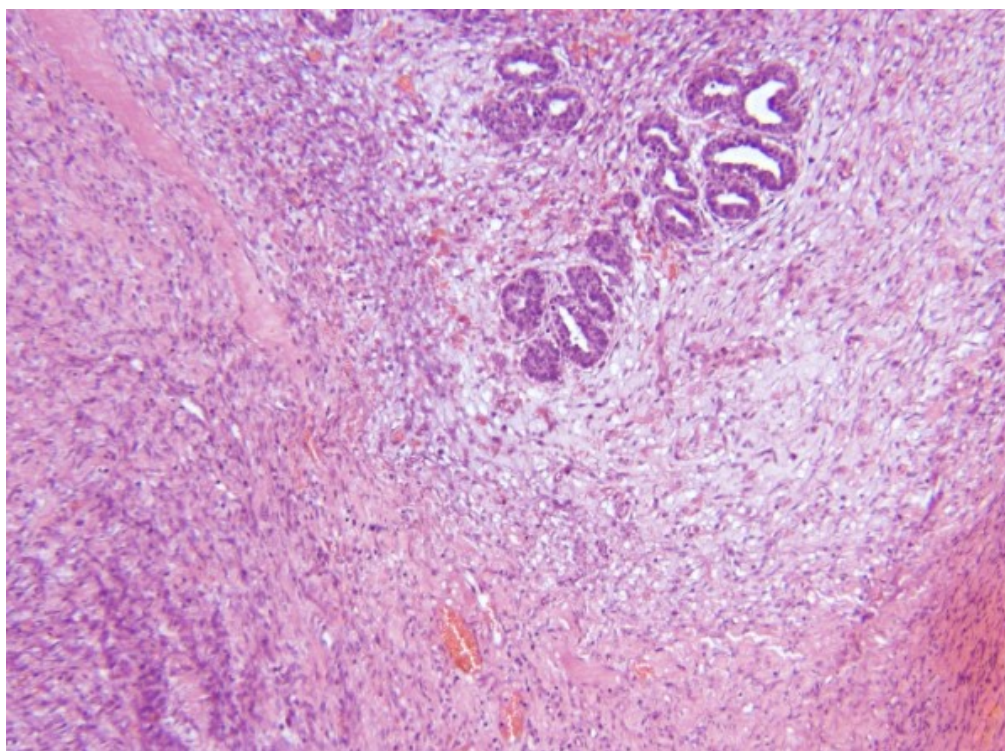


Рисунок 31 – Фиброаденома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 14. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100



Рисунок 32 – Фиброаденома молочной железы, макропрепарат. Сука, № 14

Рисунки 33, 34 – 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.

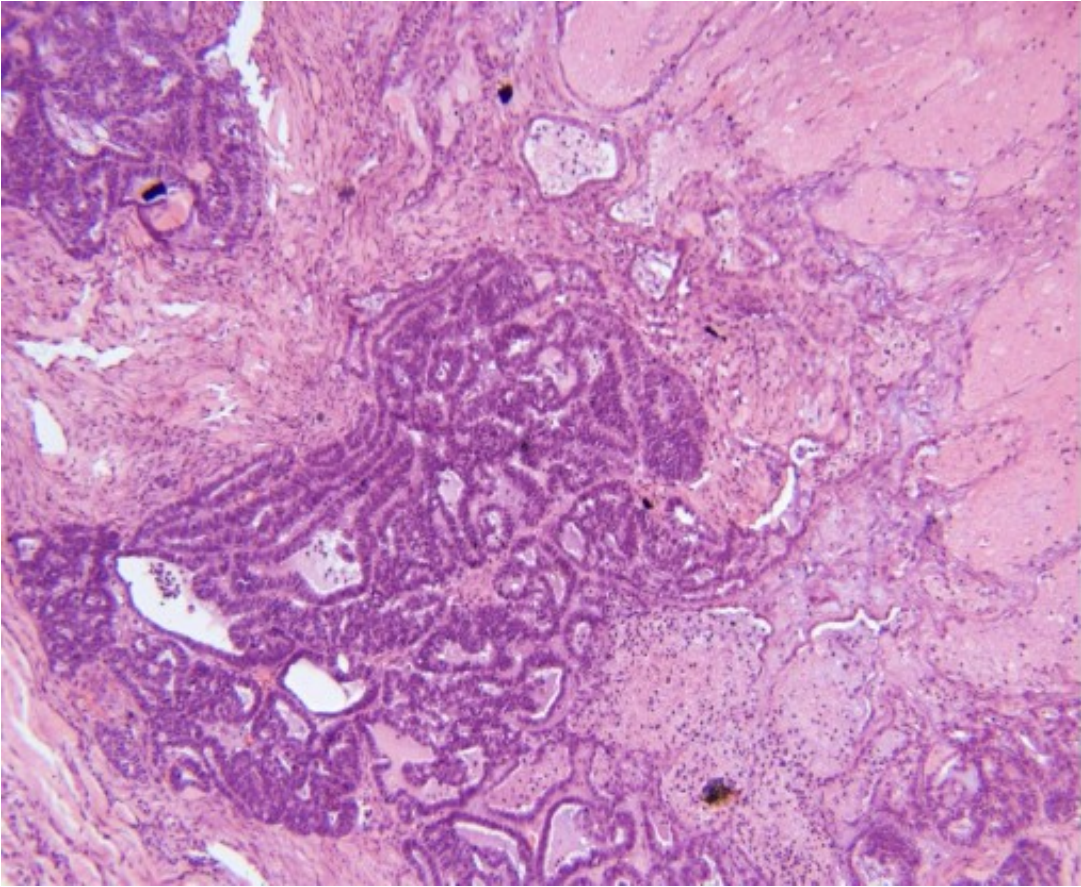


Рисунок 33 – Высокодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 19. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100

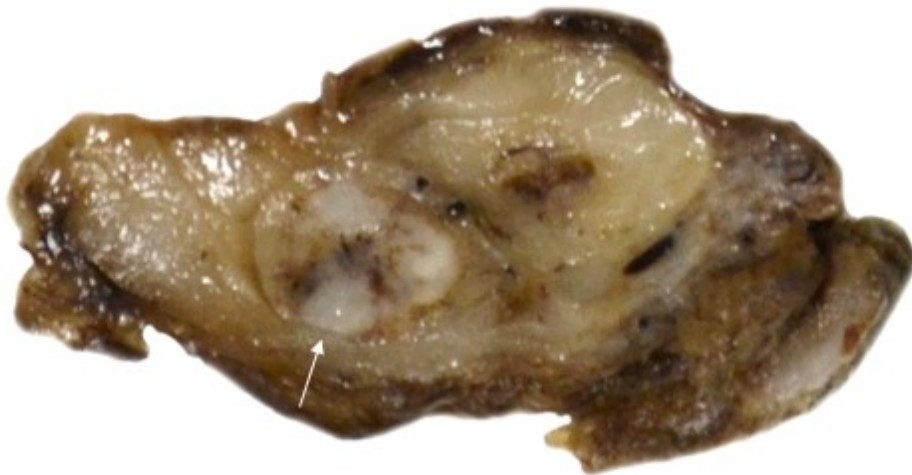


Рисунок 34 – Высокодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (белая стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 19

Рисунки 35–42 – 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.

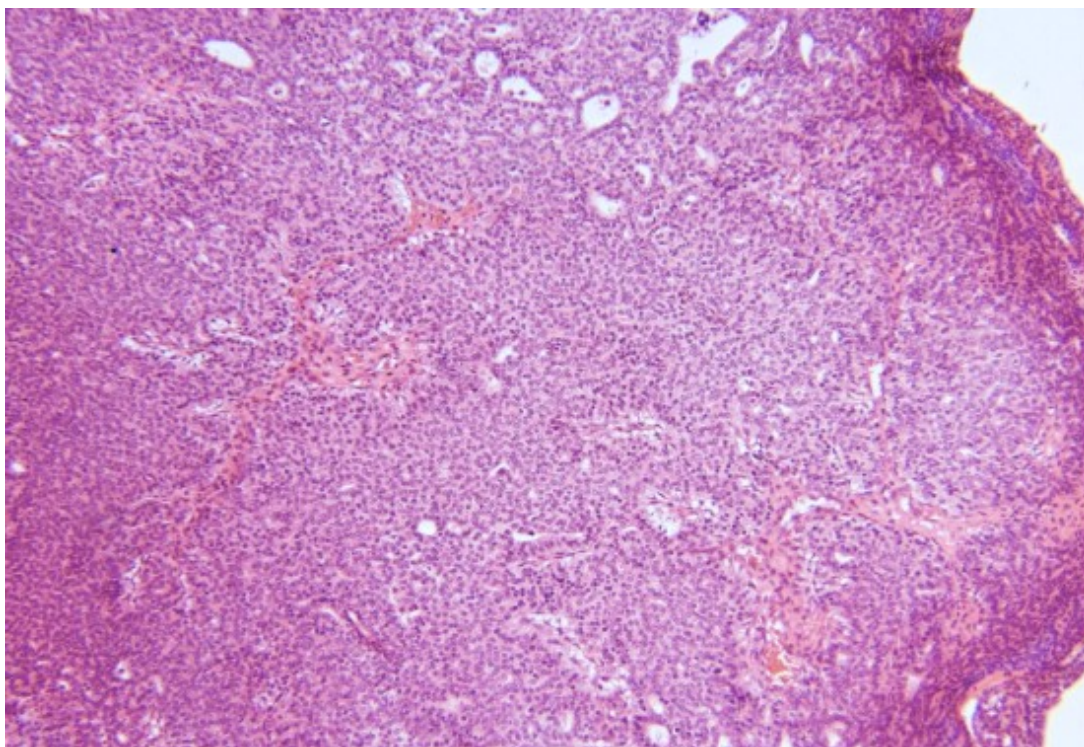


Рисунок 35 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 23. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100



Рисунок 36 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (белая стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 23

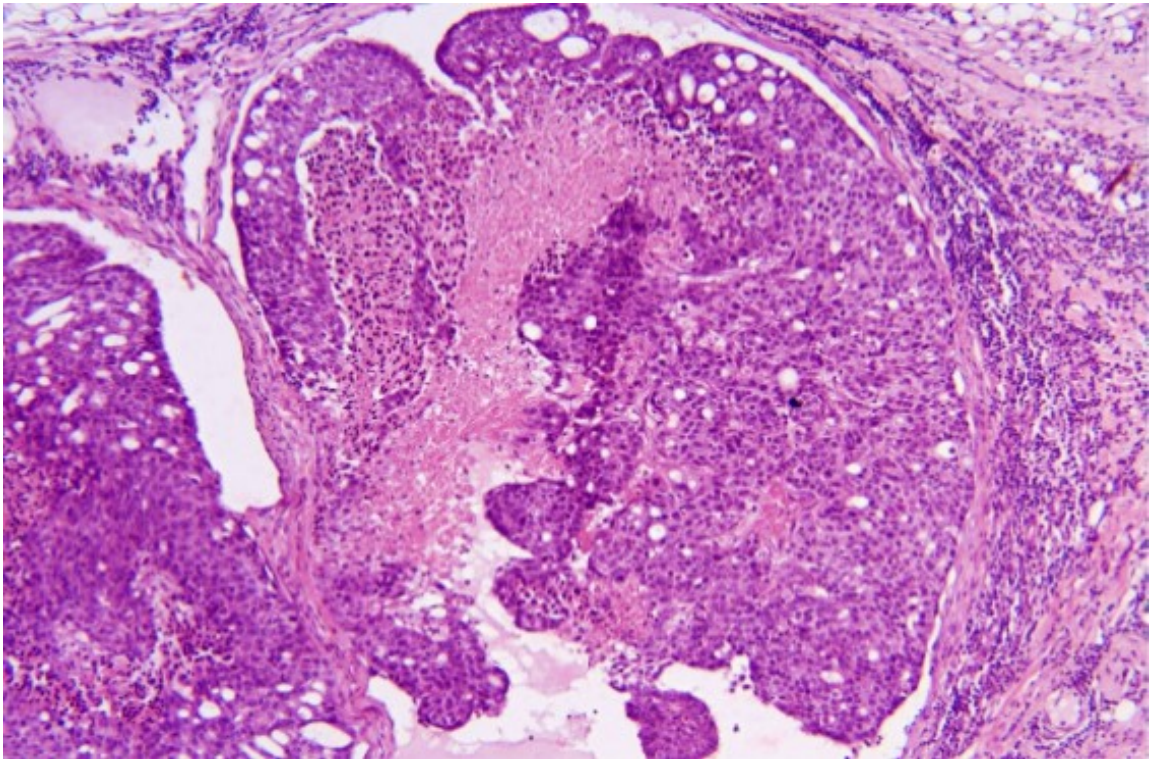


Рисунок 37 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 17. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100



Рисунок 38 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (белая стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 17

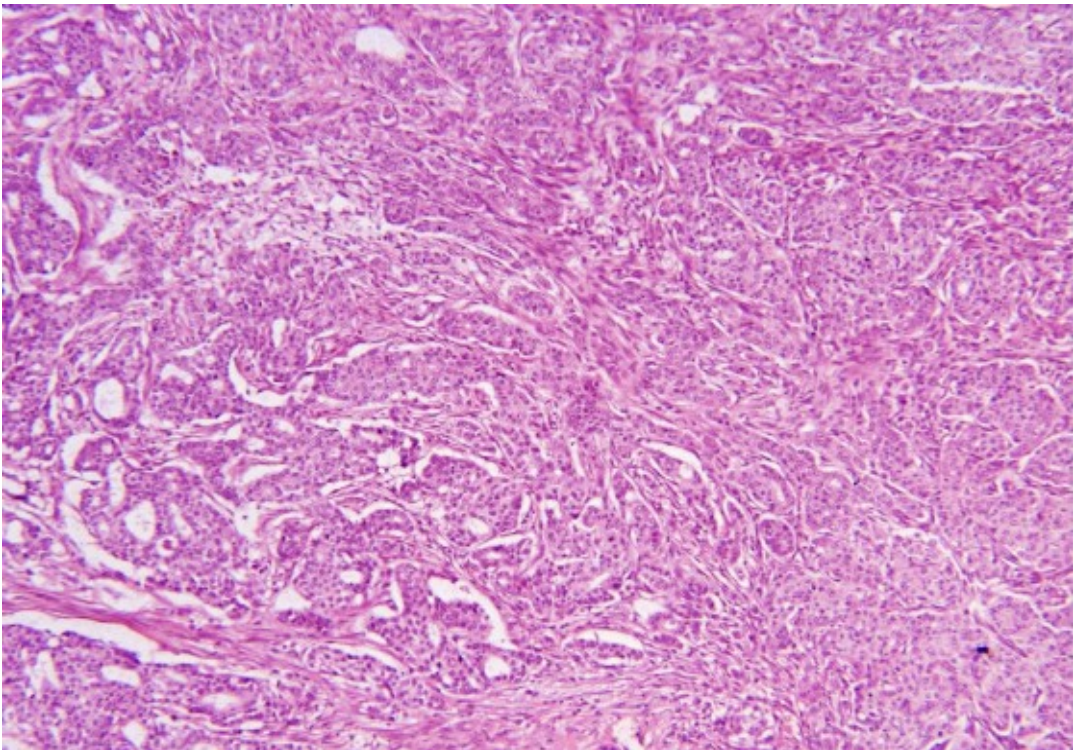


Рисунок 39 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 30. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100



Рисунок 40 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (черная стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 30

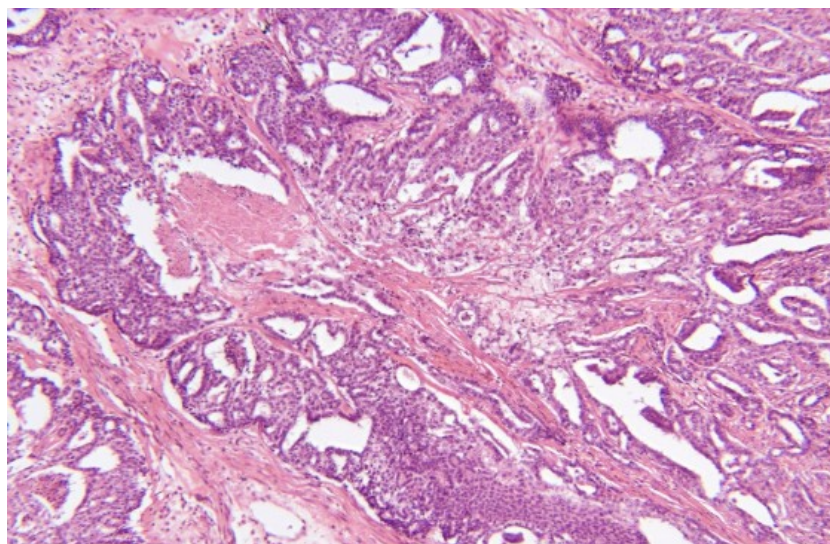


Рисунок 41 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 35. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100



Рисунок 42 – Умереннодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (белая стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 35



Рисунки 43–46 – 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 38 стрелками обозначены очаги эндолимфатической инвазии.

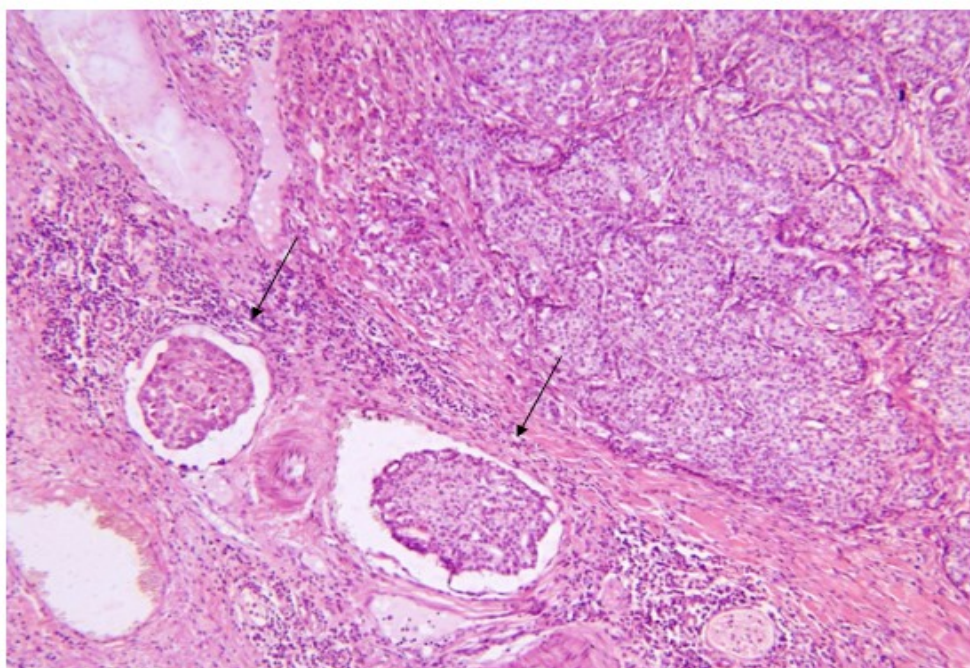


Рисунок 43 – Низкодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат (черная стрелка – очаги эндолимфатической инвазии). Сука, № 10. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100

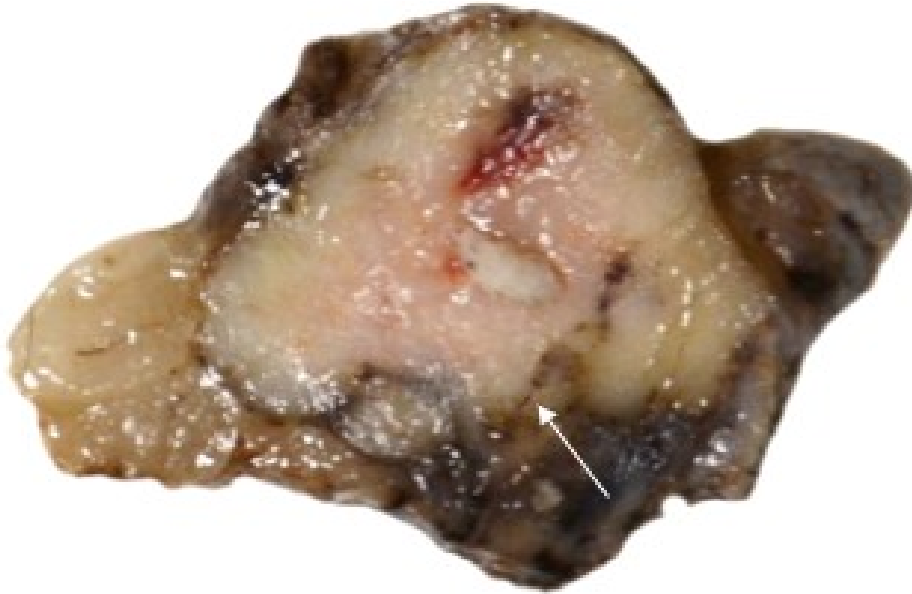


Рисунок 44 – Низкодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (белая стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 10

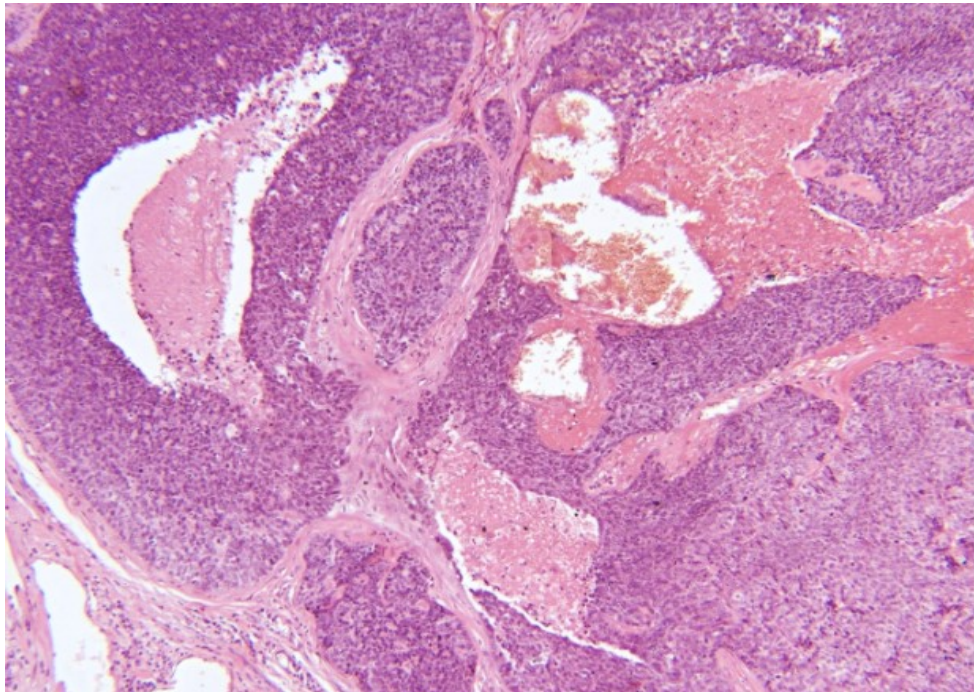


Рисунок 45 – Низкодифференцированная аденокарцинома молочной железы, микропрепарат. Сука, № 21. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100

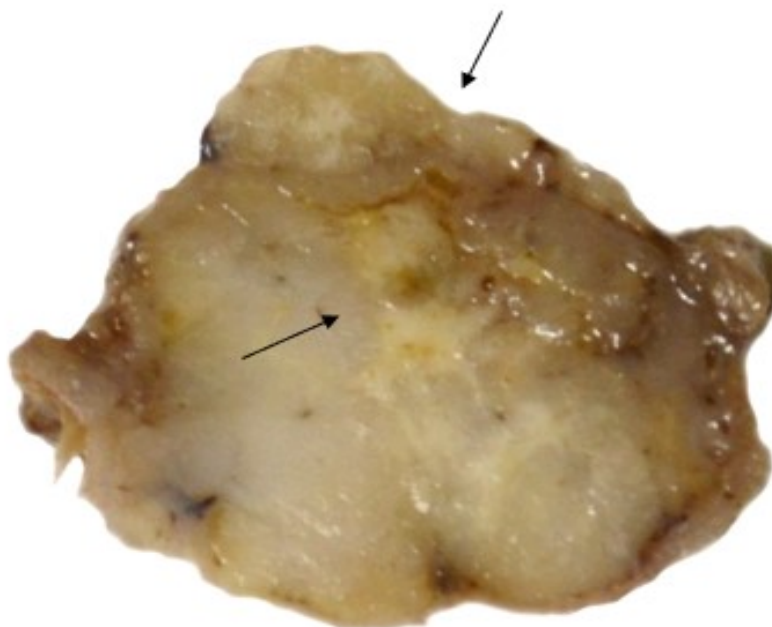


Рисунок 46 – Низкодифференцированная аденокарцинома молочной железы, макропрепарат (белая стрелка – опухолевая ткань). Сука, № 21

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), секреторирующими или муцинозными [98].

### **2.2.7 Результаты исследования церулоплазмина у животных всех 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 церулоплазмينا при низкодифференцированных высококачественных новообразованиях составляет 1032,5 мг/л.

Клинические диагнозы и результаты содержания церулоплазмينا представлены в таблице 12:

Таблица 12 – Гистологический диагноз и концентрация церулоплазмينا в сыворотке крови на примере клинических случаев

Идентификационный номер животного	Диагноз	Уровень церулоплазмينا, о.е.	Уровень церулоплазмينا, мг/л
1	Аденома	0,57	498,8
2	Низкодифференцированная аденокарцинома	1,19	1978,4
3	Фиброаденома	0,27	236,3
4	Низкодифференцированная аденокарцинома	1,33	1163,8
5	Низкодифференцированная аденокарцинома	0,95	831,3
6	Низкодифференцированная аденокарцинома	1,18	1032,5
7	Внутрипротоковая папиллярная аденома	0,55	481,3
8	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,65	568,75
9	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,71	621,3

Продолжение таблицы 12

10	Низкодифференцированная аденокарцинома	1,09	953,8
11	Низкодифференцированная аденокарцинома	1,45	1268,8
12	Низкодифференцированная аденокарцинома	1,65	1443,8
13	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,64	560
14	Фиброаденома	0,49	428,8
15	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,66	577,5
16	Аденома	0,56	490
17	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,48	420
18	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,58	507,5
19	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,48	420
20	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,62	550,2
21	Низкодифференцированная аденокарцинома	1,65	1443,8
22	Низкодифференцированная аденокарцинома	0,90	787,5
23	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,82	717,5
24	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,55	481,3

Продолжение таблицы 12

25	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,52	462,7
26	Эктазия протока	0,43	376,6
27	Внутрипротоковая аденома	0,45	393,8
28	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,58	507,5
29	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,52	455
30	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,56	490
31	Низкодифференцированная аденокарцинома	0,94	822,5
32	Низкодифференцированная аденокарцинома	0,92	805
33	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,49	428,75
34	Низкодифференцированная аденокарцинома	0,91	796,6
35	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,72	630
36	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,22	192,5
37	Фиброаденома	0,27	236,3
38	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,55	481,3
39	Эктазия протока	0,43	376,3
40	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,52	455

Продолжение таблицы 12

41	Внутрипротоковая папиллярная аденома	0,54	472,5
42	Внутрипротоковая аденома	0,45	393,75
43	Эктазия протока	0,58	507,5
44	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,52	455
45	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,50	437,5
46	Умереннодифференцированная аденокарцинома	0,56	490
47	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,24	210
48	Высокодифференцированная аденокарцинома	0,49	428,8
49	Клинически здорово	0,44	385
50	Клинически здорово	0,34	297,5
51	Клинически здорово	0,63	551,3
52	Клинически здорово	0,32	280
53	Клинически здорово	0,69	603,8
54	Клинически здорово	0,35	306,3
55	Клинически здорово	0,33	288,8
56	Клинически здорово	0,42	367,5
57	Клинически здорово	0,29	253,8
58	Клинически здорово	0,40	350
59	Клинически здорово	0,33	288,8
60	Клинически здорово	0,50	437,5

Средние значения результатов исследований представлены в следующей таблице 13:

Таблица 13 – Средние значения результатов исследований сыворотки крови у собак на содержание церулоплазмينا, мг/л

Группа животных	Содержание церулоплазмينا, мг/л M±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 <sup>×, □</sup>
Животные с умереннодифференцированными новообразованиями	533,8±87,5 <sup>*, ××, +</sup>
Животные с низкодифференцированными новообразованиями	1032,5±245 <sup>*, ++, □□</sup>

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 церулоплазмينا в сыворотке крови у собак с низкодифференцированными новообразованиями и остальными группами, в которых различия уровня церулоплазмينا незначительное. При проведении исследования мы получили следующие результаты: среднее значение содержания уровня церулоплазмينا 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 отделить 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 47).

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.

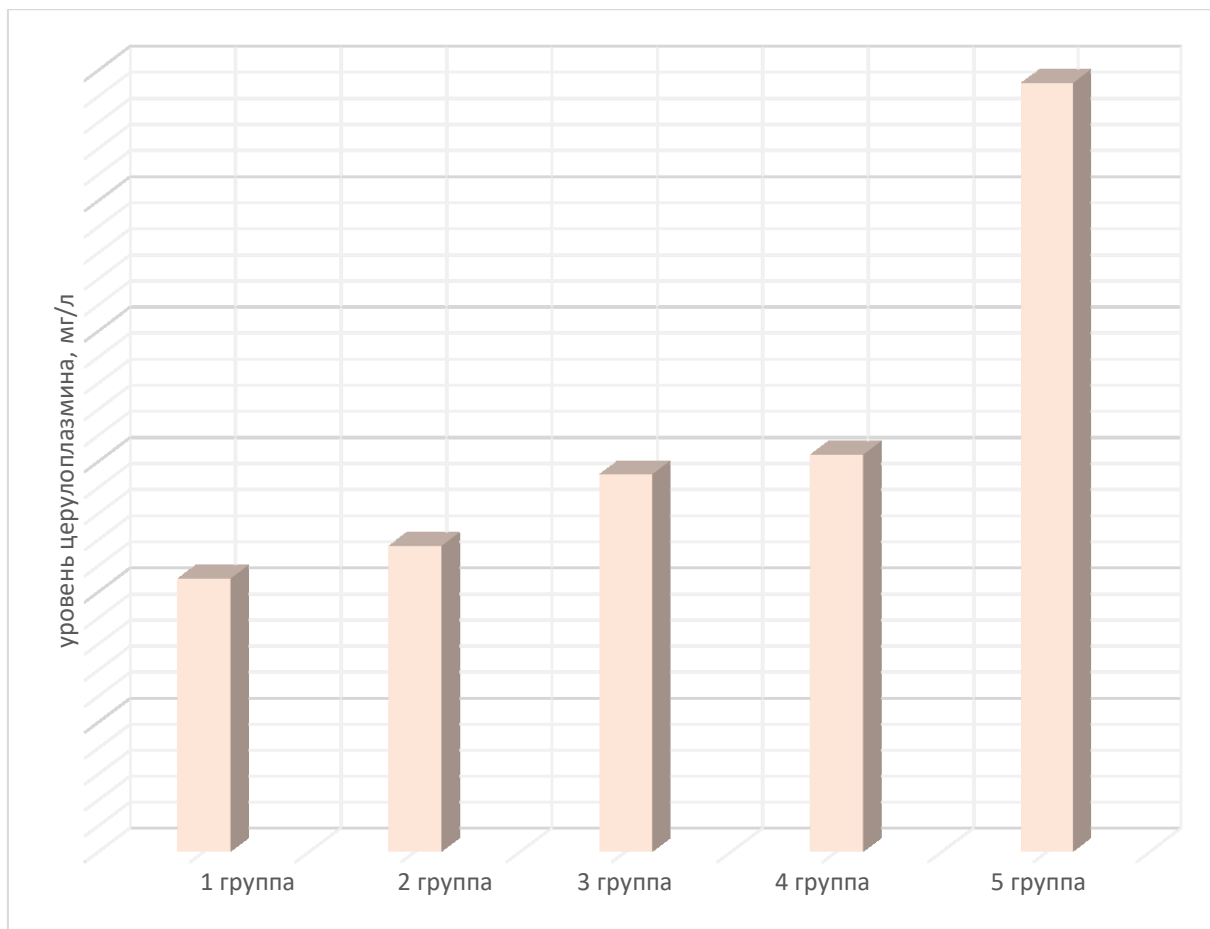


Рисунок 47 – Уровни церулоплазмينا у собак исследуемых групп, где:

- 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.

Момент назначения лекарств играет важную роль в успехе лечения. Существует ряд клинических выводов относительно времени удвоения: у мелких опухолей большая фракция роста и малое время удвоения; следовательно, они более чувствительны к действию лекарств; после хирургического удаления большой локализованной первичной опухоли в операционном поле часто остаются опухолевые клетки. (У этих клеток формируется очень большая фракция роста, и время удвоения массы становится намного короче, чем у начальной опухоли. Это называется восстановлением клеток, когда оставшиеся после удаления опухоли клетки, многие из которых находились в G-фазе, переходят в фазу деления); вначале и у местных, и у дистанционных метастазов присутствует большая фракция роста, а время удвоения массы короче, чем у первичной опухоли, из которой они проросли. Исходя из этого, можно сделать вывод, что химиотерапия наиболее действенна при лечении: маленьких быстро растущих опухолей; местных опухолевых разрастаний после удаления опухоли; микрометастатических заболеваний.

При адьювантной терапии наибольший успех химиотерапии может быть достигнут при лечении опухолей с малой массой, большой фракцией роста и малым временем удвоения массы, а также опухолей определенного типа. Идеальным временем для начала адьювантной терапии является момент сразу после операции, поскольку в это время будут учтены все вышеуказанные критерии, однако в наших реалиях это невыполнимо, ввиду длительного выполнения гистологического исследования. Задержка терапии до того момента, когда начнется явный повторный рост опухоли, приведет к тому, что фракция роста будет такой же, как и у первичной опухоли. Также в этот момент сильно увеличится число клеток, резистентных к действию лекарства. После окончания начального курса дальнейшие назначения будут продиктованы уже эффективностью использованных лекарств. Интервал между курсами должен строго

рассчитываться, чтобы одновременно было убито как можно больше опухолевых клеток и дано время на восстановлении популяции нормальных клеток. Интервал не должен быть слишком большим, чтобы не дать распространиться остаточным опухолевым клеткам, что может привести к репопуляции массы, в которой, вероятно, будет больше клонов клеток, устойчивых к лекарствам. Если же интервал будет слишком коротким, нормальные клетки не успеют восстановить свою популяцию с последующим кумулятивным токсическим действием лекарств.

При повторном росте в опухолевой массе содержится большое количество резистентных клеток, и все достижения начального курса лечения теряются.

Неoadьювантная химиотерапия направлена на уменьшение объема опухоли для достижения операбельности, оптимизации объема операции и снижения риска рецидивирования, также, косвенно, на профилактику метастазирования.

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 [30]. Полученные 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 церулоплазмина 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 [122], что значительно улучшило результаты лечения, повысило качество жизни и увеличило ее продолжительность. Все результаты лечения не расходились со статистическими данными литературных руководств.

### 3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опухоль в организме способствует развитию окислительного стресса – свободнорадикального процесса, сопровождающегося изменением активности большинства компонентов антиоксидантной системы защиты организма и накоплением продуктов перекисного окисления липидов в крови. Активные формы кислорода принимают участие в прогрессии опухоли, способствуя росту инвазивности и метастатического потенциал. Окислительный стресс является основным фактором в осуществлении различных модификаций белков, включая белки, которые экскретируются в кровь. Более того, окислительно-модифицированные опухолевые белки, которые обнаруживаются в крови, могут обеспечить понимание молекулярных процессов, происходящих в опухоли. Снижение уровня перекисного окисления липидов по мере возрастания распространенности опухолевого процесса, возможно, связано с увеличением активности компонентов антиоксидантной системы [18]. Нередко окислительный стресс, протекающий на организменном уровне, приводит к возникновению опухоли, в т.ч. злокачественного новообразования молочной железы. Метаболические изменения при развитии первичных опухолей оказывают значительное влияние на прогрессирование опухоли и на развитие метастатического фенотипа [17].

На основании этих данных предполагаем, что изменения в межклеточных взаимодействиях и окислительном стрессе, связанные с новообразованием молочной железы, не только приводит к увеличению уровней определенных белков, которые секретируются в кровь, но что эти белки будут иметь необычно высокие скорости окисления. Как таковые, эти окисленные белки могут служат в качестве циркулирующих биомаркеров опухоли молочной железы.

Изменения окислительно-восстановительного потенциала могут способствовать развитию и прогрессированию опухоли молочной железы,

путем изменения внутриклеточной сигнализации и связи между клетками. Например, умеренное увеличение внутриклеточного производства активных форм кислорода изменяет экспрессию и секрецию различных биологически активных белков в нескольких эпителиальных клеточных линиях опухоли. 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 [164]. С другой стороны, избыточное производство активных форм кислорода становится деструктивным и вызывает клеточный лизис, который может быть полезен при наличии опухоли. Увеличение, в данном случае, уровня церулоплазмينا описывается как возможность эндогенной защиты антиоксидантными системами. Можно с уверенностью констатировать, что липиды представляют собой мишень окислительной атаки и присутствие опухоли вызывает увеличение активных радикалов. Повышенные значения отражают переход к окислительным реакциям, что отражает наличие анаэробных тканей.

Повышенный уровень церулоплазмينا до введения адьювантной химиотерапии может являться симптомом остаточного заболевания, так что снижение уровня белка при проведении химиотерапевтического лечения предположительно указывает на субклинический ответ остаточной болезни. Повышение церулоплазмينا у пациента, проходящего курс адьювантной химиотерапии или после окончания курса лечения, или

отсутствие динамики в снижении уровня острофазного белка до нормального уровня при адьювантной терапии, вполне может означать наличие заболевания, которое устойчиво к используемому методу лечения.

Также уровень церулоплазмينا повышается при неопластических процессах за счет его стимуляции ангиогенеза. Стимуляторы ангиогенеза прямого действия, которые индуцируют рост сосудов в независимости 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: простогландин E1, ионы меди и гепарин. Церулоплазмин – естественный переносчик ионов меди в плазме крови – также обладает ангиогенной активностью. Доказано, что ангиогенная активность церулоплазмينا обусловлена именно присутствием ионов меди. Ионы меди содержатся в большинстве малых полипептидных цепочек, обладающих свойствами индукторов ангиогенеза в опухолевых тканях.

В ветеринарной медицине данных об уровне церулоплазмينا при опухолевом процессе крайне мало, исследования зависимости уровня белка и степени злокачественности новообразованиях молочной железы у собак в доступной литературе отсутствовали. Данные из гуманной медицины адаптировать проблематично ввиду использования видоспецифичных реагентов, различных методик исследования и, соответственно, единиц измерения [17]. Однако тенденция к повышению или снижению уровня церулоплазмينا у человека и животных общая. В проведенных ранее исследованиях опухолевого процесса различных тканей уровень острофазного белка заметно повышался, особенно это касается тканей молочной железы, репродуктивных органов, головного мозга и печени [73, 89, 96, 146]. Т. к. информации об уровне



церулоплазмина у здоровых животных, полученных спектрофотометрическим методом нет в доступе, мы взяли сыворотку крови 12 здоровых животных в качестве контроля и исходили от этих данных. Несмотря на состояние здоровья, были пациенты с новообразованиями, уровень церулоплазмина которых был ниже, чем у собак контрольной группы, это может быть индивидуальной особенностью и говорить о том, что имеющееся новообразование никак не влияет на состояние антиоксидантной системы [76, 82, 144]. При ранней диагностике новообразований, своевременном и адекватном лечении есть возможность снизить смертность от новообразований молочной железы, в том числе [117]. Своевременно поставленный диагноз и эффективные методы оценки прогрессирования болезни являются ключевыми факторами для успешного контроля болезни. Диагноз на ранних стадиях развития опухоли имеет максимальный потенциал для лучших терапевтических вмешательств и, следовательно, выживания пациентов. Однако ранние стадии обычно протекают бессимптомно, что приводит к отсроченному выявлению заболевания, диагнозу на поздних стадиях, когда эффективные методы лечения бесполезны. Доступные на данный момент диагностические тесты для выявления новообразований молочной железы у животных отсутствуют, либо являются неспецифичными и дорогостоящими, либо включают инвазивные процедуры с возможностью осложнений или не подходят для скрининга. Следовательно, существует необходимость в разработке новых биомаркеров для выявления заболеваний на ранних стадиях, особенно, если они могут быть разработаны с использованием неинвазивных методов [112].

В нашей работе мы впервые определили содержание церулоплазмина в крови здоровых собак разных пород и возрастов. На основе комплексного исследования выявлена зависимость содержания церулоплазмина от формы и стадии опухоли.

## 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 [12, 63]. 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 E<sub>1</sub>, ионы меди и гепарин. Церулоплазмин – естественный переносчик ионов меди в плазме крови обладает свойствами индуктора ангиогенеза в опухолевых тканях [64, 117, 124].

Результаты наших исследований показали зависимость 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.

#### 4. 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.

## **5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ**

Используя предложенный способ диагностики опухолей, можно получать косвенную информацию о степени злокачественности опухоли, генерализации. 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.

## **6. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Сведения, полученные в ходе выполнения экспериментальной работы по изучению зависимости 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:

- определить разницу между концентрациями церулоплазмينا у собак до и после оперативного вмешательства;
- изучить зависимость 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 ангиогенез и микроциркуляторное русло, ассоциированные с компонентами антиоксидантной системы;
- изучить зависимость церулоплазмينا со степенью злокачественности опухолей других типов у различных видов животных.

## 7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

EGFR – epidermal growth factor receptor (рецептор эпидермального фактора роста)

ERK – extracellular signal-regulated kinase (киназа, регулируемая внеклеточным сигналом)

МАРК – mitogen-activated protein kinase (митогенактивируемая протеинкиназа)

PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase (фосфатидилинозитол-3-киназа)

РКВ/АКТ – the serine/threonine protein kinase (серин/треониновая протеинкиназа)

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

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КТ – компьютерная томография

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МРТ – магнитно-резонансная томография

О.Е. – оптическая единица

ЭКГ – электрокардиография

ЭхоКГ – эхокардиография

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васин, А. В. Экспрессия псевдогена церулоплазмينا в культивируемых клетках человека / А. В. Васин // Доклады РАН 397: 827–831. 2004.
2. Васин, А. В. Митохондриальный церулоплазмин млекопитающих / А. В. Васин // Молекуляр. Биология 39: 48–60, 2005.
3. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биомембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков // М., 1972. - 142 с.
4. Владимирова, Л. Ю. Возможности использования аутоплазмы в лекарственной терапии больных раком молочной железы / Л. Ю. Владимирова // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 2005. – 21 с.
5. Волков, А. А. Комплексы физиологически активных веществ с ионами меди активных центров церулоплазмينا / А. А. Волков // Автореф. дис. канд. хим. наук - Н. Новгород, 2006. – 28 с.
6. Горудко, И. В. Новые подходы к определению концентрации и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме крови человека / И. В. Горудко, О.С. Черкалина, А. В. Соколов, М. О. Пулина, Е. Т. Захарова и др. // Биоорганическая химия. - 2009. - Т. 35. - № 6. - С. 629–639.
7. Гюлиханданова, Н. Е. Изучение регуляции экспрессии гена церулоплазмينا в клетках молочной железы / Н. Е. Гюлиханданова // Авт. Кан. Дис. СПб. ГУ НИИЭМ РАМН. 2004.
8. Гюлиханданова, Н. Е. Изучение регуляции активности гена церулоплазмينا у млекопитающих / Н. Е. Гюлиханданова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 37, 5: 553–558, 2004.
9. Жигулева, Э. А. Изучение регуляции экспрессии гена церулоплазмينا / Э. А. Жигулева // III съезд биохимического общества, Тезисы научных докладов. Санкт-Петербург, 2002. – 287 с.



10. Зеленовский, Н. В. Международная ветеринарная анатомическая номенклатура на латинском и русском языках / Н. В. Зеленовский / Издательство «Лань» СПб, 2013. – 140 с.
11. Каблуков, А. Д. Применение цитостатиков при опухолевых заболеваниях молочных желез и влагалища у сук / А. Д. Каблуков // Дис. канд. вет. наук. – СПб., 2004. –110 с.
12. Карпенко, Л. Ю. Возрастные особенности состояния антиоксидантной системы организма здоровых собак / Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта, О. К. Суховольский // Успехи геронтологии. - 2008. - Т. 21. -№ 1. - С. 49-52.
13. Костевич, В. А. Взаимодействие церулоплазмина и тиоцианата как ингибиторов миелопероксидазы в плазме крови / В. А. Костевич, А. В. Соколов // Медицинский Академический Журнал. -20б. -Т. 10. -№ 5. -С. 210.
14. Крайнова, Т. А. Влияние внутриутробной гипоксии на функции церулоплазмина у новорожденных с различными сроками гестации / Т. А. Крайнова // Нижегородский медицинский журнал. 2005. - № 2. - С. 59–64.
15. Кудряшов, А. А. Патологоанатомическая диагностика болезней собак и кошек / А. А. Кудряшов, В. И. Балабанова // СПб: НОУ ДО Институт ветеринарной биологии, 2011 – 220 с.
16. Куприянов, В. В. Ангиогенез: образование, рост и развитие кровенос. сосудов. / В. В. Куприянов // М: Квартет, 1993. – 170 с.
17. 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.
18. Летуновская, А. В. Церулоплазмин в качестве метода диагностики при оценке злокачественности новообразований молочной

железы у животных / А. В. Летуновская, П. С. Бабич, П. С. // – Международный вестник ветеринарии. – 2019. – № 1. – С. 149-153.

19. Мжельская, Т. И. Биологические функции церулоплазмينا и их дефицит при мутациях генов, регулирующих обмен меди и железа / Т. И. Мжельская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. - Т. 130, № 8. - С. 124–126.

20. Митин, В. Н. Опухоли молочных желез у собак и кошек / В. Н. Митин //Материалы 4-й научной конференции по вопросам онкологии, Москва, 2003–14 с.

21. Моисеенко, В. М. Лекции по фундаментальной и клинической онкологии / В. М. Моисеенко // Санкт-Петербург, Издательство Н-Л, 2004. – 312 с.

22. Панасенко, О. М. Влияние церулоплазмينا и лактоферрина на хлорирующую активность лейкоцитарной миелопероксидазы. Изучение методом хемилюминесценции / О. М. Панасенко, А. В. Чеканов, И. И. Власова, А. В. Соколов и др. // Биофизика. - 2008. - Т. 53. - № 4. - С. 573–581. [PMID: 18819272].

23. Панасенко, О. М. Хлорноватистая кислота как источник свободных радикалов / О. М. Панасенко, И. В. Горудко, А. В. Соколов // Успехи биологической химии. - 2013. - Т. 53. - С. 195244.

24. Паномарьков, В. И. Состояние и перспективы изучения опухолевых заболеваний у домашних животных / В. И. Паномарьков // М.: 1976–34 -45 с.

25. Племяшов, К. В. Молочная железа. Морфология, физиология и биохимические аспекты лактогенеза: Научно-методические рекомендации / К. В. Племяшов, Ю. В. Конопатов, В. И. Соколов // – СПб.: Издательство СПбГАВМ, 2007. - 30 с.

26. Пучкова, Л. В. Изучение регуляции активности гена церулоплазмина у млекопитающих / Л. В. Пучкова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2004-№ 5. С.553-558.

27. Рутницкий, А. Ю. Роль церулоплазмина в регуляции функционального состояния отдельных звеньев иммунитета / А. Ю. Рутницкий // Диссертация кандидата биологических наук: 03.00.13, 14.00.36.- Нижний Новгород, 2001.- 127 с.: ил. РГБ ОД, 61 02–3/241–5.

28. Самсонов, С. А. Активность гена CTR1 и статус меди в различных органах крысы / С. А. Самсонов // Молекулярная биология, 40 (2): 239—251, 2006.

29. Сасина, Л. К. Выделение и частичная характеристика клона кДНК рецептора церулоплазмина человека / Л. К. Сасина // Бюлл. эксп. биол. и мед, 129 (5): 578, 2000; 175.

30. Сенюк, О. Ф. Исследование физиологических функций церулоплазмина человека. Влияние церулоплазмина на иммунциты в норме и при патологии / О. Ф. Сенюк // Биохимия. 1994. - Т. 59, Вып. 10. - С. 1503–15.

31. Соколов, А. В. Взаимодействие церулоплазмина с серпроцидинами / А. В. Соколов, К. В. Агеева, В. А. Костевич, М. Н. Берлов и др. // Биохимия. - 2010. - Т. 75. - № 11. - С. 1544–1552. [PMID: 21314603].

32. Соколов, А. В. Взаимодействие церулоплазмина и 5-липоксигеназы / А. В. Соколов, Е. А. Голенкина, В. А. Костевич, В. Б. Васильев, Г. Ф. Судбина // Биохимия. - 2010. - Т. 75. - № 12. - С. 1687–1694. [PMID: 21314617].

33. Соколов, А. В. Возможности регуляции проатерогенных свойств миелопероксидазы с помощью веществ, ингибирующих ее активность и препятствующих ее взаимодействию с липопротеинами

низкой плотности / А. В. Соколов, В. А. Костевич // Медицинский Академический Журнал. - 2012. - Т. 12. - № 3. - С. 80–81.

34. Соколов, А. В. Двухстадийный метод получения церулоплазмина на основе его взаимодействия с неомицином / А. В. Соколов, В. А. Костевич, Д. Н. Романико, Е. Т. Захарова, В. Б. Васильев // Биохимия. - 2012. - Т. 77. - № 6. - С. 775–784.

35. Соколов, А. В. Идентификация комплексов церулоплазмина с матриксными металлопротеиназами 2 и 12 / А. В. Соколов, М. О. Пулина, К. В. Агеева, О. С. Черкалина и др. // Биохимия. - 2009. - Т. 74. - X» 12. - С. 1703–1708.

36. Соколов, А. В. Исследование взаимодействия церулоплазмина, лактоферрина и миелопероксидазы с помощью фотонной корреляционной спектроскопии / А. В. Соколов, В. Н. Прозоровский, В. Б. Васильев // Биохимия. - 2009. - Т. 74. - № 11. - С. 1506–1509.

37. Соколов, А. В. Комплекс церулоплазмина и лактоферрина в слезной жидкости / А. В. Соколов, М. О. Пулина, О. Л. Рунова, Е. Т. Захарова, В. Б. Васильев // Медицинский Академический Журнал. - 2013. - Т. 13. - №2. - С. 3943.

38. Соколов, А. В. Протеолитическая деградация церулоплазмина тромбином - пример неканонического гидролиза связи K887-V888 / А. В. Соколов, В. А. Костевич // Медицинский Академический Журнал. - 2010. - Т. 10. - № 5. - С. 63–64.

39. Суховольский, О. К. Комплексное лечение новообразований молочной железы и кожи у собак / О. К. Суховольский // Диссертация доктора ветеринарных наук: 16.00.05. - Санкт-Петербург, 2002. - 307 с.: ил.

40. Цымбаленко, Н. В. Связь между уровнем экспрессии генов, поддерживающих гомеостаз меди, содержанием ионов меди в пище и типом метаболизма меди в раннем онтогенезе / Н. В. Цымбаленко //

Материалы 2-го съезда медицинских генетиков, Курск, 16–19 мая 2000 г., с. 250–251.

41. Чардымова, Л. Р. Новый метод коррекции анемии у детей со злокачественными опухолями / Л. Р. Чардымова // Современные технологии в педиатрии и детской хирургии: тез. докл. II Всероссийского конгресса. М., 2003. - С. 362.

42. Чиссов, В. И. Онкология: национальное руководство / под ред. акад. РАМН В. И. Чиссова, акад. РАН и РАМН М. И. Давыдова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2013. – 1072 с.

43. Шалашная, Е. В. Использование показателей свободнорадикального окисления для оценки распространенности злокачественного процесса и эффективности противоопухолевого воздействия при раке молочной железы / Е. В. Шалашная // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 2004. – 18 с.

44. Шиффман, Ф. Патофизиология крови / Дж. Ф. Шиффман // М.; СПб.: Издательство БИНОМ - Невский диалект, 2000. - 448 с.

45. Ярополов, А. Н. Механизмы антиоксидантного действия церулоплазмينا А. Н. Ярополов // Доклады академии наук СССР. 1986. - Т. 291, № 1. -С. 237–241.

46. Aden, D. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line / D. Aden // Nature, 282 (5739): 615-616, 1979.

47. Ageeva, O. Complexes of ceruloplasmin with proteins of neutrophils and their probable biochemical roles /O. Ageeva // I A Biochemical Society focused meeting. Experimental Approaches of protein:protein interactions (11-12 January 2010, University of Sheffield, United Kingdom). - 2010. - P. 12.

48. Akshada, G. Urinary proteome alterations in HER2 enriched breast cancer revealed by multipronged quantitative proteomics /G. Akshada // Proteomics 2016.
49. Allen, L. H. Biological mechanisms that might underlie iron's effects on fetal growth and preterm birth / L. Allen // J. Nutr. 2001. - Vol. 131, N 2. - P. 581 -589.
50. Ambrosone, C. B. Oxidants and antioxidants in breast cancer. / C. B. Ambrosone // Antioxid Redox Signal. 2000; 2:903–917.
51. Antelmann, H. Thiol-based redox switches and gene regulation. / H. Antelmann // Antioxid Redox Signal. Mar 15.2011 14:1049–1063.
52. Baxter, F. O. The beginning of the end: death signaling in early involution / F. O. Baxter // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 12 (1): 3-13, 2007.
53. Bento, I. Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites / I. Bento // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., 63 (Pt 2): 240-248, 2007.
54. Berry, D. A. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer / D. A. Berry // The New England journal of medicine 2005, 353, 1784-1792.
55. Bosio, S. Anemia and iron overload due to compound heterozygosity for novel ceruloplasmin mutations / S. Bosio // Blood. 2002. — Vol. 100. - P. 2246 -2248.
56. Cassali, G. D. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours / G. D. Cassali // Cytopathology. 2007.
57. Cengizhan, S. Oxidative Status and Acute Phase Reactants in Patients with Environmental Asbestos Exposure and Mesothelioma / S. Cengizhan // Scientific World Journal Volume 2014, Article ID 902748, 5 pages.

58. Clarkson, R. W. Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in postlactational regression / R. W. Clarkson // *Breast Cancer Res.* 2004;6: R92–109. doi:10.1186/bcr754.

59. Clemente, M. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer / M. Clemente // *Vet. Pathol.* 2010. No. 47 (2).

60. Curley, L. Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice / L. Curley // *J. Biol. Chem.* -2001.-Vol. 276.-P. 36857-36861.

61. De Domenico, I. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin / I. De Domenico // *EMBO J.*, 26 (12): 2823-2831, 2007.

62. De Rosa, V. Reversal of Warburg Effect and Reactivation of Oxidative Phosphorylation by Differential Inhibition of EGFR Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer / V. De Rosa // *Clin. Cancer Res.* 21, 5110–5120.

63. Dolka, I. Retrospective study and immunohistochemical analysis of canine mammary sarcomas / I. Dolka // *BMC Vet. Res.* 2013. No. 9.

64. Ellis, M. J. Atomic resolution structures of native copper nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* and the active site mutant Asp92Glu // / M. J. Ellis // *J. Mol. Biol.*, 328: 429438, 2003.

65. Elston, C. W. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up / C. W. Elston // *Histopathology* 41: 154-161, 2002.

66. Endo, T. Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import / T. Endo // *Biochim. Biophys. Acta*, 1592: 3-14, 2002.

67. Erler, J. T. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis / J. T. Erler // *Nature* 2006; 440: 1222–1226.

68. Esther, C. Iron and Oxidative Stress in Pregnancy / Esther Casanueva, Fernando E. Viteri / C. Esther // American Society for Nutritional Sciences. -2003.-P. 1700S-1708S.
69. Fedi, P. Growth factors. In: Cancer Medicine / P. Fedi // J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W.
70. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay // Int. J. Cancer 2015, 136, E359-386.
71. Finney, L. X-ray fluorescence microscopy reveals largescale relocalization and extracellular translocation of cellular copper during angiogenesis /L. Finney // Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 2247–2252.
72. Gao, D. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression / D. Gao // Biochim Biophys Acta 2009; 1796: 33–40.
73. Gao, D. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis / D. Gao // Science 2008; 319: 195–198.
74. Gerstein, M. B. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition / M. B. Gerstein // Genome Res., 17(6): 669-681, 2007.
75. Goldschmidt, M. Classification and grading of canine mammary tumors / M. Goldschmidt // Vet. Pathol. 2011. No. 48 (1).
76. Goldschmidt, M. Neoplastic lesions of the mammary gland / M. Goldschmidt // Pathobiology of the aging dog. Ames, Iowa, Iowa State University Press, 2001.
77. Gough, D. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule / D. Gough // Cell Death Dis. 2011; 2: e213. [PubMed: 21975295].
78. Gregyrio, H. Mammary invasive micropapillary carcinoma in a dog: Immunohistochemical description and clinical followup / H. Gregyrio // Acta Vet. Hung. 2012.



79. Gudan, K. Histopathological evaluation and immunohistochemical study of estrogen receptor  $\bar{6}$ , HER-2 and Ki-67 in canine neoplastic mammary lesions / K. Gudan // *Vet. Arhiv.* 2011. No. 81. Pp. 709–722.
80. Hosada, T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer / T. Hosada // *Oncogene*, vol. 21, no. 48, pp. 7421–7434, 2002.
81. Hassouneh, B. Tetrathiomolybdate promotes tumor necrosis and prevents distant metastases by suppressing angiogenesis in head and neck cancer / B. Hassouneh // *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1039–1045.
82. Hennidhausen, L. Signaling pathways in mammary gland development / L. Hennidhausen// *Developmental cell*, 1 (10): 467-475, 2001.
83. Hongjun, J. Oxidatively Modified Proteins as Plasma Biomarkers in Breast Cancer / J. Hongjun // *Cancer Biomark.* 2013; 13(3): doi:10.3233/CBM-130349.
84. Ioan, B. Comparative oncology Bucharest / B. Ioan // The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
85. Jin, H. Protein modifications as potential biomarkers in breast cancer / H. Jin // *Biomark Insights.* 2009; 4:191–200. [PubMed: 20072669].
86. Jinong, L. Proteomics and Bioinformatics Approaches for Identification of Serum Biomarkers to Detect Breast Cancer / L. Jinong // *Clinical Chemistry* 48:8 1296–1304 (2002).
87. Jose, J. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives / J. Jose // *American Society for Veterinary Clinical Pathology.* - 2005
88. Joyce, J. Microenvironmental regulation of metastasis / J. Joyce // *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 239–252.
89. Juarez, J. Copper binding by tetrathiomolybdate attenuates angiogenesis and tumor cell proliferation through the inhibition of superoxide dismutase / J. Juarez // *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4974–4982.

90. Karayannopoulou, M. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method / M. Karayannopoulou // *J. Comp. Pathol.* 2005. No. 133 (4).
91. Karihtala, P. Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis / P. Karihtala // *Eur J Cancer.* 2006; 42:2653–2659. [PubMed: 16996262].
92. Katsunuma, H. Clinical experience with ceruloplasmin on aplastic anemia / H. Katsunuma // *Jap. J. Clin. Med.* 1961. - Vol. 19. - P. 424.
93. Kono, S. Biochemical analysis of a missense mutation in aceruloplasminemia S. Kono // *J. Biol. Chem.* 2002. -Vol. 277. - P. 1375-80.
94. Kim, N. H. Evaluation of clinicopathological characteristics and oestrogen receptor gene expression in oestrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas / N. H. Kim // *J. Comp. Pathol.* 2014. No. 151 (1).
95. Lahiru, G. Proteomic profiling of exosomes secreted by breast cancer cells with varying metastatic potential / G. Lahiru // *Proteomics*, 2017.
96. Lakhani, S. R. WHO classification of tumours of the breast / S. Lakhani // 4th edition. IARC Press, Lyon, 2012.
97. Lana, S. E. Tumors of the mammary gland. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4th ed. / S. E. Lana // MO: Saunders Elsevier, 2007.
98. Lee, J. Essential role for mammalian copper transporter Ctrl in copper homeostasis and embryonic development / J. Lee // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98,12: 6842-6847, 2001.
99. Linder, M. C. Copper and genomic stability in mammals /M. Linder // *Mutation Res.* V. 475 (1):141, 2001.
100. Lowndes, S. A Role of copper in tumour angiogenesis / S. Lowndes, A. L. Harris // *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10: 299–310.

101. Madsen, E. Copper and Iron Disorders of the Brain / E. Madsen // *Annu. Rev. Neurosci.*, 30: 317-337, 2007.
102. Madsen, E. Involvement of Reactive Oxygen Species in the Mechanisms Associated with Cervical Cancer Specific Treatment *Chirurgia* / E. Madsen // (2014) 109: 806-811 No. 6, November – December.
103. Marttila-Ichihara, F. Vascular adhesion protein-1 enhances tumor growth by supporting recruitment of Gr-1+CD11b+ myeloid cells into tumors / F. Marttila-Ichihara // *Cancer Res* 2009; 69: 7875–7883.
104. McDaniel, S. M. Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis / S. McDaniel // *Am J Pathol.* 2006; 168:608–20.
105. Mills, S. W. Prognostic value of histologic grading for dog's mammary carcinoma: a retrospective survival analysis / S. Mills // *Vet. Pathol.* 2015.No. 52 (2).
106. Misdorp, W. Tumors of the mammary gland. In: *Tumors in Domestic Animals* / W. Misdorp // Iowa State Press. Ames, 2002.
107. Moe, L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds / L. Moe // *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2001.
108. Morris, J. S. Improving the diagnosis and treatment of canine mammary tumours: Immunohistochemical markers as a prognostic tools / J. S. Morris // *Vet. J.* 2010.
109. Morris, J. S. Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER $\beta$  and p53 / J. S. Morris // *Vet. J.* 2009.
110. Mulas, J. M. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\beta$  and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog / J. M. Mulas // *Vet. Pathol.* 2005.

111. Mulas, M. J. Oncogen Her-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study / J. M. Mulas // *Breast Cancer Rest. Treat.*, 2003.
112. Neupert, W. Translocation of proteins into mitochondria / W. Neupert // *Annu. Rev. Biochem*, 76: 723-749, 2007.
113. Onizuka, K: Serum proteins in recurrent postoperative breast cancer / K. Onizuka // *Rinsho Meneki I1*: 285-293, 1979.
114. Orrenius, S. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death / S. Orrenius // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 47: 143-183, 2007.
115. Orrenius, S. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews* / S. Orrenius // *Molecular Cell Biology*, 4: 552565, 2003.
116. Overley, B. Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma / B. Overley // *J. Vet. Intern. Med.* 2005.
117. Pan, Q. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis / Q. Pan // *Cancer Res* 2002; 62: 4854–4859.
118. Peca, L. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics / L. Peca // *Vet. Pathol.* 2013. No. 50 (1).
119. Pitteri, S. J. Tumor microenvironment-derived proteins dominate the plasma proteome response during breast cancer induction and progression / S. J. Pitteri // *Cancer Res* 2011; 71: 5090–5100.
120. Platonova, N. Milk ceruloplasmin is a valuable source of nutrient copper ions for mammalian newborns / N. Platonova // *J. Trace Elem. Med. Biol*, 21 (3): 184-193, 2007.
121. Pruitt, K. D. A curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins / K. D. Pruitt // *Nucleic Acids Res*, 35 (Database issue): D61-65, 2007.

122. Robert, A. Soy isoflavone supplementation elevates erythrocyte superoxide dismutase, but not plasma ceruloplasmin in postmenopausal breast cancer survivors / A. Robert // *Breast Cancer Research and Treatment* (2005) 89: 251–255.

123. Roberts, R. J. REBASE enzymes and genes for DNA restriction and modification / R. J. Roberts // *Nucleic Acids Res*, 35 (Database issue): D269-270, 2007.

124. Robin, M. A. Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70 / M. A. Robin // *J. Biol. Chem*, 278 (21): 18960-18970, 2003.

125. Rupaimoole, M. Long Noncoding RNA Ceruloplasmin Promotes Cancer Growth by Altering Glycolysis / M. Rupaimoole // *Cell Reports* 13, 1–8, December 22, 2015 ©2015 The Authors.

126. Ryan, M. T. Mitochondrial-nuclear communications / M. T. Ryan // *II Annu. Rev. Biochem*, 76: 701-722, 2007.

127. Sain, J. Tetrathiomolybdate-associated copper depletion decreases circulating endothelial progenitor cells in women with breast cancer at high risk of relapse / J. Sain // *Annals of Oncology* 24: 1491–1498, 2013.

128. Sabatucci, A. Structural characterization of the ceruloplasmin: lactoferrin complex in solution / A. Sabatucci, C.B. Angelucci, M. Maccagnone, I. Cozzani, E. Dainese, M. Beltramini, B. Salvato, P. Vachette, V.B. Vasilyev, A. Sokolov, M. Pulina // *Journal of Molecular Biology*. - 2007. - Vol. 371. - №4.-P. 1038-1046.

129. Samygina, V. R. Ceruloplasmin: macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins / V.R. Samygina, A.V. Sokolov, G. Bourenkov, M.V. Petoukhov // *II PLoS One*. - 2013.-Vol. 8. -№ 7.-e67145.

130. Santambrogio, P. Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues / P. Santambrogio // *J. Histochem. Cytochem*, 55 (11): 1129-1137, 2007.

131. Schedin, P. Microenvironment of the involuting mammary gland mediates mammary cancer progression / P. Schedin // *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2007; 12:71–82. doi:10.1007/s10911-007-9039-3.

132. Seshadri, V. Dual role of insulin in transcriptional regulation of the acute phase reactant ceruloplasmin / V. Seshadri // *JBC Papers in Press*, Published on May 23, as Manuscript M203610200, 2002.

133. Simon, D. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome / D. Simon // *Vet. Clin. Pathol*. 2009. No. 38 (4).

134. Skorupski, K. A. Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats / K. A. Skorupski // *J. Vet. Intern. Med*. 2005.

135. Sokolov, A. Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties of each other / A.V. Sokolov, K.V. Ageeva, M.O. Pulina // *II Free Radical Research*. -2008. - Vol. 42. - № 11-12. - P. 989-998.

136. Sokolov, A. Ceruloplasmin: macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins lactoferrin and myeloperoxidase / A. Sokolov // *II XIth International Conference on Lactoferrin Structure, Function and Applications (6-10 October 2013, Rome, Italy)*. -2013-P. 33.

137. Sokolov, A. Effect of lactoferrin on oxidative features of ceruloplasmin / A.V. Sokolov, K.V. Ageeva, M.O. Pulina, E.T. Zakharova // *II BioMetals*. - 2009. - Vol. 22. - № 3. - P. 521-529.

138. Sokolov, A. Identification and properties of complexes formed by myeloperoxidase with lipoproteins and ceruloplasmin / A. V. Sokolov, K. V. Ageeva, O. S. Cherkalina, M. O. Pulina // *II Chemistry and Physics of Lipids*. - 2010. - Vol. 163. - № 4-5. - P. 347-355.

139. Sokolov, A. Interaction of ceruloplasmin with eosinophil peroxidase as compared to its interplay with myeloperoxidase: reciprocal effect

on enzymatic properties / A.V. Sokolov, V. A. Kostevich, E. T. Zakharova, V. R. Samygina // *Free Radical Research*. - 2015. - Vol. 49. - P. 800-811.

140. Sokolov, A. Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes / A. V. Sokolov, E. T. Zakahrova, V. A. Kostevich, V. R. Samygina, V. B. Vasilyev // *Biometals*. - 2014. - Vol. 27. - № 5. - P. 815-828.

141. Sokolov, A. Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase / A. V. Sokolov, V. A. Kostevich, O. L. Runova, I. V. Gorudko // *II Chemistry and Physics of Lipids*. - 2014. -Vol. 180.-P. 72-80.

142. Sokolov, A. Protection of ceruloplasmin by lactoferrin against hydroxyl radicals is pH dependent / A. V. Sokolov, K. V. Solovyov, V. A. Kostevich, A. V. Chekanov // *II Biochemistry and Cell Biol*. - 2012. - Vol. 90. - № 3. - P. 397-404.

143. Sokolov, A. Role of myeloperoxidase binding to the surface of low-density lipoprotein in their proatherogenic modification by reactive halogen species / A. Sokolov // *II 8th International Human Peroxidase Meeting (September 9-12, 2013, Sydney)*. - 2013. - P. 87.

144. Sokolov, A. Thrombin inhibits the anti-myeloperoxidase and ferroxidase functions of ceruloplasmin: relevance in rheumatoid arthritis / A. V. Sokolov, L. Acquasaliente, V. A. Kostevich, R. Frasson // *II Free Radical Biology and Medicine*. - 2015.

145. Sokolov, A. Structural and functional features of ceruloplasmin in complexes with other proteins of acute phase / A. Sokolov // *FEBS Journal, Special Issue: 38th FEBS Congress (July 6-11,2013, Saint Petersburg, Russia)*. - 2013. - Vol. 280, SI. - P. 111112.

146. Sorenmo, K. U. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma / K. U. Sorenmo // *J. Vet. Intern. Med*. 2000.

147. Stoj, C. Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function / C. Stoj // FEBS Lett., 554: 422-426, 2003.
148. Szczubiai, M. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas / M. Szczubiai // Vet. Comp. Oncol. 2011. No. 9 (4).
149. Tamura, K. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura // Mol. Biol. Evol, 24 (8): 1596-1599, 2007.
150. Filippis, L. Thrombin binds human ceruloplasmin and proteolytically hinders its antioxidant activity / L. Filippis // II XXVI Congress of International Society of Thrombosis and Haemostasis (29 June-4 July 2013, Amsterdam). - 2013. - P. 475.
151. Torsten, S. A Mouse Mammary Gland Involution mRNA Signature Identifies Biological Pathways Potentially Associated with Breast Cancer Metastasis / S. Torsten // J Mammary Gland Biol Neoplasia (2009) 14:99–116.
152. Unger-Saldaña, K. Challenges to the early diagnosis and treatment of breast cancer in developing countries / K. Unger-Saldana // World J. Clin. Oncol. 2014, 5, 465-477.
153. Valko, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer / M. Valko // Chem Biol Interact. 2006;160(1):1-40.
154. Viola-Rhenals, M. Role of peroxidases, thiols and Bak/Bax in tumor cell susceptibility to CuDEDTC.2 / M. Viola-Rhenals // Biochem. Pharmacol, 74 (6): 841-850, 2007.
155. Winston, J. Immunohistochemical detection of HER-2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours / J. Winston // Vet. Comp. Oncol. 2005.
156. Withrow, S. J. Small animal clinical oncology / S. J. Withrow // – 4<sup>th</sup> edition – Saunders Elsevier, Canada, 2007. – 864p.



157. Wondrak, G. T. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities / G. T. Wondrak // *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(12):3013-69.
158. Wu, W. S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression / W. S. Wu // *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25:695–705. [PubMed: 17160708].
159. Yakunina, M. N. Systemic taxotere chemotherapy for metastatic tumor pleurisy in cats with spontaneous breast cancer / M. N. Yakunina // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2011. Mar. No. 150 (5).
160. Yang, W. Y. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary tumours / W. Y. Yang // *J. Comp. Pathol*. 2006.
161. Zaidan, M. L. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook / M. L. Zaidan // *Vet. J*. 2008.
162. Zangar, R. C. Reactive oxygen species alter autocrine and paracrine signaling / R. C. Zangar, N. Bollinger, T. J. Weber, R. M. Tan // *Free Radic Biol Med*. Dec 1.2011 51:2041–2047. [PubMed:21963990].
163. Zappulli, V. Surgical pathology of tumor of domestic animals / V. Zappulli // D. Tompson Foundation 2019.
164. Zhang, Y. Protein secretion in human mammary epithelial cells following HER1 receptor activation: influence of HER2 and HER3 expression / Y. Zhang // *BMC Cancer*. 2011.