

На правах рукописи



Галустян Дмитрий Беникович

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
НОВООБРАЗОВАНИЙ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ
ПЛОТОЯДНЫХ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ
В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И УСТАНОВЛЕНИИ
СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ**

4.2.1. Патология животных, морфология, физиология,
фармакология и токсикология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ).

Научный руководитель Дилекова Ольга Владимировна,
доктор биологических наук, доцент.

Официальные оппоненты: Татарникова Наталья Александровна,
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Пермский государственный аграрно-технологический университет им. академика Д. Н. Прянишникова», заведующий кафедрой инфекционных болезней;

Павленко Ольга Борисовна,
доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет им. императора Петра I», профессор кафедры акушерства, анатомии и хирургии.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».

Защита состоится 05 декабря 2025 г. в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 35.2.036.02 на базе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

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

Автореферат разослан «_____» _____ 2025 г. и размещен на сайтах: ВАК Министерства науки и высшего образования РФ <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru> «_____» _____ 2025 г.; ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» <https://stgau.ru> «_____» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Шулунова Ангелина Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследований и степень ее разработанности

Частота возникновения новообразований молочных желез, как и в целом онкологических заболеваний, стремительно увеличивается по всему миру как среди животных, так и людей. По данным ВОЗ за 2022 год, данная патология являлась самой распространенной в 157 странах и завершилась летальным исходом в 670 000 случаев. У домашних животных ввиду ряда затруднений не существует единого регистра онкологических патологий, однако множество локальных исследований демонстрируют общую межконтинентальную тенденцию диагностики опухолей молочных желез в 30–50 % с летальными исходами в 40–50 % случаев (Г. П. Пигарева и соавт., 2016; В. В. Сазонова и соавт., 2021; A. Ežerskyte et al., 2011; C. Beaudu-Lange et al., 2021; L. Oliveira et al., 2022; G. Zahra et al., 2024; Jing Zheng et al., 2024; S. Sruthi et al., 2024).

Модернизация и научно-технический прогресс в клинико-лабораторной области диагностики малигнизированных образований молочных желез, на первый взгляд объясняет увеличение регистрируемых случаев, искажая тем самым масштаб и значимость данной патологии. Однако стремительное развитие химической отрасли и в целом индустриального сектора приводит к загрязнению побочными (в ходе технического цикла) канцерогенными веществами, такими как пер- и полифторалкильные соединения, содержащиеся в крови у большинства населения планеты, в том числе и животных. Вещества аккумулируются в водных резервуарах, пище и других бытовых предметах, с которыми контактируют люди и домашние животные в качестве синантропных организмов (K. Steenland et al., 2020; A. Charazac et al., 2022; L. Jane et al., 2022; National Academies of Sciences et al., 2022; G. Sakai et al., 2022).

Для разработки тактики борьбы с новообразованиями молочных желез необходимо понимать процесс канцерогенеза, который отражается в изменении соединительнотканых, сосудистых, клеточно-ядерных и других морфологических структур опухолевой ткани. Ввиду развития цифровой патологии и актуальных на сегодняшний день искусственных интеллектов биологического профиля более достоверные данные представляют количественные морфометрические критерии, отражающие точные значения параметров исследуемой ткани, способные выявлять мельчайшие паттерны, характерные для злокачественных форм опухолей.

Связь стромального и паренхиматозных компонентов, а также диаметра сосудов, плотности сосудов, размера клеток, ядер и ядрышек, а также их форм в развитии злокачественных новообразований молочных желез установлена во многих работах, где их показатели превалируют, что отражает онкологический процесс и является одним из важных элементов фундамента в разработке терапевтических подходов (В. В. Кометова и соавт., 2012, 2014; M. Derenzini et al., 2000; D. Mihalache et al., 2014; N. Sleenckx et al., 2014; S. Conner et al., 2024).

Разработка методов курации и подбор необходимой схемы химиотерапевтического лечения требует верной интерпретации гистологических типов новообразований молочных желез. Однако ввиду субъективизации визуальной интерпретации результатов, обусловленной человеческим фактором, в 20 % случаев регистрируют ошибочные постановки диагнозов, в связи с чем имеет значение разработка дополнительных методов дифференцировки гистологических типов, основанных на количественных морфометрических принципах, исключающих вольную интерпретацию и субъективизм (R. Yamaguchi et al., 2012; A. A. Renshaw et al., 2013).

Большая часть исследованных морфометрических параметров отражает картину онкологического процесса у людей, при этом у животных основная часть критериев до сих пор остается непредставленной.

На данный момент большое внимание в ветеринарной научной литературе было уделено сосудистому компоненту, где в основном изучали их плотность на площади исследуемой ткани, при этом остались не исследованы должным образом диаметр сосудов и степень васкуляризации. Также в ветеринарной литературе в малой степени затрагивается стромально-паренхиматозное отношение, представляющее количественную интерпретацию соединительно-тканного компонента опухолевой ткани, играющего важную роль в малигнизации и дальнейшем развитии онкологического процесса. Среди показателей, отражающих размеры ядрышек, такой морфометрический критерий, как индекс расстояния, на данный момент был применен только для изучения карцином желудка в гуманной

медицине. В научной литературе корреляционные влияния исследуемых количественных параметров между собой остаются слабо исследованными, однако они непосредственно характеризуют структурные особенности цито-гистологической организации неопластической ткани, которые необходимо исследовать для более точного понимания онкологических заболеваний молочных желез.

Также в настоящее время отсутствуют сведения, описывающие сравнительные морфометрические исследования между гистологическими типами молочных желез у домашних плотоядных животных, которые раскрывают морфометрические особенности компонентов микроскопической структуры опухолевого очага различных гистологических типов карцином.

Таким образом, морфометрические критерии, отражающие количественные параметры компонентов опухолевой ткани, характеризующие дедифференциацию, малигнизацию и течение онкологического процесса, в том числе среди разных гистологических типов карцином, в ветеринарной и гуманной литературе ограниченно представлены, а в некоторых случаях данные полностью отсутствуют. Перечисленные критерии необходимы для более глубокого понимания канцерогенеза и верной интерпретации в диагностике карцином молочных желез домашних плотоядных животных.

Также вследствие высокой распространенности онкологических патологий, смертности, необходимости разработки передовых клинических и лабораторных подходов в ветеринарной онкологической патологии, базирующихся на принципах ранее описанных морфометрических параметров, данная тема представляет актуальность.

Цель исследования. Изучить морфологические особенности новообразований молочных желез плотоядных и их значение в дифференцировке и установлении степени злокачественности.

Задачи исследования:

1. Провести анализ половозрастных и породных особенностей, а также локализации пораженных молочных пакетов и гистологических типов, новообразований молочных желез у собак и кошек.

2. Изучить клинические морфометрические параметры, включающие в себя массу и размеры новообразований, лимфоузлов, и их прогностическое значение с учетом метастазирования, рецидивирования, некротизации, интравазации прилегающих сосудов, числа митотических фигур и степени дифференцировки G.

3. Провести сравнительный анализ и установить корреляционные отношения соединительнотканых, сосудистых и клеточно-ядерных морфометрических параметров микроскопической структуры опухолевой ткани и здоровой молочной железы.

4. Установить корреляционные отношения морфометрических параметров микроскопической структуры и клинико-прогностических критериев.

5. Провести дифференциальный анализ морфометрических параметров тубулярной и солидной карциномы.

Объект исследований. Домашние плотоядные животные – собаки и кошки со спонтанно возникшими новообразованиями молочных желез.

Предмет исследований. Органные, тканевые, клеточные, ядерные и субклеточные морфометрические показатели, характеризующие течение онкологического процесса, их связь с прогностическими критериями и дифференциальная значимость при интерпретации гистологических типов опухолей молочных желез.

Гипотеза исследований. Органные и микроскопические морфометрические критерии имеют характерные изменения структурных компонентов, выраженные в количественном отношении, отражающие онкологический процесс, вариабельность организации гистологических типов и обладающие прогностической значимостью в ветеринарной онкологии опухолей молочных желез.

Научная новизна исследований. Впервые на основании органических морфометрических параметров новообразований молочных желез собак и кошек были определены прогностически значимые критерии, учитывающие типы пораженных молочных пакетов, стереометрические показатели опухолей и лимфатических узлов, а также массу неоплазий в предварительной оценке исхода онкологической патологии.

На основании органических и ядерных морфометрических критериев установлена взаимосвязь и построена регрессионная модель, предсказывающая фазовое изменение числа митотических фигур в зависимости от диаметра опухолевого очага у собак, характеризующая специфические пролиферативные особенности опухолевой ткани.

Впервые установлена отрицательная корреляционная связь ядерного эксцентриситета и ее площади, при которой увеличение последней приводит к уменьшению вытянутости ядра, что свидетельствует о малигнизации опухолевой ткани, а также сформирована регрессионная модель, позволяющая предсказывать эксцентриситеты клеток и ядер при изучении показателей одного из них.

Доказана предиктивная роль ядерного эксцентриситета у кошек в оценке инвазивных свойств опухоли, при котором низкие значения ядерного эксцентриситета сопровождались сосудистой интравазацией прилегающих сосудов новообразований молочных желез.

Установлена дифференциальная значимость морфометрических критериев тубулярных и солидных карцином, при которой изученные параметры могут быть использованы в качестве дополнительных методов интерпретации карцином молочных желез.

Впервые определены параметры площади ядрышек тубулярных карцином, позволяющие проводить анализ степени дифференцировки Grade G1 и G3. Доказана дифференциальная ценность морфометрического критерия – индекса расстояния (ID) в новообразованиях молочных желез собак и кошек, позволяющего достоверно интерпретировать тубулярные и солидные карциномы, а также установлены специфические показатели ID в дифференцировке степени злокачественности Grade G1, G2, G3 в тубулярных карциномах кошек.

Выявлены характерные особенности опухолевой ткани в сравнении со здоровой молочной железой, при котором у малигнизированных образований наблюдаются низкие значения площади клеток ввиду увеличения клеточной плотности, а также установлены коррелятивные отношения между тканевыми, клеточными и ядерными морфометрическими параметрами микроскопической картины, характеризующие онкогенез.

Дополнены статистические данные различных аспектов нозологического профиля онкологических патологий молочных желез в городе Ставрополь.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенного исследования расширяют и дополняют научно-теоретическую базу, описывающую онкологический процесс молочных желез собак и кошек, в количественном морфометрическом аспекте. Также раскрывают новые данные о корреляционных отношениях морфометрических критериев, тканевых, клеточных и субклеточных компонентов микроскопической картины опухолевой ткани и вносят вклад в дополнительную дифференциальную оценку гистологических типов карцином. Полученные результаты могут быть использованы для прочтения лекций, проведения практических занятий в учебных заведениях биологического профиля, а также для составления учебных пособий, справочных руководств по ветеринарной онкологии.

Практическая значимость заключается в разработке чек-листов для предварительной оценки исхода злокачественных новообразований молочных желез собак и кошек, которые могут быть применены в рутинной клинико-лабораторной оценке малигнизированных образований, а также в перспективной разработке классификации TNM в ветеринарной онкологии. Сформированные регрессионные модели характера обнаружения числа фигур митоза, клеточных и ядерных эксцентриситетов, а также полученные данные, свидетельствующие об их связи с метастатическим потенциалом, могут представлять прогностическую значимость в лабораторной диагностике. Разработка дополнительных критериальных показателей для дифференциального анализа тубулярных и солидных карцином имеет прогностическую значимость в патоморфологических, гистологических исследованиях опухолевой ткани.

По теме диссертационного исследования были изданы методические рекомендации «Морфологическая и морфометрическая оценка злокачественных новообразований молочных желез и степени их дифференцировки у собак и кошек» (Д. Б. Галустян и соавт., 2025).

Методология и методы исследования. Последовательность применения и подбор методологических принципов был сформирован исходя из поставленных цели и задач. Были проведены проспективные научные исследования, включающие в себя теоретические и эмпирические методы. Теоретический метод был использован для формирования гипотезы, анализа отечественной и зарубежной литературы, также для разработки возможных объяснений ряда наблюдаемых результатов. Эмпирический метод был применен при сборе клинических показателей, составе базы данных наблюдаемых параметров, проведении лабораторных, патоморфологических, гистологических, иммуногистохимических, морфометрических и статистических исследований, исключающих случайность результатов наблюдаемых значений.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Клинические морфометрические критерии отражают малигнизированность новообразований молочных желез собак и кошек и имеют прогностическую значимость в предварительной оценке исхода онкологической патологии.

2. Морфометрические критерии тканевых, клеточных и ядерных структур опухолевой ткани, а также их взаимозависимое влияние характеризуют дедифференциацию злокачественных новообразований молочных желез.

3. Параметры микроскопической структуры опухолевой ткани выступают в качестве предикторов в прогностической оценке степени злокачественности новообразований.

4. Дифференциальный анализ морфометрических критериев имеет диагностическую значимость в интерпретации тубулярных и солидных карцином, а также степени дифференцировки опухолевого очага.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты диссертационного исследования были получены с применением соответствующих и актуальных научных методов и основаны на обширной выборке исследуемых параметров. Лабораторные, патоморфологические, гистологические, гистохимические и морфометрические исследования были проведены на современном сертифицированном оборудовании и в программных средах для анализа патоморфологических образцов. Были составлены обширные базы данных исследуемых наблюдений в Microsoft Excel с разработкой программных алгоритмов (макросов) для работы с массивом данных и подсчетов морфометрических критериев. Полученные результаты наблюдаемых значений проходили статистический анализ в IBM SPSS Statistics для исключения недостоверных показателей.

Положения диссертационной работы были освещены, обсуждены и получили оценки в фонде содействия инновациям по программе «Умник» (Ставрополь, 2022, 2023), на грантовых конкурсах ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» в области науки и инноваций для молодых ученых (Ставрополь, 2023, 2024), на 32-м международном ветеринарном конгрессе «Серебряный микроскоп» (Москва, 2024), а также на научно-практической конференции «Развитие агропромышленного комплекса в науке и образовании Российской Федерации в период цифровизации» (Екатеринбург, 2024).

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе и в научных исследованиях в ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Вятский государственный агротехнологический университет», ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет имени А. А. Ежевского», ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова», ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет», Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр» (лаборатория ветеринарной медицины), также в ветеринарных клиниках города Ставрополь: ФГБОУ ВО СтГАУ НДиЛВЦ, ИП Заиченко И. В. «Ветеринарный центр им. Пирогова», ИП Лукашенко В. С. «Вет Семья», ИП Шаламова Е. В. «Колибри».

Личный вклад соискателя. Формирование целей и задач научного исследования, подбор и применение соответствующей и актуальной методологии проведения научной работы, создание обширной базы данных исследуемых параметров и разработка программных алгоритмов для работы с ними. Сбор клинических данных, проведение лабораторных, патоморфологических, гистологических, гистохимических, морфометрических и статистических исследований. Анализ опытных данных и описание полученных результатов. Доля участия соискателя при выполнении диссертационной работы составляет 90 %.

Публикации результатов исследования. По материалам диссертационной работы опубликованы 6 научных работ, из которых: 3 научные статьи в журналах, включенных в перечень российских рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ («Ветеринарная патология» – К2, «Известия Оренбургского государственного аграрного университета» – К2, «Иппология и ветеринария» – К3), 1 научная статья, опубликованная в издании, индексируемом в международной базе данных Scopus (Brazilian Journal of Veterinary Pathology – Q4), 1 научная статья из сбор-

ника материалов к международной научно-практической конференции «Развитие агропромышленного комплекса в науке и образовании Российской Федерации в период цифровизации» (18–21 сентября 2024 г.), 1 методические рекомендации, рекомендованные научно-методическим советом ФУМО 36.00.00 Ветеринария и зоотехния ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина» (протокол № 77 от 10 июня 2025 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 4.2.1 Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология (пп. 2, 4, 6, 7, 8, 9, 14).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает в себя введение и такие главы, как: обзор литературы, материалы и методы, собственные исследования, заключение и выводы, практические предложения, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы и библиографический список. Данная работа изложена на 209 страницах машинного текста, представлена 19 формулами, 84 таблицами и 30 иллюстрациями. Список литературы, использованной при написании работы, представлен работами 34 отечественных и 228 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе представлена актуальная научно-академическая информация, отражающая современное положение ветеринарной и гуманной онкологии. Также представлены данные о распространении опухолей молочных желез, освещены архивные и современные классификации неоплазий молочной железы, отражены передовые концепции канцерогенеза на тканевом, клеточном, субклеточном и генетическом уровне, представлена информация о морфометрических аспектах опухолевых патологий молочных желез.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе проведения диссертационных исследований были выведены показатели различных аспектов нозологического профиля. Установлены взаимосвязи клинических и прогностических параметров и сформированы чек-листы для предварительной клинической и лабораторной оценки патологий. Определены характерные морфометрические показатели микроскопической картины для здоровой и малигнизированной ткани и выявлены их отличия. Установлены взаимоотношения параметров микрокартины между собой и с прогностическими параметрами. Выявлены достоверные критерии морфометрических параметров для дифференцировки тубулярных и солидных карцином домашних плотоядных.

Материалы и методы исследования

Исследования по диссертационной работе проводились в период с 2022 по 2025 годы на базе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», института ветеринарии и биотехнологий, на кафедре паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии имени профессора С. Н. Никольского и научно-диагностического и лечебного ветеринарного центра, также на базе ветеринарных клиник города Ставрополь: ИП Заиченко И. В. «Ветеринарный центр им. Пирогова», ИП Шаламова Е. В. «Колибри», ИП Идея В. С. «Вет Семья».

Объектами диссертационного исследования служили собаки (n=100) и кошки (n=100) разных возрастных, половых и породных групп со спонтанно возникшими новообразованиями молочных желез, именуемые далее «опытными» группами. Информация об онкологическом пациенте была проанализирована с амбулаторной карты животного ветеринарных аналитических информационных систем «VetAIS», «VetDesk» и «Ветменеджер». Учитывались следующие аспекты нозологического профиля: вид, пол, возраст, порода, масса животного, ранее проведенная кастрация, гряда молочных пакетов, на которой было обнаружено новообразование, номер пораженного молочного пакета и рецидивы. Для установления достоверных клинико-прогностических параметров были сформированы две группы животных — собаки (n=50), кошки (n=50), представленные без какой-либо патологии молочных желез, именуемые далее контрольными группами.

В качестве описательных статистических исследований, характеризующих нозологический профиль, объектами служили самцы и самки собак и кошек. Для гистологических, иммуногистохимических, морфометрических и специфических статистических исследований в качестве объектов учитывались только самки обоих видов.

Тип молочных пакетов животных определяли в соответствии с классификацией Г. П. Дюльгер и соавт. (2022).

Материалом исследования служили молочные железы, полученные после унилатеральной и билатеральной мастэктомии. Для комплексного морфологического изучения параметров новообразования и прилегающих структур из представленной ткани осуществляли вырезку паховых и подмышечных лимфатических узлов и патологических участков с эксцизионной биопсией опухолевого очага. Определялось количество и масса новообразований на лабораторных электронных весах OHAUS AR 5120 (Adventurer™, Китай), с последующим расчетом массового процентного отношения опухоли.

Далее вырезанные образцы подвергались морфометрическим исследованиям с помощью электронного штангенциркуля OT-INM02 (Орбита, Китай), с помощью которого проводили измерения длины (l), ширины (w), высоты (h), они же являлись осями для сферических фигур с аффинным преобразованием и наибольшего диаметра (Ø). Из полученных данных устанавливали форму новообразования и лимфоузлов для корректного вычисления их площади поперечного сечения, площади поверхности и объема.

Эллипсоидом считались образцы, имеющие фигуру, аффинную сфере, через которую можно было провести поперечное сечение в виде эллипса, имеющего три оси с разными значениями.

Сфероиды считали опухолевые очаги и лимфоузлы, соответствующие критериям формы эллипсоида, за исключением разностей в значениях двух осей, где одна из трех осей не должна иметь разницу более, чем 1/10 мм от второй, принятое значение является амортизирующим, нивелирующим влияние погрешности электронного штангенциркуля.

Коническими считали образцы, где один из полюсов имел расширение, в виде основания у которого большая и малая оси были равны друг другу либо же разница между ними составляла не более 1/10 мм, а другой сужался к вершине и замыкался на одной точке, где значения малой и большой оси были менее 1 мм.

Для гистологического исследования из полученного материала вырезали патологические очаги молочных желез размером 1 мм³ с захватом центральной и периферической части опухолевого очага со здоровой тканью. Лимфатические узлы вырезали сегментами размером 1 мм³ вдоль всей структуры органа. Полученные образцы подвергались рутинной гистологической подготовке.

Для обзорных целей и дальнейшей идентификации структур патологической ткани и лимфатических узлов препараты окрашивали гематоксилином и эозином, для анализа соединительнотканного компонента окрашивание проводилось по методике Маллори согласно рекомендациям В. В. Семченко, С. А. Барашковой, В. Н. Ноздрина и В. Н. Артемьева (2006).

При микроскопическом исследовании образцов новообразований у собак были установлены доброкачественные (n=37) и злокачественные (n=63) неоплазии. У кошек доброкачественные (n=17) и злокачественные (n=83).

Степень злокачественности новообразований «Grade» определяли по ноттингемской методике, разработанной Elston & Ellis (1991) и модернизированной ее версией L. Peña et al. (2010).

Для корректной идентификации ядрышек проводили иммуногистохимические исследования нуклеолярных белков (нуклеофозмин/ NPM1, нуклеолин/ NCL и фибрилларин/ FBL), ручным, непрямым методом по методике Е. Г. Сухоруковой с соавт. (2012). В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антинуклеолярные антитела к Anti-Nucleophosmin antibody [SP236], Anti-Nucleolin antibody, Anti-Fibrillarin antibody [28F2] (Abcam Limited, Великобритания).

Микроскопические исследования проводились с помощью микроскопа BX53 (Olympus, Япония) при увеличении 40×, охватывающим 1500319,483 мкм² исследуемой ткани, для анализа общих гистологических и соединительнотканых структур, 100× с площадью поля зрения 240970,078 мкм² для изучения сосудистого компонента, 600×, охватывающим 6542,894 мкм² для анализа клеточных, ядерных и ядрышковых элементов. Оцифровывание препаратов осуществлялось с помощью встроенной цифровой камеры SC 50 (Olympus, Япония), в программной среде для микроскопической съемки Cellsens Entry (Olympus, Япония).

Морфометрические измерения микроскопической картины проводили в специализированных вычислительных системах для цифровой патологии и морфологии Морфотест 5.1

(ВидеоТесТ-Морфология, Россия) и QuPath 0.4.4 Bankhead P. et al., (2017), (Qupath, Шотландия). Присвоение реальных микроскопических размеров для каждого пикселя в мкм соответственно для каждого увеличения осуществляли с помощью объект-микрометра.

Все микроскопические измерения были подразделены на четыре группы морфометрических критериев исследуемого опухолевого очага: соединительнотканые, сосудистые (кровеносные), клеточно-ядерные и ядрышковые.

В группе соединительнотканых критериев проводили измерения процентной доли занимаемой площади в опухолевом очаге стромального и паренхиматозного компонентов, а также вычисляли стромально-паренхиматозное отношение (СПО).

В группе сосудистых критериев проводили измерения диаметра сосудов, площади сосудов, плотности сосудов на 1 мм², а также индекса васкуляризации (VI).

В группе клеточно-ядерных критериев проводили измерения площади клеток, ядер с помощью обученной аналитической модели StarDist Schmidt U. et al., (2018), также площади ядрышек, клеточного и ядерного эксцентриситета, ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО), также высчитывали индекс состояния (ID) Г. Г. Автандилов (1990), учитывающий площади клетки, ядра и ядрышек (1):

$$ID = \sqrt{N^2 + \frac{rn}{c}} \quad 1$$

где r – отношение пороговых значений (отношение квадратов площадей ядра и ядрышка к площади клетки), равное 130;

c – площадь клетки;

N – площадь ядра;

n – площадь ядрышек.

Статистические исследования проводили в программной среде IBM SPSS Statistics 27 (IBM corporation, США). Все выборки были проанализированы на аномальные наблюдения, после чего были определены экстремумы и выбросы, в дальнейшем подвергшиеся редактированию методом исключения.

Все исследуемые морфометрические критерии были изучены на наличие нормальности (Гауссовского) распределения.

Для морфометрических критериев и других параметров, не проявляющих нормальность распределения в качестве описательной статистики, использовали Mdn (median) медиану и IQR (interquartile range) межквартильный интервал. Все значения считали статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Значения морфометрических критериев с нормальным распределением в качестве описательной статистики представляли показатели средней M (Mean) и стандартного отклонения SD (standard deviation). Все полученные результаты считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование нозологического профиля новообразований молочных желез собак и кошек

У собак злокачественные опухоли на фоне доброкачественных встречаются не так часто и превышают последние в два раза, в то время как у кошек доля малигнизированных неоплазий гораздо превалирует над доброкачественными формами. Таким образом, среди кошек с наибольшей вероятностью обнаруживаются злокачественные новообразования в сравнении с собаками.

Породно-возрастные особенности опухолей демонстрируют, что животные гериатрического возрастного периода оказались наиболее подверженными развитию неопластических процессов. У собак чаще всего патологии можно встретить в 7–11 лет, при этом не наблюдается кардинальных различий среди возрастного распределения доброкачественных и злокачественных опухолей (Рисунок 1). Породами, оказавшимися наиболее предрасположенными к данной патологии, являются: йоркширские терьеры, немецкие овчарки и сибирские хаски. У кошек формы новообразований обнаруживаются в возрасте 13–14 лет (Рисунок 2). Среди предрасположенных пород оказались: британские короткошерстные, шотландские вислоухие и прямоухие. Породная картина полученных данных специфична для изучаемого региона, так как зависит от социально-экономических факторов.

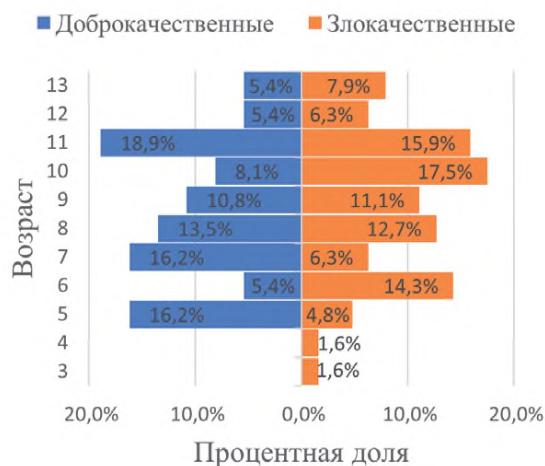


Рисунок 1 – Возрастной профиль патологии среди доброкачественных и злокачественных новообразований молочных желез собак

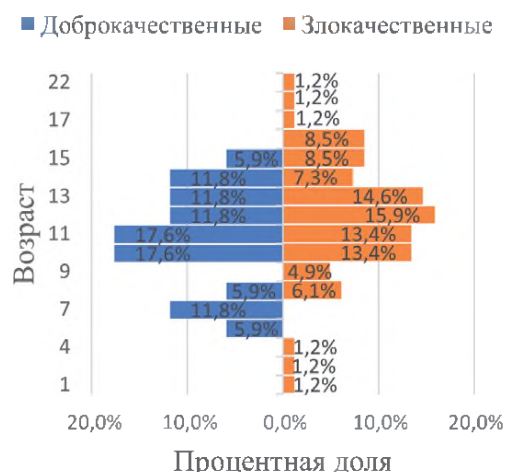


Рисунок 2 – Возрастной профиль патологии среди доброкачественных и злокачественных новообразований молочных желез кошек

Как собаки, так и кошки имели практически схожую картину локализации сформированных опухолевых очагов, неопластический процесс в основном затрагивал брюшные молочные пакеты, в частности четвертый. У собак вторым местом локализации оказались паховые. Представленная картина возникает в результате развития ткани железистых структур, доля которой больше всего представлена в каудальных молочных пакетах. Основной фигурой формирования опухоли и лимфоузлов, в том числе подверженных метастазированию, оказалась эллипсоидная. В случае с лимфатическими узлами данные органы имеют нормальную морфологическую форму, приближенную к эллипсоидной. Редкие конические фигуры новообразований объясняются поражением железистой ткани и соска, в результате которого новообразование принимает очертания затронутой структуры.

У собак среди злокачественных новообразований наиболее встречающимися гистологическими типами являлись: тубулярная карцинома – 23,8 %, солидная карцинома – 19,0 %, карциномы смешанного типа – 15,9 % папиллярная карцинома и миоэпителиальная карцинома – 9,5 %, медулярная карцинома – 4,8 %.

У кошек наиболее встречающимися гистологическими типами являлись: тубулярные карциномы – 38,6 %, солидные – 25,3 %, инвазивные дольковые – 6,0 % и папиллярные в 4,8 % случаев.

Патогистологический профиль новообразований выявил тенденции к формированию тубулярных и солидных структур, чаще всего регистрируемых у обоих видов.

Метастатический потенциал и критерии злокачественности продемонстрировали более благоприятную картину у собак, при котором в основном диагностировали высокодифференцированные опухоли с низким процентом метастазирования, митотического индекса и интравазации окружающих сосудов, данная картина объясняет низкий процент рецидивирования. У кошек наблюдалась противоположная картина, что и объясняет высокую вероятность рецидивирования и низкую медиану выживаемости.

Анализ клинических морфометрических параметров новообразований и их прогностическое значение

При исследовании морфометрических параметров опухолевого очага в зависимости от степени дифференцировки с помощью критерия Краскела–Уоллиса также были выявлены статистически достоверные различия среди наибольшего диаметра $p=0,003$, площади поперечного сечения $p=0,008$, площади поверхности $p=0,007$ и объема $p=0,006$. Внутригрупповое исследование с поправкой Бонферрони выявило, что значения перечисленных параметров отличаются только между высокодифференцированными (G1) и низкодифференцированными (G3) новообразованиями $p=0,002$; $p=0,009$; $p=0,009$ и $p=0,01$ соответственно каждому исследуемому параметру, размеры опухоли с умеренной дифференцировкой не

имели достоверно значимых различий от предыдущих градаций. Таким образом, наибольший диаметр высокодифференцированных новообразований составил 18 мм, умеренно дифференцированных – 30 мм и низкодифференцированных – 77 мм, значения площади для поперечного сечения были 222 мм², 530 мм² и 2501 мм², для площади поверхности 689 мм², 1559 мм² и 6814 мм², для объема 1558 мм³, 5301 мм³ и 30066 мм³ соответственно (Таблица 1).

Таблица 1 – Значения морфометрических параметров опухоли в зависимости от ее степени дифференцировки у собак

Тип исследуемого морфометрического параметра	Параметры опухолевого очага различной степени дифференцировки (G)		
	Mdn (IQR)		
	G1 (n=26)	G2 (n=21)	G3 (n=16)
Наибольший $\varnothing$, мм	18 (22) *	30 (47)	77 (76) *
S поперечного сечения, мм ²	222 (641) *	530 (2700)	2501 (4381) *
S поверхности, мм ²	689 (1732) *	1559 (7994)	6814 (13636) *
Объем (V), мм ³	1558 (7600) *	5301 (54090)	30066 (139785) *

Примечание: * – статистически значимое различие между первой и третьей группой $p \leq 0,05$.

Статистическое исследование таких морфометрических параметров лимфатических узлов собак, как наибольший диаметр, площадь поперечного сечения, площадь поверхности и объем с помощью критерия U Манна–Уитни выявило, что сторожевой паховый лимфатический узел имел различные показатели объема в зависимости от метастазирования опухолевого очага $p=0,04$, при этом остальные параметры не имели значимых различий среди измерений. Таким образом, объем для сторожевых паховых лимфоузлов без метастазов составил 138 мм³ и с метастазами – 389 мм³. Исследование на зависимость размеров от эмболизации сосудов, инфильтрации, некротизации, степени дифференцировки опухолевой ткани и рецидивирования не выявили статистически достоверных результатов (Таблица 2).

Таблица 2 – Значения параметров объема сторожевого лимфатического узла в зависимости от метастазирования у собак

Тип исследуемого морфометрического параметра	Параметры лимфатического узла	
	Mdn (IQR)	
	Отсутствие метастазирования (n=31)	Наличие метастазирования (n=9)
Объем (V), мм ³	138 (565) *	389 (539) *

Примечание: * – статистически достоверный уровень значимости при $p \leq 0,05$.

Было установлено, что морфометрические параметры размеров опухолевой ткани также статистически достоверно положительно коррелируют с количеством обнаруживаемых фигур митоза, Ро Спирмена составило 0,28, $p < 0,05$, что говорит о слабой, но с тенденцией к более средней взаимосвязи данных параметров. При проведении регрессионного анализа для создания модели, предсказывающей изменение числа фигур митоза в ответ на увеличение наибольшего диаметра опухолевого очага, обнаружилось, что наиболее подходящее кубическое уравнение, устойчивое к отклонениям значений от нормальности распределения, средне описывающее взаимодействие параметров в модели R–квадрат – 0,12, предсказывает фазовое изменение числа фигур митоза. Их количество уменьшается на 0,2 единицы на каждый миллиметр (Рисунок 3).

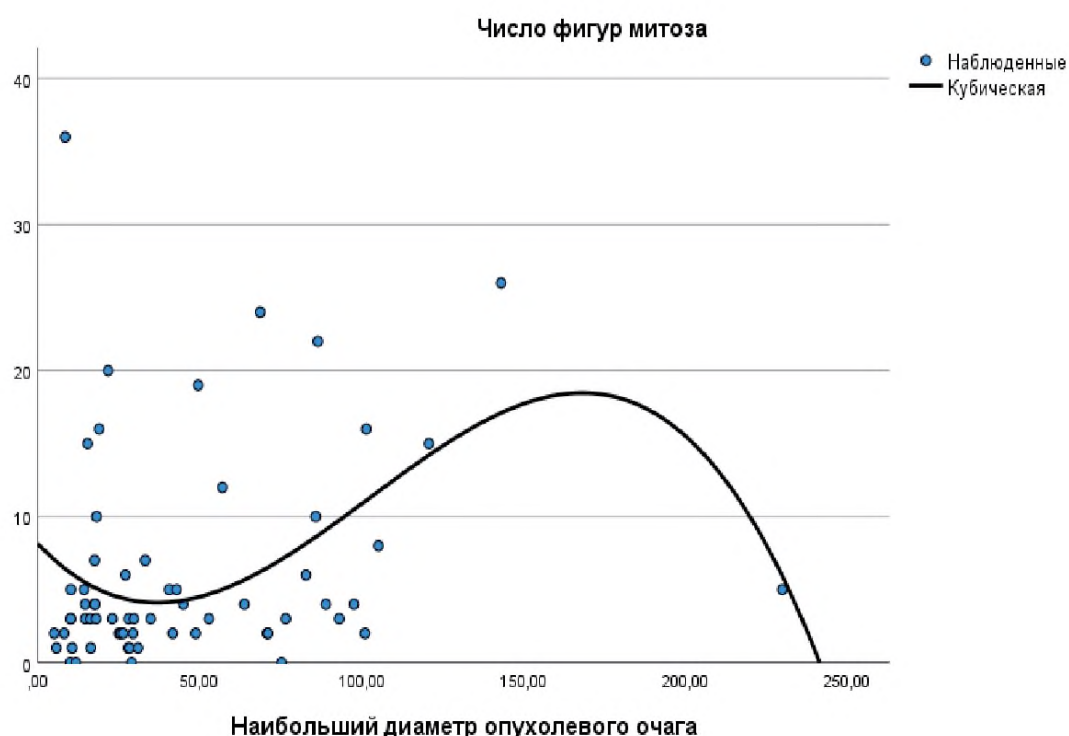


Рисунок 3 – Кубическая регрессионная модель зависимости количества фигур митоза от наибольшего диаметра опухолевого очага собак

Статистический анализ Краскела–Уоллиса наибольшего диаметра, площади поперечного сечения площади поверхности и объема опухолевого очага у кошек выявил статистически достоверные результаты показателей ранее перечисленных морфометрических параметров в зависимости от степени дифференцировки новообразования $p=0,01$; $p=0,004$; $p=0,005$; $p=0,004$ соответственно. Из результатов исследования получили, что средние значения отличаются между высокодифференцированными (G1) и низкодифференцированными (G3) $p=0,02$; $p=0,01$; $p=0,012$ и $p=0,011$ соответственно каждому исследуемому параметру, также между умеренно дифференцированными (G2) и низкодифференцированными (G3) новообразованиями $p=0,016$; $p=0,035$ и $p=0,024$ соответственно перечисленным параметрам. Статистически значимое различие между двумя последними группами отсутствует при анализе наибольшего диаметра. Таким образом, для него показатели составляют для высокодифференцированных – 21 мм и низкодифференцированных – 32 мм, площадь поперечного сечения для G1 – 248 мм², G2 – 229 мм², G3 – 590 мм², для площади поверхности 696 мм², 740 мм² и 1741 мм², для объема 966 мм³, 1154 мм³ и 5068 мм³ соответственно ранее перечисленным группам (Таблица 3).

Таблица 3 – Значения морфометрических параметров опухолевого очага в зависимости от ее степени дифференцировки у кошек

Тип исследуемого морфометрического параметра	Параметры опухолевого очага различной степени дифференцировки (G)		
	<i>Mdn (IQR)</i>		
	<i>G1 (n=23)</i>	<i>G2 (n=24)</i>	<i>G3 (n=26)</i>
Наибольший $\varnothing$, мм	21 (20) *	22 (18)	32 (27) *
S поперечного сечения, мм ²	248 (516) *	229 (316) #	590 (856) *#
S поверхности, мм ²	696 (1514) *	740 (980) #	1741 (2102) *#
Объем (V), мм ³	966 (4490) *	1154 (2295) #	5068 (9266) *#

Примечание: * – статистически значимое различие между первой и третьей группой, # – статистически значимое различие между второй и третьей группой при $p \leq 0,05$.

Также с использованием критерия U Манна–Уитни было установлено, что такие морфометрические показатели сторожевого пахового лимфатического узла, как площадь поперечного сечения, площадь поверхности и объем, имеют статистически значимые показатели в исследовании размеров лимфоузла в зависимости от метастазирования $p=0,046$; $p=0,016$ и $p=0,004$ для каждого параметра соответственно. Таким образом, для опухолей без метастазов размер площади поперечного сечения, площади поверхности и объема составил 47 мм², 111 мм² и 49 мм³ соответственно, для новообразований с метастазом показатели были 68 мм², 202 мм² и 203 мм³ соответственно (Таблица 4).

Таблица 4 – Значения морфометрических параметров сторожевого пахового лимфоузла в зависимости от метастазирования у кошек

Тип исследуемого морфометрического параметра	Параметры лимфатического узла	
	Mdn (IQR)	
	Отсутствие метастазирования (n=21)	Наличие метастазирования (n=25)
S поперечного сечения, мм ²	47 (49) *	68 (61) *
S поверхности, мм ²	111 (111) *	202 (130) *
Объем (V), мм ³	49 (91) *	203 (252) *

Примечание: * – статистически достоверный уровень значимости при $p \leq 0,05$.

Морфометрические параметры микроскопической структуры опухолевой ткани

Т-критерий Уэлча выявил, что соединительнотканная группа морфометрических критериев статистически достоверно отличалась от контрольной группы. У опухолевых образований собак стромальный компонент занимал меньшую площадь в сравнении с железистой тканью и составлял 46,0 % занимаемой площади, тогда как у контрольной группы он был 77,0 % $p < 0,001$, 95 % доверительный интервал для разности средних составил -32 и -29 %. Оценка размера эффектов по дельте Гласса составила -2,4, что говорит о сильно выраженной разнице исследуемого параметра между опытной и контрольной группами. Паренхиматозный компонент у опытной группы в среднем занимал 53,0 % площади исследуемой ткани, тогда как у контрольной группы она была представлена в меньшей степени и занимала 23,0 % $p < 0,001$, нижняя граница 95 % доверительного интервала составила 28 и верхняя 31, дельта Гласса была 2,3, что также подчеркивает выраженность разницы между средними значениями исследуемых групп. Соответственно вышеперечисленным параметрам стромально-паренхиматозное отношение продемонстрировало картину, отражающую характеристику соотношений ранее перечисленных компонентов. Таким образом, в соответствии с анализом U Манна–Уитни у новообразований СПО составило 0,8 (Рисунок 4), а у контрольной группы – 4 (Рисунок 5) $p < 0,001$.

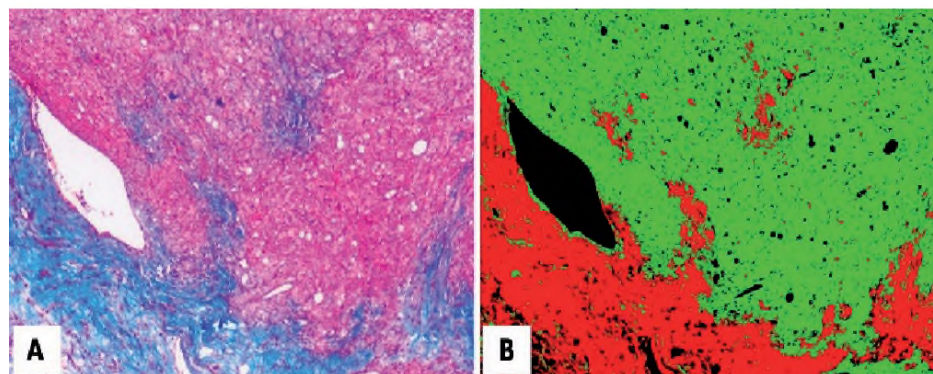


Рисунок 4 – Стромально-паренхиматозный компонент. А – медуллярная карцинома (G2).

Собака, курцхаар, 13 лет. Окраска по Маллори, ув. $\times 40$.

В – морфометрическая стратификация соединительнотканых компонентов

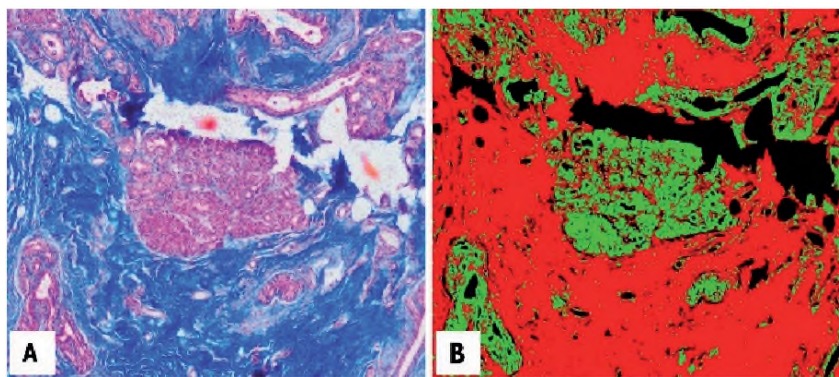


Рисунок 5 – Стромально-паренхиматозный компонент. А – здоровая ткань. Собака, тойтерьер, 13 лет. Окраска по Маллори, ув. $\times 40$. В – морфометрическая стратификация соединительнотканых компонентов

Анализ соединительнотканых компонентов с помощью t-критерия Уэлча выявил, что процент содержания площади стромы в опухолевом очаге в среднем составил 44,0 %, в то время как у контрольной группы эти значения были 80,0 % $p < 0,001$, 95 % доверительный интервал для разности средних составил -37 и -33, дельта Гласса была -1,9, что также подчеркивает большой размер эффекта среди средних изучаемого параметра. Паренхиматозный компонент при этом был сильно выражен у опытной группы и составил 54,0 % занимаемой площади опухолевого очага, тогда как в здоровой ткани молочной железы паренхима занимала лишь 20,0 % площади $p < 0,001$, 95 % доверительный интервал для разности полученных значений составил 32 для нижней и 36 для верхней границы, дельта Гласса при этом была на уровне 1,8. СПО соответственно вышеперечисленным параметрам соединительнотканной структуры и проведенному анализу U Манна–Уитни было 0,8 (Рисунок 6) для опытной и 6,4 (Рисунок 7) для контрольной группы $p < 0,001$.

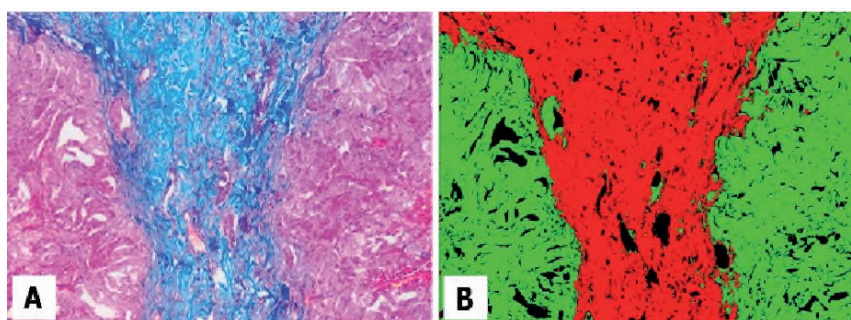


Рисунок 6 – Стромально-паренхиматозный компонент. А – смешанная карцинома (G2). Кошка, беспородная, 12 лет. Окраска по Маллори, ув. $\times 40$. В – морфометрическая стратификация соединительнотканых компонентов

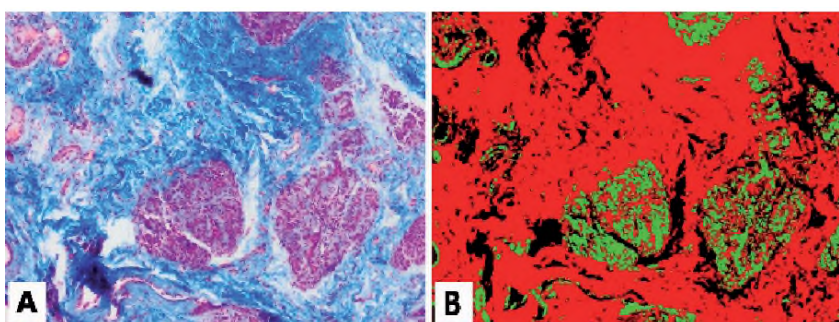


Рисунок 7 – Стромально-паренхиматозный компонент. А – здоровая ткань. Кошка, метис, 8 лет. Окраска по Маллори, ув. $\times 40$. В – морфометрическая стратификация соединительнотканых компонентов

В результате исследования с помощью t-критерия Уэлча клеточной и ядерной кривизны посредством измерения их эксцентриситетов, отражающих плеоморфизм, было установлено, что клеточный эксцентриситет новообразований статистически достоверно отличается от этого же параметра клеток здоровой ткани, где в первом случае он составил 0,7, а во втором 0,73 $p < 0,001$, где 95 % доверительный интервал для разности средних был в диапазоне от -0,27 до -0,19, дельта Гласса при этом составила -0,3. Иная картина наблюдалась при изучении эксцентриситета ядер, где наибольшую кривизну наблюдали у опухолевой ткани со значениями 0,71, при которой ядра имеют более вытянутую форму. Для здоровой ткани данный показатель составил 0,68, что делает данные ядра ближе по форме к обычному эллипсу, 95 % доверительный интервал составил 0,19–0,31, дельта Гласса была равна 0,2. Малые значения оценки эффектов говорят о наибольшей ценности полученных результатов, отражают особенности изменения клеточной и ядерной кривизны, которые удалось выявить благодаря размеру выборки (Рисунок 8).

У кошек анализ с помощью t-критерия Уэлча морфометрических критериев, демонстрирующих кривизну клетки и ядра, представленных их эксцентриситетами, имели характерные особенности, при которых их формы были более приближенными к идеальному эллипсу для малигнизированной ткани, тогда как для здоровой форма была более вытянутой. Клеточный эксцентриситет для опытной группы составил 0,69, а для контрольной – 0,74 $p < 0,001$, 95 % доверительный интервал для разницы средних был -0,45 для нижней границы и -0,38 для верхней, дельта Гласса была на уровне -0,5, что говорит о среднем эффекте разности между исследуемыми группами. Эксцентриситет ядра для первой группы оказался 0,69, в то время как для второй он был 0,71 $p < 0,001$, 95 % доверительный интервал составил -0,35 и -0,25, размер эффекта исследуемого параметра был низкий и составил -0,2 дельта Гласса, что еще раз подчеркивает крайне слабо выраженную особенность клеточной и ядерной кривизны, которая обнаруживается только благодаря размеру выборки (Рисунок 9).

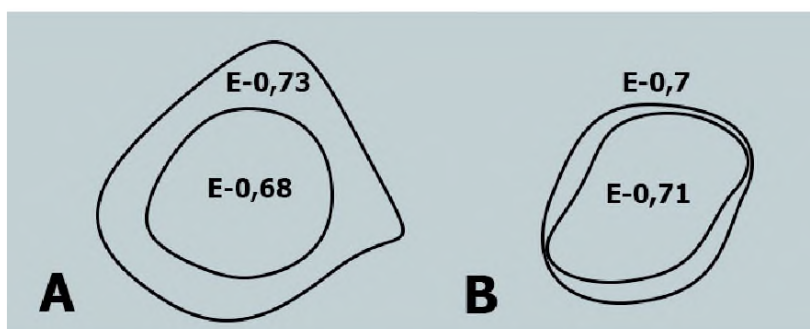


Рисунок 8 – Схематическое изображение кривизны клеток и ядер у собак в зависимости от их значений эксцентриситета. А – здоровая ткань. В – малигнизированная опухоль молочной железы

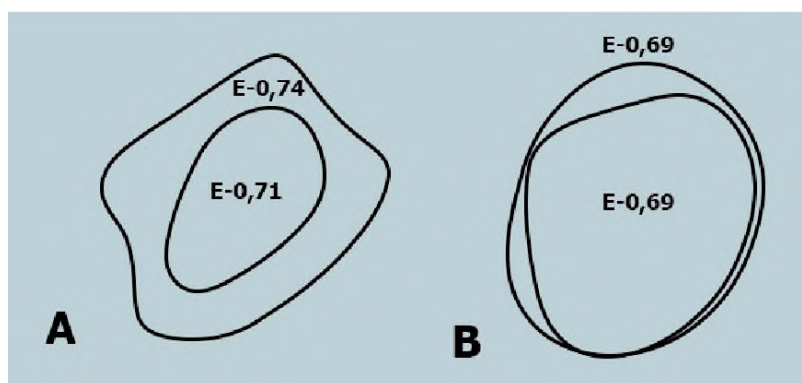


Рисунок 9 – Схематическое изображение кривизны клеток и ядер у кошек в зависимости от их значений эксцентриситета. А – здоровая ткань. В – малигнизированная опухоль молочной железы

У собак при построении регрессионной модели наиболее достоверной оказалась линейная модель, высоко предсказывающая значения эксцентриситетов, при которой коэффициент детерминации составил 0,4 $p < 0,001$, с константой 0,16. Согласно построенной модели эксцентриситет ядер изменяется на 0,078 на каждую 0,1 изменения значения клеточного эксцентриситета (Рисунок 10).

У кошек также был выявлен линейный характер регрессионного уравнения $p < 0,001$, при котором показатели определялись с высокой вероятностью при коэффициенте детерминации, равном 0,4, с константой 0,16. Согласно полученной модели, эксцентриситет ядра менялся на 0,076 единиц при изменениях значений клеточного эксцентриситета на 0,1 (Рисунок 11).

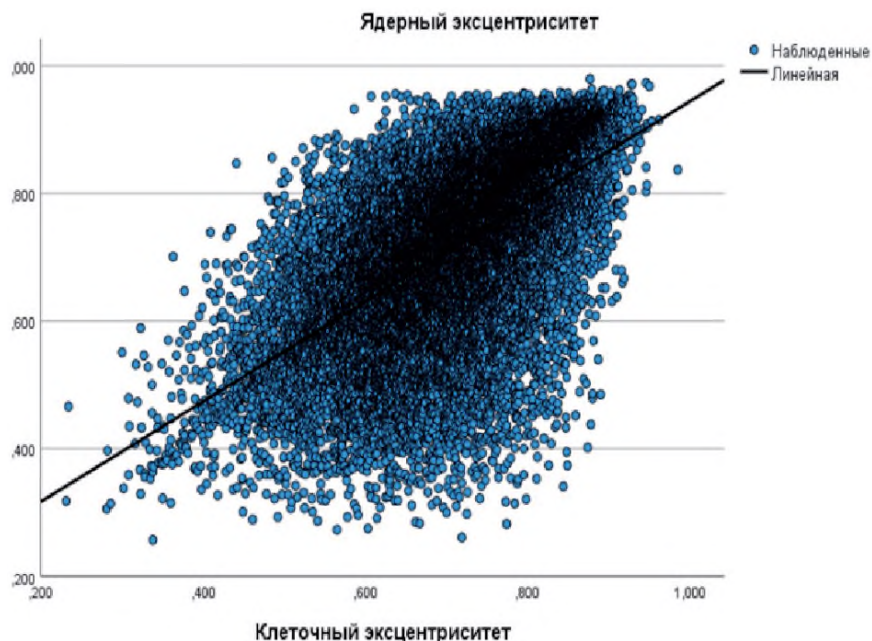


Рисунок 10 – Линейная регрессионная модель зависимости ядерного и клеточного эксцентриситетов опухолевой ткани собак

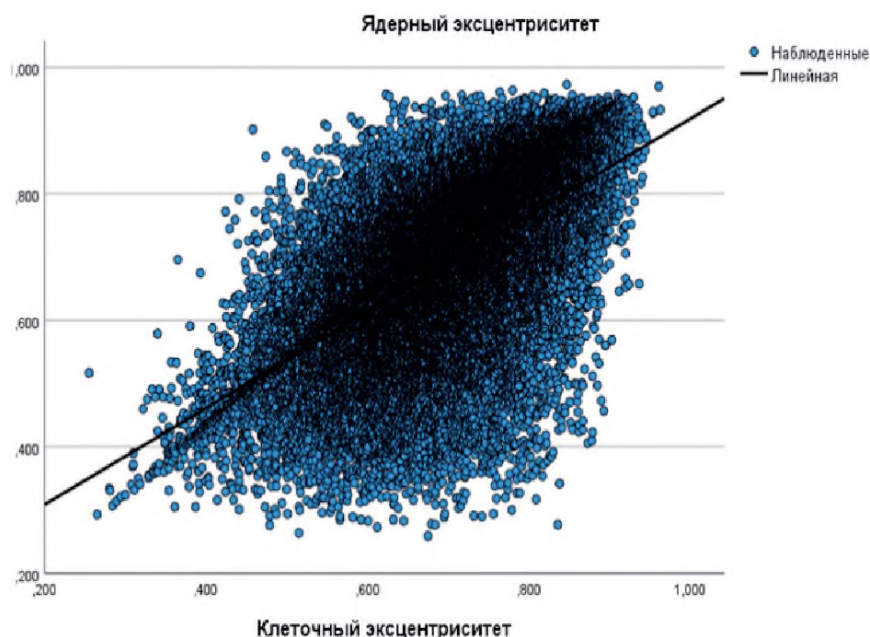


Рисунок 11 – Линейная регрессионная модель зависимости ядерного и клеточного эксцентриситетов опухолевой ткани кошек

Морфометрические исследования параметров микроскопической структуры и клинко-прогностических критериев

Исследование морфометрических параметров микроскопических структур опухолевой ткани, клинических и прогностических критериев у кошек выявили статистически достоверные особенности их взаимодействия, в то время как у собак данные критерии имели менее выраженные клинко-прогностические свойства.

Морфометрические критерии клеточно-ядерного компонента опухолевой ткани при проведении t-критерия Стьюдента продемонстрировали статистически достоверные различия показателей ядерного эксцентриситета в зависимости от интравасации прилегающих сосудов $p=0,012$. В ходе анализа результатов было установлено, что в новообразованиях, не имеющих опухолевых эмболов, показатели ядерного эксцентриситета были 0,69, при этом у неоплазий с эмболизацией значения составили 0,66 с 95 % доверительным интервалом разницы средних значений для нижней 0,005 и верхней 0,045 границы, размер эффекта d Коэна был на уровне 0,8, что говорит о сильной разнице средних значений (Рисунок 12, Таблица 5).

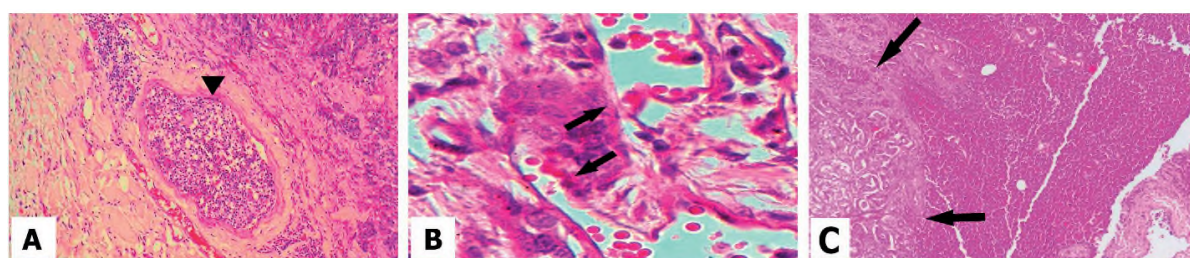


Рисунок 12 – Дольковая карцинома (G3). Кошка, беспородная, 11 лет.
А – (▼) Опухолевый эмбол в кровеносном сосуде, ув. $\times 100$. В – (↑) Интравасация опухолевыми клетками прилегающих кровеносных сосудов. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 600$. С – (↑) Макрометастаз, обнаруживаемый в сторожевом паховом лимфатическом узле, при опухолевой интравасации сосудов, ув. $\times 40$

Таблица 5 – Клеточно-ядерные морфометрические параметры опухоли в зависимости от эмболизации прилегающих сосудов у кошек

Интравасация прилегающих сосудов	Морфометрические критерии	
	Е ядра	
	$M \pm SD$	95 % ДИ d Коэна
Нет ($n=36$)	$0,69 \pm 0,03^*$	(0,005–0,045) 0,8
Да ($n=17$)	$0,66 \pm 0,04^*$	

Примечание: * – статистически достоверный уровень значимости при $p \leq 0,05$.

Дифференциальный анализ морфометрических параметров тубулярной и солидной карциномы

Исследования морфометрических параметров наиболее распространенных гистологических типов злокачественных новообразований молочных желез выявили ряд ценных критериев, позволяющих дифференцировать данные карциномы на представленном уровне.

Исследование кривизны формы клеток и ядер у собак с помощью дисперсионного анализа также предоставило статистически достоверные результаты $p < 0,001$. Клеточный эксцентриситет имел значимые различия среди всех групп при анализе Геймса–Хоуэлла. Показатели данного критерия у тубулярной карциномы были выше, чем у солидной, и составили 0,71 и 0,7 соответственно, $p=0,007$, 95 % доверительный интервал для разности средних значений составил 0,001–0,01, размер эффекта дисперсионного анализа эта-квадрат был 0,007, что подчеркивает крайне слабую силу разницы общих результатов. Показатели обоих гистологических типов также достоверно отличались от контрольной группы 0,73 $p < 0,001$, где 95 % доверительный интервал для тубулярной карциномы составил 0,015–0,026 и для солидной 0,02–

0,03. Параметры ядерного эксцентриситета, как и в случае с клеточным, также продемонстрировали достоверно значимые различия между группами при анализе Геймса–Хоуэлла. Так, параметры тубулярной карциномы были меньше солидной и находились на уровне 0,71 и 0,72 соответственно каждому гистологическому типу $p=0,004$, с 95 % доверительным интервалом -0,13 для нижней и -0,002 для верхней границы, размер эффекта дисперсионного анализа эта-квадрат составил 0,006, что так же, как и в случае с прошлым критерием, говорит о крайне слабо выраженной силе разницы значений. Оба гистологических типа статистически значимо отличаются от контрольной группы 0,68, 95 % доверительный интервал для тубулярной карциномы составил -0,03 и -0,02, для солидной -0,04 и -0,02 (Таблица 6).

Таблица 6 – Значения кривизны клеточно-ядерных морфометрических критериев в зависимости от гистологического типа опухоли у собак

Морфометрический критерий	Гистологический тип новообразования		
	Тубулярная карцинома ($n=15$)	Солидная карцинома ($n=12$)	Контрольная группа ($n=50$)
	$M \pm SD$		
<i>Е клетки</i> ($n_1=6900$), ($n_2=2400$)	$0,71 \pm 0,11^{* \#}$	$0,7 \pm 0,1^{* \sim}$	$0,73 \pm 0,1^{* \sim}$
<i>Е ядра</i> ($n_1=6900$), ($n_2=2400$)	$0,71 \pm 0,14^{* \#}$	$0,72 \pm 0,13^{* \sim}$	$0,68 \pm 0,13^{* \sim}$

Примечание: * – статистически значимые различия между первой и второй группой, # – статистически значимые различия между первой и третьей группой, ~ – статистически значимый уровень между второй и третьей группой при $p \leq 0,05$.

Среди клеточно-ядерных морфометрических критериев, отражающих вытянутость их формы у кошек, дисперсионный анализ выявил, что наибольшей дифференциальной значимостью обладали параметры эксцентриситета ядер, продемонстрировавшие статистически значимые различия результатов $p < 0,001$. Данный параметр у тубулярной карциномы был меньше солидной и составил 0,68, тогда как для солидной значения были 0,69 $p < 0,001$, 95 % доверительный интервал разности средних значений составил -0,014 для нижней и -0,006 для верхней границы, размер эффекта дисперсионного анализа эта-квадрат был на уровне 0,005, что указывает на выраженность слабой разницы между средними значениями группы. Также перечисленные гистологические типы достоверно отличались от контрольной группы 0,71 $p < 0,001$, где доверительный интервал для тубулярной карциномы был 0,03 и 0,04, а для солидной – 0,02 и 0,03. Клеточный эксцентриситет при этом не проявил дифференциальной значимости между новообразованиями. Достоверные отличия показателей были обнаружены только между контрольной группой 0,74, где уровень значимости для обоих гистологических типов составил $p < 0,001$ (Таблица 7).

Таблица 7 – Значения кривизны клеточно-ядерных морфометрических критериев в зависимости от гистологического типа опухоли у кошек

Морфометрический критерий	Гистологический тип новообразования		
	Тубулярная карцинома ($n=32$)	Солидная карцинома ($n=21$)	Контрольная группа ($n=50$)
	$M \pm SD$		
<i>Е ядра</i> ($n_1=14390$), ($n_2=9600$), ($n_3=2400$)	$0,68 \pm 0,13^{* \#}$	$0,69 \pm 0,14^{* \sim}$	$0,71 \pm 0,12^{* \sim}$
<i>Е клетки</i> ($n_1=14390$), ($n_2=9600$), ($n_3=2400$)	$0,69 \pm 0,1^{* \#}$	$0,69 \pm 0,1^{* \sim}$	$0,74 \pm 0,09^{* \sim}$

Примечание: * – статистически значимые различия между первой и второй группой, # – статистически значимые различия между первой и третьей группой, ~ – статистически значимый уровень между второй и третьей группой.

Исследование ядрышковых структур у собак с помощью критерия U Манна–Уитни, так же как и клеточно-ядерных, предоставили статистически достоверные результаты. Площадь ядрышек у тубулярной карциномы была больше солидных и составила 2,2 мкм² для первого и 1,9 мкм² для второго гистологического типа, $p < 0,001$. Индекс расстояния (ID), в свою очередь, так же как и в случае с площадью ядрышек, был больше у тубулярной карциномы и составил 5,46, тогда как у солидной он был 5,24 $p < 0,001$ (Рисунок 13).

У кошек ядрышковые морфометрические показатели, согласно полученным данным, являются ценными критериями в дифференцировке исследуемых гистологических типов. У тубулярных карцином при проведении анализа U Манна–Уитни общая площадь ядрышек оказалась меньше в сравнении с солидными и составила 1,2 мкм², тогда как у солидных значения были 2,4 мкм², $p < 0,001$. Индекс расстояния при проведении анализа t-критерия Уэлча также продемонстрировал статистически значимые различия среди изучаемых групп. У тубулярных карцином показатели были 4,7, тогда как у солидных они оказались больше и составили 5,2 $p < 0,001$, 95 % доверительный интервал разности средних значений для верхней границы был -0,5 и нижней -0,4, размер эффекта разности показателей d Козна был на уровне -0,4, что свидетельствует о средних отличиях значений между исследуемыми гистологическими типами (Рисунок 14).

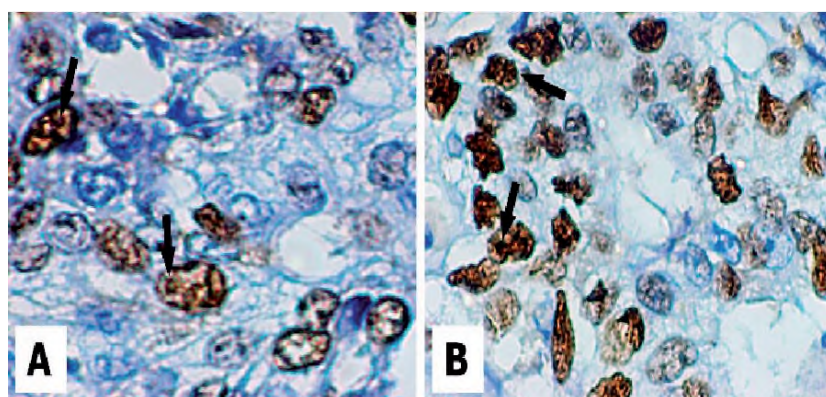


Рисунок 13 – Экспрессия NCL⁺ (↑) в ядрышках. А – тубулярная карцинома (G2). Собака, боксер, 8 лет. В – солидная карцинома (G2). Собака, чихуахуа, 5 лет. ИГХ реакция с окрашиванием DAB-хромогена, ув. ×600

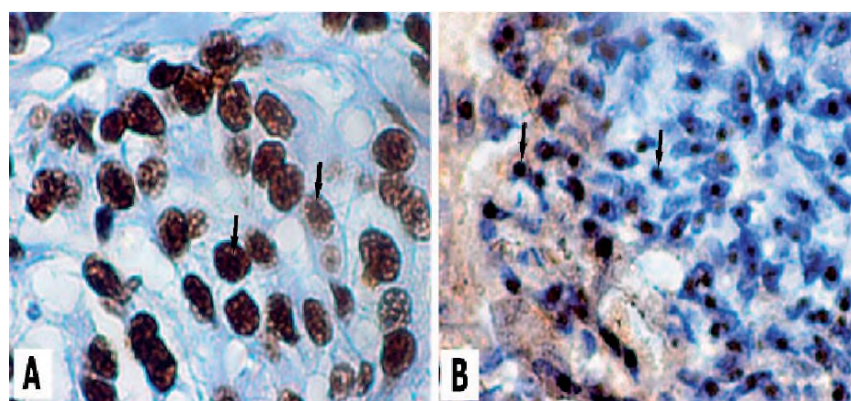


Рисунок 14 – А – экспрессия NCL⁺ (↑) в ядрышках. Тубулярная карцинома (G3). Кошка, метис, 15 лет. В – экспрессия NPH⁺ (↑) в ядрышках. Солидная карцинома (G3). Кошка, сиамская, 15 лет. ИГХ реакция с окрашиванием DAB-хромогена, ув. ×600

Показатели площади ядрышек при проведении анализа Краскела–Уоллиса достоверно отличались между высокодифференцированными (G1) и низкодифференцированными новообразованиями (G3) $p < 0,001$, где у первых значения были на уровне 0,8 мкм², а у вторых – 2,8 мкм². Также различия были обнаружены между умеренно дифференцированными

(G2) и низкодифференцированными $p < 0,001$, где их показатели были равны значениям G1. Индекс расстояния при этом при проведении дисперсионного анализа продемонстрировал различие значений средних среди всех групп. ID у высокодифференцированных новообразований был равен 4, у умеренно дифференцированных – 4,1 и у низкодифференцированных – 6, уровень значимости между каждой сравниваемой группой был $p < 0,001$, 95 % доверительный интервал разности средних G1–G2 составил -0,2 и -0,04, G1–G3 -1,9 и -1,8, а также G2–G3 -1,9 и -1,7. Размер эффекта дисперсионного анализа эта-квадрат составил 0,5, что свидетельствует о средней силе разности показателей изучаемых гистологических типов (Таблица 8).

Таблица 8 – Значения ядрышковых морфометрических критериев в зависимости от степени дифференцировки новообразования у кошек

Морфометрический критерий	Степень дифференцировки (G) новообразования		
	G1 (n=12)	G2 (n=9)	G3 (n=11)
	Mdn (IQR)		
<i>S ядрышек</i> ($n_1=1170$), ($n_2=780$)	0,8 (0,6) #	0,8 (0,9) ~	2,8 (2,2) #-
	<i>M ± SD</i>		
<i>ID</i> ($n_1=1170$), ($n_2=780$)	4 ± 0,7 **	4,1 ± 0,8 *~	6 ± 1 #-

Примечание: * – статистически значимые различия между первой и второй группой, # – статистически значимые различия между первой и третьей группой, ~ – статистически значимый уровень между второй и третьей группой при $p \leq 0,05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были получены ценные данные, характеризующие морфологические аспекты опухолей молочных желез у собак и кошек, характер онкологического процесса и особенности формирования микроскопической структуры в разных гистологических типах.

В ходе исследования был сформирован уникальный нозологический профиль разнообразных аспектов онкологической патологии молочных желез для определенной географической зоны, при котором наблюдаются общие тенденции, характерные для глобальной картины развития представленных неоплазий.

Было установлено, что размер новообразования имеет непосредственное значение для клинической оценки с целью прогнозирования исхода онкологического процесса. Исключительной особенностью стала взаимосвязь морфометрических параметров лимфоузлов в прогнозировании метастатического потенциала, с внедрением установленных параметров в клиническую ветеринарную онкологию.

В ходе исследования микроскопической структуры малигнизированных новообразований были установлены характерные морфометрические показатели различных компонентов ткани, отличающихся от этих же параметров здоровой молочной железы, что подчеркивает значимость полученных результатов и предоставляет возможность для дополнительной оценки изучаемого образца.

Полученные результаты коррелятивных отношений различных морфометрических критериев раскрывают картину взаимодействия микроскопических структур опухолевой ткани, отражающих онкологический процесс. Установлено, что увеличение площади ядер приводит к снижению ее кривизны, делая их форму стремящейся ближе к сфере. Также обозначена трофическая роль васкуляризации опухолевой ткани, приводящей к увеличению размеров клеток и ядер.

При сопоставлении результатов анализа связи морфометрических критериев микроскопической картины и клинико-прогностических параметров было установлено важное влияние размеров опухолевого очага на развитие соединительнотканного компонента. Установлена связь ядерного эксцентриситета и сосудистой эмболизации опухолевыми клетками.

Морфометрические критерии микроскопических структур демонстрируют выраженную дифференциальную значимость в оценке тубулярных и солидных карцином молочных желез домашних плотоядных животных.

В ходе исследования различных аспектов нозологического профиля и морфометрических параметров опухолевой ткани, а также их взаимосвязи между собой и клинко-прогностическими параметрами были сделаны выводы.

Выводы

1. Клинические и микроскопические морфометрические критерии, характеризующие размеры опухолевого очага и параметры микроскопической структуры опухолевой ткани имеют значение в оценке малигнизированного очага, прогнозировании его исхода и дифференциальном анализе карцином молочных желез.

2. Новообразования молочных желез регистрируются в гериатрическом возрасте у собак в периоде от 8 до 11 лет, у кошек – от 10 до 16 лет.

3. В соответствии с социально-экономическими условиями географической зоны породами, наиболее предрасположенными к возникновению злокачественных новообразований, у собак являются йоркширские терьеры – 9,5 %, немецкие овчарки – 7,9 %, сибирские хаски – 6,3 %, ротвейлер – 4,8 %. Доброкачественные опухоли встречаются у такс – 13,5 %, йоркширских терьеров – 8,1 %, мексиканских голых собак и тойтерьеров – 5,4 %. Среди кошек малигнизированные опухоли встречаются у британских короткошерстных – 8,5 %, шотландских вислоухих и прямоухих – 3,7 %. Доброкачественные, помимо перечисленных ранее, обнаруживаются у невиской маскарадной – 5,9 %.

4. Злокачественные новообразования как у собак, так и кошек вне зависимости от гряды молочных желез чаще развиваются в брюшных молочных пакетах – в 34 % и 58 % случаев. На втором месте у собак поражаются паховые – 25 %, а у кошек грудные – 34 %, смежные зоны у обоих видов поражаются редко.

5. Неблагоприятный прогноз исхода онкологической патологии молочных желез у собак наблюдают у некастрированных животных с поражением брюшных и паховых молочных пакетов при диаметре опухолей более 60 мм, с объемом паховых сторожевых лимфатических узлов больше 380 мм³. У кошек при диаметре опухолевого очага больше 30 мм с массой опухоли более 11–12 г, площадью поперечного сечения пахового сторожевого лимфатического узла более 60 мм² и с диаметром подмышечного лимфоузла более 10 мм.

6. У собак и кошек стромальный компонент более развит в здоровой молочной железе и занимает $M \pm SD$, 77 ± 13 % и 80 ± 19 % ткани, паренхиматозный компонент 23 ± 13 % и 20 ± 19 % соответственно, тогда как в малигнизированной стромальный компонент представлен 46 ± 23 % и 44 ± 21 %, паренхиматозный – 53 ± 23 % и 54 ± 21 %.

7. У собак и кошек в здоровой молочной железе площадь сосудов составляет Mdn (IQR), 191 (495) мкм² и 169 (451) мкм², плотность сосудов 0,02 (0,02), индекс васкуляризации 1,03 (1) и 0,6 (1,3). В малигнизированных новообразованиях площадь сосудов 142 (362) мкм² и 126 (274) мкм², плотность сосудов 0,03 (0,03) и индекс васкуляризации 1,45 (3,8) и 1,2 (2,7), что отражает картину интенсивного неоангиогенеза злокачественных опухолей.

8. В здоровой ткани молочных желез собак и кошек площадь люминальных эпителиоцитов составляет $M \pm SD$, 64 ± 22 мкм² и 52 ± 22 мкм², тогда как в новообразованиях показатели ниже – 58 ± 24 мкм² и 51 ± 21 мкм², что обусловлено высокой плотностью клеток в малигнизированной ткани. Площадь ядра в здоровой ткани составляет 21 ± 7 мкм² и 14 ± 7 мкм², в новообразованиях – 27 ± 14 мкм² и 24 ± 12 мкм² вследствие усиления синтетической функции ядер.

9. Ядерный эксцентриситет в здоровой молочной железе у собак составляет $M \pm SD$, $0,68 \pm 0,13$, тогда как в малигнизированной ткани он $0,71 \pm 0,14$, что обуславливает большую вытянутость формы у последних. У кошек показатели ядерного эксцентриситета в здоровой ткани составили $0,71 \pm 0,12$, в опухолевой – $0,69 \pm 0,14$, данные показатели отражают более сферические очертания для последних. Увеличение размеров площади ядер приводит к снижению их эксцентриситета. Клеточные и ядерные эксцентриситеты линейно связаны и увеличиваются при изменении одного из них. Также возможно предсказывать значение одного из эксцентриситетов при изучении показателя хотя бы одного критерия.

10. Снижение ядерного эксцентриситета с 0,69 до 0,66 у кошек связано с интравазацией малигнизированными клетками прилегающих сосудов.

11. Сосудистая плотность у кошек достигает наибольших значений в умеренно дифференцированных новообразованиях при значении 0,05 сосудов на мм².

12. Для дифференцировки тубулярных и солидных карцином у собак необходимо исследовать такие морфометрические критерии, имеющие прогностическую значимость, как: диаметр сосудов 9 (10) и 14 (16), плотность сосудов 0,04 (0,04) и 0,03 (0,02), площадь клетки 58 ± 20 мкм² и 57 ± 26 мкм², площадь ядра 30 ± 12 мкм² и 24 ± 13 мкм², ЯЦО 1 (0,8) и 0,7 (0,5), клеточный эксцентриситет $0,71 \pm 0,11$ и $0,7 \pm 0,1$, ядерный эксцентриситет $0,71 \pm 0,14$ и $0,72 \pm 0,13$, а также площадь ядрышек $2,2 (1,8)$ мкм² и $1,9 (1,5)$ мкм² и ID $5,46 (1,44)$ и $5,24 (1,24)$.

13. Для дифференцировки тубулярных и солидных карцином у кошек необходимо исследовать такие морфометрические критерии, имеющие прогностическую значимость, как: процентное содержание площади стромы 46 ± 21 % и 40 ± 20 %, процентное содержание площади паренхимы 52 ± 21 % и 57 ± 19 %, СПО 0,9 (1,2) и 0,7 (0,9), площадь сосудов $135 (284)$ мкм² и $122 (267)$ мкм², плотность сосудов 0,033 (0,044) и 0,028 (0,033), площадь ядер 24 ± 12 мкм² и 22 ± 10 мкм², ядерный эксцентриситет $0,68 \pm 0,13$ и $0,69 \pm 0,14$, а также площадь ядрышек $1,2 (1,2)$ мкм² и $2,4 (1,2)$ мкм² и ID 4,7 и 5,2.

14. У кошек для постановки степени дифференцировки G1 и G3 тубулярных карцином необходимо использовать значения площади ядрышек, где их значения составляют 0,8 (0,6) мкм² и $2,8 (2,2)$ мкм², в то время как для дифференциации G1, G2 и G3 необходимо использовать ID $4 \pm 0,7$; $4,1 \pm 0,8$ и 6 ± 1 .

Практические предложения

1. Для предварительной оценки злокачественности и возможного исхода наблюдаемой онкологической патологии молочных желез в рутинной ветеринарной клинической и лабораторной практике предлагается использовать разработанные чек-листы с установленными морфометрическими параметрами опухолевого очага, паховых и подмышечных лимфатических узлов.

2. Для корректной интерпретации в лабораторной диагностике при анализе опухолей и лечебного патоморфоза в качестве дополнительной оценки рекомендуется применять дифференциально значимые морфометрические параметры микроскопической структуры, такие как: процентное содержание площади стромального и паренхиматозного компонентов, СПО, диаметр, площадь, плотность сосудов и VI, площадь клеток люминальных эпителиоцитов, ядер, ЯЦО, клеточные и ядерные эксцентриситеты, площадь ядрышек и ID.

3. Полученные количественные значения рекомендуется использовать в качестве базовых данных для машинного обучения с целью интерпретации диагноза изучаемого образца в ветеринарной телемедицине и цифровой патологии, также для создания ветеринарной классификации TNM (tumor, nodus, metastasis) для мелких домашних животных.

4. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы для проведения других научных исследований, также их можно применять в учебном процессе вузов и колледжей биологического профиля, для составления учебных и справочных пособий и монографий видовой, возрастной, породной, структурной и количественной морфологии разных видов животных.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Изученные морфометрические критерии микроскопической структуры соединительнотканых, сосудистых, клеточно-ядерных и ядрышковых компонентов, а также клинических и прогностических параметров предоставляют ценную информацию о морфологической структуре опухолевой ткани, характере онкологического процесса и выступают в качестве предикторов для предварительной оценки исхода онкологической патологии или развития других микроскопических структур. Однако изученный ряд морфометрических критериев не может объяснить всей картины опухолевого процесса, для более точной интерпретации лабораторных диагнозов и клинических исследований необходимо увеличить количество достоверно значимых критериев, охватывающих большой спектр морфологических и молекулярно-генетических структур.

Одними из важных перспектив дальнейшего изучения представленной темы является внедрение впервые полученных и дополненных результатов в разработку искусственных интеллектов биологического направления для анализа и интерпретации результатов исследуемых опухолевых тканей. Также для понимания модели роста популяции неопластиче-

ских клеток и разработки терапевтических схем необходимо дальнейшее изучение активности малигнизированных тканей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. Митенко, В. В. Взаимосвязь метрических показателей с гистологическими типами опухолей молочных желез у животных-компаньонов // В. В. Митенко, **Д. Б. Галустян**, О. В. Дилекова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2023. – № 2 (100). – С. 210–216.
2. Митенко, В. В. Экспрессия ядрышковых организаторов в опухолевых клетках молочных желез у кошек / В. В. Митенко, **Д. Б. Галустян** // Иппология и ветеринария. – 2023. – № 1(47). – С. 70–76.
3. **Галустян, Д. Б.** Морфометрические параметры опухоли молочной железы как новые критерии в дифференцировке гистологических типов у собак / Д. Б. Галустян, О. В. Дилекова // Ветеринарная патология. – 2024. – № 23 (4). – С. 37–44.

Статьи в изданиях, индексируемые в базе научного цитирования Scopus

4. Canine mixed tumors as one of the mammary neoplasia varieties / V. Mitenko, O. Dilekova, **D. Galustyan** et al. // Brazilian Journal of Veterinary Pathology. – 2023. – Vol. 16. – P. 86–95.

Публикации в материалах других изданий

5. **Галустян, Д. Б.** Стереометрическая дифференцировка морфометрических критериев гистологических типов опухолей молочных желез собак и кошек / Д. Б. Галустян, О. В. Дилекова // Развитие агропромышленного комплекса в науке и образовании в Российской Федерации в период цифровизации. – Екатеринбург : Издательство Уральского государственного аграрного университета, 2024. – С. 81–85.

Методические рекомендации

6. **Галустян, Д. Б.** Морфологическая и морфометрическая оценка злокачественных новообразований молочных желез и степени их дифференцировки у собак и кошек : методические рекомендации / Д. Б. Галустян, О. В. Дилекова, В. С. Скрипкин. – Ставрополь, 2025. – 40 с.

