

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Южный федеральный университет»
Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского**

На правах рукописи

Вакуленко Майя Юрьевна

ПРЕДИКТОРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КОШЕК

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата

биологических наук

Научные руководители:

Доктор биологических наук,
профессор Шкурат Т.П.

Доктор биологических наук,
профессор Ермаков А.М.

Оглавление

| | | |
|-------|--|----|
| | ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| 1 | ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 11 |
| 1.1 | Новообразования молочной железы | 11 |
| 1.2 | Классификация опухолей молочной железы | 15 |
| 1.2.1 | Гистологическая классификация новообразований молочной железы | 18 |
| 1.3 | Перспективы использования генетических предикторов рака молочной железы в ветеринарной онкологии | 34 |
| 1.4 | Молекулярные предикторы злокачественности рака молочной железы | 41 |
| 1.5 | Гены <i>АДА</i> , <i>GAPDH</i> и <i>B2M</i> | 44 |
| 1.6 | Референсные гены | 47 |
| 1.7 | Перспективы использования активности ферментов обмена аденозина в крови онкологических больных в качестве предикторов рака молочной железы | 50 |
| 1.8 | Перспективы использования спермина, спермидина и путресцина в качестве предикторов рака молочной железы | 51 |
| 2 | СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ | |
| 2.1 | МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ | 54 |
| 2.2 | РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ | 66 |
| 2.2.1 | Частота встречаемости новообразований молочной железы в популяции домашних кошек Ростовской области и их клиникоморфологические формы | 66 |
| 2.2.2 | Уровень экспрессии гена АДА | 93 |
| 2.2.3 | Определение активности аденозиндезаминазы | 95 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.2.4 | Содержание полиаминов в крови кошек с новообразованиями молочной железы | 97 |
| 2.2.5 | Сопоставление экспрессии гена <i>АДА</i> с основными клинико-морфологическими параметрами | 98 |
| | ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 110 |
| | ВЫВОДЫ | 113 |
| | ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ | 114 |
| | ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ | 114 |
| | БЛАГОДАРНОСТИ | 115 |
| | СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 116 |
| | СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 117 |

ВВЕДЕНИЕ

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

В гуманной медицине активно ведётся поиск новых предикторов рака молочной железы (РМЖ), в частности проводят исследования активности фермента аденозиндезаминазы (АДА) в крови женщин с аденокарциномой молочной железы (Барсукова М. А., 2017; Вакуленко М.Ю. и др., 2017). АДА является ферментом пуринового метаболизма. Активность АДА изменяется

во время клеточного деления и иммунного ответа. Активность аденозиндезаминазы у кошек, больных раком молочной железы, не изучена. Кроме этого, было замечено резкое повышение уровня полиаминов в биологических жидкостях при различных онкологических заболеваниях у человека (Сунграпова К.Ю., 2017). Полиамины (путресцин, спермидин и спермин) имеют важное значение для роста эукариотических клеток, так как эти молекулы участвуют во многих ключевых процессах, в том числе генной транскрипции, регуляции функции белка и стабильности клеточной мембраны (Igarashi K. et al., 2018). Высокий уровень полиаминов способствует пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток (Vachrach U., 2004). Данных об изучении обмена полиаминов у кошек, больных РМЖ, нет. Любой процесс перерождения ткани, а тем более малигнизация, связан с нарушением работы определённых генов. Гены, работа которых подвергается изменению при малигнизации ткани, называются онкогенами, но процесс канцерогенеза не всегда связан с мутациями в онкогенах. Важную роль в возникновении и развитии опухоли играет изменение активности генов без возникновения мутации. Существует множество работ, подтверждающих изменение экспрессии различных генов в раковых опухолях человека, но работ, проведённых на кошках, немного.

Опухоли молочной железы у домашних кошек являются одной из основных нозологических единиц в структуре онкологических заболеваний (Якунина М.Н., 2011; Трещалина Е.М. и др., 2015), но в ветеринарных клиниках отмечается отсутствие стандартизации осмотра, диагностики и лечения РМЖ у кошек, это сильно затрудняет реальную оценку проблемы РМЖ. На 2019 г. около 30% злокачественных новообразований, диагностированных цитологическим методом, осталось не выявленными (Вакуленко М.Ю. и др., 2019; Vakulenko M.Y. et al., 2019). Данных о встречаемости этого заболевания внутри популяции домашних кошек в Ростовской области нет.

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

Задачи исследования:

1. Выявить частоту встречаемости новообразований молочной железы в популяции домашних кошек Ростовской области и определить клиноморфологические формы новообразований.
2. Определить экспрессию гена *АДА* в тканях раковых опухолей молочной железы у кошек.
3. Оценить клиническую значимость и возможность использования в качестве предикторов рака молочной железы активность аденозиндезаминазы и уровень полиаминов в крови кошек.

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

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

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

Научная новизна. Впервые получены данные о встречаемости и распределении клиноморфологических форм рака молочной железы и проведена сравнительная оценка диагностической ценности гистологических и цитологических анализов среди кошек Ростовской области. Впервые были исследованы показатели активности фермента аденозиндезаминазы и содержание полиаминов в крови кошек с новообразованиями молочной железы. Впервые была доказана возможность применения анализа содержания в крови кошек таких полиаминов, как спермин, спермидин и путресцин в качестве предикторов, которые позволяют оценить тяжесть течения инвазивной неспецифической карциномы молочной железы. Впервые была показана активность аденозиндезаминазы в плазме крови и

была проанализирована экспрессия гена *АДА* в тканях опухоли молочной железы кошек. Также нами были впервые разработаны ДНК-праймеры на ген *АДА*, кодирующий фермент аденозиндезаминазу, и получены рекомендации оценки экспрессии данного гена в тканях опухолей молочной железы у кошек.

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

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Уровень экспрессии гена *АДА* в тканях злокачественных и доброкачественных опухолей выше, чем в тканях здоровой молочной железы. Результаты проведённого исследования подтверждают участие гена *АДА* в патогенезе опухолей молочной железы.
2. Уровень активности аденозиндезаминазы в крови животных с раком молочной железы не отличается от уровня активности аденозиндезаминазы в крови здоровых животных, следовательно активность аденозин дезаминазы не является предиктором рака молочной железы у кошек.
3. В крови кошек, больных раком молочной железы, достоверно увеличивается уровень полиаминов. Измерение уровня спермина, спермидина и путресцина может быть использовано в качестве предиктора рака молочной железы.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность исследования подтверждена результатами статистической обработки и объёмом выборки обследованных животных, результатами гистологических, биохимических и генетических исследований. Все исследования были выполнены на сертифицированном оборудовании, результаты обработаны современными статистическими методами.

Основные положения диссертационной работы докладывались на конференциях разного уровня: на Всероссийской конференции «50 лет ВОГиС. Успехи и перспективы» (Москва, 2016); на Внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Механизмы тератогенного воздействия окружающей среды» (Ростовна-Дону, 2016); на Внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Молекулярная биология, химия и медицина» (Ростов-на-Дону, 2017); на XV Межрегиональной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфологии» (Ростов-на-Дону, 2018); на 72-й Итоговой научной конференции студентов и аспирантов Ростовского государственного медицинского университета (Ростов-на-Дону, 2018); на II-й Внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Молекулярная биология, химия и медицина» (Ростов-на-Дону, 2018); на V межвузовской научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Молодёжь здоровью молодёжи» (Ростов-на-Дону, 2018), на Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы патологии» (Ростов-на-Дону, 2018); на XVI Межрегиональной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфологии» (Ростов-на-Дону, 2019); на Международной научно-практической конференции «Теория и практика клинической биохимии и лабораторной диагностики», посвящённой 100летию кафедры биохимии и физиологии СПбГАВМ (Санкт-Петербург, 2019); на 73-й Итоговой научной конференции студентов и аспирантов Ростовского государственного

медицинского университета (Ростов-на-Дону, 2019); на III-й Внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Молекулярная биология, химия и медицина» (Ростов-на-Дону, 2019); на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектива - 2019» (Нальчик, 2019); на VIII научно-практической конференции с международным участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 2019); на IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, 2019).

Личный вклад. Диссертационная работа является результатом многолетних исследований (2015–2019 гг.), выполненных лично автором. Автором диссертации были поставлены цели и задачи, согласно которым проводились исследования. Автором проводился отбор и хранение образцов, приготовление гистологических образцов опухолей, измерение активности ферментов и выделение полиаминов, выделение РНК из опухолей, ПЦР анализ. Представленные в диссертационной работе экспериментальные исследования, теоретический и практический анализ полученных результатов проведены автором самостоятельно. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 95%.

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

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

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Новообразования молочной железы

Несмотря на то, что новообразования (НО) или неоплазия молочных желёз давно известное и широко встречающееся заболевание, данных в мировой литературе о частоте встречаемости НО молочной железы среди кошек немного. По мнению некоторых зарубежных авторов (Граффидд-Джонс Т. Дж., 2002; Baptista C.S. et al., 2015), опухоли молочных желёз у кошек встречаются достаточно часто и составляют 52% от всех опухолей, особенно в пожилом возрасте. При этом, на 100 тыс. кошек приходится всего 25 случаев опухоли молочной железы (Волков С.В., 2009; Нейл Т., 2003). По другим данным рак молочной железы (далее – РМЖ) встречается у 0,5% кошек, что соответствует 500 животным с РМЖ на каждые 100 000 особей (MacVean D. et al., 1978). Научные исследования на эту тему в России не опубликованы, хотя некоторые отечественные специалисты отмечают, что НО молочной железы у кошек, встречаются значительно чаще других онкологических патологий. Поэтому онкологические заболевания молочной железы у кошек в России стоят на одном из первых мест среди прочих НО (Волков С.В., 2009). Считается, что после 7 лет у 10% кошек возникают НО молочной железы и чем животное старше, тем больше вероятность возникновения данной патологии (Якунина М.Н., 2011; Трещалина Е.М. и др., 2015). По мнению ведущих российских ветеринарных онкологов онкопатология молочной железы у кошек стоит на 2 месте по частоте встречаемости после лейкозов, в 86 % случаев НО оказывается злокачественным, при этом в 50 % случаев прогноз неблагоприятный. Средний возраст кошек, в котором чаще всего диагностируют НО молочной железы составляет $10,9 \pm 0,75$ лет, при этом среди животных, обратившихся в клинику по поводу РМЖ около 6,9 %, составляют самцы. В паховых молочных пакетах НО возникают чаще, чем в верхних парах молочных желёз. Считается, что гормональный статус не оказывает влияния на возникновения РМЖ, но является причиной развития

гиперплазии, которая в свою очередь может переродиться и стать РМЖ. Широко известно, что использование препаратов, содержащих прогестерон, или комбинацию прогестерона с эстрогеном в 3 - 4 раза увеличивает риск образования опухолей молочной железы. При этом, молодые животные более подвержены возникновению фиброэпителиальной гиперплазии молочной железы после принятия гормональных препаратов (Якунина М.Н., 2015). Неоднозначен вопрос о влиянии стерилизации кошек на вероятность развития РМЖ. По одним источникам стерилизация, проведённая до 6 месяцев, снижает риск РМЖ в 6 раз (Dorn C.R. et al., 1978). По другим источникам, при проведении стерилизации до 6 лет РМЖ встречается в 2 раза реже, чем у нестерилизованных животных. По третьим – риск развития РМЖ у стерилизованных кошек составляет 9% (Rutteman G., 1993). В любом случае, после проведения овариоэктомии пропадает необходимость в принятии гормональных препаратов во время течки животного, следовательно, вероятность возникновения НО падает. По данным, опубликованным в иностранных изданиях, РМЖ у самцов составляет 1% от животных больных РМЖ, при этом у самцов РМЖ отличается наиболее злокачественным течением и неблагоприятным прогнозом. Часто РМЖ у самцов ассоциирован с развитием сертолиома яичек и феминизацией. К группе риска РМЖ можно отнести самцов в возрастной группе от 7 до 10 лет с нарушением полового цикла, связанного с нарушением гормонального статуса (Якунина М.Н., 2011). Описание РМЖ кошек у итальянских исследователей во многом совпадает, РМЖ также стоит на втором месте по частоте встречаемости после рака кожи, 1% животных с РМЖ составляют самцы, доля злокачественных новообразований молочной железы у кошек составляет 85-90%. Причины возникновения РМЖ точно не установлены, но наличие гиперплазии, применение прогестагенов и заболевание канцерогенными вирусами, такими как FeLV (вирус лейкемии кошек), определённо являются факторами риска развития РМЖ. Не опубликовано каких - либо исследований, доказывающих влияние количества окотов на возникновение РМЖ, но у не рожавших кошек

РМЖ встречается чаще. Неоднозначны данные о влиянии стерилизации на развитие РМЖ. Считается, что если стерилизация была проведена до первой течки, то риск РМЖ снижается на 0,5%. Если стерилизация была проведена между первой и второй течкой, то риск снижается на 8%, а если между второй и четвертой течкой, то риск РМЖ снижается на 26%. При этом не существует данных, подтверждающих, что овариогистерэктомия, проведённая одновременно с мастэктомией, у кошек с первичным РМЖ снижает риск возникновения метастаз. Как и у женщин, ожирение увеличивает риск развития РМЖ (Romanelli G., 2007). Примерно в 40 % случаев при РМЖ у кошек регистрировали повышение экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста (*EGFR*) – *Her2/neu*. Прогрессирование РМЖ включает в себя распространение первичного очага по тканям молочной железы, прорастание подлежащих тканей и кожных покровов, а также – метастазирование. Существуют два пути метастазирования РМЖ: лимфогенный – по лимфатическим сосудам в регионарные лимфатические узлы и по мелким лимфатическим сосудам, с образованием кожных метастазов и гематогенный – по кровеносным сосудам во внутренние органы. В результате лимфогенного пути из 1, 2 и 3 пар молочных желёз метастазирование происходит в подмышечные, добавочные подмышечные и за груди́нный лимфатические узлы. Из 4 и 5 пар молочной железы – метастазирование происходит в паховые, реже в глубокие паховые и парааортальные и подвздошные лимфоузлы (Якунина М.Н., 2011) (рисунок 1).

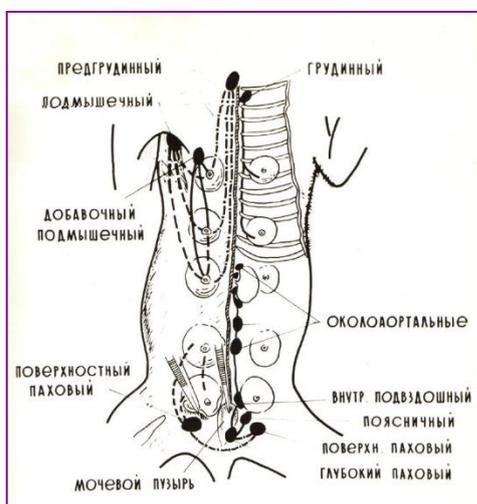


Рисунок 1 - Схема расположения лимфоузлов, подверженных метастазированию (Якунина М.Н., 2011)

Метастазирование гематогенным путём происходит в первую очередь в ткани лёгких, затем в печень, в селезёнку, в почки, в надпочечники, в сердце. Значительно реже опухоль может метастазировать в кости, но число таких наблюдений не превышает 2 %. Единичные наблюдения свидетельствуют о возможности обнаружения метастазов РМЖ в мозге. Гипертрофия молочных желёз — патология, связанная с гормональным дисбалансом. Часто наблюдается у животных, которым назначали прогестагены (Волков С.В., 2009). При этом отмечается массивная гипертрофия молочных желёз. Обычно в патологический процесс вовлекаются все молочные пакеты, может наблюдаться локальный отёк кожи с незначительным изъязвлением. У кошек, получающих прогестагены, возможно безоперационное лечение. Иногда после прекращения применения этих препаратов гипертрофия исчезает самостоятельно. В качестве предотвращения рецидивов данной патологии овариогистрэктомия способствует благоприятному исходу. Гипертрофия молочных желёз у кошек имеет сходство с неоплазией, при отсутствии своевременного лечения возможно перерождение ткани в раковую опухоль (Граффидд-Джонс Т.Дж., 2003) (рисунок 2).



Рисунок 2 – Фиброэпителиальная гиперплазия молочной железы кошки
(фото автора)

1.2 Классификация опухолей молочной железы

Существуют несколько классификаций опухолей молочной железы, используемые в ветеринарии. Золотым стандартом для диагностики того или иного вида новообразования считается классификация опухолей груди у женщин ВОЗ 2012 года (Кудайбергенова А., 2016; Marconato L., 2005), но в ветеринарной практике обычно используется более упрощённая классификация. Её основной целью является определение злокачественности опухоли, её происхождения и природы, т. к. это существенно влияет на выбор метода лечения. РМЖ обычно развивается из эпителиальных тканей, происходящих из долек или протоков железы (таблица 1 – 3).

Таблица 1 - Патанатомическая классификация рака молочной железы
(по: Суховольский О.К., 1994)

| Стадия | Гистологическая характеристика опухоли |
|--------|---|
| 1 | Местно локализованная неспецифическая карцинома |

| | |
|---|---|
| 2 | Инвазивная неспецифическая карцинома с прорастанием лимфатических и кровеносных сосудов. |
| 3 | Инвазивная неспецифическая карцинома с прорастанием кровеносных и лимфатических сосудов с метастазированием в региональные лимфоузлы. |
| 4 | Отдалённое метастазирование во внутренние органы. |

Таблица 2 - Клиническая классификация TNM рака молочной железы у кошек (по: Суховольский О.К., 1994)

| | |
|--|--|
| T – состояние первичного опухолевого очага | T 1 - опухоль до 1 см T 2 – опухоль от 1 – 2,5 см, T 3 – опухоль более 2,5 см T 4 – местно-распространённая, воспалительная карцинома |
| N – состояние регионарных лимфатических узлов | N 0 –отсутствие метастазов N 1 - поражение одного регионарного л/у N 2 - поражения основного и добавочного л/у |
| M - распространение опухоли на отдалённые органы. | M0 – отсутствие метастатического поражения M 1 – наличие метастаз |

Таблица 3 – Определение стадии РМЖ по классификации TNM (по: Суховольский О.К., 1994)

| Стадия РМЖ | Состояние первичного очага | Состояние регионарных лимфатических узлов | Поражение внутренних органов |
|------------|----------------------------|---|------------------------------|
| I | T1 | N0 | M0 |
| II | T0-1 | N1 | M0 |
| | T2 | N0 | M0 |
| | T2 | N1 | M0 |
| III | T3 | N0 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T любое | N2 | M0 |
| IV | T любое | N любое | M1 |
| | T4 | N любое | M любое |

Различают две основные клинические формы РМЖ у кошек – узловую и диффузную (таблица 4).

Таблица 4 – Клинические формы РМЖ (по: Якунина М.Н., 2011;
Marconato L. et al., 2015)

| УЗЛОВАЯ | ДИФФУЗНАЯ |
|----------------|---|
| Одиночная | Инфильтративно-отечная (воспалительная карцинома)  |
| Многоузловая | Панцерный рак (рожистая)  |
| | Маститоподобная (диффузно распространённая)  <p>метастазирование РМЖ в кожу</p> |

Узловая форма роста РМЖ преобладает и составляет 90 % случаев. Диффузная форма роста РМЖ встречается в 10 % случаев. В 59 % поражение

носит единичный характер, у 41 % больных животных поражения носят множественный характер. В 53 % случаев опухоли более 3 см в диаметре сопровождаются изъязвлением кожи. Клинические признаки злокачественного роста РМЖ: язвенно-некротический дефект, спаянность с кожей («лимонная корочка»), отсутствие чётких границ опухоли, перифокальное распространение, инфильтрация кожи и лимфатических путей, рецидивный рост (Якунина М.Н., 2011; Marconato L. et al., 2015).

Основными методами диагностики РМЖ у кошек являются следующие: сбор анамнеза, клинический осмотр, морфологическое исследование, рентгенологическое исследование органов грудной полости, УЗИ органов брюшной полости. Дополнительными методами диагностики РМЖ у кошек служат такие, как КТ, МРТ.

Окончательный диагноз РМЖ ставится при патогистологическом исследовании раковых тканей. Цитологическое исследование обычно используют для постановки первичного диагноза, либо при обследовании регионарных лимфатических узлов или метастатического поражения органов. Гистологическое исследование является основным методом для диагностики нозологического вида исследуемого новообразования и уточнения стадии патологического процесса (Якунина М.Н., 2011; Marconato L. et al., 2015).

1.2.1 Гистологическая классификация новообразований молочной железы кошек

Молочная железа по своей природе является видоизменённой потовой железой и представляет собой протоково-дольковые структуры, разделённые между собой рыхлой соединительной и жировой тканью. Ткань молочной железы представлена в основном двумя слоями клеток - эпителиальными и миоэпителиальными. Выводные протоки в области соска выстланы многослойным плоским эпителием. Молочные синусы открываются на

в

е

р

х

дольки с внутридольковой стромой и междольковые протоки. Согласно Международной гистологической классификации опухолей и опухолеподобных процессов молочной железы (ВОЗ, 2-е издание Кудайбергенова А., 2016) все опухоли подразделяются на: эпителиальные, мезенхимальные, фиброэпителиальные, опухоли соска, лимфомы и метастатические опухоли. В ветеринарной онкологии чаще используется более упрощённая классификация опухолей молочной железы (таблица 5) (Вакуленко М.Ю., 2018; Vakulenko M.Y., 2018).

Таблица 5 – Классификация опухолей молочной железы в ветеринарной онкологии (по: Волков С.В., 2009)

| Эпителиальные опухоли | |
|---|---|
| Доброкачественные | Внутрипротоковая папиллома |
| | Аденома соска |
| | Аденома |
| Прочие | Галактоцеле |
| Злокачественные | Неинвазивные (внутрипротоковая карцинома и дольковая карцинома <i>in situ</i>). |
| Прочие | Инвазивные (инвазивная протоковая карцинома; инвазивная протоковая карцинома с преобладанием внутрипротокового компонента; инвазивная дольковая карцинома; слизистая карцинома; медуллярная карцинома; папиллярная карцинома; тубулярная карцинома; аденоидная кистозная карцинома; секретирующая карцинома; апокриновая карцинома; карцинома с метаплазией). Болезнь Педжета или болезнь соска молочной железы (рак соска) |
| Смешанные соединительнотканые и эпителиальные опухоли | Фиброаденома |
| | Листовидная опухоль |
| | Карциносаркома |

| | |
|--|-------------------------|
| Пролиферативная и непролиферативная мастопатия | Аденома молочной железы |
| | Фиброаденома |

Для установления точного гистологического диагноза, кроме определения типа опухоли необходимо установить степень инвазии неопластической пролиферации в строму железы и в лимфатические и кровеносные сосуды (таблица 6) (Франк Г.А., 2012).

Таблица 6 – Гистологическая стадия опухоли (по: Якунина М.Н., 2011; Marconato L. et al., 2015)

| | |
|----------|---|
| 0 стадия | Не инвазивный рак или карцинома <i>in situ</i> |
| 1 стадия | 1а -частичная инвазия стромы 1 б – полная инвазия стромы |
| 2 стадия | Неопластическая эмболия в сосудах и метастазирование в региональные лимфоузлы |
| 3 стадия | Метастазы в другие лимфатические узлы или другие органы |

Папиллома протока: может определяться как образование круглой формы мягко-эластичной консистенции. Иногда наблюдаются выделения сукровицы при надавливании из соска. Новообразование может быть безболезненно при пальпации. Болезненность может появляться при присоединении инфекции и развитии воспалительного процесса, при надавливании выделяется мутный инфильтрат. Микроскопически папиллома протока, характеризуется мелкими внутрипротоковыми папилломатозными разрастаниями. Папилома относится к мастопатии и самостоятельной опухолью не являются. В стенке протока видны ветвящиеся сосочковые разрастания призматического или кубического эпителия со скудной стромой, солитарные цистоаденопапилломы обычно возникают в крупных выводных протоках вблизи соска (Волков С.В., 2009).

Аденома соска: аденома соска структурно схожа с экземой. При микроскопировании наблюдается пролиферация эпителия с ацидофильной протоплазмой в фиброзной строме в виде каналоподобных структур, наполненных клетками. Возникают мелкие узловатости 2-3 мм в диаметре в

ткани молочных железах. Возможно наблюдать признаки хронического воспаления и редкий митоз (Волков С.В., 2009).

Доброкачественные дисплазии: обычно выделяют два вида мастопатии непролиферативную и пролиферативную. Непролиферативная мастопатия представлена разрастаниями плотной, соединительной гиалинизированной ткани, с атрофичными дольками и кистозно-расширенные протоками. Наблюдается склероз протоков из-за замещения паренхимы железы фиброзной тканью. Протоки выстланы светлым апокринизированным, либо атрофичным эпителием, в некоторых местах эпителий образует мелкие сосочки. Чаще всего увеличивается вся железа, кожа над ней становится неподвижной, сосок краснеет и втягивается. Процесс монолатеральный. При надавливании из соска выделяется сливкообразная густая масса коричневого или серого цвета. Под микроскопом видны расширенные протоки, выстланные пиктоническим или вакуолизированным эпителием. Возможна инфильтрация жировой ткани из-за разрушения эпителиальной выстилки, когда содержимое протока инфильтрируется в прилежащую ткань, это вызывает возникновение очагов жирового некроза. В свою очередь очаги некроза вызывают скопление макрофагов и бывают окружены гигантскими, ксантомными клетками. Эти клетки могут образовывать подобие железистых структур, что симулирует картину инфильтративного рака (Ермилова В.Д., 2002; Волков С.В., 2009).

Аденома молочной железы, у кошек встречается редко, возникает в результате пролиферации железистых клеток, имеет выраженную капсулу.

Пролиферативная мастопатия бывает трёх видов: эпителиальная, миоэпителиальная и фиброэпителиальная. Митозы достаточно редки, наблюдается умеренный полиморфизм клеток и ядер. Эпителиальная пролиферация - аденит и мазоплазия отличаются значительным увеличением правильно сформированных железистых долек. Внутридольковые протоки и альвеолы выстланы кубическим эпителием с выраженной цитоплазмой, второй слой состоит из гиперхромных миоэпителиальных клеток, они могут быть либо темно окрашенные, либо светлые пузырьковидные. Эпителиальная

пролиферация отличается разрастанием протокового и долькового эпителия. Внутрипротоковые пролифераты представлены кривозными структурами или сплошными солидными полями. Просветы альвеол обычно сохранены (Ермилова В.Д., 2002; Волков С.В., 2009).

Фиброаденома при пролиферативной мастопатии - самый часто встречающийся тип новообразования. Фиброаденома обычно представлена в виде мелких очаговых узловатых образований, но может достигать значительных размеров. Если внутридольковая соединительная ткань разрастается концентрически вокруг протоков, сохраняющих небольшие размеры, то возникает периканикулярная фиброаденома. Интраканаликулярная фиброаденома характеризуется удлинением железистых трубок, выпячиванием в их просвет участков миксоматозной соединительной ткани, вследствие чего просвет протока становится щелевидным (Ермилова В.Д., 2002; Волков С.В., 2009).

Неинфильтрирующий дольковый рак *in situ* (другие названия - альвеолярный, ацинарный, дольковый рак *in situ*) может иметь разные формы и размеры и не имеет специфической макрокартины. Солидный дольковый рак возникает из эпителия концевых отделов и внутридольковых протоков. Просветы альвеол заполнены крупными мономорфными клетками со светлым гипохромным ядром. Реже встречается железистый дольковый рак *in situ*, при котором дольковая структура сохраняется. Концевые отделы выстланы резко полиморфным эпителием с гиперхромными ядрами, полярность клеток нарушена, они хаотично нагромождаются друг на друга, при этом

н

а

б

л

ю

д

а

е

т

о

0, может достигать 3-5 см, не имея признаков инвазии ни на одном из гистологических срезов и сохранять черты карциномы. При этом обладает способностью к инвазии и метастазированию, образован однотипными округлыми и слабо связанными между собой клетками с гиперхромными ядрами, формирующими солидные раковые альвеолы различных размеров (Суховольский О.К., 1994)) (рисунки 3, 4).

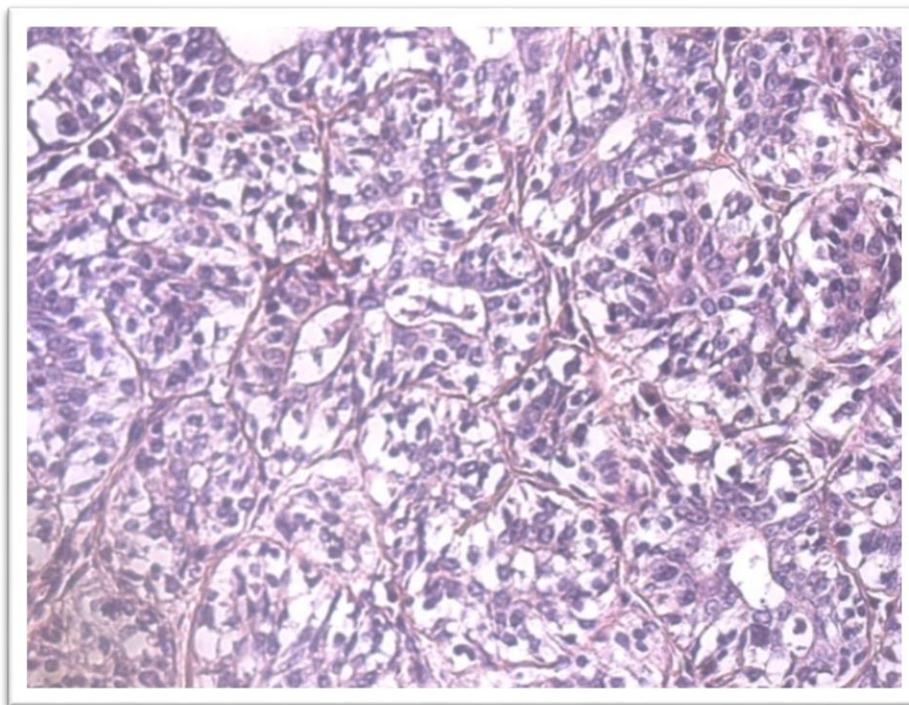


Рисунок 3 – Солидный монотипноклеточный лобулярный рак *in situ*, х 400 (по: Marconato L. et al., 2015)

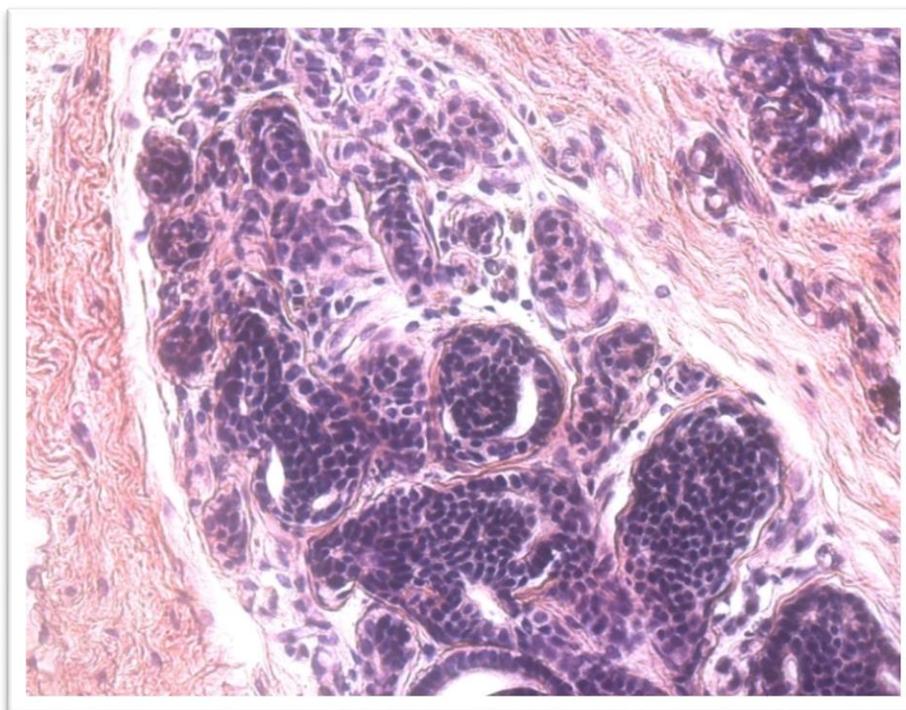


Рисунок 4 – Полиморфноклеточный вариант долькового рака *in situ*, x 400 (по: Marconato L. et al., 2015)

Неинфильтрирующий внутрипротоковый рак (*in situ*) не относится к предраковым состояниям, а является интраэпителиальной фазой истинного РМЖ. Характеризуются четырьмя основными типами роста: солидным, угревидным, папиллярным и криброзным (Якунина М.Н., 2015).

Солидный тип - состоит из мономорфных и полиморфных опухолевых клеток (рисунок 5). Криброзный рак – напоминает внутрипротоковый солидный рак, который состоит из довольно однотипных клеток эпителия и отличается от него наличием множества мелких нечётко отграниченных отверстий (рисунок 6).

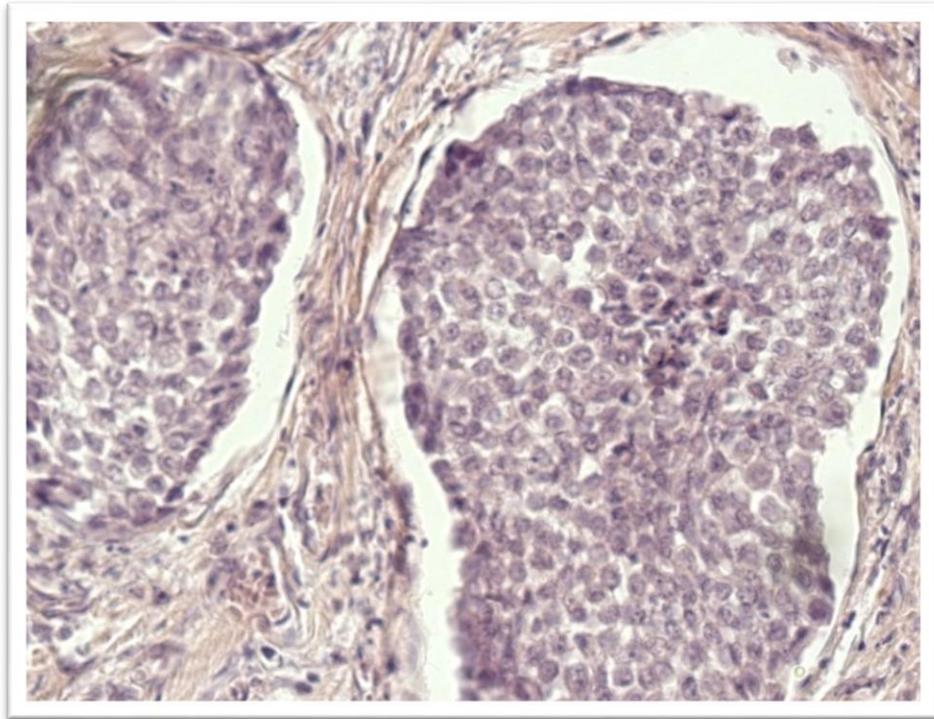


Рисунок 5 – Солидный тип, x 400 (по: Marconato L. et al., 2015)

Папиллярный рак – представлен внутрипротоковыми и внутрикистозными сосочковыми структурами, построенными из однотипных эпителиальных клеток, не имеющих соединительнотканной ножки (Суховольский О.К., 1994) (рисунок 7).

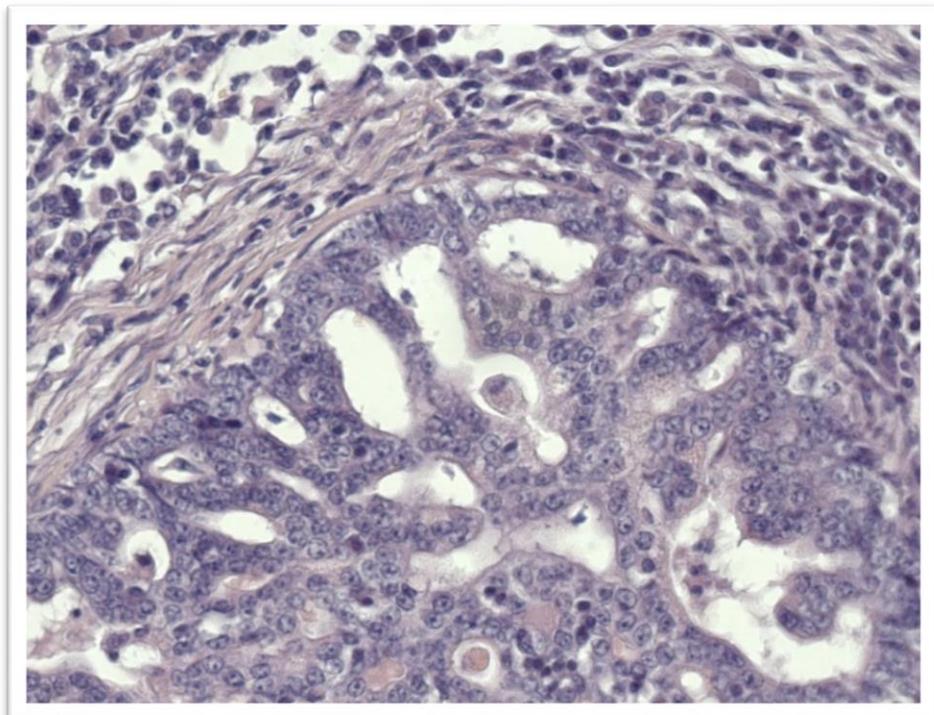


Рисунок 6 – Криброзный рак с лимфоидной инфильтрацией стромы, х400
(по: Marconato L. et al., 2015)

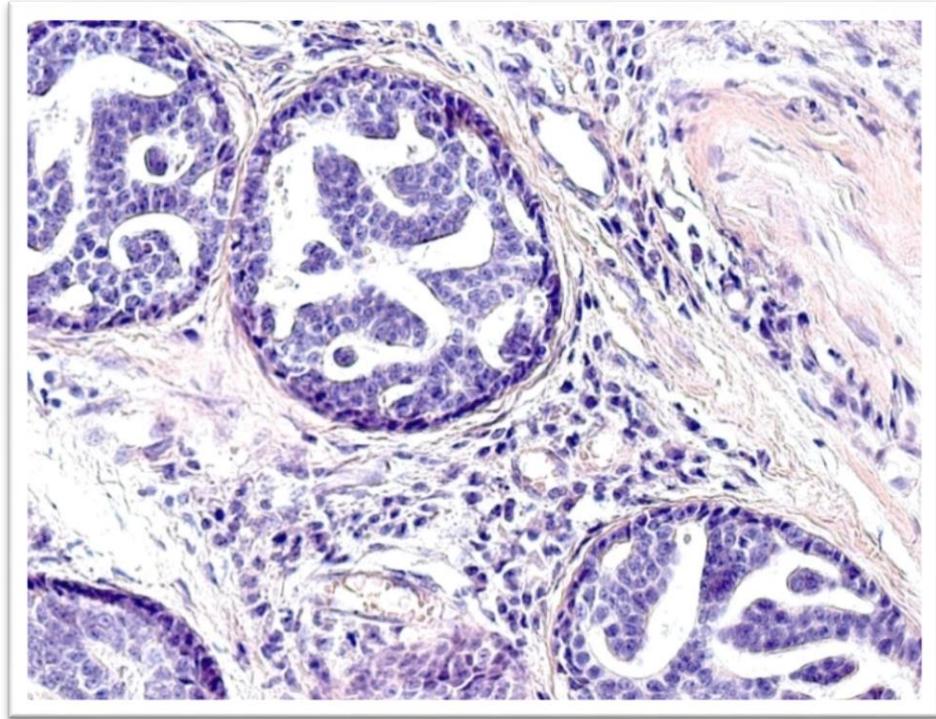


Рисунок 7 – Рак папиллярного строения (с ложными сосочками), х400 (по:
Marconato L. et al., 2015)

Инвазивный РМЖ – инфильтративный рак, который развивается на фоне различных форм доброкачественных поражений молочной железы и неинфильтративных типов долькового и протокового рака. У кошек самые распространённые типы инвазивного РМЖ или инвазивной карциномы неспецифического типа являются: солидная карцинома и тубулярная карцинома. Солидная карцинома молочной железы представлена

р
а
з
н
о
о
б
р

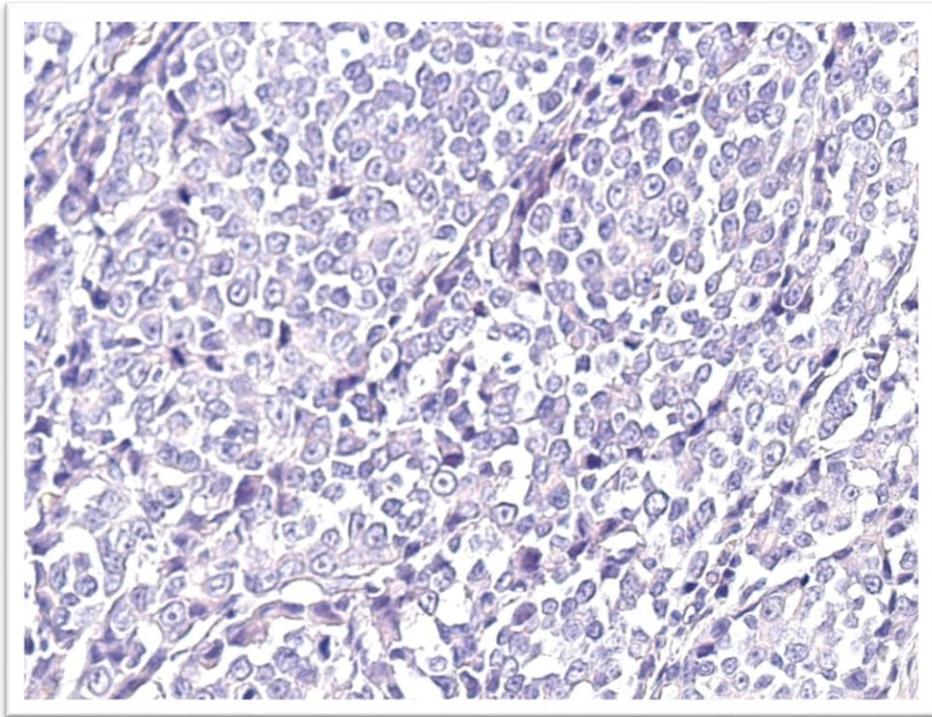


Рисунок 8 – Дольковый солидный рак молочной железы, х400
(по: Marconato L. et al., 2015)

Иногда трабекулярные структуры, разделены узкими прослойками соединительной ткани (рисунок 9).

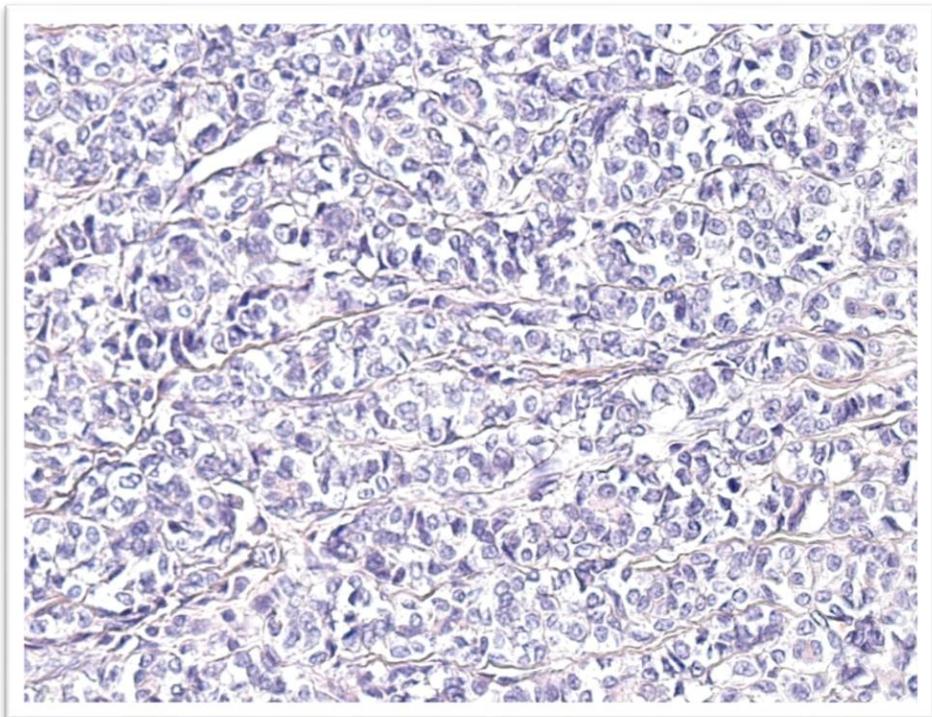


Рисунок 9 – Дольковый солидный рак молочной железы, х400

(по: Marconato L. et al., 2015)

Иногда солидные карциномы представлены сплошным клеточным пластом без сформировавшихся протоков и просветов с незначительным количеством стромы и частыми митозами (рисунок 10).

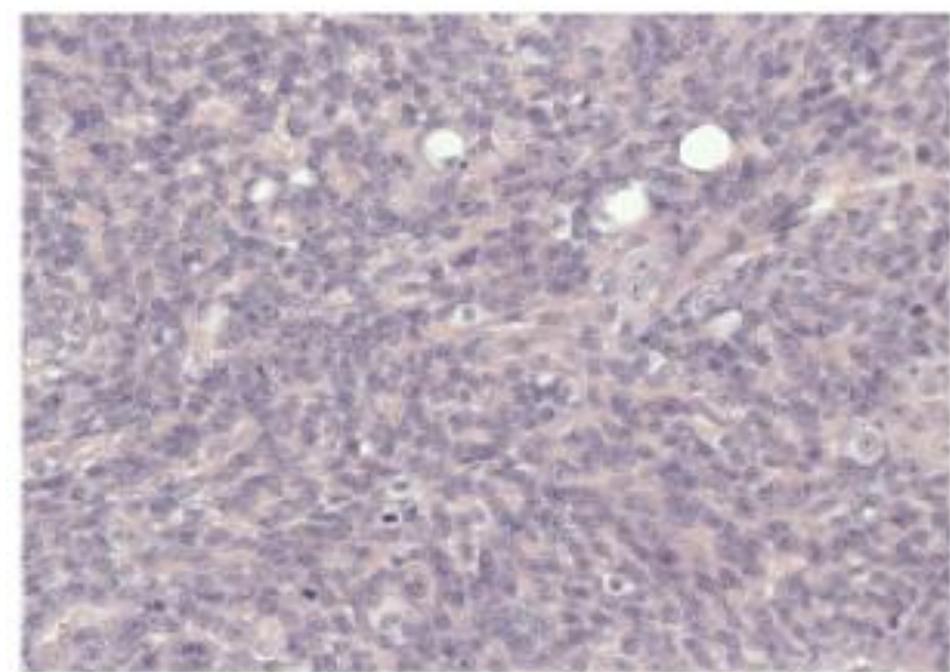


Рисунок 10 – Инфильтрирующий дольковый солидный рак молочной железы, x 400 (по: Marconato L. et al., 2015)

Солидный РМЖ «комплексного типа» состоит из сплошных клеточных полей опухолевых эпителиальных клеток и диффузно расположенных опухолевых клеток. Опухолевые клетки имеют различную величину и форму, полиморфные ядра, немногочисленные митозы и сочетаются с очагами разрастаний веретеновидных и звездчатых клеток на фоне миксоидного межклеточного вещества (Суховольский О.К., 1994) (рисунок 11).

Тубулярная аденокарцинома – состоит из трубочек различных размеров, неправильной формы с отчётливыми просветами, выстланными полиморфным однослойным, реже 2-слойным эпителием. В зависимости от разреза, некоторые трубочки получают разрезанными вдоль, другие

поперёк. Они расположены в фиброзной строме соединительной ткани (рисунок 12).

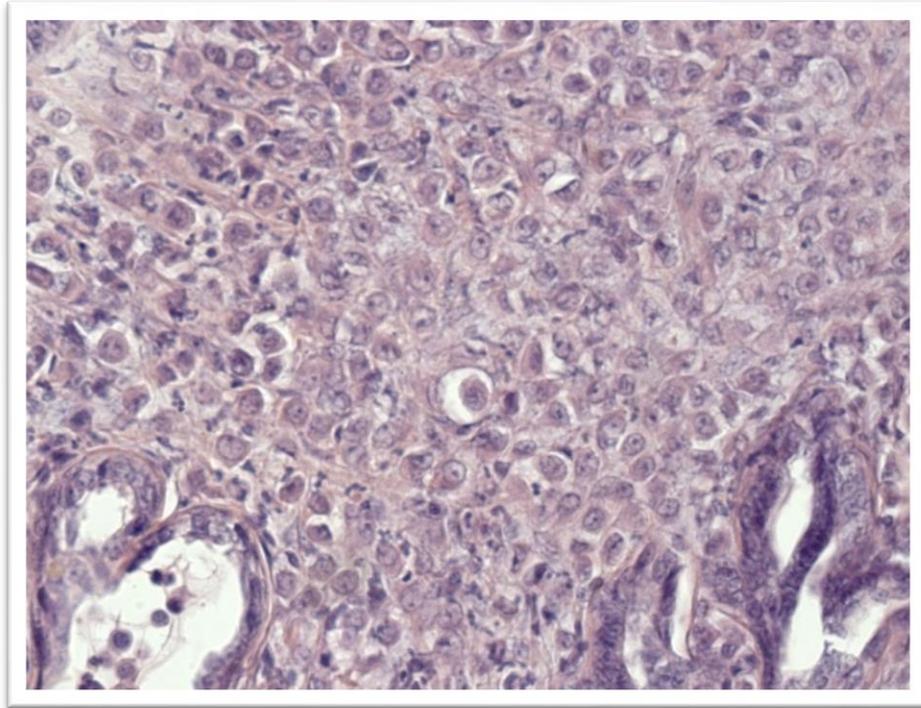


Рисунок 11 – Солидный рак молочной железы «комплексный тип, x400, эпителиальный компонент опухоли (по: Marconato L. et al., 2015)

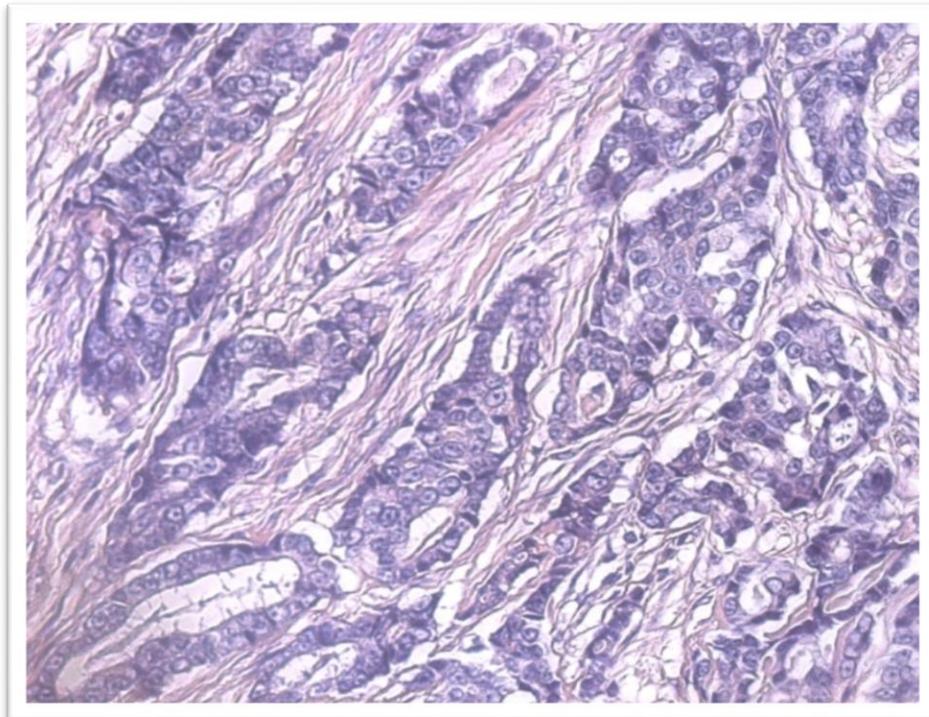


Рисунок 12 – Тубулярная аденокарцинома, x400 (по: Marconato L. et al., 2015)

Внутрипротоковый инфильтрирующий и неинфильтрирующий рак не имеют специфической макрокартины. На гистологических препаратах наблюдается множество кистозных каналов, от которых ветвятся настоящие и уже после образованные соски. Клетки эпителия среднего размера с небольшим содержанием хроматина в клеточных ядрах. Ядра имеют способность существовать в состояниях с различной внутренней структурой или в разных внешних формах во время своего жизненного цикла. Клеточное деление редкое. Ориентация в пространстве морфологических процессов и структур клеток чаще всего выходит за рамки нормы. Ветвление сосков противоестественное, в некоторых местах клетки создают пласты, состоящие из нескольких ядер. Структурные образования, определяющие и поддерживающие форму клеток сосков, при опухоли становятся тонкими либо полностью исчезают. Очагов склерозирующего аденоза, который характерен для заболевания молочных желез, никогда не отмечается (Ермилова В.Д., 2002).

Медуллярный рак представляет собой большого размера опухолевое образование, инвазивный рост которого очень слабый. Вокруг ракового новообразования присутствует лимфоцитарный вал. При рассмотрении ракового образования под микроскопом, можно отметить, что опухоль представляет собой неразрывные участки крупных клеток с большим количеством светлой цитоплазмы, в центре которой расположено ядро. Имеет высокий митотический индекс. В строме наблюдается диффузная инфильтрация лимфоидными и плазматическими клетками (Ермилова В.Д., 2002).

Папиллярная карцинома – более поздняя стадия развития не инфильтрирующего сосочкового рака, характеризуется инфильтрацией стромы.

Решетчатый рак представляет собой опухолевое образование, морфологические структуры которого очень схожи с решетом. Зачастую проявляется в угревидной опухоли на сосках. Под микроскопом очень схож с

трубчатой опухолью слюнных желез, а также с раком легких (Волков С.В., 2009). Папиллярная аденокарцинома может быть построена только из плоской многослойной эпителиальной ткани без соединительнотканной связки, отличается непрямым делением клеток и находится внутри кистозного очага. Также папиллярная аденокарцинома может состоять из разветвленных сосков, которые покрыты однослойной цилиндрической формы эпителиальной тканью на соединительнотканной связке. В данном случае, атипия клеток запускает процесс инфильтрации стромы самого начала ракового образования на соске (рисунки 13, 14).

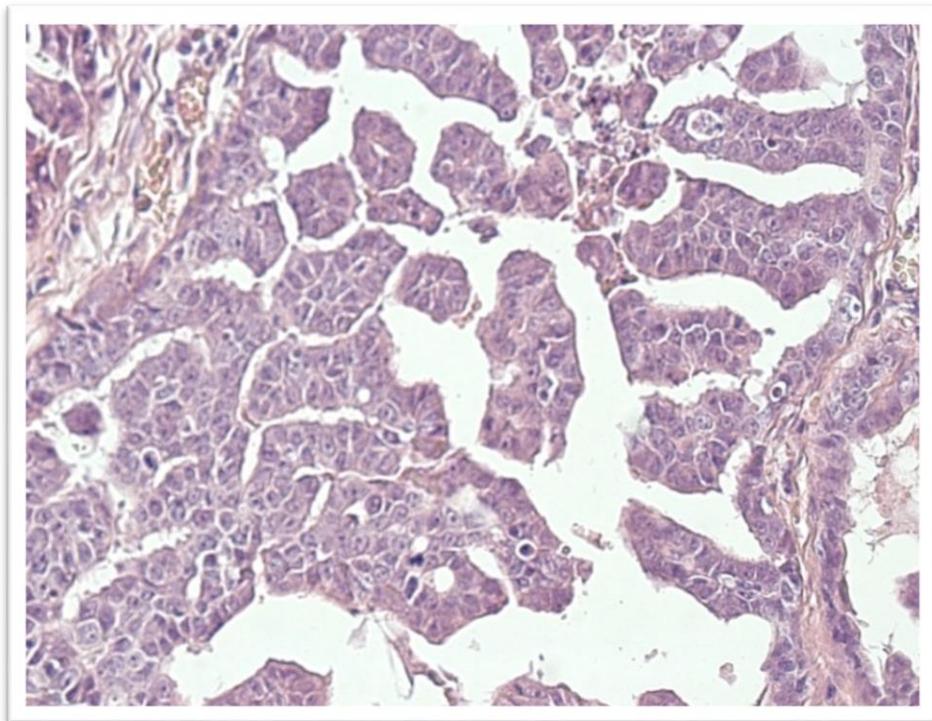


Рисунок 13 - Папиллярный рак молочной железы простого типа, x 400
(по: Marconato L. et al., 2015)

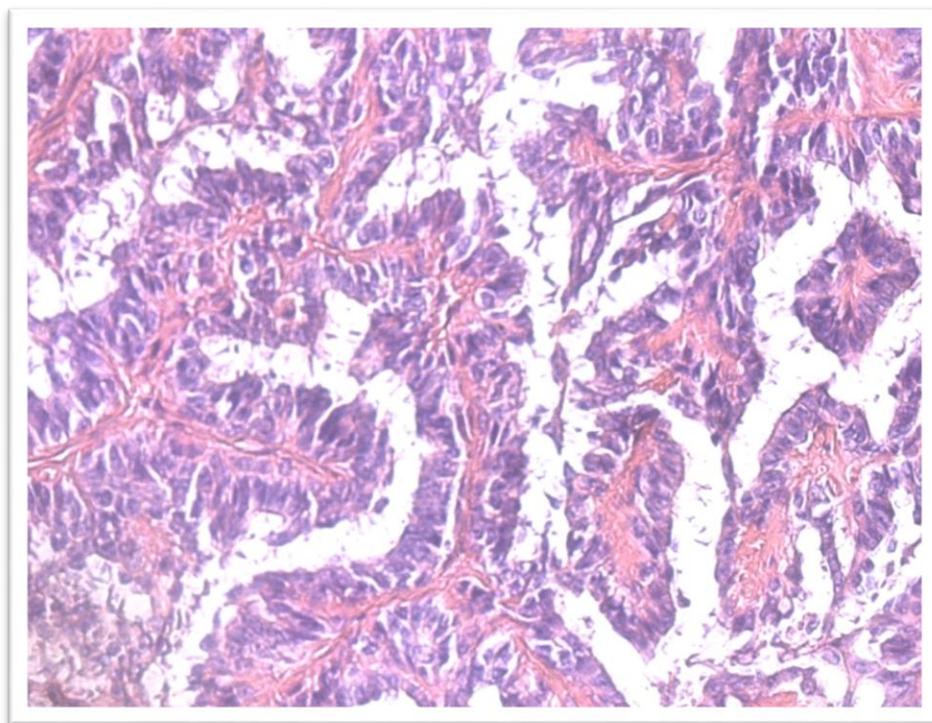


Рисунок 14 – Папиллярный рак молочной железы простого типа, х 400
(по: Marconato L. et al., 2015)

Анапластическая карцинома является самой низкодифференцированной формой инвазивного РМЖ. Опухоль характеризуется диффузным разрастанием резко атипичных клеток с эозинофильной цитоплазмой. Клетки расположены разрозненно или группами, расположенными в соединительной ткани, формирующей коллагеновую строму (рисунок 15).

Слизистый рак другие названия коллоидный или желатиновый рак - макроскопически представляет собой чётко ограниченный от окружающих тканей узел серого цвета с влажной желатиновидной поверхностью на разрезе. Микроскопически среди массивных скоплений слизи визуализируются солидные или железистые скопления мноморфных клеток, в цитоплазме которых находится слизь (Волков С.В., 2009).

Мезенхимальные опухоли: остеосаркома молочной железы и фибросаркома (рисунок 16).

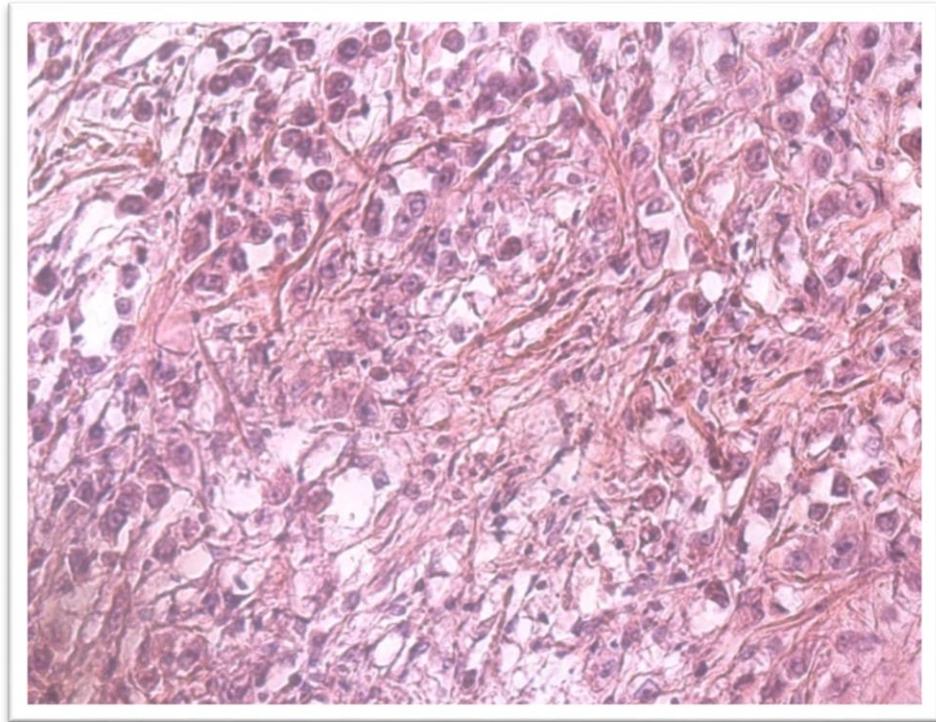


Рисунок 15 – Анапластическая карцинома молочной железы, х400 (по: Marconato L. et al., 2015)

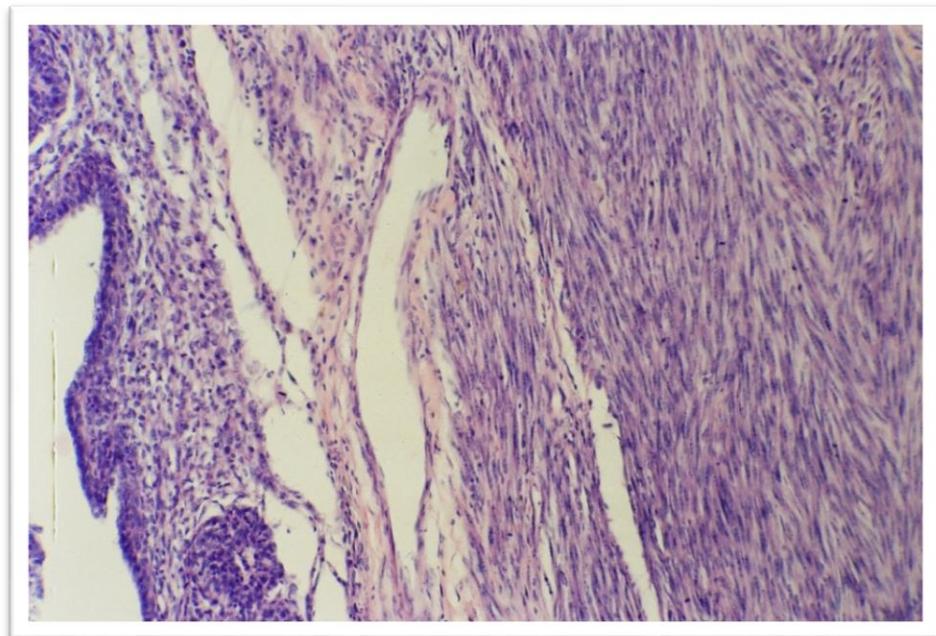


Рисунок 16 - Фибросаркома молочной железы, х160

(по: Marconato L. et al., 2015)

состоит из бесформенных глыбок атипичной формы, напоминающих костные балочки и разрастания полиморфных опухолевых клеток типа остеобластов, фибробластов и остеокластов. Фибросаркома встречается редко и может развиваться на фоне фиброаденом и из соединительнотканых прослоек молочной железы и существенно не отличается от фибросарком мягких тканей. Микроскопически представлена фибробластоподобными клетками и коллагеновыми волокнами.

Подавляющее большинство (73%) РМЖ у кошек составляют аденокарциномы или инвазивные неспецифические карциномы простого типа (Якунина М.Н., 2011).

1.3 Перспективы использования генетических предикторов рака молочной железы в ветеринарной онкологии

В современной медицине для диагностики и мониторинга лечения онкологических заболеваний широко используются различные онкомаркеры. В ветеринарной практике использование онкомаркеров пока находится на стадии разработки. Несмотря на недостаточное внимание, которое уделяется данной проблеме, изучение онкомаркеров у домашних животных, является крайне перспективным (Matos A.J., 2015). Домашние животные живут вместе с человеком и, следовательно, подвергаются схожим факторам риска при развитии рака (Синкина Т.В., 2009). Возникновение и развитие раковых опухолей у мелких домашних животных во многом схоже с канцерогенезом у человека. Например, наблюдаются схожая гистопатология и различные прогностические аспекты, такие как: местоположение, размер, метастазирование в лимфатические узлы, а также схож и ответ организма на противораковую терапию (Santos S., et al., 2012; Matos A.J., 2015, Вакуленко М.Ю., 2018). Поэтому изучение онкомаркеров у мелких домашних животных важно не только для улучшения понимания природы рака. Оно может дать возможность использовать рак домашних животных в качестве модели для

изучения рака человека. Можно предположить, что тестирование новых лекарств от рака на домашних животных может значительно снизить сроки доклинических исследований и внедрения новых лекарственных препаратов в производство и понизить стоимость их разработки (Baptista C.S. et al., 2015; Вакуленко М.Ю., 2019). Как и у женщин, РМЖ у мелких домашних животных занимает одно из первых мест по частоте возникновения среди других видов рака, до 90% случаев речь идёт о злокачественных новообразованиях и, следовательно, ведёт к летальному исходу (Santos S. et al., 2013, Вакуленко М.Ю., 2018, 2019). В последние годы увеличилось число исследований, которые проливают свет на молекулярные основы канцерогенеза молочной железы у собак и кошек, в частности, изучается роль специфических онкомаркеров, таких как: супрессоры опухоли, регуляторы апоптоза, факторы репарации ДНК, пролиферативный индекс и факторы, влияющие на циркуляцию раковых клеток (Klopfleisch R., 2011). Онкомаркеры представляют собой соединения, синтезируемые в аномальных опухолевых клетках и практически не встречающиеся в тканях здоровых взрослых животных. Их концентрация в сыворотке крови, определяемая иммуноферментными или иммунофлюоресцентными методами, коррелирует с наличием опухоли, степенью ее распространения и регрессией в результате лечения. Можно выделить следующие генетические онкомаркеры, описанные при изучении РМЖ мелких домашних животных, протоонкогены и онкогены (*CDK*, *SATB1*, *ERBB2*, *EGFR1*, *IGF1*, *IGF2*, рецептор эстрогена), супрессоры опухоли (*BRCA1*, *BRCA2*, *p53*) и факторы роста опухоли (*PCNA*, *Ki67*) (Пальцева М.А. и др., 2009).

Факторы роста опухоли *PCNA*, *Ki67* – это группа веществ полипептидной природы с молекулярной массой от 5 до 50 кДа, которые регулируют рост опухоли. Механизм действия данных факторов можно сравнить с работой гормонов. Подобно гормонам, эти факторы обладают широким спектром биологического действия на многие клетки – стимулируют или ингибируют пролиферацию, хемотаксис и дифференцировку. В отличие

от гормонов, факторы роста, как правило, продуцируются неспециализированными клетками, находящимися во всех тканях, и обладают эндокринным, паракринным и аутокринным действием. Большинство полипептидных факторов роста действует по паракринному или аутокринному типу. Однако отдельные факторы, такие как инсулиноподобный фактор роста (IGF), способны оказывать эндокринное действие. На сегодняшний день механизм неконтролируемого деления клеток в опухолях молочной железы у собак и кошек пока недостаточно изучен, но можно с уверенностью утверждать, что увеличение клеточного роста является неотъемлемым признаком злокачественных клеток. Для определения пролиферативной активности в некоторых исследованиях раковых клеток были использованы: PCNA, Ki67 (Klopfleisch R. et al., 2011; Klopfleisch R. et al., 2017). PCNA находится в ядре и является кофактором δ ДНК - полимеразы, соответственно увеличивает ДНК репликацию. Кроме того, PCNA играет роль в ДНК зависимой репарации и ингибировании апоптоза путём регуляции стабильности тирозинкиназы. Увеличение концентрации PCNA наблюдается в G1 и S фазах клеточного цикла, но из-за того, что этот период длится от 8 до 20 часов, PCNA может находиться в клетках, которые недавно завершили M фазу. Вследствие того, что PCNA участвует в ДНК репарации, PCNA может определяться и в неделящихся клетках. Ki67 является гетеродимерным протеином с пиком экспрессии, приходящимся на M- фазу клеточного цикла, обычно определяется с помощью MIB1 антител. Продолжительность жизни менее часа редко позволяет определение Ki67 в неделящихся клетках, а также в злокачественных клетках с аномальной экспрессией в течение G0 и в клетках с увеличенным временем прохождения фазы G1 или G2 (Klopfleisch R. et al., 2017). PCNA и Ki67 могут быть использованы как маркёры, показывающие соотношение поражённых раком клеток к общему количеству здоровых и больных клеток. Благодаря различным проявлениям изучаемых белков, оба маркера могут быть использованы как в комбинации, так и отдельно друг от друга. Важно отметить, что PCNA и Ki67 имеют обратную

корреляцию с экспрессией α рецепторов эстрогена. Ещё одной важной особенностью использования этих онкомаркеров является связь между ростом PCNA и послеоперационной выживаемостью. Как уровень PCNA, так и уровень Ki67 были различными между доброкачественной дисплазией и злокачественной опухолью. В серии, состоящей из 60 интраэпителиальных поражений молочной железы, увеличение Ki67 наблюдалось вместе с прогрессированием стадии рака и на последних стадиях карциномы. Высокие значения Ki67 были связаны с некоторыми клиническими и гистологическими изменениями, такими как размер лимфоузлов и вовлечение их в метастазирование. (Klopfeisch R. et al., 2010).

На сегодняшний день механизмы канцерогенеза активно изучаются во всем мире, но что именно запускает процесс возникновения РМЖ у домашних животных до сих пор недостаточно ясно. С уверенностью можно сказать, что неопластическая ткань молочной железы характеризуется увеличением клеточной пролиферации, поэтому раковые клетки молочной железы должны проявлять повышение уровня экспрессии протоонкогенов и понижение уровня экспрессии супрессоров опухоли. Протоонкогены – это обычные гены, кодирующие белки, которые регулируют клеточный рост и дифференцировку, например, циклин-зависимые киназы (CDK), а также белки, косвенно участвующие в регуляции клеточного цикла, например, белки рецепторы на поверхности мембраны. Для диагностики РМЖ у кошек могут быть использованы циклин А и циклин Д, уровень экспрессии которых повышается в злокачественных раковых клетках молочной железы. *SATB1* – глобальный организатор хроматина и фактор транскрипции, один из ключевых факторов возникновения и развития рака груди у женщин. Повышенная экспрессия *SATB1* в медицине человека связана с неблагоприятным прогнозом течения болезни. У собак экспрессия *SATB1* проявляет прямо противоположное поведение. У кошек экспрессия данного гена не изучена. При анализе образцов аденом и метастазированных опухолей молочной железы у собак было выявлено понижение экспрессии *SATB1*. Поведение экспрессии *SATB1*

является одним из немногих примеров различий между РМЖ у собак и раком груди у женщин (Вакуленко М.Ю., 2019; Klopfleisch R. et al., 2010; 2017). Протоонкоген *HER-2 (ERBB2)* кодирует трансмембранную рецепторную протеинкиназу, которая является рецептором эпидермального фактора роста. В 25 % РМЖ у женщин наблюдается повышенная экспрессия *ERBB2* и это связано с неблагоприятным прогнозом течения болезни (Ferretti G. et al., 2007). В ряде исследований была предпринята попытка выявить схожую зависимость у собак. Но результаты были противоречивы и не оправдали ожидания (Gama A. et al., 2008; Hsu W.L. et al., 2009). У кошек в 55 % образцов опухолей молочной железы подтвердилась оверэкспрессия *ERBB2* и были выявлены 5 полиморфизмов данного гена, 2 из которых, возможно связаны с возникновением и развитием РМЖ. Повышение экспрессии *ERBB2* у кошек достоверно связано с неблагоприятным прогнозом течения болезни (Klopfleisch R. et al., 2011; Klopfleisch R. et al., 2017). Эпидермальный фактор роста *EGFR1* широко применяется в человеческой медицине, прежде всего для оценки эффективности лечения онкологических патологий. Но у собак и у кошек, больных РМЖ связь экспрессии эпидермального фактора *EGFR1* с какими-либо клинико-патологическими параметрами пока не выявлена (Hsu W. et al., 2009). Очень большое значение в развитии рака груди у женщин играет IGF1 и IGF2. Инсулиноподобный фактор роста – белок по структуре и функциям, похожий на инсулин. В его функции входит эндокринная, аутокринная и паракринная регуляция процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма. Схожее поведение IGF1 и IGF2 показали и в РМЖ у собак и у кошек, возможно, это связано с тем, что прогестины стимулируют выработку гормона роста, а гормон роста, наряду со стимуляцией роста эпителия молочной железы, стимулирует выработку IGF1. Образцы злокачественных опухолей молочной железы у собак и у кошек содержали повышенный уровень IGF1 по сравнению с образцами доброкачественных опухолей (Klopfleisch R. et al., 2017, Gama A. et al., 2009). Активность рецептора эстрогена ещё один мощный фактор, влияющий на

пролиферацию эпителиальных клеток молочной железы. Возможно, излишняя стимуляция эстрогеном этих рецепторов или нарушения структуры белков, входящих в состав рецептора, влияют на рост и клинические проявления РМЖ у собак и у кошек. Общеизвестное предположение о том, что стероидные рецепторы влияют на возникновение РМЖ у собак основано на том, что у стерилизованных и молодых сук РМЖ встречается крайне редко. Однако, некоторые исследования показали, что с увеличением степени злокачественности рака уменьшается экспрессия рецепторов эстрогена, по сравнению со здоровой тканью. Поэтому развитие раковой опухоли может сопровождаться возрастанием резистентности к пролиферативной стимуляции (Chang C. et al., 2009; De Las Mulas J.M. et al., 2005; Millanta F. et al., 2005). В связи с этим, поведение стероидных рецепторов при появлении и развитии РМЖ у собак не может быть использовано как независимый фактор диагностики и мониторинга онкологии молочной железы (Вакуленко М.Ю., 2019). Гормональная зависимость карциномы определяется по наличию в клетках рецепторов эстрогенов. У кошек рак молочной железы считается гормоннезависимым (Якунина М.Н., 2011).

Супрессоры опухоли - *BRCA1* и *BRCA2*. Геномная нестабильность является основным условием возникновения раковых клеток. В процессе жизнедеятельности самые различные факторы могут привести к повреждению генома и накоплению повреждённой ДНК, поэтому в организме животных существуют определённые механизмы защиты. Например, гены *BRCA1* и *BRCA2* кодируют ферменты, необходимые для репарационных процессов в клетке и регуляции клеточного апоптоза, при накоплении большого количества повреждений ДНК. Поэтому, уровень экспрессии генов *BRCA1* и *BRCA2* является важным фактором для предотвращения канцерогенеза, и клетки с высокой экспрессией *BRCA1* и *BRCA2* проявляют более высокую устойчивость к агентам, которые вызывают разрушение ДНК. *BRCA1* был первым геном, для которого было показано явное участие в этиологии

семейных форм РМЖ у женщин. Снижение экспрессии гена *BRCA1* и *BRCA2* в образцах опухолей молочной железы является одним из возможных механизмов, объясняющим развитие опухоли молочной железы у собак и кошек, но в отличие от человеческой медицины взаимосвязь между полиморфизмом *BRCA1* и *BRCA2* генов и развитием РМЖ у собак и кошек пока недостаточно изучена (Вакуленко М.Ю., 2019; Klopfleisch R. et al., 2017). Хотя, уже установлены отдельные нуклеотидные полиморфизмы в последовательности *BRCA1* и *BRCA2* генов в раковых клетках по сравнению со здоровой тканью молочной железы, но клинического подтверждения взаимосвязи между наличием этих мутаций и возникновением РМЖ пока нет. По имеющимся на сегодняшний день данным в мировой литературе, можно сказать, что у собак было отмечено достоверное снижение экспрессии *BRCA1* и *BRCA2* во всех образцах опухолей молочной железы по сравнению со здоровой тканью (Klopfleisch R. et al., 2017). У кошек, так же доказано участие генов *BRCA1* и *BRCA2* в процессе канцерогенеза РМЖ. У 30% животных с РМЖ наблюдается мутация, связанная со снижением экспрессии данного гена (Govoni V.M. et al., 2021). В будущем, измерение экспрессии *BRCA1* и *BRCA2* генов у домашних животных может стать важным информативным параметром при диагностике ранних стадий РМЖ, а также, стать удобным параметром для оценки успешности проведения терапии и формирования прогноза продолжительности жизни больного животного (Yoshikawa et al., 2015). Ещё один белок, участвующий в идентификации и репарации повреждённой ДНК, называется супрессор опухоли p53. Супрессор опухоли p53 является транскрипционным фактором регуляции клеточного цикла. Ген *P53* выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, соответственно ген *P53* является антионкогеном. *P53* активируется после идентификации повреждения ДНК и индуцирует остановку клеточного цикла и репликацию ДНК. Если повреждения ДНК слишком серьёзные, запускается процесс апоптоза, в обратном случае запускается процесс репарации. За репарацию ДНК отвечают такие гены, как *CADD45*, *RAD17*, *RAD21*, *RPD21*,

RPA, SMCI1A и TOPBP1. В случае необходимости репарации ДНК, экспрессия этих генов возрастает. Активация систем репарации была проанализирована с помощью ДНК праймеров в образцах тканей метастазированных карцином, не метастазированных карцином и в образцах здоровой ткани молочной железы, полученных от нескольких собак и кошек. Результаты исследования не показали значимых различий в экспрессии генов, связанных с репарацией ДНК. Но так как процессы репарации запускаются после обнаружения геномной нестабильности, причины которой не известны, это может быть и гипоксия, и репликационный стресс, вызванный нарушениями клеточного деления, или просто длительное накопление множественных мутаций, экспрессия *P53* может рассматриваться только как подходящий параметр оценки степени повреждения ДНК. В ближайшем будущем должны быть идентифицированы мутации в последовательности генома раковых клеток молочной железы собак и кошек в генах, отвечающих за репарацию ДНК, так как схожие мутации, ведущие к развитию рака груди, уже обнаружены у женщин (Klopfleisch R. et al., 2017).

Подводя итог, на основании опубликованных данных по РМЖ собак и кошек можно сказать, что несмотря на то, что ветеринарная онкология только начинает развиваться и очень сильно отстаёт от гуманной онкологии, уже можно обозначить перспективы использования генетических предикторов РМЖ для диагностики, мониторинга и лечения опухолей молочной железы у мелких домашних животных (Вакуленко М.Ю., 2016; Вакуленко М.Ю., 2017).

1.4 Молекулярные предикторы злокачественности рака молочной железы

В онкологии человека для классификации пациентов, больных РМЖ и для прогноза исхода заболевания в течение многих лет использовали такие параметры, как возраст пациентов, состояние лимфатических узлов, размер

опухоли, гистологические особенности, статус гормонального рецептора. Комбинация этих факторов используется для определения пациентов в различные категории риска. Это полезно для прогноза реакции на терапию РМЖ, однако, их роль в определении прогноза и оценке риска у отдельного пациента ограничена. Следовательно, для оценки прогноза исхода и определения наиболее подходящего лечения для пациентов на индивидуальной основе необходимы более эффективные методы. В последнее время для уточнения классификации РМЖ и оценки прогноза течения заболевания и ответа на терапию используются различные молекулярные методы, например, определение экспрессии генов. Новые молекулярные методы обладают большим потенциалом в сравнении с традиционными клиническими и патологическими факторами и их роль уточняется (Brenton J.D., 2005). Для классификации пациентов с РМЖ обычно используют разнообразные клинические и патологические факторы. К ним относятся возраст пациента, состояние подмышечных лимфатических узлов, размер опухоли, гистологические особенности (особенно гистологическая степень рака и лимфо-сосудистая инвазия) (Goldhirsch A., 2007; Ingle J., 2009; Sarli G., 2002).

Метод молекул также применяется в целях более точного изучения теории и классификации раковых образований. К примеру, сочетание микроскопического исследования тканей и измерения активности тысячи генов сразу позволило сделать вывод том, что у ракового образования существует множество разных форм. Так, была установлена инвазивная микропапиллярная опухоль. Помимо этого, было определено, что некоторые опухоли являются схожими по совокупности транскриптов при абсолютно различном морфологическом строение. Например, рак карциномы. Транскриптом трубчатых и лобулярных карциномов схож при их различной морфологии. Помимо этого, классификация по видам экспрессии дольковый рак молочной железы (идентичные протоковым карциномам) включает разные категории опухолей (люминальный и базальный тип), тогда как большинство

других видов рака относятся только к одной молекулярной категории, например, тубулярный рак, слизистые, микропапиллярные, медуллярные и кистозные карциномы (Mohammed et al., 2015).

В ветеринарной онкологии определение молекулярного подтипа опухоли пока не применяется. В онкологии человека, на сегодняшний день, тесты для определения молекулярного подтипа опухоли являются коммерчески доступными, но в большинстве учреждений дополнительные исследования биомаркеров, таких как *CK5 / 6*, *EGFR* и *Ki67*, не проводятся. Обычно для определения подтипа молекулярного РМЖ, помимо рутинного гистологического анализа, используют определение статуса *ER*, *PR* и *HER2*. Но поскольку схемы лечения, предназначенные для определенных молекулярных подтипов, разработаны и утверждены, в скором времени ожидается внедрение определения данных биомаркеров в рутинную практику. Недавние исследования показали, что базальноподобный РМЖ особенно чувствителен к химиотерапии на основе платины и ингибиторов полимеразы. Оценка отдельных прогностических факторов позволила выявить клинически различные подгруппы пациентов с РМЖ, но существует необходимость в разработке комплексного профиля биологических и молекулярных характеристик опухоли, которые могут помочь в составлении прогноза течения заболевания и прогноза реакции на различные терапевтические методы у отдельных пациентов (Mohammed A. et al., 2015).

Молекулярные методы диагностического исследования в изучении доброкачественных и злокачественных опухолей используются в целях определения источника развития патологии, постановки диагноза, а также в целях ведения контроля правильности лечения путем постоянного исследования ДНК, РНК и белков. Метод ДНК-проверки с задействованием PCR-реакции является самым популярным диагностическим методом исследования раковых заболеваний. PCR-анализ необходим для определения ранней стадии развития заболевания, выявления наличия предрасположенности к раку, определения дальнейшего лечения,

прогнозирования эффективности назначенного лечения и контроля за процессом последующей реабилитации (Смолякова Р.М., 2011).

1.5 Гены *ADA*, *GAPDH* и *B2M*

Ген *ADA* кодирует аденозиндезаминазу, которая представляет собой один из главных элементов пуринового обмена, в процессе которого происходит синтез и распад пуринов и пуриновых нуклеотидов. Замедление активности данного элемента будет отражаться соответственно и на процессе синтеза природных высокомолекулярных органических соединений и процессе размножения клеток. Наследственный иммунодефицит часто связан с нарушением работы *ADA* в лимфоцитах (Abbed К.М. et al., 2018). Показано, что при некоторых видах рака активность *ADA* снижается. При лейкозах активность *ADA* повышается. Ген *ADA* активно учувствует в каждой клетке, однако, в зависимости от типа ткани, активность экспрессии гена различна и может достигать разницы уровня экспрессии гена в более чем тысячу раз. Фермент может присутствовать в тканях животных в четырех изоформах. Три изо-компонента имеют разный молекулярный вес и расположены в гиалплазме. Четвертый изо-компонент соединен со структурными элементами клетки. Существуют аллели *ADA 1* и *ADA 2* и редкие аллели *ADA 3* и *ADA 4*, кДНК аденозиндезаминазы животных секвенирована и определена ее последовательность (Миронова К.А., 2015). Аденозиндезаминаза состоит из 362 аминокислотных остатков. Ген аденозиндезаминазы кошки имеет протяжённость около 32 килобаз, состоит из 12 экзонов и 11 интронов. Размер экзонов варьирует от 62 до 325 пар оснований, а размер интронов - от 76 до 15166 нуклеотидов. Промоторная область гена не содержит характерные для эукариотических промоторов ТАТА- и СААТ- последовательностей. Однако в этой области локализуются пять GC-обогащённых мотивов (GGGCGGG) и инвертированные повторы из 10 и 16 пар оснований, выполняющие функции связывания факторов транскрипции. В гене идентифицировано 23 копии *Alu*

повторов и одна копия "О"-семейства повторов, локализованных в первых трех интронах и 5'-фланкирующей области. Первый интрон фермента имеет порядок р53-респонсивного элемента, соответственно имеет место упорядочение транскрипции гена ADA белком р53 (Миронова К.А., 2017; Abbed et al., 2018).

Ген GAPDH кодирует синтез глицеральдегид3-фосфатдегидрогеназы, который можно назвать одним из ключевых ферментов гликолиза, вследствие чего фосфоглицериновый альдегид преобразуется в 1,3 дифосфоглицериновую кислоту. В человеческом организме GAPDH также называют геном «домашнего хозяйства», эти гены нужны для поддержания самых важных функций в организме, вследствие чего они экспрессируются во все клетки и ткани на постоянной основе, расположение GAPDH находится в коротком плече 12й хромосомы. Как и многие другие ферменты, GAPDH, имеет несколько функций. Кроме участия в катализе 6-й реакции гликолиза, GAPDH, участвует в активации транскрипции и инициации апоптоза, и других клеточных процессах (Смолякова Р.М., 2011; Zheng L. et al., 2003; Hara M.R. et al., 2005). Кроме этого, GAPDH участвует в переключении метаболизма клетки во время окислительного стресса, участвует в транспорте от пузырьков эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи и т.д. (Смолякова Р.М., 2011; Tisdale A.J., 2008). Клинико-экспериментальные исследования выявили, что ферментативная активность и повышенная экспрессия GAPDH связаны с клеточной канцерогенезом и пролиферацией. Повышенная экспрессия гена GAPDH была выявлена: при раке предстательной железы, лёгких, меланоме, почек, молочной железы, мочевого пузыря, прямой кишки, желудка, печени, поджелудочной железы и раке глиоме. Во время испытаний на животных инъекции GAPDH антагонистов индуцировали апоптоз и блоки опухолевой прогрессии (Colell A. et al., 2007). Исследования GAPDH выявили, во время активности пролиферации клеток РМЖ и высокой агрессивности опухоли пролиферация GAPDH становится сильнее (Huang C. et al., 2008). Объединение и установление объема GAPDH

можно осуществлять путем real time PCR в образцах непосредственной опухолевой ткани или подверженных очищению опухолевых клетках (Смолякова Р.М., 2011).

Ген В2М – кодирует белок β 2-микроглобулин — компонент лёгкой цепи главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС I), представленный на всех ядродержащих клетках организма человека (кроме эритроцитов). Низкомолекулярный белок (11 800 Да) β 2-микроглобулин расположен рядом с α 3-цепью на поверхности клетки. В отличие от α 3 не имеет трансмембранного участка. Выше β 2-участка от поверхности клетки располагается цепь α 1. Также функция β 2-микроглобулина взаимодействует с белком HFE, вместе с которым выполняется регулирование экспрессии гепцидина в печени, гепцидин является ключевым модулятором системного гомеостаза железа. У взрослых особей млекопитающих скорость продукции β 2-микроглобулина поддерживается на одном уровне. β 2-микроглобулин элиминируется почками, где он подвержен фильтрации и практически полной реабсорбции, и диссимиляции в проксимальных канальцах почек. В моче в норме определяется в следовых объемах. Уровень β 2-микроглобулина в крови показывает главным образом пролиферацию лимфоцитов и клеточный оборот, в которых он находится в большом количестве. При увеличении активности иммунной системы возрастает и синтез уровня β 2-микроглобулина, например: воспалительные процессы любых типов, лимфомы, реакция отторжения трансплантата, опухоли крови, аутоиммунные заболевания, множественная миелома, вирусные инфекции. Если в организме наблюдается повышенный уровень β 2-микроглобулина в крови и имеется злокачественное заболевание, это может быть связано с активностью процесса, которые вызваны большой опухолевой массой и свидетельствует о плохом прогнозе. Благодаря вышесказанному β 2-микроглобулин сыворотки используют как прогностический опухолевый маркер в онкогематологии. Если у пациентов имеется хронический гемодиализ β 2-микроглобулин, то последний может агрегировать в амилоидные волокна, что приводит к отложению их в суставах,

и дальнейшему амилоидозу. Ген B2M экспрессируются практически во всех клетках и тканях на практически постоянном уровне, а также задействован в поддержании самых важных жизненных функций организма, по этой причине его относят к так называемым генам «домашнего хозяйства».

1.6 Референсные гены

Проект расшифровки генома млекопитающих произвёл революцию в современных исследованиях. Благодаря этому стало возможным проводить широкомасштабные сравнительные исследования молекулярных основ различных заболеваний. Для моделирования различных заболеваний человека, чаще всего используются лабораторные мыши, крысы, кролики и собаки. Проект расшифровки генома домашней кошки открыл пути для молекулярных исследований на этих животных (*Felis catus*). Многие заболевания, такие как поликистозная болезнь почек, мукополисахаридоз типа VI, первичный билиарный цирроз, гемофилия, гипертрофическая кардиомиопатия, наследственная мозжечковая кортикальная атрофия, спинальная мышечная атрофия, нейрональный цероид-липофусциноз, болезнь Нимана-пика типа C, и дистрофия сетчатки встречаются у кошек практически так же часто, как и у людей и имеют схожий патогенез. Это подчёркивает важность описания заболеваний кошек в молекулярном аспекте (Zacchetti A. et al., 2003; Penning L.C., 2007).

Самым используемым методом в молекулярных исследованиях является количественная полимеразная цепная реакция. Поскольку Q-PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) является чрезвычайно деликатным и чувствительным методом, необходимо брать во внимание многочисленные переменные при анализе экспрессии генов. Это такие переменные как: целостность РНК после изоляции, концентрация входного сигнала кДНК, ферментативная эффективность, разница транскрипционной активности между различными клетками и тканями. В биомолекулярных исследованиях

человека оценка референсных генов проводится с помощью методики Q-PCR. Насколько нам известно, по оценке референсных генов животных-компаньонов были опубликованы исследования, сфокусированные на сердце, почке, печени, молочной железе и простате. Для изучения референсных генов у кошек использовались образцы, полученные из зубов, сердца (левый желудочек), почек, печени, лёгких и молочной железы. Были изучены референсные гены различных функциональных классов, таких как рибосомальные гены и гены, участвующие в анаболических и катаболических процессах. Была изучена экспрессия генов в пределах одной специфической ткани (зубы, сердце, почки, печень, лёгкие и молочная железа), полученные от случайно выбранных животных, как здоровых, так и с различными заболеваниями. Для анализа экспрессии генов применялись следующие референсные гены (*B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HMBS*, *HPRT*, *RPL17*, *RPL30*, *RPS7*, *RPS19* и *YWHAZ*), так как они имеют различную функциональность. Рибосомальные гены *rpl17*, *RPL30*, *RPS7* и не-рибосомальные *HPRT* и *YWHAZ* имеют довольно стабильные уровни экспрессии во всех тканях. Даже в ткани сердца, где *RPL17* был оценён как наименее стабильный, численные расчёты показали его надёжную устойчивость. В отличие от этого, *B2M*, *RPS19* и *GAPDH* являются относительно неустойчивыми, но наиболее изученными у кошек. При исследовании экспрессии генов в тканях почки, лёгкого и молочной железы двух генов может быть достаточно, тогда как в сердце и печени семь эталонных генов являются оптимальным количеством. Хотя в большинстве публикаций используют только пять генов. В целом, использование двух-пяти эталонных генов, обеспечивает достаточную надёжность механизмов внутреннего контроля. Поскольку количество эталонных генов варьируется в зависимости от исследуемой ткани, целесообразно проводить дополнительные исследования обследуемой ткани, перед тем как приступить к основному эксперименту. Первоначальную проверку стоит проводить с использованием *RPL17*, *RPS7*, или *YWHAZ*, покрывая рибосомные и не-рибосомные продукты гена, так как они являются

наиболее стабильными. Эти эталонные гены чаще всего выбирают для внутреннего контроля при определении уровня экспрессии мРНК. В исследованиях на кошках Q-PCR *GAPDH* является наиболее часто используемым ссылочным геном экспрессии. Иногда используют бета-актин. В исследовании РМЖ у кошек был использован *GUSB* с целью выявления соотношения экспрессии этого гена и активности киназы, которую он кодирует. Также изучена экспрессия *HPRT* кодирующего IL-4, IL-12 и гамма-интерферон при заболевании токсоплазмозом. Опубликованные протоколы Q-PCR рекомендуют использовать более одного эталонного гена (Penning L.C., 2007; Zheng, L. 2003). Оптимальное количество эталонных генов сильно различается между сердцем, почкой, печенью, лёгким, молочной железой и зубами, но возможно, что достаточно одного или двух референсных генов для применения на практике. Существуют и видовые различия в работе референсных генов, например *RPS19*, у собак и кошек проявляется по-разному. Возможно, это связано с тем, что инбридинг у собак имел место чаще, чем у кошек. Исследования по валидации feline референсных генов руководствовались референсными генами, описанными у собак. Аналогичные эталонные гены и ткани были включены для облегчения межвидового сравнения. Сходства результатов экспериментов, описанные в ходе исследования других одомашненных млекопитающих, были гораздо менее выражены, чем между собакой и кошкой, поэтому общий межвидовой обзор затруднён. Однако появилась некоторая конвергенция. Во-первых, сравнение с тремя другими одомашненными видами: крупный рогатый скот, свиньи и овцы, показал превосходство *HPRT*. Поведение *GAPDH* в качестве референсного гена, схоже у кошек и собак, и в исследованиях генов бета-актина крупного рогатого скота *GAPDH*, *RPLP0* и *18SrRNA* *GAPDH* оказался более стабильным референсным геном, чем *RPLP0* и *18SrRNA*. Наиболее подходящими референсными генами для кошачьих являются *RPL17*, *RPL30*, *RPS7*, *YWHAZ* и *HPRT*. Поскольку три из этих пяти относятся к одной и той же функциональной группе (рибосомальных генов), допустимо использование

одного или двух из них. Включение более одного эталонного гена целесообразно при исследовании определённых органов, например сердца. В будущем исследования экспрессии позволят проводить более точное сравнение молекулярных данных из разных лабораторий (Penning L.C., 2007).

1.7 Перспективы использования активности ферментов обмена аденозина в крови онкологических больных в качестве предикторов рака молочной железы

Защита организма животного от возникновения онкологических заболеваний обусловлена, способностью эффекторных клеток иммунной системы распознавать и устранять опухолевые клетки. Аденозин препятствует распознаванию клеток опухоли. Концентрация аденозина увеличивается в солидных опухолях, из-за гипоксии (Милашенко, В. А., 2001; Muller-Haegle S. et al., 2014). Аденозин относится к факторам супрессарам иммунной системы и продуцируется самой опухолью. Эффекты аденозина проявляются благодаря его взаимодействию с поверхностноклеточными аденозиновыми рецепторами (ARs) и последующей активацией внутриклеточных путей (Миронова К. А., 2001; Hendrik J., 2000; Stanley T. et al., 2013; Arabella Y., 2014; Kim M.D. et al., 2019). Рецепторы ARs имеют различное сродство к аденозину, поэтому, клеточный ответ на аденозин зависит от его концентрации. Активация A2A и A3 рецепторов высокими концентрациями аденозина приводит к ангиогенезу и к ингибированию Т-киллерных (Миронова К.А., 2001; Kocbuch K., 2009; Melanie M. et al., 2013; Muller-Haegle S. et al., 2014). Существуют данные, подтверждающие роль АДА в модуляции процесса репликативного старения Т-лимфоцитов (Stanley T. et al., 2013). Аденозин дезаминаза АДА расщепляет аденозин до инозина в результате аденозинкиназной реакции. АТФ превращается в АМФ, который по принципу отрицательной обратной связи ингибирует аденозиндезаминазу. В зарубежной литературе описаны методики лечения больных раком, путём применения антагонистов A3R и A2AR и активации АДА в лимфоцитах. Особо

подчеркивается потенциал терапевтических средств, направленных на развитие аденозинергического пути (Arabella Y. et al., 2014;). Иммуносупрессирующее состояние при онкопатологии может быть объяснено нарушением гомеостаза аденозина. Снижение активности аденозиндезаминазы в лимфоцитах у онкобольных коррелирует с увеличением содержания недееспособных клеток иммунной системы, что обусловлено накоплением внеклеточного аденозина и способствует иммуносупрессорному эффекту (Миронова К.А., 2001; Барсукова М.А., 2017).

1.8 Перспективы использования спермина, спермидина и путресцина в качестве предикторов рака молочной железы

Полиаминами называют соединения, содержащие несколько аминогрупп. Они имеют малую молекулярную массу, и являются полифункциональными соединениями. К полиаминам относятся: спермидин, спермин и диамины - путресцин и кадаверин. У большинства млекопитающих и, в частности, у представителей кошачьих, в норме полиамины присутствуют в крови в крайне низких концентрациях. Функцию транспорта полиаминов на себя берут эритроциты, соответственно в цельной крови уровень их содержания будет зависеть от уровня их концентрации в форменных элементах. Содержание спермина в сыворотке и плазме крови ниже, чем спермидина и путресцина. Количество спермидина в цельной крови преобладает (Березов Т.Т. и др., 2012; Igarashi K., 2018). Изучение обмена полиаминов в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, а также клинико-биохимические обследования больных людей с РМЖ показало, что процесс развития опухоли, часто сопровождается накоплением полиаминов в организме. Поэтому их концентрацию, в эритроцитах и в крови в целом принято считать показателем некроза тканей. Клиническое значение данный показатель имеет в основном при наблюдении за динамикой лечения людей, больных онкологическими заболеваниями. Опухолевые ткани обычно имеют высокий уровень некрозов

и, следовательно, в связи с этим повышается синтез полиаминов. Уровень повышения концентрации полиаминов в эритроцитах у онкологических больных имеет прямую взаимосвязь со стадией заболевания. В свою очередь это даёт право считать количественный показатель содержания полиаминов в эритроцитах – онкомаркерами, и использовать изменение этого показателя для оценки эффективности проводимой терапии (Cervelli M. et al., 2014; Casero R.J. et al., 2018). Резкое повышение уровня полиаминов в биологических жидкостях организма наблюдается при росте различных новообразований (Miller-Fleming L. et al., 2015). Обмен полиаминов активно проявляется при пролиферации и клеточной дифференцировке тканей, поэтому ведётся активная разработка противоопухолевых препаратов направленного действия на обмен полиаминов (Nowotarski S.L. et al., 2013). Измерение уровня полиаминов в биологических жидкостях можно использовать для оценки эффективности проводимого лечения. Так, клинический мониторинг уровня полиаминов для оценки эффективности лечения и составления прогноза, уже проводится при таких заболеваниях как, карцинома простаты, острый миелоидный лейкоз, трансплантация костного мозга, фокальная церебральная ишемия и тд. Свободные молекулы полиаминов не имеют поглощения в видимой или УФ-области спектра, поэтому не могут измеряться на спектрофотометре (Miller-Fleming L. et al., 2015). Основным аналитическим методом для определения полиаминов является высокоэффективная жидкостная хроматография с пред- или постколоночной деривацией (Gugliucci C., 2004; Ducros V. et al., 2009). Также возможно использовать метод газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (Gosetti F. et al., 2013). Известны методы определения полиаминов с помощью капиллярного электрофореза (Hernández-Cassou S. et al., 2011). Можно также упомянуть иммуно-ферментативные техники определения полиаминов, ограничивающим фактором для них является кросс-реактивность различных полиаминов к антителам (Gugliucci C., 2004).

Полиамины – это небольшие поликатионные алкиламины, встречающиеся в природе и необходимые для нормального роста и развития клеток эукариот. Внутриклеточная концентрация полиаминов находится под постоянным контролем и поддерживается на определённом уровне. В переродившихся клетках РМЖ происходит дисрегуляция метаболизма полиаминов. Полиамины облегчают взаимодействие транскрипционных факторов, таких как рецепторы эстрогенов с их специфическим элементом ответа, и участвуют в пролиферации ER-отрицательных и высокоинвазивных опухолевых клеток рака груди. Поскольку метаболизм полиаминов играет важную роль в гибели и пролиферации клеток, он представляет собой потенциальную цель для вмешательства при лечении рака. Полиаминовый путь является важной целью для развития химиотерапии РМЖ с помощью ингибиторов ферментов. Кроме того, возможно использование саморегулирующегося характера метаболизма полиаминов с использованием аналогов полиаминов для воздействия на гомеостаз и регуляцию данного обмена при перерождении ткани. В настоящее время в области противораковой терапии молочной железы противоопухолевые соединения, нацеленные на путь полиаминов, представляют большой интерес и оказывают большое социальное влияние на химиотерапию РМЖ (Cervelli M. et al., 2014; Wachrach U., 2004).

РМЖ является распространённым заболеванием не только среди женщин, но и у домашних кошек. Одной из основных терапевтических проблем при лечении РМЖ является то, что опухоли, изначально реагирующие на химиотерапевтические препараты, могут прогрессировать до более агрессивных форм, плохо реагирующих на терапию. По изменению уровня полиаминов можно ориентироваться в прогрессии опухоли и вовремя менять химиотерапевтические препараты.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Животные подбирались для исследования среди пациентов, поступивших в ветеринарные клиники по поводу спонтанно возникших опухолей в области молочных пакетов. Всем кошкам с опухолевыми поражениями молочной железы назначали оперативное лечение. При этом учитывали возраст пациента, степень операционного риска, размеры новообразования и отсутствие метастазов (по данным ультразвукового и рентгенологического исследования грудной и брюшной полости тела). В первую очередь лечение заключалось в уни- и билатеральной резекции молочных пакетов поражённых опухолью и региональных лимфатических узлов. В исследуемую группу были включены животные с 1 и 2 стадией рака классификация по TNM (Якунина М.Н., 2014). Все животные имели отрицательные результаты на вирусную лейкемию кошек (FeLV) и вирусный иммунодефицит кошек (FIV). Операцию проводили с соблюдением принципов абластики и антиабластики.

Для установления частоты встречаемости новообразований молочной железы у кошек в Ростовской области, были проанализированы 73247 историй болезни кошек, предоставленные ветеринарными клиниками г. Ростова-на-Дону и области (таблица 7).

Таблица 7 – Число проанализированных историй болезней кошек в ветеринарных клиниках г. Ростов-на-Дону и Ростовской области

| Название клиники | Адрес | Число проанализированных историй болезней |
|--------------------------|--|---|
| Ветклиника «ЦЕНТР» | г. Ростов-на-Дону, Фурмановская 10б | 14760 |
| Ветклиника ООО Феникс | г. Батайск, ул. Кирова 2а | 17885 |
| сеть клиник «Вита» | г. Ростов-на-Дону, г. Таганрог | 32207 |
| Ветклиника «Пчелка» | г. Ростов-на-Дону | 3245 |
| Ветклиника «ЗООСИТИ» | г. Ростов-на-Дону | 2163 |
| Веткабинет | г. Ростов-на-Дону, Пушкинская 104 | 2987 |
| ИТОГО | | 73247 |

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Clopper-Pearson (Расчет точного доверительного интервала в MS Excel).

Анализ клиноморфологических форм новообразований молочной железы кошек Ростовской области

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

(парафиновых блоков и стекол) по стандартной методике (Семченко В. В. и др., 2006).

Для этого ткань опухоли извлекали из формалина, вырезали репрезентативный участок, размером, подходящим для помещения в гистологические кассеты, препарат промывали в проточной воде из-под крана. Далее осуществляли проводку на аппарате Tero scientific в автоматическом режиме. 5 повторов раствора дегидратанта продолжительностью - 1 час, промежуточная смесь I - 2 часа, промежуточная смесь II – 2 часа, минеральное масло 2 часа, парафин универсальный I 62° - 3 часа, парафин универсальный II 62° - 3 часа. После автоматической проводки оставляли препараты на 1-2 часа в парафине в термостате при температуре 60°C. После этого проводили заливку препаратов в блоки с использованием тугоплавкого парафина и осуществляли приготовление гистологических срезов с использованием микротомы («Орион медик» полуавтоматический). Перед перенесением среза на предметное стекло, стекла обрабатывали адгезивной жидкостью для обработки предметных стёкол.

Окраску препаратов проводили вручную по следующей схеме: ортоксилол I - 3 мин., ортоксилол II - 3 мин., ортоксилол III - 3 мин., спирт 95 % - 2 мин, спирт 80 % - 2 мин., спирт 70 % - 2 мин., вода очищенная -1 мин., вода очищенная - 0,5 мин., гематоксилин 10 мин., проточная вода 1 мин., очищенная вода 15 сек., HCl 1% в 70% спирте – 5 сек., эозин – 30 сек., вода проточная – 1 мин., вода очищенная 20 сек., спирт 70 % - 1 мин., спирт 80 % - 1 мин., спирт 95 % - 1 мин, ортоксилол I - 2 мин., ортоксилол II - 2 мин., просветление фенол+ксилол – 15 сек. После этого на препарат наносили канадский бальзам и накрывали покровным стеклом.

Препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, фотографировали (в формате .jpg, размером 3136×2352 пикселей в палитре 24 бит) при увеличении ×100, ×400, ×1000. Все микроскопические исследования проводили с помощью светового микроскопа ЛОМО микмед 5 (Россия) и

фотоаппарата Canon EOS (Япония), с использованием окуляра $\times 10$ и объективов $\times 10$, $\times 40$, $\times 100$.

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

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

Отбор тканевого материала для анализа РНК проводился под морфологическим контролем объёма опухолевого материала. Выделение тотальной РНК из образцов тканей опухолей молочной железы и тканей здоровой молочной железы проводили гуанидинтриоцитат фенолхлороформной экстракцией (Chomczynski P. et al., 1987). Процедура выделения РНК в соответствии с данным методом состоит из последующих стадий: лизис клеток в присутствии гуанидинтиоцианата и фенола, очищение препарата РНК от белков и фенолов хлороформом и осаждение нуклеиновой кислоты изопропиловым спиртом. Для освобождения образцов РНК от примесей ДНК использовали ДНКазу. Концентрацию очищенной тотальной РНК определяли спектрофотометрически при 260 нм. Проведение реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием набора реагентов компании (Евроген, Россия).

Ход работы:

Ткань замороженных опухолей и ткань здоровых молочных желез гомогенизировали в охлаждённых ступках с добавлением 1мл раствора ExtractRNA (Евроген, Россия). Чтобы произошла полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов, лизат инкубировали при комнатной температуре в течение 10-15 минут. Далее лизат центрифугировали при 12 000

– 15 000 g в течение 10 минут для удаления нерастворённых фрагментов. Супернатант переливали в новую пробирку. При отборе супернатанта избегали попадания верхнего жирового слоя в новую пробирку. Для разделения фаз мы добавляли 0,2 мл хлороформа на каждый 1 мл реагента ExtractRNA, добавленного на этапе гомогенизации, инкубировали смесь в течение 3-5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая образец. Потом центрифугировали образец при 12000 об. в течение 15 минут при 4°C в холодной центрифуге. В ходе центрифугирования смесь распадалась на три фазы: нижнюю – органическую фенол-хлороформную фазу желтоватого оттенка, интерфазу белого цвета и верхнюю бесцветную водную фазу. РНК находилось в водной фазе, поэтому держа пробирку наклонно под углом 45°, мы отбирали водную фазу, избегая касания интерфазы или органической фазы. Водную фазу переносили в новую пробирку. При выделении РНК в водную фазу добавляли 0,5мл 100% изопропанола на каждый 1мл реагента, использованного для гомогенизации. Инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 10 мин. Центрифугировали образец при 12 000 об. в течение 10 мин при комнатной температуре. Аккуратно отбирали супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки. Медленно, по стенке пробирки, добавляли 2 мл 75% этанола на каждый 1 мл использованного изопропанола. Образец центрифугировали на максимальной скорости в течение 5 мин при комнатной температуре. Удаляли этанол, внимательно следя, чтобы в процессе отмывки осадок не был смыт со дна пробирки и утерян. Осадок высушивали на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течение 5-7 мин. Раствор пипетировали для лучшего растворения осадка.

После растворения РНК начинали процесс обратной транскрипции. Для получения первой цепи кДНК, с помощью реагентов рабочую смесь готовили из следующих компонентов: X мкл стерильная вода, свободная от РНКаз + 1-6 мкл РНК матрица (0,5-2 мкг) + 1-3 мкл праймер (20 мкг).

Суммарный объем первой части реакционной смеси составлял 9 мкл на каждую пробу. Смесь аккуратно перемешивали, сбрасывали капли со стенок на микроцентрифуге. Далее прогревали 2 мин при 70°C для расплавления вторичных структур РНК и переносили образцы на лед. Потом в каждую пробу добавляли 11 мкл предварительно подготовленной смеси следующего состава: X мкл стерильная вода, свободная от РНКаз + 4 мкл 5x буфер для синтеза первой цепи + 2 мкл смесь dNTP (10 mM каждого) + 2 мкл DTT (20 mM) + 1-3 мкл MMLV ревертаза. Суммарный объем второй части реакционной смеси составлял 11 мкл. В пробирку с отрицательным контролем не добавляли MMLV-RT. Аккуратно перемешивали смесь, сбрасывали капли со стенок на микроцентрифуге и инкубировали реакционную смесь 40 мин при 40°C в амплификаторе с греющейся крышкой. Для остановки реакции прогревали смесь при 70°C в течение 10 мин.

Анализ уровня транскрипции генов пуринового обмена в тканях опухолей и в тканях здоровой молочной железы

Уровни мРНК генов *B2M*, *GAPDH* и *ADA* определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени в присутствии красителя SYBRGreen I. Количество ПЦР-продукта кДНК данных генов, которые мы получили в результате реакции обратной транскрипции, измерялись в каждом цикле ПЦР с помощью флуоресцентного красителя. SYBRGreen I является интеркалирующим красителем, интенсивность флуоресценции которого увеличивается при встраивании в двухцепочечную ДНК. Таким образом, по силе сигнала можно судить о первоначальном количестве интересующих нас молекул (Provenzano M., 2007). Работу проводили на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США). Для подбора праймеров к кДНК генов использовали программу Primer 3 (<http://hebi.praimerblast/primer3/>). Синтез праймеров осуществлен фирмой Евроген (Россия). Последовательность использованных праймеров приведена в таблице 8.

Таблица 8 – Последовательность праймеров для проведения ПЦР в режиме реального времени

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

Реакцию амплификации проводили в двух повторностях для каждого образца с использованием реагентов фирмы Евроген (Россия). Реакционная смесь состояла из: 5 ml qPCRmix – HS SYBR, 1µl каждого праймера, 17 µl деионизированной воды и 1.0 мкл образца кДНК.

Программа амплификации:

1. Предварительный прогрев 95 С - 5 минут;
2. 95 С - 20 секунд;
3. 60 С - 10 секунд;
4. 72 С - 20 секунд;
5. 36 циклов, кривая плавления от 65 С до 95 С по 0,5 секунд с шагом 0,5 С.

Реакция считалась валидной, если приращение флуоресцентного сигнала фиксировалось на графике амплификации в пределах 40-го цикла ПЦР. Пример графика амплификации участка кДНК гена *АДА* представлен на рисунке 17.

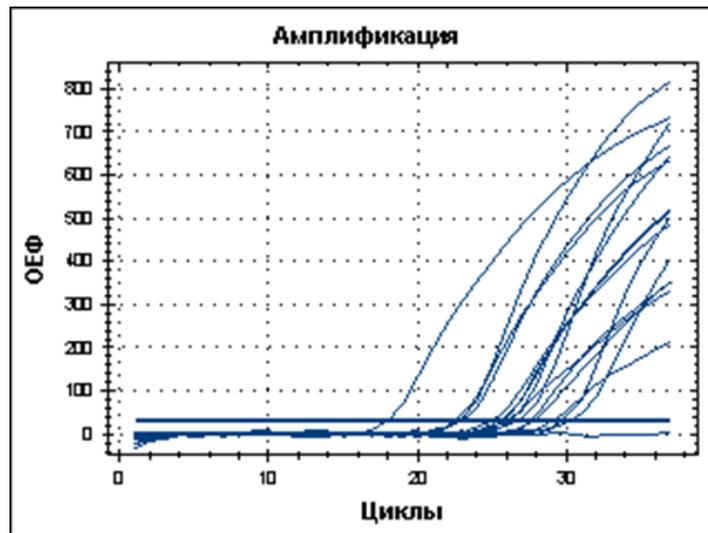


Рисунок 17 - График роста уровня флуоресценции при амплификации участка кДНК гена *АДА*

Так как ПЦР в реальном времени позволяет идентифицировать конкретные амплифицированные фрагменты ДНК, используя анализ их температуры плавления, который специфичен, для каждого амплифицированного фрагмента, но SYBR Green I связывается с любой двуцепочечной ДНК и увеличение флуоресценции в ПЦР может быть связано с накоплением как специфического продукта, так и неспецифического (димеры праймеров, неспецифический отжиг праймеров), для получения корректных результатов после окончания реакции необходимо дополнительно проанализировать результат ПЦР с помощью построения так называемой "кривой плавления". Нами были проанализированы пики плавления кДНК исследуемых генов в образцах тканей опухолей и в тканях здоровой молочной железы (рисунок 18).

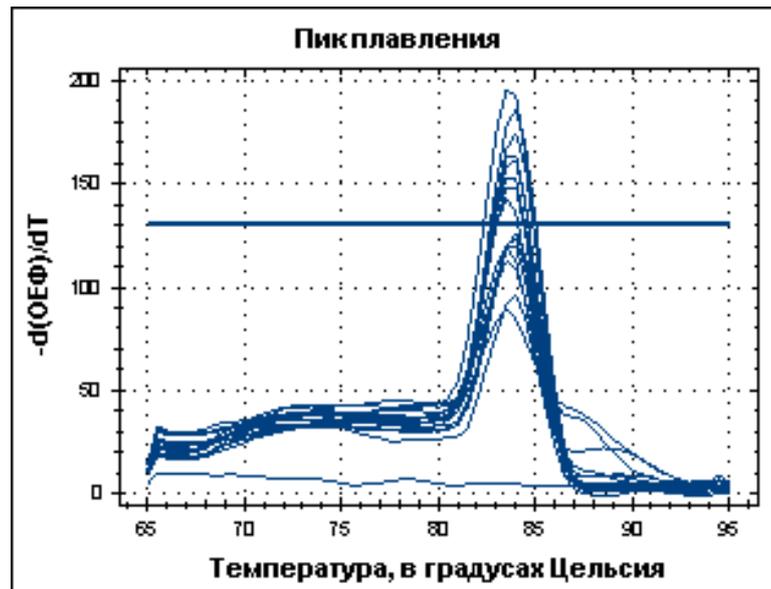


Рисунок 18 - График плавления участка кДНК гена *ADA*

Учитывая тот факт, что методом ПЦР в реальном времени точное начальное количество интересующего нас продукта измерить нельзя, существуют специальные методы нормировки для определения экспрессии исследуемых генов. Обычно измеряют отношение количеств двух молекул, соответствующих работе разных генов, в анализе одного и того же образца. Мы нормировали образцы кДНК по контрольному гену B2M, являющемуся «геном домашнего хозяйства», так как B2M экспрессируется практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне на всех стадиях жизненного цикла организма. Кроме того, в предварительных экспериментах установлено, что разброс уровней транскрипции для гена «домашнего хозяйства» B2M наименьший по сравнению с другим контрольным геном – GAPDH.

Методы статистической обработки результатов

Статистический анализ данных по уровню экспрессии генов проводили методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Где C_t это пороговое число циклов ПЦР, при котором наблюдалась флуоресценция, превышающая пороговое значение базовой линии. ΔC_t эта разница между C_t исследуемого гена и C_t внутреннего

контрольного образца. $\Delta\Delta Ct$ это разность значений ΔCt исследуемого образца и калибровочного образца. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ показывает количество продукта амплификации в технических репликах относительно калибровочного образца. Все образцы в рамках нашего эксперимента сравнивались с калибровочным. Данный метод показывает кратность изменений уровня экспрессии гена в сравниваемых образцах. $\Delta\Delta Ct$ и ΔCt рассчитывали согласно Livak и Schmittgen (Livak K.J. et. al, 2001). Все значения экспрессии генов (ΔCt) в группах образцов сравнивали между собой как две выборки. Для подтверждения статистически значимых отличий между выборками образцов применяли критерий Манна-Уитни. Для определения взаимосвязи изучаемых показателей при их нормальном распределении в совокупности использовали линейную корреляцию Пирсона (r).

Контроль качества проводимых исследований

Лаборатория генетики человека и животных Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ (г. Ростов-на-Дону) проводит внутренний и внешний контроль качества молекулярно - генетических исследований. Лабораторное оборудование, использованное в ходе диссертационного исследования, поверяется согласно требованиям федерального агентства по техническому регулированию и метрологии. Во время проведения анализа каждый образец анализировали в дублях. Для проверки чистоты работы все постановки полимеразной цепной реакции включали отрицательный контроль. В качестве положительного контроля реакции амплификации использовали ранее проанализированные гетерозиготные образцы ДНК.

Определение активности аденозин дезаминазы в плазме крови кошек

Активность фермента определяли по методу Kalear (Березин И.В., 1976) на спектрофотометре NanoProtometr Implen. Данный метод основан на изменении оптической плотности исследуемой жидкости при длине волны, равной 260 нм. Изменение плотности обусловлено дезаминированием аденозина до инозина. В оптических пробах в качестве субстрата использовали $0,36 \times 10^{-4}$ М раствор аденозина в фосфатном буфере (рН = 7). В качестве ферментативной фракции использовали разбавленную плазму крови в буфере в соотношении 1:270 (0,01 мл плазмы крови в 2,7 мл буфера). Реакции проводили при температуре раствора 5⁰С. Активность АДА высчитывали по формуле $A = \Delta D \times 1\ 000 / t \times 0,0149 \times 267$ нмоль/сек/мл плазмы. Где, ΔD – разница между показаниями после и до инкубации, 1000 – разбавление, t – время в секундах, 0,0149 – коэффициент из соотношения показания при измерении стандартного раствора аденозина, 267- молекулярная масса аденозина. За единицу активности фермента принимали такое количество, которое обеспечивало превращение 1 нмоль аденозина за 1 секунду в 1 мл плазмы в соответствующих условиях реакции.

Измерение содержания полиаминов в крови животных с новообразованиями молочной железы

Содержание полиаминов определяли в эритроцитах венозной крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Lichrospher RP18, предварительно переводя их в бензольные производные для идентификации в УФ при 229 нм. Для получения эритроцитов кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3 000 об/мин. Отмытые физиологическим раствором эритроциты хранили при –30⁰С. Определение полиаминов проводили в эритроцитах, полученных из 1 мл крови. Для осаждения белков к образцам добавляли 1 мл 10 % трихлоруксусной кислоты, которую затем нейтрализовали 2 мл 2 М NaOH. Далее образцы смешивали с

20 мкл бензоилхлорида (разбавленного в метаноле 1:1). После интенсивного перемешивания смеси образцов с бензоилхлоридом в течение 2 ч прибавляли 1 мл хлороформа и центрифугировали 10 мин при 3500 об. Фракцию хлороформа, содержащую полиамины, отбирали, повторно добавляли хлороформ к образцам и центрифугировали. В качестве внутреннего контроля использовали 1,4-диаминогептан (DAG). Хлороформ выпаривали при 80° С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл 60 % метанола. Состав подвижной фазы – метанол: вода (60:40), объем вводимой пробы составлял 20 мкл, время хроматографического анализа – 60 мин. Время выхода бензоильных производных составляло для путресцина 17 мин, для спермидина 29-30 мин, DAG - 33 мин, спермина - 49 мин.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Statistica 6.0». Для оценки достоверности обнаруженных изменений применяли следующие статистические критерии: тест Уилкоксона (сравнение параметров, измеренных у контрольной группы и у животных с новообразованиями молочной железы) и тесты Стьюдента (сопоставление двух независимых групп данных). Отличия между группами считались достоверными при $p \leq 0,05$. Результаты были представлены как среднее арифметическое и ошибка среднего ($M \pm m$).

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данном разделе изложены результаты научных исследований, опубликованные в научных статьях Вакуленко М.Ю. (2016); Вакуленко М.Ю., Добаева Н.М., Сухомлинов В.В., Шкурят Т.П., Ермаков А.М. (2018); Вакуленко М.Ю., Добаева Н.М., Акинина Н.И., Дентелла Н., Пономарева В.Ф., Ермаков А.М. (2019); Карнаухов Н.С. Добаева Н.М., Акинина Н.И., Дентелла Н., Пономарева В.Ф., Ермаков А.М. Попов И.В. (2019); Vakulenko M., Akinina N., Dobaeva N., Vakurova E., Ermakov A. (2019); Vakulenko M., Karnaukhov N., Dobaeva N., Akinina N., Suhomlinov V., Kochetkova A., Ermakov A. (2019), которые содержат уточненные, расширенные и новые сведения. Соавторы не возражают об использовании совместно изданных материалов.

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

Анализ 73247 историй болезни кошек, предоставленных ветеринарными клиниками г. Ростова – на - Дону и области, показал, что 321 животному была проведена операция по удалению новообразований (НО) молочной железы, что составляет 0,44 % от всех обратившихся пациентов (таблица 9).

Таблица 9 - Анализ историй болезни кошек, поступивших на прием в клиники Ростовской области в 2018 году

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

Соответственно животные с новообразованиями молочной железы составили примерно 400 особи на каждые 100 000 кошек. Далее был проведен анализ распределения клиноморфологических форм новообразований на основании цитологических исследований, имеющихся в предоставленных

нам историях болезни. Только в 61 истории болезни из 321 имелись данные о проведении цитологических исследований вырезанных новообразований, и из них только 5 животным был поставлен диагноз на основании гистологического исследования. В соответствии с классификацией опухолей молочной железы (ВОЗ, 2012) карцинома и саркома были отнесены к злокачественным новообразованиям молочной железы, а к доброкачественным и опухолеподобным образованиям – фиброаденома и фиброэпителиальная гиперплазия. У 32 животных из 61 было диагностировано злокачественное новообразование, что составило 53% (Вакуленко М.Ю., 2019; Vakulenko M.Y. 2019) (рисунок 19).

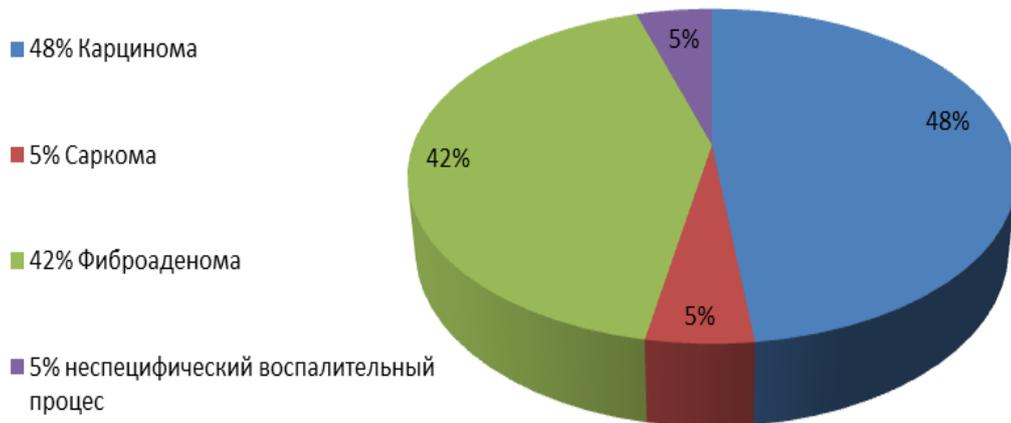


Рисунок 19 – Распределение различных форм новообразований по данным цитологических исследований

Важно отметить, что при работе в клиниках нами было замечено, что практикующие врачи часто совершали ошибки приготовления цитологического препарата. Поэтому низкий процент выявления злокачественных опухолей, скорее всего, связан не с недостатками метода, а с низкой квалификацией персонала, делающего мазок на местах, и с отсутствием ветеринарных цитологов. На момент исследования в ветеринарных клиниках отмечалось отсутствие стандартизации осмотра, диагностики и лечения РМЖ у кошек, что затрудняет реальную оценку проблемы РМЖ. Большинство НО было прооперировано без соблюдения

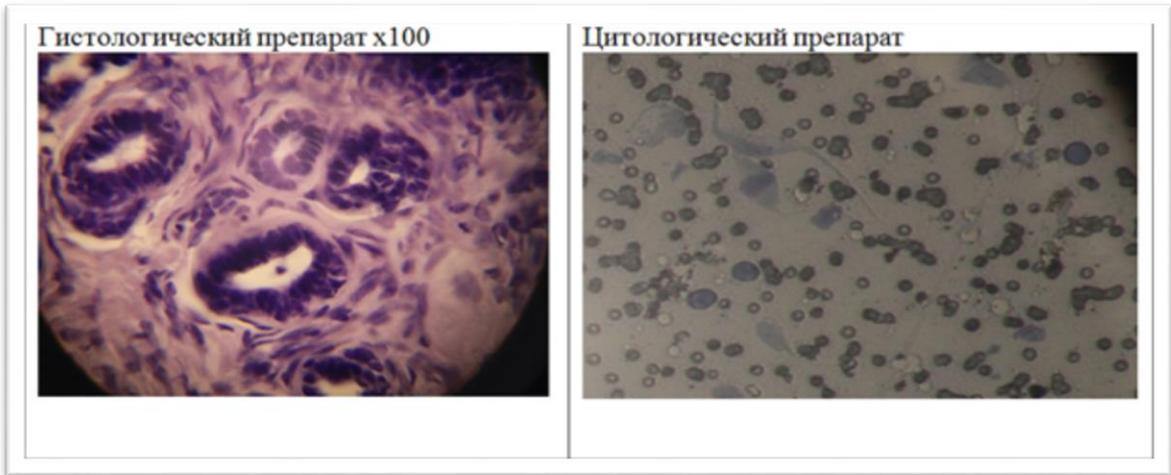


Рисунок 20 – Кошка, 1 год, Фиброэпителиальная гиперплазия молочной железы. Ув. 10 x 100

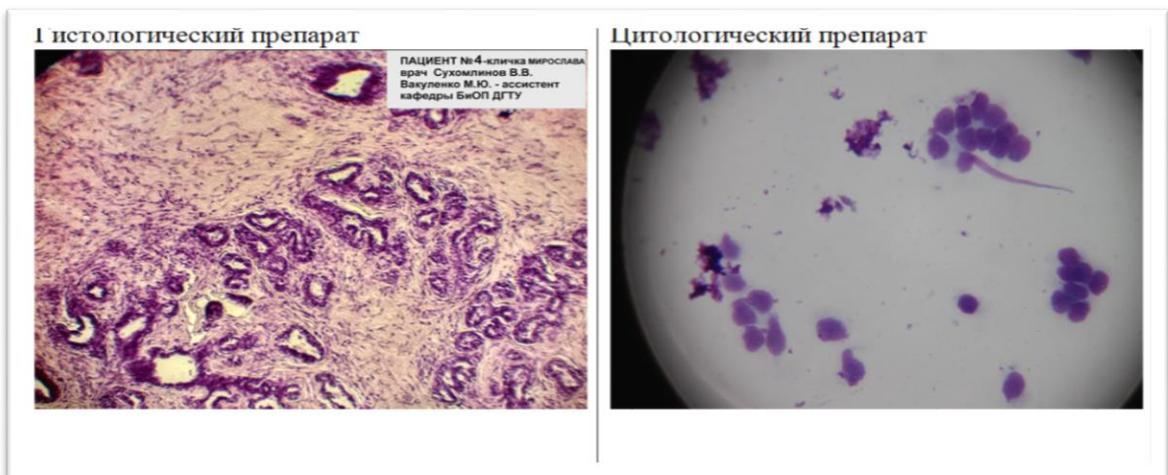
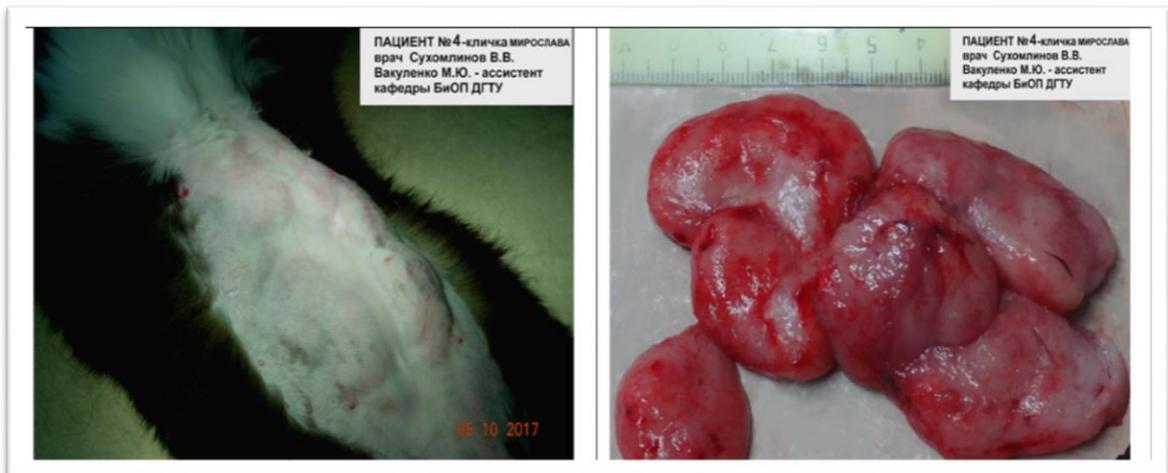


Рисунок 21 – Кошка, 1 год, Фиброэпителиальная гиперплазия молочной железы Ув.10 X 10

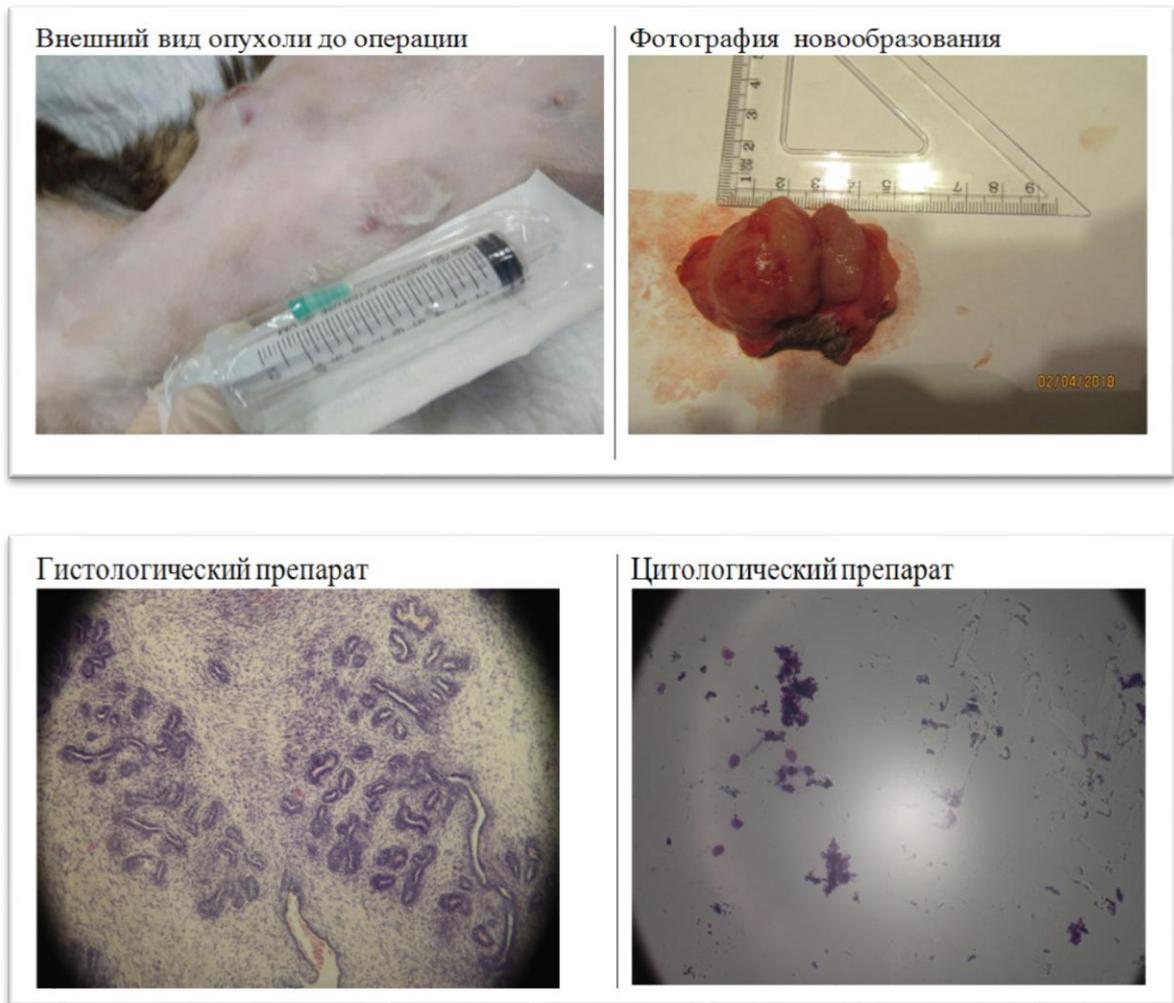


Рисунок 22 – Кошка, 2 года, Фиброэпителиальная гиперплазия
молочной железы Ув. 10 X 10

Макроскопически большинство опухолей представляли собой новообразования бобовидной формы, от 2 до 4 см в диаметре, эластичной консистенции. Границы определялись чётко, от близлежащих тканей опухоли отделялись самопроизвольно и имели собственную капсулу. На разрезе тела опухоли некрозов и кровоподтеков не наблюдалось, отмечалась гладкая блестящая ткань розового цвета. Микроскопически установлено разрастание плотной соединительной ткани, в которой наблюдались чётко оформленные, разветвлённые протоки, сформированные эпителиальной железистой тканью. Обычно пролиферирующие протоки были выстланными двумя - тремя слоями мономорфных призматических эпителиальных клеток с

гиперхромными округлыми ядрами. Митозы наблюдались в единичных клетках. При этом просветы ацинусов были сохранены, глубоких структурных изменений ядра и цитоплазмы не наблюдалось.

У одного животного была диагностирована периканаликулярная фиброаденома. У данного животного уже проводилась операция по удалению НО молочной железы, которая представляла собой фиброаденоматозную гиперплазию, но хозяин вместо рекомендованной стерилизации продолжил применение прогестиновых препаратов. Удаленный макропрепарат представлял собой конгломерат узлов бобовидной формы, диаметром от 2 до 8 мм. Узлы были четко отграниченными, в капсуле, подвижными, не связанными с окружающими тканями, плотноэластической консистенции, с гладкой поверхностью. На разрезе они были представлены светло-розовой однородной мелкозернистой тканью. Участков некроза и кровоизлияний не выявлено. Ткань опухоли состояла из множества пролиферирующих мелких тубул, выстланных одним-двумя слоями мономорфных призматических и вытянутых (миоэпителий) клеток со слабозозинофильной цитоплазмой, округлыми гиперхромными ядрами. Ядерный полиморфизм не выражен. Митозы единичные в препарате. Тубулы окружены фибробластической стромой (рисунок 23).



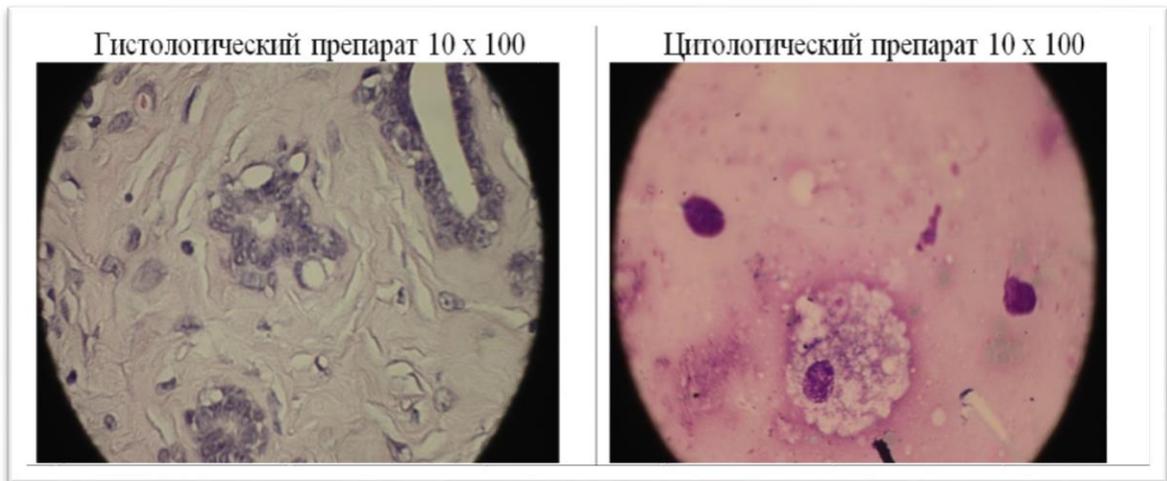


Рисунок 23 – Кошка, 10 лет, Периканаликулярная фибroadенома Ув. 10 x 100

У 26 животных был диагностирован РМЖ различной степени злокачественности (рисунки 24 - 49). Возраст животных варьировал от 8 до 19 лет.

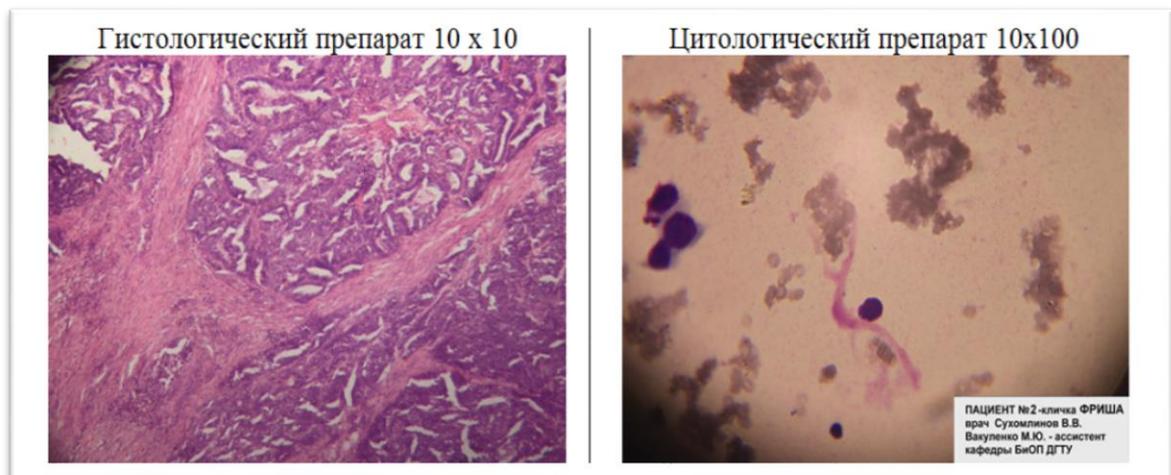


Рисунок 24 – Кошка, 19 лет, Инвазивная неспецифическая высокодифференцированная карцинома

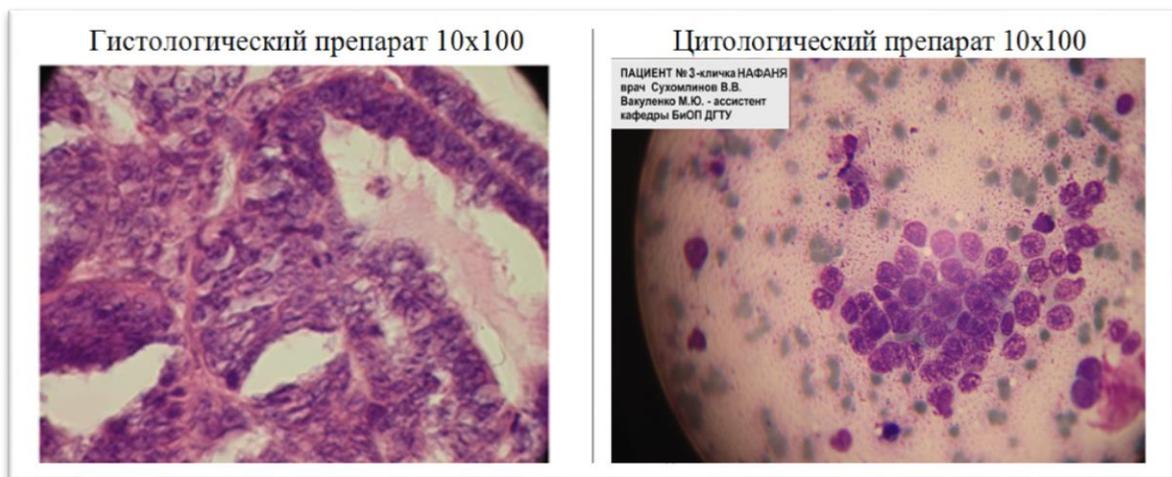


Рисунок 25 – Кошка, 14 лет, Инвазивная неспецифическая низкодифференцированная карцинома



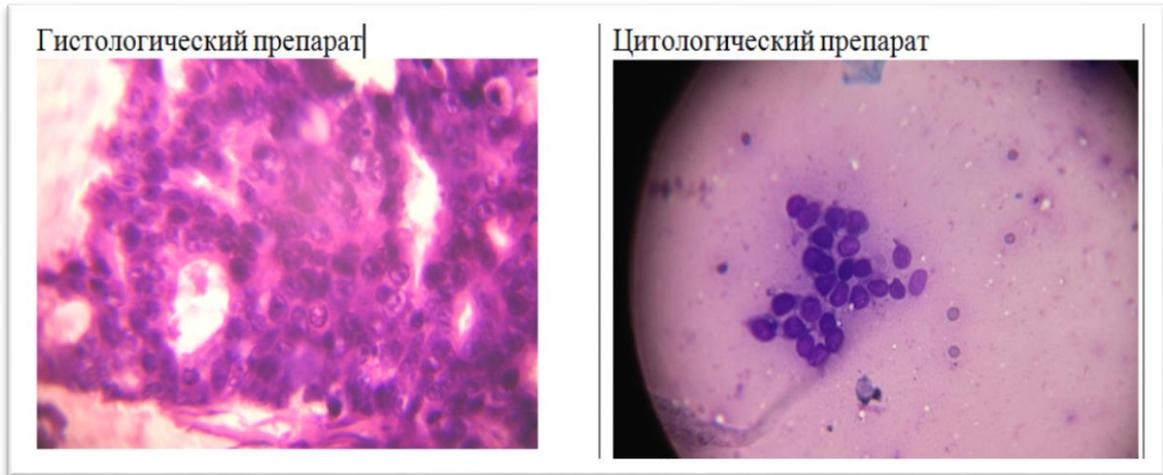


Рисунок 26 – Кошка, 13 лет, Инвазивная неспецифическая высокодифференцированная карцинома Ув. 10 x 40

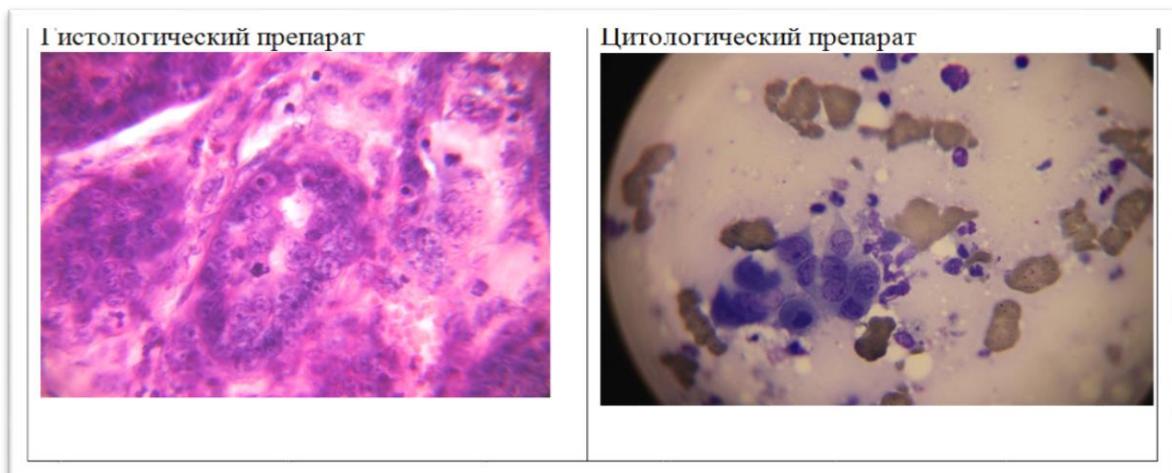


Рисунок 27 – Кошка, 13 лет, Инвазивная неспецифическая низкодифференцированная карцинома Ув. 10 x 100

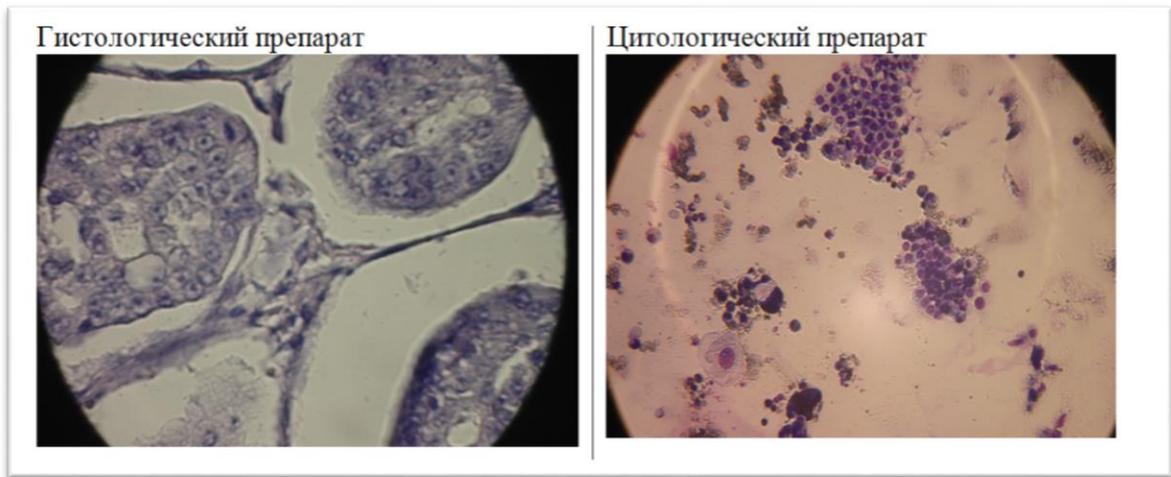


Рисунок 28 – Кошка, 8 лет, Инвазивная высокодифференцированная неспецифическая карцинома (тубуло-папиллярный вариант) Ув. 10 x 100

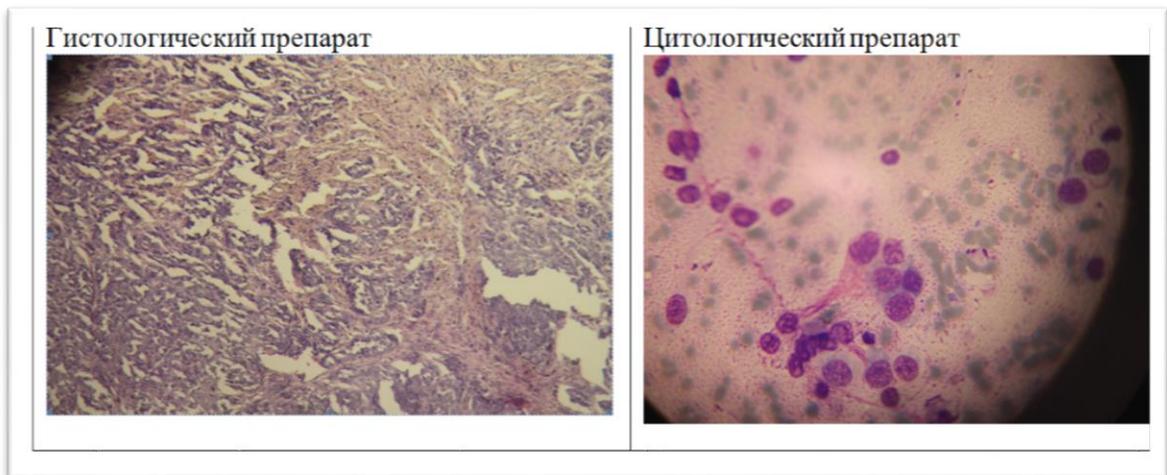


Рисунок 29 – Кошка, 14 лет, Инвазивная умереннодифференцированная неспецифическая карцинома Ув. 10 x 10



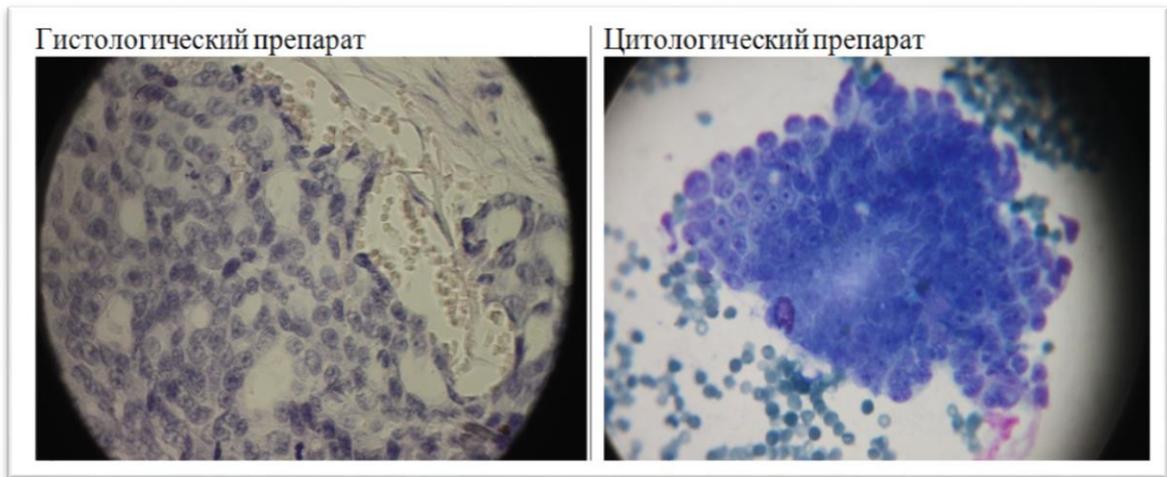


Рисунок 30 – Кошка, 17 лет, Инвазивная неспецифическая высокодифференцированная карцинома 10 x 40

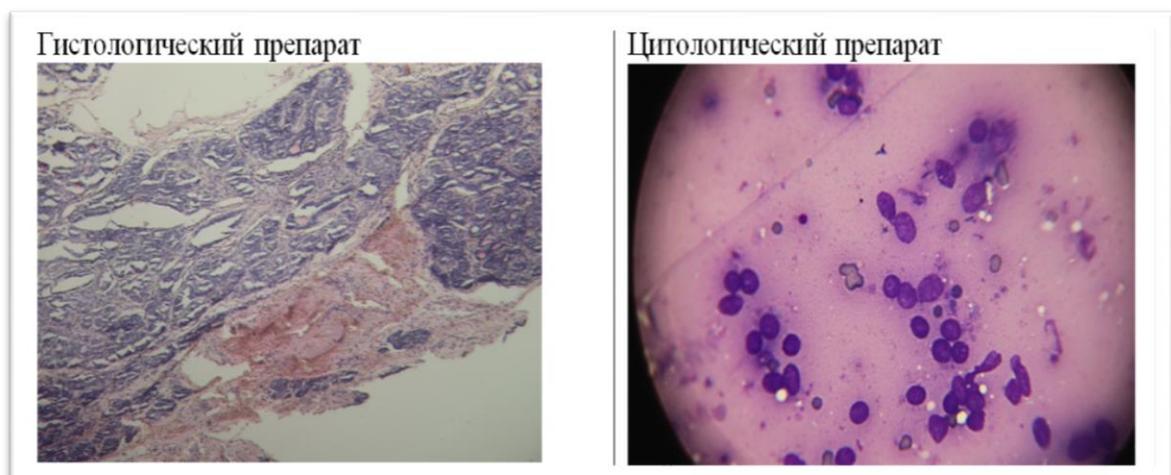


Рисунок 31 - Кошка, 11 лет, Инвазивная умереннодифференцированная неспецифическая карцинома Ув. 10 x 10

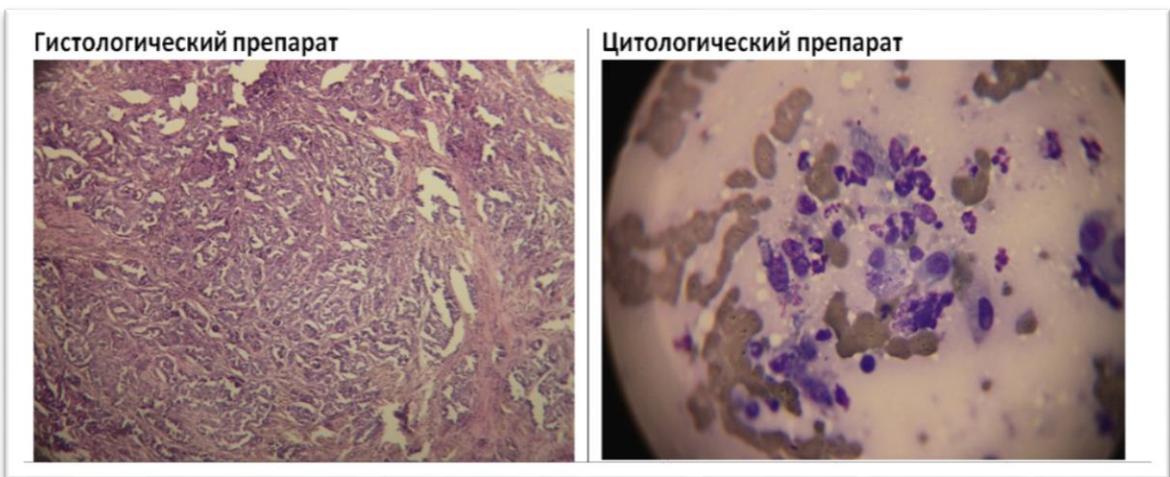


Рисунок 32 – Кошка, 17 лет, Инвазивная умереннодифференцированная неспецифическая карцинома Ув. 10 X 10



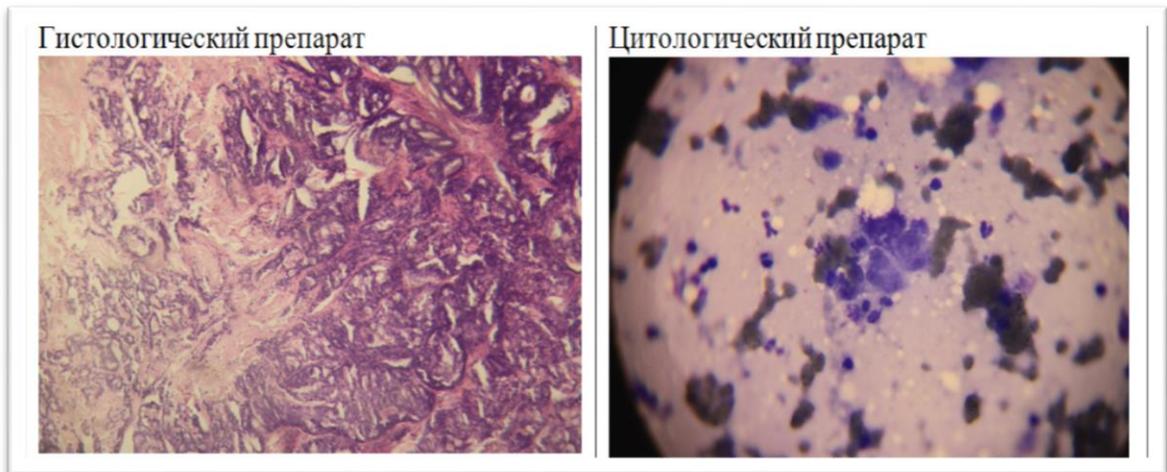


Рисунок 33 – Кошка, 15 лет, Инвазивная умереннодифференцированная неспецифическая карцинома Ув. 10 X 10



Рисунок 34 – Кошка, 15 лет, Инвазивная высокодифференцированная неспецифическая карцинома Ув. 10 X 100



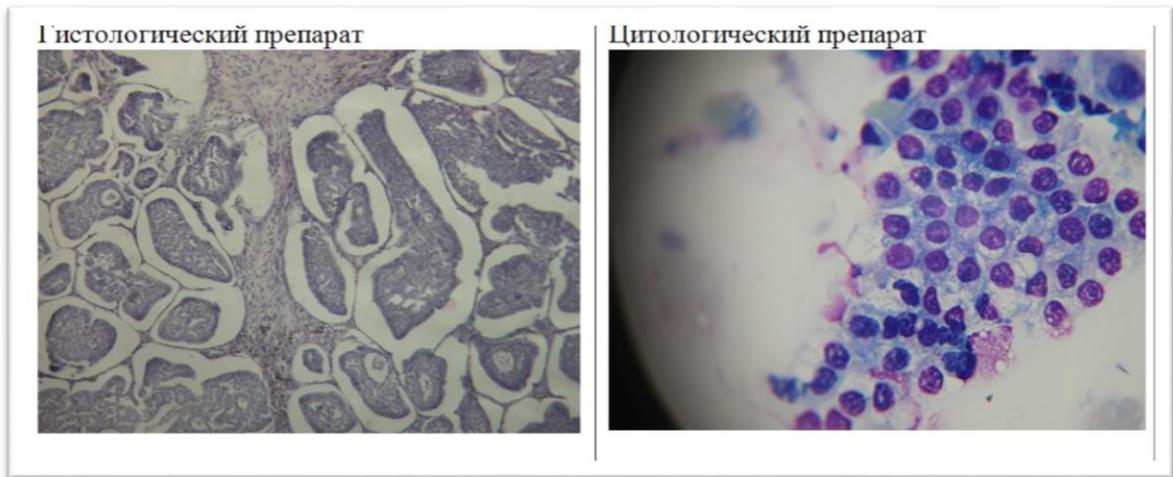


Рисунок 35 – Кошка, 13 лет, Инвазивная высокодифференцированная неспецифическая карцинома Ув. 10X100

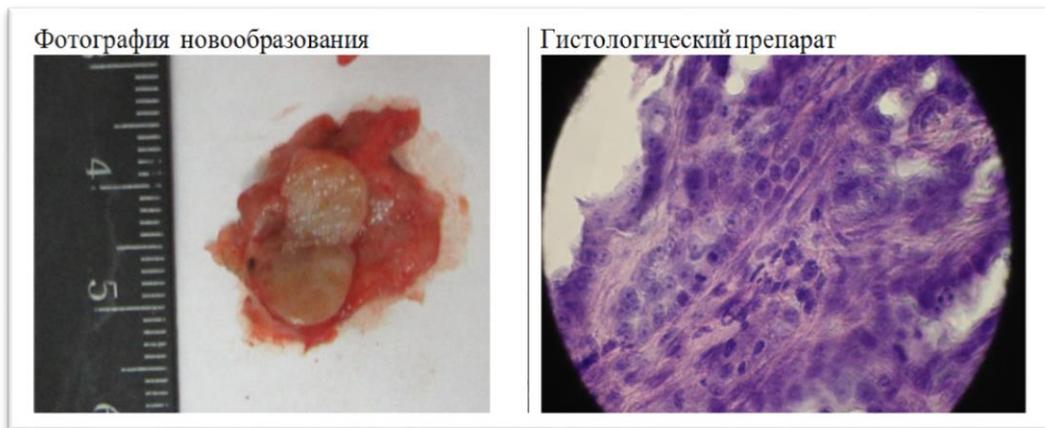


Рисунок 36 – Кошка, 13 лет, Инвазивная высокодифференцированная неспецифическая карцинома Ув. 10 x 100



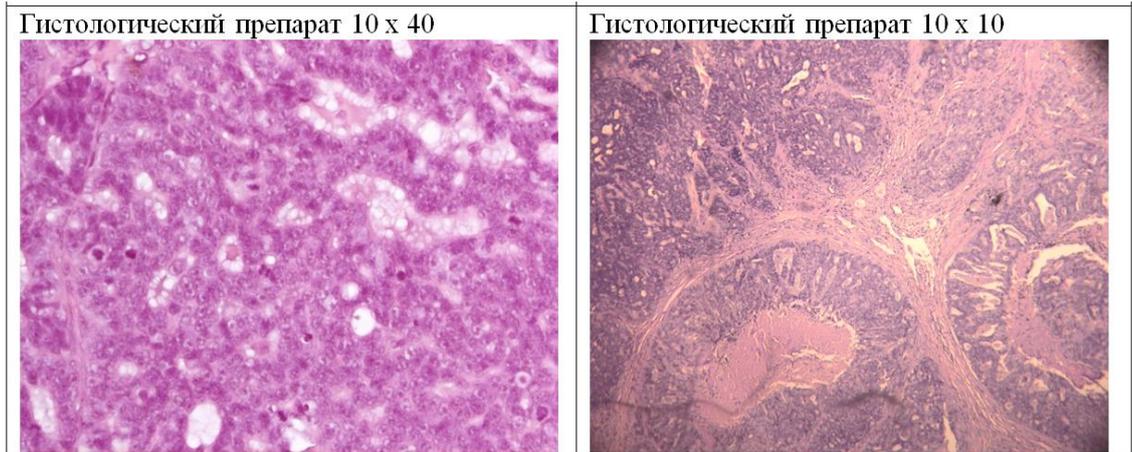


Рисунок 37 – Кошка, 15 лет, Инвазивная неспецифическая
низкодифференцированная карцинома

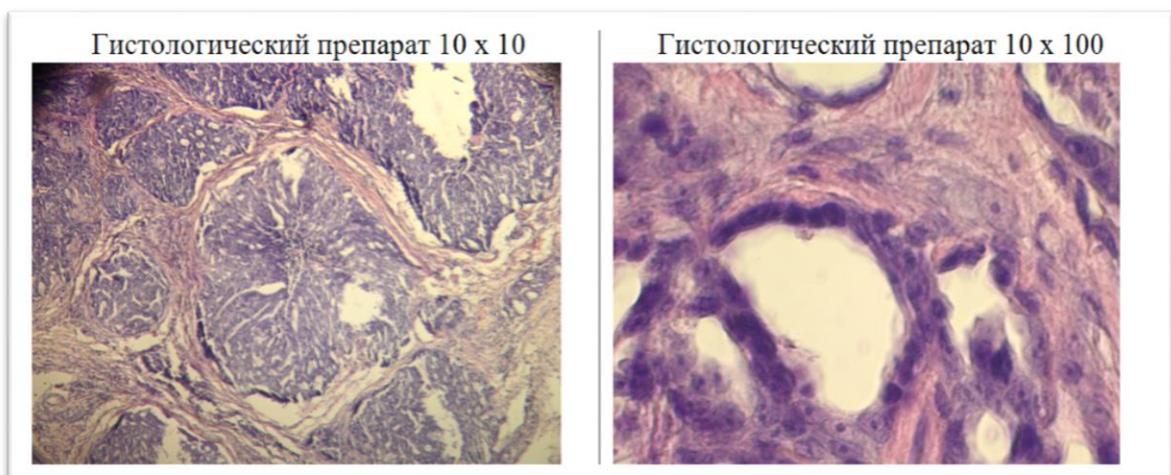


Рисунок 38 – Кошка, 10 лет, Инвазивная умереннодифференцированная
неспецифическая карцинома

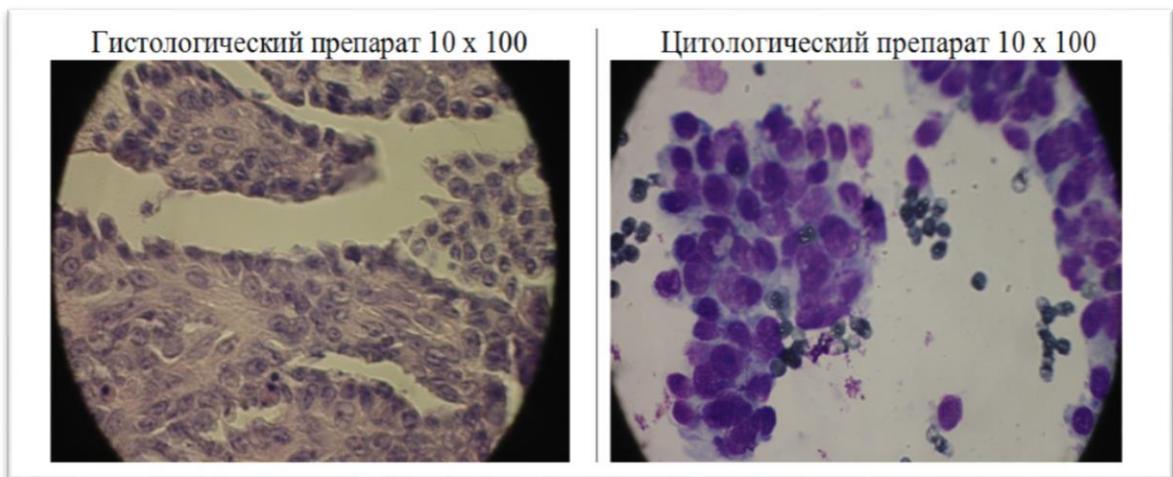
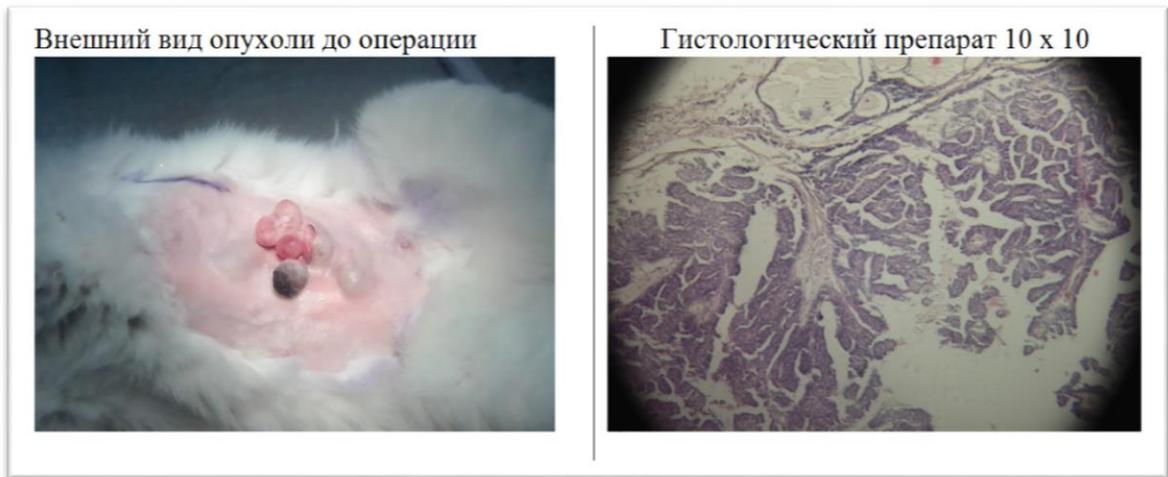


Рисунок 39 – Кошка, 10 лет, Инвазивная неспецифическая
низкодифференцированная карцинома

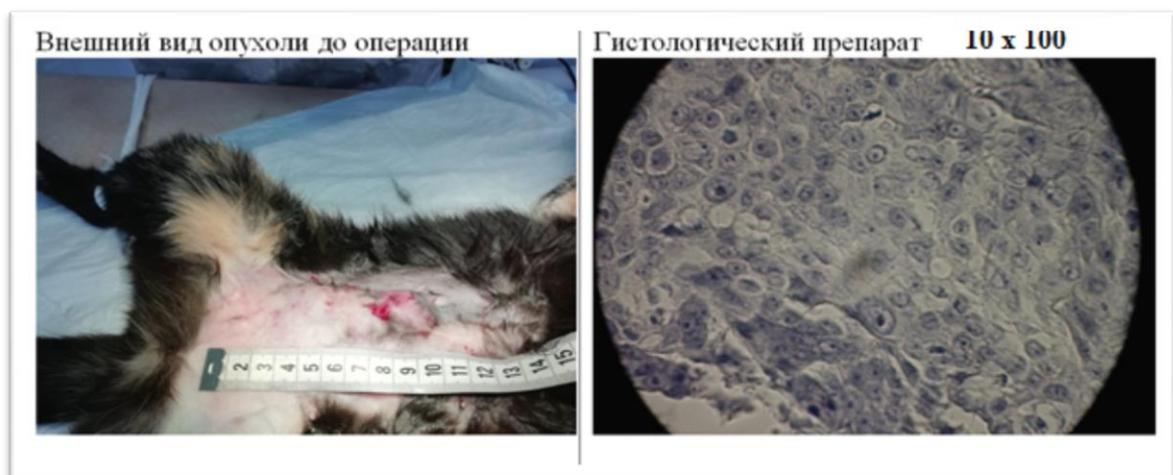
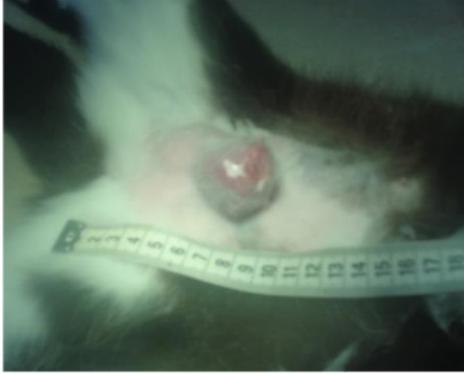


Рисунок 40 – Кошка, 15 лет, Инвазивная неспецифическая
низкодифференцированная карцинома

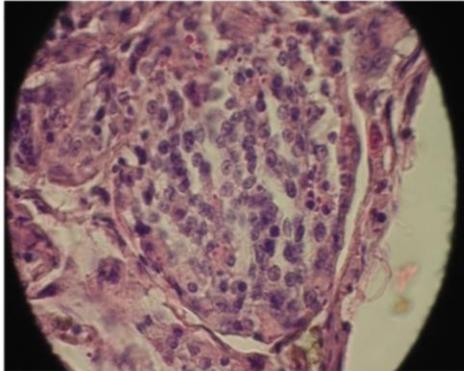
Внешний вид опухоли до операции



Фотография новообразования



Гистологический препарат 10 x 100



Гистологический препарат 10 x 10

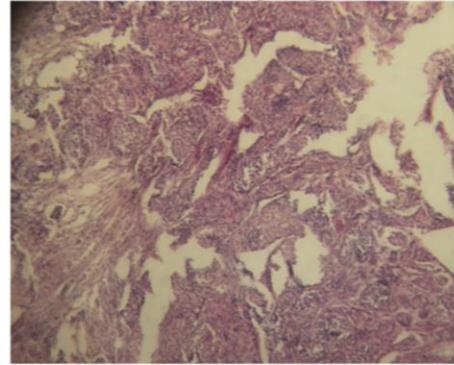
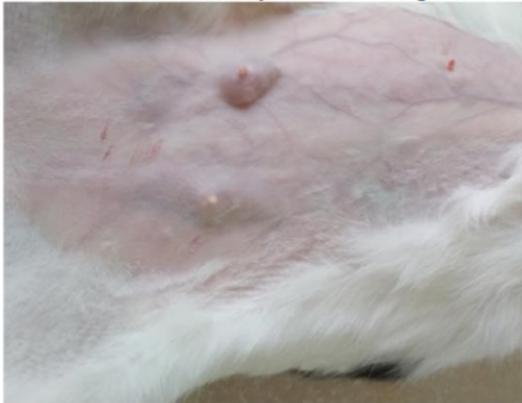
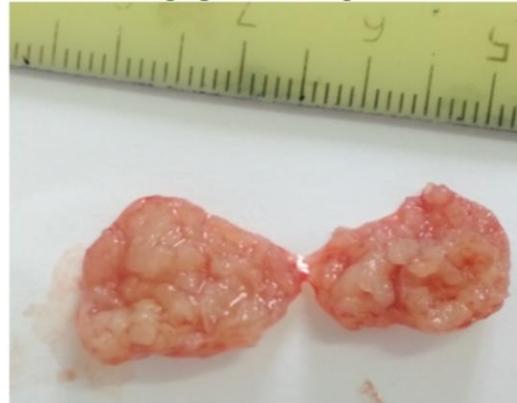


Рисунок 41 – Кошка, 15 лет, Инвазивная неспецифическая высокодифференцированная карцинома

Внешний вид опухоли до операции



Фотография новообразования



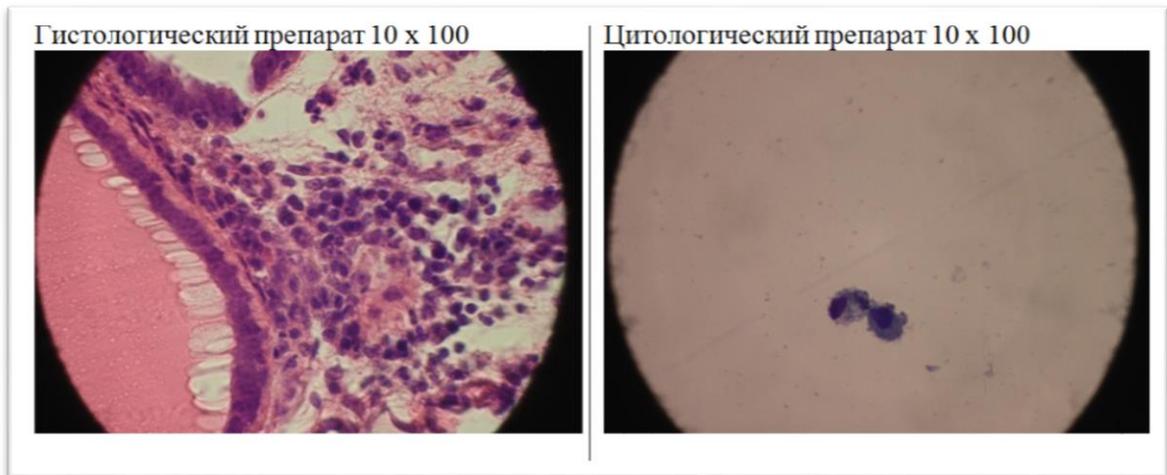


Рисунок 42 – Кошка, 10 лет, Инвазивная неспецифическая высококодифференцированная карцинома

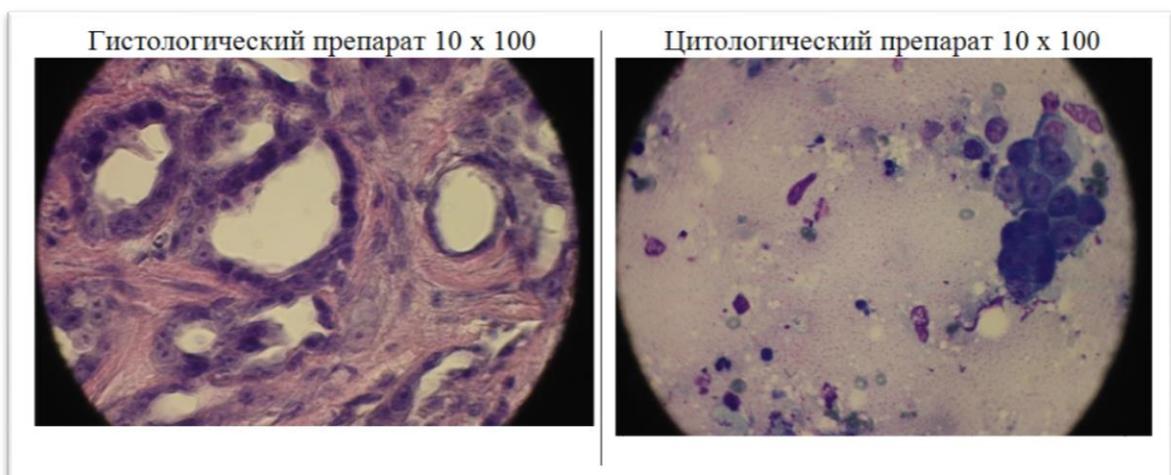


Рисунок 43 – Кошка, 14 лет, Инвазивная неспецифическая высококодифференцированная карцинома

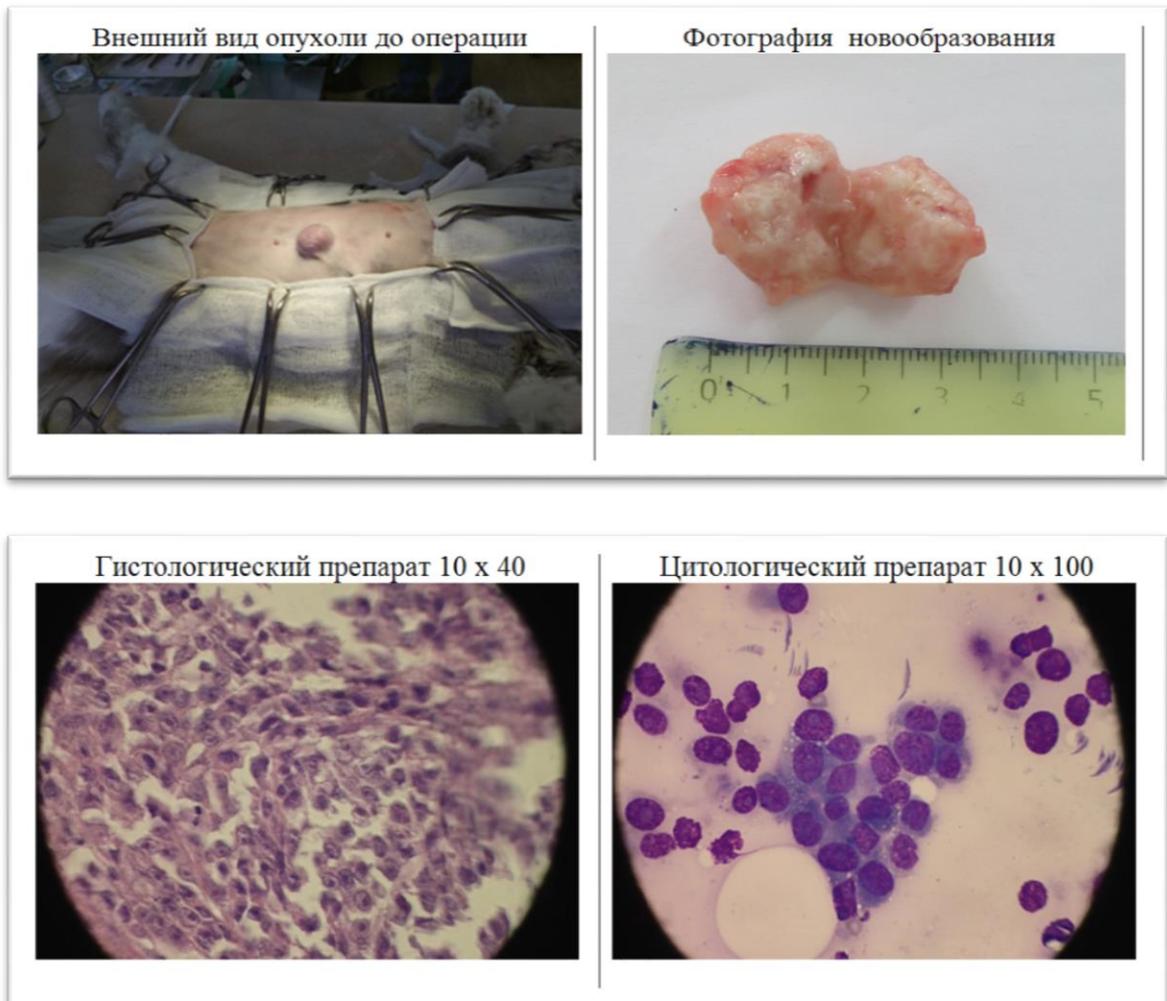


Рисунок 44 – Кошка 10 лет, Инвазивная неспецифическая высокодифференцированная карцинома



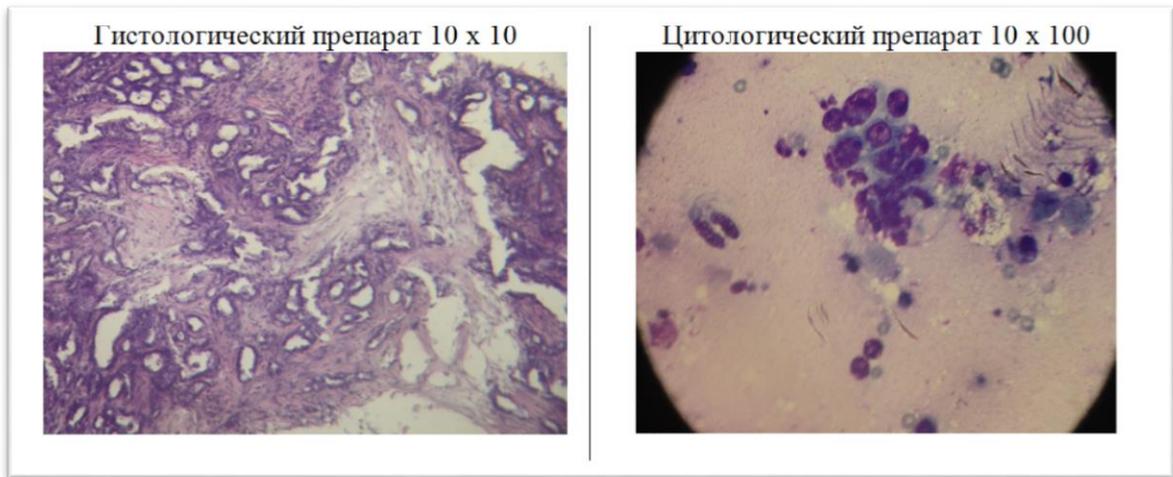


Рисунок 45 – Кошка, 8 лет, Инвазивная неспецифическая низкодифференцированная карцинома

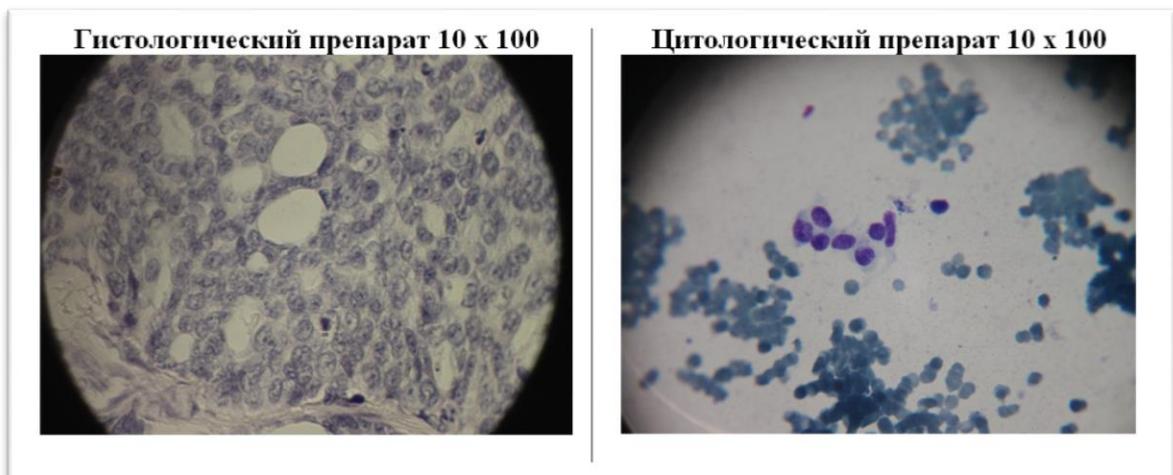
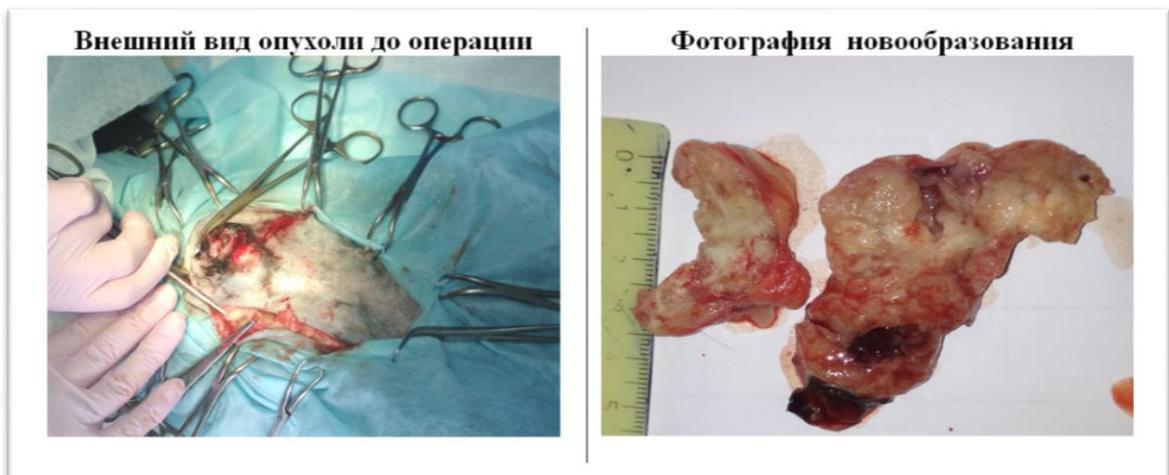


Рисунок 46 – Кошка, 17 лет, Инвазивная неспецифическая высокодифференцированная карцинома

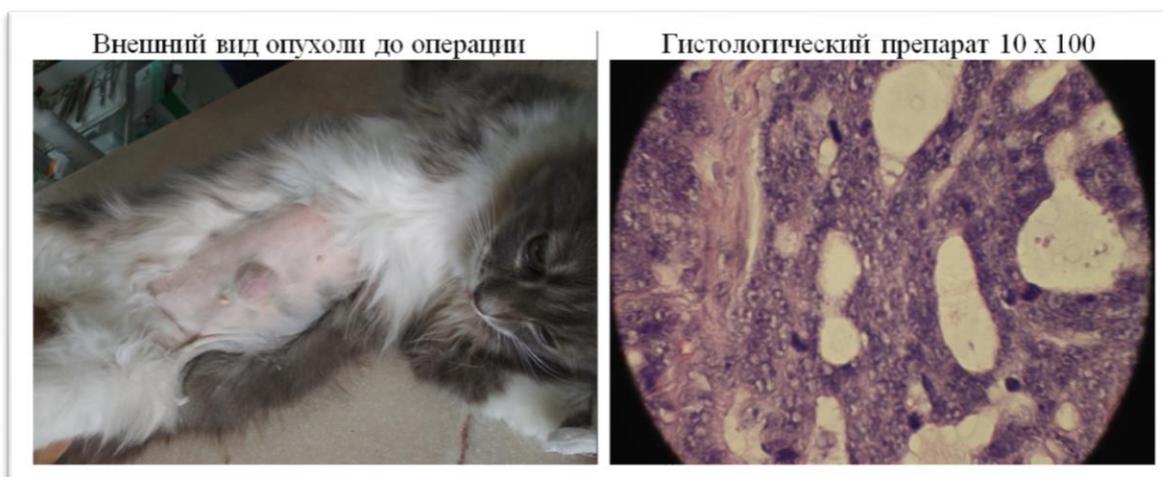


Рисунок 47 – Кошка, 8 лет, Инвазивная неспецифическая
низкодифференцированная карцинома

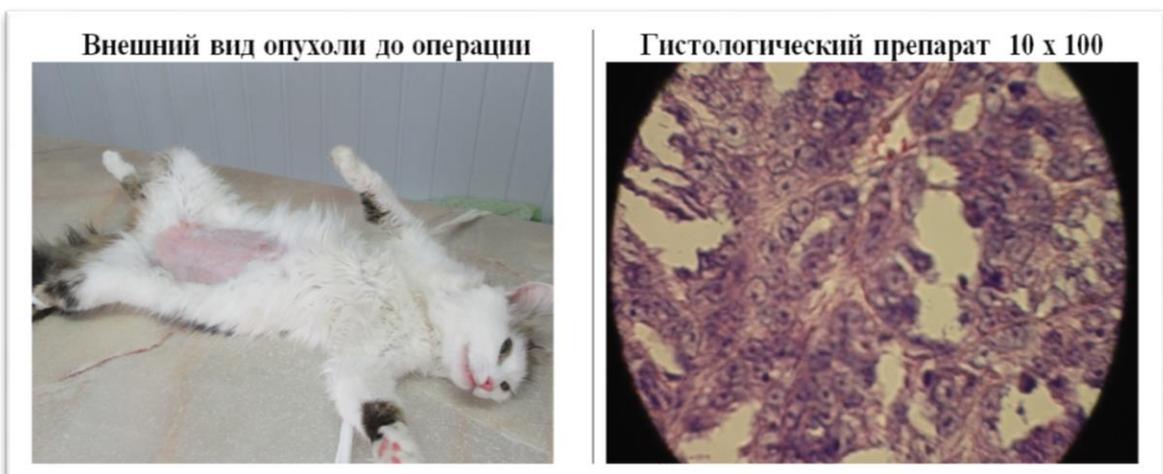


Рисунок 48 – Кошка, 10 лет, Инвазивная умереннодифференцированная
неспецифическая карцинома

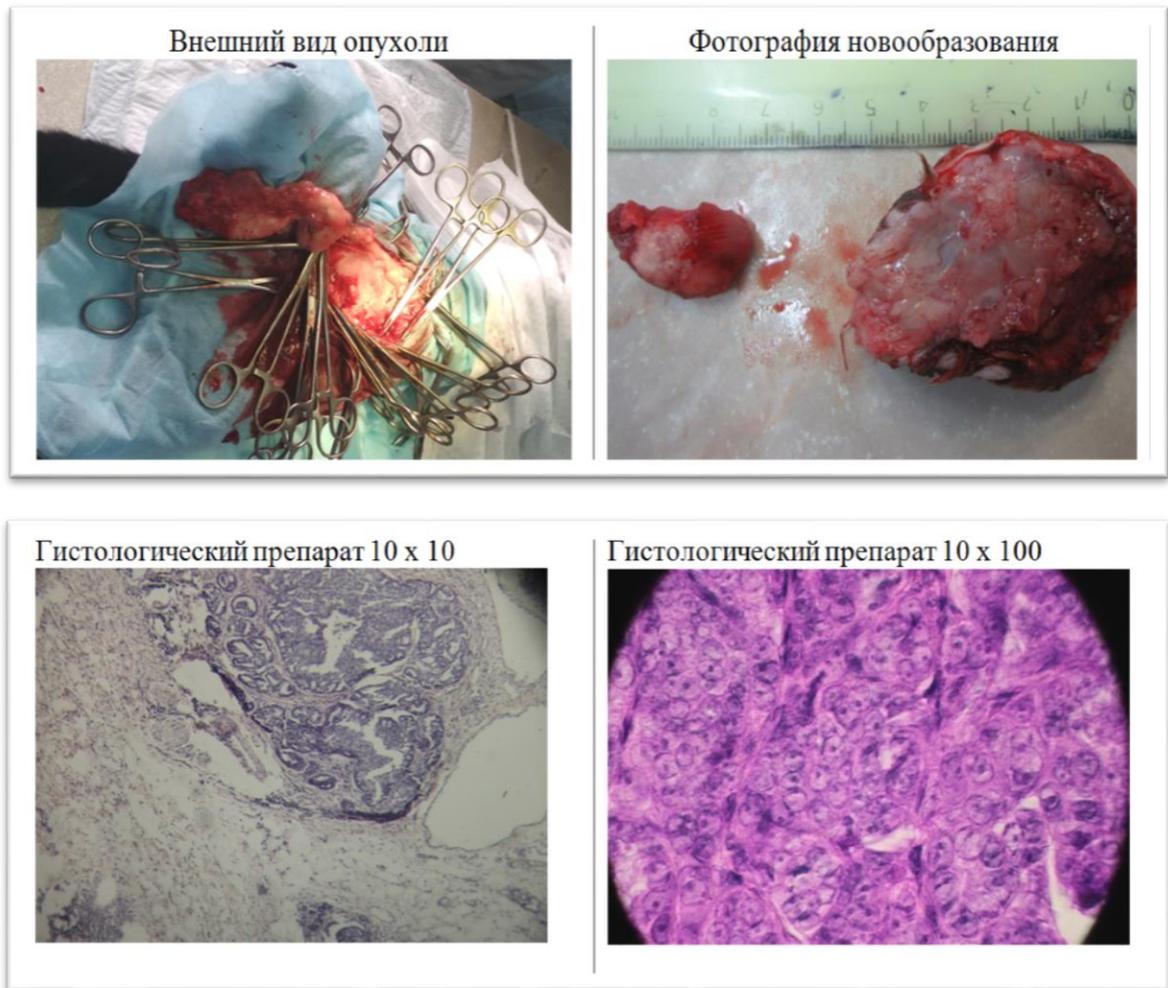


Рисунок 49 – Кошка, 19 лет, Инвазивная низкокодифференцированная неспецифическая карцинома

Макроскопически опухоли не имели общих закономерностей. Они отличались размерами и локализацией. Обычно, на срезе ткани опухолей были значительно светлее прилежащих тканей, цвет варьировал от бледно-розового до серо-желтого.

Микроскопически карцинома молочной железы у кошек характеризовалась признаками злокачественности: инвазивный рост, клеточный и ядерный полиморфизм, высокий митотический индекс. Эпителиальные клетки располагались преимущественно в скоплениях, похожих на просветы каналов. Обычно опухоль была представлена нечетко оформленными протоками, выстланными одним или несколькими слоями

полиморфных округлых и призматических клеток с округлыми гиперхромными ядрами. Строма опухоли была представлена рыхлой и плотной соединительной тканью, соотношение между эпителиальной и соединительной тканью варьировало в разных опухолях, иногда встречались разрозненно лежащие клетки рака. При низкодифференцированных формах рака, соответствующих высокой степени злокачественности, наблюдались: неправильная форма ядра, неровные и нечёткие контуры ядерной мембраны, глыбчатый хроматин, крупные чётко выраженные ядрышки, высокий митотический индекс.

Таким образом, злокачественные новообразования составили 87% от всех прооперированных нами животных, что существенно превышало процент злокачественных новообразований, диагностированных с помощью цитологических исследований, но соответствовало литературным данным (Якунина М.Н., 2011) (рисунок 50).

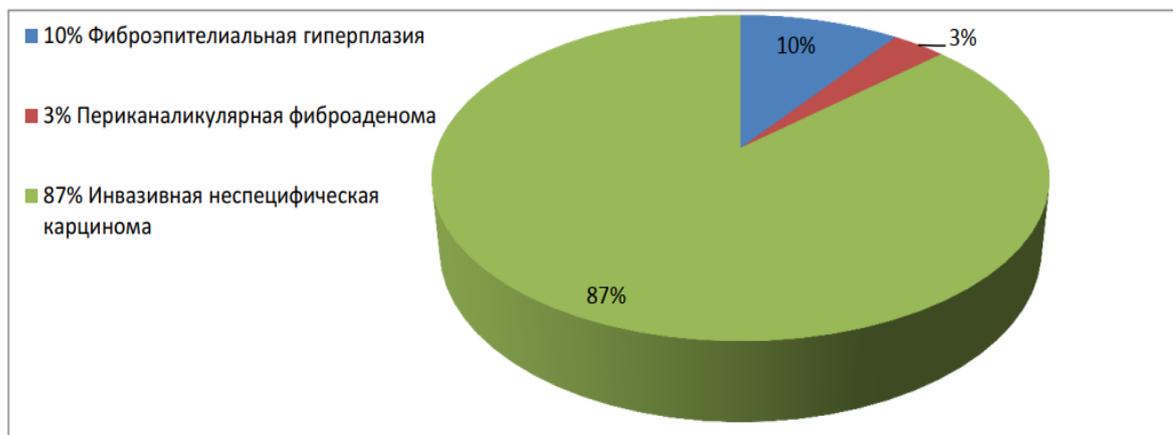


Рисунок 50 – Распределение различных форм новообразований, диагностированных гистологически

В подавляющем большинстве случаев мы регистрировали протоковый рак тубулярную форму. Макроскопическая картина отличалась выраженным полиморфизмом. В ряде случаев определялись довольно крупные кисты с сосочковыми разрастаниями в просветах, в отдельных случаях определялся узел с четкими или с неотчетливыми границами, построенный из плотной

волокнистой ткани, местами гомогенный, местами волокнистый с кистообразованиями. В случаях расположения опухолей под кожей нередко наблюдалось изъязвление и нагноение кожного покрова. В некоторых опухолях обнаруживались вторичные изменения: гнойное расплавление в 3 случаях, некроз в 6 случаях, склероз в 2 случаях. У 3 пациентов отмечалось прорастание опухолевых клеток в просветы лимфатических сосудов, что свидетельствовало о процессе метастазирования. В случаях инкапсулированного узла возникала необходимость взятия материала с учетом наличия в одном поле зрения ткани опухоли, капсулы и окружающих тканей с целью оценки степени инвазии. Так, в 8 случаях наличия инкапсулированных узлов отмечалась инвазия в капсулу и окружающие ткани. При микроскопическом исследовании все опухоли в данной группе отнесены к протоковому раку с большей или меньшей степенью инвазии в капсулу или окружающие ткани. Обнаруживалось большое количество кистозно-расширенных протоков с наличием со стороны внутренней поверхности многочисленных ветвящихся истинных сосочков с выраженной пролиферативной активностью клеток. По гистогенезу клетки имели эпителиальную природу, характеризовались полиморфизмом, в том числе и ядерным, нарушением полярности и наличием митозов. Местами клетки формировали тяжи, пласты, и крупные поля. Стромальный компонент опухоли был представлен волокнистой тканью, выраженной в большей или меньшей степени с наличием сосудов неравномерного кровенаполнения. В случаях инвазивного рака возникали сложности в установлении принадлежности клеток (дольковый или протоковый эпителий). В этих случаях просматривалось много полей зрения. При наличии элементов измененных протоков, протоковых папиллом, нередко малигнизированных, с инвазией клеток в строму сосочков и глубже устанавливался диагноз протокового рака. В строме опухолей нередко определялись более или менее выраженные скопления зрелых лимфоидных клеток, что служило выражением

степени иммунной защиты организма при пролиферации атипичных клеток (Вакуленко М.Ю., 2018, 2019; Vakulenko M. Y., 2019; Ханхасыков С.П., 2013).

В проведенном исследовании наблюдалась чёткая зависимость злокачественности опухоли от возраста животного. Случаи фиброэпителиальной гиперплазии наблюдались у животных не старше 2 лет, средний возраст животных с протоковым раком составил 12,9 лет (рисунок 51).

Таким образом, в группу риска можно отнести кошек в возрасте от 8 лет, средний возраст животных, в котором у них развивается рак молочной железы находится в диапазоне 9-15 лет. Самое большое количество животных с диагнозом рака молочной наблюдалось в возрастной группе 10, 13 и 15 лет. Динамика распределения количества животных с первичным диагнозом РМЖ в зависимости от возраста представлены в таблице 10.

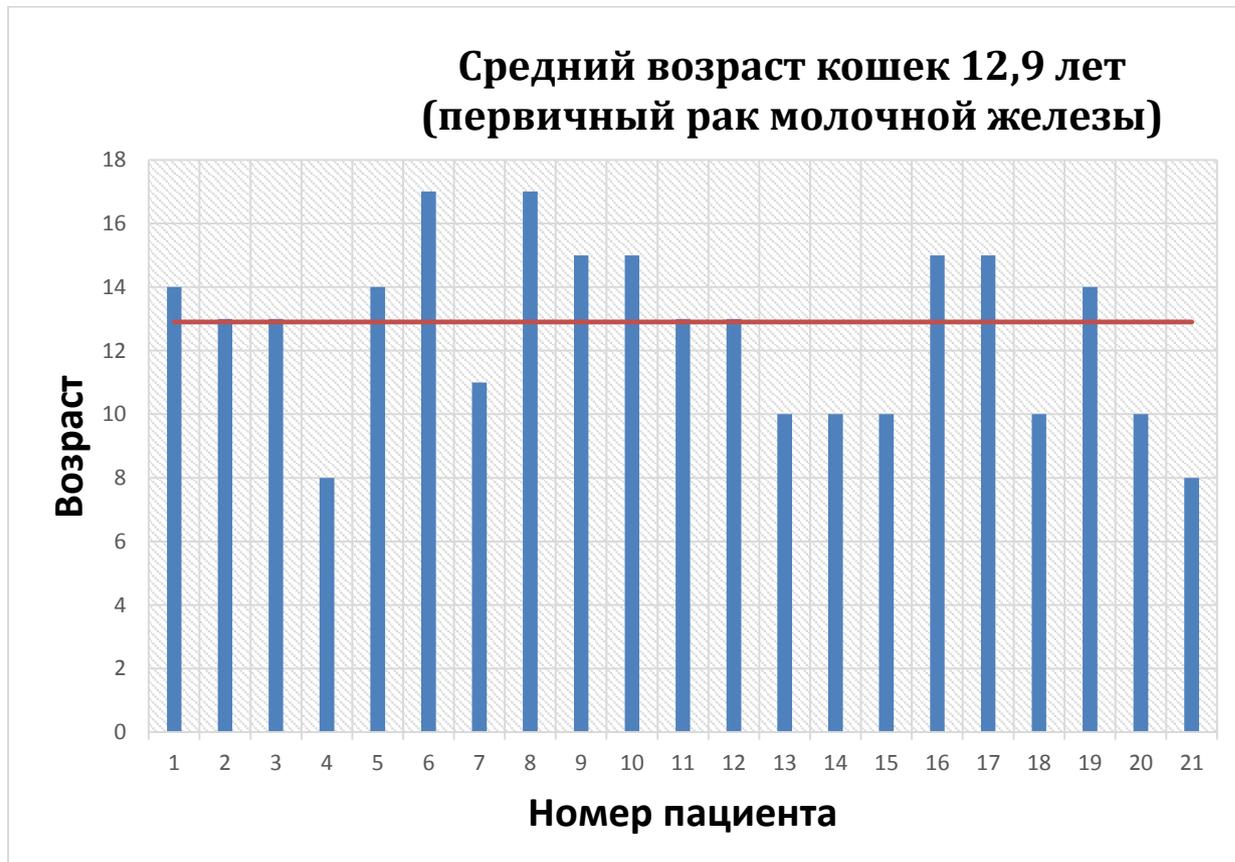


Рисунок 51 – Средний возраст животных с протоковым раком

Таблица 10 - Динамика распределения количества животных с первичным диагнозом РМЖ в зависимости от возраста

| Возраст, лет | Количество животных с первичным диагнозом РМЖ |
|--------------|---|
| 1 | 0 |
| 2 | 0 |
| 3 | 0 |
| 4 | 0 |
| 5 | 0 |
| 6 | 0 |
| 7 | 0 |
| 8 | 3 |
| 9 | 0 |
| 10 | 6 |
| 11 | 1 |
| 12 | 0 |
| 13 | 4 |
| 14 | 3 |
| 15 | 4 |
| 16 | 0 |
| 17 | 3 |
| 18 | 0 |
| 19 | 2 |

90% животных в исследуемой группе были не стерилизованы, у 3 животных стерилизация была проведена во взрослом возрасте за несколько лет до развития опухоли. У 80% процентов животных в анамнезе, хозяева указывали применение гормональных препаратов в виде капель или уколов пролигеснона и т.д. (рисунки 52-53).



Рисунок 52 – Количество нестерилизованных животных среди кошек с РМЖ

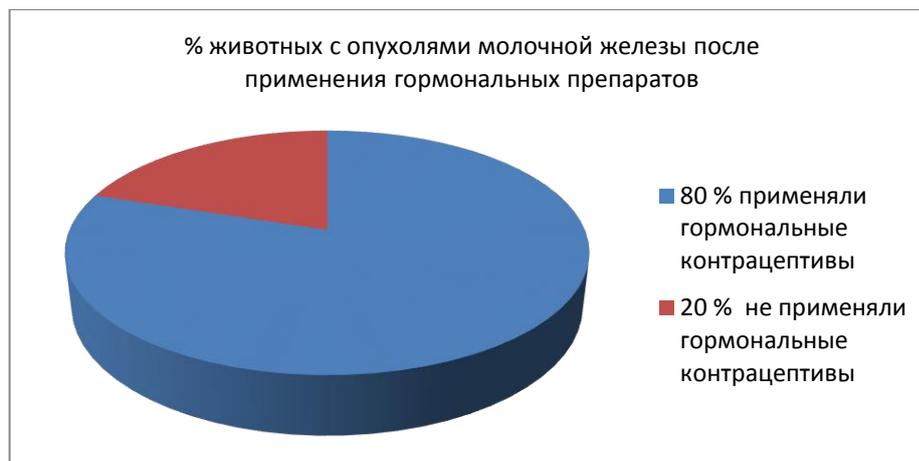


Рисунок 53 – Количество животных, принимавших гормональные контрацептивы среди кошек с РМЖ

Многие владельцы избегают стерилизации кошек. Некоторым кошкам владельцы самостоятельно применяют контрацептивы, причем абсолютно бессознательно, и в неограниченных количествах. Так, по данным наших исследований 24 кошкам применялись те или иные гормональные препараты, подавляющие половую охоту. При этом лишь 3 животным проводили контрацепцию в клинических условиях под наблюдением ветеринарного врача. А остальным владельцы сами назначали гормональные препараты в домашних условиях. На основании наших данных, беря во внимание вышеуказанные результаты исследования, можно сделать вывод, что заболеваемость кошек онкологическими заболеваниями молочной железы зависит от фона половых гормонов. Заметим, что дисгормональные расстройства чаще всего приводят к раку молочной железы.

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

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

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

2.2.2 Уровень экспрессии гена АДА

Нами были разработаны ДНК-праймеры на ген *АДА* кодирующий фермент аденозиндезаминазу. Смоделированные мРНК специфичные ДНК-праймеры были опробованы в трех различных концентрациях в режиме real-time PCR (125, 250 и 500 Нм) прямого и обратного праймеров. Все образцы содержали конечную концентрацию ДНК 0,2 НГ/мкл. Анализ кривой плавления проводили при температуре от 60°C до 99°C. Реакции ПЦР были линейными в диапазоне восьми \log_{10} синтетического шаблона, и давали один пик в анализе кривой плавления. Амплификация мРНК, выделенной из биологических образцов, дала такие же кривые амплификации, что и для синтетических шаблонов. Анализ кривой плавления показал наличие только одного ампликона. Кроме того, при использовании биологических образцов наблюдалась хорошая корреляция между C_t и концентрацией шаблона в четырех разведениях, что подтвердило высокую специфичность и

чувствительность разработанных праймеров. При выборе референсных генов, ген *B2M* показал высокую экспрессию во всех образцах тканей и имел низкий коэффициент вариации в отличие от гена *GAPDH*. Кроме того, по данным литературы (Penning L.C., 2007), обычно при изучении экспрессии генов, связанных с развитием рака молочной железы, в качестве референсного используют ген *B2M*. Поэтому экспрессию генов *АДА* рассчитывали по отношению к экспрессии гена *B2M*. Уровень экспрессии гена *АДА* значительно увеличивался в тканях новообразований молочной железы по сравнению со здоровой молочной железой. Результаты исследования представлены в таблицах 11, 12.

Таблица 11 – Показатели ΔC_t для гена *АДА* в группах животных с новообразованиями и в контрольной группе

| Исследуемые группы АДА | Контрольная группа n =10 | Инвазивная неспецифическая карцинома n =26 | Фиброэпителиальная гиперплазия и фиброаденома |
|--------------------------|--------------------------|--|---|
| ΔC_t (M \pm m) | 0,4 \pm 0,07 | 5,57 \pm 0,31 | 7,44 \pm 0,59 |

Таблица 12 - Показатели уровня экспрессии *АДА* в тканях опухолей по отношению к показателям в здоровых тканях молочной железы

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

По данным литературы, аденозиндезаминаза осуществляет гидролитическое дезаминирование аденозина до инозина, и в быстро

пролиферирующих тканях, например, в лимфоцитах и в клетках кишечника, активность данного фермента обычно изменяется (Vu Hong-Diep, 2017; Abbed K.M., 2018). Перерождение здоровых клеток молочной железы в опухолевые всегда сопровождается неконтролируемым ростом ткани, соответственно экспрессия гена *АДА* должна изменяться. Для подтверждения правильности сделанных выводов было проведено попарное сравнение средних показателей ΔC_t исследуемых мРНК контрольной группы с группами инвазивной неспецифической карциномы и фиброэпителиальной гиперплазии с помощью U-критерия Манна-Уитни, данные которого также приведены в таблицах 15,16. Получены результаты, которые подтверждают, что уровень экспрессии гена *АДА* в ткани опухолей инвазивной неспецифической карциномы и в ткани фиброэпителиальной гиперплазии статистически значимо отличаются от соответствующего показателя в контрольной группе ($p < 0,001$). Уровень экспрессии гена *АДА* в тканях опухолей инвазивной неспецифической карциномы и в тканях фиброэпителиальной гиперплазии резко повышается по сравнению с тканью здоровой молочной железы (в 36 раз в тканях инвазивных карцином и в 131 раз в тканях фиброэпителиальных гиперплазий). Результаты проведённого исследования подтверждают участие гена *АДА* в патогенезе онкологических заболеваний. Учитывая вышесказанное, выявление изменения количества определённых мРНК может быть использовано для понимания как патофизиологических основ канцерогенеза, так и для поиска молекулярно-генетических подходов к его ранней диагностике (Вакуленко М.Ю., 2019). Учитывая увеличение экспрессии гена, кодирующего фермент аденозиндезаминазу, мы ожидали увидеть увеличение активности данного фермента в периферической крови животных с РМЖ.

2.2.3 Определение активности аденозин дезаминазы

На графике хорошо прослеживается снижение концентрации аденозина в растворе, связанное с образованием фермент субстратного комплекса

(рисунок 54). Продуктом реакции фермента аденозиндезаминазы является инозин, длина волны которого совпадает с аденозином, и мы видим на графике, что концентрация вещества с длиной волны в диапазоне 280 Нм практически возвращается к первоначальному уровню. Поэтому количество фермента аденазиндезаминазы в плазме крови мы определяли, не по изменению концентрации Аденозина, а по скорости образования субстрат ферментного комплекса.

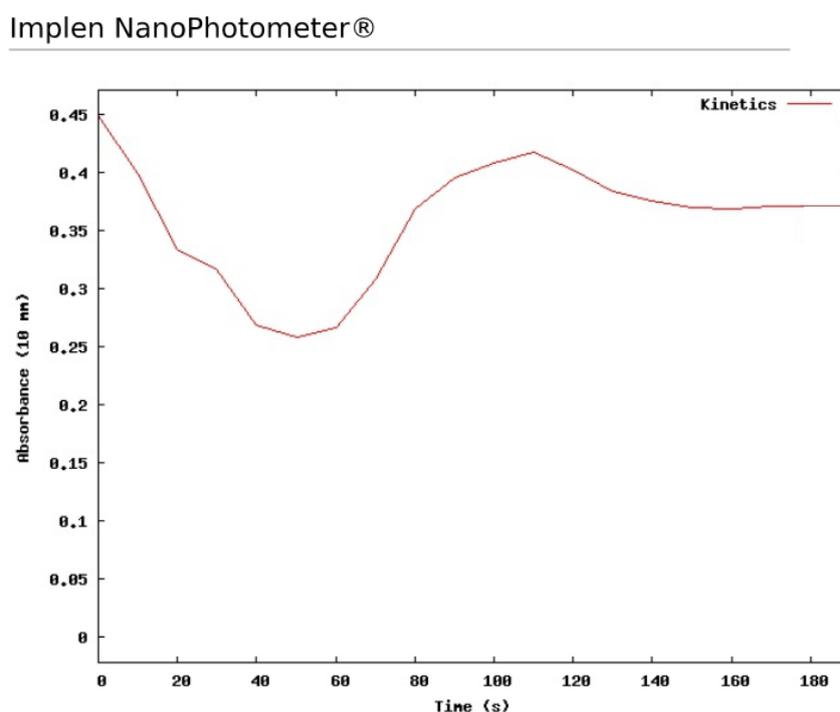


Рисунок 54 - Измерение активности АДА

Согласно полученным результатам между активностью АДА в плазме крови здоровых животных и в плазме крови животных со злокачественными новообразованиями молочной железы достоверных отличий не наблюдалось (таблица 13).

Таблица 13 - Активность АДА в плазме крови здоровых кошек и кошек с новообразованиями ($M \pm m$, в нмоль / сек/ мл плазмы крови)

| Группы | Активность фермента АДА |
|--------------------------|---------------------------|
| Контроль n=10 | 67±5 |
| Все новообразования n=30 | 54±15 (t=1,00, p = 0,212) |

| | |
|--|-----------------------------|
| Фиброэпителиальная гиперплазия и фиброаденома n=4 | 45±2 (t = 5,00, p = 0,007) |
| Высокодифференцированная инвазивная неспецифическая карцинома n=10 | 50±10 (t =1,271, p = 0,261) |
| Умеренно дифференцированная инвазивная неспецифическая карцинома n=9 | 47±2 (t =1,33, p = 0,22) |
| Низкодифференцированная инвазивная неспецифическая карцинома n=7 | 68±2 (t =0,278, p = 0,79) |

В зависимости от степени дифференциации опухоли достоверных различий активности фермента также не обнаружено. По всей видимости, этот факт связан с тем, что обследованные животные были прооперированы на 1-2 стадии рака молочной железы и патологические процессы были недостаточно существенными, чтобы повлиять на метаболизм организма в целом. Другим возможным объяснением отсутствия увеличения активности АДА в крови больных животных, может являться тот факт, что, в основном АДА в крови содержится в лимфоцитах. При иммунодефицитных состояниях обычно наблюдается недостаточность АДА, следовательно, падение выработки АДА лимфоцитами может компенсировать рост активности АДА синтезируемой тканью опухоли (Вакуленко М.Ю., 2019; Vakulenko M. Y. 2019).

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

2.2.4 Содержание полиаминов в крови кошек с новообразованиями молочной железы

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

При доброкачественных и опухолеподобных новообразованиях молочной железы содержание путресцина в крови кошек статистически значимо увеличивалось в 5 раз ($p < 0,0001$) по сравнению с показателями контрольной группы. При злокачественных новообразованиях молочной железы (инвазивной неспецифической карциноме) содержание путресцина и спермина в крови значительно превышало контрольные значения в 6 ($p < 0,0001$) и в 10 раз ($p < 0,02$), соответственно. При этом содержание спермидина в крови кошек, наоборот, снижалось в 8 раз ($p < 0,02$) по сравнению с контролем. Снижение содержания спермидина, по-видимому, связано с образованием различных ацетильных производных (Вакуленко М.Ю., 2019; Акинина Н.И., 2019; Vakulenko M. Y. 2019) (таблица 14).

Таблица 14 - Содержание полиаминов в крови кошек с новообразования молочной железы ($M \pm m$, в мкг/ мл крови)

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

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

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

2.2.5 Сопоставление экспрессии гена АДА с основными клинико-морфологическими параметрами

В заключение объединили все параметрические значения с клинико-морфологическими параметрами и провели корреляционный анализ всех признаков. Перед проведением корреляционного анализа полученных показателей была проведена проверка нормальности выборки для соответствующего выбора метода статистической обработки. Нормальность выборки была оценена с помощью критериев Шапиро-Уилка, Андерсона-Дарлинга и Лиллифорса. (таблица 15).

Таблица 15 – Определение нормальности выборки

| Критерий | Δ Сt (АДА- В2М) | АДА в плазме | Спермин | Спермидин | Путресцин |
|--------------------|------------------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|
| N | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Shapiro-Wilk W | 0.7168 | 0.8669 | 0.8003 | 0.7099 | 0.7888 |
| P | 1.857E-07 | 0.0002373 | 6.862E-06 | 1.423E-07 | 3.981E-06 |
| Anderson-Darling A | 5.726 | 1.908 | 3.467 | 5.398 | 3.535 |
| P | 2.266E-14 | 5.826E-05 | 7.84E-09 | 1.426E-13 | 5.327E-09 |
| Lilliefors L | 0.366 | 0.187 | 0.239 | 0.3896 | 0.2396 |
| P | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |

По всем критериям выборка отличалась от нормального распределения ($p < 0,05$). Далее была оценена нормальность группы с неспецифической инвазивной карциномой (таблица 16)

Таблица 16 – Определение нормальности группы с неспецифической инвазивной карциномой

| | Экспрессия АДА | АДА в плазме | Спермин | Спермидин | Путресцин |
|----------------|-------------------|-----------------|---------|-----------|-----------|
| N | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| Shapiro-Wilk W | 0,9483 | 0,8603 | 0,936 | 0,931 | 0,9584 |
| P | 0,2119 | 0,00227 | 0,1077 | 0,08174 | 0,3609 |

| | | | | | |
|--------------------|---------|----------|--------|---------|--------|
| Anderson-Darling A | 0,3273 | 1,322 | 0,5934 | 0,576 | 0,2618 |
| P | 0,5039 | 0,001562 | 0,1112 | 0,1207 | 0,6771 |
| Lilliefors L | 0,08919 | 0,1944 | 0,1433 | 0,157 | 0,1074 |
| P | 0,8576 | 0,01271 | 0,178 | 0,09557 | 0,607 |

За исключением показателей АДА, в плазме все переменные имели нормальное распределение ($p > 0,05$). В контрольной группе все переменные, за исключением путресцина, имели нормальное распределение ($p > 0,05$) (таблица 17).

Таблица 17 – Определение нормальности контрольной группы

| | Экспрессия АДА | АДА в плазме | Спермин | Спермидин | Путресцин |
|--------------------|----------------|--------------|---------|-----------|-----------|
| N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Shapiro-Wilk W | 0,9245 | 0,8644 | 0,931 | 0,8932 | 1 |
| P | 0,3958 | 0,08601 | 0,4581 | 0,184 | 1 |
| Anderson-Darling A | 0,3028 | 0,5558 | 0,3242 | 0,4668 | 9,518 |
| P | 0,5109 | 0,1129 | 0,4585 | 0,1947 | 3,493E-25 |
| Lilliefors L | 0,1813 | 0,2351 | 0,1617 | 0,2056 | 0,8286 |
| P | 0,4554 | 0,1167 | 0,641 | 0,2648 | 0,0001 |

Для межгруппового сравнения мы использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили в программе статистической обработки Past 4.2.

Поскольку в наших данных мы имели дело с ненормальным распределением, мы использовать ранговые корреляции Спирмена. Для оценки величина коэффициента корреляции использовали шкалу Чеддока (таблица 18)

Таблица 18 - Шкала Чеддока

| | |
|-------------------------|---------------|
| Значение КК (по модулю) | Теснота связи |
| от 0 до 0,3 | слабая |
| от 0,3 до 0,5 | умеренная |
| от 0,5 до 0,7 | заметная |
| от 0,7 до 0,9 | сильная |
| от 0,9 до 1 | очень сильная |

Ниже приведены результаты корреляционного анализа по методу Спирмена для всей выборки и для отдельных групп. Коэффициенты корреляции Спирмена (r_s) приведены в ячейках ниже главной диагонали корреляционной матрицы. Уровни значимости (p) коэффициента корреляции Спирмена приведены в ячейках выше главной диагонали корреляционной матрицы (таблицы 19-21, рисунки 55-57).

Таблица 19 – Корреляционный анализ всей выборки

| | Экспрессия АДА | АДА в плазме | Спермин | Спермидин | Путресцин | Размер опухоли | Возраст |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Экспрессия АДА | | 0,001746 | 0,01528 | 0,00031131 | 0,0063 | 7,5171E-06 | 0,068576 |
| АДА в плазме | -0,48515 | | 0,058937 | 0,1685 | 0,0080783 | 0,0091298 | 0,00044628 |
| Спермин | 0,3858 | -0,3051 | | 0,0011962 | 3,886E-07 | 0,00056957 | 7,367E-08 |
| Спермидин | -0,5473 | 0,22498 | -0,49982 | | 0,00015064 | 0,0039909 | 0,00045894 |
| Путресцин | 0,42994 | -0,41812 | 0,71121 | -0,57026 | | 4,7915E-10 | 4,126E-05 |
| Размер Опухоли | 0,65003 | -0,41215 | 0,52685 | -0,45063 | 0,80854 | | 0,051782 |

| | | | | | | | |
|---------|--------|----------|---------|----------|---------|---------|--|
| Возраст | 0,2947 | -0,53526 | 0,73988 | -0,53431 | 0,60739 | 0,31373 | |
|---------|--------|----------|---------|----------|---------|---------|--|

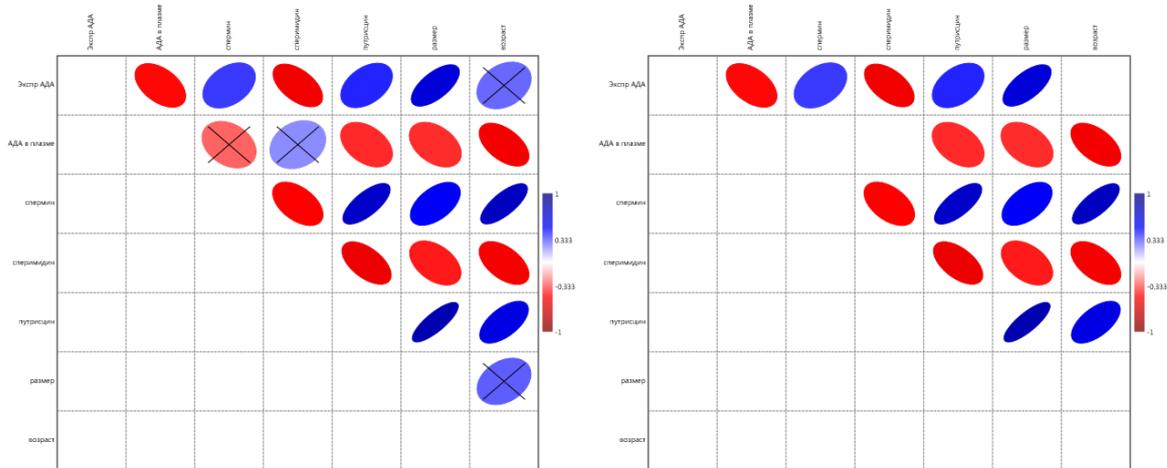


Рисунок 55 - Корреляционный анализ всей выборки

(Графическое отображение коэффициентов корреляции. Теснота взаимосвязи показана насыщенностью цвета и формой эллипса, чем уже эллипс, тем теснее взаимосвязь. Наклон большей оси эллипса соответствует знаку коэффициента корреляции. Синим цветом показана прямая зависимость, красным обратная. Ячейки с незначимыми коэффициентами корреляции ($p > 0,05$) перечеркнуты. Во втором варианте рисунка показаны только значимые коэффициенты корреляции)

В результате анализа взаимосвязи признаков были установлены следующие закономерности (значимые на уровне $p < 0,05$ взаимосвязи):

- умеренная обратная взаимосвязь между экспрессией *АДА* и *АДА* в плазме ($r_s = -0,49$);
- умеренная прямая взаимосвязь между экспрессией *АДА* и спермином ($r_s = 0,39$);
- заметная обратная взаимосвязь между экспрессией *АДА* и спермидином ($r_s = -0,55$);
- умеренная прямая взаимосвязь между экспрессией *АДА* и путресцином ($r_s = -0,49$);
- заметная прямая взаимосвязь между экспрессией *АДА* и размером опухоли ($r_s = 0,65$);
- умеренная обратная взаимосвязь между *АДА* в плазме и путресцином ($r_s = -0,42$);
- умеренная обратная взаимосвязь между *АДА* в плазме и размером опухоли ($r_s = -0,41$);
- заметная обратная взаимосвязь между *АДА* в плазме и возрастом ($r_s = -0,54$);
- заметная обратная взаимосвязь между спермином и спермидином ($r_s = -0,50$);

- **сильная прямая взаимосвязь между спермином и путресцином ($r_s=0,71$);**
- заметная прямая взаимосвязь между спермином и размером опухоли ($r_s=0,53$);
- **сильная прямая взаимосвязь между спермином и возрастом ($r_s=0,74$);**
- заметная обратная взаимосвязь между спермидином и путресцином ($r_s=-0,57$);
- умеренная обратная взаимосвязь между спермидином и размером опухоли ($r_s=-0,45$);
- заметная обратная взаимосвязь между спермидином и возрастом ($r_s=-0,53$);
- **сильная прямая взаимосвязь между путресцином и размером опухоли ($r_s=0,81$);**
- заметная прямая взаимосвязь между путресцином и возрастом ($r_s=0,61$).

Таблица 20 – Корреляционный анализ группы с инвазивной неспецифической карциномой

| | Экспрессия АДА | АДА в плазме | Спермин | Спермидин | Путресцин | Размер | Возраст |
|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| Экспрессия АДА | | 0,48088 | 0,51695 | 0,078038 | 0,23337 | 0,50907 | 0,89417 |
| АДА в плазме | -0,14462 | | 0,59914 | 0,70285 | 0,22739 | 0,84498 | 0,00017201 |
| Спермин | -0,13307 | -0,1081 | | 0,00052047 | 0,26122 | 0,50654 | 0,082786 |
| Спермидин | -0,35175 | -0,078563 | 0,63292 | | 0,30265 | 0,32526 | 0,16905 |
| Путресцин | -0,24213 | -0,24516 | 0,22865 | 0,21022 | | 3,2313E-06 | 0,50704 |
| Размер | -0,13556 | -0,040314 | 0,13636 | 0,20082 | 0,77571 | | 0,47978 |
| Возраст | -0,027433 | 0,67164 | 0,34662 | 0,27803 | 0,1362 | -0,14498 | |

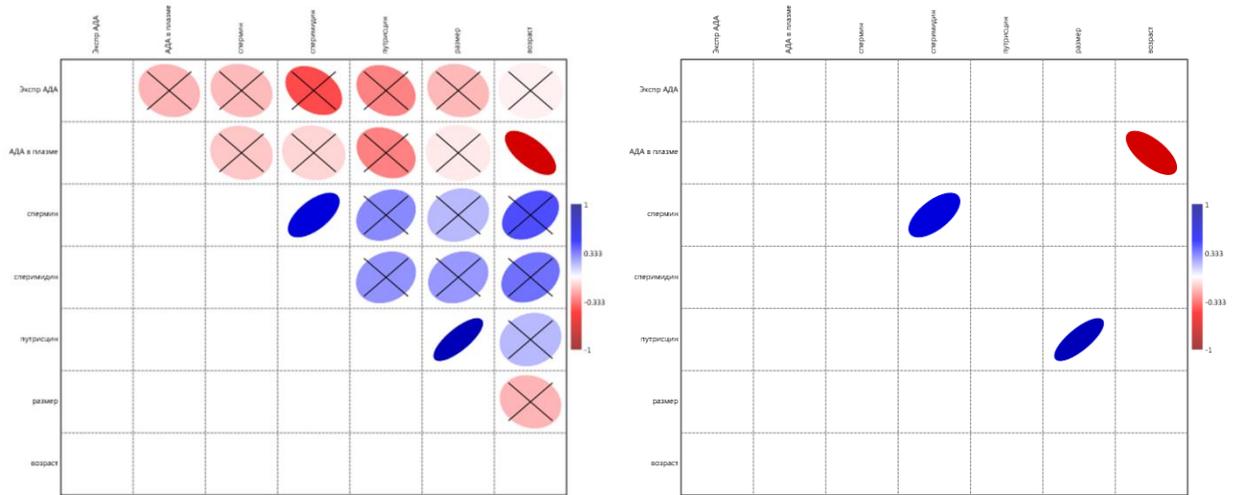


Рисунок 56 - Корреляционный анализ группы с инвазивной неспецифической карциномой (Графическое отображение коэффициентов корреляции. Теснота взаимосвязи показана насыщенностью цвета и формой эллипса, чем уже эллипс, тем теснее взаимосвязь. Наклон большой оси эллипса соответствует знаку коэффициента корреляции. Синим цветом показана прямая зависимость, красным обратная. Ячейки с незначимыми коэффициентами корреляции ($p > 0,05$) перечеркнуты. Во втором варианте рисунка показаны только значимые коэффициенты корреляции)

В результате анализа взаимосвязи признаков установлены следующие закономерности (значимые на уровне $p < 0,05$ взаимосвязи):

- заметная обратная взаимосвязь между АДА в плазме и возрастом ($r_s = -0.67$);
- заметная прямая взаимосвязь между спермином и спермидином ($r_s = 0.63$);
- **сильная прямая взаимосвязь между путресцином и размером опухолей ($r_s = 0.78$).**

Таблица 21 – Корреляционный анализ в контрольной группе

| | Экспрессия АДА | АДА в плазме | Спермин | Спермидин | Путресцин | Размер опухоли | Возраст |
|----------------|-----------------|-----------------|---------|-----------------|-----------|----------------|------------------|
| Экспрессия АДА | | 0,015878 | 0,8601 | 0,040874 | 0 | 0 | 0,0091409 |
| АДА в плазме | -0,73298 | | 0,72673 | 0,1468 | 0 | 0 | 0,0013523 |
| Спермин | 0,06422 | 0,12695 | | 0,63826 | 0 | 0 | 0,69467 |

| | | | | | | | |
|----------------|----------------|-----------------|----------|----------------|---|---|-----------------|
| Спермидин | 0,65245 | -0,49391 | -0,17021 | | 0 | 0 | 0,019819 |
| Путресцин | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| Размер опухоли | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 |
| Возраст | 0,77025 | -0,86164 | -0,14243 | 0,71617 | 0 | 0 | |

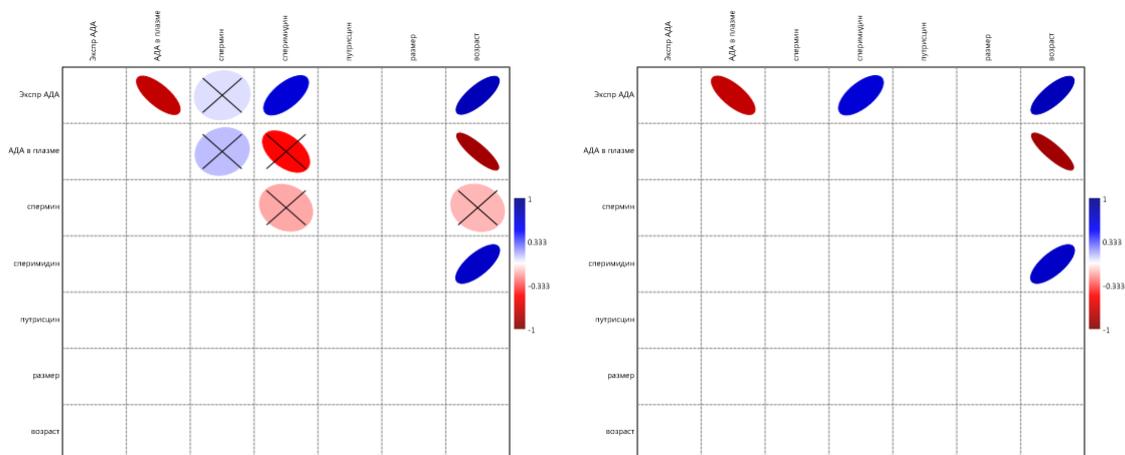


Рисунок 57 - Корреляционный анализ в контрольной группе

(Графическое отображение коэффициентов корреляции. Теснота взаимосвязи показана насыщенностью цвета и формой эллипса, чем уже эллипс, тем теснее взаимосвязь. Наклон большой оси эллипса соответствует знаку коэффициента корреляции. Синим цветом показана прямая зависимость, красным обратная. Ячейки с незначимыми коэффициентами корреляции ($p > 0,05$) перечеркнуты. Во втором варианте рисунка показаны только значимые коэффициенты корреляции)

В результате анализа взаимосвязи признаков были установлены следующие закономерности (значимые на уровне $p < 0,05$ взаимосвязи):

- **сильная обратная взаимосвязь между экспрессией АДА и АДА в плазме ($r_s = -0,73$);**
- умеренная прямая взаимосвязь между экспрессией АДА и спермидином ($r_s = 0,65$);
- умеренная прямая взаимосвязь между экспрессией АДА и возрастом ($r_s = 0,65$);

- **сильная обратная взаимосвязь между АДА в плазме и возрастом (rs=-0,77);**
- **сильная прямая взаимосвязь между спермидином и возрастом (rs=0,72);**

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

соответственно размер опухоли по отношению ко всему организму был относительно несущественен.

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

Важно отметить, что установлена сильная прямая взаимосвязь между содержанием путресцина в эритроцитах и размером опухолей ($r_s = 0,78$). Полиамины (путресцин, спермидин и спермин) имеют важное значение для роста эукариотических клеток, так как эти молекулы участвуют во многих ключевых процессах, в том числе генной транскрипции, регуляции функции белка и стабильности клеточной мембраны (Igarashi K. et al 2018). Высокий уровень полиаминов способствует пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток (Bachrach U., 2004). При злокачественных новообразованиях молочной железы (инвазивной неспецифической карциноме) содержание путресцина и спермина в крови значительно превышало контрольные значения в 6 ($p < 0,0001$) и в 10 раз ($p < 0,02$) соответственно. Тот факт, что уровень спермина в эритроцитах не коррелировал с размером опухоли, указывает на начальные этапы развития онкологического процесса. Сильная прямая взаимосвязь между спермидином и возрастом животных ($r_s = 0,72$) может быть объяснена тем фактом, что спермидин является индуктором аутофагии, и снижение его содержания при старении может способствовать накоплению дефектных молекул и развитию онкологического процесса (Zhang H, 2020).

Так как при использовании метода главных компонент ни один из параметров не показал однозначных результатов, нами были просчитаны индексы-онкомаркеры (рисунки 58-60).



Рисунок 58 – отношение активности АДА в плазме крови к содержанию спермина (1-4– доброкачественные, 5-30– злокачественные, 31-40– контроль)



Рисунок 59 – отношение активности АДА в плазме крови к содержанию спермина (1-4– доброкачественные, 5-30– злокачественные, 31-40– контроль)



Рисунок 60– отношение содержания спермина к путресцину

(1-4– доброкачественные, 5-30– злокачественные, 31-40– контроль)

Индекс отношения активности АДА в плазме крови к содержанию спермина в крови животных показал себя как наиболее чувствительный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

Далее был проведен корреляционный анализ данных показателей и клинико-морфологических параметров (размер опухоли, возраст животного) и выявлены следующие закономерности: выявлена сильная прямая взаимосвязь между спермином и путресцином и прямая взаимосвязь между спермином и возрастом. В группе с РМЖ наблюдалась прямая взаимосвязь

между путресцином и размером опухоли. В группе контрольных животных была выявлена сильная обратная взаимосвязь между экспрессией АДА и активностью АДА в плазме, обратная взаимосвязь между АДА в плазме и возрастом животного, прямая взаимосвязь между спермидином и возрастом кошек. Так же был разработан индекс-онкомаркер, представляющий собой отношение уровня активности АДА к содержанию спермина в крови; по этому индексу можно разделять между собой группы с фиброэпителиальной гиперплазией, инвазивной неспецифической карциномой и здоровых животных. Таким образом, данный индекс-онкомаркер, может быть, внедрен в реальную клиническую ветеринарную практику для постановки дифференциальных диагнозов рака молочной железы и мониторинга рецидивов данного заболевания.

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

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

ВЫВОДЫ

1. Встречаемость новообразований молочной железы у кошек Ростовской области составляет 400 особей на каждые 100 000 кошек. На 2018 год 0.44% популяции кошек Ростовской области имели новообразования молочной железы, из них злокачественные новообразования составили 87%.
2. Уровень экспрессии гена АДА в тканях злокачественных и доброкачественных опухолей статистически значимо выше, чем в тканях здоровой молочной железы (в 36 раз в тканях инвазивных карцином и в 131 раз в тканях фиброэпителиальных гиперплазий). Уровень активности аденозиндезаминазы в крови при этом не меняется. Активность АДА в группе здоровых животных составляет 67 ± 5 нмоль / сек/ мл плазмы крови, в группе животных больных раком молочной железы 54 ± 15 нмоль / сек/ мл плазмы крови.
3. В крови кошек, больных раком молочной железы достоверно увеличивается уровень полиаминов. Содержание полиаминов в крови здоровых животных составляет: путресцина $0,04 \pm 0,01$ мкг/мл, спермидина $5,94 \pm 1,13$ мкг/мл, спермина $1,63 \pm 0,30$ мкг/мл. Содержание полиаминов в крови животных больных раком молочной железы составляет: путресцина $2,45 \pm 0,67$ мкг/мл, спермидина $0,76 \pm 0,14$ мкг/мл, спермина $15,56 \pm 3,76$ мкг/мл.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Данные о частоте встречаемости новообразований молочной железы у кошек в Ростовской области могут быть использованы при планировании ветеринарных санитарно-эпидемиологических мероприятий в Ростове-на-Дону и области.
2. Методики определения предикторов РМЖ могут быть использованы для диагностики и мониторинга лечения инвазивной неспецифической карциномы молочной железы у кошек в рутинной клинической диагностике в условиях ветеринарной клиники и в научно-исследовательской работе.
3. Всем кошкам после 10 лет рекомендовано проходить скрининговое обследование по поводу новообразований молочной железы.
4. При назначении противоопухолевой терапии (химиотерапии, гормонотерапии, хирургическом удалении опухоли) рекомендовано проводить биопсию опухолевой ткани с дальнейшим гистологическим исследованием для дифференцирования опухоли. В случаях проведения оперативного вмешательства на пораженной молочной железе следует учитывать микроскопический характер роста.
5. Рекомендовано разъяснять владельцам кошек о преимуществах ранней стерилизации кошек, до наступления полной половозрелости, которые ведет к снижению риска развития рака молочной железы.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ:

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

- изучение патофизиологических основ канцерогенеза при возникновении рака молочной железы у кошек;
- изучение встречаемости новообразований молочной железы у кошек на территории г. Ростова-на-Дону и близлежащих поселений;

- разработка молекулярно-генетических методов ранней диагностики рака молочной железы у млекопитающих.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность сотрудникам кафедры генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ – научному руководителю профессору, д.б.н. Татьяне Павловне Шкурат. Декану факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» ДГТУ д.б.н. профессору Ермакову Алексею Михайловичу за конструктивные советы и помощь в написании настоящей работы; доценту кафедры биологии и общей патологии ДГТУ к.м.н. Пасечнику Дмитрию Геннадьевичу за помощь в постановке патологоанатомических диагнозов новообразований и доценту кафедры биологии и общей патологии ДГТУ к.б.н. Бутенко Елене Викторовне.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НО – новообразование

РМЖ- рак молочной железы

ФАСТ- Functional Assessment of Cancer Therapy. (Функциональная оценка терапии рака)

АДА- аденозиндезминаза.

ПА-полиамин

кДНК – кодирующая ДНК

Q-PCR - Quantitative Polymerase Chain Reaction (количественная полимеразная цепная реакция)

PCR - Polymerase Chain Reaction (полимеразная цепная реакция)

ER - Estrogen receptor (эстрогеновый рецептор)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Акинина, Н.И. Содержание ацетильных производных полиаминов в крови кошек при злокачественных новообразованиях молочной железы / Н.И. Акинина, М. Ю. Вакуленко, Н.М. Добаева // Acta Naturae. – 2019. – т.26. – С. 219-220.
2. Барсукова, М.А. Изоферментный профиль аденозиндезаминазы в аденокарциноме молочной железы / М.А. Барсукова, Л.С. Хомутов, Е. Д. Дмитриев, И.И. Якубенко, Е.В.Зинкович // Новообразование (Neoplasm). – 2017. – Т. 9, №2(17). – С.186-189.
3. Березов, Т. Т. Полиамины: их роль в норме и при патологии центральной нервной системы / Т. Т. Березов, М.Г. Маклецова, Т.Н. Федорова // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2012. – Т. 6, № 2. – С.38-42.
4. Березин, И.В. Практический курс химической и ферментативной кинетики / И.В.Березин, А.А. Клёсов // Москва. – 1976. – С.325.
5. Вакуленко, М. Ю. Перспективы использования онкомаркеров в ветеринарной онкологии / М.Ю. Вакуленко // Ветеринарная патология. – 2016. –№4 (58). – С.23-29.
6. Вакуленко, М. Ю. Сравнение онкомаркеров человека с онкомаркерами собак и кошек / М.Ю. Вакуленко, Н.И. Акинина // Материалы внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Молекулярная биология, химия и медицина». – 2017. - изд-во РостГМУ Ростов-на-Дону, - С.15-17.
7. Вакуленко, М. Ю. Патоморфологические формы рака молочной железы у кошек / М.Ю. Вакуленко, В.Ф. Пономарева, А.А. Сергеева // Материалы II внутривузовской межкафедральной научно-практической конференции

- студентов и молодых учёных «Молекулярная биология, химия и медицина». - 2018. - Ростов н/Д изд-во РостГМУ. - С. 22-24.
8. Вакуленко, М. Ю. Рак молочной железы у кошек как модель для изучения рака груди у женщин / М.Ю. Вакуленко, В.Ф. Пономарева, А.А. Сергеева М.А. Кулишова // Сборник материалов 72-й Итоговой научной конференции студентов Ростовского государственного медицинского университета. – 2018. - Ростов н/Д, изд-во РостГМУ. - С.13-14.
 9. Вакуленко, М. Ю. Морфологические формы рака молочной железы у кошек / М.Ю. Вакуленко, В.Ф. Пономарева, А.А. Сергеева М.А. Кулишова // Материалы V межвузовской научно-практической конференции студентов и молодых ученых. «Молодёжь здоровью молодежи». – 2018. - РостГМУ Ростов-на-Дону 26 мая 2018. - С. 4-6.
 10. Вакуленко, М. Ю. Плоскоклеточный рак кожи у домашних животных / М.Ю. Вакуленко, В.Н. Демидов, А.В. Финаев // Материалы научно-практической межвузовской конференции студентов и молодых учёных «Кожа и ее производные». – 2018. – РостГМУ Ростов-на-Дону 28 сентября 2018. - С.8-11.
 11. Вакуленко, М. Ю. Морфологические формы рака молочной железы у кошек / М.Ю. Вакуленко, В.Ф. Пономарева, А.А. Сергеева М.А. Кулишова // Сборник материалов XVII Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении. Дни молекулярной медицины на Дону». - 2018. - С.148-149.
 12. Вакуленко, М. Ю. Оценка качества жизни домашних животных больных раком молочной железы / М.Ю. Вакуленко, Н.М. Добаева, В.В. Сухомлинов, Т.П. Шкурат, А.М. Ермаков // Ветеринария Кубани. – 2018. – №5. – С.21-25.
 13. Вакуленко, М. Ю. Опухоли молочных желёз у кошек и у женщин / М.Ю. Вакуленко, В.Н. Демидов, А.П. Ракитянска // Материалы XVI международной научно-практической конференция «Актуальные

- вопросы патологии» секция научно-исследовательская работа. – 2019. - РостГМУ Ростов-на-Дону. 25 декабря 2019. - С. 38-45.
- 14.Вакуленко, М. Ю. Сколько кошек живёт в Ростовской области / М.Ю. Вакуленко, М.А. Кулишова, А.М. Ермаков, И.В. Попов, В.Ф. Пономарева // Молодой исследователь Дона. - 2019. - №2(17). - С.81-84.
- 15.Вакуленко, М. Ю. Использование полиаминов в качестве онкомаркеров рака молочной железы у кошек / М.Ю. Вакуленко, Н.И. Акинина, В.Ф. Пономарева // Сборник материалов 73-й Итоговой научной конференции студентов Ростовского государственного медицинского университета. - 2019. - Ростов н/Д изд-во РостГМУ. - С.10-11.
- 16.Вакуленко, М. Ю. Рак молочной железы в популяции кошек ростовской области / М.Ю. Вакуленко, Н.И. В.Н. Демидов, А.П. Ракитянская, Н.М. Добаева // Результаты Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектива 2019». – 2019. - Изд-во КБГУ Нальчик. - Т.3. - С. 202-204.
- 17.Вакуленко, М. Ю. Исследование уровня экспрессии гена *ada* в опухолях молочной железы кошек / М.Ю. Вакуленко, В.Н. Демидов, Е.В. Бутенко, Н.И. Акинина, В.Ф. Пономарева // Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции». – 2019. - Изд-во ЮФУ Ростов-на-Дону. - С. 152-154.
- 18.Вакуленко, М. Ю. Изменение содержания полиаминов в крови кошек с различными типами новообразований молочной железы / М.Ю. Вакуленко, Н.М. Добаева, Н.И. Акинина, Н. Дентелла, В.Ф. Пономарева, А.М. Ермаков // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2019.- №1. - С.230-233.
- 19.Вакуленко, М. Ю. Превалентность и нозологические формы новообразований молочной железы у кошек в ростовской области / М.Ю. Вакуленко, Н.С. Карнаухова Н.М. Добаева, Н.И. Акинина, Н. Дентелла,

- В.Ф. Пономарева, И.В. Попов, А.М. Ермаков Н.С. // Ветеринарная патология. - 2019. - №2. - С.28-36.
20. Волков, С. В. Клинико-морфологические проявления опухолей и опухолеподобных состояний молочной железы у кошек в г. Перми: Дис... канд. вет. наук / С.В. Волков. – Пермь, 2009. – С.132.
21. Граффидд–Джонс, Т. Дж. Патология молочных желез. Болезни кошек / Т. Дж. Граффидд–Джонс, Э.А. Чандлер, К.ДЖ. Гаскелл и др. // – Москва: «Аквариум», 2003. – С. 258.
22. Ермилова, В. Д. Роль современной патоморфологии в характеристике рака молочной железы / В.Д. Ермилова // Практическая онкология. – 2002. – №1. – С.15-20.
23. Кудайбергенова, А. Протокол исследования инвазивного рака молочной железы / А. Кудайбергенова // Общероссийская общественная организация «Российское общество онкомаммологов», – 2016. С. 35-128.
24. Милашенко, В. А. Клинико-патогенетическое значение исследования активности аденозиндезаминазы, АМФ-дезаминазы, адениндезаминазы и изоферментов аденозиндезаминазы у больных системной красной волчанкой и системной склеродермией: Дис. кан. мед. наук 14.00.39 / В.А. Милашенко. – М.: НИИ клинической и экспериментальной ревматологии волгоградская медицинская академия, 2001. – 162 с.
25. Миронова, К.А. Нарушения гомеостаза аденозина у онкобольных / К.А. Миронова // Новообразование (Neoplasm). – 2017. – Т.16, № 1. – С.56-67.
26. Нейл, Т. Молочные железы. Опухолевые заболевания мелких домашних животных / Т. Нейл, Т. Горман // – Москва: «Аквариум», 2003. – С. 190-194.
27. Пальцева, М.А. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний / М.А.Пальцева, Д.В. Залетаева. – М.: Медицина, 2009. – 384 с.

28. Семченко, В.В. Гистологическая техника / В.В. Семченко, С.А Барашкова, С.А. Ноздрин, В.Н. Артемьев // Учебное пособие. - 2006. - 3-е изд., доп. и перераб. — Омск—Орел: Омская областная типография. - 290 с.
29. Синкина, Т.В. Современные представления о факторах риска рака молочной железы/ Т.В. Синкина, В.Д. Петрова, А.Ф. Лазарев // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т.8, №1. – С.87-92.
30. Смолякова, Р.М. Молекулярно-генетические методы исследования в онкологии / Р.М. Смолякова // Онкологический журнал. – 2011. – Т. 5, № 4. – С.37–41.
31. Сунграпова, К.Ю. Роль полиаминов как онкомаркеров в крови / К. Ю. Сунграпова, А. Хиляль, С. П. Сяткин // Специальный выпуск. Материалы 19 международного конгресса «Здоровье и образование в 21 веке». – 2017. – Том16. – С.12.
32. Суховольский О.К. Новообразования молочной железы у собак: дисс. кан. вет. наук: 16.00.05 / О.К. Суховольский. – Петербургский ветеринарный институт, 1994. –168 с.
33. Трещалина, Е.М. Результаты доклинических исследований гемцитабинсодержащей схемы предоперационной химиотерапии спонтанного рака молочной железы кошек / Е.М. Трещалина, М.Н. Якунина, М.О. Антар, Б.А. Борисова, Г.Б. Смирнова, Н.Т. Райхлин // Российский онкологический журнал. – 2015. – Е.20, №3. – С.43-48.
34. Франк, Г.А. Классификация опухолей молочной железы ВОЗ 2012 года / Г.А. Франк, Л.В. Хибхенов, С.С.Тармакова // Архив патологии. – 2013. – Т.2 – С.53-63.
35. Ханхасыков, С.П. Клинико-морфологическое проявление онкологических заболеваний мелких домашних животных / С.П. Ханхасыков // Ветеринарная медицина и морфология животных. – 2013. – № 2 (31). – С.19-24.
36. Якунина, М. Н. Клинические и морфологические аспекты течения и лекарственной чувствительности рака молочной железы мелких

- домашних животных: дисс. док. вет. наук: 06.02.01 / М.Н. Якунина. – М.: Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 2011. – 245 с.
37. Якунина, М. Н. Возможности лечения диссеминированного рака молочных желез у кошек / М.Н. Якунина // Ветеринарная медицина. – 2014. – №2. – С.28-30.
38. Якунина, М. Н. Рак молочной железы у собак и кошек / М.Н. Якунина // Vetpharma. – 2015. – №2. – С.64-70.
39. Abbed, K.M. Performance of serum adenosine deaminase in measuring disease activity in rheumatoid arthritis patients / A. Abbed, K.M. Hameed, Tamer O. El-Said, Hamdia Y. Askar, B. A. ElKady // The Egyptian Rheumatologist. – 2018. – Vol.41, Issue 2. – P.81-85.
40. Arabella, Y. Co-blockade of immune checkpoints and adenosine A2A receptor suppresses metastasis / Y. Arabella, M. Deepak, S. Kimberley // OncoImmunology. – 2014. – Nov.1. – 14 -22.
41. Bachrach, U. Polyamines and cancer: Minireview article / U. Bachrach // Amino Acids. – 2004. – N.26. – P. 307–309.
42. Baptista, C.S. Gärtner M.F. Rutteman G.R. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures / C.S. Baptista, C.S. Gärtner, M.F. Rutteman // Journal of Comparative Pathology. – 2015. – Vol. 153. – P. 266–277.
43. Brenton, J.D. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application / JD. Brenton, L.A. Carey, A.A. Ahmed // J Clin Oncol. – 2005. – V23. – P. 7350–7360.
44. Casero, R. J. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities / R.J. Casero, S.T. Murray, A.E. Pegg // Nat. Rev. Cancer. – 2018. – V18, N11. – P. 681-695.
45. Cervelli, M. Polyamines metabolism and breast cancer: state of the art and perspectives / M. Cervelli, S. Pietropaoli, F. Signore, R. Amendola, P. Mariottini // Breast Cancer Res Treat. – 2014. – Nov. 148. – P. 232-248.

46. Chang, C. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors / C.C. Chang, M.H. Tsai, J.W. Liao, J.P. Chan, M.L. Wong, S.C. Chang // *J Am Vet Med Assoc.* – 2009. – V235. – P. 391–396.
47. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Biochemistry.* -1987. – V.162(1). - P. 2687-97.
48. Colell, A. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation / A. Colell // *Cell.* – 2007. – Vol.129, N5. – P.983–97.
49. De Las Mulas, J.M. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog / J.M. De Las Mulas, Y. Millan, R. A. Dios // *Vet Pathol.* – 2005. – V42. – P. 200–212.
50. Dorn, C. R. Survey of Animal Neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer Morbidity in Dogs and Cats from Alameda County / C.R. Dorn, R. Taylor, R. Schneider, M.R. Hibbard // *Journal of the National Cancer Institute.* – 1978. – Vol. 40, Issue 2. – P. 307–318.
51. Ducros, V. Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / V. Ducros, D. Ruffieux, H. Belva-Besnet, F. De Fraipont, F. Berger, A. Favier // *Analytical Biochemistry.* – 2009. – Nov.390. – P. 41-51.
52. Farshid, K. Comparative value of clinical, cytological, and histopathological features in feline mammary gland tumors; an experimental model for the study of human breast cancer / K. Farshid, H. Ehsan // *Diagnostic Pathology.* – 2013. – N.5. – P. 59-136.
53. Ferretti, G. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend / G. Ferretti, A. Felici, P. Papaldo, A. Fabi, F. Cognetti // *Curr Opin Obstet Gynecol.* – 2007. - V19. – P 56–62.

54. Gama, A., Alves A., Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification // *Virchows Arch.* – 2008. - V 453. - P123–132.
55. Gama, A. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues / A. Gama, F. Gartner, A. Alves, F. Schmitt // *Res Vet Sci.* - 2009. - V 87. - P 432–437.
56. Garden, O.A. Companion animals in comparative oncology: One Medicine in action / O.A. Garden, S.W. Volk, N.J. Mason, J.A. Perry // *The Veterinary Journal.* –2018. – Vol.240. – P. 6-13.
57. Goldhirsch, A. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer / A. Goldhirsch, W. Wood, R. Gelber // *Ann Oncol.* – 2007. – V18. – P.1133–1144.
58. Govoni V. M. Genetic variants of BRCA1 and BRCA2 genes in cats with mammary gland carcinoma / V.M. Govoni, T.C. da Silva, J.M. Guerra, I. Veloso, A. Pereira, F, L, Queiroga, B, Cogliati // *Vet Comp Oncol.*- 2021. - Feb 12. – P. 12685.
59. Gosetti, F. Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS / F. Gosetti, E. Mazzucco, M. Gennaro, E. Marengo // *Anal Bioanal Chem.* – 2013. –V.405. – P. 907-916.
60. Gugliucci, C. Polyamines as clinical laboratory tools / C. Gugliucci // *Clinica Chimica Acta.* – 2004. – V.344. – P. 23—35.
61. Hara, M.R. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding / M.R. Hara // *Nat. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 475-96.
62. Hendrik, J. Adenosine triphosphate in advanced lung cancer: a randomized clinical trial / J. Hendrik // *Thesis Erasmus University Rotterdam.* – 2000. – Vol.1. – P. 207.
63. Hernández-Cassou, S. Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques /

- S. Hernández-Cassou, J. Saurina // *Journal of Chromatography*. – 2011. – V.879. – P. 1270–1281.
- 64.Hsu, W. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene / W.L. Hsu, L. Huang, J. Liao, M. Wong, S. Chang // *Vet J*. – 2009. – V180. – P116–123.
- 65.Huang, C. Targeting therapy for breast carcinoma by atp synthase inhibitor aurovertin / C. Huang // *J. ProteomeRes*. – 2008. – Vol.7, N4. – P.1433–44.
- 66.Ingle, J. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer / J. Ingle, R. Gelber // *Ann Oncol*. - 2009. - V20. - P1319–1329.
- 67.Igarashi, K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells / K. Igarashi, K. Kashiwagi // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2018. – Vol.107. – P. 104-115.
- 68.Kim, M. D. Neutropenia among patients with adenosine deaminase deficiency / M. Kim, A. Pham, E. Grunebaum / M.D. Kim // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2019. – Vol. 143, Issue 1. – P. 403-405.
- 69.Klopfleisch, R. The combined expression pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors / R. Klopfleisch, P. Klose, A. Gruber // *Vet Pathol*. – 2010. – V 47. – P. 446–454.
- 70.Klopfleisch, R. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles / R. Klopfleisch, D. Lenze, M. Hummel // *BMC Cancer*. – 2010. – V 10. – P. 618.
- 71.Klopfleisch, R. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors News from an Old Disease / R. Klopfleisch, H. von Euler, G. Sarli, S. Pinho, F. Gärtner, A. Gruber // *Veterinary Pathology*. – 2011. – V 48(1). – P 98-116.
- 72.Klopfleisch, R. MicroRNA expression patterns in canine mammary cancer show significant differences between metastatic and non-metastatic tumours / R. Klopfleisch, E. Hellmén, A.O. Gure, J. Mucha // *BMC Cancer*. – 2017. – N.7. – P. 728.

73. Kocbuch, K. Effect of insulin and glucose on adenosine metabolizing enzymes in human B lymphocytes / K. Kocbuch // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2009. – Vol. 56 № 3. – P. 439-446.
74. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method / K. J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – N.25. – P. 402-408.
75. MacVean, D. Frequency of canine and feline tumors in a defined population / D.W. MacVean, A.W. Monlux, J. Anderson, S. Silberg, J. Roszel // *Vet Pathol*. – 1978. – N15. – P. 700-715.
76. Marx, A. The World Health Organization Classification of Tumors / A. Marx // *J.T.O.* – 2015. – Vol. 10, Issue 10. – P.1377-1504.
77. Marconato, L. *Oncologia medica dei piccoli animali* / L. Marconato, F. Del Piero // Poletto editore. – 2005. – N.9 – P. 440-459.
78. Matos, A.J. Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours / Matos A.J., Santos A.A. // *The Veterinary Journal*. – 2015. – Vol. 205, Issue 2 – P. 136-143.
79. Melanie, M. Antagonism of adenosine A2A receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their growth / M. Melanie, V. Kimberly // *Cancer Biology & Therapy*. – 2013. – N.14. – P. 860–868.
80. Millanta, F. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues / F. Millanta F, M. Calandrella, G. Bari, M. Niccolini, I. Vannozzi, A. Poli // *Res Vet Sci*. – 2005. – V 79. – P 225–232.
81. Miller-Fleming, L. Remaining mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the in the Cell / L. Miller-Fleming, V. Olin-Sandoval, K. Campbell, M. Ralser // *Journal of Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 427, Issue 21. – P. 3389-3406.

- 82.Mohammed, A. Molecular Classification of Breast Cancer Precision Molecular Pathology of Breast / A. Mohammed, I. Aleskandarany, O. Ellis, A. Emad, A. Rakha // *Cancer*. – 2015. – Vol.10. – P. 137-155.
- 83.Muller-Haegle, S. Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression / S. Muller-Haegle, L. Muller, T. Whiteside // *Expert Rev Clin Immunol*. – 2014. – V. 10(7). – P.897-914.
- 84.Nowotarski, S.L., Woster P.M., Casero R.A.Jr. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention / S. L. Nowotarski, P. Woster, R. Casero // *Expert Rev Mol Med*. – 2013. Vol.1. – P. 15-23.
- 85.Overley-Adamson, B. Feline Mammary Carcinoma /B. Overley-Adamson, J. Baez // *August's Consultations in Feline Internal Medicine*. – 2016. – V 7. – P. 578-584.
- 86.Penning, L. C. A validation of 10 feline reference genes for gene expression measurements in snap-frozen tissues / L. Penning, H. Vrieling, B. Brinkhof // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2007.-Vol. 120.-P.212–222.
- 87.Radmehr, S. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends / S. Radmehr, J. Javad, A. Nahid, B. Alimohammad, K. Danial, S. Reyhaneh // *J. CellBiol*. – 2013. – Vol.200, N4. – P. 373–83.
- 88.Romanelli, G. *Oncologia del cane e del gatto* / G. Romanelli // Ed elsevier masson. – 2007. – N1. – P. 215-222.
- 89.Rutteman G. Hormonal background of canine and feline mammary tumours / G. Rutteman, W. Misdorp // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1993. – Vol. 47. – P. 483-487.
- 90.Santos, S. ERBB2 in Cat Mammary Neoplasias Disclosed a Positive Correlation between RNA and Protein Low Expression Levels A Model for erbB-2 Negative Human Breast cancer / S. Santos, C. Baptista, M. V. Abreu Rui, E. Bastos, I. Amorim, I. G. Gut, F. Gärtner, R. Chaves // *PLoS ONE*. – 2013. – V 8 (12). – P. 83 - 73.
- 91.Santos, S. Sequence Variants and Haplotype Analysis of Cat ERBB2 Gene A Survey on Spontaneous Cat Mammary Neoplastic and Non – Neoplastic

- Lesions. International / S. Santos, E. Bastos, C. Baptista, C. Caloustian, H. Guedes-Pinto, F. Gärtner, I.V. Gut, R. Chaves // Journal of Molecular Sciences. – 2012. – V. 13. – P. 2783-2800.
92. Sarli, G. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors / G. Sarli, R. Preziosi, C. Benazzi, P. Marcato // J Vet Diagn Invest. – 2002. – V 14. – P. 25–34.
93. Stanley, T. Adenosine deaminase modulation of telomerase activity and replicative senescence in human CD8 T lymphocytes / T. Stanley, M. Parish, S. Kim // J Immunol. – 2013. – 184(6). – P. 2847–2854.
94. Tisdale, E. J. A GAPDH mutant defective in Src-dependent tyrosine phosphorylation impedes Rab2-mediated / E. J. Tisdale, C. R. Artalejo // Traffic. – 2008. – Vol.8. – P. 89–99.
95. Vakulenko M.Y. The estimation of the size of domestic cat population in Rostov region / M. Y. Vakulenko, S.B. Milnikova, V.F. Ponomareva, N. Dentella, A.M. Ermakov // European Scientific Journal. - 2018. - №11 (39). - P.4-7.
96. Vakulenko M.Y. Breast cancer in cats as a model for studying breast cancer in women / M. Y. Vakulenko, V.F. Ponomareva, M.A. Kulishova, A. A. Segeeva // Материалы XV научной межвузовской конференции студентов, молодых ученых и специалистов с международным участием «Актуальные вопросы морфологии». – 2018. - изд-во РостГМУ Ростов-на-Дону. - С. 51-53.
97. Vakulenko M.Y. Changes in the activity of adenosine deaminase and the content of polyamines in the blood of cats with breast cancer / M. Y. Vakulenko, N. I. Akinina, N.M. Dobaeva, E. M. Bakurova, A.M. Ermakov // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 12th International Scientific Conference on Agricultural Machinery Industry, Interagromash. - 2019. – P. 134 - 142.
98. Vakulenko M.Y. Breast cancer in the population of cats in Rostov region / M. Y. Vakulenko, N. I. Akinina, N.M. Dobaeva, V. V. Suhomlinov, A.Y. Kochetkova, N.S. Karnaukhov A.M. Ermakov // IOP Conference Series: Earth

- and Environmental Science. 12th International Scientific Conference on Agricultural Machinery Industry, Interagromash. -2019. - P. 142 - 151.
99. Vy Hong-Diep, Kim. Neutropenia among patients with adenosine deaminase deficiency / Vy Hong-Diep Kim, Anne Pham-Huy, Eyal Grunebaum // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2019. – Vol.143. – P. 403-405.
100. Yoshikawa, Y. Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors / Y. Yoshikawa, M. Morimatsu, K. Ochiai, T. Ishiguro-Oonuma, S. Wada, K. Orino, Watanabe K. // *BMC Vet Res*. – 2015. – V23. – P11-159.
101. Zacchetti, A. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry / A. Zacchetti, E. van Garderen, E. Teske, H. Nederbragt, J. Dierendonck, G. Rutteman // *APMIS*. – 2003. – V111. – P. 430–438.
102. Zheng, L. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component//*Cell*. –2003.– Vol.114, N2.–P.255–66.
103. Zhang, H. Polyamines reverse immune senescence via the translational control of autophagy / H. Zhang, A. Simon // *Autophagy*. – 2020 – N.16. – P. 181-182.