

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

КОВАЛЕНКО МАКСИМ СТАНІСЛАВОВИЧ

УДК 637.7:619:618.19-006:616-089

**ДИСЕРТАЦІЯ
КЛІНІКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ТА МЕТРОНОМНОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ
ЗА ПУХЛИН МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ У СОБАК**

Спеціальність 211 «Ветеринарна медицина»

Галузь знань 21 «Ветеринарна медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання
на відповідне джерело

М. С. Коваленко

Науковий керівник – **Білий Дмитро Дмитрович,**
доктор ветеринарних наук, професор

Дніпро – 2025

АНОТАЦІЯ

Коваленко М.С. **Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак.** Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» (21 «Ветеринарна медицина»). Дніпровський державний аграрно-економічний університет. Дніпро, 2025.

Дисертаційна робота присвячена клініко-експериментальному обґрунтуванню нового вирішення проблеми комплексного лікування собак за неоплазій молочної залози на підставі визначення біологічних маркерів неангіогенезу, проліферації та інвазії пухлинних клітин у кровоносні і лімфатичні судини, результати якого слугували підґрунтям для розробки і вивчення клінічної ефективності поєданого використання хірургічного лікування та ад'ювантної метрономної терапії хіміопрепаратом циклофосфамід і перепрофільованим антигіперглікемічним препаратом метформін.

Наукова новизна полягає в тому, що вперше проведено аналіз захворюваності собак на новоутворення молочної залози, визначено поширення, фактори ризику та прогноз їх біологічної поведінки за даними лікарень ветеринарної медицини міст Дніпра і Запоріжжя. Уперше узагальнено інформацію щодо часу між виявленням ознак захворювання власниками до початку лікування, щорічну динаміку верифікації пухлин за гістологічними типом та взаємозв'язок клінічної стадії із ангіо- і лімфоінвазією ракових клітин. Пухлинні осередки діагностували в кровоносних судинах: за I стадії в 10–25 %, II стадії – 26,3–31,6 %, III стадії – 36,2–51,7 %, IV стадії – 45,5–70,6 %, лімфатичних – 3,3; 6,4–10,5; 33,3–41,4 та 51,0–52,9 пацієнтів, відповідно.

Уперше проведено порівняний аналіз рівня біохімічних показників крові сук із нормальною та надлишковою масою тіла, вивчено експресію та

встановлено взаємозв'язок біологічних маркерів, які характеризують інтенсивність неангіогенезу (VEGF), проліферації (Ki-67) й інвазії (ММП-2 і -9) за злоякісних неоплазій молочної залози.

Визначено ефективність хірургічного лікування сук із злоякісними пухлинами молочної залози залежно від клінічної стадії, гістологічного типу та інвазії у судини. Клінічно та експериментально обґрунтована можливість та ефективність протипухлинної дії перепрофільованого антидіабетичного засобу метформін за комплексного лікування собак із злоякісними новоутвореннями молочної залози. Перепрофілювання передбачає використання існуючого препарату для терапії захворювання, для якого раніше він не був показаний.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що визначено біологічні маркери, які дозволяють в клінічних умовах об'єктивно оцінити важкість перебігу захворювання та обґрунтовують рекомендований протокол лікування сук із злоякісними неоплазіями молочної залози.

Отримані результати дисертації впроваджено в освітній процес підготовки здобувачів другого (магістерського) і третього (освітньо-наукового) рівнів вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина».

Виконання наукової роботи передбачало проведення чотирьох етапів досліджень. Перший етап включав статистичну обробку, аналіз даних, які дозволяли встановити стан вирішення проблеми пухлин молочної залози у собак на основі визначеного рівня захворюваності із урахуванням сприйнятливості, етіологічних факторів, нозологічних форм, клінічної стадії. Другий етап передбачав вивчення молекулярних маркерів для обґрунтування розробленої схеми лікування (VEGF, Ki-67, ММП-2 і -9). Впродовж третього етапу досліджень визначали клінічну ефективність хірургічного лікування сук за злоякісних новоутворень молочної залози, четвертого – комбінованого протоколу, який крім мастектомії включав ад'ювантну метрономну терапію циклофосфамідом і метформіном.

Актуальність проблеми новоутворень молочної залози у сук підтверджено результатами моніторингових досліджень в умовах міст Дніпро і Запоріжжя, проведених протягом 2018–2023 років. Кількість виявлених випадків захворювання протягом зазначеного періоду суттєво не змінилась на тлі незначного коливання співвідношення злоякісних і доброякісних пухлин в межах 1,02–1,07/1. У 2022 році реєстрували збільшення частки злоякісних нозологічних форм на тлі скорочення чисельності поголів'я собак в містах Дніпро та Запоріжжя.

У більшості випадків (67,1–72,1 %) проміжок часу від первинного виявлення неоплазій молочної залози (частіше власниками) до надання допомоги спеціалістами знаходився в межах 3 місяців, що підвищувало ймовірність сприятливого прогнозу.

Встановлена вікова сприйнятливість відповідає загальноприйнятій тенденції до збільшення кількості випадків захворювання на пухлини молочної залози із віком. За середнього віку онкохворих тварин $9,4 \pm 1,7$ років, максимальний ризик мали собаки, віком від 8 до 10 років. У структурі захворюваності частка таких тварин складала 33,5 %.

Результати аналізу впливу оваріогістеректомії на ризик розвитку пухлин молочної залози не підтвердили доцільність стерилізації сук як необхідного заходу для профілактики неоплазій.

Згідно із гістологічною класифікацією (за даними 2018–2023 років), найбільш поширеною серед доброякісних новоутворень молочної залози виявилась доброякісна змішана пухлина, яку щорічно верифікували в $47,9 \pm 5,4$ % випадків. Частіше (47,6 %) доброякісна змішана пухлина відносилась до III клінічної стадії. Більш ніж у половині випадків ($62,7 \pm 7,1$ %) серед злоякісних типів діагностували неоплазії епітеліального походження, частіше карциному комплексного типу (13,1 %), тубулярну карцинома (12 %), карциному змішаного типу (11,7 %). В структурі спеціальних типів епітеліальних злоякісних пухлин переважали муцинозна і секреторна карциноми (25,8 і 20 %, відповідно), сарком – карциносаркоми (39,1 %) та фібросаркоми (34,8 %).

Гістологічний тип неоплазій корелював із клінічною стадією та ймовірністю ангіо- та лімфатичної інвазії.

Неоплазійні ураження молочної залози супроводжуються зниженням ($p < 0,001$) в 1,3 раза концентрації гемоглобіну і гематокриту, в 1,8 раза вмісту еритроцитів; підвищенням ($p < 0,001$) в 1,5 рази рівня тромбоцитів, подовженням в 3 рази швидкості осідання еритроцитів ($p < 0,001$). За високого індексу маси тіла в онкохворих сук в 1,2 раза збільшується вміст тригліцеридів і глюкози ($p < 0,01$), 1,3 раза – холестерину ($p < 0,01$).

Визначені біологічні маркери, які обґрунтовують метрономну терапію циклофосфамідом і метформіном. Імуногістохімічно ММП-2 і -9 за доброякісних неоплазій молочної залози виявляли значно рідше, порівняно із злоякісними типами (3,80–6,33 % проти 32,93–63,47 % зразків плазми). Рівень експресії желатиназ в неоплазійній тканині злоякісних нозологічних форм перевищував значення доброякісних в 6,5–7,2 раза, у плазмі – в 9,2–9,3 раза. Прогресування захворювання із метастазуванням супроводжувалось посиленням у плазмі крові активності латентних форм ММП, порівняно із здоровими тваринами в 3,3–4,8 раза, доброякісними пухлинами – в 1,9–2,5 раза, активних форм ММП – 2,6–4,1 і 2,2–3,4 раза, відповідно. За зростання агресивності неоплазій молочної залози більш інтенсивно збільшувалась активність ММП-2 і -9 у неоплазійній тканині, відносно показників плазми крові.

Вищий ступінь злоякісності пухлин молочної залози корелює із частотою виявлення та інтенсивністю експресії VEGF, VEGF-1, VEGF-2 та Ki-67. Коефіцієнти кореляції становлять: VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2/Ki-67 – 1; VEGF/лімфо-/ангіоінвазія; VEGFR-1/VEGFR-2; Ki-67/лімфо-/ангіоінвазія – 0,662. Підвищення клінічної стадії з першої до четвертої супроводжується збільшенням кількості неоплазій, імунопозитивних до VEGF в 1,9 раза, VEGF-1 – 2,5 рази, VEGF-2 – 2,2 раза, Ki-67 – 2,1 раза, що свідчить про посилення неоангіогенезу і проліферативної активності пухлинних клітин та кореляції між ними. Збільшення розміру пухлини супроводжується

підвищення рівня експресії Ki-67. Таким чином, VEGF відіграє ключову роль в неангіогенезі та лімфо-/ангіоінвазії, які підтримуються факторами VEGFR-1 та VEGFR-2, а Ki-67 відображає агресивність новоутворення через проліферативний потенціал ракових клітин.

Медіана виживання за першої клінічної стадії (становила 13,1 місяця) була більшою, порівняно із тваринами, в яких діагностували другу (6,3 місяці) та третю стадію (5,4 місяці) – в 2,1 та 2,4 раза, відповідно. Кращі результати мастектомії отримано за видалення мукозної карциноми, карциноми *in situ* і веретеноподібноклітинної карциноми: медіана виживання становила 27,0; 19,8; 19,7 місяців, відповідно. За інвазії ракових клітин в кровоносні судини тривалість медіани виживання скорочувалась в 2,9 рази, у лімфатичні судини – в 2,8 рази, у лімфатичні вузли – в 2,6 рази. У сук із індексом *vet-NPI* (враховує наявність всіх трьох факторів ризику прогресування захворювання) більшим за 4, медіани виживаності зменшувалась в 1,4 раза.

Результати клінічної апробації комбінованого застосування у метрономному режимі циклофосфаміду і метформіну після проведення мастектомії з приводу неоплазій молочної залози продемонстрували їх ефективність та тлі кореляції із індексом маси тіла. Запропонований протокол дозволив подовжити медіану виживання у собак із нормальною масою тіла (за 9-бальною шкалою Baldwin et al., 2010) в 1,3 раза, надмірною та ожирінням – в 2,5 рази. Проте, за високого індексу маси тіла, порівняно із нормальним, скорочувала медіану виживання в 1,5 рази, що підтверджує ризик раннього прогресування захворювання у таких пацієнтів. Ад'ювантне метрономне призначення циклофосфаміду і метморфіну сприяло збільшенню медіани безрецидивного періоду у собак за нормальної маси тіла в 1,4 раза, ожиріння – 2,4 раза, тоді як надмірний індекс маси тіла слугував однією із причин зниження зазначеного показника в 1,5 рази (з 3,7 до 2,5 місяців). Включення метформіну до комбінованої схеми лікування сук із пухлинами молочної залози дозволило покращити клінічні результати лікування, насамперед у тварин, які мали надмірну масу тіла або ожиріння.

Проведення метрономної терапії у сук на тлі мастектомії не впливало на концентрацію глюкози у крові, також за відсутності впливу на показники ліпідного обміну (холестерин і тригліцериди).

Результати клініко-експериментальних досліджень слугують підґрунтям для рекомендації щодо практичного впровадження ад'ювантної метрономної терапії циклофосфамідом (доза 12,5 мг/м²) і метформіном (10 мг/кг) за лікування сук після екстирпації неоплазій молочної залози. Режим застосування зазначених лікарських засобів – щоденно один раз на добу протягом 6 місяців.

Ключові слова: собаки, пухлини, молочна залоза, хірургічне лікування, хіміотерапія, метформін, гематологія, біохімічні показники, гістопатологічна структура, медіана виживання, медіана безрецидивного періоду, прогностичні фактори, метастази, рецидиви.

ANNOTATION

Kovalenko M.S. **Clinical and experimental justification of surgical treatment and metronomic chemotherapy for mammary gland tumors in dogs.**

Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on acquisition of a Doctor of Philosophy scientific degree of a specialty 211 "Veterinary Medicine" (21 "Veterinary Medicine"). Dnipro State Agrarian and Economic University. Dnipro, 2025.

The dissertation work is devoted to the clinical and experimental substantiation of a new solution to the problem of complex treatment of dogs with mammary neoplasia based on the determination of biological markers of neoangiogenesis, proliferation and invasion of tumor cells into blood and lymphatic vessels, the results of which served as the basis for the development and study of the clinical effectiveness of the combined use of surgical treatment and adjuvant metronomic therapy with the chemotherapeutic drug cyclophosphamide and the reprofiled antihyperglycemic drug metformin.

The scientific novelty lies in the fact that for the first time an analysis of the incidence of dogs with mammary neoplasms was conducted, the distribution, risk factors and prognosis of their biological behavior were determined according to data from veterinary hospitals in the cities of Dnipro and Zaporizhia. For the first time, information has been summarized on the time between the detection of signs of the disease by the owners and the start of treatment, the annual dynamics of tumor verification by histological type, and the relationship of the clinical stage with angio- and lympho-invasion of cancer cells. Tumor foci were diagnosed in blood vessels: in stage I in 10–25%, stage II – 26.3–31.6%, stage III – 36.2–51.7%, stage IV – 45.5–70.6%, lymphatic – 3.3; 6.4–10.5; 33.3–41.4 and 51.0–52.9 patients, respectively.

For the first time, a comparative analysis of the level of biochemical blood parameters in bitches with normal and overweight body weight was conducted, the expression was studied and the relationship between biological markers characterizing the intensity of neoangiogenesis (VEGF), proliferation (Ki-67) and invasion (MMP-2 and -9) in malignant breast neoplasms was established.

The effectiveness of surgical treatment of bitches with malignant breast tumors was determined depending on the clinical stage, histological type and vascular invasion. The possibility and effectiveness of the antitumor effect of the repurposed antidiabetic drug metformin in the complex treatment of dogs with malignant breast neoplasms was clinically and experimentally substantiated. Repurposing involves the use of an existing drug for the treatment of a disease for which it was not previously indicated.

The practical significance of the results obtained is that biological markers have been identified that allow objective assessment of the severity of the disease in clinical conditions and justify the recommended treatment protocol for bitches with malignant mammary neoplasia.

The results of the dissertation were implemented in the educational process of training applicants for the second (master's) and third (educational and scientific) levels of higher education in the specialty 211 "Veterinary Medicine".

The implementation of the scientific work involved conducting four stages of research. The first stage included statistical processing, data analysis, which allowed establishing the status of solving the problem of mammary tumors in dogs based on the determined level of morbidity, taking into account susceptibility, etiological factors, nosological forms, clinical stage. The second stage involved studying molecular markers to substantiate the developed treatment regimen (VEGF, Ki-67, MMP-2 and -9). During the third stage of the study, the clinical effectiveness of surgical treatment of female dogs with malignant breast tumors was determined, and the fourth stage was a combined protocol, which, in addition to mastectomy, included adjuvant metronomic therapy with cyclophosphamide and metformin.

The relevance of the problem of breast tumors in female dogs was confirmed by the results of monitoring studies in the cities of Dnipro and Zaporizhia, conducted during 2018–2023. The number of detected cases of the disease during the specified period did not change significantly against the background of insignificant fluctuations in the ratio of malignant and benign tumors within 1.02–1.07/1. In 2022, an increase in the proportion of malignant nosological forms was recorded against the background of a decrease in the number of dogs in the cities of Dnipro and Zaporizhia.

In most cases (67.1–72.1 %) the time interval from the initial detection of mammary neoplasia (most often by owners) to the provision of assistance by specialists was within 3 months, which increased the likelihood of a favorable prognosis.

The established age susceptibility corresponds to the generally accepted tendency to an increase in the number of cases of mammary tumors with age. With an average age of cancer-stricken animals of 9.4 ± 1.7 years, dogs aged 8 to 10 years had the maximum risk. In the structure of morbidity, the share of such animals was 33.5 %.

The results of the analysis of the impact of ovariohysterectomy on the risk of mammary tumors did not confirm the feasibility of sterilization of bitches as a necessary measure for the prevention of neoplasia.

According to the histological classification (according to data from 2018–2023), the most common benign breast neoplasm was benign mixed tumor, which was verified annually in $47.9\pm 5.4\%$ of cases. More often (47.6%) benign mixed tumor belonged to the III clinical stage. In more than half of the cases ($62.7\pm 7.1\%$) among malignant types, neoplasias of epithelial origin were diagnosed, most often complex type carcinoma (13.1%), tubular carcinoma (12%), mixed type carcinoma (11.7%). In the structure of special types of epithelial malignant tumors, mucinous and secretory carcinomas prevailed (25.8 and 20%, respectively), sarcoma - carcinosarcoma (39.1%) and fibrosarcoma (34.8%). The histological type of neoplasia correlated with the clinical stage and the probability of angio- and lymphatic invasion.

Neoplastic lesions of the mammary gland are accompanied by a 1.3-fold decrease ($p<0.001$) in hemoglobin and hematocrit concentrations, a 1.8-fold decrease in erythrocyte content; an increase ($p<0.001$) in platelet levels by 1.5 times, and a 3-fold increase in erythrocyte sedimentation rate ($p<0.001$). With a high body mass index in cancer bitches, the content of triglycerides and glucose increases by 1.2 times ($p<0.01$), and cholesterol by 1.3 times ($p<0.01$).

Biological markers that justify metronomic therapy with cyclophosphamide and metformin have been determined. Immunohistochemically, MMP-2 and -9 were detected much less frequently in benign breast neoplasms compared to malignant types (3.80–6.33% versus 32.93–63.47% of plasma samples). The level of gelatinase expression in neoplastic tissue of malignant nosological forms exceeded the values of benign ones by 6.5–7.2 times, in plasma – by 9.2–9.3 times. The progression of the disease with metastasis was accompanied by an increase in the activity of latent forms of MMP in the blood plasma, compared with healthy animals by 3.3–4.8 times, benign tumors – by 1.9–2.5 times, active forms of MMP – by 2.6–4.1 and 2.2–3.4 times, respectively. With increasing aggressiveness of breast neoplasias, the activity of MMP-2 and -9 in the neoplastic tissue increased more intensively, relative to blood plasma indicators.

A higher degree of malignancy of breast tumors correlates with the frequency of detection and intensity of expression of VEGF, VEGF-1, VEGF-2 and Ki-67. The correlation coefficients are: VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2/Ki-67 – 1; VEGF/lympho-/angioinvasion; VEGFR-1/VEGFR-2; Ki-67/lympho-/angioinvasion – 0.662. The increase in clinical stage from the first to the fourth is accompanied by an increase in the number of neoplasias immunopositive for VEGF by 1.9 times, VEGF-1 by 2.5 times, VEGF-2 by 2.2 times, Ki-67 by 2.1 times, which indicates an increase in neoangiogenesis and proliferative activity of tumor cells and the correlation between them. An increase in tumor size is accompanied by an increase in the level of Ki-67 expression. Thus, VEGF plays a key role in neoangiogenesis and lympho-/angioinvasion, which are supported by VEGFR-1 and VEGFR-2 factors, and Ki-67 reflects the aggressiveness of the neoplasm due to the proliferative potential of cancer cells.

The median survival for the first clinical stage (13.1 months) was greater than that of animals diagnosed with the second (6.3 months) and third stage (5.4 months) by 2.1 and 2.4 times, respectively. The best results of mastectomy were obtained for the removal of mucous carcinoma, carcinoma in situ and spindle cell carcinoma: the median survival was 27.0; 19.8; 19.7 months, respectively. In case of invasion of cancer cells into blood vessels, the median survival duration was reduced by 2.9 times, into lymphatic vessels – by 2.8 times, into lymph nodes – by 2.6 times. In bitches with a vet-NPI index (taking into account the presence of all three risk factors for disease progression) greater than 4, the median survival decreased by 1.4 times.

The results of clinical testing of the combined use of cyclophosphamide and metformin in a metronomic regimen after mastectomy for breast neoplasia demonstrated their effectiveness and the correlation with body mass index. The proposed protocol allowed to extend the survival period in dogs with normal body weight (according to the 9-point scale of Baldwin et al., 2010) by 1.3 times, overweight and obese – by 2.5 times. However, with a high body mass index, compared to normal, it reduced the median survival by 1.5 times, which confirms the risk of early disease progression in such patients. Adjuvant metronomic

administration of cyclophosphamide and metformin increased the average lifespan of dogs with normal body weight by 1.4 times, and obese dogs by 2.4 times, while excessive body mass index was one of the reasons for the 1.5-fold decrease in this indicator (from 3.7 to 2.5 months). The inclusion of metformin in the combined treatment regimen for bitches with mammary tumors improved clinical outcomes, especially in animals with excess body weight or obesity.

Metronome therapy in bitches following mastectomy did not affect blood glucose concentration, nor did it affect lipid metabolism (cholesterol and triglycerides).

The results of clinical and experimental studies serve as a basis for recommendations on the practical implementation of adjuvant metronomic therapy with cyclophosphamide (dose 12.5 mg/m²) and metformin (10 mg/kg) for the treatment of dogs after and extirpation of breast neoplasia. The regimen for using these drugs is once a day for 6 months.

Keywords: dogs, tumors, mammary gland, surgical treatment, chemotherapy, metformin, hematology, biochemical parameters, histopathological structure, median survival, median relapse-free period, prognostic factors, metastases, recurrences.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, які відображають основні наукові результати дисертації:

Статті у наукових виданнях,

включених до наукометричної бази даних **Scopus**:

1. **Kovalenko, M., & Bilyi, D.** (2021). Prognostic value of vascular invasion in breast tumours in she-dogs (pilot study). *Scientific Horizons*, 24(2), 54–61. [https://doi.org/10.48077/scihor.24\(2\).2021.54-61](https://doi.org/10.48077/scihor.24(2).2021.54-61) (Дисертантом проведено дослідження щодо прогностичного значення інвазії ракових клітин у кровоносні і лімфатичні судини, проаналізовано їх результати, оформлено рукопис до друку).

Статті у наукових виданнях,

включених до наукометричної бази даних **Web of Science**:

2. **Kovalenko, M. S., Bilyi, D. D., Skliarov, P. M., Maslikov, S. N., Suslova, N. I., Spitsyna, T. L., & Yevtushenko, I. D.** (2021). Prognostic markers of canine mammary tumours: Retrospective study of 142 cases. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(4), 649–654. <https://doi.org/10.15421/022189> (Дисертантом проведено клінічні дослідження відносно визначення предикторів за неоплазій молочної залози у сук, надано аналітичну оцінку отриманим результатам, підготовлено рукопис до друку).

3. **Kovalenko, M. S., Bilyi, D. D., & Hrebeniuk, K. R.** (2023). The prognostic significance of the activities of matrix metalloproteinases-2 and -9 in dogs for mammary gland neoplasia (pilot study). *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(2), 273–277. <https://doi.org/10.15421/022340> (Здобувачем встановлено рівень експресії матриксних металопротеїназ-2 і -9 у сук із неоплазіями молочної залози і динаміку їх змін на тлі мастектомії, проаналізовано отримані дані та оформлено роботу до друку).

Статті у наукових фахових виданнях України:

4. Bilyi, D. D., & **Kovalenko, M. S.** (2023). Efficacy of metformin treatment for bitches with the mammary gland carcinoma. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 11(2), 21–28. <https://doi.org/10.32819/2023.11009> (Здобувачем розроблено протокол лікування до складу якого входив метморфін, проведено його клінічну апробацію та оцінку ефективності, підготовлено рукопис до друку).

Наукові праці, які засвідчують апробацію результатів дисертації:

5. Коваленко, М. С. (2020). Гістологічна діагностика новоутворень молочної залози у сук. У І. В. Кирпичова, Л. І. Пархоменко, С. М. Мічківський, А. М. Поляков, Д. С. Сопов, С. В. Цвяткова, Д. Г. Руднік (Ред.), *Актуальні проблеми та наукові звершення молоді на початку третього тисячоліття* (357–359). Луганський національний аграрний університет.

6. **Коваленко, М. С.** & Білий, Д. Д. (2021). Імуногістохімічна характеристика злужкісних пухлин молочної залози у сук. У О.А. Шуст, О.М. Варченко, С.В. Мерзлов, Т.М. Димань, В.В. Сахнюк, Р.В. Шаганенко, І.О. Ластовська, О.Г. Олешко (Ред.), *Сучасний розвиток ветеринарної медицини* (50–52). Білоцерківський національний аграрний університет. (Дисертант виконав імунохімічні дослідження зразків патологічного матеріалу неоплазій молочної залози, провів аналіз їх діагностичного і прогностичного значення, оформив статтю до друку).

7. **Коваленко, М. С.** & Білий, Д. Д. (2022). Ефективність хіміотерапії ендоксаном у сук за новоутворень молочної залози. У М. І. Цвіліховський, С. І. Голопура, Н. Г. Грушанська, П. В. Шарандак, Т. В. Немова, Т. А. Палюх (Ред.), «Єдине здоров'я–2022» (89–91). Національний університет біоресурсів і природокористування України. (Здобувач проаналізував клінічні результати метрономної хіміотерапії ендоксаном у кішок за новоутворень молочної залози, підготував до друку тези).

8. **Kovalenko, M.**, Dankevych, N. & Bilyi, D. (2023). Clinical significance of biological markers for mammary gland neoplasms in bitches. In S. S. Arun, D.

Dalgin, N. Decaro, G. Dupre, P. Freeman, J. Haggstrom, C. Mooney, H. Oguz, M. Ok, K. Özer, M. Rinkinen, G. von Samson, B. Ulutas, H. Erdogan, S. Erdogan, İ. Polat, S. Masson, J. Mortier, H. Radke, M. Aksay, A. Barut, J. Hedley, E. Kalemzaki, N. Mitchell, H. Ömer, H. Ruel (Ed.), *17th Turkish Small Animal Veterinary Association International Continuing Education Congress (222–224)*. Istanbul. (Здобувач встановив об'єктивні біологічні маркери та можливість їх практичного впровадження, підготував тези до публікації).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА СИМВОЛІВ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1. Поширення та фактори ризику неоплазій молочної залози у собак	27
1.2. Патогенетичні предиктори ефективності лікування сук за пухлин молочної залози	32
1.3. Ефективність хірургічного лікування сук за неоплазій молочної залози	35
1.4. Переваги метрономної терапії за пухлин молочної залози	39
1.5. Аналіз використання метрономної хіміотерапії циклофосфамідом у собак	42
1.6. Оцінка протипухлинних ефектів метформіну	46
Висновок до розділу 1	50
РОЗДІЛ 2 ВИБІР НАПРЯМКІВ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	52
Висновок до розділу 2	68
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	69
3.1. Аналіз особливостей перебігу новоутворень молочної залози у сук	69
3.1.1. Поширення, клінічні і гістопатологічні фактори ризику пухлин молочної залози у собак	69
3.1.2. Оцінка гематологічних і біохімічних змін за неоплазій молочної залози у сук	87
3.2. Потенційні терапевтичні маркери для циклофосфаміду та метформіну	90
3.2.1. Активність матриксних металопротеїназ-2 та -9 за злоякісних пухлин молочної залози	90

3.2.2. Прогнозування біологічної поведінки неоплазій молочної залози за маркерами неоангіогенезу, проліферації і судинної інвазії	95
3.3. Ефективність хірургічного лікування сук за неоплазій молочної залози	105
3.4. Клінічна апробація ад'ювантної метрономної терапії циклофосфамідом та метформіном	112
Висновок до розділу 3	122
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	124
ВИСНОВКИ	143
ПРАКТИЧНІ ПРОПОЗИЦІЇ	147
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	148
ДОДАТКИ	190
Додаток А. Список праць, опублікованих за темою дисертації	191
Додаток Б. Відомості щодо апробації матеріалів дисертації	193
Додаток В. Акти впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес і науково-дослідну роботу	194
Додаток Г. Акти впровадження результатів дисертації в практичну діяльність	199
Додаток Д. Висновок біоетичної експертизи	204

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА СИМВОЛІВ

- АлАТ – аланінамінотрансфераза
АМФК – АМФ-активована протеїнкіназа
АсАТ – аспартатамінотрансфераза
ГГТ – гамма-глутамілтрансфераза
ЕМП – епітеліально-мезенхімальний перехід
МЗ – молочна залоза
ММП – активні форми матриксні металопротеїнази
ПЗВЗ – поле зору з великим збільшенням
pro-ММП – латентні форми матриксних металопротеїназ
ШОЕ – швидкість осідання еритроцитів
САФ – асоційовані з карциномою фібробласти
DFS – безрецидивна виживаність
ЕСМ – компоненти позаклітинного матриксу
ЕМТ – епітеліально-мезенхімального перехід
ЕРС – ендотеліальні клітини-попередники
HIF-1 – фактор-1, індукований гіпоксією
LDM – низькодозова метронмна хімотерапія
MALA – метформін-асоційований лактоацидоз
mTOR – мішень рапаміцину у ссавців
MTD – максимально переносима доза
MVD – щільності мікросудин пухлини
ROS – активні форми кисню
PDGF-B – тромбоцитарний фактор росту В
PGE₂ – простагландин
SHC – асептичний геморагічний цистит
TAM – пухлинно-асоційовані макрофаги
TNF- α – фактор некрозу пухлини альфа
VEGF – фактор росту ендотелію судин

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Новоутворення МЗ відносять до найбільш поширених захворювань, які зустрічаються в клінічній практиці (Murphy, 2008). Пізня діагностика та відсутність ефективного лікування є основними причинами короткого терміну життя хворих на пухлини МЗ сук і високий рівень їх загибелі (Petrov et al., 2014).

Навіть за дотримання принципів онкологічної хірургії, хірургічна техніка не впливає на загальну виживаність, інтервал без захворювань та тривалість періоду до прогресування захворювання у сук із новоутвореннями МЗ (Horta et al., 2014). Тому вирішальне значення відіграють ад'ювантні протоколи лікування.

Незважаючи на відсутність розбіжностей думок щодо значення хірургічного втручання та ад'ювантної хіміотерапії за пухлин МЗ у собак, наразі недостатньо вивченою залишається проблема вибору оптимальних предикторів перебігу захворювання та оцінки ефективності проведеного лікування (de Souza et al., 2023). Складнощі визначення точних прогностичних факторів за новоутворень МЗ обумовлені, насамперед, значною варіабельністю їх біологічної поведінки (Santos et al., 2015). Необхідно вдосконалити та стандартизувати діагностичні критерії, а також продовжувати вивчення прогностичних маркерів, які могли б рутинно використовуватись у клінічній практиці (Cassali, 2009).

Протягом останнього десятиліття в онкології запроваджено велику кількість новаторських рішень, завдяки чому досягнуті суттєві покращення клінічних результатів. Проте, запропоновані протоколи передбачають використання цитостатиків у режимі максимально переносимої дози (MTD). В якості альтернативної стратегії покращення відповіді при одночасному зниженні токсичності був запропонований метрономний режим, який ґрунтується на регулярному введенні низьких доз хіміотерапевтичних засобів та адаптивна терапія – модулювання дози та частоти введення цитотоксичних речовин для контролю прогресування захворювання (Benzekry et al., 2015).

Низькодозна метрономна (LDM) хіміотерапія представляє нову концепцію в лікуванні раку, спрямовану проти неоплазійних, а також ендотеліальних та імунних клітини. LDM хіміотерапія змінює мікрооточення новоутворення та пригнічує вроджені біологічні механізми, які підтримують ріст пухлини. Вивчається доцільність поєднання метрономної і традиційної хіміотерапії (Loven et al., 2013). За допомогою метрономної хіміотерапії досягнуто задовільні результати за різних типів пухлин на тлі мінімальних токсичних ефектів, порівняно із стандартними протоколами. Загалом, опубліковані метрономні режими неоднорідні, часто включають ретроспективні дані, мало досліджень рандомізовані, що обмежує об'єктивну оцінку ефективності лікування (Romiti et al., 2013).

Протягом останнього десятиліття інноваційною стратегією лікування ряду захворювань, у тому числі раку МЗ, стало перепрофілювання фармакологічних засобів. Такий підхід дозволяє скоротити термін до клінічного впровадження та використовувати препарати, безпека яких для людини вже встановлена. При цьому отримано обнадійливі результати, але опубліковані дані в окремих випадках суперечливі, а повний потенціал перепрофілюваних засобів досі не вивчений (Pushrakom et al, 2019). Більшість перепрофілюваних засобів не можуть бути використані як окремі агенти, деякі не дають клінічно значимих ефектів. Проте, доклінічні дослідження щодо використання метформіну, одного із найбільш поширених перепрофілюваних препаратів, в лікуванні неоплазій, показали багатообіцяючі результати (Saengboonmee et al., 2021).

У ветеринарній онкології представлено результати застосування циклофосфаміду (Best & Fry, 2013), але вивчення клінічного ефекту його комбінації із метформіном не проводилось. Крім того, опубліковані рукописи як правило обмежуються клінічними результатами (Kent, 2013), без визначення їх кореляції із патогенетичними ланками канцерогенезу. «Механічне» залучення інформації із гуманної медицини, без врахування видових особливостей, призводить до того, ефективні дози часто викликають

значно виражені побічні ефекти (Marrington et al., 2012; Musser et al., 2021). За використання циклофосфаміду метформін знижує побічні ефекти хіміопрепарату (Alhowail et al., 2019; Engin et al., 2021), що обґрунтовує доцільність клінічної апробації такої комбінації у собак із пухлинами МЗ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота є частиною ініціативної тематики кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету «Клінічна корекція екологічних деструкцій антропогенного походження у свійських тварин Придніпровського промислового регіону» (термін виконання 2014–2024 рр., номер держреєстрації: 0115U002143).

Мета та завдання дослідження. *Мета роботи* – клініко-експериментально обґрунтувати ефективність комбінованого застосування хірургічного лікування та метрономної ад'ювантної терапії сук за неоплазій молочної залози.

Для досягнення поставленої мети роботи необхідно було вирішити наступні завдання:

- провести аналіз динаміки захворюваності собак на пухлини МЗ в містах Дніпро і Запоріжжя залежно від віку, клінічної стадії, репродуктивного статусу і періоду між первинним виявленням неоплазій та початком лікування;
- вивчити динаміку щорічної верифікації доброякісних і злоякісних новоутворень МЗ із урахуванням нозологічних форм, клінічної стадії та інвазії неоплазійних клітин в кровоносні і лімфатичні судини;
- визначити гематологічні і біохімічні показники у сук за пухлин МЗ;
- вивчити експресію латентних та активних форм ММП-2 і -9 в плазмі і пухлинній тканині за різних нозологічних форм новоутворень МЗ;
- провести аналіз експресії маркерів неоангіогенезу і проліферації залежно від клінічної стадії та кореляційних зв'язків VEGF, Ki-67 та ангіо-/лімфоінвазії;
- визначити ефективність хірургічного лікування сук із неоплазіями МЗ за показниками медіани виживаності залежно від клінічної стадії, нозологічної

форми і судинної інвазії;

- провести оцінку ефективності метрономної ад'ювантної терапії циклофосфамідом і метформіном на тлі хірургічного лікування сук із новоутвореннями МЗ, за медіаною виживаності і безрецидивного періоду та динамікою концентрації у крові глюкози, холестерину і тригліцеридів з урахуванням індексу маси тіла тварин.

Об'єкт дослідження – пухлини молочної залози у собак.

Предмет дослідження – поширеність пухлин молочної залози, фактори ризику, експресія маркерів ангиогенезу, проліферації й інвазії, хірургічне лікування, метрономний режим ад'ювантної терапії циклофосфамідом і метформіном за новоутворень молочної залози у сук.

Методи дослідження клінічні, візуальної діагностики (ультразвукові та рентгенографічні), гематологічні (вміст еритроцитів, гемоглобіну, тромбоцитів, лейкоцитів; гематокрит; ШОЕ), біохімічні (концентрацію загального білку, альбуміну, глобулінів, білірубину загальний, сечовини, креатиніну, кальцію загального, фосфору неорганічного, холестерину, тригліцеридів, глюкози; активність АлАТ, АсАТ, ГГТ, лужної фосфатази; співвідношення альбуміни/глобуліни), імуногістохімічні (експресію VEGF, VEGF-1, VEGF-2, Ki-67), зимографія (активність матриксних металопротеїназ-2 і -9), гістоморфологічні (зразків пухлинної тканини), статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. В умовах міст Запоріжжя і Дніпро проведено аналіз захворюваності в період з 2018 по 2023 роки та встановлено поширення, етіологічні чинники, предиктори неоплазій МЗ у сук. Вперше узагальнено дані щодо періоду від первинного виявлення пухлин МЗ до надання спеціалізованої допомоги (встановлено, що у більшості випадків (68,1–72,1 %) не перевищував 3 місяців), визначено динаміку реєстрації пухлин за гістологічними типами та ризик інвазії ракових клітин в кровоносні/лімфатичні судини залежно від клінічної стадії (верифікували: за I

стадії – в 10–25/3,3 %; II стадії – 26,3–31,6/6,4–10,5 %; III стадії – 36,2–51,7/33,3–41,4 %, IV стадії – 45,5–70,6/51,0–52,9 % випадків).

Уперше проведено порівняльну оцінку біохімічного профілю онкохворих сук залежно від індексу маси тіла. У собак з надлишковою масою тіла та ожирінням реєструється достовірне ($p < 0,01$) підвищення концентрації у крові холестерину у 1,3 раза, тригліцеридів і глюкози – у 1,2 раза.

Уперше на основі визначення рівнів експресії маркерів неоангіогенезу (VEGF, VEGF-1, VEGF-2), проліферації (Ki-67), інвазії (ММП-2 і -9) та доведеної кореляцію між ними, обґрунтовано використання у сук із пухлинами МЗ ад'ювантної терапії у метрономному режимі.

Визначено ефективність хірургічного лікування собак за злоякісних неоплазій МЗ залежно від клінічної стадії, гістологічного типу і судинної інвазії. Вища стадія захворювання, ангіо- і лімфоінвазія та окремі нозологічні форми новоутворень МЗ достовірно знижують ефективність хірургічного лікування: згідно vet-NPI медіана виживаності скорочується в 1,4 раза (з 14,4 до 10,5 місяців).

Уперше в Україні обґрунтована можливість та доведена ефективність використання перепрофільованого препарату метформін у сук за новоутворень МЗ. Клініко-експериментально обґрунтовано ефективність метрономного режиму використання комбінації циклофосаміду і метформіну після мастектомії у сук із злоякісними неоплазіями МЗ за різного індексу маси тіла. Метрономна терапія циклофосамідом і метформіном після екстирпації новоутворень МЗ дозволила збільшити медіану виживання в 1,3–2,5 раза і безрецидивного періоду в 1,4–2,4 раза за кращих клінічних результатів у сук із високим індексом маси тіла.

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що на підставі вивчення клінічних, патоморфологічних, імуногістохімічних, гематологічних та біохімічних особливостей канцерогенезу за новоутворень МЗ у собак, визначено предиктори (клінічна стадія, нозологічна форма, інвазія пухлинних клітин в кровоносні і лімфатичні судини) та молекулярні маркери

(матриксні металопротеїнази, VEGF, Ki-67), які дозволяють оцінити ступінь ураження тканин і поширення онкологічного процесу, здійснити контроль післяопераційного періоду та подальшого перебігу захворювання.

Запропоновану схему лікування сук за злоякісних неоплазій молочної залози (передбачає поєднання мастектомії з ад'ювантною метрономною хімотерапією циклофосфамідом у комбінації із метформіном) включено до переліку клінічних протоколів, які використовуються лікарями ветеринарної медицини, що спеціалізуються на наданні допомоги онкохворим тваринам в державних і приватних лікарнях міст Дніпро і Запоріжжя (державна лікарня ветеринарної медицини Шевченківського і Соборного районів міста Дніпро, «Бест», «VetVille», «Ветсервіс», Навчально-науково-виробничий центр факультету ветеринарної медицини ДДАЕУ).

Результати клініко-експериментальних досліджень впроваджено в освітній процес за підготовки здобувачів другого (магістерського) і третього (освітньо-наукового) рівнів вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» з дисциплін: «Загальна і спеціальна хірургія», «Хірургічні хвороби собак і котів», «Клінічна онкологія» (Дніпровський державний аграрно-економічний університет); «Клінічна онкологія», «Сучасні клініко-інструментальні методи діагностики, лікування і профілактики хвороб тварин», «Хірургічні хвороби дрібних тварин з анестезіологією та реаніматологією» (Білоцерківський національний аграрний університет); «Хвороби собак і котів», «Загальна і спеціальна хірургія», «Оперативна хірургія з основами топографічної анатомії, анестезіологія» (Національний університет біоресурсів і природокористування України); «Загальна і спеціальна хірургія», «Ветеринарні хірургічні технології», «Хірургічні хвороби тварин», «Оперативна хірургія з топографічною анатомією» (Сумський національний аграрний університет); «Загальна і спеціальна хірургія», «Оперативна хірургія з основами топографічної анатомії та анестезіології», «Акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин» (Одеський державний аграрний університет), а також

використовуються в наукових дослідженнях на кафедрах: ветеринарної хірургії і репродуктології ДДАЕУ; ветеринарної хірургії та анестезіології БНАУ; ветеринарної хірургії імені академіка І.О. Поваженка НУБіП України; акушерства та хірургії СНАУ; хірургії, акушерства та хвороб дрібних тварин ОДАУ.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням автора. Здобувач самостійно провів аналіз наукових джерел за темою дисертації, моніторингові дослідження щодо поширення захворювання та етіологічних чинників новоутворень МЗ у сук, відпрацював методики діагностики, визначив патогенетично обґрунтовані біологічні мішені для ад'ювантної терапії, організував та здійснив лікування собак згідно розробленого протоколу (екстирпація пухлин із післяопераційним метрономним застосуванням циклофосфаміду і метформіну), опрацював із використанням статистичної обробки отримані дані, проаналізував й узагальнив отримані результати. Дисертант разом із науковим керівником (доктором ветеринарних наук, професором Д.Д. Білим) провів наукову оцінку й інтерпретацію клініко-експериментальних результатів, сформулював висновки і рекомендації для впровадження матеріалів роботи в наукову, навчальну і практичну діяльність.

Апробація результатів дисертаційної роботи. Основні результати дисертаційного дослідження доповідались та були схвалені на наступних науково-практичних конференціях: V науково-практичній конференції студентів, магістрантів та аспірантів «Актуальні проблеми та наукові звершення молоді на початку третього тисячоліття» (м. Слов'янськ, 2020 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори» (м. Біла Церква, 2021 р.); міжнародній науковій конференції, присвяченій 100-річчю кафедр факультету ветеринарної медицини (м. Київ, 2022 р.); 17-му міжнародному конгресі безперервної освіти Турецької ветеринарної асоціації дрібних тварин (Туреччина, Стамбул, 2023р.).

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи викладено у 9 наукових працях: 1 – у науковому фаховому виданні, включеному до наукометричної бази даних Scopus, 2 – у наукових фахових виданнях, включених до наукометричної бази даних Web of Science, 1 – у науковому фаховому виданні України, а також 4 тезах наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. Дисертаційну роботу викладено на 205 сторінках комп'ютерного тексту. Вона включає розділи: анотацію, вступ, огляд літератури, вибір напрямків, матеріали і методи виконання роботи, результати власних досліджень, їх аналіз та узагальнення, висновки, пропозиції виробництву, список використаних джерел і додатки. Дисертацію ілюстровано 32 рисунками і 29 таблицями. Бібліографія містить 309 джерел, у тому числі – 293 латиницею.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Поширення та фактори ризику неоплазій молочної залози у собак

Серед тварин, які утримуються в умовах мегаполісів, максимальна частота виявлення пухлин встановлена у собак – 61,7 % і котів – 30,1 %. Рівень онкологічної патології у тхорів, мурчаків, щурів і кролів знаходиться в межах 8,2 %. У собак новоутворення МЗ за кількістю займають друге місце, після неоплазій шкіри. В більшості випадків (85,7 %) вони відносяться до злоякісних, без вираженої вікової схильності (Лещова зі співав., 2018). Михайленко зі співав. (2017) оприлюднили подібні показники ураження пухлинами різних видів тварин: собаки – 60,7 %, коти – 26,7 %, щури – 5,9 %, мурчаки – 2,2 %, пісчанки – 1,5%.

Статистичні дані щодо поширення новоутворень у собак, зокрема пухлин молочної залози, в різних регіонах України та країн зарубіжжя суттєво різняться. Пухлини МЗ у собак є найбільш поширеним захворюванням, порівняно з іншими видами раку. Вони становлять 50–70 % усіх неоплазій, діагностованих у нестерилізованих самок собак, головним чином уражаючи сук старше 7 років (Vazquez et al., 2023).

Згідно Касянчук (2011), онкологічна патологія у собак становить 7,24 %, за переважного ураження породистих тварин (85,8 %), насамперед: пуделів (8,6 %), спанієлів (8,3 %), стаффордських тер'єрів і німецьких вівчарок (6,6 %), боксерів і доберманів (6,3 %) та ротвейлерів (6 %). Частка новоутворень МЗ в загальній структурі пухлинної патології – 42,1 %, яку найбільш часто діагностують у метисів (41,9 %). У структурі хірургічних хвороб собак, які утримуються в м. Львів, захворюваність на пухлини складає в середньому 12,85 % за переважного ураження тканин МЗ (35,1 %) і шкіри (29,8 %) (Івашків зі співав., 2019). За даними Samoiliuk (2021) у собак в умовах м. Дніпро близько третини всіх новоутворень представлені неоплазіями МЗ (35,9 %), серед яких злоякісні гістологічні типи реєструються частіше, порівняно із доброякісними, в 3,6 раза. Захворюваність сук на неоплазії МЗ в м. Суми

характеризується піком реєстрації у тварин віком 6–12 років, насамперед, у метисів (42,3 %), а також переважанням злоякісних пухлин у пацієнтів старших 12 років (Зон зі співавт., 2013). У м. Полтава у собак пухлинне ураження МЗ діагностовано у 21,4 % тварин, переважна більшість з яких (70 %) – породисті (Дмитренко & Шерстюк, 2020). Irgashev et al. (2023) повідомляють про поширення неоплазій МЗ у сук на рівні 36,3 %.

В зарубіжних країнах поширення пухлин МЗ значною мірою залежить від географічного регіону, складаючи впродовж року: у Хорватії – 64,4 (Šoštarić-Zuckermann et al., 2013), північній Італії (Генуя) – 181,8 (Merlo et al., 2008), у Великобританії – 205 (Dobson et al., 2002), 1340,7 (Varney et al., 2023) випадків захворювань на 100000 собак.

Співвідношення злоякісних та доброякісних новоутворень МЗ у сук має значну варіабельність. Зокрема, частка доброякісних пухлин коливається в межах від 10,8 до 89,1 %, злоякісних – від 7,6 до 89,2 % (Ткаczyk-Wliziło et al., 2023; Rodríguez et al., 2022), що може бути пов'язане із відсутністю єдиного методологічного підходу, недостатньою кількістю пацієнтів у вибірці та використанням різних класифікацій.

Фактори ризику виникнення і прогресування неоплазій МЗ у сук різноманітні, пов'язані із географічним регіоном, породою, віком, метаболічними і гормональними порушеннями, впливом зовнішнього середовища, тощо (Vazquez et al., 2023).

Із ризиком розвитку неоплазій МЗ та їх агресивністю пов'язаний вік тварин, ймовірність виявлення злоякісної пухлини зростає в 1,19 рази з кожним додатковим роком життя (Gedon et al., 2021). Медіана віку первинної реєстрації пухлин МЗ коливається в межах 10–11 років, мінімальна захворюваність характерна для сук до 4-річного віку (McNeill & Vienna, 2015). Доброякісні пухлини МЗ частіше діагностують в молодшому віці (9,2 років), порівняно із карциномами (9,7 років) та саркомами (10,4 років) (Rodríguez et al., 2022). При цьому результати більшості спостережень свідчать про зниження середнього віку сук, в яких діагностували пухлини МЗ (Білий, 2015;

Koreyba et al., 2024). Зокрема, за даними Брода (2010) впродовж 4 років спостереження кількість собак із неоплазіями МЗ, віком до 7 років збільшилась з 8 до 13 %.

Питання породної сприйнятливості до новоутворень молочної залози залишається дискусійним. За даними Vanchi et al. (2022) ризик виникнення доброякісних пухлин МЗ вищий у собак великих порід (53,6 %), зляжкісних – представників карликових і малих порід (59 %), але за відсутності достовірної різниці частоти пухлинного ураження МЗ у чистопородних тварин і метисів. Згідно Varma et al. (2021) чистопородні собаки більш схильні до неоплазій МЗ, які у них частіше були зляжкісними, збільшення розміру тварини корелює із підвищенням рівня захворюваності. Згідно Датському ветеринарному реєстру раку, існує породна схильність до виникнення пухлин МЗ з високим коефіцієнтом захворюваності у боксерів і бернських зенненхундів, помірним – у німецьких вівчарок і датсько-шведських гардхундів (Brønden et al., 2010).

Опубліковані відомості щодо залежності рівня стерилізації сук, як одного із чинників ризику раку МЗ та частоти його реєстрації, суттєво відрізняються. Крім того, у більшості випадків не представлено кореляцію оваріогістероектомії із віком тварин, яка має важливе значення у прогнозуванні ймовірності розвитку пухлин МЗ. Згідно із даними, рівень стерилізації сук складає: у США – 64 % (Trevejo et al., 2011) – 70 % (Clancy & Rowan, 2003); Іспанії – 25 % (Alonso et al., 2022) – 63 (Brito-Casillas al., 2021); Болгарії – 40,4 % (Smith et al., 2022); Україні – 35,4% (Smith et al., 2022); Бразилії – 17 % (Vaquero et al., 2015) – 28,1 % (Dias et al., 2018) – 32,9 % (Vaquero et al., 2018); Новій Зеландії – 86,8 % (Forrest et al., 2023); Британії – 43,8 % (Engdahl et al., 2023) – 44,8 % (O'Neill et al., 2023) – 72 % (Anderson et al., 2023); Ірландії – 59,9 % (Downes et al., 2009); Мексиці – 24 % (Kisiel, 2017) – 37 % (Kisiel et al., 2018); Китаї і Гонконгу – 75 % (Tilley et al., 2023); Італії – 50 % (Carvelli et al., 2020); Індії – 36–48,9 % (Kartal & Chaudhari, 2017) – 61,8–86,4 % (Totton, 2009).

Тривалий час вважалось, що стерилізація значно знижує ризик виникнення пухлин МЗ у сук, проте наразі з'являється все більше повідомлень про неоднозначність такої думки. Beauvais et al., (2012) прийшли до висновку, що слабкість доказів і ризик упередженості опублікованих результатів не дають підставу рекомендувати стерилізацію для недопущення раку МЗ. Після овариогістероектомії відбувається злаякісна трансформація за менших розмірів доброякісних неоплазій (Gedon et al., 2022), частіше діагностують злаякісні пухлини МЗ агресивних типів (Gedon et al., 2021). У стерилізованих сук вірогідність рецидиву новоутворення МЗ після мастектомії значно вища (Banchi al., 2022).

Одним із можливих факторів ініціації канцерогенезу у тканинах МЗ собак є ожиріння. Bilyi & Khomutenko (2024) у сук із надлишковою масою тіла в 30,7 % випадках діагностували мастопатію, 46,5 % – доброякісні новоутворення, 52,7 % – злаякісні пухлини МЗ. Надмірна маса тіла, яка є значущим фактором ризику новоутворень МЗ ($p=0,048$), збільшує ймовірність їх розвитку в 2,3 раза (Santos et al., 2020). Зв'язок спонтанних злаякісних неоплазій МЗ із індексом маси тіла ($p<0,001$) підтвердили da Silva et al. (2023): надмірну масу тіла мали 37,2 %, ожиріння – 14,6 % онкохворих пацієнтів. У самок із високим відсотком жиру в організмі пухлини МЗ більш агресивні (do Nascimento-Nama et al., 2022). При цьому Cleary et al. (2010) висновок щодо кореляцію ожирінням із появою пухлин МЗ у собак вважають суперечливим.

За ожиріння знижується експресія адипонектину та тлі збільшення кількості макрофагів, що корелює із високим гістологічним ступенем і лімфатичною інвазією – факторами несприятливого прогнозу (Lim et al., 2015). Хронічна запальна реакція, ендокринні і метаболічні розлади, спричинені ожирінням, одночасно активують різні ланки канцерогенезу (Marchi et al., 2022). У тварин із надмірною масою тіла, хворих на злаякісні новоутворення МЗ, експресія ароматази достовірно корелює із ядерним фактором каппа бета (NF- κ B), лептином та підвищеним рівнем простагландину (PGE₂) (Shin et al., 2015).

Вплив на ризик виникнення спонтанних пухлин МЗ у собак мають раціони годівлі. Вища частота неоплазій МЗ реєструється за годівлі приготованим в домашніх умовах кормом (порівняно із комерційним), високого споживання червоного м'яса (яловичини, свинини) і низького – курятини (Alenza et al., 1998). Мінімізувати ризик новоутворень МЗ дозволяє дієта із високим вмістом білка та низьким вмістом жирів та вуглеводів. Її обґрунтування, зокрема, базується на тому, що обмеження вуглеводів позбавляє неоплазійні клітини глюкози – їх основного джерела енергії (Beunen, 2020). На захворюваність сук на неоплазії МЗ можуть впливати дієтичні фактори, які викликають активацію перекисного окиснення ліпідів. Годування тварин комерційними кормами вважається більш збалансованим, що забезпечує захист організму від оксидативного стресу (Karayannopoulou et al., 2013).

Збільшують ризик виникнення онкологічних захворювань сук екологічні фактори. Вищий рівень захворюваності на спонтанні неоплазії МЗ встановлено у собак, які утримуються в умовах мегаполісів, промислових міст та екологічно забруднених територіях (Білий, 2015; Kisiel et al., 2016).

На частоту виникнення пухлин, ймовірно, впливають кліматичні фактори, проте біологічні механізми цього впливу залишаються незрозумілими. Зокрема, у Хорватії частота пухлин МЗ у внутрішніх регіонах складає 20,54 %, у прибережних регіонах – 28,63 %, на тлі розповсюдження тубулопапілярної карциноми МЗ на рівні 6,37 % та 11,54 %, відповідно (Šoštarić-Zuckermann et al., 2013). Рівень захворюваності сук на рак МЗ в прибережних регіонах Португалії вищий, порівняно із внутрішніми територіями (Carvalho et al., 2023).

До факторів ризику відносять всі причини, які можуть призвести до змін структури ДНК у генах-регуляторах клітинного циклу, що є безпосередньою причиною виникнення та прогресування новоутворень МЗ. В неоплазійно зміненій тканині МЗ шляхи запалення, диференціації та адгезії клітин і підтримки позаклітинного матриксу дерегульовані (Santos et al., 2023). Через

свою «динамічну» характеристику морфологічної структури МЗ сприйнятлива до утворення неоплазій (Sewoyo et al., 2023). Зокрема, в новоутвореннях МЗ високостабільні інгібітори циклін-залежної кінази, що діють як потужні супресори пухлин, у більшості випадків є дефектними (Lutful Kabir et al., 2015).

Таким чином, можна стверджувати про значне поширення неоплазій молочної залози у сук, на тлі їх більшої сприйнятливості до онкологічної патології у видовому аспекті. В останні роки структура факторів ризику змінюється, більшу актуальність набувають погіршення екологічного стану внаслідок антропогенного забруднення, надлишкова маса тіла і не раціональне використання засобів гормональної контрацепції.

Спостерігається негативна тенденція до підвищення рівня онкологічної захворюваності і зменшення середнього віку онкохворих сук, обумовлена збільшення кількості собак та відсутністю єдиної концепції боротьби із раком МЗ у тварин, зокрема, у собак.

1.2. Патогенетичні предиктори ефективності лікування сук за пухлин молочної залози

Потужним ангиогенним фактором, який пов'язаний із індукцією проліферації та метастазування ендотеліальних клітин за спонтанних новоутворень МЗ, виступає фактор росту ендотелію судин (VEGF). Рівні гена та білка VEGF за злоякісних пухлин достовірно перевищують показники нормальної МЗ ($p=0,0089$ та $p<0,0001$, відповідно) (Raposo-Ferreira et al., 2016). Підвищена експресія білка VEGF спостерігається в 33,3 % морфологічно нормальних тканинах МЗ і 78 % – неоплазійних ($p<0,01$) (Qiu et al., 2008). Високі сироваткові рівні VEGF корелюють із значною васкуляризацією, ураженням лімфатичних вузлів, метастазами, рівнем летальності і низькою виживаністю ($p<0,05$) (Moschetta et al., 2015; Anadol et al., 2017). За карцином МЗ у собак крім статусу лімфатичних вузлів та судинної інвазії єдиною ознакою, яка корелює із тривалістю виживання є висока експресія VEGFR-2

(Diessler et al., 2017). Загальним проявом надмірної експресії VEGF-A та VEGFR-2 є васкулогенна мімікрія – процес утворення каналців для проведення рідини шляхом злиття високоагресивних ракових клітин без участі ендотеліальних клітин. Наявність васкулогенної мімікрії корелює із меншим періодом виживання ($p < 0,0001$) (Prado et al., 2019).

Ризик прогресування неоплазій МЗ у собак корелює із наявністю пухлинних емболів у лімфатичних і кровоносних судинах внаслідок міграції ракових клітин, а також посиленою експресією рецептора фактору росту судинного ендотелію (Diessler et al., 2017). На механізм формування пухлинних мікроемболів в судинах і лімфатичних вузлах впливає збільшення кількості і щільності лімфатичних судин в перитуморальній тканині (Stan, 2015). Судинна та стромальна інвазія ракових клітин за новоутворень МЗ знижують дворічну виживаність на 85 % та 80 %, відповідно (Itoh et al., 2015).

Одним із основних механізмів інвазії та метастазування неоплазій МЗ є втрата клітинної адгезії до основної маси пухлини та деградація позаклітинного матриксу. Матриксні металопротеїнази (ММП), будучи цинк-активованими пептидазами, здатні руйнувати і ремоделювати оточуючий позаклітинний матрикс, полегшуючи ці події. ММП розділяють на шість основних класів: желатинази, колагенази, стромелізени, матрілізини, металопротеїнази мембранного типу та інші некласифіковані ММП. Активність ММП регулюється тканинними інгібіторами металопротеїназ (ТІМП). Вони приймають участь у багатьох біологічних процесах, як у нормальних фізіологічних умовах, так і за патологічних станів. ММП відіграють важливу роль у гомеостазі позаклітинного матриксу, диференціації та зростанні адипоцитів, запаленні за надлишку жирової тканини, чутливості до інсуліну та, загалом, метаболічних шляхах (Pore et al., 2016)

Наявність активних форм ММП-9 (особливо в зразках через 4 і 12 місяців після видалення злоякісних пухлин МЗ), незалежно від його кількості, а також значне підвищення рівня попередників ММП (pro-ММП-2 і pro-ММП-9) протягом 12 місяців після операції свідчить про високий ризик загибелі,

метастазування та/або рецидивування. Більш важливим є визначення активності ММП-2, оскільки її присутність, на відміну від активної форми ММП-9, корелює із ступенем агресивності певних злоякісних новоутворень (Khaki, 2021). Gramulia et al. (2016) не виявили статистичних відмінностей рівня експресії ММП-9 між анапластичними карциномами, карциномами у змішаній пухлині та простими карциномами за позитивністю ($p=0,9707$), інтенсивністю ($p=0,5386$) та характером фарбування ($p=0,6135$).

Показано функцію ММП як модуляторів адипогенезу – у пацієнтів із ожирінням спостерігали підвищення рівнів ММП-2 і ММП-9 у плазмі крові, що може вказувати на порушення метаболізму позаклітинного матриксу (Derosa et al., 2008).

В якості маркера проліферації неоплазійних клітин використовують білок Ki-67. Інтенсивність проліферації Ki-67 у цитологічних зразках злоякісних пухлин МЗ достовірно вища, ніж у доброякісних. Високий індекс Ki-67 позитивно корелює із ризиком метастазування, загибелі, низькими показниками загального виживання та періоду до прогресування хвороби (Zuccari et al., 2004). Рівень експресії Ki-67 в суміжних непухлинних тканинах МЗ пов'язаний із клініко-патологічними особливостями новоутворення та коротшим терміном загальної виживаності (Carvalho et al., 2016). Показано важливий зв'язок проліферативного потенціалу пухлини МЗ та надмірного вмісту жиру в організмі: експресія Ki-67 була вищою у собак із надмірною масою тіла ($p=0,0001$), що свідчило про високу ймовірність загибелі (Nicchio et al., 2020).

За онкогенезу, зокрема і новоутворень МЗ у собак, відбувається метаболічне пере програмування, яке забезпечує високі потреби ракових клітин в енергії і проміжних продуктах для підтримки неоплазійної проліферації. За спонтанних пухлин МЗ метаболізм глюкози змінюється найбільш часто (Farhadi et al., 2022). Але на відміну від людини, інформація стосовно його метаболічного пере програмування у сук обмежена. Rodigheri et al. (2023) повідомляють про високий передопераційний рівень глюкози у крові

сук із новоутвореннями МЗ, який вони обґрунтовують впливом на організм неоплазійних клітин. Один із ключових факторів, який впливає на агресивність неоплазій МЗ – суттєве збільшення споживання глюкози раковими клітинами, яке призводить до посилення анаеробного гліколізу і окиснення жирних кислот, а також зміна катаболізму глутаміну внаслідок активізації експресії глутаміназ (Tamarindo et al., 2023). Проте, в поодиноких випадках пухлинні клітини МЗ здатні до експресії фактора росту інсуліну-2, викликаючи критичне зниження рівня глюкози у крові в період росту неоплазії та діабетичну гіперглікемію після мастектомії (Rossi et al., 2010).

На основі аналізу літературних джерел можна стверджувати про недостатнє вивчення можливості використання VEGF, MMP, Ki-67 в розробці діагностичних схем та лікувальних протоколів. Зазначені біологічні маркери характеризують основні ланки канцерогенезу: ангіогенез, руйнування неоплазійними клітинами оточуючого матриксу та їх інвазію в кровоносні і лімфатичні судини, проліферативний потенціал новоутворення, що було враховано за вибору фармакологічних засобів для включення у діагностичний і лікувальний протокол.

1.3. Ефективність хірургічного лікування сук за неоплазій молочної залози

Лікування неоплазій МЗ у сук базується на оперативному втручанні. В публікаціях найбільш часто оцінюється ефективність радикальної мастектомії (92 %). Менш інвазивні техніки рекомендовані за нижчої агресивності неоплазій МЗ. Частіше аналізуються такі показники, як тривалість виживання (58 %), рівень рецидивів (50 %) і період до прогресування захворювання (42 %). Вибір хірургічної техніки повинен базуватись на прогностичних факторах та ймовірних ускладненнях. Оцінка лімфатичних дренажних шляхів не забезпечує об'єктивного визначення перебігу захворювання. Зменшення ступеня агресивності новоутворення МЗ пов'язано із меншими хірургічними кордонами (Hörnfeldt & Mortensen, 2023).

Незважаючи на спроби удосконалення оперативної техніки, високим залишається ризик розвитку рецидивів та метастазів внаслідок складності визначення хірургічних кордонів залежно від гістологічного типу. Наразі не визначено оптимальну техніку хірургічного втручання, яка забезпечує кращий контроль за перебігом загоєння операційної рани, знижує ризик рецидивів і метастазів. Вибір хірургічного методу (нодулектомія, мамектомія, мастектомія: регіонарна, одно- / двобічна) залежить від клінічної стадії та ступеня агресивності (Cassali et al., 2020).

Оперативне висічення солідних пухлин необхідне для місцевого контролю новоутворень. Однак, хірургічне втручання та обумовлені ним місцеві і системні запальні реакції можуть виступати в якості потенційних тригерів рецидиву захворювання. Мастектомія може стимулювати вивільнення проангіогенних факторів росту, спричинювати надходження неоплазійних клітин у кровеносні судини, посилювати міграцію та інвазію ракових клітин із формуванням мікрометастазів, пригнічувати протипухлинний імунітет, викликати зміни в тканині-мішені (зокрема, посилювати адгезійні властивості молекул) (Tohme et al., 2017; Jin et al., 2024).

У сук із карциномою МЗ I–III клінічних стадій показник умовного річного виживання становить 59 %, ймовірність загибелі собак до однорічного віку не перевищує 20 % (Chocteau et al., 2021).

Порівняно з регіонарною, радикальна мастектомія у сук пов'язана з довшою тривалістю хірургічного втручання, сильнішим ноцицептивним стимулом і хірургічним стресом та вищою частотою післяопераційних ускладнень. Тому вибір хірургічної техніки повинен проводитись із урахуванням необхідності максимального збереження структури і функціональних можливостей МЗ, а також ролі лімфатичного дренажу ділянки і прогностичних факторів у подальшому перебігу захворювання. Одностороння або двостороння мастектомія, навіть забезпечуючи кращий локальний контроль біологічної поведінки пухлини, пов'язана з більшим ризиком хірургічних ускладнень через агресивність техніки та не завжди

пов'язана з довшим часом виживання. З іншого боку, невеликі за розмірами неоплазійні вогнища можуть характеризуватись високою агресивністю (Horta et al., 2015). За даними Betz et al. (2012) екстирпація пухлини МЗ забезпечували загальну тривалість виживання 1113 днів, медіану виживаності при злоякісних гістопатологічних типах 670 (I стадія) і 406 (II стадія) днів, доброякісних – 1319 днів. Гістологічний ступінь новоутворення впливає на безрецидивний ($p=0,040$), безметастатичний ($p=0,007$) інтервали та виживання ($p=0,029$).

У 58 % сук після видалення одиначної неоплазії розвивалось нове пухлинне вогнище в іпсилатеральному ланцюжку МЗ, у 77 % тварин виникала необхідність у проведенні повторного оперативного втручання. Якщо первинне новоутворення злоякісне, то існує висока ймовірність злоякісності нової пухлини ($p=0,0089$), особливо за її розташування з того ж боку ($p=0,026$) (Stratmann et al., 2008).

Більшу ймовірність метастазування слід прогнозувати за макроскопічних змін лімфатичних вузлів, розміру пухлини >3 см, анапластичної карциноми або неоплазій МЗ II/III ступеня. Тому доцільним є видалення регіонарних лімфатичних вузлів для верифікації стадії, прогнозування перебігу та призначення ад'ювантної терапії (Souza et al., 2023). Згідно Razavirad et al. (2024), виживаність після екстирпації пухлин МЗ знижують: вибір регіонарної мастектомії, тричі негативні пухлини, надмірна експресія Ki-67 та циклооксигенази-2. На тлі однорічного виживання 41,5 % сук після видалення карциноми МЗ, прогностичними факторами загального виживання виступають: розмір пухлини більше 20 мм, вузлової стадія, гістологічний ступінь III, ER α -негативність, високий індекс проліферації Ki-67 і EGFR-негативність (Nguyen et al., 2018).

Moon et al. (2022) визначають в якості предикторів 2-річної виживаності після операції: розмір пухлинного вогнища, стадію TNM і гістопатологічний діагноз. 2-річна виживаність сук за доброякісних новоутворень становила 90,2%, злоякісних – 67,3%. Неоплазії розміром більше 30 мм мають високу ймовірність злоякісності, тому слід розглянути їх широку резекцію для

мінімізації метастазування. Кожні 10 мм збільшення розміру неоплазії підвищують летальність впродовж 2 років в 1,213 рази, IV або V клінічна стадія TNM – в 8,667 разів.

Оваріогістеректомія, виконана під час екстирпації злоякісної пухлини МЗ, знижує ризик появи нових новоутворень приблизно на 50 %, але на показники виживаності не впливає (Kristiansen et al., 2013). У сук, які перенесли одночасно оваріогістеректомію та мастектомію, безрецидивна виживаність (DFS) довша, ніж у інтактних собак ($p=0,00064$), або вже були стерилізовані ($p=0,0098$). Статус стерилізації впливає на величину пухлини, яка в середньому складала: після оваріогістеректомії – $2,75\pm 2,72$ см; інтактні – $1,76\pm 2,04$ см, $p=0,039$ (Banchi et al., 2022).

Прогностичне значення у пацієнтів із пухлинами МЗ мають лімфовузли, в яких діагностовано метастази, розміром більше 2 мм (Szcubiał & Łopuszynski, 2011). На думку de Araújo et al. (2015), прогностичну значимість мають тварини, в яких виявлено більше ніж один лімфатичний вузол із ознаками метастазування. Крім пахових і поверхневих пахових лімфатичних вузлів необхідно звертати увагу на додаткові пахові, медіальні клубові, підколінні та груднинні лімфатичні вузли (Pimentel et al., 2024).

Частота ускладнень після мастектомії залежить від розміру собаки, обраної хірургічної стратегії та схеми післяопераційної терапії. Evans et al. (2021) повідомляють про частоту ускладнень на рівні 16,9 % (серед них 34,6 % пацієнтів потребували госпіталізації) та більший ризик їх виникнення у сук великих і гігантських порід, а також за тотальної мастектомії без післяопераційної системної антибіотикотерапії.

Раннє виявлення та оптимальний протокол лікування, який включає вибір адекватної техніки мастектомії та ад'ювантної терапії можуть бути найефективнішим рішенням (Akter & Alam, 2022).

Таким чином, визначено фактори, які впливають на результати екстирпації неоплазій МЗ. У більшості випадків ефективність хірургічного лікування сук із новоутвореннями МЗ залишається недостатньою. За

злоякісних пухлин виживаність коливається в межах 50–65 %, ризик розвитку рецидивів/метастазів становить близько 60 %, а рівень післяопераційних ускладнень досягає 20 %. Тому доцільно проводити подальші дослідження з розробки оптимальних лікувальних протоколів, складовою частиною яких є хірургічне втручання.

1.4. Переваги метрономної терапії за пухлин МЗ

Незважаючи на спроби зупинити поширення неоплазій МЗ у собак, рівень захворюваності продовжує підвищуватись. У більшості випадків вік онкохворих сук становив більше 8 років, близько половини новоутворень відносились до злоякісних, що обумовлювало високу частку несприятливих прогнозів. Основним методом лікування пухлин МЗ залишається хірургічне втручання, яке в ад'ювантному режимі поєднують із хіміотерапією, застосуванням гормональних або нестероїдних протизапальних засобів, опромінення (Kivrak & Aydin, 2017). В останні роки проводяться інтенсивні дослідження даної проблеми, про що свідчить значна кількість публікацій.

У сук із злоякісними новоутвореннями хірургічне втручання ефективно лише за I–III клінічної стадії, тоді як за неоплазій IV–V стадій збільшення терміну загального виживання можливе лише за комбінованої терапії (мастектомія + хіміотерапія) (Nunes et al., 2019). Проте, ад'ювантні терапевтичні стратегії не завжди забезпечують покращення результатів, тому зберігається необхідність розробки і впровадження сучасних інноваційних підходів до лікування онкохворих пацієнтів (Kim et al., 2021; Nosalova et al., 2024; Rossi et al., 2018).

На перших етапах застосування хіміотерапії базувалось на принципі «максимально переносимої дози». Хоча такі протоколи із інтенсивними дозами продовжують використовуватись, але все більшу роль починають відігравати метрономний режим введення препаратів, в основі якого лежить щоденне застосування цитотоксичних засобів у мінімальних дозах (Gaspar et al., 2018).

Хіміотерапія раку у собак традиційно включає призначення хіміотерапевтичних засобів у максимально переносимих дозах, що супроводжується високим ризиком токсичності та резистентності ракових клітин до цитотоксичних засобів. Необхідність дотримання інтервалу між курсами близько 3 тижнів призводить до можливого відновлення неоплазійних клітин. Метрономна хіміотерапія характеризується більш частим застосуванням менших доз пероральних препаратів, зупиняє або уповільнює прогресування пухлини за допомогою багатьох механізмів. Цей підхід може бути таким же ефективним, як звичайна хіміотерапія, але з меншим ризиком токсичності (Biller, 2014; Barbolosi et al., 2014). Основні ідентифіковані мішені LDM хіміотерапії – неоплазійні ендотеліальні клітини, які приймають участь у ангиогенезі. Крім того, вона ефективно впливає на гетерогенну популяцію пухлинних клітин та активує вроджені та адаптовані імунні механізми. При цьому такі аспекти, як оптимальна доза та ефективний графік, не визначені, що потребує подальшого вивчення (Muraro et al., 2023).

Антиангіогенний потенціал метрономної хіміотерапії був суттєво розширений з моменту її появи в 2000 році. Той факт, що хіміотерапія безпосередньо впливає на ракові клітини, а також стимулює імунну систему, демонструє фундаментальний багатоцільовий характер цієї стратегії лікування. За останнє десятиліття кількість клінічних випробувань метрономного режиму хіміотерапії різко зросла, і він все частіше використовується в поєднанні зі стандартними методами лікування, такими як променева терапія та хіміотерапія з максимальною переносимою дозою (MTD), а також з новими підходами до лікування раку, такими як імунно-, таргентна терапія на зміна сфери використання препарату (Mir et al., 2024).

В якості первинної мішені метрономної хіміотерапії спочатку було визначено ендотеліальні клітини, що підтримують судинну мережу пухлини, а не власне неоплазійні клітини, що узгоджується з новою концепцією раку як системного захворювання, патогенез якого пов'язаний як з раковими клітинами, так і з мікрооточенням (Kareva et al., 2015).

Хоча метрономний режим використовує кілька механізмів, що робить його універсальним підходом проти різних видів раку, резистентність неоплазійних клітин до лікарських засобів обмежує його довгострокову ефективність, що зумовлює необхідність постійної розробки нових протипухлинних препаратів. Розробка і впровадження нових ліків має високу вартість та тривалість, що зумовлено необхідністю ідентифікації цільового білка, віртуального скринінгу, оптимізації доз і шляхів введення, а також оцінки безпеки та ефективності. Економічно обґрунтованою альтернативою є перепрофілювання лікарських засобів, які рекомендуються для використання за іншої патології на основі результатів експериментальних досліджень та обчислювальних методів: аналізу зв'язування білків, тесту на цитотоксичність *in vitro*, скринінгу на основі структури та декілька типів аналізу асоціацій, ретроспективного клінічного аналізу (Abdelrady et al., 2024).

Незважаючи на певну ефективність за раку, традиційна хіміотерапія не забезпечує належного стабільного результату за більшості видів пухлин. Крім того, вона викликає важкі побічні ефекти, пов'язані із пошкодженням здорових клітин. Для усунення обмежень використання хіміотерапії на перший план вийшли два терапевтичні підходи: метрономний режим і зміна призначення препаратів. Крім зменшення дози метрономна терапія усуває тривалі інтервали між прийомами лікарських засобів, що є характерною рисою класичної хіміотерапії. Цей підхід передбачає використання існуючих препаратів, первинно розроблених для інших терапевтичних цілей, як потенційних засобів лікування раку. Перетин двох стратегій дав початок новому терапевтичному підходу під назвою «Метрономіка», який має переваги як метрономної хіміотерапії, так і перепрофілюваних препаратів, що призводить до зниження токсичності, потенціалу перорального введення, покращення якості життя пацієнтів, прискореного клінічного впровадження та підвищення економічної доступності (Jan et al., 2024).

Всупереч початковим очікуванням, методи лікування, направлені на гальмування ангіогенезу, мають схильність до вродженої або набутої

резистентності, як і інші способи лікування раку. Проте дослідження резистентності до інгібіторів шляху фактора росту ендотелію судин виявили чіткі механізми резистентності порівняно зі звичайною цитотоксичною терапією (Riesco-Martinez et al., 2017).

Доведено, що метрономна хіміотерапія викликає протипухлинну імунну відповідь і блокує ангиогенез пухлини іншим шляхом, ніж за терапії максимальною переносимою дозою. Враховуючи повідомлення про блокування VEGF/VEGFR, що антагонізує протипухлинний імунітет, вибір препарату, дозу та селективну доставку, визначену удосконаленими комбінаціями, розглядаються як потенційні джерела інновацій для визначення антиангіогенних модальностей, які можна поєднувати з метрономними режимами лікарських засобів прямої протипухлинної та імунної направленості (Lai et al., 2021).

Значна кількість публікацій вказує на те, що метрономна хіміотерапія, часте введення низьких доз ліків, є потенційно перспективним напрямком боротьби з раком. Зокрема, численні доклінічно визначені молекулярні мішені та шляхи представляють багатообіцяючі шляхи подолання резистентності та посилення переваг, досягнутих за допомогою метрономної хіміотерапії. Проте, ми визнаємо необхідність додаткових клінічних досліджень, щоб остаточно встановити роль метрономної хіміотерапії в поєднанні з іншими методами лікування в комплексному лікуванні раку.

1.5. Аналіз використання метрономної хіміотерапії циклофосфамідом у собак

Дослідженнями у клінічній онкології доведено достатньо високу ефективність та мінімальну токсичність циклофосфаміду – протипухлинного засобу класу оксазафосфоринів. Циклофосфамід під впливом мікосомальних печінкових ферментів трансформується у 4-гідроксициклофосфамід (4ОНСП), спричинює цитотоксичну та імуносупресивну дію. Швидкість його

біоактивації видоспецифічна: у собак перевищує відповідні показники людини в 55, кішок – 2,8, мишей – 1,2 рази (Ramirez, et al., 2019).

Опубліковані результати свідчать про широкі можливості поєднання циклофосфаміду з лікарськими препаратами різних фармакологічних груп. Згідно даних Suryawanshi (2021), призначення на тлі мастектомії циклофосфаміду у дозі 50–100 мг/м² забезпечувала підвищення рівня виживання та якості життя сук. При цьому слабо або помірно виражені побічні ефекти хіміотерапії (млявість, помірний об'єм алопеції, блювання, анорексію, анемію та гематурію) спостерігали після третього курсу.

Застосування циклофосфаміду у комбінації із інгібітором циклооксигенази-2 тоцераніба фосфатом за запальної карциноми МЗ подовжувало: загальну тривалість виживання, виживаність без захворювання і період до прогресування ($p=0,018$; $p=0,002$; $p<0,001$, відповідно). Протокол адекватно переносився більшістю пацієнтів, токсичні ефекти незначного або помірного ступеня усувалися підтримуючою терапією (Alonso-Miguel et al., 2022).

За використання неoad'ювантної хіміотерапії комбінацією доксорубіцину (25–30 мг/м²) і циклофосфаміду (100 мг/м²) у сук із місцево-розповсюдженими новоутвореннями МЗ (4 курси із інтервалом 3 тижні) захворювання стабілізувалось у 31,25 % тварин, повна відповідь спостерігалась – 12,5 % особин, часткова відповідь – 56,25 % сук. Із побічних ефектів реєстрували: лихоманку, анорексію і зниження маси тіла, млявість, блювоту, алопеції і виразкові дефекти шкіри, ентерит, гематурію, нейтропенію і зниження гематокриту (Kuruoglu et al., 2020).

Доповнення у сук із карциномою МЗ хіміотерапії карбоплатином (300 мг/м², в/в) циклофосфамідом (12,5 мг/м², перорально) в метронормному режимі збільшувало рівень виживання ($p=0,0044$), хоча у таких пацієнтів спостерігали еритроцито-, тромбоцито- і лейкопенію ($p<0,0001$; $p=0,0005$; $p=0,0002$, відповідно) і зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів ($p=0,0007$) (Machado et al., 2022).

За допомогою пероральної низькодозової метрономної терапії (LDM) циклофосфамідом (10 мг/м²) та піроксикамом (0,3 мг/кг), яка була проведена протягом двох місяців, досягнуто прогресивну регресію в безрецидивному періоді, що покращувало якість життя тварин (Sowbharenya et al., 2019).

У дослідженнях на щурах Silva et al. (2023) показали, що при комбінованій хіміотерапії циклофосфамід підвищував біологічну доступність карбоплатину, що дозволяло знижувати його рекомендовану дозу, тим самим зменшуючи ризик побічних ефектів.

У собак із злоякісними неоплазіями МЗ II–IV стадії показано клінічну ефективність протоколу неoad'ювантної хіміотерапії доксорубіцин / циклофосфамід (АС), доповненого паклітакселом. Повна відповідь була отримана у собак із потрійним негативним раком МЗ в 33,33 % випадків, підтипу Luminal A – 14,29 % тварин (Kuruoglu et al., 2024). Побічні ефекти обмежувались першим і другим ступенями та могли коректуватись. Позитивно оцінено клінічний ефект застосування у собак комбінацію МТД доксорубіцину та метрономного циклофосфаміду (mCTX), яка зменшували кількість лімфоцитів та не впливала на циркулюючі регуляторні Т-клітини (Treg) (Rasmussen et al., 2017).

Ад'ювантна метрономна хіміотерапії циклофосфамідом і мелоксикамом за карцином МЗ у сук супроводжувалась, порівняно із стандартною хіміотерапією, нижчим рівнем пошкодження ДНК, що підтверджує «стабільність» показників крові (Elizabeth Chalco-Torres et al., 2024).

Призначення циклофосфаміду в метрономному режимі разом із трикратним внутрішньопухлинним введенням інтерлейкіну (IL)–12 супроводжувалось імуностимулюючим та антиангіогенним ефектами, а також зменшенням швидкості прогресування захворювання в довгостроковій перспективі (Cicchelerio et al., 2017). Крім того, така комбінація спричинювала у пухлинній тканині підвищення рівнів інтерлейкіна-12, інтерферону- γ (IFN γ) і тромбоспондіну-1 (TSP-1), а також зниження фактора росту ендотелію судин (VEGF), сироватці крові – збільшення рівня інтерферону-10 і -12 та зменшення

– VEGF і TSP-1 (Cicchelerio et al., 2017). Burton et al. (2011) повідомляють про значне зниження кількості Treg і щільності мікросудин пухлини (MVD) у собак, які отримували метрономно циклофосфамід перорально у дозах 12,5 і 15,0 мг/м² один раз на добу.

За метрономної хіміотерапії циклофосфамідом (12,5 мг/м²) або у його комбінації із темозоломідом (6,6 мг/м²) спостерігали стимуляцію імунної відповіді (за рівнями CD25⁺ Foxp3⁺ CD4⁺) без виснаження механізмів секреції регуляторних Т-клітин (Tregs) та пригнічення ангиогенезу через модуляцію синтезу тромбоспондину-1 (TSP-1) та фактора росту ендотелію судин (VEGF) (Denies et al., 2017).

Неoad'ювантне призначення циклофосфаміду і піроксикаму впродовж 28 днів собакам із злоякісними карциномами МЗ з наступною мастектомією призвело до зменшення MDV у пухлинній тканині (Ferrari et al., 2019).

За злоякісних неоплазій МЗ у сук застосування після мастектомії шести курсів хіміотерапії за протоколом CVD (циклофосфан + вінкрисдин + дексаметазон) забезпечував відсотку виживання пацієнтів на тлі побічних ефектів в межах II ступеня гематологічної, нефро-, гепато-, гастроінтестинальної токсичності (Мисак & Прицак, 2015).

Найбільш частим ускладнення за хіміотерапії циклофосфамідом у собак, був асептичний геморагічний цистит (SHC). Зокрема, за метрономного застосування циклофосфаміду протягом 90 днів (у дозі 25 мг/м² один раз на дві доби) через токсичні ускладнення лікування було припинено в 44 % тварин, у 32 % сук в середньому через 127,5 діб (діапазон 54–1305 днів) діагностували SHC. Збільшення дози циклофосфаміду було пов'язане із підвищенням ризику SHC (Matsuyama et al., 2017).

Про добру переносимість метрономного режиму циклофосфаміду (у дозі від 5 до 15 мг/м²/день або через день) повідомляють також Harper & Blackwood (2017). Токсичні ускладнення (як правило, легкого ступеня), які реєстрували в 49 % пацієнтів, найбільш часто проявлялись у вигляді геморагічного циститу і розладів роботи шлунково-кишкового тракту. При цьому середня тривалість

періоду до розвитку асептичного геморагічного циститу становила 110 днів (діапазон від 7 до 686 днів). Бактеріальні інфекції сечового міхура під час лікування виникли у 25 % тварин.

Аналіз публікацій засвідчив широке використання циклофосфаміду у собак із неоплазіями МЗ, зумовлене його клінічною ефективністю, помірним токсичним ефектом та можливістю поєднання із іншими лікарськими засобами. Проте, перелік фармакологічних засобів, які рекомендовано використовувати із циклофосфамідом обмежуються хіміотерапевтичними препаратами інших груп, нестероїдними протизапальними засобами та імуномодуляторами.

1.6. Оцінка протипухлинних ефектів метформіну

У ветеринарній онкології започатковано перепрофілювання фармакологічних засобів, яке передбачає використання лікарських препаратів, що ліцензовані для хвороб не онкологічного профілю. Перевага перепрофілювання зводиться до зменшення вартості лікування за рахунок використання раніше зареєстрованих комерційних лікарських засобів із визначеними: механізмом дії, фармакокінетикою / фармакодинамікою, біологічною безпекою і дозами. В гуманній медицині численні дослідження *in vivo* та *in vitro* перепрофільованих для лікування раку препаратів показали обнадійливі результати. Для ветеринарної онкології цей напрямок є новим, тому кількість публікацій наразі обмежена, а клінічна ефективність залишається не вивченою (Giuliano et al., 2022).

Метформін відноситься до найбільш ефективних фармакологічних засобів для лікування цукрового діабету 2 типу. Він знижує активність глюконеогенезу в мітохондріях гепатоцитів без посилення секреції інсуліну, тим самим не створюючи ризику гіпоглікемії та збільшення маси тіла (Madiraju et al., 2014). Як побічний ефект за коротко- або довготривалого використання метформіну, гіпоглікемія реєструється рідко (Lalau et al., 2017).

В організмі метморфін не метаболізується, виводиться виключно шляхом ниркової екстракції плазми (90–100 %). Більш повільний розподіл із клітин крові порівняно із кліренсом у плазмі обумовлює суттєву різницю показників ступеню клітинного розподілу метформіну *in vitro* відносно значено *in vivo* (Xie et al., 2015).

У собак динамічні зміни сироваткового вмісту метформіну мають виражену міжіндивідуальну варіабельність та подібні значенням у людини і собак. Встановлені фармакокінетичні і фармакодинамічні середні показники становили: біодоступність при пероральному введенні – 31 %; період напіввиведення за внутрішньовенної ін'єкції – $20,4 \pm 4,1$ години; час досягнення максимальної сироваткової концентрації – $2,5 \pm 0,4$ години; системний кліренс – $24,1 \pm 7,8$ мл/хв/кг; об'єм розподілу – $44,8 \pm 23,5$ л/кг (Johnston et al., 2017).

Метформін рекомендований в якості антигіперглікемічного засобу в комплексному лікуванні ожиріння та інсулінорезистентності у собак (Johnston et al., 2017; Вуріж, 2017). Використання метформіну з метою нормалізації порушень метаболізму виявилось ефективним у собак із гіперадренкортицизмом за рахунок вираженого зниження: вмісту глюкози, холестерину і тригліцеридів у крові; синтезу інсуліну та інсулінорезистентності м'язової і жирової тканин, а також покращення функціонального стану β -клітин підшлункової залози (Miceli et al., 2018). Враховуючи енергетичну залежність неоплазійних клітин від інтенсивності гліколізу, гіпоглікемічний ефект метформіну може бути використаний у направлених (таргентній) терапії для обмеження високих біоенергетичних і біосинтетичних потреб неоплазійних клітин.

Шляхом послаблення передачі сигналу TGF β метморфін повністю блокує участь мезенхімальних клітин у патологічних процесах, включаючи фіброз (хронічне захворювання нирок, серцева недостатність, склероз) (Cufi et al., 2010).

Метформін за додавання до розчинника собачої сперми під час кріоконсервації в період зберігання зменшує окиснювальний стрес і пошкодження ДНК, після розморожування забезпечує збереження високої життєздатності сперматозоїдів, без порушення цілісності клітинних мембран або акросомальної реакції (Grandhaye et al., 2020).

За даними Garamaleki et al. (2012) метморфін у собак із однобічною обструкцією верхнього відділу уретри за рахунок цитозахисту спричинює, на тлі ішемії артерії, покращення функцій нирок, а також виражений протизапальний вплив на ниркову тканину.

Одним із обґрунтувань доцільності використання метформіну за новоутворень МЗ є наявність в організмі стійких до ад'ювантної хіміотерапії «сплячих» ракових клітин, які характеризуються високою активністю 5'-аденозинмонофосфат-активованої протеїнкінази (АМРК) та посиленням окисненням жирних кислот. Інгібування метформіном АМРК та механізмів окиснення направлене на профілактику розвитку рецидивів та / або метастазів (Hampsch et al., 2020).

За неоплазій МЗ у собак метформін індукує блокування клітинного циклу у фазах G₀/ G₁, посилює експресію p21 і p27 на тлі зниження експресії цикліну D1 і циклінзалежної кінази 4. В ракових клітинах під впливом метформіну збільшується рівень апоптозу на тлі активації каспази-3 та розщеплення полі(АДФ-рибози) полімерази (Fan et al., 2021).

Метформін продемонстрував виражене пригнічення проліферативного потенціалу ракових стовбурових клітин (CSC), які характеризуються здатністю до самовідновлення, забезпечують резистентність неоплазійних клітин до опромінення і хіміотерапії та ініціацію онкогенезу (Barbieri et al., 2015). Cufi et al. (2010) довели, що метформін через зниження вмісту глюкози у крові, зменшує потенціал самовідновлення і проліферації CSC МЗ, резистентних до трастузумабу.

Результати досліджень, проведені на моделях *in vitro* та *in vivo* (метастатичній лінії клітин CF41 та ксенотрансплантата раку МЗ собаки)

засвідчили, що здатність TGF- β 1 пригнічувати експресію окремих генів у поєднанні із метформіном забезпечують блокування процесу епітеліально-мезенхімального переходу (EMT) та профілактику розвитку метастазів (Xavier et al., 2018).

У тривимірних культурах клітинних ліній новоутворень МЗ собак СМТ-U229 і CF-41 метформін, пов'язаний із TGF- β 1 пригнічує експресію N-кадгерину та посилює – E-cadherin і Claudin-7, що свідчить про його антиметастатичний ефект (Leonel et al., 2014).

Результати, отримані Moschetta et al. (2019), показали можливість контролю механізмів ангіогенезу в новоутвореннях МЗ через зниження експресії генів VEGF (фактор росту ендотелію судин) та HIF-1 (фактор-1, індукований гіпоксією) за допомогою метформіну і LY294002 (морфолін-вмісна хімічна сполука – інгібітор багатьох білків і потужний інгібітор фосфоінозитид-3-кіназа).

Метформін пригнічує міграцію ендотеліальних клітин-попередників (EPC) за рахунок зниження рівня ММП-2 і ММП-9. Ймовірний механізм такого ефекту регуляторний вплив через шлях АМРК (5'-аденозинмонофосфат-активована протеїнкіназа) / mTOR (мішень рапаміцину у ссавців) / аутофагія (Li et al., 2017). Призначення метформіну обумовлювало зменшення частоти метастазування у лімфатичні вузли на тлі зниження рівня Ki-67/ММП-2 (Min et al., 2020).

Доведено, що метформін забезпечує зменшення проліферації і посилення апоптозу на клітинних лініях карциноми передміхурової залози та уретрального каналу (Saeki et al., 2015).

Враховуючи, що більшість сук із пухлинами МЗ відносились до старшої вікової групи (10 років та старші), важливим аспектом дії метформіну виступає його кардіопротективний ефект у собак із серцевою недостатністю. Sasaki et al. (2009) показали, що метформін посилював фосфорилування АМРК та ендотеліальної синтази оксиду азоту, підвищував у крові рівень оксиду азоту і резистентність до інсуліну, за рахунок чого зменшував апоптоз

кардіоміоцитів і запобігав прогресуванню серцевої недостатності. Ефект метформіну у метастатичних ліній клітин МЗ собак (CMGT) опосередкований АМПК-незалежним блокуванням клітинного циклу, неметастатичних – шляхом активація АМПК та інгібування мішені рапаміцину для ссавців (mTOR) (Klose et al., 2021).

Через ризик розвитку метформін-асоційованого лактоацидозу (MALA) захворювання печінки і нирок вважались абсолютним протипоказанням до його використання (Brackett, 2010; Lalau et al., 2015). Проте, навіть за тяжкого лактоацидозу і гіповолемії, викликаного застосуванням метформіну, внутрішньовенне крапельне введення кристалоїдів, дестрози та ізотонічного розчину бікарбонату натрію забезпечує стабілізацію загального стану і видужання тварин (Ueda et al., 2018).

Основні механізми протипухлинної дії метформіну включають блокаду клітинного циклу, індукцію апоптозу та зміну умов мікрооточення ракових клітин (шляхом зниження рівня глюкози в крові). Поряд із протиглікемічним ефектом, показана протипухлинна та кардіопротективна дія метформіна в онкохворих собак. Проте, доцільність застосування метформіну за новоутворень, у тому числі і неоплазій МЗ, базується, як правило, на результатах досліджень *in vitro*. Клінічні дослідження представлені поодинокими публікаціями без аналізу терапевтичних мішеней для метформіну.

Висновок до розділу 1

Онкологічна патологія найбільш часто реєструється серед собак і котів, які утримуються в якості домашніх компаньйонів. Проблема лікування сук із новоутворенням МЗ залишається актуальною, незважаючи на потужні спроби удосконалення існуючих та запровадження нових протоколів лікування. Останнє десятиріччя характеризується негативною динамікою реєстрації пухлин МЗ у собак, збільшенням частки злоякісних типів, посиленням ролі екологічних факторів в ініціації канцерогенезу, формуванням резистентності

ракових клітин до хіміотерапевтичних препаратів. Оперативне втручання хоча і залишається основою для лікування сук із пухлинами МЗ, суттєвим чином не впливає на подальший перебіг захворювання. Тому найбільш перспективним напрямком є клінічне впровадження біологічних маркерів для ранньої діагностики та оцінки ризиків прогресування хвороби, а також ефективних консервативних протоколів.

В онкологічній практиці за новоутворень МЗ найбільше поширення отримала ад'ювантна хіміотерапія, зокрема циклофосфамідом. Основним недоліком хіміотерапевтичних препаратів є висока токсичність, для зменшення рівня якої запропоновано метрономний режим. Він передбачає часте (наприклад, щоденне) пероральне призначення препарату в мінімальних дозах. Метрономний режим хіміотерапії у ветеринарній онкології використовується вкрай рідко. Ймовірно, основна причина пов'язана із незначною кількістю клінічних досліджень та відсутністю патогенетичного обґрунтування щодо метрономного використання хіміотерапевтичних засобів.

Інноваційний напрямок лікування сук із неоплазіями МЗ, який у ветеринарній онкології залишається не вивченим – використання перепрофільованих препаратів. Один із представників таких фармакологічних засобів, метформін, спричинює протипухлинну дію і знижує токсичні ефекти хіміопрепаратів.

Опубліковані результати засвідчили ефективність циклофосфаміду у собак за неоплазій МЗ, але комбінація із перепрофільованими препаратами, зокрема, метформіном, не вивчалась. Наразі не повністю оцінений потенціал застосування циклофосфаміду у метрономному режимі, що обмежує його призначення в межах прямої протипухлинної дії.

РОЗДІЛ 2 ВИБІР НАПРЯМКІВ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконана впродовж 2018–2023 років в умовах кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету, лікарень ветеринарної медицини міст Дніпро та Запоріжжя державної і приватної форм власності: державної лікарні ветеринарної медицини Шевченківського та Соборного районів міста Дніпро, «Ветсервіс», «Best», «Біосвіт», «Добрий доктор», «Ветлайф», «Ветеринарний госпіталь», «VetVille», клініко-діагностичного центру ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Всі дослідження проведено із дотриманням вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» (18.03.1986, Страсбург), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006, із змінами, поточна редакція № 3039-IX від 11.04.2023), що підтверджено біоетичною експертизою.

Матеріалом для досліджень слугували собаки із верифікованими новоутвореннями МЗ. Етапи дослідження представлено на рис. 2.1.

Проведення дослідження включало наступні етапи:

1. Моніторинг поширення, визначення факторів ризику та структури захворюваності сук на неоплазії МЗ. Проведено аналіз амбулаторних карт 1721 пацієнта, які містились в електронних базах даних лікарень ветеринарної медицини. Із 1721 тварини були відібрані 862 сук, в яких визначали клінічні особливості перебігу захворювання, гематологічні і біохімічні показники крові; проводили рентгенологічні та ультразвукові дослідження для виявлення можливих метастазів (насамперед, у грудній порожнині). Результати гістопатологічної верифікації у цих тварин отримували після дослідження екстирпованих неоплазій МЗ. Також враховували анамнестичні дані.

Клінічні, рентгенологічні, ультрасонографічні і гістологічні дослідження проводили у 862 тварин, визначення гематологічних показників – у 157 собак (онкохворих – 78, клінічно здорових – 79 пацієнтів).

Біохімічні показники (n=157) досліджували у 79 тварин із пухлинами та 78 клінічно здорових сук МЗ (44 з яких мали нормальний індекс маси тіла, 35 – високий). На індекс маси тіла, який визначали за 9-бальною шкалою (Baldwin et al., 2010) не впливала порода і розміри тварини.



Рис. 2.1. Схема проведення наукового дослідження

За гістологічного дослідження видалених пухлин МЗ (n=862), доброякісні нозологічні форми верифікували у 390, злроякісні – 472 зразках патологічного матеріалу. Додаткову верифікацію наявності/відсутності ангіо- і лімфоінвазії проводили гістологічно в зразках патологічного матеріалу злроякісних новоутворень МЗ (n=472).

Результати клінічних, рентгенологічних та ультразвукових досліджень були підґрунтям для клінічної класифікації пухлин МЗ (за Owen, 1980).

2. Визначення біологічних маркерів, які дозволяють об'єктивно оцінити ефективність мастектомії та лікувального протоколу, а також можуть слугувати мішенями для запропонованої метромомної терапії. Визначали експресію матриксних металопротеїназ-2 та -9, які відіграють важливу роль у метастазуванні (забезпечують міграцію ракових клітин за межі пухлини); фактору росту ендотелію судин VEGF (VEGF-1, VEGF-2) – показника неангіогенезу пухлин; маркера проліферації Ki-67 – показника, який характеризує агресивність росту новоутворення; інвазії неоплазійних клітин у лімфатичні і кровоносні судини – прогностичного фактору перебігу захворювання.

Для визначення серед всього загалу частки пухлин, які мають високу активність ММП-2 і -9 у плазмі та пухлинній тканині досліджували шляхом зимографії 79 зразків доброякісних та 167 зразках злроякісних неоплазій МЗ. Порівняння активності ММП-2 і -9 (латентних й активних форм) за різних гістологічних форм новоутворень МЗ проводили в 23 зразках МЗ клінічно здорових тварин, 27 – доброякісних і 68 злроякісних неоплазій (33 – без метастазів, 35 – з метастазами).

Експресію VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 та Ki-67 визначали у 472 сук із злроякісними пухлинами МЗ імуногістохімічно. Оцінку фактору росту ендотелію судин (VEGF) проводили за інтенсивністю імунофарбування в зразках неоплазійної тканини ядер та/або цитоплазми ракових клітин, Ki-67 – кількісного підрахунку пофарбованих клітин серед 100 пухлинних клітин не менше ніж у 5 типових полях зору.

3. Оцінка ефективності мастектомії за неоплазій МЗ у сук. Отримані результати використовували для порівняння із запропонованою ад'ювантною метрономною терапією. Контроль за перебігом захворювання після хірургічного лікування включав клінічні дослідження, визначення медіани виживання і безрецидивного періоду та їх кореляцію із прогностичними факторами (клінічною стадією, гістопатологічною структурою, ангіо- і лімфоінвазією), а також рентгенографічне та ультразвукове дослідження для діагностики метастазів.

Мастектомію проведено у 382 сук, які відносились до різних порід або були метисами, віком від 7 до 10 років. Серед них I клінічна стадія діагностована у 47, II стадія – 151, III стадія – 184 сук. Тваринам IV клінічної стадії хірургічне лікування не проводили, тому їх не використовували за проведення цього етапу досліджень.

Для визначення впливу гістологічної форми пухлини на медіани виживання і безрецидивного періоду (серед 382 сук) враховували результати, отримані за екстирпації найбільш поширених нозологічних форм. Загальна кількість таких тварин – 126. Кількість прооперованих тварин, залежно від гістопатологічної форми злоякісних неоплазій МЗ, становила: муцинозна карцинома (n=5), карцинома *in situ* (n=17), веретеноподібноклітинна карцинома (n=5), тубулярна карцинома (n=12), протокова карцинома (n=8), карцинома змішаного типу (n=22), тубулопапілярна карцинома (n=18), карцинома комплексного типу (n=19), комедокарцинома (n=8), крибриформна карцинома (n=12). Інші нозологічні форми пухлин МЗ діагностували в поодиноких випадках.

Серед сук, яких лікували хірургічно, у 169 судинна інвазія була відсутня, ангіоінвазію верифікували у 135, лімфоінвазію – 78, метастазування в лімфатичні судини – 71 тварини.

4. Клінічна апробація ад'ювантної метрономної терапії за злоякісних неоплазій МЗ у сук. З метою визначення протипухлинної дії перепрофільованого препарату метформін, основна дія якого –

антидіабетична, та враховуючи можливо (прогнозовано) високий рівень глюкози, холестерину і тригліцеридів у крові тварин із надлишковою масою тіла, для дослідження використовували сук із нормальним і високим індексом маси тіла. Оцінка ефективності лікування включала клінічні дослідження, визначення медіан виживання і безрецидивного періоду та динаміки біохімічних показників (глюкоза, холестерин, тригліцериди). Розвиток метастазів впродовж лікування та після його закінчення контролювали рентгенологічно та ультрасонографічно.

Для проведення досліджень було відібрано тварин із нормальним та високим індексом маси тіла. У контрольних групах кількість пацієнтів із нормальним індексом маси тіла становила 17, високим – 12 сук, дослідних – 17 та 13 тварин, відповідно. Сукам дослідних груп, порівняно із контрольними, одночасно із метрономною терапією циклофосфамідом ($12,5 \text{ мг/м}^2$) призначали метформін (10 мг/кг).

Моніторинг поширення, визначення факторів ризику та структури захворюваності сук на неоплазії молочної залози. Перший етап передбачав моніторинг онкологічної патології собак, які утримувались в умовах міст Дніпра та Запоріжжя ($n=1721$). При цьому, з урахуванням нозологічних форм, аналізували анамнестичні дані, визначали поширення серед собак новоутворень МЗ, оцінювали можливі фактори ризику їх виникнення і прогресування, вивчали клінічні, патоморфологічні і гістопатологічні особливості, гематологічні і біохімічні зміни крові.

Анамнестичні дані включали інформацію щодо раціонів годівлі, утримання, використання тварини, перенесених захворювань / результатів їх лікування, репродуктивного статусу, використання засобів гормональної контрацепції, часу виявлення ознак захворювання та його перебігу (за даними власника), проведеного лікування та його ефективності (за наявності).

Клінічне дослідження передбачало оцінку загального стану тварини, а також місцевих патологічних змін: локацію, множинність, величину, форму, співвідношення із оточуючими тканинами, наявність виразок.

За визначення факторів ризику виникнення пухлин МЗ враховували породу, вік, гормональний статус, екологічні чинники, клінічну стадію, патоморфологічну структуру і наявність ангіо- та лімфатичної інвазії пухлинних клітин.

Клінічну стадію визначали відповідно до класифікації Owen (1980). Визначення клінічної стадії новоутворень МЗ у сук ґрунтувалось на клінічних показниках: визначенні розміру неоплазії, характеру поверхні, щільності, співвідношення із оточуючими тканинами, стану шкіри над пухлиною (наявність/відсутність виразок), оцінці регіонарних лімфатичних вузлів (величини, форми, рухливості, ознак запалення). Враховували результати рентгенологічного та ультразвукового досліджень, за допомогою яких встановлювали наявність або відсутність віддалених метастазів.

Ультрасонографічно також визначали розмір регіонарних лімфатичних вузлів (збільшення може свідчити про запальні або неоплазійні процеси), їх форму та контури (нормальна форма – овальна; зміна форми, нечіткі контури або нерівні краї можуть вказувати патологію), внутрішню структуру (однорідність або неоднорідність структури дозволяє диференціювати запальні процеси від новоутворень), наявність включень (наявність кіст, кальцинатів та інших патологічних структур).

За ультрасонографічного дослідження регіонарних лімфатичних вузлів диференціювали їх метастатичне ураження (характеризується наявністю в середині лімфовузла патологічних включень, що вказують на вторинне ураження) від реактивних змін (обумовлені запалення за дії інфекційних факторів; лімфовузли збільшені, але зберігають однорідну структуру), гіперплазії (може бути ознакою імунної відповіді на запалення) та первинного пухлинного ураження (лімфовузли неоднорідні, збільшені, мають змінену форму та структуру).

Рентгенологічне дослідження грудної порожнини проводили в двох взаємно перпендикулярних проекціях: прямій і латеральній (бічній). Можливі рентгенологічні ознаки метастазів в грудній порожнині: осередкові (форма

наближена до кулі, зазвичай свідчать про слабку агресивність первинної злоякісної неоплазії), інфільтративні (форма неправильна, контури не чіткі, можуть візуалізуватись у вигляді сітки або локальних затемнень), змішані (характеризуються поєднанням осередкових та інфільтративних осередків). За кількістю метастази можуть бути поодинокими або множинними, дрібними і великими, одно- і двобічними.

Візуальна діагностика була забезпечена ультразвуковим сканером Mindray Vetus 8 (Китай) та рентгенівським апаратом MeCan MX-V200B10 (Китай).

Визначення загальноклінічних показників крові проводили на гематологічному аналізаторі Mindray BC-20 Vet (Китай), біохімічних – на біохімічному аналізаторі Mindray BS-230 (Китай). Зазначене обладнання функціонує в автоматичному режимі, призначене для досліджень у ветеринарній медицині. В обох випадках використовували набори ветеринарних реактивів, вироблені Mindray Co Ltd.

Серед гематологічних показників визначали: вміст еритроцитів, гемоглобіну, тромбоцитів, лейкоцитів; гематокрит; швидкість осідання еритроцитів; кількість основних типів лейкоцитів (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, лімфоцити, моноцити) в абсолютних одиницях. Біохімічний профіль крові включав: концентрацію загального білку та його фракцій (альбумінів, глобулінів), загального білірубину, сечовини, креатиніну, загального кальцію, неорганічного фосфору, холестерину, тригліцеридів, глюкози; активність аланін- та аспартатамінотрансферази, гамма-глутамілтранспептидази, лужної фосфатази.

Необхідність вивчення біохімічних змін крові у тварин із надмірною масою тіла обумовлена прогресуючим збільшенням таких особин та високим ризиком у них метаболічних порушень, які можуть ініціювати розвиток пухлин МЗ. Тому, крім онкохворих тварин (n=78) біохімічні показники визначали у клінічно здорових сук із нормальним (n=44) і високим (n=35) індексом маси тіла.

Індекс маси тіла розраховувався індивідуально для кожної суки згідно методики Baldwin et al. (2010) та не залежав від породної приналежності або розмірів тварини. Згідно методики за показнику до 4 балів індекс маси тіла низький, 4–6 балів – нормальний, більше 6 балів – високий. Тобто, тварини із надлишковою масою тіла та ожирінням мали оцінку 6 балів та вище.

Гістологічне дослідження патологічного матеріалу, відібраного з трьох ділянок екстирпованої пухлини МЗ (або шляхом біопсії) проводили за методикою Ляшенко зі співавт. (2007). Зразки неоплазійної тканини фіксували 10 % нейтральним забуференим формаліном за Лілі протягом 48–72 годин, «проводили» через висхідні спирти, хлороформ, хлороформ-парафін і парафін та заливали в парафін. Зрізи (товщина 5–6 мкм) виготовляли на ротаційному мікротомі MPS-2 (MICROmed, Україна). Парафінові зрізи депарафінували в ксилолі та фарбували гематоксиліном-еозином і толуїдиновим синім. Для верифікації неоплазій використовували мікроскоп Olympus BX43 (Olympus, Японія). Для визначення гістологічного типу пухлин використовували класифікацію Goldschmidt et al. (2011), стадії – критерії Elston та Ellis (1991) у модифікації Peña et al. (2013).

За статистичної оцінки результатів моніторингу проводили розрахунок довірчого інтервалу (використовувати функцію confidence у програмі Microsoft Excel). Довірчий інтервал показує, наскільки можна покладатися на отримані дані та яка відмінність результатів являється статистично значимою. Довірчий інтервал розраховується на основі статистики вибірки та бажаного рівня довіри (95%). 95% довірчий інтервал для середнього зниження болю - це діапазон значень, в межах якого очікується, що середній показник в популяції буде знаходитися з ймовірністю 95%.

Визначення біологічних маркерів, які дозволяють об'єктивно оцінити ефективність мастектомії та лікувального протоколу, а також можуть слугувати мішенями для запропонованої метрономної терапії. На моделях тварин і в когортних дослідження людей матриксні металопротеїнази (ММП) визначені як ключові медіатори прогресування пухлини (Radisky & Radisky,

2015). ММП відносяться до одного із найбільш поширених в організмі сімейства ензимів, яке представлено протеїназами: цистеїновими, сериновими, аспартильними і металозалежними (Visse & Nagase, 2003). ММП-2 та -9 (желатинази) забезпечують протеолітичну деструкцію міжклітинного матриксу, а також сигналінг на всіх етапах метастазування. Визначення їх активності в крові та неоплазії являє собою перспективний маркер оцінки ризику прогресування раку МЗ, насамперед у пацієнтів із ожирінням (Ганусевич зі співавт., 2021). Роль ММП в патогенезі неоплазій МЗ у собак залишається не вивченою, наявна інформація з цього питання обмежена.

Спочатку серед 79 доброякісних пухлин і 167 злоякісних новоутворень МЗ визначали кількість неоплазій із високою активністю МПП-2 і -9. Потім досліджували рівень експресії латентних й активних форм МПП-2 і -9 у нормальній тканині МЗ (n=23), а також у доброякісних (n=27) та злоякісних (n=68) пухлинах (33 – без метастазів, 35 – з метастазами).

Активність ММП визначали шляхом зимографії. Проби крові відбирали в пробірки з 3,8 % розчином цитрату натрію (Eximlab, Китай) із подальшим їх центрифугуванням (Thermo Heraeus Labofuge 400, США; 15 хв. при 3000g). Отриману плазму поміщали в мікроцентрифужні пробірки (типу Еппендорф) по 50 мкл і заморожували. В якості еталону використовували пул плазми клінічно здорових собак: однакові об'єми ретельно перемішували до однорідної маси, розливали по 50 мкл та заморожували.

Використовували протокол Gelatin zymography protocol Detect MMP activity in conditioned media (Abscam, Велика Британія), адаптований для дослідження плазми (Шевцова зі співавт., 2013). Зразки плазми дослідних собак та аліквоту пулу-плазми інкубували (37°C, 20 хв.), після чого розводили у 20 раз забуференим фізіологічним розчином та змішували у співвідношенні 1:1 із буфером Лемлі (0,4 М Tris-HCl, 5 % ДСН, 20 % гліцеролу, 0,03 % бромфенолового синього (pH=6.8).

Для електрофоретичного фракціонування використовували вертикальний електрофорез (Clever Scientific nanoPAC-300P, Велика Британія)

у холодовій камері при 4°C (4 год., 20 mA). Електрофорез зразків плазми крові проводили у 7,5 % ПААГ в присутності 0,1 % ДСН, 2 мг/мл желатина, 1.5М Tris-HCl, pH 8,8, 0,05 % персульфату амонію, 0,005% TEMED. У кожен лунку гелю вносили по 20 мкл підготовленого зразка. В якості електродного буферу використали розчин: 0,025М Tris + 0,192М гліцину + 0,01 % ДСН (pH=8,3). Після закінчення електрофорезу гелі відмивали 2 рази по 30 хвилин за допомогою буфера: 2,5 % Triton X-100 + 50 mM Tris-HCl + 5 mM CaCl₂ + 1 μM ZnCl₂ (pH=7,5). Потім гелі промивали 5-10 хвилин інкубаційним буфером (1% Triton X-100 + 50 mM Tris-HCl + 5 mM CaCl₂ + 1 μM ZnCl₂ (pH=7,5)) при 37°C з постійним струшуванням та з наступною інкубацією в свіжому буфері впродовж 24 год. за температури 37°C. Після закінченню інкубації зливали інкубаційний буфер, гель витримували 1 год. у фарбувальному розчині (40 % метанолу + 10 % оцтової кислоти + 50 % дистильованої води + 0,5 % Coomassie Blue). Після фарбування гелі промили дистильованою водою та заливали проявним розчином (40 % метанолу + 10 % оцтової кислоти + 50 % дистильованої води) до моменту візуалізації смуг активності ММП (рис. 2.2). Обробку отриманого матеріалу здійснювали шляхом сканування гелів із обробкою цифрових зображень за допомогою програми ImageJ (Wayne Rasband and contributors National Institutes of Health, США, 1998).

Активність ММП у пухлинній тканині визначали за методом Bencsik et al. (2017). Зразки тканин об'ємом близько 0,3 см³ поміщали в буфер для розчинення, потім гомогенізували на льоду із використанням BioSpec Tissue Tearor та центрифугували за температури 4°C (45 хв., 2000 g). В супернатанті визначали загальну концентрацію білка за допомогою набору Stanbio LiquiColor (Stanbio Laboratories) на рідері Minray MR A за 550 нм. За необхідності зразки зберігали за температури -80 °C. Для проведення зимографії за протоколом Detect MMP у кондиціонованому середовищі з желатином зразки розбавляли буфером Леммлі до концентрації білка 20 мг/мл. Методика аналогічна дослідженню плазми. Еталоном слугувала активність ММП у пулі нормальної тканини МЗ. Активність ММП у крові визначалась у

% до пулу здорових донорів, у неоплазії – до пулу нормальної тканини МЗ.

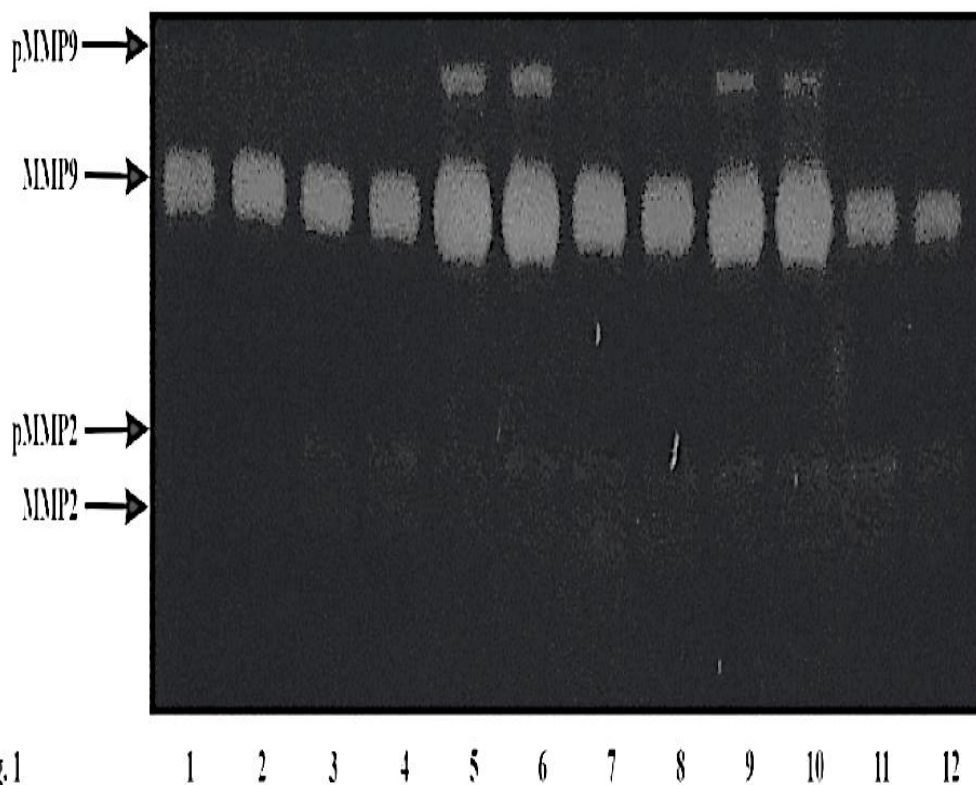


Рис. 2.2. Проведення зимографії за визначення активності матричних металопротеїназ

Статистичний аналіз та графічну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 10 (StatSoft inc., USA, 2011), де пул-плазми використали як еталон, у якому активність желатиназ прийняли за 100 %. ANOVA (дисперсійний аналіз) з поправкою Бонферроні використовувався для правильного порівняння середніх значень між групами. Отриманий показник вважали статистично значимим за $p < 0,05$.

Визначення фактору росту ендотелію судин в зразках патологічного матеріалу (пухлинах МЗ) проводили шляхом імуногістохімічного фарбування. Виготовлені зрізи, завтовшки 4 мкм, піддавали стандартній депарафінізації у ксилолі та гідратації у спиртах нисхідної концентрації. Активність ендогенної пероксидази блокували інкубацією у 0,3 % водному розчині перекису водню протягом 30 хв. Демаскування антигенів здійснювали у мікрохвильовій пічці за потужності 750 Вт впродовж 3–5 хв. у цитратному буфері (10 ммоль, рН=6).

В подальшому на зразки наносили антитіла (VEGF-A specific polyclonal antibody (VEGF [A20]: sc-152; Santa Cruz Biotechnology Ltd., Santa Cruz, у разведенні 1 до 200, VEGFR-2 polyclonal antibody (anti-VEGFR-1/Flt-1: sc-316; Santa Cruz Biotechnology) у розведенні 1:150; VEGFR-2 monoclonal antibody (Flk-1 [A-3]: sc-6251; Santa Cruz Biotechnology) у разведенні 1 до 100) та інкубували за температури 37°C протягом 30 хв. Для виявлення реакції антиген-антитіло використовували систему детекції «Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» («Thermo scientific», США), яка включала блокування ендогенної активності пероксидази перекисем водню і неспецифічного фонового фарбування з використанням «Ultra V block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto» та кінцеву візуалізацію діамінобензидином з дофарбовуванням гематоксиліном Маєра. Позитивним результатом імуногістохімічної реакції вважалася наявність специфічного забарвлення ядер та/або цитоплазми пухлинних клітин.

Визначення Ki-67 в пухлинній тканині МЗ: зразки, відібрані з екстерпованої неоплазії МЗ фіксували 10 % нейтральним забуференим формаліном та заливали парафіном. Зрізи товщиною 3 мкм, отримані із використанням мікротома Leica RM2125 RTS (Німеччина), інкубували за 60°C із наступною депарафінізацією через серію ксилолу та етанолу (100 %, 100 %, 90 %, 80 %, 70%, фосфатний буферний розчин – протягом 5 хв. у кожному). Відновлення антигену проводили 10мМ цитратним буфером рН 6,0 і нагріванням протягом двох 5-хвилинних циклів у мікрохвильовій печі за 750 Вт (PickCell Laboratories, Нідерланди). Ендогенну пероксидазу блокували шляхом занурення в 3 % перекис водню на 30 хв. Первинним антитілом при дослідженні Ki-67 був моноклональний клон MIB-1 (Dako Denmark) у розведенні 1:600). Антитіла інкубували зі зрізами тканин протягом 12 год. при 4 °С. Для посилення реакції використовували метод авідин-біотин (ABC kit elite, Vector) та візуалізували 0,04 % розчином 3,3'-діамінобензидину протягом 4 хв. за 15–20 °С. Потім зрізи контрастували фарбуванням гематоксиліном Майєра, промивали у водопровідній воді, зневоднювали етанолом, промивали

ксилолом і фосфатно-сольовим буфером та накривали покривним скельцем. В якості негативного контролю використовували фарбовану без первинного антитіла нормальну тканину МЗ. Потім проводили мікроскопію пофарбованих зрізів за за 400-разового збільшення (Olympus BX43, Японія). Кількісна оцінка базувалась на підрахунку щонайменше в п'яти репрезентативних (типових) полях кількості пофарбованих клітин серед 100 неоплазійних клітин.

Оцінка ефективності мастектомії у сук за неоплазій МЗ.

Алгоритм загального знеболювання за екстирпації новоутворень МЗ у сук:

- індукція шляхом внутрішньовенного введення пропофолу (емульсія, 10 мг/мл) у дозі 5 мг/кг;
- проведення інтубації;
- через 5–7 хвилин внутрішньовенна інфузія кетаміну із постійною швидкістю у дозі 5 мг/кг/год.;
- одночасно із кетаміном – інгаляційне застосування ізофлурану (рідина для інгаляції, 99,9 %) у дозі 1,5–2 % у суміші з киснем.

Таким чином, за оперативного втручання загальне знеболювання забезпечували кетаміном та ізофлураном.

Інгаляційне введення загального анестетика здійснювали за допомогою наркозно-дихального апарату Mindray WATO EX-35 Vet (Китай).

З метою візуалізації регіонарних лімфатичних вузлів за 7–10 хв. до початку операції в ділянці першого та п'ятого молочних пакетів внутрішньошкірно вводили 0,05 % водний розчин метиленового синього в об'ємі 0,2–0,5 мл. Введення барвника призводило до фарбування лімфатичних вузлів що спрощувало їх верифікацію та видалення.

Хірургічне втручання з видалення пухлин МЗ проводили із використанням високочастотного електрокоагулятора ЕК-300М (Інститут електрозварювання ім. Є.О. Патона НАН України). Розріз шкіри навколо новоутворень МЗ проводили скальпелем, хірургічні кордони визначались індивідуально, залежно від локалізації, співвідношення із оточуючими

тканинами. Подальше відокремлення пухлин від оточуючих тканин, а також коагуляцію кровоносних судин, здійснювали із використанням електрохірургічного інструменту ЕК-300М. Після екстирпації неоплазій МЗ на операційну рану накладали вузлуваті шви з мефілу (полігліколіду) № 3–6.

За локалізації пухлини в четвертому та п'ятому пакеті МЗ проводили екстирпацію третього–п'ятого пакетів, в третьому – всіх пакетів відповідної сторони.

Для об'єктивної оцінки ефективності розробленого протоколу визначили вплив на медіану виживання окремих предикторів: клінічної стадії, гістологічного типу новоутворення МЗ та судинної інвазії.

З метою визначення ступеня агресивності раку МЗ та відповідно ризику прогресування захворювання використовували Ноттінгемський прогностичний індекс, адаптований Haybittle et al. (1982) для ветеринарної медицини (veterinary-adapted Nottingham prognostic index, vet-NPI). Vet-NPI продемонстрував прогностичну цінність у ветеринарній онкології (Santos et al., 2015).

Vet-NPI обчислювався за формулою: $\text{Vet-NPI} = \text{розмір пухлини (см)} \times 0,2 + \text{Ноттінгемський гістологічний клас (NHG)} (1, 2 \text{ або } 3 \text{ відповідно для ступенів I, II та III}) + \text{докази наявної судинної інвазії/метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах (відсутні – 1, наявні – 2)}$.

На основі оптимальних порогових значень за допомогою тесту логарифмічного рангу були створені та порівняні криві Каплана–Майєра. З метою оцінки незалежної патогенетичної ролі різних прогностичних факторів у багатофакторному аналізі використовували регресійну модель Кокса.

До груп було включено сук із I–III клінічними стадіями раку МЗ (за Owen, 1980) різних порід і метисів, віком від 7 до 10 років. Критерії клінічної класифікації TNM наведено в цьому розділі вище. Кількість сук, в яких проведена мастектомія з приводу злякисних неоплазій МЗ (I–III стадій) становила 382 тварини: I стадії – 47, II стадія – 151, III стадія – 184 тварини. Сук із IV стадією не залучали до експерименту.

Клінічна апробація метрономного режиму ад'ювантної терапії циклофосфамідом та метформіном за пухлин МЗ. Наразі особливу актуальність набула значна кількість серед собак особин із надмірною масою тіла (Pegram et al., 2021; Suarez et al., 2022). Загальна поширеність собак із надмірною масою тіла досягає 21,1 %, ожирінням – 20,2 % (Chiang et al., 2022). Надмірна маса тіла виступає одним із факторів ризику неоплазій МЗ у сук (da Silva et al., 2023; Dolka et al., 2024) та супроводжується підвищенням рівня глюкози у крові (Zeugswetter & Schwendenwein, 2020). Тому клінічну апробацію метформіну у складі ад'ювантного протоколу проводили у сук як із нормальним, так і підвищеним індексом маси тіла.

Визначення індексу маси тіла собак визначали за 9-бальною шкалою, згідно методики Baldwin et al. (2010). Згідно методики за показнику до 4 балів індекс маси тіла низький, 4–6 балів – нормальний, більше 6 балів – високий. Тобто, тварини із надлишковою масою тіла та ожирінням мали оцінку 6 балів та вище.

Знеболювання пацієнтів та техніку хірургічного втручання наведено в цьому розділі вище (с. 64–65). Запропонований протокол лікування сук із неоплазіями МЗ включав мастектомію та ад'ювантну фармакологічну терапію, яка у контрольних групах передбачала призначення циклофосфаміду у дозі 12,5 мг/м², дослідних – комбінацію циклофосфаміду (12,5 мг/м²) із метформіном (10 мг/кг). Препарати застосовували у метрономному режимі – перорально 1 раз на добу протягом 6 місяців. З метою проведення клінічної апробації протоколу було сформовано по дві контрольні і дослідні групи з тварин із нормальним (по 17 сук у кожній) та високим індексом тіла (12 і 13 особин, відповідно), в яких діагностовано злоякісні пухлини МЗ III клінічної стадії (табл. 2.1).

Вибір сук із надмірною масою тіла обґрунтовано результатами першого етапу наших досліджень, згідно яким встановлено достовірне підвищення рівня глюкози, холестерину і тригліцеридів.

Циклофосфамід – протипухлинний засіб, який відноситься до класу

оксазафосфоринів (алкілувальні сполуки, аналоги азотистого іприту, код АТХ L01A A01). Діюча речовина – циклофосфаміду моногідрат. Виробник – ЕБЕВЕ Фарма, Словенія. Препарат спричинює специфічну цитотоксичну дію на всіх стадіях клітинного циклу.

Метформін – протидіабетичний препарат (пероральні гіпоглікемічні засоби, за винятком інсулінів, бігуаніди, код АТХ А10В А02), який містить метформіну гідрохлорид. Виробник – Акціонерне товариство «Київмедпрепарат», Україна.

Таблиця 2.1

Схема метрономних протоколів лікування сук за пухлин МЗ

Групи	Індекс маси тіла	Протокол		
		хірургічне втручання	фармакотерапія	
			препарат	режим
контроль	нормальний (n=17)	мастектомія	циклофосфамід (12,5 мг/м ²)	перорально 1 раз на добу, протягом 6 місяців
	високий (n=12)			
дослід	нормальний (n=17)		циклофосфамід (12,5 мг/м ²) + метформін (10 мг/кг)	
	високий (n=13)			

У тварин контрольних і дослідних груп визначали медіани виживання і безрецидивного періоду, а також один раз на 3 місяці аналізували динамічні зміни показників глюкози, холестерину, тригліцеридів. Дослідження проводили на автоматичному біохімічному аналізаторі BS-230 (Mindray, China). Глюкозу визначали за методом Тріндера (GLU 500, Erba, Чехія) (Barham, et al. 1972). Холестерин досліджували за методом Тріндера (CHOL 250, Erba, Чехія) (Allain et al. 1974; Roeschlau et al. 1974). Тригліцериди визначали за методом GPO-POD (TG 250, Erba, Чехія) (Cole et al. 1997).

Контроль прогресії пухлинного процесу під час лікування за допомогою рентгенографії грудної клітини та УЗД органів черевної порожнини проводили щомісячно.

Статичний аналіз та графічну обробку результатів було проведено за допомогою ПЗ Statistica 10 (StatSoft inc., USA, 2011), данні порівнювали за допомогою тесту Т'юкі, з урахуванням похибки Бонфероні для множинних порівнянь, різниця вважалась достовірною за $p < 0,05$. Медіану виживання для кожної групи та 95 % довірчий інтервал оцінювали за кривими виживання Каплана-Мейєра. Медіана виживання – часовий проміжок, впродовж якого рівень виживаності вибірки досягне 50 %. Безрецидивний період розраховувалась як середнє значення періодів від дати хірургічного втручання до дати смерті тварини або еутаназії, обумовленої метастазами. Тварини, які загинули або були еутаназовані з причин, не пов'язаних із новоутворенням, не враховувались в подальших спостереженнях.

Висновок до розділу 2

Дослідження проводили із дотриманням вимог щодо гуманного відношення до тварин, що підтверджено актом біоетичної експертизи. Рівень знеболювання забезпечував адекватне знеболювання, використанні препарати мають незначний ризик побічних ефектів.

Методи проведення досліджень відповідають поставленій меті і завданням. Проведення запланованих досліджень було забезпечено використанням сучасного обладнання (аналізатори: гематологічний – Mindray BC-20 Vet, біохімічний – Mindray BS-230; ультразвуковий сканер – Mindray Vetus 8, рентгенівський апарат – MeCan MX-V200B10). Для об'єктивної оцінки ефективності проведених заходів використано методики визначення біологічних маркерів, які відображають: інтенсивність утворення ініційованою раковими клітинами судинної «сітки», активність проліферативних механізмів, а також особливості судинної інвазії.

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Аналіз особливостей перебігу новоутворень молочної залози у сук

3.1.1. Поширення, клінічні і гістопатологічні фактори ризику пухлин молочної залози у собак

Протягом 2018–2023 років було діагностовано 862 випадки пухлин МЗ у сук. В дослідження було включено сук, в яких було діагностовано новоутворення МЗ I–IV клінічної стадії (за Owen, 1980), за виключенням самців із новоутвореннями МЗ.

Моніторинг поширення спонтанних неоплазій МЗ у сук в період з 2018 по 2023 рік дозволив встановити наступні закономірності (табл. 3.1). На фоні незначного коливання загальної кількості щорічно задокументованих випадків новоутворень МЗ (від 146 до 154), співвідношення злоякісних і доброякісних типів у період з 2018 по 2021 роки було приблизно рівним (складало 1,02–1,07/1). Тобто, протягом шести років у досліджених собак не реєстрували збільшення частки злоякісних нозологічних форм пухлин МЗ.

Таблиця 3.1

Частота реєстрації пухлин МЗ у сук в період 2018–2023 роки

Період спостереження, роки	Всього	Злоякісні		Доброякісні		Співвідношення злоякісні/доброякісні
		n	%	n	%	
2018	159	82	51,6	77	48,4	1,07 / 1
2019	146	76	52,0	70	48,0	1,08 / 1
2020	165	84	50,9	81	49,1	1,04 / 1
2021	154	78	50,6	76	49,4	1,02 / 1
2022	87	71	81,6	16	18,4	4,43 / 1
2023	151	81	53,6	70	46,4	1,16 / 1
Разом	862	472	54,8	390	45,2	1,20 / 1

В 2022 році констатували різке збільшення (в 1,6 раза) частки тварин із злоякісними пухлинами МЗ (до 81,6 %), порівняно із періодом 2018–2021 роки (50,6–52,0 %), що, ймовірно, обумовлено значно меншою, порівняно із іншими періодами, кількістю досліджених тварин. Впродовж 2023 року злоякісних новоутворень МЗ діагностовано на 11,6 % більше, порівняно із доброякісними.

Одним із факторів, який впливає на прогноз та ефективність подальшого лікування є термін від візуалізації новоутворення МЗ власником до звернення в лікарню ветеринарної медицини (табл. 3.2). При цьому сутність скарг з боку власників зводилась до виявлення одиничних або множинних шароподібних утворень різних розмірів в структурі молочної залози собак.

В абсолютній більшості випадків (67,1–72,1 %) період від виявлення клінічних ознак новоутворення МЗ до постановки первинного діагноза спеціалістом ветеринарної медицини не перевищував 3 місяців, що підвищувало кількість тварин, в яких отримано позитивний результат лікування. Виключення складає зниження зазначеного показнику до 40,2 % впродовж 2022 року.

Таблиця 3.2

Період від виявлення пухлини власниками до звернення до лікарні

Період спостереження, роки	Загальна к-ть	< 3 місяців		> 3 місяців	
		п	%	п	%
2018	159	108	67,9	51	32,1
2019	146	103	70,5	43	29,5
2020	165	119	72,1	46	27,9
2021	154	105	68,1	49	31,9
2022	87	35	40,2	52	59,8
2023	151	90	69,6	61	40,4

Зменшення кількості зареєстрованих випадків новоутворень МЗ у сук та більш пізні звернення власників в лікарні ветеринарної медицини впродовж 2022 року значною мірою обумовлені бойовими діями, які спричинили

міграцію населення та суттєвий вплив на його психоемоційний стан.

Аналізуючи частоту випадків неопластичної патології у досліджуваних собак в розрізі 2018–2023 років, констатували певні варіації динаміки захворюваності серед тварин різних вікових груп (табл. 3.3). Проаналізувавши віковий розподіл захворюваності було виявлено що пухлини МЗ вражають сук від 2,5 до 17 років, причому середній вік пацієнтів становив $9,4 \pm 1,7$ роки. Структура захворюваності собак на пухлини МЗ свідчить про динамічне зростання кількості хворих тварин із віком.

Таблиця 3.3

Частота реєстрації неоплазій МЗ у сук залежно від віку

Вік тварин, років	Загальна кількість		Новоутворення			
			злюякісні		доброякісні	
	п	%	п	%	п	%
≤ 3	6	0,7	-	-	6	100
4	31	3,6	4	12,9	27	87,1
5	48	5,6	11	22,9	37	77,1
6	62	7,2	26	41,9	36	58,1
7	89	10,3	38	42,7	51	57,3
8	98	11,4	48	49,0	50	51,0
9	145	16,8	84	57,6	61	42,1
10	144	16,7	87	60,4	57	39,6
11	97	11,3	69	71,1	28	28,9
12	96	11,1	68	70,8	28	29,2
> 12	46	5,3	37	80,4	9	19,6
всього	862	100	472	54,8	390	45,2

Мінімальний рівень захворюваності спостерігали у собак віком до 3 років (0,7 %), максимальний – 9–10-річних сук (33,5 % випадків) із подальшим зниженням показника до 11,1–11,3 % у 11–12-річних тварин та 5,3 % – старших

12 років. Синхронно із збільшенням кількості випадків пухлин МЗ відбувалось підвищення ймовірності верифікації злоякісних типів: з 12,9 % у 4-річних сук до 80,4% у тварин, старших 12 років. При цьому у сук до 3-річного віку реєстрували тільки доброякісні неоплазії молочної залози.

Вивчення породної схильності собак до новоутворень МЗ дозволило визначити лише окремі породи, в яких захворювання діагностували частіше, порівняно із іншими (табл. 3.4). Хоча відсоткова різниця була не суттєвою, більш сприйнятливими до новоутворень МЗ були: німецькі (11,8 %) і східноєвропейські (9,4 %) вівчарки, такси (8 %), пуделі (6,3 %), йоркширські тер'єри (6,1 %).

Таблиця 3.4

Породна сприйнятливість собак до пухлин молочної залози

Порода	n	%
німецька вівчарка	102	11,8
східноєвропейська вівчарка	81	9,4
такса	69	8,0
пудель	54	6,3
йоркширський тер'єр	53	6,1
англійський/російський спанієль	47	5,5
середньоазійська вівчарка	33	3,8
лабрадор	30	3,5
французький бульдог	29	3,4
ротвейлер	28	3,2
інші породи із частотою реєстрації < 3 %	142	16,5
метиси	194	22,5
всього	862	100

Необхідно відзначити значний відсоток (16,5 %) порід собак, в яких частота реєстрації неоплазій не перевищувала 3 %, а також метисів (22,5 %).

На ймовірність розвитку пухлин у породному аспекті впливає фактор їх поширеності в регіоні, режими утримання, годівлі, використання, а також репродуктивний статус. Тому, на нашу думку, визначена породна схильність не є об'єктивним фактором ризику новоутворень МЗ. Сприйнятливість до неоплазій МЗ у породному аспекті, ймовірно, доцільно вивчати із урахуванням даних щодо генних мутацій та ступеня ризику спадкової передачі захворювання.

Аналіз впливу оваріогістеректомії сук на ймовірність розвитку новоутворень МЗ, насамперед злоякісних типів, засвідчив наступне. Серед досліджених 862 сук стерилізованими виявились 304 тварини (35,3%). Оваріогістеректомія у віці до 2 років проведена у 71 із 304 собак, що складає 8,2 %. Третина сук (102 тварини, 33,6 %) були стерилізовані більше ніж за 12 місяців до появи пухлини МЗ, у них діагностували лише злоякісні типи новоутворення. Питання щодо зниження ризику онкологічної патології МЗ після стерилізації сук, на нашу думку, залишається дискусійним. Зокрема, це зумовлено тим, що збільшення індексу маси тіла, яке реєструється на тлі оваріогістеректомії. Надлишкова маса тіла є одним із факторів ризику неоплазій МЗ (Pope et al., 2016; Marchi et al., 2022).

Окремі клінічні випадки представлено на рис. 3.1–3.3. Пухлини МЗ мали значну варіабельність за множинністю, величиною, локалізацією, відношенням до оточуючих тканин, характером патологічного вогнища (щільністю, поверхнею, наявністю/відсутністю виразкових дефектів). Клінічні ознаки злоякісності (некротичні ділянки на поверхні неоплазії, виражені ознаки запалення) не були пов'язані із розмірами та у більшості випадків є суб'єктивними предикторами агресивності неоплазій МЗ.

Зокрема, II клінічну стадію верифікували за незначних розмірів (від 3 до 5 см), але окремі із них мали ознаки вираженої запальної реакції і ділянки некрозу та були з'єднані із оточуючими тканинами. Тому, ймовірно, величина патологічного осередку не відображає ступінь агресивності новоутворення.

Поверхня пухлин МЗ, які класифікувались як друга клінічна стадія,

часто мали горбисту нерівну поверхню, неоднорідну щільність та різну форму. Частіше новоутворення МЗ II стадії виявляли під час клінічного дослідження тварин, зумовленого іншою патологією. Собаки, в яких діагностували стадію $T_2 N_0 M_0$ не мали породної сприйнятливості.



Рис. 3.1. II клінічна стадія пухлин МЗ ($T_2 N_0 M_0$) за Owen (1980)

Тварини із третьою клінічною стадією без ознак наявності пухлинних осередків у регіонарних лімфатичних вузлах та метастазів у віддалених тканинах ($T_3 N_0 M_0$) частіше відносились за розмірами до середніх і великих собак (порід або метисів).

Клінічну стадію $T_3 N_1 M_0$ найбільш часто діагностували у собак дрібних порід та тварин із надлишковою масою тіла, що ймовірно, обумовлене застосуванням засобів гормональної контрацепції та відсутністю в'язок.

Клінічні випадки щодо використання рентгенографії для діагностики метастазів у віддалених тканинах представлено на рис. 3.4.



Рис. 3.2. III клінічна стадія неоплазій МЗ (Т_{3b} N₀ M₀) за Owen (1980)



Рис. 3.3. III клінічна стадія новоутворень МЗ (Т_{3b} N₀ M₀) за Owen (1980)

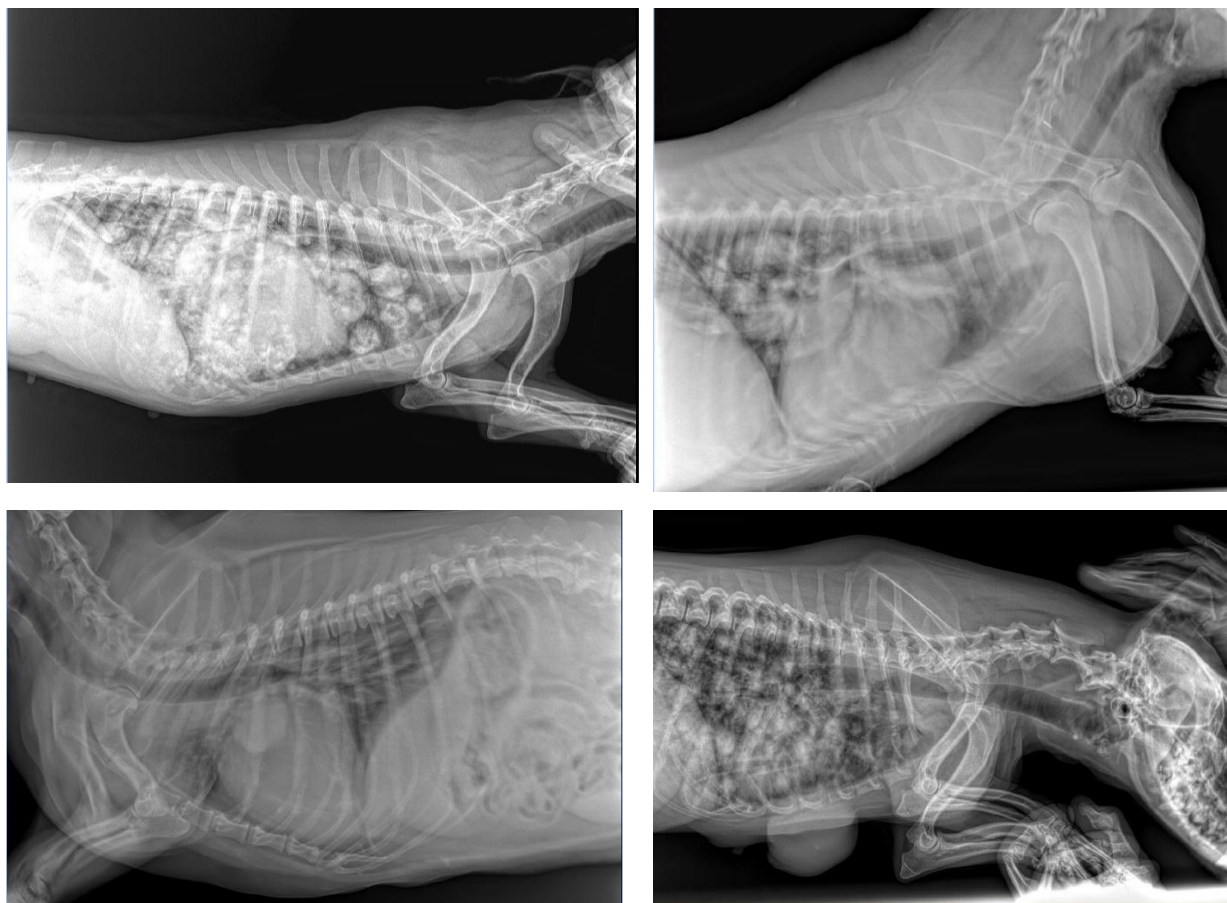


Рис. 3.4. Рентгенологічні ознаки метастазів у грудній порожнині за неоплазій МЗ у сук

Структура доброякісних новоутворень МЗ була представлена чотирма гістопатологічними типами, частота верифікації яких впродовж 2018–2023 років не зазнавала значних коливань (табл. 3.5). Загальна кількість тварин із доброякісною змішаною пухлиною становила 187, комплексною аденомою – 95, фіброаденомою – 70, внутрішньопротоковою папілярною аденомою – 38 особин, їх частка у структурі складала: $47,9 \pm 5,4$ % (41,4–62,5 %), $24,4 \pm 2,5$ % (22,1–28,9 %), $17,9 \pm 1,9$ % (12,5–21,4 %), $9,8 \pm 2,2$ % (9,8 \pm 2,2 %), відповідно.

Діагностовані у сук злоякісні неоплазії МЗ включали: епітеліальні пухлини (n=283, $62,7 \pm 7,1$ %, довірчий інтервал 54,9–70,4 %), злоякісні епітеліальні новоутворення спеціальних типів (n=120, $23,9 \pm 6,2$ %, довірчий інтервал 18,3–30,5 %), саркоми (n=69, $13,0 \pm 1,1$ %, довірчий інтервал 11,3–14,6 %) (табл. 3.6).

Тобто, в структурі злякисних типів неоплазій МЗ переважали новоутворення епітеліального походження. Впродовж періоду спостережень щорічна кількість нозологічних форм новоутворень МЗ суттєво не змінювалась, що узгоджується із даними табл. 3.1 щодо частоти реєстрації пухлин та співвідношення злякисних і доброякісних типів.

Таблиця 3.5

Динаміка верифікації доброякісних пухлин МЗ

2018		2019		2020		2021		2022		2023	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Доброякісна змішана пухлина МЗ (n=187, 47,9±5,4 %, довірчий інтервал 41,4–62,5 %)											
36	46,8	30	42,9	42	51,9	33	43,4	10	62,5	36	41,4
Комплексна аденома (n=95, 24,4±2,5 %, довірчий інтервал 18,8–25,7 %)											
17	22,1	18	25,7	18	22,2	22	28,9	3	18,8	17	24,3
Фіброаденома (n=70, 17,9±1,9 %, довірчий інтервал 12,5–19,5 %)											
15	19,5	15	21,4	14	17,3	13	17,1	2	12,5	11	15,7
Внутрішньопротокова папілярна аденома (n=38, 9,8±2,2 %, довірчий інтервал 6,3–11,6 %)											
9	11,6	7	10,0	7	8,6	8	10,5	1	6,3	6	8,6
Всього											
77	19,7	70	17,9	81	20,9	76	19,5	16	4,1	70	17,9
390											100

довірчий інтервал – діапазон, в якому можуть міститись реальні результати з ймовірністю 95 %

Злоякісні типи неоплазій молочної залози у сук

2018		2019		2020		2021		2022		2023	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Епітеліальні новоутворення (n=283, 62,7±7,1%, довірчий інтервал 54,9–70,4 %)											
45	54,9	49	64,5	47	55,9	45	57,7	50	70,4	47	58,0
Злоякісні епітеліальні новоутворення спеціальних типів (n=120, 23,9±6,2%, довірчий інтервал 18,3–30,5 %)											
25	30,5	15	19,7	26	31,0	22	28,2	13	18,3	19	23,5
Саркоми (n=69, 13,0±1,1%, довірчий інтервал 11,3–14,6 %)											
12	14,6	12	15,8	11	13,1	11	14,1	8	11,3	15	18,5
Всього											
82	17,4	76	16,1	84	17,8	78	16,5	71	15,0	81	17,2
472										100	

довірчий інтервал – діапазон, в якому можуть міститись реальні результати з ймовірністю 95 %

Епітеліальні злоякісні пухлини молочної залози верифікували найбільш часто. Порівняно із злоякісними епітеліальними пухлинами спеціальних типів та саркомами вони характеризувались значною варіабельністю (табл. 3.7). За поширенням слід виділити карциноми, які верифікували найбільш часто: комплексного, змішаного типу і тубулярну, які діагностували у 13,1; 11,7 та 12,0 % онкохворих тварин. В межах 10 % випадків зустрічались такі карциноми, як *in situ* (8,8 %), солідна (8,5 %), комедокарцинома, тубулопапілярна і цистопапілярна (по 6,4 %), анапластична (6,0 %). Ризик виникнення крибриформної, внутрішньо-протокової папілярної, простої, мікропапілярної інвазивної, протокової карцином, карциноми, що виникла в

складній аденомі/змішаній пухлині не перевищував 5 % та становив 4,2; 3,9; 3,5%; 3,5; 2,8; 2,5 %, відповідно.

До рідких епітеліальних типів злоякісних новоутворень МЗ (згідно класифікації Goldschmidt et al., 2011) слід віднести карциному та злоякісну міоепітеліому, яку було діагностовано у однієї тварини (0,4 %).

Таблиця 3.7

Епітеліальні злоякісні неоплазії молочної залози сук

Гістопатологічний діагноз	К-ть		Період спостереження					
	n	%	2018	2019	2020	2021	2022	2023
карцинома комплексного типу	37	13,1	6	8	5	5	8	5
тубулярна карцинома	34	12,0	7	6	3	5	6	7
карцинома змішаного типу	33	11,7	5	6	7	6	3	6
карцинома <i>in situ</i>	25	8,8	3	6	4	5	2	5
солідна карцинома	24	8,5	4	3	4	4	5	4
тубулопапілярна карцинома	18	6,4	3	2	4	3	3	3
цистопапілярна карцинома	18	6,4	3	2	3	3	4	3
комедокарцинома	18	6,4	2	4	2	2	6	2
анапластична карцинома	17	6,0	3	4	1	3	3	3
крибриформна карцинома	12	4,2	2	1	2	2	3	2
внутрішньо-протокова папілярна карцинома	11	3,9	1	3	2	1	3	1
проста карцинома	10	3,5	2	-	4	2	-	2
мікропапілярна інвазивна карцинома	10	3,5	1	2	3	1	2	1
протокова карцинома	8	2,8	1	2	1	1	2	1
карцинома, що виникла в складній аденомі/змішаній пухлині	7	2,5	2	-	1	2	-	2
карцинома та злоякісна міоепітеліома	1	0,4	-	-	1	-	-	-
всього	283	100	45	49	47	45	50	47

Аналіз верифікації злоякісних епітеліальних пухлин спеціальних типів (табл. 3.8) вказує на те, що найбільш поширеними виявились: муцинозна (25,8 %), секреторна (20,0 %), веретеноподібноклітинна (17,5 %) та плоскоклітинна (14,2 %) карциноми. Інші гістопатологічні типи реєстрували в межах 10 % випадків: запальну карциному – у 10,8 %, аденосквамозну карциному – 6,7 %, злоякісну міоепітеліому – 5 % пацієнтів. Загалом, кількість тварин, в яких верифікували епітеліальні новоутворення спеціальних типів склала 120 особин. Частіше виявляли лише злоякісні епітеліальні пухлини (283 випадки).

Таблиця 3.8

Структура злоякісних епітеліальних пухлин спеціальних типів МЗ у собак (за Goldschmidt et al., 2011)

Гістопатологічний діагноз	К-ть		Період спостереження					
	n	%	2018	2019	2020	2021	2022	2023
муцинозна карцинома	31	25,8	6	5	7	3	3	7
секреторна (багата ліпідами) карцинома	24	20,0	5	2	6	7	2	2
веретеноподібноклітинна карцинома	21	17,5	4	3	2	4	4	4
плоскоклітинна карцинома	17	14,2	4	2	3	3	2	3
запальна карцинома	13	10,8	3	2	4	2	1	1
аденосквамозна карцинома	8	6,7	1	1	2	1	1	2
злаякісна міоепітеліома	6	5,0	2	-	2	2	-	-
всього	120	100	25	15	26	22	13	19

Найменш поширеними за патоморфологічною структурою новоутвореннями МЗ у собак виявились саркоми, які протягом шести років діагностували у 69 тварин (табл. 3.9). Серед них найбільшу частку склали карциносаркоми – 39,1 % та фібросаркоми – 34,8 %, дещо рідше спостерігали остеосаркоми – 14,5 % і хондросаркоми – 8,7 %. Гемангіосаркоми були виявлені лише в 2 із 69 досліджених зразків патологічної тканини МЗ, що складає 2,9 %.

Саркоми молочної залози у сук

Гістопатологічний діагноз	К-ть		Період спостереження					
	п	%	2018	2019	2020	2021	2022	2023
карциносаркома	27	39,1	4	2	4	5	5	7
фібросаркома	24	34,8	4	9	2	3	2	4
остеосаркома	10	14,5	3	1	2	2	-	2
хондросаркома	6	8,7	1	-	2	1	-	2
гемангіосаркома	2	2,9	-	-	1	-	1	-
всього	69	100	12	12	11	11	8	15

Аналіз розподілу злоякісних пухлин МЗ за клінічними стадіями засвідчив, що найбільш часто діагностували II та III клінічні стадії захворювання: за епітеліальних новоутворень – у 33,2 і 38,2 %, злоякісних епітеліальних неоплазій спеціальних типів – 31,7 і 39,2 %, сарком – 27,5 і 42,1 % випадків (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

**Структура злоякісних неоплазій молочної залози за клінічними стадіями
(за Owen, 1980)**

I стадія		II стадія		III стадія		IV стадія	
п	%	п	%	п	%	п	%
Епітеліальні новоутворення (n=283)							
30	10,6	94	33,2	108	38,2	51	18,0
Злоякісні епітеліальні новоутворення спеціальних типів (n=120)							
13	10,8	38	31,7	47	39,2	22	18,3
Саркоми (n=69)							
4	5,8	19	27,5	29	42,1	17	24,6

Кількість сук із I клінічною стадією становила 10,6; 10,8; 5,8 %, IV стадії – 18,0; 18,3; 24,6 %, відповідно. Саркоми I стадії реєстрували вдвічі рідше, ніж злоякісні епітеліальні новоутворення, а IV стадії, навпаки, в 1,3–1,4 раза частіше, порівняно із пухлинами епітеліального походження. Співвідношення кількості випадків II і III клінічних стадій в межах груп тварин із епітеліальними неоплазіями, епітеліальними пухлинами спеціальних типів і сарком було подібним.

Наведемо патоморфологічні зміни за окремих клінічних випадків новоутворень МЗ у сук. Карцинома, що виникла в складній аденомі/змішаній пухлині, характеризувалась (рис. 3.5): вогнищами атипових поліморфних епітеліальних клітин; анізокаріозом; ділянками фіброматозу, розростанням атипових міоепітеліальних клітин; проліферацією сполучнотканинних компонентів, внутрішньодольковим фіброзом; ділянками крововиливів та некрозів; кістозним розширенням окремих протоків. Мітотичний індекс – 2–3/10 ПЗВЗ.

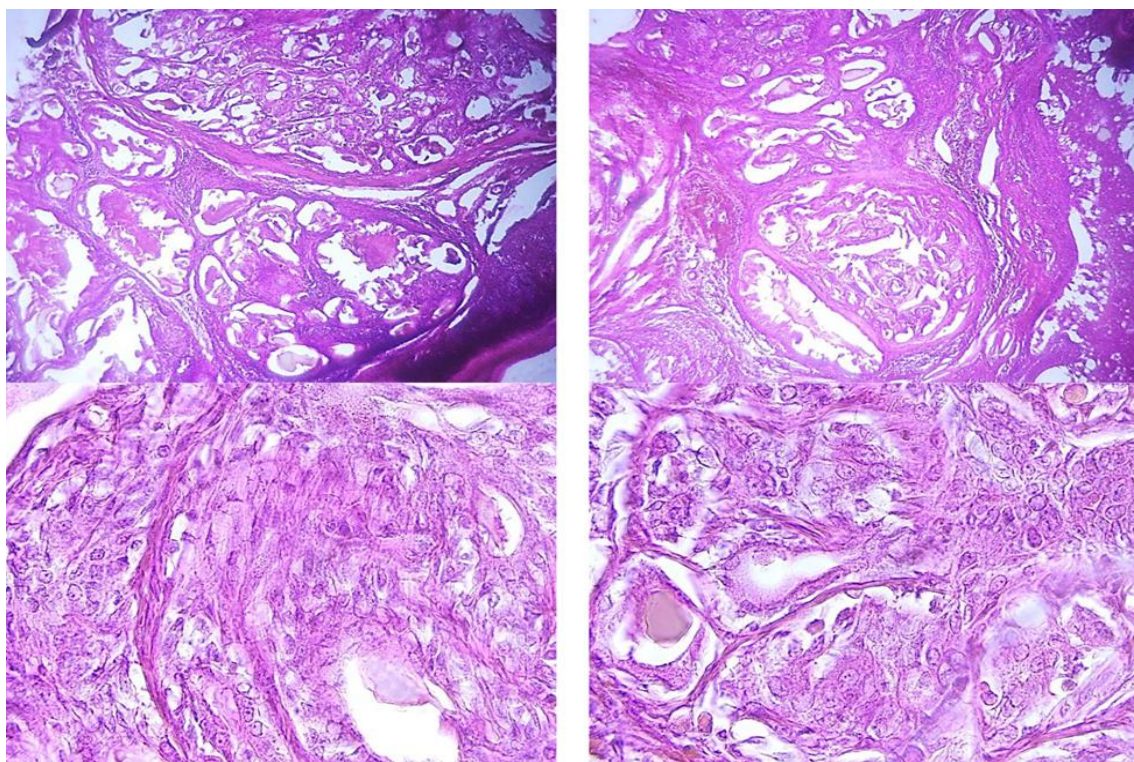


Рис. 3.5. Карцинома, що виникла в складній аденомі/змішаній пухлині. Забарвлення: гематоксилін та еозин, толуїдиновий синій. Зб.×100-400

Виявлені гістопатологічні зміни за змішаної неоплазії МЗ (дисгормональна дисплазія з вогнищами малігнізації протокового епітелію – протокового інвазивного раку) включали: ділянки фіброматозу, розростання атипівих міоепітеліальних клітин; чисельні кісти протоків; розростання сполучної тканини; вогнища атипівих поліморфних епітеліальних клітин, що інфільтрують строму молочної залози; анізокаріоз із візуалізацією великих ядерець; кількість мітозів складала 2–3 / 10 ПЗВЗ (рис. 3.6).

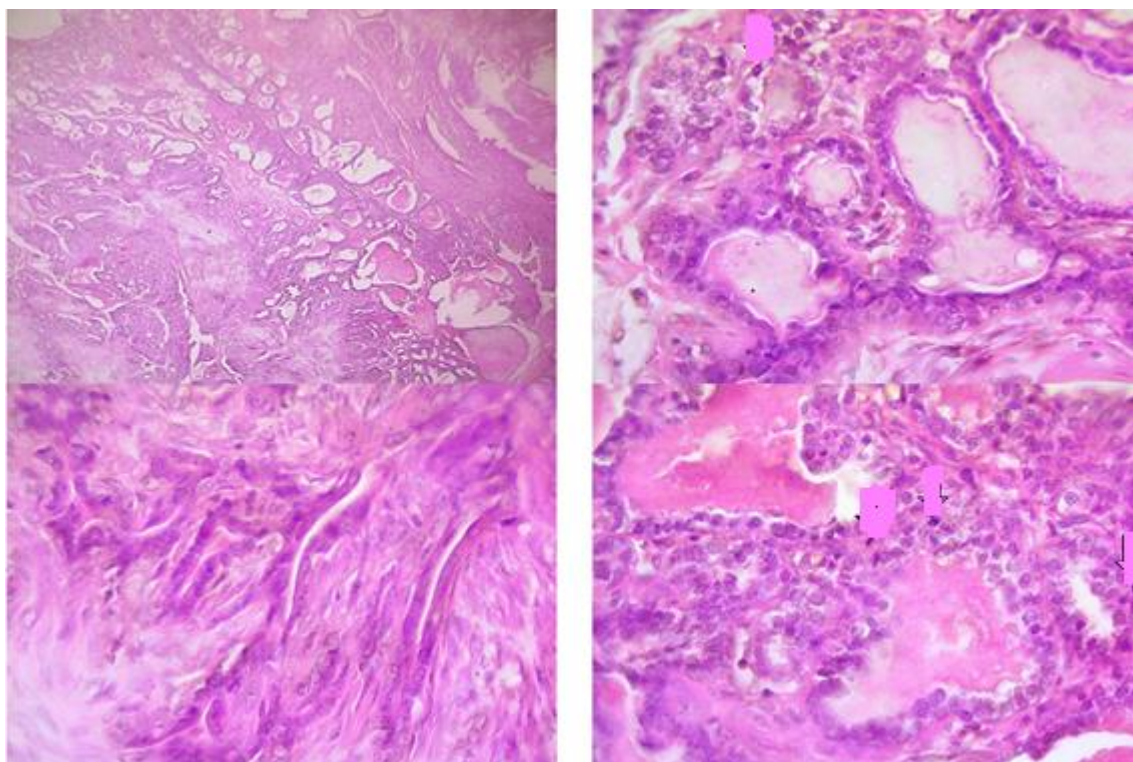


Рис. 3.6. Змішана пухлина (дисгормональна дисплазія – протоковий інвазивний рак). Забарвлення: гематоксилін та еозин. Зб.× 100-400

Протоковий інфільтруючий рак із криброзним типом росту (рис. 3.7) визначали за атипівими поліморфними епітеліальними клітинами, які інфільтрували строму МЗ, анізокаріозом із візуалізацією великих ядерець і низькою мітотичною активністю (0–1/10 ПЗВЗ). Тубулярні утворення складають >40%, форма ядер – мономорфна.

За часточкового раку МЗ верифікувались комплекси атипівих поліморфних епітеліальних клітин з гіперхромними ядрами, тубулярні

утворення не перевищували 40 %, форма ядер була плейоморфною, кількість мітозів – 2–3/10 ПЗВЗ (рис. 3.8).

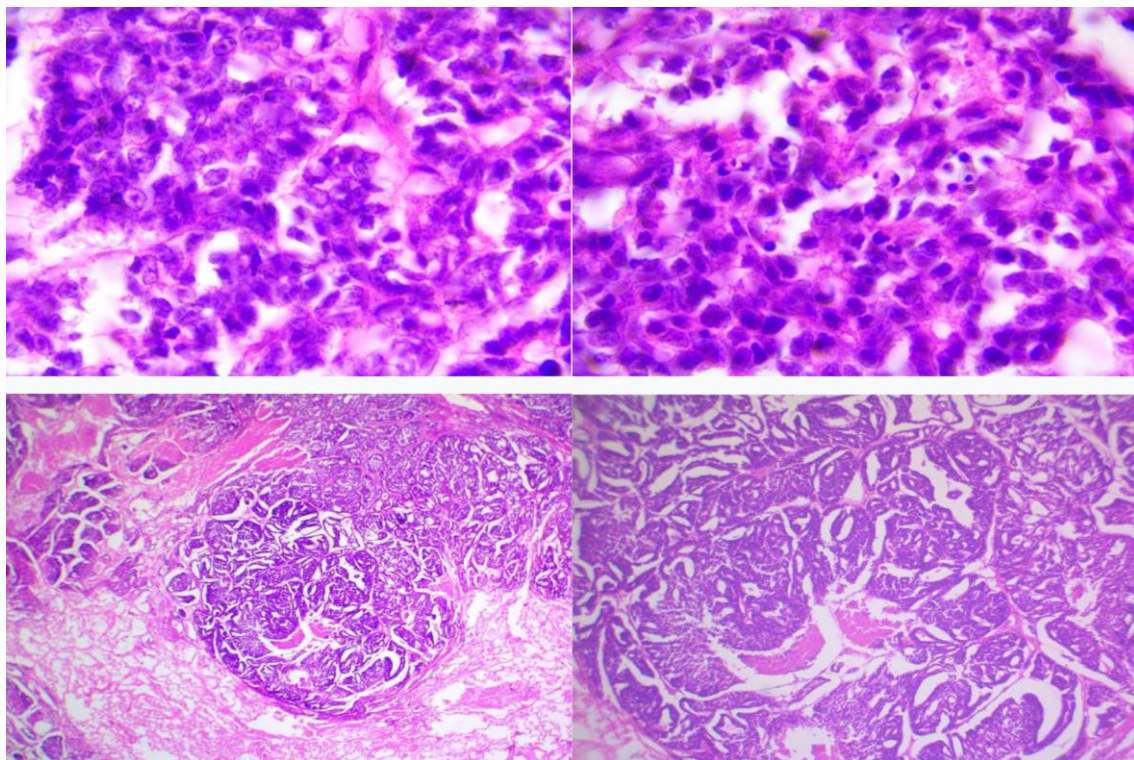


Рис. 3.7. Протоковий інфільтруючий рак МЗ (криброзний тип).

Забарвлення: гематоксилін та еозин. Зб.× 100-400

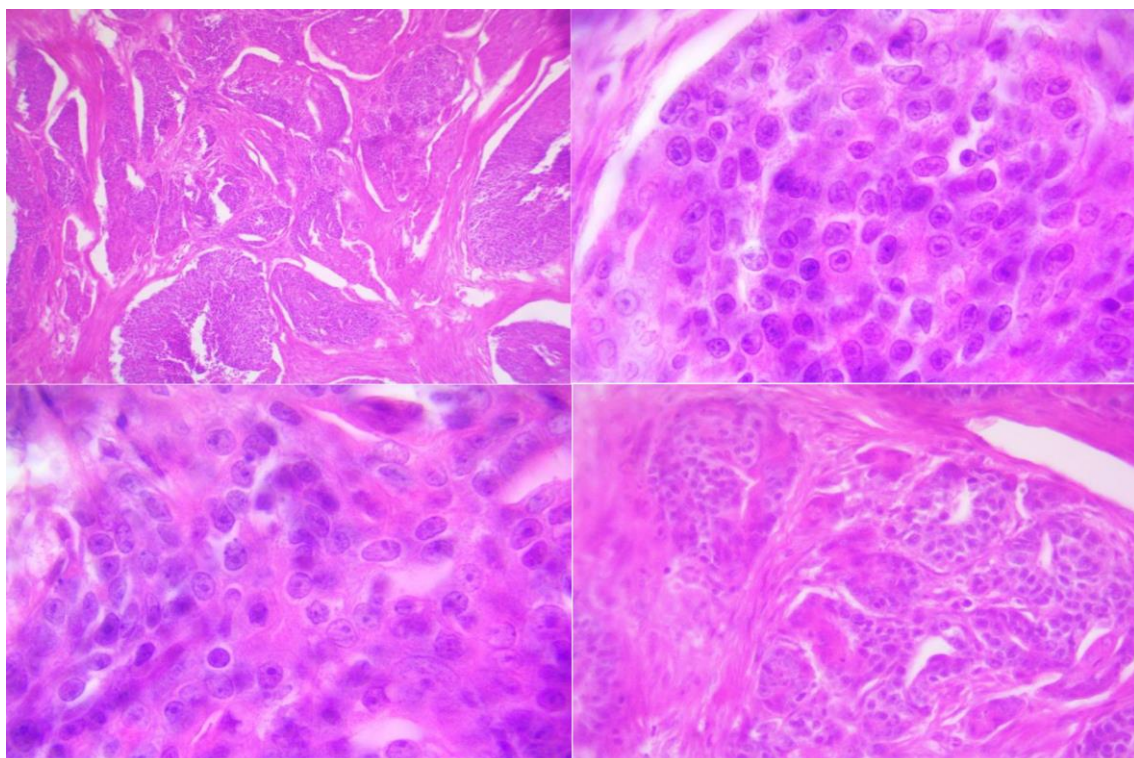


Рис. 3.8. Часточковий рак (аденокарцинома) МЗ. Забарвлення:

гематоксилін та еозин. Зб.× 100-400

Оцінка ризику інвазії неоплазійних клітин в кровоносні і лімфатичні судини дозволила встановити наступні закономірності (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Ангіо- та лімфоінвазія за злоякісних пухлин МЗ

Гістологічний тип неоплазії	n ^{заг.}	Інвазія пухлинних клітин					
		судини				лімфатичні вузли	
		кровоносні		лімфатичні			
		n	%	n	%	n	%
I стадія							
Епітеліальні пухлини	30	3	10	1	3,3	-	-
Злоякісні епітеліальні неоплазії спеціальних типів	13	2	15	-	-	-	-
Саркоми	4	1	25	-	-	-	-
II стадія							
Епітеліальні пухлини	94	28	29,8	6	6,4	2	2,1
Злоякісні епітеліальні неоплазії спеціальних типів	38	12	31,6	3	7,9	-	-
Саркоми	19	5	26,3	2	10,5	-	-
III стадія							
Епітеліальні пухлини	108	52	48,1	36	33,3	21	19,4
Злоякісні епітеліальні неоплазії спеціальних типів	47	17	36,2	18	38,3	7	14,9
Саркоми	29	15	51,7	12	41,4	6	20,7
IV стадія							
Епітеліальні пухлини	51	34	66,7	26	51,0	20	39,2
Злоякісні епітеліальні неоплазії спеціальних типів	22	10	45,5	13	59,1	9	40,9
Саркоми	17	12	70,6	9	52,9	6	35,3

n^{заг.} – загальна кількість собак

В зразках патологічної тканини злоякісних новоутворень I клінічної стадії пухлинні мікроемболи в кровоносних судинах (рис. 3.9) реєстрували у 10–25 %, в лімфатичні судини – лише за епітеліальних неоплазій у 3,3 % випадків. За II стадії частота виявлення метастатичних осередків в кровоносних судинах збільшувалась до 26,3–31,6 %, лімфатичних – 6,4–10,5 %, III стадії – 36,2–51,7 та 33,3–41,4 %, IV стадії – 45,5–70,6 та 51,0–52,9 %, відповідно. Тобто, ризик ангіо- та лімфоінвазії збільшувався із підвищенням клінічної стадії захворювання. Наявність пухлинних мікроемболів в судинах новоутворення збільшує ймовірність «забруднення» тканин операційної рани із розвитком рецидиву, та/або міграції неоплазійних клітин, їх фіксацією у відділених тканинах і формуванням вогнищ метастазів. Ймовірність верифікації ракових клітин в регіонарних лімфатичних вузлах мала пряму кореляцію із клінічною стадією та не залежали від гістологічного типу. У тварин із першою стадією злоякісних неоплазій МЗ дисемінацію ракових клітин в лімфатичні вузли не виявляли, кількість сук із другою стадією захворювання, які мали метастази в лімфатичних вузлах складала 2,1–2,6 %, третьої стадії – 14,9–20,7 %, четвертою стадією – 35,3–40,9 %.

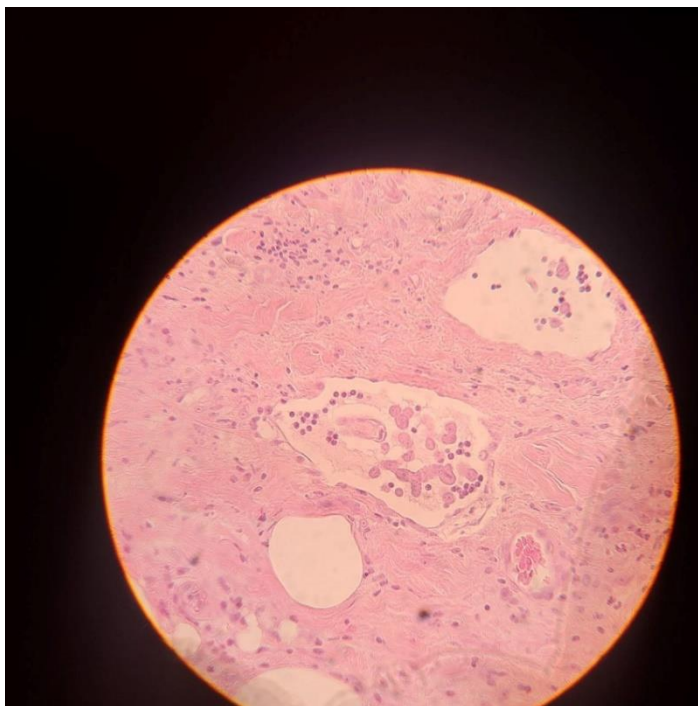


Рис. 3.9. Судинна інвазія ракових клітин в межах пухлини МЗ.

Забарвлення: гематоксилін та еозин. 36.×400

3.1.2. Оцінка гематологічних і біохімічних змін за неоплазій молочної залози у сук

У тварин з пухлинами МЗ спостерігається певна гематологічна дисфункція. Аналіз гематологічних змін у собак, хворих на неоплазію МЗ, порівняно із клінічно здоровими тваринами (табл. 3.12), засвідчив достовірне ($p < 0,001$) зниження в 1,3 раза рівня гемоглобіну та гематокриту та в 1,8 раза ($p < 0,001$) – кількості еритроцитів. При цьому в онкохворих собак реєстрували збільшення концентрації тромбоцитів в 1,5 рази ($p < 0,001$), хоча показники знаходились в межах фізіологічної норми. Достовірно подовжувалась швидкість осідання еритроцитів – з $4 \pm 0,5$ до 12 ± 4 мм/год (в 3 рази, $p < 0,001$).

За відсутності змін вмісту лейкоцитів, констатували зниження в 1,3 раза ($p < 0,001$) кількості лімфоцитів і агранулоцитів, а також збільшення в 1,4 раза ($p < 0,001$) гранулоцитів. Збільшення кількості паличкоядерних (в 1,2 раза, $p < 0,01$) та сегментоядерних (в 1,3 раза, $p < 0,01$) нейтрофілів, свідчить про активну запальну реакцію та імунну відповідь організму на пухлинний процес у МЗ.

Зниження кількості лімфоцитів може вказувати на імунодефіцитний стан у тварин з пухлинами МЗ. Підвищене співвідношення гранулоцитів до агранулоцитів може свідчити про активність запальних процесів або імунної відповіді в організмі тварин з неоплазіями МЗ, тобто реакцією на патологічний процес у МЗ, спрямований на боротьбу з ним.

Таблиця 3.12

Гематологічні показники собак із злоякісними неоплазіями МЗ

Показники	Собаки			
	онкохворі (n=78)		клінічно здорові (n=79)	
	M±m	Lim	M±m	Lim
1	2	3	4	5
Еритроцити, Т/л	$4,7 \pm 1,1^{***}$	4,2–6,9	$8,4 \pm 1,2$	5,2–9,8
Гемоглобін Г/л	$131 \pm 8^{***}$	114–181	171 ± 10	142–214

1	2	3	4	5
Гематокрит	48±4***	36–66	60±5	32–68
Тромбоцити, Г/л	394±23***	124–794	267±39	100–669
ШОЕ, мм/год	12±4***	5–16	4±0,5	2–5
Лейкоцити, Г/л	11,6±9,2	3,7–40,1	11,1±4,1	5,3–24,0
Паличкоядерні нейтрофіли, Г/л	1,42±0,05**	0,04–27,65	1,15±0,03	0,14–8,16
Сегментоядерні нейтрофіли, Г/л	8,22±0,6**	2,22–21,03	6,57±0,3	3,72–12,39
Еозінофіли, Г/л	0,48±0,07	0,00–2,35	0,53±0,06	0–2,96
Моноцити, Г/л	0,52±0,09	0,00–4,20	0,44±0,03	0,00–1,44
Лімфоцити, Г/л	1,90±0,4***	0,30–5,40	2,44±0,3	0,85–4,47
Гранулоцити	9,13±1,94	2,44–50,48	8,26±0,88	4,18–20,64
Агранулоцити	2,33±0,2***	0,43–9,61	2,98±0,2	1,11–4,84
Гранулоцити / агранулоцити	4,26±0,7***	1,5–11,5	3,15±0,5	1,32–6,14

** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$, відносно клінічно здорових сук

Оцінка біохімічних маркерів у собак із новоутвореннями МЗ засвідчила наступні закономірності (табл. 3.13). Порівняно із клінічно здоровими тваринами, реєстрували збільшення концентрації загального білірубіну в 1,6 раза ($p < 0,001$), неорганічного фосфору – 1,3 раза ($p < 0,001$) та посилення активності лужної фосфатази в 1,3–1,5 раза ($p < 0,001$).

В онкохворих тварин, порівняно із клінічно здоровими тваринами, які мають надлишкову масу тіла встановлено збільшення у крові вмісту холестерину – в 1,3 раза ($p < 0,01$), тригліцеридів і глюкози – в 1,2 раза ($p < 0,01$).

Біохімічні показники собак із злоякісними неоплазіями МЗ

Показники	Онкохворі суки (n=78)	Клінічно здорові собаки	
		індекс маси тіла	
		нормальний (n=44)	високий (n=35)
Загальний білок, г/л	73,40±7,47	72,73±6,02	72,86±7,02
Альбуміни, г/л	28,70±4,58	29,93±3,25	30,09±3,18
Глобуліни, г/л	44,71±8,57	42,80±6,14	42,50±6,30
Альбуміни/глобуліни	0,67±0,19	0,72±0,17	0,73±0,17
Білірубін загальний, мкмоль/л	14,06±1,19***	8,91±1,03	8,77±1,09
АЛАТ, Од/л	78,03±7,58	67,65±5,46	73,96±6,51
АсАТ, Од/л	49,57±5,34	42,20±3,98	44,92±3,22
ГГТ, Од/л	6,68±0,71	5,27±0,42	5,75±0,41
Лужна фосфатаза, Од/л	119,35±8,79**	80,98±9,76	91,38±7,82
Сечовина, ммоль/л	6,20±0,66	6,18±0,35	6,31±0,92
Креатинін, мкмоль/л	85,48±8,06	83,88±10,66	91,30±9,15
Кальцій загальний, ммоль/л	2,60±0,53	2,58±0,20	2,59±0,24
Фосфор неорганічний, ммоль/л	1,39±0,04***	1,07±0,07	1,07±0,04
Холестерин, ммоль/л	5,29±0,3**	5,39±0,05	6,99±0,8 ^{oo} **
Тригліцериди, ммоль/л	0,88±0,06**	0,82±0,05	1,07±0,08 ^{oo} **
Глюкоза, ммоль/л	4,86±0,21**	5,13±0,36	5,94±0,29 ^{oo}

** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$, порівняно із клінічно здоровими; ** – $p < 0,01$, відносно клінічно здорових сук із надмірною масою тіла; ° – $p < 0,05$; °° – $p < 0,01$; °°° – $p < 0,001$, суки із надмірною масою тіла порівняно із нормальною масою тіла

У клінічно здорових тварин із високим індексом маси тіла рівні холестерину і тригліцеридів перевищували відповідні показники тварин із нормальною масою тіла в 1,3 раза ($p < 0,01$).

Таким чином, моніторингові дослідження вказують на значну поширеність новоутворень МЗ серед собак на тлі приблизно однакової щорічної кількості реєстрації первинних випадків новоутворень МЗ. Наявна породна сприйнятливність, на нашу думку, є об'єктивною в межах Дніпровського і Запорізького регіонів.

Узагальнюючи інформацію, наведену в цьому розділі, можна зробити наступні висновки. У більшості випадків термін звернень від виявлення ознак пухлинного росту власниками до їх верифікації в умовах лікарні ветеринарної медицини не перевищував трьох місяців. При цьому прогностичне значення величини патологічного вогнища не завжди мало актуальність. Серед нозологічних форм доброякісних пухлин МЗ найбільш поширені доброякісні змішані неоплазії, дещо рідше верифікували комплексну аденому і фіброаденому. В структурі злоякісних типів абсолютну більшість складала пухлини МЗ епітеліального походження, мінімальну частку – саркоми. Гематологічні і біохімічні показники в онкохворих собак є неспецифічними, вони відображають загальні зміни (зокрема, наявність запальної реакції), обумовлені як неоплазією так і надлишковою масою тіла.

3.2. Потенційні терапевтичні маркери для циклофосфаміду та метформіну

3.2.1. Активність матриксних металопротеїназ-2 та -9 за злоякісних пухлин молочної залози

Активну участь в патогенезі неоплазій МЗ, у тому числі міграції ракових клітин, відіграють ММП. Вплив на неоплазійний процес пов'язаний зі специфічними залежностями між ММП та компонентами позаклітинного матриксу (ЕСМ), а також нематриксними компонентами, такими як компоненти клітинної поверхні (Piskór et al., 2020). Слід відзначити, що на

відміну від гуманної медицини, у ветеринарній онкології патогенетична роль ММП в онкогенезі залишається не повністю з'ясованою.

Клінічне використання першого (якісного) етапу дослідження активності латентних та активних форм ММП відображено на рис. 3.10–3.13.

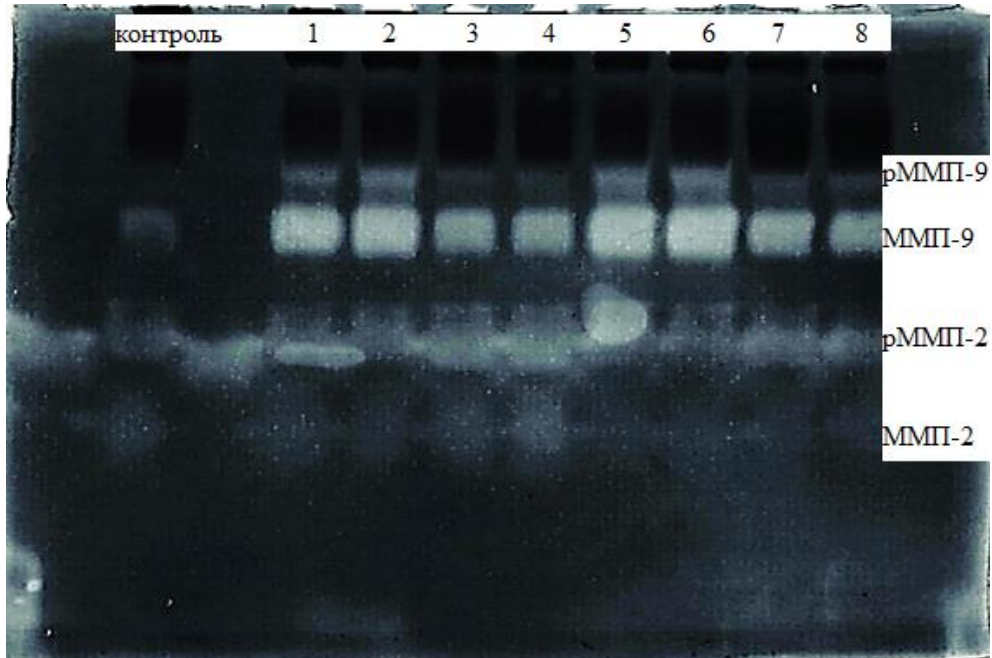


Рис. 3.10. Активність ММП у зразках плазми крові сук із новоутвореннями МЗ (планшет А)

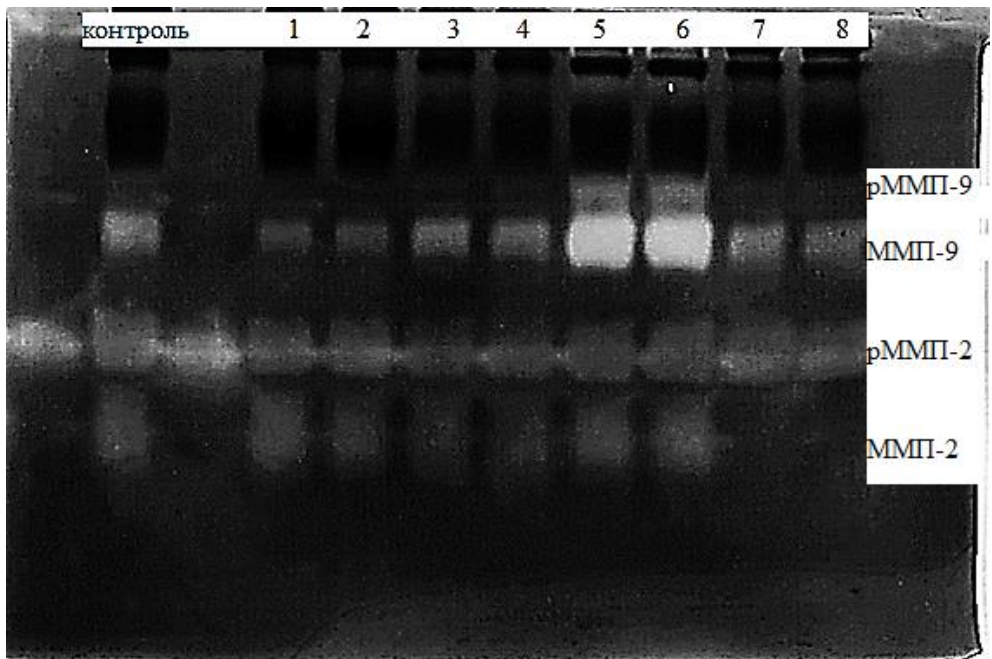


Рис. 3.11. Рівень активності ММП у крові сук із пухлинами МЗ (планшет Б)

Наступний етап передбачав визначення кількісних показників, які представлені нижче. Рисунок 3.10 відображає слабку та помірну активність pro-ММП-2 так і ММП-2, а також pro-ММП-9 у 3, 4, 7, 8 зразках на тлі максимального рівня експресії ММП-9 у всіх пробах. На рис. 3.11 відзначається відсутність активності ММП-2 у 7 і 8 зразку, сильна активність ММП-9 – 5 і 6 пробах, в інших випадках – помірний рівень експресії латентних і активних форм ММП.

Отримані результати (планшет В) демонструють сильну активність ММП-9 у зразках 1–6 на тлі слабкої і помірної експресії pro-ММП-2;-9 і ММП-2;-9 в інших пробах плазми крові (рис. 3.12).

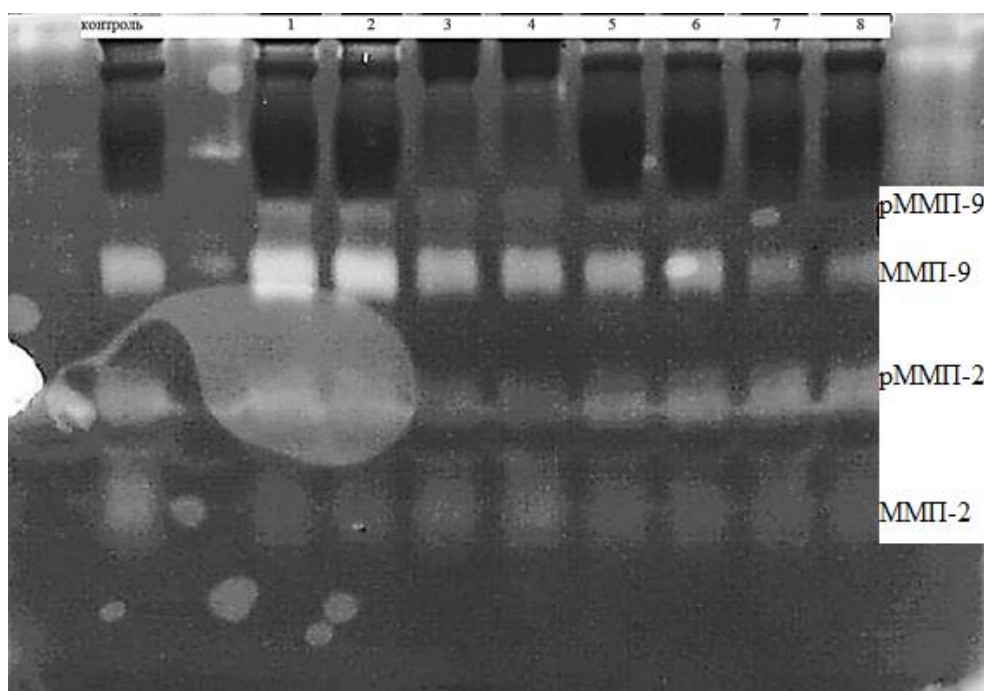


Рис. 3.12. Експресія ММП за неоплазій МЗ у собак (планшет В)

Рис. 3.13 відображає значну активність латентних та активних форм ММП-9 у зразках 1–4 і 7, 8 на тлі помірної експресії pro-ММП-2 і ММП-2 у всіх пробах.

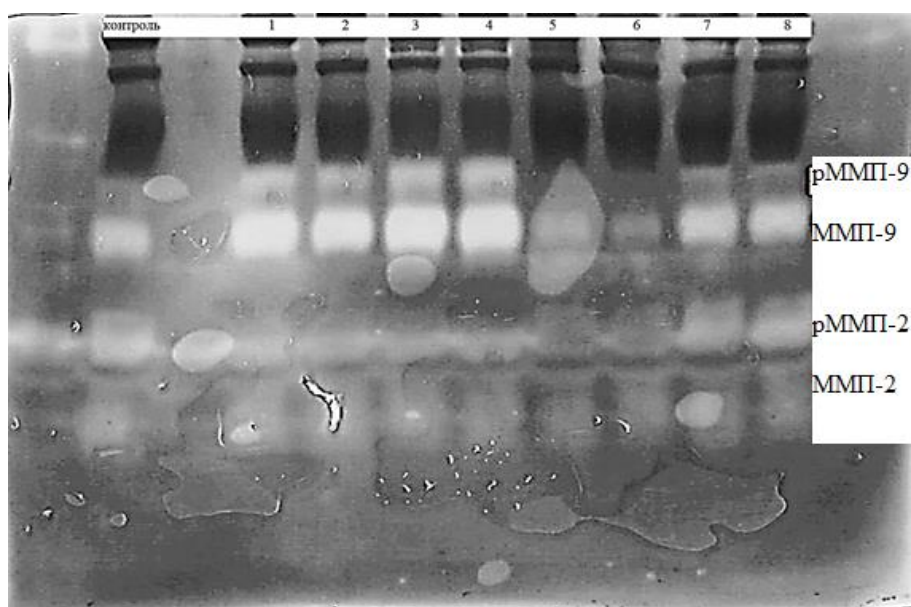


Рис. 3.13. Рівень експресії матриксних металопротеїназ сук за новоутворень МЗ (планшет Г)

Як показали результати досліджень, експресія ММП-2 та -9 за доброякісних неоплазій МЗ встановлена в 3,80–6,33 % зразків плазми, 5,06–8,86 % зразків неоплазійної тканини (табл. 3.14). У тварин із злоякісними новоутвореннями високу активність ММП у плазмі виявляли у 35,33–58,08 %, тканинах пухлини – 32,93–63,47 % зразків.

Таблиця 3.14

Частка новоутворень молочної залози із високою активністю матриксних металопротеїназ

Матриксні металопротеїнази	Плазма крові		Пухлинна тканина	
	n	%	n	%
Доброякісні пухлини (n=79)				
ММП-2	5	6,33	7	8,86
ММП-9	3	3,80	4	5,06
ММП-2 + ММП-9	3	3,80	4	5,06
Злоякісні неоплазії (n=167)				
ММП-2	97	58,08	106	63,47
ММП-9	70	41,92	61	36,53
ММП-2 + ММП-9	59	35,33	55	32,93

Кількість сук із злоякісними пухлинами, в яких реєструється високий рівень експресії ММП у плазмі, порівняно із доброякісними новоутвореннями, більша в 9,2–11,0 разів, тканинах пухлини – у 6,5–7,2 разів. Тобто, висока активність ММП-2, ММП-9 або одночасно їх обох, більш характерна для злоякісних нозологічних форм, що підтверджує їх біологічну роль в механізмах епітеліально-мезенхімального переходу за канцерогенезу та кореляцію із агресивністю пухлини.

Встановлено (табл. 3.15), що активність латентних і активних форм ММП у плазмі крові за злоякісних новоутворень МЗ достовірно посилювалась ($p < 0,001$), порівняно як із клінічно здоровими суками, так і з доброякісними пухлинами: pro-ММП-2 – в 4,2–4,8 і 2,2–2,5; pro-ММП-9 – в 3,3–3,9 і 1,9–2,3; ММП-2 – в 2,6–4,1 і 2,2–3,4; ММП-9 – в 2,7–3,3 і 2,4–3,0 разів, відповідно.

Таблиця 3.15

Активність про- та матриксних металопротеїназ-2 та -9 у собак^o

ММП	Клінічно здорові (n=23)	Новоутворення МЗ		
		доброякісні (n=27)	злоякісні	
			без метастазів (n=33)	з метастазами (n=35)
1	2	3	4	5
плазма крові				
pro-ММП-2	0,62±0,13	1,19±0,32	2,61±0,17***◇◇◇	2,95±0,12***◇◇◇
pro-ММП-9	0,64±0,19	1,08±0,26	2,09±0,22***◇◇◇	2,48±0,11***◇◇◇
ММП-2	0,73±0,15	0,87±0,23	1,93±0,19***◇◇◇	2,99±0,28***◇◇◇
ММП-9	0,80±0,24	0,89±0,13	2,18±0,24***◇◇◇	2,66±0,21***◇◇◇

1	2	3	4	5
неоплазійна тканина				
ММП-2	1,44±0,20 ^{□□□}	2,09±0,41 ^{□□□}	21,62±3,77***◇◇◇□□□	24,96±2,09***◇◇◇□□□
ММП-9	2,07±0,15 ^{□□□}	2,69±0,32 ^{□□□}	30,03±3,11***◇◇◇□□□	38,17±4,51***◇◇◇□□□
ММП-2+-9	3,55±0,18 ^{□□□}	4,60±0,38 ^{□□□}	55,10±3,27***◇◇◇□□□	61,11±3,99***◇◇◇□□□

° – активність ММП вимірюється у крові у відсотках (%) до пулу здорових донорів, у неоплазійній тканині – у відсотках (%) до пулу нормальної тканини МЗ. *** – $p < 0,001$, відносно клінічно здорових тварин; ◇◇◇ – $p < 0,001$, відносно доброякісних пухлин; □□□ – $p < 0,001$, порівняння показників пухлини та плазми

Подібні зміни стосувались експресії ММП неоплазійно зміненою тканиною МЗ, але за більш вираженої різниці показників. У сук активність ММП-2 злякисної пухлини перевищувала ($p < 0,001$) відповідні значення фізіологічно нормальної тканини МЗ в 15–17,3 раза, доброякісної неоплазії – 10,3–11,9 раза; ММП-9 – в 14,5–18,4 і 11,2–14,2 раза; обох желатиназ (ММП-2 та -9) – в 15,5–17,2 і 12,0–13,3 раза, відповідно.

Показники активності желатиназ у пухлині були достовірно ($p < 0,001$) більшими, ніж у плазмі крові (ММП-2 / ММП-9): у здорових тварин в 2 / 2,6; у собак із доброякісними новоутвореннями – 2,4 / 3,0, за раку МЗ – 8,3–11,2 / 13,8–14,3 раза, відповідно.

3.2.2. Прогнозування біологічної поведінки неоплазій молочної залози за маркерами неоангіогенезу, проліферації і судинної інвазії

Вважається, що в основі росту та інвазії пухлини МЗ одним із найважливіших факторів є тривалий ангиогенез, який відбувається під впливом факторів росту, зокрема VEGF (Santos et al., 2011). Доведено, що VEGF стимулює проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, запобігає регресії

новоутворених судин, підвищує проникність мікросудин (Queiroga et al., 2011), а також помірно корелює із проліферативним індексом (Al-Dissi et al., 2010). Проте, різні методологічні підходи їх визначення та оцінки результатів не дозволяють в повній мірі встановити його патогенетичне значення в онкогенезі.

У зразках патологічного матеріалу, відбраному після екстирпації новоутворень МЗ, встановлено, що підвищення клінічної стадії супроводжувалось збільшенням ймовірності виявлення експресії фактору росту ендотелію судин (VEGF, VEGF-1, VEGF-2) та ядерного білку – маркеру активності проліферації ракових клітин Ki-67 (табл. 3.16). За злоякісних неоплазій МЗ першої стадії наявність експресії VEGF встановлена у 48,9 %, VEGFR-1 – 21,3 %, VEGFR-2 – 27,7 %, Ki-67 – 31,9 % тварин, тоді як внаслідок динамічного збільшення кількості таких собак, за IV клінічної стадії зазначені показники становили 93,3; 53,3; 60,0; 66,7 %, відповідно. Тобто, порівняно із першою стадією, частка сук із пухлинами МЗ, імунопозитивними до VEGF збільшилась в 1,9 раза, VEGF-1 – 2,5 рази, VEGF-2 – 2,2 раза, Ki-67 – 2,1 раза, що підтверджує кореляцію клінічної стадії із ступенем агресивності новоутворення МЗ, а також обґрунтовує метрорномний режим хіміотерапії, направлений на блокування неангіогенезу у неоплазійній тканині.

Таблиця 3.16

Експресія VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 та Ki-67 за різних клінічних стадій злоякісних пухлин МЗ (n=472)

Клінічна стадія	VEGF		VEGFR-1		VEGFR-2		Ki-67	
	n	%	n	%	n	%	n	%
I (n=47)	23	48,9	10	21,3	13	27,7	15	31,9
II (n=151)	101	66,9	45	29,8	48	31,8	63	41,7
III (n=184)	150	81,5	82	44,6	87	47,3	97	52,7
IV (n=90)	84	93,3	48	53,3	54	60,0	60	66,7

Рівень експресії фактору росту ендотелію судин навіть в межах одного гістологічного типу пухлини має індивідуальні особливості у кожного пацієнта. Локація рецепторів VEGF у неоплазійній тканині характеризується нерівномірністю та різною щільністю. Інтенсивність імунофарбування фактору росту ендотелію судин відображає активність утворення судинної «сітки», необхідної для живлення ракових клітин, важливої складової їх проліферації. Одночасно із активацією утворення нових судин відбувається посилення проліферативної активності клітин неоплазії, що складає основу механізмів прогресування хвороби.

Імуногістохімічне визначення VEGF, VEGF1, VEGF2 на прикладі окремих клінічних випадків представлено на рис. 3.14–3.20.

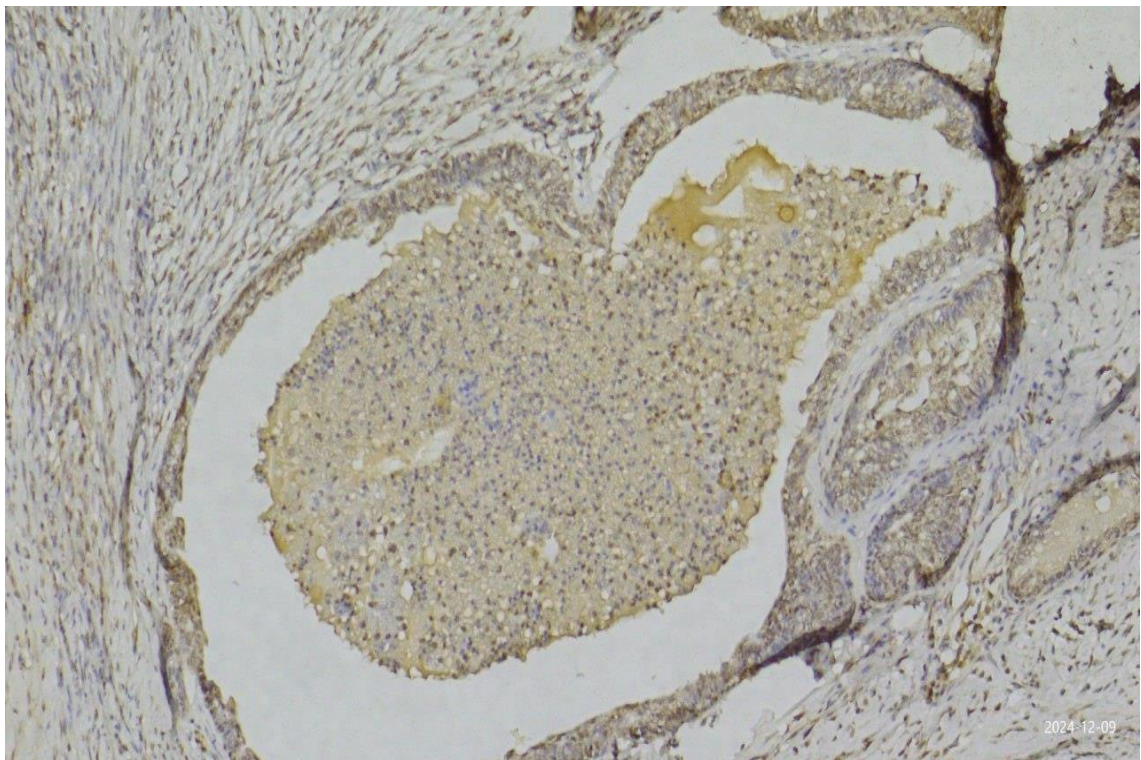
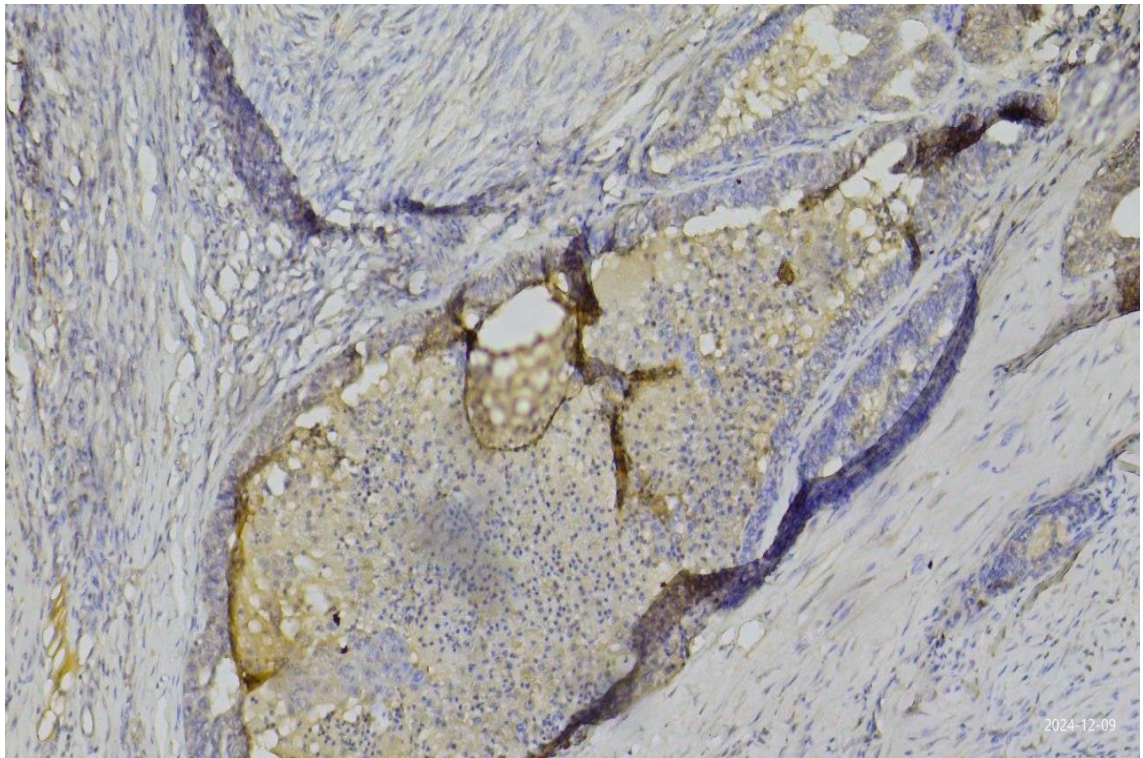
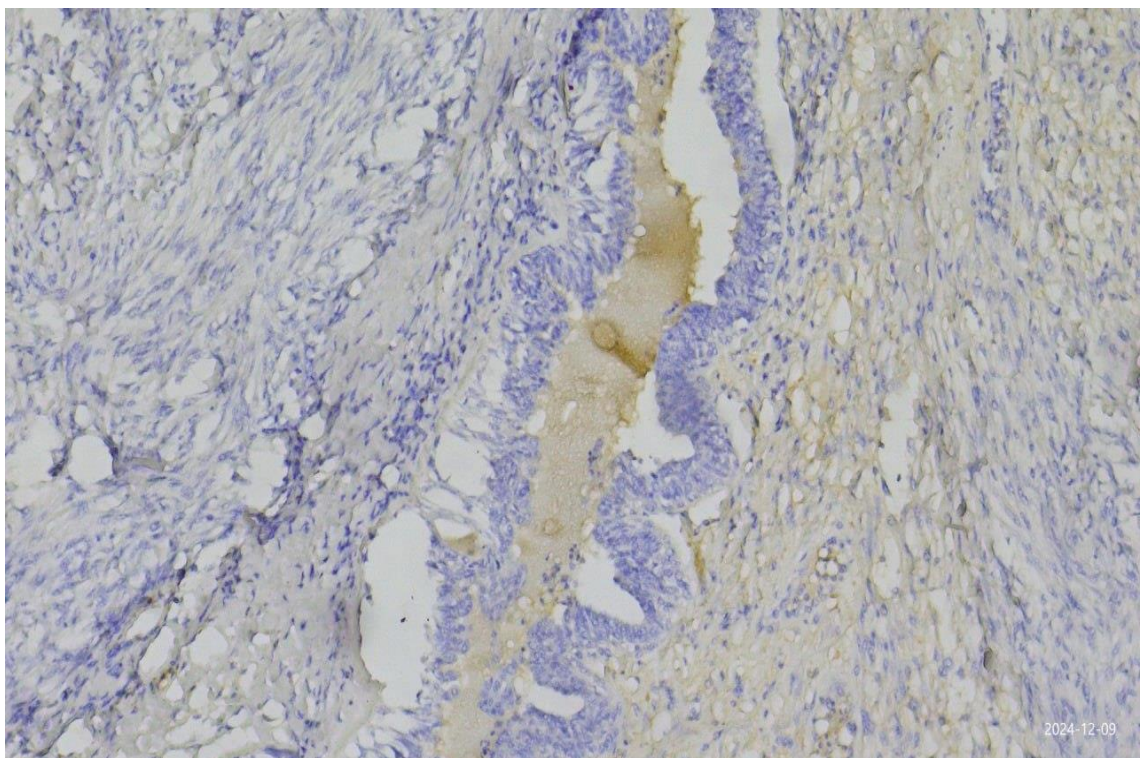


Рис. 3.14. Позитивна експресія VEGF за карцинома МЗ комплексного типу. Зabarвлення: діамінобензидин + гематоксилін Майєра. 36.×400



**Рис. 3.15. Експресія VEGF за тубулопапілярної карциноми МЗ.
Забарвлення: діамінобензидин + гематоксилін Майєра. Зб.×400**



**Рис. 3.16. Імуногістохімічне забарвлення VEGF-1 за тубулярної
карциноми МЗ. Забарвлення: діамінобензидин + гематоксилін Майєра.
Зб.× 400**

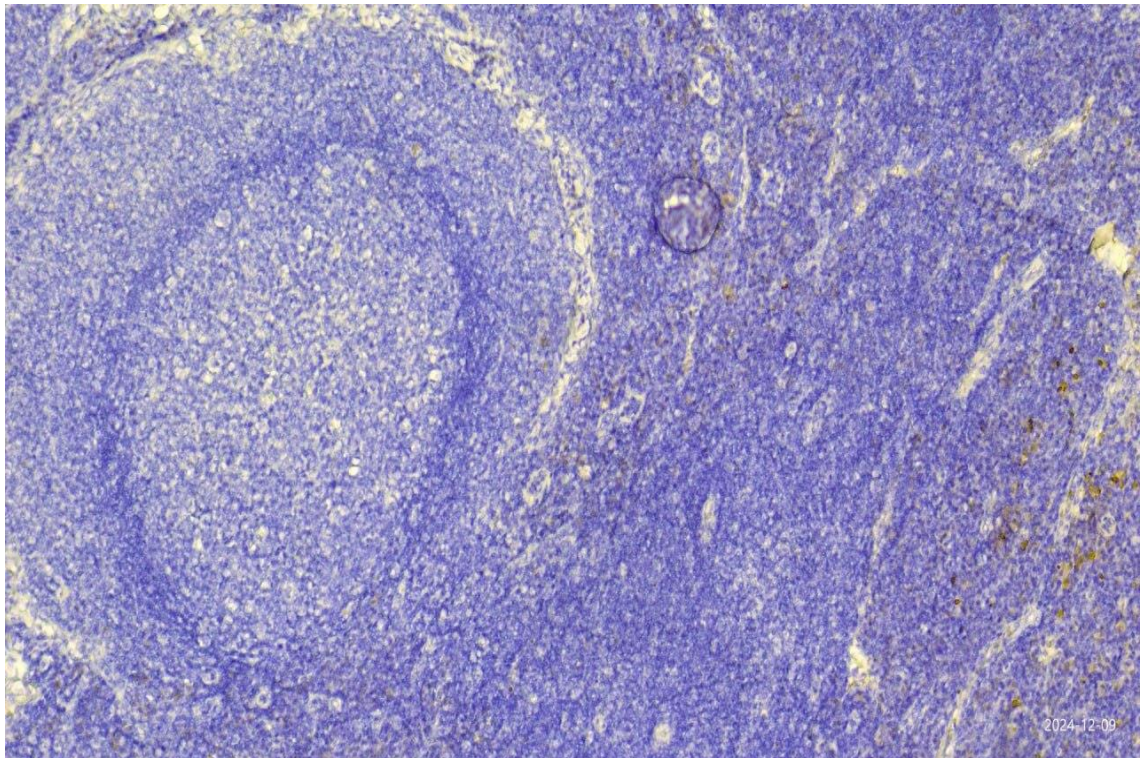


Рис. 3.17. Експресія молекулярного маркера VEGFR-1 за цистопапілярної карциноми М3. Забарвлення: діамінобензидин + гематоксилін Майєра. Зб.×400

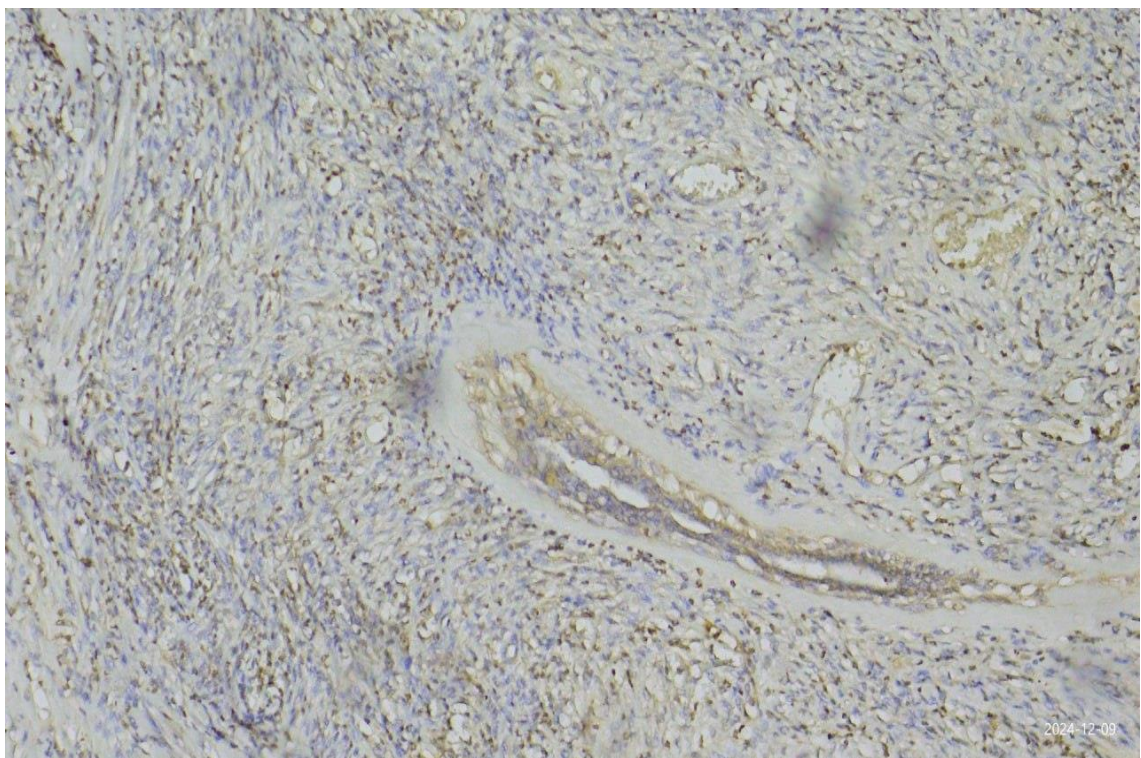
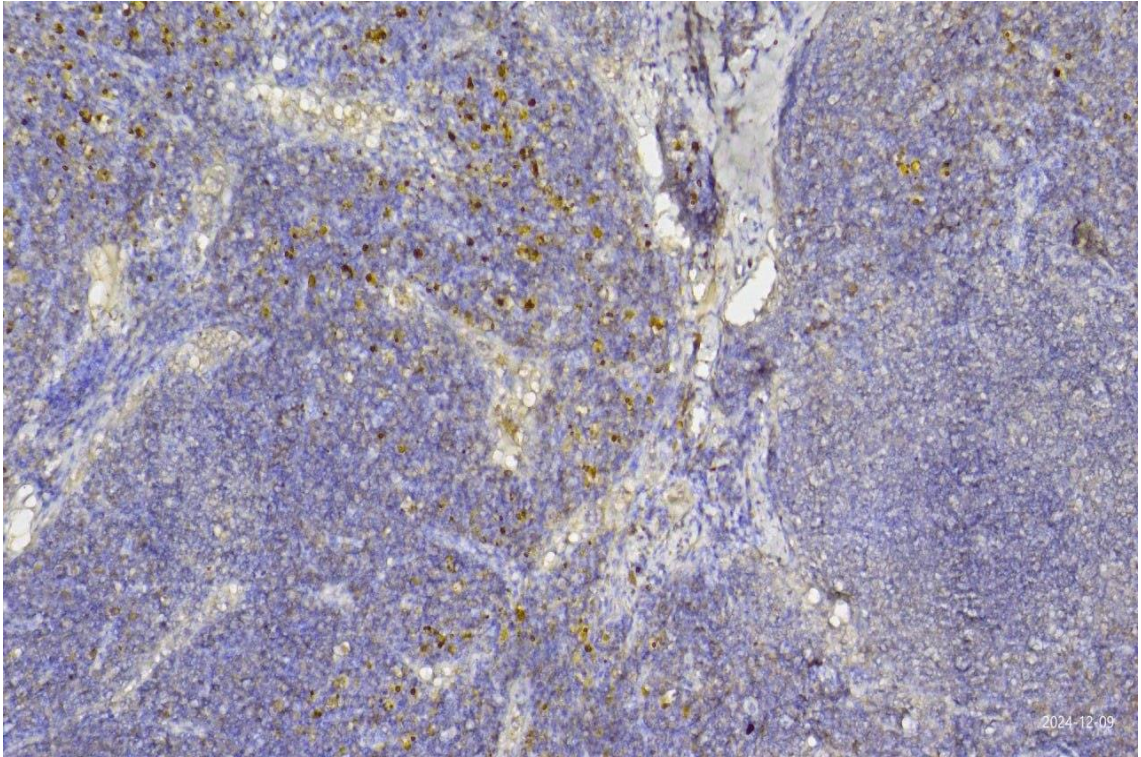
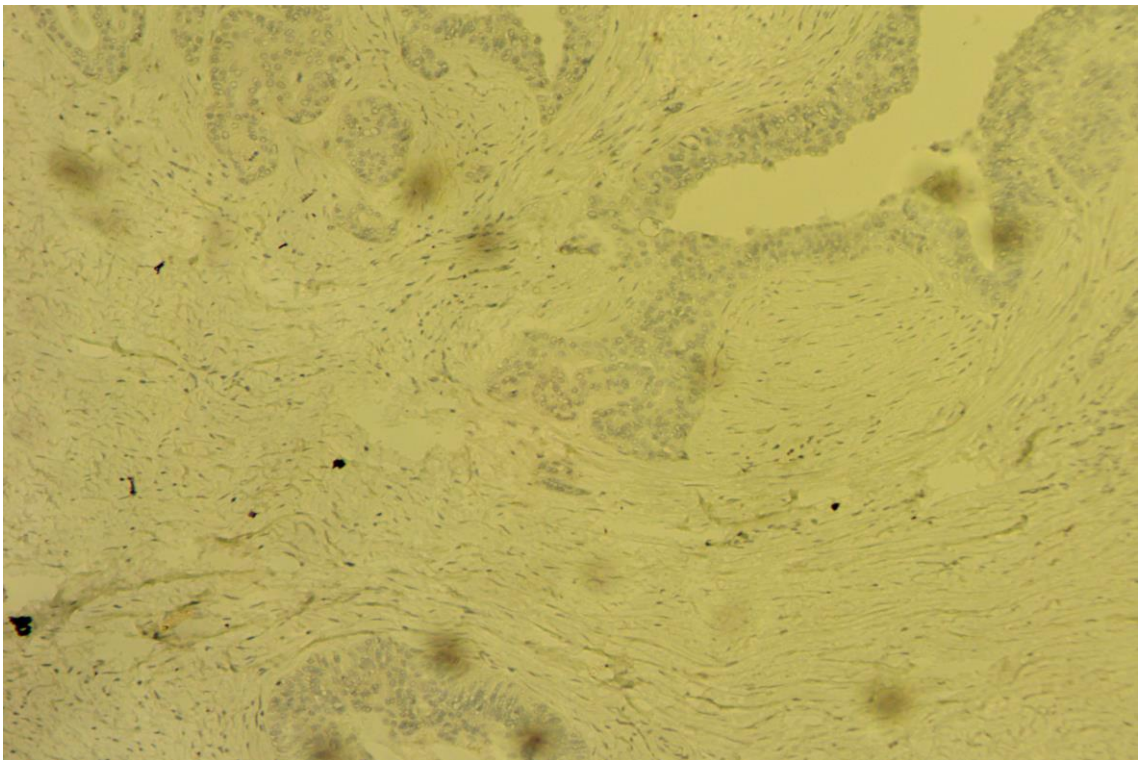


Рис. 3.18. VEGFR-2-позитивна карцинома комплексного типу. Забарвлення: діамінобензидин + гематоксилін Масйра. Зб.×400



**Рис. 3.19. Експресія VEGFR-2 за карциноми змішаного типу
Забарвлення: діамінобензидин + гематоксилін Майєра. Зб.×400**



**Рис. 3.20. Негативна експресія VEGFR-1 у карциномі МЗ змішаного
типу. Забарвлення: діамінобензидин + гематоксилін Маєра. Зб.×400**

Аналіз корелятивних зв'язків експресії біологічних маркерів, які характеризують інтенсивність ангиогенезу у пухлинах МЗ (VEGF, VEGF-1, VEGF-2), проліферативної активності (Ki-67) та ангио-/лімфоінвазії ракових клітин дозволили встановити наступні закономірності (табл. 3.17):

1. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 та Ki-67 мають сильну взаємну кореляцію (коефіцієнт = 1.000):

- свідчить про те, що рівні експресії цих маркерів часто збільшуються або зменшуються одночасно;

- така кореляція може бути наслідком спільних механізмів регуляції або загальної агресивності пухлини.

2. VEGF та лімфо-/ангіоінвазія мають помірну позитивну кореляцію (коефіцієнт = 0.662):

- експресія VEGF пов'язана зі здатністю пухлини до інвазії у кровоносні та лімфатичні судини, що узгоджується із попередніми даними.

- VEGF сприяє ангиогенезу, що може полегшувати інвазію.

3. VEGFR-1 та VEGFR-2 також помірно корелюють із лімфо-/ангіоінвазією (коефіцієнт = 0.662):

- рівномірна експресія цих рецепторів у пухлині може вказувати на їх роль у регуляції ангиогенезу, який полегшує інвазію;

- ступінь кореляції VEGFR-1 та VEGFR-2 нижчий, порівняно із VEGF.

4. Ki-67 та лімфо-/ангіоінвазія мають подібний рівень кореляції (коефіцієнт = 0.662):

- вказує на те, що висока проліферативна активність (за маркером Ki-67) також асоційована зі здатністю пухлин до інвазії;

- проте, як зазначено вище, відсутній прямий зв'язок між експресією VEGF та Ki-67.

Загальні висновки:

- VEGF є ключовим фактором, який пов'язаний із здатністю пухлин до лімфо-/ангіоінвазії, підтверджуючи його роль в неоангіогенезі;

Таблиця 3.17

Кореляційна матриця маркерів проліферації та інвазії за раку МЗ у собак

	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2	Ki-67	Лімфо- /ангіоінвазія
VEGF	1.0	0.9999999958209198	1.0000000000000002	1.0	0.6620097677936604
VEGFR-1	0.9999999958209198	1.0	0.9999999958209196	0.9999999958209197	0.6619982616216492
VEGFR-2	1.0000000000000002	0.9999999958209196	1.0	1.0	0.6620097677936605
Ki-67	1.0	0.9999999958209197	1.0	1.0	0.6620097677936603
Лімфо- /ангіоінвазія	0.6620097677936604	0.6619982616216492	0.6620097677936605	0.6620097677936603	1.0

- VEGFR-1 і VEGFR-2 підтримують цей процес, хоча їх вплив може бути менш вираженим порівняно з VEGF;

- Ki-67 як маркер проліферації опосередковано пов'язаний із інвазією через загальну агресивність пухлин.

Крім того встановлено, що у зразках новоутворень МЗ кількість позитивних до Ki-67 клітин мала залежність від розміру патологічного вогнища (коефіцієнт кореляції – 0,41; 95 % довірчий інтервал – 0,25–0,59). Збільшення величини пухлини супроводжувалось більш інтенсивним імунофарбуванням ракових клітин, які експресують Ki-67.

Не було встановлено достовірної різниці рівнів експресії Ki-67 залежно від гістопатологічного типу пухлин МЗ. У табл. 3.18 наведено результати статистичного обчислення кількості імунопозитивних пухлинних клітин за окремих злоскісних новоутворень МЗ. У розрахунку на 100 неоплазійних клітин, експресію маркера проліферації (Ki-67) демонстрували $11,2 \pm 7,5$ (протокова карцинома) – $18,0 \pm 6,2$ (крибриформна карцинома) ракових клітин. Значні коливання кількості ракових клітин, імунопозитивних до фарбування Ki-67, в межах одного гістопатологічного типу новоутворення, зумовлюють відсутність достовірної різниці між показниками нозологічних форм.

Таблиця 3.18

Експресія Ki-67 за різних злоскісних пухлин молочної залози у сук

Нозологічні форми	Середня кількість Ki-67-позитивних клітин у розрахунку на 100 ракових клітин
Карцинома змішаного типу (n=12)	$13,4 \pm 7,3$
Крибриформна карцинома (n=9)	$18,0 \pm 6,2$
Протокова карцинома (n=17)	$11,2 \pm 7,5$
Тубулярна карцинома (n=13)	$14,8 \pm 6,9$
Тубулопапілярна карцинома (n=10)	$12,1 \pm 4,7$

Експресія маркера проліферації Кі-67 представлено на рис. 3.21, 3.22. В представлених зразках відмічається різна щільність імунопозитивних до Кі-67 ракових клітин на тлі їх нерівномірного розташування. Збільшення кількості імунопозитивних неоплазійних клітин свідчить про високий ризик прогресування захворювання із формуванням метастатичних вогнищ та післяопераційних рецидивів.

Таким чином, приймаючи до уваги особливості протипухлинної дії метрономного режиму застосування хіміотерапевтичних засобів та перепрофільованого препарату метформін було визначено біологічні мішені, для їх терапевтичного впливу, які відіграють важливу роль в ангіогенезі неоплазії, проліферації і міграції ракових клітин.

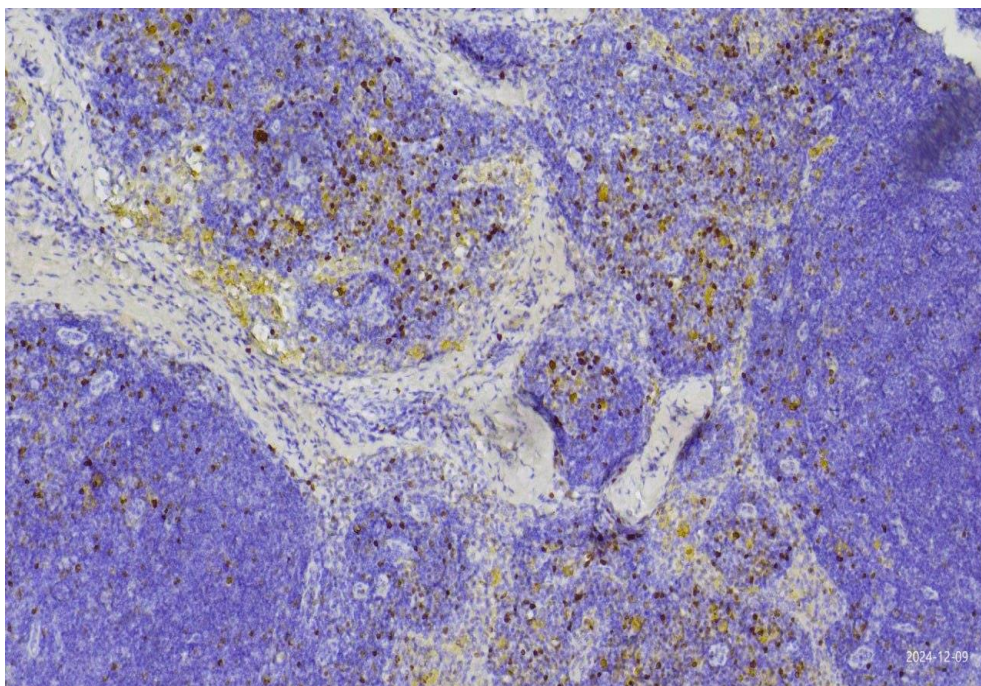


Рис. 3.21. Високий рівень проліферативної активності (згідно маркера Кі-67) за карциноми МЗ змішаного типу. Фарбування гематоксиліном Майєра. Зб.×400

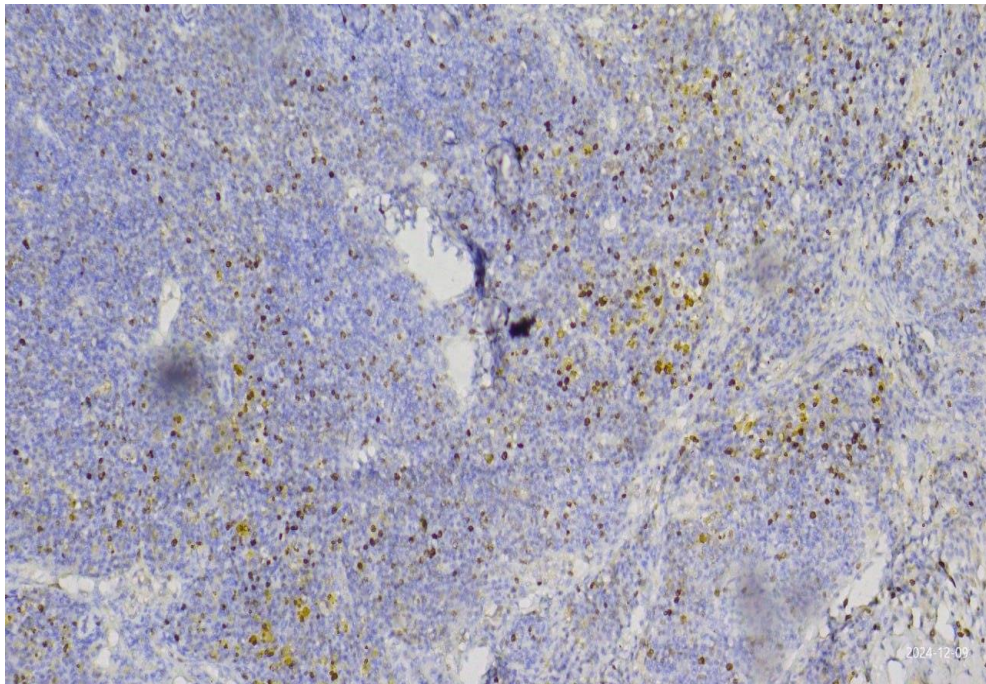


Рис. 3.22. Помірний рівень експресії Кі-67 за тубулопапілярної карциноми МЗ. Фарбування гематоксином Майєра. Зб.×400

Встановлено, що збільшення агресивності новоутворень МЗ супроводжувалось посилення активності латентних й активним форм ММП, які забезпечують деструкція міжклітинного матриксу, що є необхідною умовою міграції неоплазійних клітин.

Крім того, прогресування захворювання обумовлює надмірну експресію VEGF – ангіогенного фактору, необхідного для забезпечення ракових клітин поживними речовинами для підтримки їх життєдіяльності і проліферації. Інтенсивна проліферація злоякісних неоплазій МЗ підтверджена збільшенням експресії маркера Кі-67. VEGF та Кі-67 корелювали із інвазією пухлинних клітин в кровоносні і лімфатичні судини. Наявність ракових клітин в судинах новоутворення (визначалась гістологічно) збільшує ризик післяопераційних ускладнень та метастазування.

3.3. Ефективність хірургічного лікування сук за неоплазій молочної залози

Перший етап визначення ефективності розробленого протоколу лікування сук за новоутворень МЗ передбачав визначення ефективності

хірургічного лікування сук із злоякісними новоутвореннями молочної залози. Отримані результати були використані як «базові» (контрольні) для об'єктивної оцінки впливу комбінації препаратів циклофосфамід + метформін.

За проведення даного етапу досліджень проаналізовано вплив на клінічні результати мастектомії у собак факторів, які мають перспективу практичного застосування: клінічної стадії, патоморфологічних змін функціональної тканини МЗ, інвазії ракових клітин в кровеносні і лімфатичні судини. Незважаючи на значну кількість публікацій, наразі можна констатувати суттєву різницю їх інтерпретації та складність узагальнення наявних результатів.

Для екстирпації новоутворень МЗ була обрана загальноприйнята техніка мастектомії із використанням височастотного електрокоагулятора ЕК-300М, яка детально описана вище у розділі 2.

Аналіз результатів екстирпації злоякісних неоплазій МЗ в межах певної клінічної стадії дозволив виявити кореляцію медіани виживання із стадією захворювання (табл. 3.19; рис. 3.23).

Таблиця 3.19

Перебіг захворювання залежно від клінічної стадії

Клінічна стадія	n	Медіана виживаності, місяців	
		значення	95 % ДІ*
I	47	13,1	14–19
II	151	6,3	3–11
III	184	5,4	2–8

* - ДІ: довірчий інтервал

Підвищення клінічної стадії захворювання супроводжується достовірним посиленням агресивності неоплазії МЗ (Marconato et al., 2009; Gundim et al., 2016), що пояснює найбільш високий рівень виживання у тварин, яких оперували за першої стадії захворювання. На тлі мастектомії, середній показник виживання собак із злоякісними новоутвореннями першої стадії

становив 13,1 місяці, другої стадії був нижчим в 2,1 раза (6,3 місяці), третьої стадії – в 2,4 раза (5,4 місяці).

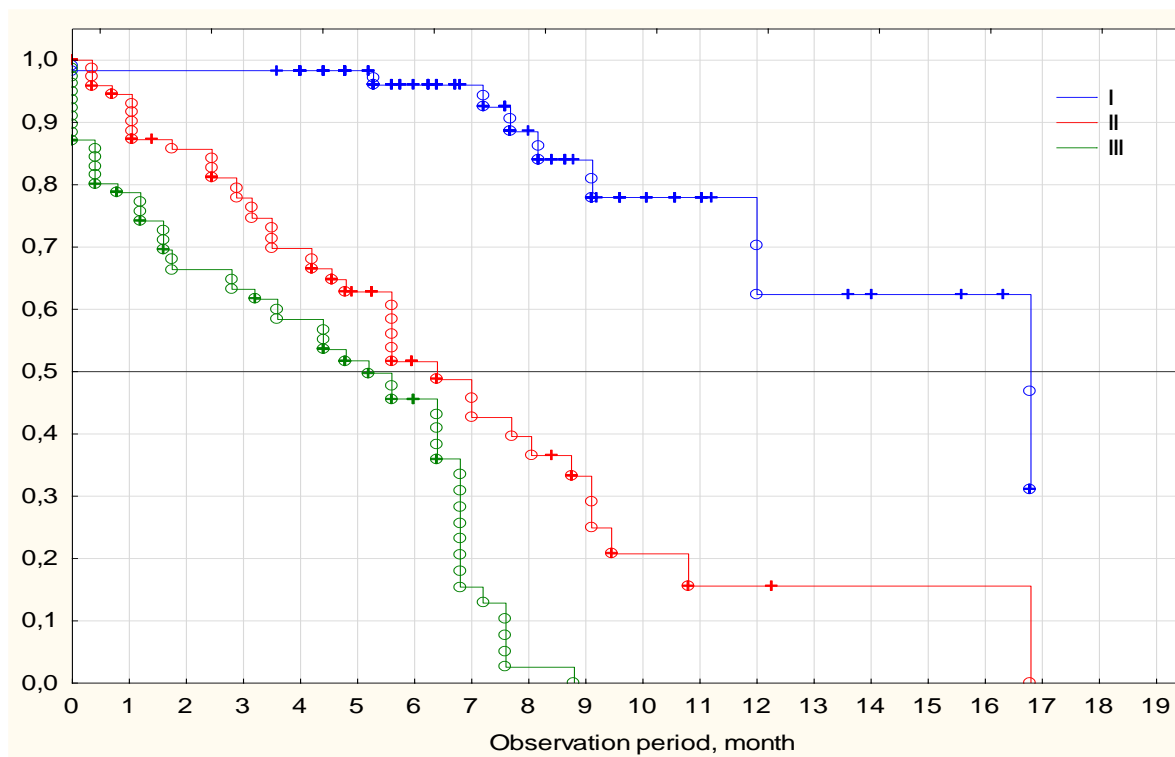


Рис. 3.23. Крива Каплана-Мейєра виживання сук залежно від клінічної стадії неоплазій МЗ (повні спостереження помічено O, неповні +)

Важливим біологічним маркером, який потрібно враховувати за прогнозування біологічної поведінки пухлини МЗ є її нозологічна форма (Sarli et al., 2002). Проведені дослідження засвідчили, що кращі результати відносно медіани виживання після проведення хірургічного лікування сук із злоякісними пухлинами МЗ отримано за мукозної карциноми, карциноми *in situ* і веретеноподібноклітинної карциноми – 27,0 і 27,5; 19,8 і 20,1; 19,7 і 18,3 місяці, відповідно (табл. 3.20; рис. 3.23). Достатня медіани виживання тлі екстирпації новоутворень МЗ (близько 13–14 місяців) констатували за таких карцином, як тубулярна (13,6 місяців), протокова (13,2 місяців), змішаного типу (13,1 місяців), тубулопапілярна (13 місяців). Мінімальна ефективність оперативного втручання була встановлена за видалення карциноми комплексного типу (11 місяців), комедокарциноми (10,5 місяців) та

крибриформної карциноми (9 місяців). Отримані результати продемонстрували прогностичне значення нозологічних форм злоякісних пухлин, яке потрібно враховувати для обґрунтування необхідності ад'ювантної хіміотерапії.

Таблиця 3.20

**Вплив на ефективність хірургічного лікування сук
гістопатологічного типу пухлин МЗ**

Нозологічна форма	n	Медіана	
		виживаності, місяців	
		значення	95 % ДІ*
муциозна карцинома	5	27,0	17–39
карцинома <i>in situ</i>	17	19,8	11–26
веретеноподібноклітинна карцинома	5	19,7	10–29
тубулярна карцинома	12	13,6	7–18
протокова карцинома	8	13,2	6–21
карцинома змішаного типу	22	13,1	9–19
тубулопапілярна карцинома	18	13	7–16
карцинома комплексного типу	19	11	5–21
комедокарцинома	8	10,5	6–14
крибриформна карцинома	12	9	4–15

* - ДІ: довірчий інтервал

Представлені іншими авторами публікації щодо інвазії неоплазійних клітин в кровоносні і лімфатичні судини як правило обмежуються констатацією факту, без узгодження із можливістю їх практичного застосування (Sleesckx et al., 2014). Отримані нами дані засвідчили залежність клінічного ефекту мастектомії від наявності/відсутності пухлинних осередків у судинах (верифікували шляхом гістологічного дослідження новоутворень після екстирпації), розташованих в межах неоплазії (табл. 3.21; рис. 3.25, 3.26).

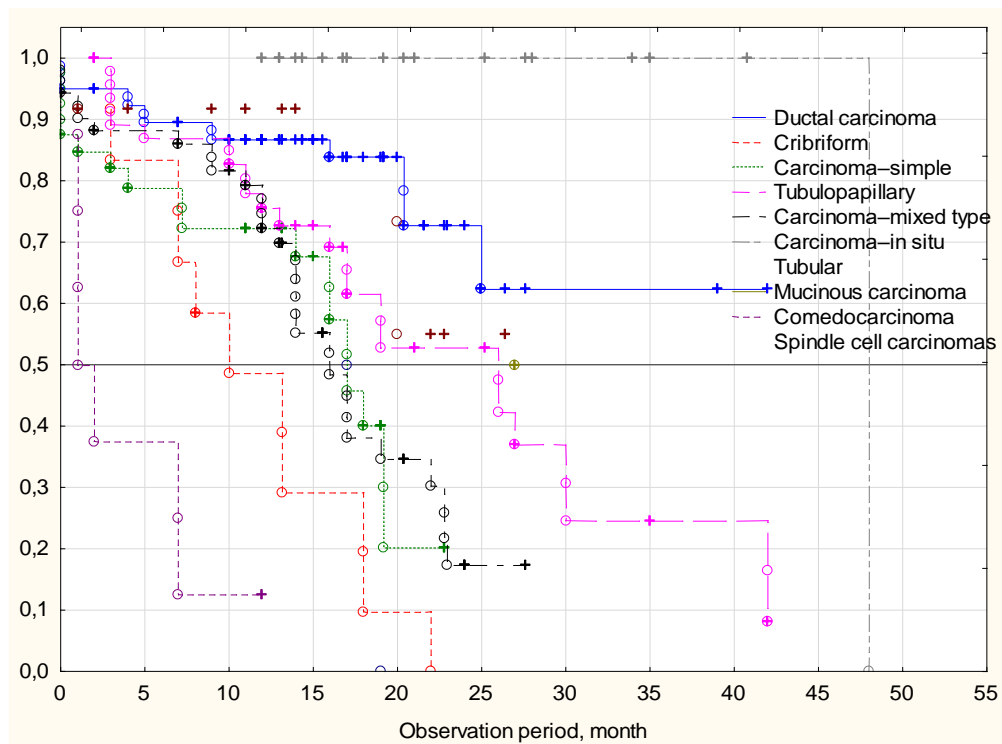


Рис. 3.24. Крива Каплана-Мейєра виживання сук залежно від гістологічного типу неоплазій МЗ (повні спостереження помічено O, неповні +)

Відсутність міграції ракових клітин за межі позаклітинного матриксу пухлин на тлі оперативного втручання дозволяла прогнозувати медіану виживаності на рівні 32,6 місяців із 95% довірчим інтервалом 24–39 місяців.

Таблиця 3.21

Вплив судинної інвазії на ефективність мастектомії

Прогностичний фактор	n	Медіана виживаності, місяців	
		значення	95 % ДІ*
судинна інвазія відсутня	169	32,6	24–39
ангіоінвазія	135	11,1	5–13
лімфоінвазія	78	11,6	4–14
метастази у лімфатичні вузли	71	12,4	5–17

* - ДІ: довірчий інтервал

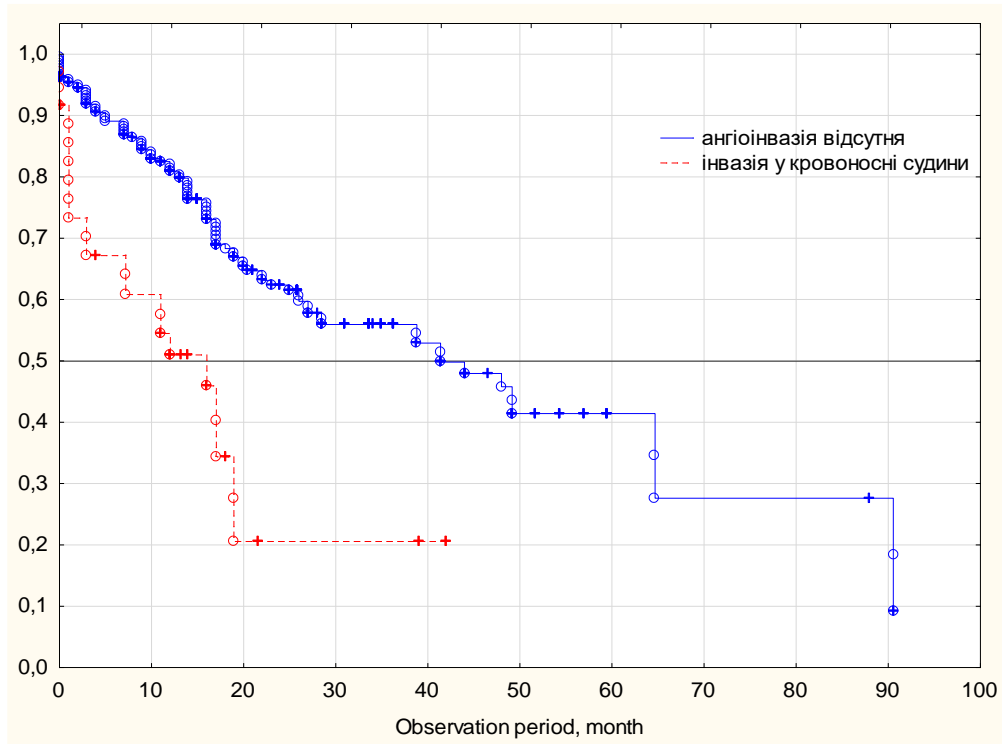


Рис. 3.25. Крива Каплана-Мейєра виживання сук залежно від наявності ангіоінвазії (повні спостереження помічено O, неповні +)

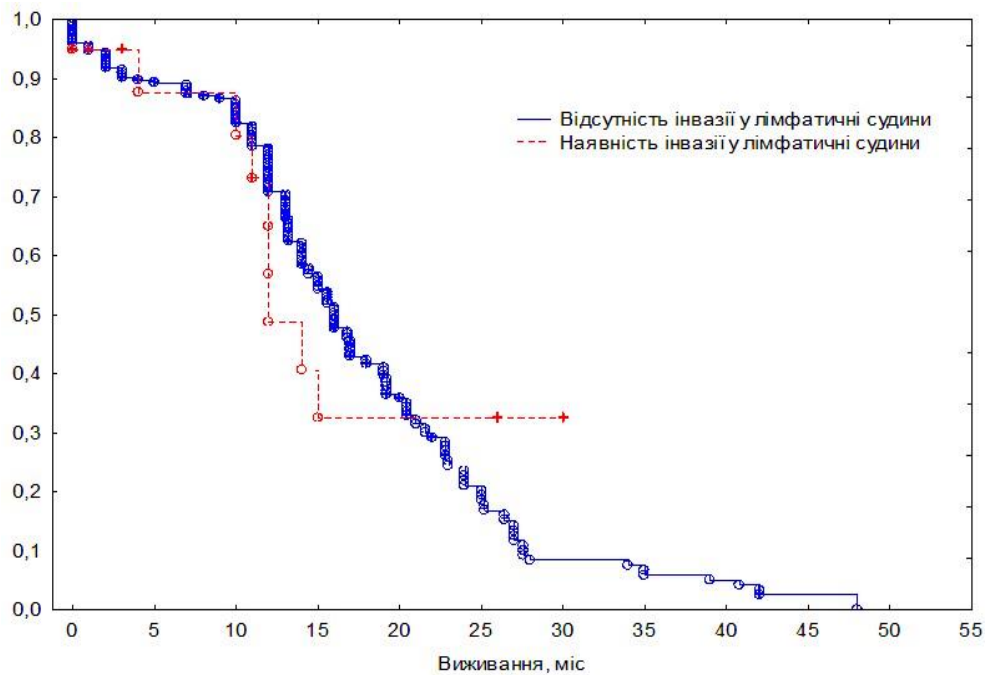


Рис. 3.26. Крива Каплана-Мейєра виживання сук залежно від наявності лімфангіоінвазії (повні спостереження помічено O, неповні +)

Екстирпація пухлин МЗ за відсутності судинної інвазії дозволяла прогнозувати медіану виживаності на рівні 32,6 місяців. Наявність ангіо- та лімфатичної інвазії ракових клітин знижувала зазначені показники в 2,8–2,9 (до 11,1–11,6 місяців), а метастазування в регіонарні лімфатичні вузли – 2,6 (до 12,4 місяців) рази, відповідно.

Прогнозування подальшого перебігу захворювання за Ноттінгемським прогностичним індексом, адаптованим до ветеринарної медицини (vet-NPI), який узагальнює дані щодо клінічної стадії, гістопатологічного типу пухлини МЗ та інвазії пухлинних клітин в судинне русло (кровоносне та/або лімфатичне) засвідчило, що збільшення зазначеного показнику більше 4 зменшує медіану виживаності в 1,4 (з 14,4 до 10,5 місяців) рази (табл. 3.22; рис. 3.27).

Таблиця 3.22

Прогнозування перебігу захворювання за vet-NPI[◇]

Значення	n	Медіана виживаності, місяців	
		значення	95 % ДІ*
< 3,9	284	14,4	9–17
> 4	98	10,5	7–16

* - ДІ: довірчий інтервал; [◇] – Ноттінгемський прогностичний індекс, адаптований до ветеринарної медицини (vet-NPI) (Haybittle et al., 1982)

Таким чином, vet-NPI підтверджує, що підвищення клінічної стадії, наявність ангіо- і лімфоінвазії та певні нозологічні форми пухлин МЗ достовірно знижують ефективність хірургічного лікування та обґрунтовують доцільність фармакологічної терапії в післяопераційний період.

Аналізуючи представлені у даному розділі дані, слід відзначити, що результати проведених досліджень щодо визначення ефективності хірургічного лікування сук за злоякісних неоплазій МЗ продемонстрували її залежність від клінічної стадії, гістопатологічного типу та судинної інвазії. Більший ризик негативного результату, зниження рівня виживаності, скорочення медіани безрецидивного періоду пов'язано із третьою стадією

захворювання, високоагресивними нозологічними формами та наявністю в кровоносних / лімфатичних судинах і лімфатичних вузлах ракових мікроемболів.

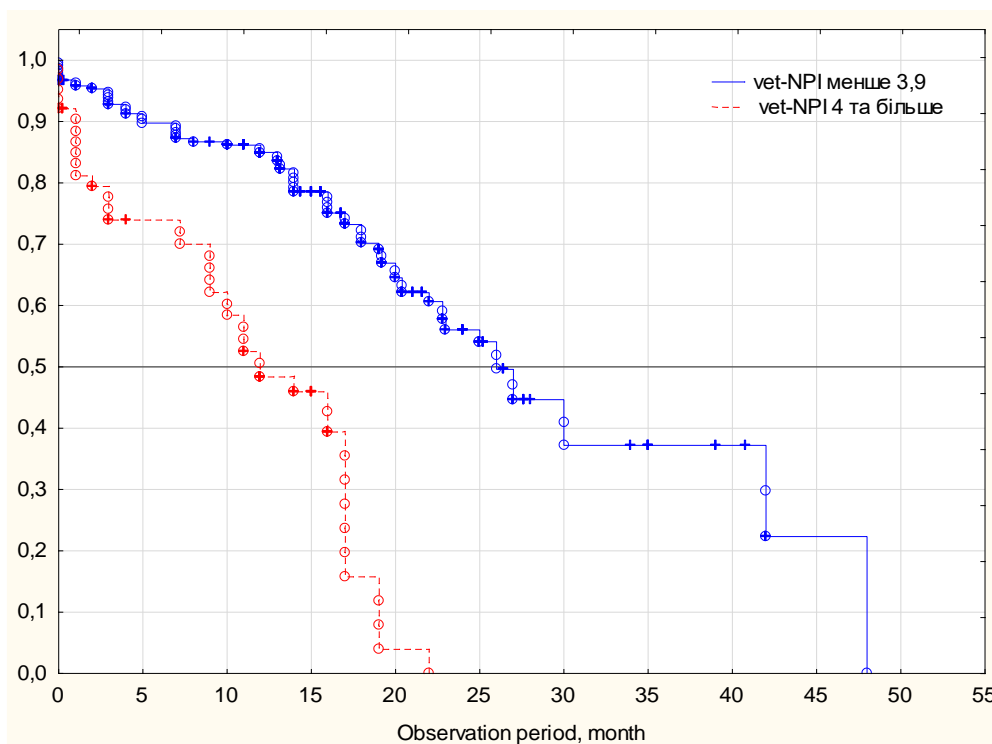


Рис. 3.27. Крива Каплана-Мейєра виживання сук залежно від Ноттінгемського прогностичного індексу, адаптованого до ветеринарної медицини (повні спостереження помічено O, неповні +)

Слід зауважити, що за злоякісних неоплазій МЗ їх екстирпація не забезпечує бажаного результату лікування. Тому незважаючи на те, що у сук частіше реєструються одиничні пухлинні ураження, доцільним є проведення фармакологічного лікування, зокрема хіміотерапії у комбінації із засобами, які впливають на ключові ланки канцерогенезу.

3.4. Клінічна апробація ад'ювантної метрономної терапії циклофосфамідом та метформіном

Недостатня ефективність хірургічного втручання, особливо за третьої клінічної стадії, яка часто супроводжується міграцією ракових клітин в кровоносні і лімфатичні судини, а також формування метастатичних вогнищ в

регіонарних лімфатичних вузлах обґрунтували необхідність проведення в післяопераційний період адекватної фармакологічної терапії, яка б покращила результати лікування на тлі мінімального токсичного впливу на організм. За розробки терапевтичної схеми вважали за необхідне враховувати сучасну негативну тенденцію щодо збільшення частки собак, які мають надмірну масу тіла або ожиріння (Chiang et al., 2022; Venka et al., 2023).

Аналіз публікацій щодо клінічного досвіду використання ад'ювантної хіміотерапії у ветеринарній онкології (Beaudu-Lange & Lange, 2024) та перепрофільованих фармакологічних засобів – у собак за незаразної патології (Wesolowski et al., 2020), стали підґрунтям для вибору метрономного протоколу лікування сук після мастектомії, до складу якого було включено циклофосфамід та метформін.

Для видалення новоутворень МЗ використовували високочастотний електрохірургічний метод, техніка якого представлена у розділі 2.

Середня тривалість періоду від операції до початку хіміотерапії на основі циклофосфаміду та метформіну становила 7,5 діб (від 5 до 12 днів). У однієї тварини дослідної групи виникли токсичні явища у вигляді розвитку макрогематурії, яка була купована після відміни циклофосфаміду протягом 3 діб.

Дослідженнями встановлено, що медіана виживання сук після видалення злоякісних неоплазій МЗ залежала від індексу маси тіла (табл. 3.23, рис. 3.28). За надмірної маси тіла або ожиріння, порівняно із нормальним індексом маси тіла, середній показник виживання тварин зменшувався в 1,5 рази: з 4,5 до 3,1 місяця, що підтверджує вищий ризик прогресування захворювання у таких пацієнтів.

Клінічна апробація ад'ювантного призначення циклофосфаміду і метформіну в метрономному режимі дозволила подовжити медіану виживаності за нормального індексу маси тіла в 1,3 раза, надмірної маси тіла та ожиріння – 2,5 раза. При цьому, за включення до лікувального протоколу метморфіну, медіана виживання собак із надмірною масою тіла перевищувала

відповідне значення сук із нормальним індексом маси тіла в 1,3 раза. Такий результат, пов'язаний із здатністю метформіну проявляти свою дію тільки за порушення вуглеводного і ліпідного обмінів, зокрема у собак із надмірною масою тіла або ожирінням.

Таблиця 3.23

Медіана виживання за різних протоколів лікування сук із злоякісними пухлинами МЗ (місяців)

Група	Індекс маси тіла	median	95 % ДІ*
контроль	нормальний (n=17)	4,5	3–8
	високий (n=12)	3,1	1–6
дослід	нормальний (n=17)	6,0	3–9
	високий (n=13)	7,9	3–11

* - ДІ: довірчий інтервал

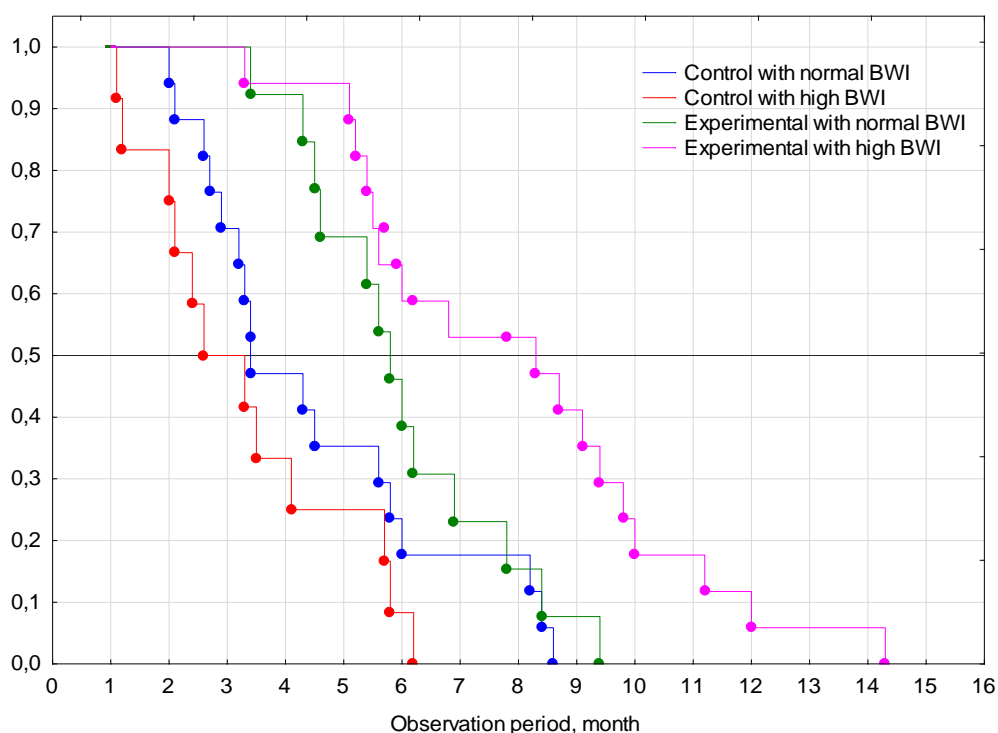


Рис. 3.28. Медіана виживання (крива Каплана-Мейєра) за лікування собак із злоякісними неоплазіями МЗ (місяців)

Зокрема, метформін активує АМФК, яка відіграє ключову роль в метаболізмі глюкози і жирів, що проявляється зниженням вмісту у крові глюкози, холестерину і тригліцеридів. Механізм дії метформіну (зниження утворення глюкози без посилення секреції інсуліну) обумовлює його протидіабетичний ефект тільки за гіперглікемії (Madiraju et al., 2014).

Медіана безрецидивного періоду сук на тлі проведеної мастектомії (з приводу карцином МЗ) за нормального індексу маси тіла становила 3,7 місяців, тоді як надмірна маса тіла слугувала причиною зниження цього показника в 1,5 рази, до 2,5 місяців (табл. 3.24; рис. 3.29). Призначення після хірургічного втручання циклофосфаміду і метморфіну подовжувало медіану безрецидивного періоду таких собак в 1,4 (до 5,3 місяців) та 2,4 (до 6 місяців) рази, відповідно. На відміну від медіани виживання, різниця медіани безрецидивного періоду залежно від маси тіла тварин виявились незначними.

Показник тварин із ожирінням (6 місяців) перевищував відповідний результат у собак із нормальним індексом маси тіла (5,3 місяці) лише на 13 % (в 1,13 рази). Ймовірно, це обумовлено обмеженим терміном нормалізуючої дії метформіну на вуглеводний і ліпідний обміни.

Таблиця 3.24

Вплив метрономного протоколу з метформіном на медіану безрецидивного періоду (місяців)

Група	Індекс маси тіла	median	95 % ДІ
контроль	нормальний (n=17)	3,7	2–7
	високий (n=12)	2,5	1–5
дослід	нормальний (n=17)	5,3	3–8
	високий (n=13)	6,0	3–9

* - ДІ: довірчий інтервал

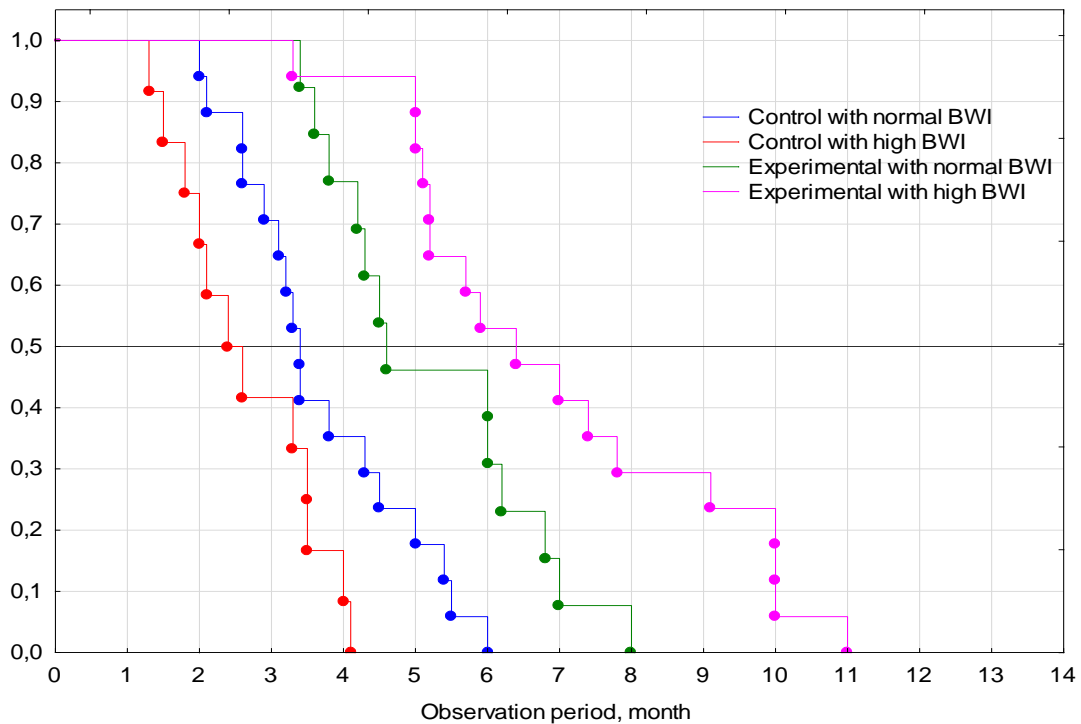


Рис. 3.29. Крива Каплана-Мейєра безрецидивного періоду собак за метрономної ад'юванної терапії залежно від індексу маси тіла (місяців)

Визначено показники глюкози, загального холестерину і тригліцеридів у сук із неоплазіями МЗ за нормального і високого індексу маси тіла до операції та в період проведення ад'юванної метрономної терапії циклофосфамідом і метформіном. Статичний аналіз та графічну обробку результатів було проведено за допомогою ПЗ Statistica 10 (StatSoft inc., USA, 2011), данні порівнювали за допомогою тесту Т'юкі, з урахуванням похибки Бонфероні для множинних порівнянь, різниця вважалась достовірною за $p > 0,05$.

Як показали дослідження, у сук за новоутворень МЗ показники ліпідного обміну знаходились в межах референтних значень та не залежали від індексу маси тіла на тлі значного коливання показників (табл. 3.25, рис. 3.30). Концентрація у крові тригліцеридів становила $0,88 \pm 0,33 - 0,98 \pm 0,47$ ммоль/л, загального холестерину – $4,94 \pm 0,79 - 5,90 \pm 1,59$ ммоль/л. Рівень глюкози, згідно тесту Т'юкі, у собак із надлишковою масою тіла та ожирінням достовірно ($p < 0,05$) перевищувала відповідні показники собак із нормальним індексом маси тіла, хоча не виходили за межі клінічно здорових тварин. Таким чином,

гіперглікемія у собак на тлі ожирінням обґрунтовує доцільність застосування метформіну, дія якого направлена на інгібування синтезу глюкози, що спричинює протипухлинний ефект.

Таблиця 3.25

Показники ліпідного обміну та глюкози у сук із злякисними пухлинами МЗ

Маркер, ммоль/л	Референтні значення	Група			
		контрольна		дослідна	
		індекс маси тіла			
		нормальний (n=17)	високий (n=12)	нормальний (n=17)	високий (n=13)
Глюкоза	4,4–6,7	4,8±0,76 ^a	5,3±0,83 ^{ab}	4,9±0,73 ^a	5,8±0,64 ^{ab}
Тригліцериди	0,24–0,98	0,88±0,33	0,97±0,47	0,95±0,41	0,88±0,35
Загальний холестерин	2,9–6,5	5,07±0,84	5,90±1,59	4,94±0,79	5,09±0,86

Вміст глюкози до початку лікування у собак із надмірною масою тіла був більшим, порівняно із суками, які мали нормальний індекс маси тіла. В подальшому на тлі проведеного впродовж 6 місяців лікування циклофосфамідом і метформіном її концентрація не мала достовірних відмінностей між контрольними і дослідними групами, а також в межах експериментальних груп в залежності від маси тіла (табл. 3.26). У тварин із нормальним індексом маси тіла у контролі рівень глюкози становив 4,8±0,77–5,2±0,66 ммоль/л, досліді – 4,8±0,45–5,2±0,45 ммоль/л, високим – 4,7±0,74–5,2±0,94 ммоль/л та 4,9±0,55–5,7±0,75 ммоль/л, відповідно, на тлі референтних значень 4,4–6,7 ммоль/л.

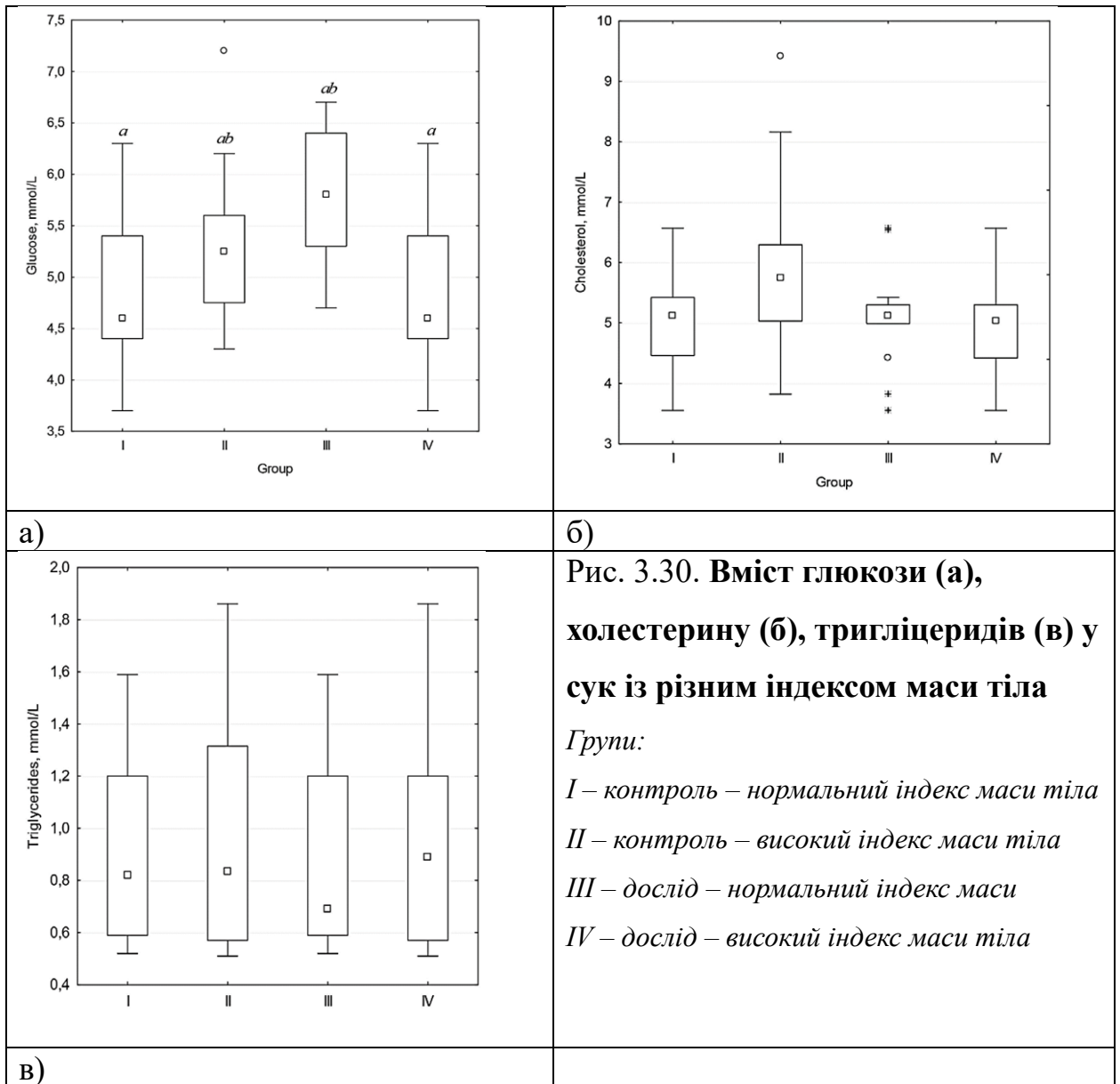


Рис. 3.30. Вміст глюкози (а), холестерину (б), тригліцеридів (в) у сук із різним індексом маси тіла
Групи:
 I – контроль – нормальний індекс маси тіла
 II – контроль – високий індекс маси тіла
 III – дослід – нормальний індекс маси
 IV – дослід – високий індекс маси тіла

Таблиця 3.26

Динаміка концентрації глюкози (ммоль/л) у крові за лікування сук із злякисними пухлинами МЗ

Термін спостереження, місяців	Група			
	контрольна		дослідна	
	індекс маси тіла			
	нормальний (n=17)	високий (n=12)	нормальний (n=17)	високий (n=13)
1	2	3	4	5
референтні значення	4,4–6,7			
до лікування	4,8±0,76 ^a	5,3±0.83 ^{ab}	4.9±0.73 ^a	5.8±0.64 ^{ab}

1	2	3	4	5
динаміка змін на тлі лікування				
1	5,1±0,86	5,2±0,94	4,8±0,75	5,3±0,53
	n=17	n=11	n=15	n=13
2	4,9±0,47	5,1±0,63	5,2±0,45	4,9±0,55
	n=12	n=9	n=14	n=12
3	4,8±0,77	5,2±0,75	4,8±0,89	5,7±0,75
	n=10	n=5	n=9	n=11
4	5,2±0,66	4,7±0,74	4,8±0,45	5,3±0,62
	n=7	n=3	n=7	n=9
5	4,9±0,78	5,2±0,00	5,0±0,49	5,5±0,42
	n=6	n=1	n=6	n=9
6	4,9±0,58	5,3±0,00	5,1±0,32	5,4±0,32
	n=6	n=1	n=6	n=8

* - поряд із показником рівня глюкози вказана кількість виживших тварин.

Аналіз динамічних змін концентрації тригліцеридів у крові собак, хворих на злоякісні пухлини МЗ, продемонстрував відсутність статистично достовірних змін (табл. 3.27). В контрольних групах до лікування, залежно від індексу маси тіла, вміст тригліцеридів становив $0,88\pm0,33$ – $0,97\pm0,47$ ммоль/л, дослідних – $0,88\pm0,35$ – $0,95\pm0,41$ ммоль/л, тобто був в межах референтних значень ($0,24$ – $0,98$ ммоль/л). В подальшому, під час проведення курсу лікування у контрольних тварин рівень тригліцеридів за нормального індексу маси тіла знаходився в межах $0,81\pm0,48$ – $0,90\pm0,28$ ммоль/л, високого – $0,93\pm0,48$ – $1,06\pm0,76$ ммоль/л. У дослідних собак отримано подібні результати – $0,90\pm0,68$ – $1,04\pm0,44$ ммоль/л та $0,83\pm0,33$ – $1,07\pm0,84$ ммоль/л, відповідно.

Тобто, не було встановлено змін концентрації тригліцеридів під впливом лікувального протоколу та достовірних відмінностей показників у контрольних і дослідних групах.

Таблиця 3.27

Вплив лікувального протоколу на вміст тригліцеридів у крові сук із злоякісними неоплазіями МЗ*

Термін спостереження, місяців	Група			
	контрольна		дослідна	
	індекс маси тіла			
	нормальний (n=17)	високий (n=12)	нормальний (n=17)	високий (n=13)
референтні значення	0,24–0,98			
до лікування	0,88±0,33	0,97±0,47	0,95±0,41	0,88±0,35
динаміка змін на тлі лікування				
1	0,85±0,32	0,93±0,48	0,93±0,42	0,83±0,33
	n=17	n=11	n=15	n=13
2	0,86±0,30	1,02±0,54	0,99±0,47	0,94±0,39
	n=12	n=9	n=14	n=12
3	0,90±0,28	0,97±0,63	1,00±0,44	0,89±0,38
	n=10	n=5	n=9	n=11
4	0,84±0,24	1,06±0,76	1,04±0,44	0,91±0,36
	n=7	n=3	n=7	n=9
5	0,86±0,25	1,07±0,00	0,91±0,37	0,91±0,38
	n=6	n=1	n=6	n=9
6	0,81±0,48	1,03±0,00	0,90±0,68	1,07±0,84
	n=6	n=1	n=6	n=8

* - вказана кількість виживших тварин

Спостереження впродовж періоду лікування вказують на відсутність вираженого впливу ад'ювантного лікування на вміст у крові загального холестерину (табл. 3.28).

Таблиця 3.28

Динамічні зміни рівня холестерину у крові сук за використання циклофосфаміду і метформіну*

Термін спостереження, місяців	Група			
	контрольна		дослідна	
	індекс маси тіла			
	нормальний (n=17)	високий (n=12)	нормальний (n=17)	високий (n=13)
референтні значення	2,9–6,5			
до лікування	5,07±0,84	5,90±1,59	4,94±0,79	5,09±0,86
динаміка змін на тлі лікування				
1	5,18±0,94	5,85±1,59	5,09±0,83	5,18±0,81
	n=17	n=11	n=15	n=13
2	5,09±1,10	5,93±1,43	5,19±0,92	5,43±0,79
	n=12	n=9	n=14	n=12
3	5,25±1,03	6,54±1,39	5,14±0,83	5,61±0,77
	n=10	n=5	n=9	n=11
4	5,12±1,26	5,88±0,4	4,99±0,66	5,59±0,96
	n=7	n=3	n=7	n=9
5	5,12±1,18	5,94±0,00	4,96±0,76	5,49±0,82
	n=6	n=1	n=6	n=9
6	5,11±1,19	5,96±0,00	4,96±0,76	5,54±0,86
	n=6	n=1	n=6	n=8

* - поряд із показником рівня холестерину вказана кількість виживших тварин

Зокрема, у контрольних тварин за нормального індексу маси тіла рівень даного маркера коливався в межах $5,11 \pm 1,19$ – $5,25 \pm 1,03$ ммоль/л, високого – $5,85 \pm 1,59$ – $6,54 \pm 1,39$ ммоль/л за передопераційних значень $5,07 \pm 0,84$ та $5,90 \pm 1,59$ ммоль/л, відповідно. У собак дослідних груп концентрація загального холестерину за нормального індексу маси тіла протягом курсу лікування становила від $4,96 \pm 0,76$ до $5,19 \pm 0,92$ ммоль/л, надмірної маси тіла (ожиріння) – від $5,18 \pm 0,81$ до $5,61 \pm 0,77$ ммоль/л на тлі передопераційних значень $4,94 \pm 0,79$ та $5,09 \pm 0,86$ ммоль/л, відповідно.

Ймовірно, відсутність достовірних змін загального холестерину і тригліцеридів за призначення метморфіну підтверджує його дію тільки за порушеного ліпідного обміну.

Тобто, ад'ювантне призначення у метрономному режимі циклофосфаміду і метформіну сукам після висічення новоутворень МЗ дозволило статистично достовірно збільшити медіани виживаності і безрецидивного періоду у таких пацієнтів. Причому, кращі результати отримано у собак дослідної і контрольної груп, які мали надмірну масу тіла або ожиріння. В період проведення лікування не залежно від індексу маси тіла рекомендований протокол не спричинював вираженого впливу на маркери вуглеводного і ліпідного обмінів – показники концентрації глюкози, тригліцеридів і загального холестерина у крові. Клінічні результати метрономного використання комбінації циклофосфамід + метформін є підґрунтям для рекомендації щодо її застосування сукам на тлі мастектомії.

Висновок до розділу 3

Моніторингові дослідження підтвердили актуальність проблеми щодо лікування злоякісних новоутворень МЗ у сук. Згідно отриманих даних має місце не тільки високий рівень захворюваності собак, але й щорічне збільшення кількості пацієнтів із пухлинами МЗ та частки злоякісних нозологічних форм. Визначена породна схильність до новоутворень МЗ актуальна для міст Дніпро і Запоріжжя, вікова – узгоджується із

загальноприйнятою тенденцією щодо підвищення схильності до пухлин із віком. Наразі серед факторів ризику розвитку неоплазій МЗ важливе значення відіграє надлишкова маса тіла.

Визначені біологічні маркери, які характеризують основні каскади канцерогенезу: ММП-2 і -9, VEGF, VEGF-1, VEGF-2, Ki-67. Крім того, доведена прогностична значимість інвазії ракових клітин в кровоносні і лімфатичні судини, які знаходяться в межах пухлини. Доведена доцільність їх використання для діагностики та прогнозування перебігу захворювання.

Досліджено ефективність високочастотного хірургічного лікування новоутворень МЗ, встановлено вплив на його результати клінічної стадії, гістопатологічної форми, ангіо- та лімфоінвазії. Збільшення стадії та наявність ракових клітин в судинах пухлини достовірно знижує медіану виживання і безрецидивного періоду.

Клініко-експериментально обґрунтовано доцільність призначення сукам ад'ювантного метронормного протоколу, до складу якого входить циклофосфамід та метформін. Зокрема, його використання у тварин із пухлинами МЗ збільшує медіану виживання і безрецидивного періоду.

Наведена у розділі 3 інформація відображена в наукових публікаціях: Коваленко, 2020; Коваленко & Білий, 2021; Kovalenko et al., 2021; Kovalenko, M., & Bilyi, 2021; Коваленко & Білий, 2022; Kovalenko, M., Dankevych, N. & Bilyi, 2023; Bilyi & Kovalenko, 2023; Kovalenko et al., 2023.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Збільшенням тривалості життя домашніх тварин і їх кількості являють собою один із основних чинників підвищення рівня захворюваності сук на новоутворення МЗ. Неоплазія МЗ вражає переважно нестерилізованих самок старшої вікової групи. Знання про основні аспекти цієї пухлини, її діагностику, а також терапевтичні та профілактичні можливості стають основоположними для успіху лікування та підтримки якості життя пацієнта (Rueda et al., 2024).

Наші спостереження, на відміну від публікацій результатів досліджень ряду науковців (Moe et al., 2001; Fonti et al., 2024), не підтвердили динамічне збільшення впродовж останніх років як загальної кількості сук із пухлинами молочної залози, так і частки їх злоякісних гістопатологічних типів.

Оцінки рівня щорічної захворюваності сук найбільш сприйнятливого віку (3–10 років) на неоплазію МЗ залежать від кількості тварин досліджуваної популяції і регіону та мають широкі варіативні межі: від 200 на 100 тис. собак до 120 на 10 тис. самок (Dobson et al., 2002; Egenvall et al., 2005). Тому встановлена нами частка сук, хворих на новоутворення МЗ актуальна тільки для міст Дніпро та Запоріжжя, в межах яких проводився скринінг.

Визначені особливості перебігу новоутворень МЗ подібні даним, опублікованим іншими дослідниками. Зокрема, результати Sorenmo et al. (2009) свідчать про те, що у собак пухлини МЗ прогресують від доброякісних до злоякісних; злоякісні пухлини клінічно та гістопатологічно подібні до новоутворень МЗ людини; злоякісні типи більші за розмірами, ніж доброякісні ($p=0,0002$); за злоякісних нозологічних форм вищий ризик утворення нових вогнищ ($p=0,015$).

Дослідженнями не підтверджено зниження ризику розвитку неоплазій молочної залози на тлі проведення оваріогістеректомії сук середньої і старшої вікової груп. Високий відсоток злоякісних неоплазій МЗ у стерилізованих сук ставить під сумнів доцільність її використання у таких тварин для профілактики захворювання, що рекомендовано Bilyi & Khomutenko (2024).

Це також може бути обумовлене тим, що у літніх самок важливу роль у розвитку пухлин МЗ відіграють фактори, не пов'язані із статевими гормонами, які продукуються яєчниками. По мірі старіння тварин вплив стерилізації на ймовірність появи неоплазій МЗ зменшується. В пухлинах у сук, старших 11 років експресія рецепторів ER знижена незалежно від статусу стерилізації, а частота злоякісних типів вища у кастрованих особин, порівняно із інтактними (Kim et al., 2017).

Banchi et al. (2022) прийшли до думки щодо доцільності гонадектомії при екстирпації неоплазій МЗ за умови врахування віку тварини, розміру і локалізації новоутворення. Згідно їх даним, у сук із пухлинами МЗ одночасне проведення мастектомії та оваріогістеректомії подовжувало термін безрецидивної виживаності (DFS). DFS була меншою за пухлин, які мали розміри більше за 2 см ($p < 0,006$) та були локалізованих у першій парі МЗ ($p = 0,00009$).

Отримані результати вікової та породної сприйнятливості сук до неоплазій МЗ узгоджуються із загальноприйнятою тенденцією щодо збільшення загальної кількості тварин-пухлиноносіїв серед собак середньої і старшої вікових груп та частки серед них злоякісних новоутворень (Silva et al., 2019; Fonti et al., 2024).

Описані в літературних джерелах гістопатологічні типи неоплазій МЗ у сук суттєво різняться (Patel et al., 2019; Nadhiya et al., 2020; Tkaczyk-Wlizio et al., 2023), що значною мірою обумовлено їх високою варіабельністю на фоні відсутністю єдиної (стандартизованої) діагностичної методики. Одночасно більшість результатів демонструє високий ризик розвитку у тканинах МЗ злоякісних новоутворень епітеліального походження (Sorenmo et al., 2011; Ariyarathna et al., 2022).

На противагу нашим результатам, Han et al. (2017) повідомляють про низьку захворюваність сук на новоутворення МЗ та переважання доброякісних гістологічних типів, хоча середній вік хворих тварин не відрізнявся від загальновизнаного показника (9 років).

Достовірну кореляцію клінічного перебігу з інвазією ракових клітин в лімфатичні і кровоносні судини, а також можливість їх використання в якості предиктора перебігу захворювання продемонстрували Salgado et al. (2013).

Отримані нами результати частково узгоджуються із даними, опублікованими Dolka et al. (2024): ризик смерті за неопластичної емболії підвищувався у п'ять разів, виразок новоутворення МЗ – у чотири рази. Наявність неопластичних емболів та великий розмір пухлини були незалежними предикторами смерті, пов'язаної із раком МЗ. Суки із пухлинною судинною емболією, виразкою та простою або складною карциномою мали значно вищий ризик місцевого рецидиву. Розмір пухлини більше 3 см виступав достовірним незалежним предиктором легеневих метастазів. Час оваріогістеректомії по відношенню до мастектомії достовірно корелював зі клінічним ступенем, виживанням і летальністю, пов'язаних із неоплазіями МЗ.

Протягом останніх років серед собак зростає актуальність проблеми надмірної маси тіла та ожиріння (Chun et al., 2019). Отримані нами результати дають підстави розглядати ожиріння як фактор ризику розвитку новоутворень МЗ у сук та причину зниження ефективності лікування. Наразі це питання знаходиться в стані активного вивчення та обговорення. Magalhães et al. (2020) вказують, що надмірна маса тіла не спричинювала клінічних і лабораторних змін у сук з раком МЗ. Проте, у таких тварин реєстрували більшу кількість змін гематологічних та біохімічних показників, зокрема тромбоцитоз, лімфопенію, лейкоцитоз, лейкопенію, гіперглікемію. Такі параметри, як оцінка стану тіла (BCS) та індекс маси тіла (SBMI) не мали кореляції із злоякісністю неоплазій МЗ (гістологічними типами).

Оваріогістеректомія у більшості тварин підвищує ризик надмірної маси тіла/ожиріння, порівняно з інтактними собаками. Мінімальна ймовірність збільшення індексу маси тіла встановлена за стерилізації до однорічного віку (Benka et al., 2023). Проте, у більш ранньому ретроспективному дослідженні на 1930 собаках Lefebvre et al. (2013) не спостерігали кореляції між віком

гонадектомії та ризиком розвитку ожиріння.

При проведенні аналізу історій хвороб, нами був врахований «фактор часу» – період від виявлення первинних ознак захворювання до початку проведення діагностичних заходів. Високий відсоток звернень (близько 70 %) власників в межах 3 місяців дозволяв виявляти пухлини на ранніх клінічних стадіях та використовувати щадні протоколи лікування, які дозволяли отримати позитивні результати. В опублікованих закордонних наукових працях це питання залишається поза увагою. Враховуючи відсутність в Україні практики регулярних диспансерних оглядів тварин, використання у просвітницькій діяльності такої інформації дасть змогу зменшити частку собак із злоякісними пухлинами молочної залози III-IV стадій.

Результати клінічного та біохімічного аналізу крові потрібно інтерпретувати у відповідності не тільки до пухлини МЗ, а й змін, обумовлених супутніми хворобами. Отримані результати аналізу крові відображають безпосередній вплив на організм пухлини та вторинні пухлино-асоційовані порушення систем. В онкохворих собак, особливо за наявності надмірної маси тіла, лабораторні дослідження, такі як аналіз крові, є незамінними для виявлення можливих порушень і допомоги у визначенні прогнозу та лікування, щоб забезпечити кращу якість життя та виживання (Garrido et al., 2015). Пацієнти з ожирінням та онкологічні захворювання мають різноманітні системні зміни, а в онкологічних пацієнтів такі зміни можуть бути наслідком прямого впливу росту пухлини або паранеопластичного синдрому (Childress, 2012). За ожиріння відбувається збільшення прозапальних цитокінів, яке, ймовірно, пов'язане із секвестрацією заліза, що супроводжується скороченням періоду напіввиведення еритроцитів і секреції еритропоєтину, що призводить до анемії (Lallo et al., 2019).

Підвищене співвідношення гранулоцитів до агранулоцитів у гемограмі тварин з пухлинами МЗ може свідчити про активність імунної системи та запальних процесів у організмі, що може мати прогностичне значення для оцінки ходу захворювання та вибору стратегії лікування.

Оцінка змін біохімічних маркерів у сук із неоплазіями МЗ дозволила встановити підвищення рівня білірубіну, що може вказувати як на наявність інтоксикації, так і посилення внутрішньосудинного гемолізу. Надмірний рівень глюкози, встановлений у сук за надлишкової маси тіла можна розглядати як фактор ризику розвитку діабету.

Існування та прогресування пухлини МЗ потребує використання великого об'єму поживних речовин. Один із ланцюгів забезпечення високого рівня живлення неоплазій МЗ є активний ангиогенез. Тому терапія, що інгібує ангиогенез, може бути використана для зупинки росту пухлинних клітин. Низка лікарських засобів – інгібіторів ангиогенезу успішно використовується в гуманній медицині, тоді як у ветеринарній медицині такі препарати використовуються вкрай рідко (Sewoyo et al., 2023).

За оцінкою Kimura et al. (2022) експресія VEGF, VEGFR-2 і pVEGFR-2 була вищою в епітеліальних пухлинах, порівняно із мезенхімальними ($p < 0,01$), що свідчить про зв'язок сигнального шляху фактора росту судинного ендотелію з проліферацією ракових клітин.

За даними Al-Dissi et al. (2007) за новоутворень МЗ присутня помірна кореляція: між VEGF і гістологічним ступенем ($p = 0,43$), VEGFR-2 і гістологічним ступенем ($p = 0,47$), VEGF і VEGFR-2 та індексом проліферації ($p = 0,47$). Одночасна експресія VEGF і VEGFR-2 на пухлинних клітинах може вказувати на те, що VEGF має аутокринну функцію, завдяки якій фактор росту судин стимулює проліферацію пухлинних клітин. До того ж, VEGF також може зменшити апоптоз пухлини, індукувати експресію ММП-9 раковими клітинами та сприяти їх міграції через базальну мембрану (Dias et al., 2000).

Встановлене посилення експресії VEGF і матриксних металопротеїназ-9 пояснюється наявністю аутокринної петлі, яка приймає участь у виживанні ракових клітин та зростанні пухлини МЗ, а також зв'язком між активацією ендотеліальних клітин і білків, що розкладають матрикс (Santos et al., 2016). При цьому автори також не виявили залежності імунореактивності VEGF і VEGFR-2 від загальної виживаності та тривалості періоду без захворювання,

хоча і розглядають інгібування експресії VEGF як потенційний напрямок лікування неоплазій МЗ. Сильна експресія VEGF, яка може сприяти високому ангиогенному фенотипу пухлин МЗ, локальному і системному метастазуванню цих новоутворень, продемонстрована Millanta et al. (2010).

За запальної карциноми МЗ собаки Samacho et al. (2014) встановили високий рівень з VEGF-D і VEGFR-3, який пов'язаний із високою експресією циклооксигенази-2. Тобто, підвищення експресії судинного фактору стимулює ріст неоплазії через посилення запальної реакції.

З експресією VEGF достовірно корелювали гістологічно визначена венозна інвазія ракових клітин ($p=0,039$) і метастази в лімфатичних вузлах ($p=0,049$). Рівень виживаності після хірургічного втручання був кращим у пацієнтів без експресії VEGF ($p<0,05$), а віддалені метастази після операції часто спостерігалися у пацієнтів з експресією VEGF ($p=0,023$).

Наші результати щодо достовірно вищого рівня експресії VEGF при злоякісних неоплазіях МЗ, порівняно із доброякісними, узгоджуються із даними, опублікованими Ipek & Kaplan (2023).

Встановлений зв'язок маркера проліферації Ki-67 із розвитком неоплазій МЗ підтверджується публікаціями ряду дослідників. Експресія Ki-67 була значно вищою за протокової карциноми *in situ* (DCIS) високого ступеня, порівняно із атиповою протоковою гіперплазією (ADH) або DCIS низького ступеня (Antuofermo et al., 2007).

Neumann et al. (2017) також повідомляють про позитивний вплив на рівень Ki-67 ступеня злоякісності новоутворення: злоякісні типи демонстрували значно підвищені концентрації Ki-67 у сироватці ($p<0,001$), порівняно зі здоровими або доброякісними неоплазіями МЗ на тлі відсутності впливу розміру пухлини на концентрацію Ki-67 у сироватці крові ($p>0,05$). Достовірну вищу експресію VEGF у неоплазіях МЗ, порівняно із нормальною тканиною ($p<0,01$), а також відсутність її зв'язку із віком собаки і розміром вогнища підтверджують Qiu et al. (2008). Проте, автори вказують на кореляцію рівня VEGF із метастазами в лімфатичних вузлах і клінічною стадією ($p<0,05$).

Pauly et al. (2024) зазначають відсутність статистично достовірної різниці рівнів Ki-67 і VEGFR-2 в межах злоякісних типів новоутворень, а також клінічних стадій.

Наші результати узгоджуються з даними Lim et al. (2022) відносно вищої ($p < 0,005$) експресії Ki-67 в онкохворих собак, які мали надлишкову масу тіла, яка вказує, що ожиріння може впливати на розвиток і прогресування раку МЗ, пов'язане з вищим гістологічним ступенем, більшою інфільтрацією пухлино-асоційованими макрофагами і посиленням неоангіогенезу пухлини.

Експресія Ki-67 у собак із новоутвореннями МЗ патогенетично пов'язана із гемостазіологічними механізмами, про що свідчить кореляція його рівня із фактором фон Віллебранда (Madej et al., 2013; Sennazli et al., 2015).

Отримані результати клінічного застосування у метрономному режимі циклофосфаміду та метформіну вказують на необхідність додаткового вивчення перспективних напрямків лікування сук із неоплазіями МЗ, які будуть враховувати хронічне запалення, обумовлене високим індексом маси тіла та ожирінням, на що вказує робота Liu et al. (2022). Наразі ожиріння як етіологічний чинник у практичній діяльності ветеринарних онкологів і хірургів не враховується. Завдяки багатообіцяючим клінічним дослідженням очікується, що метрономні хімотерапевтичні протоколи у поєднанні з іншими методами лікування посилять переваги цієї стратегії та обґрунтують її широке застосування в клінічній практиці.

Aresu et al. (2011) відзначають наявність активної форми ММП-9 у плазмі всіх онкохворих собак (на відміну від ММП-2), акцентують увагу на тому, що ММП-2 та -9 синтезуються як епітеліальними раковими клітинами, так і в стромальній складовій пухлин (асоційованими з раком фібробластами). При цьому інтенсивність фарбування ММП-2, виявлена у 94 % зразків карцином була сильнішою, порівняно із аденомою, яка демонструвала експресію в 17 % випадків.

Визначене посилення експресії ММП-2 Nagase (1997) обґрунтовує її стимуляцією факторами: росту ендотелію судин (VEGF) і некрозу пухлини

альфа (TNF- α), а також інтерлейкіном-1 (IL-1) і простагландином (PG). Крім неоплазійних та стромальних клітин, іншими основними джерелами експресії ММП-2 є нормальні фібробласти, ММП-9 – нормальні фібробласти, судинні перицити, а також тучні клітини, моноцити-макрофаги та лейкоцити, які інфільтрують новоутворення (Khaki, 2021).

Наші результати узгоджуються із опублікованими Khaki (2023) даними, згідно яким рівні pro-ММП-2 у сук за злоякісних пухлин МЗ достовірно перевищували (в середньому у два рази) відповідні показники у собак із доброякісними і клінічно здоровими тваринами. Крім того, автори звертають увагу на суттєве підвищення експресії pro-ММП-9 через 12 місяців після хірургічного втручання (порівняно із іншими періодами спостереження) за розвитку рецидивів та/або метастазів, наявність активної ММП-2 лише у злоякісних (насамперед, метастатичними) новоутвореннях та прогностичне значення стосовно ризику прогресування захворювання ММП-9 (особливо в зразках через 4 та 12 місяців після операції).

При вивченні рівня желатиназ та інтенсивності проліферації ракових клітин Nowak et al. (2015) не виявили достовірної різниці експресії ММП-2 і Ki-67 залежно від наявності метастатичних вогнищ, аргументуючи такі результати недостатньою кількістю оцінених клінічних випадків. За наявності метастазів новоутворення МЗ продемонстрували експресію ММП-2 в 85 %, Ki-67–65 % зразків, метастатичні – в 100 та 91 % випадків, відповідно. Середні показники експресії Ki-67 до появи метастазів становили $1,1 \pm 0,94$, за виникнення метастазів – $1,5 \pm 0,90$ ($p=0,22$), ММП-2 – $2,9 \pm 1,9$ проти $2,7 \pm 2,4$ ($p=0,50$). Інші результати отримали Nowak et al. (2008; 2023), якими відзначена експресія ММП-9 у 83 %, тоді як Ki-67 – лише у 26 % зразків на тлі позитивної кореляція ($r=0,375$) між експресіями ММП-9 і Ki-67.

Результати дисертаційної роботи доповнюють інформацію Loukouroulos et al. (2003), які вперше продемонстрували зв'язок експресії ММП із типом і ступенем пухлин МЗ, а також довели діагностичну перевагу зимографії перед імуногістохімією. Вони, зокрема, виявили високі рівні як неактивних (pro-

ММП), так і активних форм ММП у більшості неоплазій, довели наявність вищої експресії ММП у новоутвореннях, порівняно із передпухлинними станами; зляжкісних типах, відносно доброякісних; в саркомах порівняно із карциномами.

Аналогічні результати отримано Shia et al. (2011), які встановили, що рівні ММП-2 і -9 пов'язані зі зляжкісністю пухлини МЗ, а активність ММП-9 у плазмі крові може стати потенційним маркером як у подальшому спостереженні, так і в прогнозі перебігу захворювання у сук із раком МЗ. Зокрема, плазмові рівні ММП-2 і -9 були достовірно вищими у неоплазії, порівняно із нормальною тканиною МЗ ($p < 0,05$); у зляжкісних, ніж доброякісних новоутвореннях ($p = 0,15$; $p < 0,01$, відповідно) і мастопатії ($p < 0,05$; $p = 0,54$, відповідно). Крім того, встановлена кореляція рівнів ММП-9 у плазмі і пухлинній тканині ($r = 0,78$, $p = 0,02$). Зазначені результати можуть вказувати на те, що спонтанні зляжкісні пухлини молочної залози у собак мають більш агресивний характер, ніж доброякісні гістологічні типи та фіброзно-кістозна хвороба МЗ (Kawai et al., 2006).

Таким чином, останнім часом ММП, зокрема желатинази ММП-2 і ММП-9, зазвичай розглядаються як онкомаркери для клінічного застосування. Підвищення рівня желатинази в пухлинній тканині та сироватці пов'язане із запаленням та агресивністю пухлини, і тому його слід використовувати для прогнозування метастазування або рецидиву пухлини в поєднанні з гістопатологічними результатами (Miya et al., 2005). Згідно з отриманими даними, було б доцільно використовувати їх визначення перед хірургічним лікуванням з метою прогнозування поведінки новоутворення (Fathipour et al., 2018). Подібно нашому заключенню, Zhang et al. (2007) розглядають високий рівень експресії ММП-2 та -9 за неоплазій МЗ у собак як несприятливий прогностичний фактор.

Визначені моніторингові показники рівня захворюваності, фактори ризику, діагностичні маркери доповнюють результати скринінгу раку МЗ (у тому числі рівень і коефіцієнт захворюваності на зляжкісні пухлини) у сук,

прогностичні і діагностичні критерії, продемонстровані ведучими науковцями (Valdivia et al., 2021; Dhein et al., 2024).

Наш висновок щодо важливості для досягнення оптимальних результатів лікування собак із пухлинами МЗ раннього виявлення та хірургічного втручання на початкових стадіях захворювання відповідає загальноприйнятій стратегії (Jing et al., 2024).

Згідно Tran et al. (2016), незалежними предикторами медіани часу виживання (MST) були клінічна стадія, лімфатична інвазія (за наявності неоплазійних емболів у лімфатичних судинах становила 179 днів, відсутності – 1098 днів), виразка (за наявності – 118 днів, відсутності – 443 дні) та хірургічні краї (неповне висічення – 70 днів, повне – 872 днів). Повне висічення новоутворення в межах хірургічних кордонів за 1–3 клінічної стадії забезпечувало MST – 1098 днів, неповне – 68 днів. За наявності лімфоінвазії показники MST знижувались до 347 та 70 днів, відповідно. У тварин із 4 клінічною стадією захворювання ад'ювантна хімотерапія не спричинювала покращення MST, яке не перевищувало 228 днів.

Враховуючи важливу роль в канцерогенезі судинної інвазії ракових клітин, підвищену увагу слід приділяти контролю регіонарних лімфатичних шляхів і картуванню сторожових лімфатичних вузлів. Важливість оцінки регіонарних лімфатичних вузлів для кількісного визначення метастатичного поширення неоплазії добре визнана у ветеринарії, однак забір правильного лімфатичного вузла може бути неможливим без картування «сторожових» лімфатичних вузлів. Використані нами методики передопераційного фарбування регіонарних лімфатичних вузлів, з метою їх візуалізації перед екстирпацією, широко використовуються за кордоном (Beer et al., 2018; 2023). Застосування барвників (патентованого синього або метиленового синього, із розрахунку 2 мг/кг), введених внутрішньошкірно в перинеопластичні тканини, рекомендоване для полегшення ідентифікації регіонарних лімфатичних вузлів, на додаток до мінімізації хірургічних розрізів, особливо для оцінки пахвового лімфатичного вузла (Pinheiro et al., 2003; Worley, 2014).

На відміну від наших результатів, Gupta et al. (2014) не було встановлено достовірної різниці середніх термінів виживання та виживаності після мастектомії залежно від хірургічної техніки, а також зрушень гематологічних і біохімічних показників. Найбільш ефективним рекомендований лікувальний протокол виявився за використання у тварин до 8-річного віку. Курс хіміотерапії ми рекомендуємо проводити через 7–10 днів після операції, Gupta et al. (2014) – через 15 днів.

Наша оцінка стосовно того, що хірургічне висічення в поєднанні з хіміотерапією циклофосфамідом є ефективним протоколом для лікування злоякісних пухлин МЗ у сук з мінімальною токсичністю на тлі підвищення якості життя та виживання пацієнтів, узгоджується із Suryawansh (2021).

На відміну від негативного досвіду ад'ювантного застосування у метрорномному режимі на тлі хірургічного лікування новоутворень МЗ таких деяких хіміотерапевтичних засобів, як доксорубіцин і доцетакселу (Simon et al., 2006), ми можемо об'єктивно стверджувати про покращення результатів за рахунок призначення циклофосфаміду.

Bracha et al. (2014) також відзначають невисоку токсичність циклофосфаміду, яка найбільш часто (у 47 % випадків) характеризувалась анемією від легкого до помірного ступеня, а також відсутність нейтропенії, тромбоцитопенії і значної мієлосупресивної дії, що свідчить про можливість комбінованої терапії з іншими фармакологічними засобами, зокрема цитотоксичними хіміопрепаратами.

Cunha et al. (2017) за використання у сук із новоутвореннями МЗ циклофосфаміду серед найбільш частих побічних ефектів діагностували нейтропенію (22 %), блювоту (21 %), діарею (20 %), відсутність апетиту (20 %). Вони підтвердили, що циклофосфамід відноситься до хіміотерапевтичних засобів, застосування яких частіше супроводжується розладами функціонування шлунково-кишкового тракту, ніж токсичними гематологічними ефектами.

Багатообіцяючим напрямком, альтернативним традиційній

протипухлинній терапії за новоутворень МЗ, є метрономний режим хіміотерапії, який має потенціал для подолання таких обмежень, як токсичність і резистентність ракових клітин до лікарських засобів. У гуманній медицині в складі комплексних протоколів метрономна хіміотерапія продемонструвала ефективність щодо різних підтипів злоякісних пухлин МЗ, що найбільш актуально за потрійного негативного раку (Guarini et al., 2024).

У прогресуванні та агресивності злоякісних новоутворень МЗ вирішальна роль належить стромі, формування якої залежить від інфільтрації стромальних клітин, таких як асоційовані з карциномою фібробласти (CAF), пухлинно-асоційовані макрофаги (TAM), супресорні клітини мієлоїдного походження (MDSC), і секретії паракринних факторів. Метрономний режим, на відміну від стандартної хіміотерапії, не спричинює змін стромі, які призводять до розвитку резистентності мікросередовища та слабкій терапевтичній відповіді (Chan et al., 2016).

Висока ефективність запропонованого лікувального протоколу на тлі незначної частоти та ступеня вираження побічних ефектів, ймовірно, обумовлена тим, що метрономна хіміотерапія сприяє контролю захворювання у пацієнтів із раком молочної залози на пізній стадії з меншою частотою побічних ефектів, порівняно зі загальноприйнятою хіміотерапією з максимальною переносимою дозою. Циклофосфамід відноситься до препаратів, які добре переносяться, що пов'язано з його мінімальною кумулятивною токсичністю (Munzone & Colleoni, 2015). Крім того, важливим аспектом метрономної терапії циклофосфамідом та метформіном є можливість їх перорального використання та низька вартість.

Дозування циклофосфаміду в різних схемах метрономної терапії в онкохворих собак має значну варіабельність: від 7 до 25 мг/м² (London et al., 2015; Finotello et al., 2017; Rasmussen et al., 2017). Останні дослідження показали, що добові дози 12,5 мг/м² та вищі мають як імуномодулюючу, так і антиангіогенну дію (Gaspar et al., 2018). У ветеринарній медицині показано позитивні результати використання метформіну у поєднанні із деякими

хіміотерапевтичними засобами, зокрема доксорубіцином (Duque et al., 2012). При цьому дані щодо можливості поєднання циклофосфаміду і метформіну представлені поодинокими публікаціями. Тому доведена ефективність такої комбінації є важливим доповненням до лікувальних протоколів, які наразі рекомендовані у собак за неоплазій МЗ.

Результати позитивного клінічного досвіду використання циклофосфаміду і метформіну узгоджуються із протипухлинною їх дією на лабораторних тваринах. Отриманий протипухлинний ефект метформіну підтверджується даними Rizvi et al. (2021), які продемонстрували гальмування прогресування новоутворень МЗ (зниження швидкості росту неоплазії та її маси, $p < 0,001$). Zaki et al. (2024) на моделі аденокарциноми МЗ у мишей довели терапевтичні переваги комбінованого метрономного застосування циклофосфаміду та метформіну з низьким токсичним ефектом, досягнуті за рахунок потенціювання їх дії та пошкодження ДНК ракових клітин. Одночасно констатували збільшення кількості лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, і посилення експресії гранзиму В.

Низький токсичний ефект ад'ювантної терапії циклофосфамідом та метформіном узгоджується із інформацією щодо зниження прояву таких побічних ефектів, як анемія та мієлосупресія (Fares et al., 2020).

Одним із механізмів, які обумовлюють підвищення ефективності лікування собак із пухлинами МЗ за використання метформіну, є пригнічення неоангіогенезу шляхом впливу на експресію факторів росту/ангіогенних інгібіторів у $CD34^+$ клітинах за умов стану гіперглікемії–гіпоксії. Подвійний ефект метформіну за гіперглікемії та гіпоксії опосередковується прямим впливом на VEGFR-1/R-2, що призводить до активації клітинної міграції через регуляцію MMP16 і ROCK1, і пригнічення апоптозу шляхом збільшення фосфо-ERK1/2 і FABP4, компонентів сигналізації VEGF каскаду (Bakhashab et al., 2018).

В гуманній медицині доцільність застосування за відсутності порушень обміну глюкози в організмі обґрунтовується результатами

клінічних досліджень, згідно яким у хворих на цукровий діабет, за призначення метформіну, менша ймовірність розвитку судинних ускладнень, незалежно від контролю глікемії. Метформін має значний потенціал для лікування судинної дисфункції та ангіогенезу пухлини за нормального рівня глюкози. Продемонстровано значну різноманітність судинних ефектів метформіну за патологічних станів, не пов'язаних із діабетом. Нормалізація судинної дисфункції, як нова терапевтична стратегія, може забезпечити кращу доставку протипухлинних агентів до неоплазії та оточуючих їх тканин (Kannarkatt et al., 2016).

Kurelac et al. (2020) пояснюють протипухлинні ефекти метформіну його впливом на мікрооточення новоутворень. Неоплазія являє собою складний механізм, за якого відбувається взаємодія ракових клітин із оточуючими непухлинними клітинами. Окремі публікації доводять, що метформін може впливати на прогресування раку шляхом модуляції фенотипу нетрансформованих клітин у пухлині та її мікрооточенні.

Опосередковане пухлиною перепрограмування мікро- та макрооточення може варіювати від індукції цитокінів і факторів росту до стимуляції навколишніх стромальних клітин для синтезу багатих енергією катаболітів, стимулюючи виживання і проліферацію неоплазійних клітин. Тому, плейотропні ефекти метформіну, спрямовані на продукцію і використання клітинної енергії та міжклітинні і гормональні взаємодії вказують на його можливе використання для перепрограмування «екосистеми» злякисних новоутворень (Lee et al., 2018).

Як ймовірний механізм протипухлинної дії метрономної терапії описано прямий вплив на пухлинні клітини, включаючи націлювання на ракові стовбурові клітини (РСК). Крім того, схеми метрономної хіміотерапії мінімізують або навіть усувають проблему індукованих хіміотерапією реакцій організму, які можуть вторинно сприяти росту пухлини та злякисності після того, як викликають початкову та сприятливу протипухлинну відповідь (Kerbel & Shaked, 2017; Scharovsky et al., 2020). Метрономна хіміотерапія

запобігає мобілізації циркулюючих ендотеліальних клітин-попередників (CEP) та забезпечує інгібування росту пухлини, тоді як загальноприйнята хіміотерапія чинить протилежні ефекти (Kim & Kim, 2019).

Ефективність низьких доз циклофосфаміду, насамперед, обумовлена його здатністю сприяти розвитку протипухлинного імунітету шляхом вибіркового виснаження регуляторних і посилення ефекторних функцій Т-клітин. Порівняно з ефекторними Т-клітинами (представляють собою індуковані цитокінами клітини-кілери), регуляторні Т-клітини мають метаболічні адаптації, що робить їх більш чутливими до опосередкованої циклофосфамідом цитотоксичності (Madondo et al., 2016).

Вважається, що протипухлинна дія метформіну здійснюється через прямі та опосередковані механізми. Прямий вплив на ракові клітини відбувається за рахунок активації АМФК та секреції білка p53 (транскрипційного фактора, який регулює клітинний цикл), а також інгібуванням mTORC (серин/треонін (Ser/Thr)-протеїнкінази, яка зазвичай активується за умов наявності поживних речовин) та сигнального шляху ROS-JNK/c-Jun (обумовлює загибель клітин, опосередковану ініціацією N-кінцевої кінази c-Jun (JNK) активними формами кисню (ROS)). Опосередковані механізми включають оптимізацію метаболізму глюкози і ліпідів, інгібування пухлино-асоційованого запалення та вплив на мікрооточення неоплазії (Shen & Liu, 2006; Zhang et al., 2019; Karadeniz et al., 2020; Yenmis et al., 2021).

Wang et al. (2019) вказують інші шляхи впливу метформіна на онкогенез. Зменшення ризику метастазів та покращення хемосенсибілізації були опосередковані судинними ефектами метформіну. Зниження регуляції тромбоцитарного фактора росту В (PDGF-B) значною мірою сприяло нормалізації судин, спричиненій метформіном.

Знижуючи пухлинний PDGF-B, метформін пригнічує надмірний ангиогенез і покращує зрілість і функціональність судин. Нормалізована судинна стінка мала більшу кількість клітин і кращу структуру базальної мембрани (Maes et al., 2014). Оскільки структура визначає функцію,

покращена зрілість судин призводить до збільшення кровопостачання пухлин, що дозволяє доставляти більше хіміопрепаратів або терапевтичних частинок у пухлини (Jiang et al., 2015).

Нормалізація рівня глюкози у крові найбільш актуальна для сук із високим індексом маси тіла та ожирінням, що було встановлено нашими дослідженнями у 35 тварин. Позитивний ефект за використання у таких пацієнтів метформіну обумовлений наступними фактами. Гіперглікемія сприяє проліферації та міграції ракових клітин із формуванням віддалених метастазів. Високий рівень глюкози приймає участь в ремоделюванні пов'язаних із раком сигнальних шляхів за допомогою метаболітів. Зокрема, посилення глюкозою сигнального шляху WNT/ β -катенін в ракових клітинах сприяє проліферації, виживанню та обходу старіння та являє собою раніше нерозпізнаний прямий механізм, що зв'язує гіперглікемію і рак. Підвищене поглинання глюкози пухлинними клітинами забезпечує посилену передачу сигналів WNT для безперервної проліферації. Високий рівень глюкози призводить до дисбалансу ацетилювання – ацетилювання β -катеніну в лізині K354, необхідного для ядерного накопичення та транскрипційної активації генів-мішеней WNT (García-Jiménez et al., 2013; Ryu et al., 2014; Xu et al., 2014).

Метформін знижує рівень глюкози та інсуліноподібного фактора росту, покращує резистентність до інсуліну шляхом інгібування розкладення глікогену і глюконеогенезу печінки, сприяння утилізації глюкози в периферичних тканинах, збільшення кількості і спорідненості інсулінових рецепторів, посилення активності тирозинкінази у м'язовій і жировій тканинах (Li et al., 2019).

Хоча середні показники вмісту холестерину та тригліцеридів при проведенні дослідження не виходили за межі фізіологічної норми, проте в окремих пацієнтів реєстрували підвищення їх вмісту, що свідчило про порушення ліпідного обміну. Тому ад'ювантне призначення метформіну є необхідним, приймаючи до уваги, що дисліпідемія слугує фактором ризику розвитку раку МЗ (Nelson et al., 2014). Ймовірно, дисліпідемія призводить до

підвищення вмісту холестерину в клітинних мембранах, таким чином впливаючи на плинність мембран і подальшу передачу сигналів. Крім того, метаболіт 27-гідроксихолестерин (27НС) володіє естрогенподібними властивостями, посилюючи проліферацію ракових клітин у МЗ, позитивних до естрогенний рецептор (ER) (Brindisi et al., 2020).

Хронічне запалення пов'язано із різними етапами виникнення та розвитку неоплазійного процесу, включаючи трансформацію нормальних клітин в пухлинні, їх подальшу проліферацію, інвазію, а також ангиогенез і метастазування (Danforth, 2021). Клінічні дослідження показали, що метформін не тільки знижує хронічне запалення за рахунок нормалізації метаболічних механізмів, таких як гіперглікемія, резистентність до інсуліну та атерогенна дисліпідемія, але також має пряму протизапальну дію. Метформін пригнічує запальну реакцію шляхом інгібування ядерного фактора κВ (NFκB) через АМР-активовану протеїнкіназу (АМПК)-залежні та незалежні шляхи за рахунок чого стимулюється ріст, проліферація, а також інвазія ракових клітин (Saisho, 2015). Крім того, метформін інгібує спричинене новоутворенням запалення шляхом гальмування інфільтрації пухлин-асоційованих макрофагів та шляху COX2/PGE2 (циклооксигеназа-2/простагландин E2), тим самим попереджуючи прогресування захворювання (Shi et al., 2021).

Метформін демонструє помітне зниження проліферації, інвазії, міграції та адгезії на тлі значного посилення апоптозу, що супроводжується пригніченням експресії матриксних металопротеїназ-2 і -9. Це свідчить про потенційну ефективність метформіну проти раку МЗ, опосередковану через сигнальний шлях STAT3 та інтерлейкіни-6 і -7 (Song et al., 2023). STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) – перетворювач сигналу та активатор транскрипції 3, є транскрипційним фактором для передачі сигналів цитокінів, який конститутивно активується при багатьох видах раку. Цей білок опосередковує експресію генів у відповідь на клітинні стимули, і, таким чином, відіграє ключову роль у багатьох клітинних процесах, таких як клітинний ріст і апоптоз (Ma et al., 2020).

Тривале застосування метформіну не спричинювало побічних ефектів на тлі позитивного клінічного ефекту, який можна пояснити пригніченням мітохондріального дихального комплексу I (Ekström et al., 2012). У сук, яким призначали метформін, не було встановлено важкий ступінь лактоацидозу (накопичення в організмі лактату із зниженням рівня рН крові) і гіпоглікемію, як прояв гострої інтоксикації препаратом. Гіпоглікемія та лактоацидоз є рідкісними ускладненнями за застосування метформіну у людей. Оскільки метформін зазвичай не використовується у ветеринарії, серйозні побічні ефекти, пов'язані з його впливом на організм, невідомі (Barrella et al., 2017). Ueda et al. (2018) описують один такий випадок, але акцентують увагу на тому, у ветеринарній медицині такі побічні ефекти метформіну не описані.

Питання таких ускладнень у тварин залишається дискусійним. Наразі відсутні опубліковані результати досліджень, які б оцінювали тривалість гіперлактатемії, концентрацію метформіну та рівень смертності. Оскільки в клінічній практиці немає чіткого причинного впливу концентрації метформіну на концентрацію лактату, лактоацидоз, про який повідомляють у цих пацієнтів, може бути зовсім не спричинений метформіном. Зокрема, терапія метформіном не обов'язково викликає його накопичення, так само як накопичення метформіну не обов'язково спричинює гіперлактатемію, а гіперлактатемія не обов'язково викликає лактоацидоз (Lalau et al., 2017).

Циклофосфамід є відомим протипухлинним та імуносупресивним засобом, який стає ефективним після метаболічної активації в печінці. Його широке клінічне застосування наразі обмежене токсичними ефектами. Нещодавно було показано, що кардіотоксичність є фактором, що обмежує дозу під час терапії циклофосфамідом. Хоча механізм індукованої циклофосфамідом кардіотоксичності не повністю зрозумілий, вважається, що він охоплює окиснювальний і нітративний стрес (Ayza et al., 2020). Частота кардіотоксичності у людей за доз, які перевищують 120-150 мг/кг становить 8-20% у дорослих і 5% – у дітей. Ймовірність серцевої недостатності після високих доз циклофосфаміду коливається в межах від 5 до 29 % (Kamel et al.,

2022).

При цьому, призначення метформіну, крім протипухлинного ефекту, буде послаблювати електричне та структурне ремоделювання передсердя, покращувати метаболізм ліпідів та усувати ефект Варбурга (Liu et al., 2020). В основі ефекту Варбурга лежить схильність ракових клітин виробляти енергію за рахунок надзвичайно активного гліколізу з наступним утворенням молочної кислоти, замість повільного гліколізу та окиснення пірувата у мітохондріях із використанням кисню (Guha et al., 2018). Важливо, що метформін може проявляти антиаритмічну та кардіопротекторну дію в умовах швидкої кардіостимуляції за рахунок послаблення щільного з'єднання через шлях AMPK і зниження рівня P-Src (активна форма протоонкогенної тирозин-протеїнкінази Src) (Li et al., 2020).

Циклофосфамід характеризується вираженими нефротоксичними властивостями, яка супроводжується дегенеративними змінами структури нирок та їх підвищеними функціональними показниками. Відсутність побічних ефектів за лікування собак із пухлинами МЗ, ймовірно, пов'язана із ренопротекторними механізмами метформіну, які сприяють запобіганню дефіциту глутатіону (утворений амінокислотами природний трипептид, який захищає клітини від дії вільних радикалів) і зниженню накопичення активних форм кисню, зменшенню вираженої запальної реакції та апоптозу (Tohamy et al., 2021).

Результати наших клініко-експериментальних досліджень доповнюють і деталізують наявну інформацію щодо лікування собак із пухлинами МЗ, зокрема дані вивчення ефективності хіміотерапії, патогенетичної ролі в онкогенезі VEGF, Ki-67 і MMP на моделях раку МЗ у лабораторних тварин. Проведення порівняльного аналізу ускладнене, тому що абсолютна більшість публікацій відображає дані, отримані на лабораторних тваринах або культурах клітин. Тим не менш, наявна інформація дала можливість об'єктивного обґрунтування отриманих результатів, насамперед, механізму дії метрономної терапії циклофосфамідом і метформіном.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена новому вирішенню проблеми лікування собак, хворих на неоплазії МЗ – клініко-експериментальному обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин МЗ у собак. Доцільність застосування удосконаленого протоколу, який включає оперативне втручання (мастектомію) та метрономну ад'ювантну хіміотерапію циклофосфамідом у поєднанні із перепрофільованим препаратом метформін доведена результатами клінічних (за медіанами виживаності і безрецидивного періоду), імуногістохімічних (за маркерами неоангіогенезу, проліферації й інвазії), біохімічних (динамікою концентрації глюкози, холестерину, тригліцеридів) досліджень у сук із високим і нормальним індексом маси тіла.

1. Серед 1721 обстежених онкохворих собак неоплазії МЗ діагностовано у 862 сук (50,1 %). Частота щорічної (2018-2023 роки) реєстрації спонтанних новоутворень МЗ у сук суттєво не змінюється. Період між первинним виявленням ознак захворювання і наданням спеціалізованої допомоги у більшості випадків (67,1–72,1 %) не перевищує 3 місяці. Найбільш сприйнятливими до пухлин МЗ є німецькі (11,8 %) і східноєвропейські (9,4 %) вівчарки та такси (8 %). Середній вік сук, хворих на неоплазії МЗ становить $9,4 \pm 1,7$ років, збільшення віку супроводжується підвищенням ризику розвитку пухлин МЗ (за максимального рівня захворюваності у віці 9 та 10 років – 16,8 і 16,7 %, відповідно) та ймовірності верифікації злоякісних нозологічних форм (за найвищої їх частки у собак, старших 12 років – 80,4 %). Оваріогістероектомія собак достовірно не впливає на ризик виникнення неоплазій МЗ, які верифіковано у 35,3 % стерилізованих сук.

2. В структурі новоутворень МЗ у сук (862 випадків) частка доброякісних пухлин становить 45,2 % (390 тварин), злоякісних – 54,8 % (472 собаки). Серед 472 випадків злоякісних неоплазій МЗ, I клінічну стадію діагностовано у 47, II – 151, III – 184, IV – 90 сук. Доброякісні новоутворення МЗ найбільш часто

представлені доброякісною змішаною пухлиною ($47,9 \pm 5,4$ %) і комплексною аденомою ($24,4 \pm 2,5$ %), зляжкісні – епітеліальними неоплазіями ($62,7 \pm 7,1$ %) і епітеліальними пухлинами спеціальних типів ($23,9 \pm 6,2$ %). В структурі зляжкісних новоутворень епітеліального походження переважають карциноми: комплексного типу (13,1 %), тубулярна (12 %), змішаного типу (11,7 %), спеціальних типів – муциозна (25,8 %) і секреторна (20 %) карциноми, сарком – карциносаркоми (39,1 %) і фібросаркоми (34,8 %). У більшості випадків ($38,2$ – $42,1$ %) зляжкісні неоплазії МЗ відносяться до III стадії захворювання. Найчастіше у гістопатологічних зразках пухлин МЗ клінічних стадій III та IV верифікується інвазія ракових клітин в кровоносні ($36,2$ – $51,7$ % та $45,5$ – $70,6$ %, відповідно) і лімфатичні ($33,3$ – $41,4$ % та 51 – $59,1$ %, відповідно) судини, а також формування метастатичних осередків в лімфатичних вузлах ($14,9$ – $20,7$ % та $35,3$ – $40,9$ %, відповідно).

3. Неоплазійні ураження МЗ супроводжуються зниженням концентрації гемоглобіну і гематокриту (в 1,3 раза, $p < 0,001$) та вмісту еритроцитів (в 1,8 раза, $p < 0,001$); підвищенням рівня тромбоцитів (в 1,5 рази, $p < 0,001$) і середнього показника ШОЕ (в 3 рази, $p < 0,001$); за нормального рівня лейкоцитів – зменшення кількості лімфоцитів (в 1,3 раза, $p < 0,001$) на тлі збільшення – паличкоядерних (в 1,2 раза, $p < 0,01$) та сегментоядерних (в 1,3 раза, $p < 0,01$) нейтрофілів. У сук із пухлинами МЗ реєструється підвищення загального білірубину (в 1,6 раза, $p < 0,001$), неорганічного фосфору (в 1,3 раза, $p < 0,001$) та активності лужної фосфатази (в 1,3–1,5 раза, $p < 0,001$). За високого індексу маси тіла в онкохворих собак в 1,2 раза збільшується вміст тригліцеридів і глюкози ($p < 0,01$), 1,3 раза – холестерину ($p < 0,01$); у клінічно здорових тварин – в 1,3 раза концентрації холестерину і тригліцеридів ($p < 0,01$).

4. Частка зляжкісних пухлин МЗ, за яких встановлено високий рівень експресії ММП-2 і -9 у плазмі та неоплазійній тканині більша, відносно доброякісних новоутворень, в $9,2$ – $11,0$ ($32,93$ – $63,47$ % проти $3,80$ – $6,33$ %) та $6,5$ – $7,2$ ($32,93$ – $63,47$ % проти $5,06$ – $8,86$ %) раза, відповідно. Активність латентних та активних форм ММП в плазмі крові за зляжкісних неоплазій МЗ

вища ($p < 0,001$), порівняно із клінічно здоровими собаками і доброякісними новоутвореннями: pro-MMP-2 – в 4,2–4,8 і 2,2–2,5; pro-MMP-9 – в 3,3–3,9 і 1,9–2,3; MMP-2 – в 2,6–4,1 і 2,2–3,4; MMP-9 – в 2,7–3,3 і 2,4–3,0 рази, відповідно. Інтенсивність експресії желатиназ в злоякісній пухлині більша ($p < 0,001$), відносно нормальної тканини в 14,5–18,4 рази, доброякісної неоплазії – 10,3–14,2 рази. Активність MMP-2 і -9 у пухлинній тканині вища ($p < 0,001$), ніж у плазмі крові за доброякісних неоплазій в 2,4 і 3 рази, злоякісних – 8,3–11,2 і 13,8–14,3 рази, відповідно.

5. Інтенсивність експресії VEGF (VEGF-1, VEGF-2) та Ki-67 корелює із клінічною стадією та відображає ступінь агресивності неоплазій. Підвищення стадії захворювання супроводжується збільшенням кількості собак із пухлинами, які характеризуються посилення неоангіогенезу і проліферативної активності. Частка собак із злоякісними пухлинами IV стадії, відносно неоплазій I стадії, які мають високу експресію VEGF, більша в 1,9 рази, VEGF-1 – 2,5 рази, VEGF-2 – 2,2 рази, Ki-67 – 2,1 рази. VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2) мають сильну кореляцію із Ki-67 та помірну – із ангіо-/лімфоінвазією.

6. Ефективність хірургічного лікування сук із новоутвореннями МЗ залежить від клінічної стадії, нозологічної форми судинної інвазії. Порівняно із першою стадією захворювання, медіана виживаності за екстирпації неоплазій другої стадії знижується в 2,1 рази, третьої – в 2,4 рази, відповідно. Медіану виживання ≥ 20 місяців слід прогнозувати за лікування сук із мукозною карциномою (складає 27,0 місяців), карциномою *in situ* (становить 19,8 місяців) і веретеноподібноклітинною карциномою (складає 19,7 місяців). Інвазія пухлинних клітин в кровоносні судини знижує медіану виживання в 2,9 разів, лімфатичні судини – 2,8 рази, метастазування у лімфатичні вузли – в 2,6 рази. За значення $\text{vet-NPI} \geq 4$ медіана виживаності знижується в 1,4 рази.

7. Протокол лікування сук із злоякісними пухлинами молочної залози, який включає мастектомію та метрономну ад'ювантну терапію циклофосфамідом і метформіном, дозволяє подовжити медіану виживання у собак із нормальним індексом маси тіла в 1,3 рази, надмірною масою тіла – в

2,5 раз, безрецидивного періоду – в 1,4 та 2,4 раз, відповідно, за відсутності впливу на концентрацію глюкози у крові. Медіана виживання у тварин за надмірної маси тіла, відносно собак із нормальним індексом маси тіла, більша в 1,3 раз.

ПРАКТИЧНІ ПРОПОЗИЦІЇ

1. Результати клінічних та експериментальних досліджень можуть бути використані у навчальному процесі за програмою підготовки здобувачів другого (магістерського) і третього (освітньо-наукового) рівнів вищої освіти спеціальності 211 – Ветеринарна медицина, викладанні теоретичних і практичних курсів за проведення підвищення кваліфікації, науково-практичних семінарів і тренінгів для практикуючих лікарів ветеринарної медицини, а також в науково-дослідній роботі за підготовки навчальних посібників, методичних рекомендацій, наукових статей, монографій.

2. До комплексної оцінки неоплазій МЗ у сук з метою прогнозування їх біологічної поведінки та контролю ефективності лікування доцільно включати визначення маркерів неоангіогенезу (VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2), проліферації (Ki-67) та ЕМП (ММП-2 і -9) а також враховувати наявність судинної інвазії і метастатичне ураження лімфатичних вузлів за гістопатологічного дослідження патологічного матеріалу.

3. За новоутворень МЗ у сук рекомендовано протокол лікування, який включає наступні етапи:

– електрохірургічне видалення неоплазій молочної залози шляхом унілатеральної або білатеральної (одно- або двоетапної) мастектомії із екстирпацією регіонарних лімфатичних вузлів.

– метрономну ад'ювантну терапію (перорально, один раз на добу протягом 6 місяців) комбінацією лікарських засобів: циклофосфамід у дозі 12,5 мг/м² та метформін у дозі 10 мг/кг.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Білий, Д. Д. (2015). Екологічні аспекти поширеності пухлин молочної залози у дрібних домашніх тварин в умовах Дніпропетровської області. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини*, 30(2), 40–43.
2. Брода, Н. А. (2010). Видові та вікові особливості пухлинних захворювань дрібних домашніх тварин. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 12(44), 24–27.
3. Ганусевич, І. І., Вірко, С. В., & Бурлака, А. П. (2021). Матриксні металопротеїнази-2 та -9 як редокс-залежні маркери метастазування раку молочної залози. *Онкологія*, 23(3), 115–122. <https://doi.org/10.32471/oncology.2663-7928.t-23-3-2021-g.9732>
4. Дмитренко, Н. І., & Шерстюк, Л. М. (2020). Поширеність та лікування патології тканинного росту в собак. *Scientific Progress & Innovations*, 2, 179–186. <https://doi.org/10.31210/visnyk2020.02.22>
5. Зон, Г. А., Івановська, Л. Б., & Доб'я, М. В. (2013). Результати діагностики пухлин собак в м. Суми. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*, 9, 171–174.
6. Івашків, Б. Б., Мисак, А. Р., Хомин, Н. М., & Прицак В.В. (2019). Моніторинг поширення спонтанних неоплазій у собак в умовах м. Львів та в приміській зоні обласного центру. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 2, 97–104.
7. Карташов, М. І., & Тимошенко, О. П. (За ред.) (2010). Ветеринарна клінічна біохімія. Харків: *Еспада*.
8. Касянчик, О. М. (2011). Поширення та структура онкологічних захворювань у собак залежно від породи, статі та віку. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького*, 13(2–1 (48)), 112–116.
9. Коваленко, М. С. (2020). Гістологічна діагностика новоутворень молочної залози у сук. У І. В. Кирпичова, Л. І. Пархоменко, С. М. Мічківський,

А. М. Поляков, Д. С. Сопов, С. В. Цвяткова, Д. Г. Руднік (Ред.), *Актуальні проблеми та наукові звершення молоді на початку третього тисячоліття* (357–359). Луганський національний аграрний університет.

10. Коваленко, М. С. & Білий, Д. Д. (2021) Імуногістохімічна характеристика злоякісних пухлин молочної залози у сук. У О.А. Шуст, О.М. Варченко, С.В. Мерзлов, Т.М. Димань, В.В. Сахнюк, Р.В. Шаганенко, І.О. Ластовська, О.Г. Олешко (Ред.), *Сучасний розвиток ветеринарної медицини* (50–52). Білоцерківський національний аграрний університет.

11. Коваленко, М. С. & Білий, Д. Д. (2022) Ефективність хіміотерапії ендоксаном у сук за новоутворень молочної залози. У М. І. Цвіліховський, С. І. Голопура, Н. Г. Грушанська, П. В. Шарандак, Т. В. Немова, Т. А. Палюх (Ред.), «Єдине здоров'я–2022» (89–91). Національний університет біоресурсів і природокористування України.

12. Лещова, М. О., Шулешко, О. О., & Балчухов, В. О. (2018). Поширення і структура новоутворень тварин у місті Дніпро. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 6(2), 30–37.

13. Ляшенко Ю. В., Самойлюк В. В., Козій М. С., & Куцак Р. С. (2007). Спосіб експрес-діагностики новоутворень м'ясоїдних. Патент України на корисну модель № 20234. Опубліковано 15.01.2007, Бюл. № 1, А61D 7/00. u200607930

14. Мисак, А. Р., & Прицак, В. В. (2015). Ефективність застосування ад'ювантної хіміотерапії за лікування злоякісних пухлин молочної залози у сук. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 17(1-1 (61)), 115–121.

15. Михайленко, Н. И., & Войцехович, Д. В. (2017). Органна локалізація пухлин у дрібних тварин різних видів. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 19(77), 162–165.

16. Шевцова А.І., Гордієнко Ю.А., Шаульська О.Е., Скоромна А.С. Пат. на корисну модель 83196, МПК G01N33/49, G01N27/26, G01N33/84,

G01N33/96 / заявн. і власник Державний заклад «Дніпропетровська медична академія» – u201303700; заявлений 26.03.2013; опублікований 27.08.2013, Бюл. № 16

17. Abdelrady, Y. A., Thabet, H. S., & Sayed, A. M. (2024). The future of metronomic chemotherapy: experimental and computational approaches of drug repurposing. *Pharmacological Reports*, 1–20.

18. Akter, A., & Alam, M. (2022). Regional mastectomy for mammary gland tumor in a bitch: A case report. *Veterinary Research Notes*, 2(12), 86–90. <http://doi.org/10.5455/vrn.2022.b19>

19. Al-Dissi, A. N., Haines, D. M., Singh, B., & Kidney, B. A. (2007). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor associated with tumor cell proliferation in canine cutaneous squamous cell carcinomas and trichoepitheliomas. *Veterinary Pathology*, 44(6), 823–830. <https://doi.org/10.1354/vp.44-6-823>

20. Al-Dissi, A. N., Haines, D. M., Singh, B., & Kidney, B. A. (2010). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 51(10), 1109–1114.

21. Alenza, D. P., Rutteman, G. R., Peña, L., Beynen, A. C., & Cuesta, P. (1998). Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of veterinary internal medicine*, 12(3), 132–139. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1998.tb02108.x>

22. Alhowail, A. H., Chigurupati, S., Sajid, S., & Mani, V. (2019). Ameliorative effect of metformin on cyclophosphamide-induced memory impairment in mice. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(21), 9660–9666. https://doi.org/10.26355/eurrev_201911_19460

23. Alonso-Miguel, D., Valdivia, G., García-San José, P., Alonso-Diez, Á., Clares, I., Portero, M., ... & Pérez-Alenza, M. D. (2022). Clinical outcome of dogs diagnosed with canine inflammatory mammary cancer treated with metronomic

cyclophosphamide, a cyclooxygenase-2 inhibitor and toceranib phosphate. *Veterinary and Comparative Oncology*, 20(1), 179–188. <https://doi.org/10.1111/vco.12760>

24. Anadol, E., Yar Saglam, A. S., Gultiken, N., Karakas, K., Alcigir, E., Alkan, H., & Kanca, H. (2017). Expression of iNOS, COX-2 and VEGF in canine mammary tumours and non-neoplastic mammary glands: Association with clinicopathological features and tumour grade. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(3), 382–393. <https://doi.org/10.1556/004.2017.036>

25. Anderson, K. L., Casey, R. A., Cooper, B., Upjohn, M. M., & Christley, R. M. (2023). National Dog Survey: Describing UK Dog and Ownership Demographics. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(6), 1072. <https://doi.org/10.3390/ani13061072>

26. Antuofermo, E., Miller, M. A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S., & Mohammed, S. I. (2007). Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - a model of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16(11), 2247–2256. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0932>

27. Aresu, L., Giantin, M., Morello, E., Vascellari, M., Castagnaro, M., Lopparelli, R., ... & Dacasto, M. (2011). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. *BMC veterinary research*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-33>

28. Ariyathna, H., Aberdein, D., Thomson, N., Gibson, I., & Munday, J. S. (2022). Canine mammary gland disease in New Zealand: a review of samples from 797 dogs. *New Zealand veterinary journal*, 70(2), 95–100. <https://doi.org/10.1080/00480169.2021.2004953>

29. Ayza, M. A., Zewdie, K. A., Tesfaye, B. A., Wondafrash, D. Z., & Berhe, A. H. (2020). The Role of Antioxidants in Ameliorating Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(1), 4965171. <https://doi.org/10.1155/2020/4965171>

30. Bakhashab, S., Ahmed, F., Schulten, H. J., Ahmed, F. W., Glanville, M., Al-Qahtani, M. H., & Weaver, J. U. (2018). Proangiogenic effect of metformin in

endothelial cells is via upregulation of VEGFR1/2 and their signaling under hyperglycemia-hypoxia. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 293. <https://doi.org/10.3390/ijms19010293>

31. Baldwin, K., Bartges, J., Buffington, T., Freeman, L. M., Grabow, M., Legred, J., & Ostwald, D., Jr (2010). AAHA nutritional assessment guidelines for dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(4), 285–296. <https://doi.org/10.5326/0460285>

32. Banchi, P., Morello, E. M., Bertero, A., Ricci, A., & Rota, A. (2022). A retrospective study and survival analysis on bitches with mammary tumours spayed at the same time of mastectomy. *Veterinary and comparative oncology*, 20(1), 172–178. <https://doi.org/10.1111/vco.12759>

33. Barbieri, F., Thellung, S., Ratto, A., Carra, E., Marini, V., Fucile, C., Bajetto, A., Pattarozzi, A., Würth, R., Gatti, M., Campanella, C., Vito, G., Mattioli, F., Pagano, A., Daga, A., Ferrari, A., & Florio, T. (2015). In vitro and in vivo antiproliferative activity of metformin on stem-like cells isolated from spontaneous canine mammary carcinomas: translational implications for human tumors. *BMC cancer*, 15, 228. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1235-8>

34. Barbolosi, D., Ciccolini, J., Meille, C., Elharrar, X., Faivre, C., Lacarelle, B., André, N., & Barlesi, F. (2014). Metronomics chemotherapy: time for computational decision support. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 74(3), 647–652. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2546-1>

35. Barrella, N., Eisenberg, B., & Simpson, S. N. (2017). Hypoglycemia and severe lactic acidosis in a dog following metformin exposure. *Clinical Case Reports*, 5(12), 2097. <https://doi.org/10.1002/ccr3.1255>

36. Baquero, O. S., Chiozzotto, E. N., de Cassia Maria Garcia, R., Amaku, M., & Ferreira, F. (2015). Demographic characteristics of owned dogs and cats of Votorantim, São Paulo State, Brazil. *Ciência Rural*, 45(11), 2039–2043. <https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20141646>

37. Baquero, O. S., Marconcin, S., Rocha, A., & Garcia, R. C. M. (2018). Companion animal demography and population management in Pinhais, Brazil.

Preventive veterinary medicine, 158, 169–177.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.07.006>

38. Beaudu-Lange, C., & Lange, E. (2024). Intensive Multimodal Chemotherapy in a Dog Suffering from Grade III/Stage IV Solid Mammary Carcinoma. *Animals: an open access journal from MDPI*, 14(17), 2618. <https://doi.org/10.3390/ani14172618>

39. Beauvais, W., Cardwell, J. M., & Brodbelt, D. C. (2012). The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs—a systematic review. *The Journal of small animal practice*, 53(6), 314–322. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01220.x>

40. Beer, P., Pozzi, A., Rohrer Bley, C., Bacon, N., Pfammatter, N. S., & Venzin, C. (2018). The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: A comparison with current approaches in human medicine. *Veterinary and comparative oncology*, 16(2), 178–187. <https://doi.org/10.1111/vco.12372>

41. Beer, P., Chiti, L. E., & Nolff, M. C. (2023). The role of sentinel node mapping and lymphadenectomies in veterinary surgical oncology. *Lymphatics*, 1(1), 2–18. <https://doi.org/10.3390/lymphatics1010002>.

42. Bencsik, P., Bartekova, M., Görbe, A., Kiss, K., Pálóczi, J., Radosinska, J., Szűcs, G., & Ferdinandy, P. (2017). MMP Activity Detection in Zymograms. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1626, 53–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_6

43. Benka, V. A., Scarlett, J. M., Sahrman, J., Rieke, K., Briggs, J. R., Ruple, A., Zawistowski, S., Morrison, J. A., Spofford, N., & Romagnoli, S. (2023). Age at gonadectomy, sex, and breed size affect risk of canine overweight and obese outcomes: a retrospective cohort study using data from United States primary care veterinary clinics. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 261(9), 1316–1325. <https://doi.org/10.2460/javma.22.12.0596>

44. Benzekry, S., Pasquier, E., Barbolosi, D., Lacarelle, B., Barlési, F., André, N., & Ciccolini, J. (2015). Metronomic reloaded: Theoretical models

bringing chemotherapy into the era of precision medicine. *Seminars in cancer biology*, 35, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.09.002>

45. Best, M. P., & Fry, D. R. (2013). Incidence of sterile hemorrhagic cystitis in dogs receiving cyclophosphamide orally for three days without concurrent furosemide as part of a chemotherapeutic treatment for lymphoma: 57 cases (2007–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(7), 1025–1029. <https://doi.org/10.2460/javma.243.7.1025>

46. Betz, D., Schoenrock, D., Mischke, R., Baumgärtner, W., & Nolte, I. (2012). Postoperative treatment outcome in canine mammary tumors. Multivariate analysis of the prognostic value of pre- and postoperatively available information. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 40(4), 235–242.

47. Beynen, A. C. (2020). Diet and canine cancer. *Bonny canteen*, 1, 137–148.

48. Biller B. (2014). Metronomic chemotherapy in veterinary patients with cancer: rethinking the targets and strategies of chemotherapy. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 44(5), 817–829. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.05.003>

49. Bilyi, D., & Khomutenko, V. (2024). The influence of dog body conditions on the risk of mastopathy. *Acta Veterinaria Eurasia*, 50(1), 37–46 <https://doi.org/10.5152/actavet.2024.23050>

50. Bilyi, D. D., & Kovalenko, M. S. (2023). Efficacy of metformin treatment for bitches with the mammary gland carcinoma. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 11(2), 21–28. <https://doi.org/10.32819/2023.11009>

51. Brackett C. C. (2010). Clarifying metformin's role and risks in liver dysfunction. *Journal of the American Pharmacists Association: JAPhA*, 50(3), 407–410. <https://doi.org/10.1331/JAPhA.2010.08090>

52. Bracha, S., Walshaw, R., Danton, T., Holland, S., Ruaux, C., & Obradovich, J. (2014). Evaluation of toxicities from combined metronomic and maximal-tolerated dose chemotherapy in dogs with osteosarcoma. *The Journal of small animal practice*, 55(7), 369–374. <https://doi.org/10.1111/jsap.12228>

53. Brindisi, M., Fiorillo, M., Frattaruolo, L., Sotgia, F., Lisanti, M. P., & Cappello, A. R. (2020). Cholesterol and mevalonate: two metabolites involved in breast cancer progression and drug resistance through the ERR α pathway. *Cells*, 9(8), 1819. <https://doi.org/10.3390/cells9081819>
54. Brito-Casillas, Y., Melián, C., Holder, A., Wiebe, J. C., Navarro, A., Quesada-Canales, Ó., Expósito-Montesdeoca, A. B., Catchpole, B., & Wägner, A. M. (2021). Studying the heterogeneous pathogenesis of canine diabetes: Observational characterization of an island population. *Veterinary medicine and science*, 7(4), 1071–1081. <https://doi.org/10.1002/vms3.452>
55. Brønden, L. B., Nielsen, S. S., Toft, N., & Kristensen, A. T. (2010). Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record*, 166(19), 586–590. <https://doi.org/10.1136/vr.b4808>
56. Burton, J. H., Mitchell, L., Thamm, D. H., Dow, S. W., & Biller, B. J. (2011). Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(4), 920–926. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0753.x>
57. Camacho, L., Peña, L., Gil, A. G., Martín-Ruiz, A., Dunner, S., & Illera, J. C. (2014). Immunohistochemical vascular factor expression in canine inflammatory mammary carcinoma. *Veterinary pathology*, 51(4), 737–748. <https://doi.org/10.1177/0300985813503568>
58. Carvalho, M. I., Pires, I., Prada, J., Lobo, L., & Queiroga, F. L. (2016). Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. *Veterinary pathology*, 53(6), 1138–1146. <https://doi.org/10.1177/0300985816646429>
59. Carvalho, P. T., Niza-Ribeiro, J., Amorim, I., Queiroga, F., Severo, M., Ribeiro, A. I., & Pinello, K. (2023). Comparative epidemiological study of breast cancer in humans and canine mammary tumors: insights from Portugal. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. 1271097. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1271097>

60. Carvelli, A., Scaramozzino, P., Iacoponi, F., Condoleo, R., & Della Marta, U. (2020). Size, demography, ownership profiles, and identification rate of the owned dog population in central Italy. *PloS one*, *15*(10), e0240551. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240551>
61. Cassali, G. (2009). Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasms in dogs. *Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress – WSAVA*, 29–34.
62. Cassali, G. D., Jark, P. C., Gamba, C., Damasceno, K. A., Lima, A. E., Nardi, A. B. D., ... & Nakagaki, K. Y. (2020). Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, *2020*, *13*(3), 555–574 <https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574>
63. Cicchelerio, L., Denies, S., Vanderperren, K., Stock, E., Van Brantegem, L., De Rooster, H., & Sanders, N. N. (2017). Immunological, anti-angiogenic and clinical effects of intratumoral interleukin 12 electrogene therapy combined with metronomic cyclophosphamide in dogs with spontaneous cancer: a pilot study. *Cancer Letters*, *400*, 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.015>
64. Chan, T. S., Hsu, C. C., Pai, V. C., Liao, W. Y., Huang, S. S., Tan, K. T., ... & Tsai, K. K. (2016). Metronomic chemotherapy prevents therapy-induced stromal activation and induction of tumor-initiating cells. *Journal of Experimental Medicine*, *213*(13), 2967–2988. <https://doi.org/10.1084/jem.20151665>
65. Chiang, C. F., Villaverde, C., Chang, W. C., Fascetti, A. J., & Larsen, J. A. (2022). Prevalence, risk factors, and disease associations of overweight and obesity in dogs that visited the veterinary medical teaching hospital at the University of California, Davis from January 2006 to December 2015. *Topics in companion animal medicine*, *48*, 100640. <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2022.100640>
66. Childress, M. O. (2012). Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, *42*(1), 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.009>

67. Chocteau, F., Mordelet, V., Dagher, E., Loussouarn, D., Abadie, J., & Nguyen, F. (2021). One-year conditional survival of dogs and cats with invasive mammary carcinomas: A concept inspired from human breast cancer. *Veterinary and comparative oncology*, *19*(1), 140–151. <https://doi.org/10.1111/vco.12655>
68. Chun, J. L., Bang, H. T., Ji, S. Y., Jeong, J. Y., Kim, M., Kim, B., Lee, S. D., Lee, Y. K., Reddy, K. E., & Kim, K. H. (2019). A simple method to evaluate body condition score to maintain the optimal body weight in dogs. *Journal of animal science and technology*, *61*(6), 366–370. <https://doi.org/10.5187/jast.2019.61.6.366>
69. Clancy, E.A., & Rowan, A.N. (2003). Companion animal demographics in the United States: A historical perspective. In D.J. Salem & A.N. Rowan (Eds.), *The state of the animals II: 2003* (pp. 9–26). Washington, DC: Humane Society Press.
70. Cleary, M. P., Grossmann, M. E., & Ray, A. (2010). Effect of obesity on breast cancer development. *Veterinary pathology*, *47*(2), 202–213. <https://doi.org/10.1177/0300985809357753>
71. Cunha, S. C. D. S., Silva, F. B. F., Corgozinho, K. B., Da Silva, K. G. C., & Ferreira, A. M. R. (2017). Adverse effects of chemotherapy in dogs. *World's Veterinary Journal*, *3*, 74–82.
72. Cufi, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Martin-Castillo, B., Joven, J., & Menendez, J. A. (2010). Metformin against TGF β -induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): from cancer stem cells to aging-associated fibrosis. *Cell cycle*, *9*(22), 4461–4468. <https://doi.org/10.4161/cc.9.22.14048>
73. Danforth, D. N. (2021). The role of chronic inflammation in the development of breast cancer. *Cancers*, *13*(15), 3918. <https://doi.org/10.3390/cancers13153918>
74. da Silva, E. M. G., Dos Santos, T. R., & Silva, M. J. B. (2023). Identifying the risk factors for malignant mammary tumors in dogs: A retrospective study. *Veterinary Sciences*, *10*(10), 607. <https://doi.org/10.3390/vetsci10100607>
75. de Araújo, M. R., Campos, L. C., Ferreira, E., & Cassali, G. D. (2015). Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in

Malignant Mammary Tumors of Dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 29(5), 1360–1367. <https://doi.org/10.1111/jvim.13576>

76. Denies, S., Cicchelerio, L., De Rooster, H., Daminet, S., Polis, I., Van de Maele, I., & Sanders, N. N. (2017). Immunological and angiogenic markers during metronomic temozolomide and cyclophosphamide in canine cancer patients. *Veterinary and comparative oncology*, 15(2), 594–605. <https://doi.org/10.1111/vco.12203>

77. Derosa, G., Ferrari, I., D'Angelo, A., Tinelli, C., Salvadeo, S. A. T., Ciccarelli, L., ... & Cicero, A. F. G. (2008). Matrix metalloproteinase-2 and-9 levels in obese patients. *Endothelium*, 15(4), 219–224. <https://doi.org/10.1080/10623320802228815>

78. de Souza, M. C. C., Flecher, M. C., Arrais, F. M., de Sena, B. V., Giuliano, A., & Horta, R. D. S. (2023). Comparison of surgical resection of Axillary Lymph Nodes in Dogs with Mammary Gland Tumors with or without sentinel lymph node visualization with patent blue dye. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1149315. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1149315>

79. Dias, S., Hattori, K., Zhu, Z., Heissig, B., Choy, M., Lane, W., Wu, Y., Chadburn, A., Hyjek, E., Gill, M., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., & Rafii, S. (2000). Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *The Journal of clinical investigation*, 106(4), 511–521. <https://doi.org/10.1172/JCI8978>

80. Diessler, M. E., Castellano, M. C., Portiansky, E. L., Burns, S., & Idiart, J. R. (2017). Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. *Veterinary and comparative oncology*, 15(2), 450–461. <https://doi.org/10.1111/vco.12189>

81. Dhein, E. S., Heikkilä, U., Oevermann, A., Blatter, S., Meier, D., Hartnack, S., & Guscelli, F. (2024). Incidence rates of the most common canine tumors based on data from the Swiss Canine Cancer Registry (2008 to 2020). *PloS one*, 19(4), e0302231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302231>

82. Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., & Wood, J. L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *The Journal of small animal practice*, 43(6), 240–246. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x>

83. Dolka, I., Czopowicz, M., Stopka, D., Wojtkowska, A., Kaszak, I., & Sapieryński, R. (2024). Risk factor analysis and clinicopathological characteristics of female dogs with mammary tumours from a single-center retrospective study in Poland. *Scientific Reports*, 14(1), 5569. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56194-z>

84. do Nascimento-Hama, L. C., Vasconcelos, R. D. O., de Nardi, A. B., de Camargo, A. C. D. A. L., Marchini, L. R., Rocha, F. D. L., ... & Amoroso, L. (2022). Association between vitamin D and malignant mammary tumors in obese female dogs. *Brazilian Journal of Pathology Veterinary*, 15(1): 20–30 <https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v15i1p20-30>

85. Downes, M., Canty, M. J., & More, S. J. (2009). Demography of the pet dog and cat population on the island of Ireland and human factors influencing pet ownership. *Preventive veterinary medicine*, 92(1-2), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.07.005>

86. Duque, J. E., Velez, J., Samudio, I., & Lai, E. (2012). Metformin as a novel component of metronomic chemotherapeutic use: a hypothesis. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 4(3), 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.jecm.2012.04.002>.

87. Egenvall, A., Bonnett, B. N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., & von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive veterinary medicine*, 69(1-2), 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.014>

88. Ekström, N., Schiöler, L., Svensson, A. M., Eeg-Olofsson, K., Jonasson, J. M., Zethelius, B., ... & Gudbjörnsdóttir, S. (2012). Effectiveness and safety of metformin in 51 675 patients with type 2 diabetes and different levels of renal

function: a cohort study from the Swedish National Diabetes Register. *BMJ open*, 2(4), e001076. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001076>

89. Elizabeth Chalco-Torres, L., Atilio Aranguren-Méndez, J., Elizabeth Guerrero-López, A., & Nirchio-Tursellino, M. (2024). Assessment of metronomic chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes from canine mammary cancer patients using the alkaline comet assay. *Revista Científica de la Facultade de Veterinaria*, 34(1). <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e34336>

90. Engdahl, K. S., Brodbelt, D. C., Cameron, C., Church, D. B., Hedhammar, Å., & O'Neill, D. G. (2023). Demography and disorders of English Cocker Spaniels under primary veterinary care in the UK. *Canine medicine and genetics*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40575-023-00128-x>

91. Engin, S., Barut, E. N., Soysal, A. C., Keskin, O., Kerimoglu, G., Kadioglu, M., & Sezen, S. (2021). Double benefit of metformin treatment: improved bladder function in cyclophosphamide-induced cystitis and enhanced cytotoxicity in cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 394(6), 1167–1175. <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02055-9>

92. Evans, B. J., Holt, D. E., Stefanovski, D., & Sorenmo, K. U. (2021). Factors influencing complications following mastectomy procedures in dogs with mammary gland tumors: 140 cases (2009-2015). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 258(3), 295–302. <https://doi.org/10.2460/javma.258.3.295>

93. Fan, Y., Ren, X., Wang, Y., Xu, E., Wang, S., Ge, R., & Liu, Y. (2021). Metformin inhibits the proliferation of canine mammary gland tumor cells through the AMPK/AKT/mTOR signaling pathway in vitro. *Oncology Letters*, 22(6), 1–7. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13113>

94. Fares, J. E., El Tomb, P., Khalil, L. E., Atwani, R. W., Moukadem, H. A., Awada, A., & El Saghir, N. S. (2020). Metronomic chemotherapy for patients with metastatic breast cancer: Review of effectiveness and potential use during pandemics. *Cancer treatment reviews*, 89, 102066. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102066>

95. Farhadi, P., Yarani, R., Valipour, E., Kiani, S., Hoseinkhani, Z., & Mansouri, K. (2022). Cell line-directed breast cancer research based on glucose metabolism status. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *146*, 112526. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112526>

96. Fathipour, V., Khaki, Z., & Nassiri, S. M. (2018). Evaluation of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9 activity in serum and biochemical and hematological parameters in spontaneous canine cutaneous tumors before and after surgical treatment. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, *9*(1), 19–26.

97. Ferrari, A. R. M., Ferrari, H. F., Carreira, V. S., Frigério, E. D., Luvizotto, M. C. R., & De Andrade, A. L. (2019). Microvessel density assessment in canine mammary carcinomas as a predictive factor for metronomic chemotherapy. *Semina: Ciências Agrárias*, *40*(5), 1849–1856. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n5p1849>

98. Finotello, R., Henriques, J., Sabattini, S., Stefanello, D., Felisberto, R., Pizzoni, S., Ferrari, R., & Marconato, L. (2017). A retrospective analysis of chemotherapy switch suggests improved outcome in surgically removed, biologically aggressive canine haemangiosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*, *15*(2), 493–503. <https://doi.org/10.1111/vco.12193>

99. Fonti, N., Parisi, F., Lachi, A., Dhein, E. S., Guscetti, F., Poli, A., & Millanta, F. (2024). Age at Tumor Diagnosis in 14,636 Canine Cases from the Pathology-Based UNIPI Animal Cancer Registry, Italy: One Size Doesn't Fit All. *Veterinary Sciences*, *11*(10), 485. <https://doi.org/10.3390/vetsci11100485>

100. Forrest, R., Awawdeh, L., Pearson, M., & Waran, N. (2023). Pet Ownership in Aotearoa New Zealand: A National Survey of Cat and Dog Owner Practices. *Animals: an open access journal from MDPI*, *13*(4), 631. <https://doi.org/10.3390/ani13040631>

101. García-Jiménez, C., García-Martínez, J. M., Chocarro-Calvo, A., & De la Vieja, A. (2013). A new link between diabetes and cancer: enhanced WNT/ β -

catenin signaling by high glucose. *Journal of molecular endocrinology*, 52(1), 51–66. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0152>

102. Garamaleki, M. N., Kazemi, D., Heydarinegad, H., & Safarmashaei, S. (2012). Effect of metformine (Glucophage) on renal function after complete unilateral ureteral obstruction in dog. *American Journal of Toxicological Sciences*, 4, 6–10.

103. Garrido, E., Castanheira, T. L. L., de Oliveira Vasconcelos, R., Machado, R. Z., & Alessi, A. C. (2015). Alterações hematológicas em cadelas acometidas por tumores mamários. *PubVet*, 9, 287–347. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v9n7.291-297>

104. Gaspar, T. B., Henriques, J., Marconato, L., & Queiroga, F. L. (2018). The use of low-dose metronomic chemotherapy in dogs—insight into a modern cancer field. *Veterinary and comparative oncology*, 16(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/vco.12309>

105. Gedon, J., Wehrend, A., Failing, K., & Kessler, M. (2021). Canine mammary tumours: Size matters—a progression from low to highly malignant subtypes. *Veterinary and comparative oncology*, 19(4), 707–713. <https://doi.org/10.1111/vco.12649>

106. Gedon, J., Wehrend, A., & Kessler, M. (2022). Ovariectomy reduces the risk of tumour development and influences the histologic continuum in canine mammary tumours. *Veterinary and comparative oncology*, 20(2), 476–483. <https://doi.org/10.1111/vco.12793>

107. Giuliano, A., Horta, R. S., Vieira, R. A., Hume, K. R., & Dobson, J. (2022). Repurposing drugs in small animal oncology. *Animals*, 13(1), 139. <https://doi.org/10.3390/ani13010139>

108. Gramulia, B. C., Pulz, L. H., Mota, E. F., Fukumasu, H., & Strefezzi, R. F. (2016). Matrix metalloproteinase 9 expression in canine mammary carcinomas. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 9(2), 55–61.

109. Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary pathology*, 48(1), 117–131. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>
110. Grandhaye, J., Partyka, A., Ligocka, Z., Dudek, A., Nizański, W., Jeanpierre, E., ... & Froment, P. (2020). Metformin improves quality of post-thaw canine semen. *Animals*, 10(2), 287. <https://doi.org/10.3390/ani10020287>
111. Guarini, C., Santoro, A. N., Melaccio, A., Lanotte, L., Gadaleta-Caldarola, G., Giuliani, F., ... & Fedele, P. (2024). Metronomic chemotherapy and breast cancer: a critical evaluation of its role in the new landscape of therapeutics. *Expert Opinion on Drug Safety*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/14740338.2024.2419547>
112. Guha, M., Srinivasan, S., Raman, P., Jiang, Y., Kaufman, B. A., Taylor, D., Dong, D., Chakrabarti, R., Picard, M., Carstens, R. P., Kijima, Y., Feldman, M., & Avadhani, N. G. (2018). Aggressive triple negative breast cancers have unique molecular signature on the basis of mitochondrial genetic and functional defects. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(4 Pt A), 1060–1071. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.01.002>
113. Gundim, L. F., de Araújo, C. P., Blanca, W. T., Guimarães, E. C., & Medeiros, A. A. (2016). Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 80(4), 318–322.
114. Gupta, P., Raghunath, M., Gupta, A. K., Sharma, A., & Kour, K. (2014). Clinical study for diagnosis and treatment of canine mammary neoplasms (CMNs) using different modalities. *Indian Journal of Animal Research*, 48(1), 45–49. <https://doi.org/10.5958/j.0976-0555.48.1.009>
115. Hampsch, R. A., Wells, J. D., Traphagen, N. A., McCleery, C. F., Fields, J. L., Shee, K., ... & Miller, T. W. (2020). AMPK activation by metformin promotes survival of dormant ER+ breast cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 26(14), 3707–3719. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0269>

116. Han, J. H., Kim, K. S., & Kim, J. H. (2017). Mammary gland tumors in three male dogs. *Korean Journal of Veterinary Research*, 56(4), 229-232. <https://doi.org/10.14405/kjvr.2016.56.4.229>
117. Harper, A., & Blackwood, L. (2017). Toxicity of metronomic cyclophosphamide chemotherapy in a UK population of cancer-bearing dogs: a retrospective study. *Journal of Small Animal Practice*, 58(4), 227–230. <https://doi.org/10.1111/jsap.12635>
118. Haybittle, J. L., Blamey, R. W., Elston, C. W., Johnson, J., Doyle, P. J., Campbell, F. C., Nicholson, R. I., & Griffiths, K. (1982). A prognostic index in primary breast cancer. *British journal of cancer*, 45(3), 361–366. <https://doi.org/10.1038/bjc.1982.62>
119. Hörnfeldt, M. B., & Mortensen, J. K. (2023). Surgical dose and the clinical outcome in the treatment of mammary gland tumours in female dogs: a literature review. *Acta veterinaria Scandinavica*, 65(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13028-023-00674-1>
120. Horta, R. D. S., Lavalle, G. E., Cunha, R. M. D. C., Moura, L. L. D., Araújo, R. B. D., & Cassali, G. D. (2014). Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. *Advances in Breast Cancer Research*, 3(02), 38-46. <https://doi.org/10.4236/abcr.2014.32006>
121. Horta, R. S., Figueiredo, M. S., Lavalle, G. E., Costa, M. P., Cunha, R. M., & Araújo, R. B. (2015). Surgical stress and postoperative complications related to regional and radical mastectomy in dogs. *Acta veterinaria Scandinavica*, 57(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0121-3>
122. Ipek, V., & Kaplan, O. (2023). Mast Cell and VEGF Profile in Canine Soft Tissue Tumors. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 74(2), 5713–5720. <https://doi.org/10.12681/jhvms.30129>
123. Irgashev, A., Ishenbaeva, S., Nurgaziev, R., & Lykhina, L. (2023). Influence of age and breed of dogs on tumour development. *Scientific Horizons*, 26(11), 29–38. doi: 10.48077/scihor11.2023.29.

124. Itoh, T., Tateyama, S., Uchida, K., Nishi, A., Chambers, J., & Shii, H. (2015). Clinical Significance of Tumor Size, Primary Tumor Invasion, and Lymph Node Metastasis in Mammary Gland Tumors in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Medicine*, 68(12), 908–913.
125. Jan, N., Sofi, S., Qayoom, H., Shabir, A., Haq, B. U., Macha, M. A., Almilaibary, A., & Mir, M. A. (2024). Metronomic chemotherapy and drug repurposing: A paradigm shift in oncology. *Heliyon*, 10(3), e24670. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24670>
126. Jiang, W., Huang, Y., An, Y., & Kim, B. Y. (2015). Remodeling tumor vasculature to enhance delivery of intermediate-sized nanoparticles. *ACS nano*, 9(9), 8689–8696. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b02028>
127. Jin, X., Han, H., & Liang, Q. (2024). Effects of surgical trauma and intraoperative blood loss on tumour progression. *Frontiers in oncology*, 14, 1412367. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1412367>
128. Jing, Z., Feng, J., & Jin, H. (2024). Epidemiological investigation and surgical treatment of canine mammary tumors in Dalian, China, from 2019 to 2023. *PloS one*, 19(11), e0314292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0314292>
129. Johnston, C. A., Dickinson, V. S. M., Alcorn, J., & Gaunt, M. C. (2017). Pharmacokinetics and oral bioavailability of metformin hydrochloride in healthy mixed-breed dogs. *American journal of veterinary research*, 78(10), 1193–1199. <https://doi.org/10.2460/ajvr.78.10.1193>
130. Kamel, S. S., Abdelbaky, N. A., Sayed-Ahmed, M. M., Karkeet, R. M., Osman, A. M. M., & Fouad, M. A. (2022). Cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Azhar International Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences*, 2(2), 1-8. <https://doi.org/10.21608/aijpms.2022.114213.1103>
131. Kannarkatt, J., Alkharabsheh, O., Tokala, H., & Dimitrov, N. V. (2016). Metformin and angiogenesis in cancer-revisited. *Oncology*, 91(4), 179–184. <https://doi.org/10.1159/000448175>
132. Karadeniz, Z., Aynacıoğlu, A. Ş., Bilir, A., & Tuna, M. Y. (2020). Inhibition of midkine by metformin can contribute to its anticancer effects in

malignancies: A proposal mechanism of action of metformin in context of endometrial cancer prevention and therapy. *Medical Hypotheses*, 134, 109420. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.109420>

133. Karayannopoulou, M., Fytianou, A., Assaloumidis, N., Psalla, D., Savvas, I., & Kaldrymidou, E. (2013). Lipid peroxidation in neoplastic tissue of dogs with mammary cancer fed with different kinds of diet. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 37(4), 449-453. <https://doi.org/10.3906/vet-1211-7>

134. Kareva, I., Waxman, D. J., & Lakka Klement, G. (2015). Metronomic chemotherapy: an attractive alternative to maximum tolerated dose therapy that can activate anti-tumor immunity and minimize therapeutic resistance. *Cancer letters*, 358(2), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.039>

135. Kartal, T., & Chaudhari, A. (2017). Surveys of the Street and Private Dog Population in Vadodara, India (2017). *Demography and Statistics for Companion Animal Populations Collection*. 1. <https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/demscapop/1>

136. Kawai, K., Uetsuka, K., Doi, K., & Nakayama, H. (2006). The activity of matrix metalloproteinases (MMPS) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. *Journal of veterinary medical science*, 68(2), 105–111. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.105>

137. Kent, M. S. (2013). Cats and chemotherapy: treat as ‘small dogs’ at your peril. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(5), 419–424. <https://doi.org/10.1177/1098612X13483240>

138. Kerbel, R. S., & Shaked, Y. (2017). The potential clinical promise of ‘multimodality’ metronomic chemotherapy revealed by preclinical studies of metastatic disease. *Cancer letters*, 400, 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.005>

139. Kim, H. W., Ju, J. H., Shin, J. I., Seung, B. J., & Sur, J. H. (2017). Differential and correlated expressions of p16/p21/p27/p38 in mammary gland tumors of aged dogs. *Journal of Veterinary Science*, 18(4), 479–485. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.4.479>

140. Kim, J. Y., & Kim, Y. M. (2019). Tumor endothelial cells as a potential target of metronomic chemotherapy. *Archives of pharmacal research*, 42(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-01102-z>

141. Kim, Y., Seo, K., & Song, K. (2021). Chemotherapy of mammary comedocarcinoma with doxorubicin in a dog. *Journal of veterinary clinics*, 38(6), 274–278. <https://doi.org/10.17555/jvc.2021.38.6.274>

142. Kimura, M., Miyahara, K., Yamasaki, M., & Uchida, N. (2022). Comparison of vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and its relationship to tumor cell proliferation in canine epithelial and mesenchymal tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84(1), 133–141.

143. Kisiel, L. M. (2017). *Using a dog demography field study to inform the development of an agent-based computer simulation. Evaluating owned dog population control interventions in a small, semi-urban community in Mexico* (Doctoral dissertation, University of Guelph).

144. Kisiel, L. M., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Coe, J. B., Flockhart, D. T. T., Reynoso Palomar, A., Canales Vargas, E. J., & Greer, A. L. (2016). Owned dog ecology and demography in Villa de Tezontepec, Hidalgo, Mexico. *Preventive veterinary medicine*, 135, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.10.021>

145. Kisiel, L. M., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Coe, J. B., Flockhart, D. T. T., Canales Vargas, E. J., & Greer, A. L. (2018). Modeling the effect of surgical sterilization on owned dog population size in Villa de Tezontepec, Hidalgo, Mexico, using an individual-based computer simulation model. *PloS one*, 13(6), e0198209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198209>

146. Kivrak, M. B., & Aydin, I. (2017). Treatment and prognosis of mammary tumors in bitches. *International Journal of Veterinary Science*, 6(4), 178–186.

147. Khaki, Z. (2021). Evaluation of Prognostic Value of Serum Matrix Metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9 in Canine Mammary Gland Tumors; A Longitudinal Study. PREPRINT (Version 1) available at Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-271056/v1>

148. Khaki, Z., & Fathipour, V. (2023). Prognostic value of different forms of serum MMP-2 and MMP-9 in dogs with mammary tumors; a longitudinal study. *Research in Veterinary Science*, *163*, 104995. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.104995>

149. Klose, K.; Packeiser, E.M.; Müller, P.; Granados-Soler, J.L.; Schille, J.T.; Goericke-Pesch, S.; Kietzmann, M.; Escobar, H.M.; Nolte, I. (2021). Metformin and sodium dichloroacetate effects on proliferation, apoptosis, and metabolic activity tested alone and in combination in a canine prostate and a bladder cancer cell line. *PLoS ONE*, *16*, e0257403.

150. Kristiansen, V. M., Nødtvedt, A., Breen, A. M., Langeland, M., Teige, J., Goldschmidt, M., ... & Sørenmo, K. (2013). Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *27*(4), 935–942. <https://doi.org/10.1111/jvim.12110>

151. Koide, N., Nishio, A., Kono, T., Yazawa, K., Igarashi, J., Watanabe, H., Nimura, Y., Hanazaki, K., Adachi, W., & Amano, J. (1999). Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepato-gastroenterology*, *46*(26), 952–958.

152. Koreyba, L., Masyuk, D., Skliarov, P., & Leshchova, M. (2024). Organopathology of the mammary gland in female carnivores: current state of research issues. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, *26*(113), 132–139. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11320>

153. Kovalenko, M., & Bilyi, D. (2021). Prognostic value of vascular invasion in breast tumours in she-dogs (pilot study). *Scientific Horizons*, *24*(2), 54–61. [https://doi.org/10.48077/scihor.24\(2\).2021.54-61](https://doi.org/10.48077/scihor.24(2).2021.54-61)

154. Kovalenko, M. S., Bilyi, D. D., Skliarov, P. M., Maslikov, S. N., Suslova, N. I., Spitsyna, T. L., & Yevtushenko, I. D. (2021). Prognostic markers of canine mammary tumours: Retrospective study of 142 cases. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, *12*(4), 649–654. <https://doi.org/10.15421/022189>

155. Kovalenko, M. S., Bilyi, D. D., & Hrebeniuk, K. R. (2023). The prognostic significance of the activities of matrix metalloproteinases-2 and -9 in dogs for mammary gland neoplasia (pilot study). *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(2), 273–277. <https://doi.org/10.15421/022340>

156. Kovalenko, M., Dankevych, N. & Bilyi, D. (2023). Clinical significance of biological markers for mammary gland neoplasms in bitches. In S. S. Arun, D. Dalgin, N. Decaro, G. Dupre, P. Freeman, J. Haggstrom, C. Mooney, H. Oguz, M. Ok, K. Özer, M. Rinkinen, G. von Samson, B. Ulutas, H. Erdogan, S. Erdogan, İ. Polat, S. Masson, J. Mortier, H. Radke, M. Aksay, A. Barut, J. Hedley, E. Kalemzaki, N. Mitchell, H. Ömer, H. Ruel (Ed.), *17th Turkish Small Animal Veterinary Association International Continuing Education Congress* (222–224). Istanbul.

157. Kurelac, I., Umesh Ganesh, N., Iorio, M., Porcelli, A. M., & Gasparre, G. (2020). The multifaceted effects of metformin on tumor microenvironment. *Seminars in cell & developmental biology*, 98, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.010>

158. Kuruoglu, F. E., Ekici, Z. M., Nak, D., Ozyigit, M. O., Kupeli, Z. A., & Koca, D. (2024). Investigation of efficacy of two different chemotherapy protocols used in neoadjuvant chemotherapy in clinical stages II–IV canine malignant mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 22(2), 284–294. <https://doi.org/10.1111/vco.12976>

159. Kuruoglu, F. E., Ozyigit, M. O., Deniz, N. A. K., Kupeli, Z. A., Ekici, Z. M., Davut, K. O. C. A., ... & Shahzad, A. H. (2020). Efficacy and toxicity of doxorubicin and cyclophosphamide for the neoadjuvant treatment of locally advanced stage canine mammary tumors. *Kafkas Universitesi veteriner fakultesi dergisi*, 26(6). <https://doi.org/10.9775/kvfd.2020.24112>

160. Lai, V., Neshat, S. Y., Rakoski, A., Pitingolo, J., & Doloff, J. C. (2021). Drug delivery strategies in maximizing anti-angiogenesis and anti-tumor immunity. *Advanced drug delivery reviews*, 179, 113920. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113920>

161. Lalau, J. D., Arnouts, P., Sharif, A., & De Broe, M. E. (2015). Metformin and other antidiabetic agents in renal failure patients. *Kidney international*, 87(2), 308–322. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.19>
162. Lalau, J. D., Kajbaf, F., Protti, A., Christensen, M. M., De Broe, M. E., & Wiernsperger, N. (2017). Metformin-associated lactic acidosis (MALA): Moving towards a new paradigm. *Diabetes, obesity & metabolism*, 19(11), 1502–1512. <https://doi.org/10.1111/dom.12974>
163. Lallo, M. A., Ferrarias, T., Stravino, A., Rodriguez, J., & Zucare, R. (2016). Alterações hematológicas em cadelas portadoras de tumores de mama. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 23(1-2), 3-8.
164. Lee, T. Y., Martinez-Outschoorn, U. E., Schilder, R. J., Kim, C. H., Richard, S. D., Rosenblum, N. G., & Johnson, J. M. (2018). Metformin as a Therapeutic Target in Endometrial Cancers. *Frontiers in oncology*, 8, 341. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00341>
165. Lefebvre, S. L., Yang, M., Wang, M., Elliott, D. A., Buff, P. R., & Lund, E. M. (2013). Effect of age at gonadectomy on the probability of dogs becoming overweight. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(2), 236–243. <https://doi.org/10.2460/javma.243.2.236>
166. Leonel, C., Borin, T. F., de Carvalho Ferreira, L., Moschetta, M. G., Bajgelman, M. C., Vilorio-Petit, A. M., & de Campos Zuccari, D. A. P. (2017). Inhibition of epithelial-mesenchymal transition and metastasis by combined TGFbeta knockdown and metformin treatment in a canine mammary cancer xenograft model. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 22, 27–41.
167. Li, J., Li, B., Bai, F., Ma, Y., Liu, N., Liu, Y., ... & Liu, Q. (2020). Metformin therapy confers cardioprotection against the remodeling of gap junction in tachycardia-induced atrial fibrillation dog model. *Life sciences*, 254, 117759. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117759>
168. Li, M., Hu, X., Xu, Y., Hu, X., Zhang, C., & Pang, S. (2019). A Possible Mechanism of Metformin in Improving Insulin Resistance in Diabetic Rat Models.

International journal of endocrinology, 2019, 3248527.
<https://doi.org/10.1155/2019/3248527>

169. Li, W. D., Li, N. P., Song, D. D., Rong, J. J., Qian, A. M., & Li, X. Q. (2017). Metformin inhibits endothelial progenitor cell migration by decreasing matrix metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9, via the AMPK/mTOR/autophagy pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(5), 1262–1268.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2929>

170. Lim, H. Y., Im, K. S., Kim, N. H., Kim, H. W., Shin, J. I., & Sur, J. H. (2015). Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. *The Veterinary Journal*, 203(3), 326–331.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.005>

171. Lim, H. Y., Seung, B. J., Cho, S. H., Kim, S. H., Bae, M. K., & Sur, J. H. (2022). Canine mammary cancer in overweight or obese female dogs is associated with intratumoral microvessel density and macrophage counts. *Veterinary Pathology*, 59(1), 39-45. <https://doi.org/10.1177/03009858211040481>

172. Liu, Y., Bai, F., Liu, N., Zhang, B., Qin, F., Tu, T., ... & Liu, Q. (2020). Metformin improves lipid metabolism and reverses the Warburg effect in a canine model of chronic atrial fibrillation. *BMC cardiovascular disorders*, 20, 1-9.
<https://doi.org/10.1186/s12872-020-01359-7>

173. Liu, J., He, M., Wang, Z., Li, Q., & Xu, B. (2022). Current research status of metronomic chemotherapy in combination treatment of breast cancer. *Oncology research and treatment*, 45(11), 681–692. <https://doi.org/10.1159/000526481>

174. London, C. A., Gardner, H. L., Mathie, T., Stingle, N., Portela, R., Pennell, M. L., Clifford, C. A., Rosenberg, M. P., Vail, D. M., Williams, L. E., Cronin, K. L., Wilson-Robles, H., Borgatti, A., Henry, C. J., Bailey, D. B., Locke, J., Northrup, N. C., Crawford-Jakubiak, M., Gill, V. L., Klein, M. K., ... Post, G. (2015). Impact of Toceranib/Piroxicam/Cyclophosphamide Maintenance Therapy on Outcome of Dogs with Appendicular Osteosarcoma following Amputation and Carboplatin Chemotherapy: A Multi-Institutional Study. *PloS one*, 10(4), e0124889.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124889>

175. Loven, D., Hasnis, E., Bertolini, F., & Shaked, Y. (2013). Low-dose metronomic chemotherapy: from past experience to new paradigms in the treatment of cancer. *Drug discovery today*, *18*(3-4), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.07.015>
176. Loukopoulos, P., Mungall, B. A., Straw, R. C., Thornton, J. R., & Robinson, W. F. (2003). Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Veterinary Pathology*, *40*(4), 382–394. <https://doi.org/10.1354/vp.40-4-382>
177. Lutful Kabir, F. M., Alvarez, C. E., & Bird, R. C. (2015). Canine mammary carcinomas: a comparative analysis of altered gene expression. *Veterinary Sciences*, *3*(1), 1. <https://doi.org/10.3390/vetsci3010001>
178. Ma, J. H., Qin, L., & Li, X. (2020). Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Communication and Signaling*, *18*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0527-z>
179. Machado, M. C., Yamamoto, P. A., Pippa, L. F., de Moraes, N. V., Neves, F. M. F., Portela, R. D., ... & Estrela-Lima, A. (2022). Pharmacokinetics of carboplatin in combination with low-dose cyclophosphamide in female dogs with mammary carcinoma. *Animals*, *12*(22), 3109. <https://doi.org/10.3390/ani12223109>
180. Madej, J. A., Madej, J. P., Dziegiel, P., Pula, B., & Nowak, M. (2013). Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular density in mammary adenomas and adenocarcinomas in bitches. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *55*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-73>
181. Madiraju, A. K., Erion, D. M., Rahimi, Y., Zhang, X. M., Braddock, D. T., Albright, R. A., Prigaro, B. J., Wood, J. L., Bhanot, S., MacDonald, M. J., Jurczak, M. J., Camporez, J. P., Lee, H. Y., Cline, G. W., Samuel, V. T., Kibbey, R. G., & Shulman, G. I. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, *510*(7506), 542–546. <https://doi.org/10.1038/nature13270>
182. Madondo, M. T., Quinn, M., & Plebanski, M. (2016). Low dose cyclophosphamide: mechanisms of T cell modulation. *Cancer treatment reviews*, *42*, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.11.005>

183. Maes, H., Kuchnio, A., Peric, A., Moens, S., Nys, K., De Bock, K., ... & Carmeliet, P. (2014). Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer cell*, *26*(2), 190–206. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.025>
184. Magalhães, J. R., Guimarães, J. B., Bonfim, L. S., Carvalho, C. F., Luz, L. C., Cagnini, D. Q., ... & Amaral, A. V. (2020). Relationship of obesity with clinical and laboratory changes in female dogs with mammary neoplasia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *40*, 536–545. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6451>
185. Marchi, P. H., Vendramini, T. H., Perini, M. P., Zafalon, R. V., Amaral, A. R., Ochamoto, V. A., ... & Brunetto, M. A. (2022). Obesity, inflammation, and cancer in dogs: Review and perspectives. *Frontiers in veterinary science*, *9*, 1004122. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1004122>
186. Marconato, L., Romanelli, G., Stefanello, D., Giacoboni, C., Bonfanti, U., Bettini, G., Finotello, R., Verganti, S., Valenti, P., Ciaramella, L., & Zini, E. (2009). Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *235*(8), 967–972. <https://doi.org/10.2460/javma.235.8.967>
187. Marrington, A. M., Killick, D. R., Grant, I. A., & Blackwood, L. (2012). Toxicity associated with epirubicin treatments in a large case series of dogs. *Veterinary and comparative oncology*, *10*(2), 113–123. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00281.x>
188. Matsuyama, A., Woods, J. P., & Mutsaers, A. J. (2017). Evaluation of toxicity of a chronic alternate day metronomic cyclophosphamide chemotherapy protocol in dogs with naturally occurring cancer. *The Canadian Veterinary Journal*, *58*(1), 51.
189. McNeill, C., & Vienna, V. A. (2015). Treatment of Mammary Gland Tumors in Cats and Dogs. *2015 CVC Washington, DC*, 618–620.
190. Merlo, D. F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P. L., Sestito, V., Tanara, G., & Bocchini, V. (2008). Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of

Genoa, Italy. *Journal of veterinary internal medicine*, 22(4), 976–984.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x>

191. Miceli, D. D., Vidal, P. N., Batter, M. F. C., Pignataro, O., & Castillo, V. A. (2018). Metformin reduces insulin resistance and the tendency toward hyperglycaemia and dyslipidaemia in dogs with hyperadrenocorticism. *Open Veterinary Journal*, 8(2), 193–199. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i2.13>

192. Millanta, F., Caneschi, V., Ressel, L., Citi, S., & Poli, A. (2010). Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, 142(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.06.004>

193. Min, W., Wang, B., Guo, A., Mao, G., Zhao, Y., Zhang, S., ... & Huang, Y. (2020). The effect of metformin on the clinicopathological features of breast cancer with type 2 diabetes. *World Journal of Oncology*, 11(1), 23. <https://doi.org/10.14740/wjon1242>

194. Mir, M. A., Jan, A., Shabir, A., & Jan, N. (2024). Metronomics: Toward Personalized Chemotherapy. *Novel Approaches in Metronomic Chemotherapy for Breast Cancer Treatment*, 99–119.

195. Miya, K., Misumi, K., Miyoshi, N., Arai, K., Fujiki, M., Kubota, C., & Sakamoto, H. (2005). Interpreting gelatinase activity in tumor tissue and serum as a prognostic marker of naturally developing canine tumors. *The Journal of veterinary medical science*, 67(8), 769–775. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.769>

196. Moe L. (2001). Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 57, 439–443.

197. Montoya-Alonso, J. A., Bautista-Castaño, I., Peña, C., Suárez, L., Juste, M. C., & Tvarijonaviciute, A. (2017). Prevalence of canine obesity, obesity-related metabolic dysfunction, and relationship with owner obesity in an obesogenic region of Spain. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 59. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00059>

198. Moon, C. H., Kim, D. H., Yun, S. H., Lee, H. B., & Jeong, S. M. (2022). Assessment of prognostic factors in dogs with mammary gland tumors: 60 cases

(2014-2020). *Korean Journal of Veterinary Research*, 62(1), 9-1.
<https://doi.org/10.14405/kjvr.20210046>

199. Moschetta, M. G., Maschio, L. B., Jardim-Perassi, B. V., Gelaleti, G. B., Lopes, J. R., Leonel, C., ... & Zuccari, D. A. P. D. C. (2015). Prognostic value of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 α in canine malignant mammary tumors. *Oncology Reports*, 33(5), 2345–2353.
<https://doi.org/10.3892/or.2015.3856>

200. Moschetta, M. G., Leonel, C., Maschio-Signorini, L. B., Borin, T. F., Gelaleti, G. B., Jardim-Perassi, B. V., ... & de Campos Zuccari, D. A. (2019). Evaluation of angiogenesis process after metformin and LY294002 treatment in mammary tumor. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 19(5), 655–666.
<https://doi.org/10.2174/1871520619666181218164050>

201. Munzone, E., & Colleoni, M. (2015). Clinical overview of metronomic chemotherapy in breast cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 12(11), 631–644.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.131>

202. Muraro, E., Vinante, L., Fratta, E., Bearz, A., Höfler, D., Steffan, A., & Baboci, L. (2023). Metronomic Chemotherapy: Anti-Tumor Pathways and Combination with Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancers*, 15(9), 2471.
<https://doi.org/10.3390/cancers15092471>

203. Murphy, S. (2008). Mammary tumours in dogs and cats. *In Practice*, 30(6), 334-339. <https://doi.org/10.1136/inpract.30.6.334>

204. Musser, M. L., Curran, K. M., Flesner, B. K., & Johannes, C. M. (2021). A Retrospective Evaluation of Chemotherapy Overdoses in Dogs and Cats. *Frontiers in veterinary science*, 8, 718967.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.718967>

205. Nadhiya, C., Nair, M. G., Kumar, R., Uma, A. W. L. S., & Alphonse, R. M. D. (2020). Occurrence and pathology of canine mammary neoplasms-A prospective study. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(4), 1498–1503.

206. Nagase H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological chemistry*, 378(3–4), 151–160.

207. Nelson, E. R., Chang, C. Y., & McDonnell, D. P. (2014). Cholesterol and breast cancer pathophysiology. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 25(12), 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.10.001>

208. Neumann, S., Schuettler, J., Frenz, M., Kaup, F. J., & Gessler, F. (2017). Investigation of serum Ki-67 as a biomarker in tumor-bearing dogs. *Research in veterinary science*, 110, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.10.012>

209. Nicchio, B. O., Barrouin-Melo, S. M., Machado, M. C., Vieira-Filho, C. H., Santos, F. L., Martins-Filho, E. F., Barbosa, V. F., Barral, T. D., Portela, R. W., Damasceno, K. A., & Estrela-Lima, A. (2020). Hyperresistinemia in Obese Female Dogs With Mammary Carcinoma in Benign-Mixed Tumors and Its Correlation With Tumor Aggressiveness and Survival. *Frontiers in veterinary science*, 7, 509. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00509>

210. Nguyen, F., Peña, L., Ibisch, C., Loussouarn, D., Gama, A., Rieder, N., ... & Abadie, J. (2018). Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast cancer research and treatment*, 167, 635–648.

211. Nosalova, N., Huniadi, M., Horňáková, Ľ., Valenčáková, A., Horňák, S., Nagoos, K., ... & Cizkova, D. (2024). Canine mammary tumors: classification, biomarkers, traditional and personalized therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2891. <https://doi.org/10.3390/ijms25052891>

212. Nowak, M., Madej, J. A., Podhorska-Okolow, M., & Dziegiel, P. (2008). Expression of extracellular matrix metalloproteinase (MMP-9), E-cadherin and proliferation-associated antigen Ki-67 and their reciprocal correlation in canine mammary adenocarcinomas. *in vivo*, 22(4), 463–469.

213. Nowak, M., Madej, J. A., Pula, B., Dziegiel, P., & Ciaputa, R. (2015). Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), E-cadherin and Ki-67 in metastatic and non-metastatic canine mammary carcinomas. *Irish veterinary journal*, 69, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13620-016-0068-3>

214. Nowak, M., Madej, J. A., Podhorska-Okolow, M., & Dziegiel, P. (2008). Expression of extracellular matrix metalloproteinase (MMP-9), E-cadherin and proliferation-associated antigen Ki-67 and their reciprocal correlation in canine mammary adenocarcinomas. *In vivo*, 22(4), 463–469.
215. Nunes, F. C., Damasceno, K. A., de Campos, C. B., Bertagnolli, A. C., Lavalle, G. E., & Cassali, G. D. (2019). Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. *Veterinary and Animal Science*, 7, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.09.003>
216. O'Neill, D. G., Skipper, A. M., Barrett, K., Church, D. B., Packer, R. M. A., & Brodbelt, D. C. (2023). Demography, common disorders and mortality of Boxer dogs under primary veterinary care in the UK. *Canine medicine and genetics*, 10(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40575-023-00129-w>
217. Owen, L. N. (1980). TNM Classification of tumors in domestic animals. Geneva: World Health Organization, 53.
218. Patel, M. P., Ghodasara, D. J., Raval, S. H., & Joshi, B. P. (2019). Incidence, gross morphology, histopathology and immunohistochemistry of canine mammary tumors. *Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*, 14(4), 40–44. <https://doi.org/10.21887/ijvsbt.14.4.11>
219. Pauly, L. A. M., Junginger, J., Oechtering, G. U., Hewicker-Trautwein, M., & Rösch, S. (2024). Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, cyclooxygenase-2, survivin, E-cadherin and Ki-67 in canine nasal carcinomas and sarcomas—a pilot study. *Frontiers in veterinary science*, 11, 1388493. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1388493>
220. Pegram, C., Raffan, E., White, E., Ashworth, A. H., Brodbelt, D. C., Church, D. B., & O'Neill, D. G. (2021). Frequency, breed predisposition and demographic risk factors for overweight status in dogs in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 62(7), 521–530. <https://doi.org/10.1111/jsap.13325>
221. Peña, L., De Andrés, P. J., Clemente, M., Cuesta, P., & Pérez-Alenza, M. D. (2013). Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship

with clinical and histological characteristics. *Veterinary pathology*, 50(1), 94–105. <https://doi.org/10.1177/0300985812447830>

222. Petrov, E. A., Ilievska, K., Trojancanec, P., Celeska, I., Nikolovski, G., Gjurovski, I., & Dovenski, T. (2014). Canine mammary tumours-clinical survey. *Macedonian Veterinary Review*, 37(2), 129–134. <http://dx.doi.org/10.14432/j.macvetrev.2014.05.015>

223. Pimentel, P. A. B., da Silva, P. H. S., de Sena, B. V., Flecher, M. C., Cassali, G. D., & Horta, R. D. S. (2024). The role of lymph nodes and their drainage in canine mammary gland tumours: Systematic review. *Research in veterinary science*, 168, 105139. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105139>

224. Pinheiro, L. G. P., Moraes, M. O. D., Soares, A. H., Lopes, A. J. T., Naguère, M. A. S. P., Gondim, F. Á. D. L., ... & Silva, J. M. D. M. (2003). Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc99m. *Acta cirúrgica brasileira*, 18, 545–552. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502003000600006>

225. Piskór, B. M., Przylipiak, A., Dąbrowska, E., Niczyporuk, M., & Ławicki, S. (2020). Matrilysins and Stromelysins in Pathogenesis and Diagnostics of Cancers. *Cancer Management and Research*, 12, 10949–10964. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S235776>

226. Polton, G. (2009). Mammary tumours in dogs. *Irish Veterinary Journal*, 62(1), 50–56.

227. Pope, B. D., Warren, C. R., Parker, K. K., & Cowan, C. A. (2016). Microenvironmental control of adipocyte fate and function. *Trends in cell biology*, 26(10), 745–755. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.005>

228. Prado, M. C. M., Macedo, S. D. A. L., Guiraldelli, G. G., de Faria Lainetti, P., Leis-Filho, A. F., Kobayashi, P. E., ... & Fonseca-Alves, C. E. (2019). Investigation of the prognostic significance of vasculogenic mimicry and its inhibition by sorafenib in canine mammary gland tumors. *Frontiers in oncology*, 9, 1445. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01445>

229. Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., & Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature reviews. Drug discovery*, *18*(1), 41–58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>
230. Qiu, C. W., Lin, D. G., Wang, J. Q., Li, C. Y., & Deng, G. Z. (2008). Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. *Veterinary research communications*, *32*, 463–472. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9049-7>
231. Queiroga, F. L., Pires, I., Parente, M., Gregório, H., & Lopes, C. S. (2011). COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *The Veterinary Journal*, *189*(1), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.022>
232. Radisky, E. S., & Radisky, D. C. (2015). Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *20*(7), 1144–1163. <https://doi.org/10.2741/4364>
233. Ramirez, D. A., Collins, K. P., Aradi, A. E., Conger, K. A., & Gustafson, D. L. (2019). Kinetics of cyclophosphamide metabolism in humans, dogs, cats, and mice and relationship to cytotoxic activity and pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Disposition*, *47*(3), 257–268. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083766>
234. Raposo-Ferreira, T. M., Salvador, R. C., Terra, E. M., Ferreira, J. H., Vechetti-Junior, I. J., Tinucci-Costa, M., ... & Laufer-Amorim, R. (2016). Evaluation of vascular endothelial growth factor gene and protein expression in canine metastatic mammary carcinomas. *Microscopy Research and Technique*, *79*(11), 1097–1104. <https://doi.org/10.1002/jemt.22763>
235. Rasmussen, R. M., Kurzman, I. D., Biller, B. J., Guth, A., & Vail, D. M. (2017). Phase I lead-in and subsequent randomized trial assessing safety and modulation of regulatory T cell numbers following a maximally tolerated dose doxorubicin and metronomic dose cyclophosphamide combination chemotherapy

protocol in tumour-bearing dogs. *Veterinary and comparative oncology*, 15(2), 421–430. <https://doi.org/10.1111/vco.12179>

236. Rasotto, R., Zappulli, V., Castagnaro, M., & Goldschmidt, M. H. (2012). A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Veterinary pathology*, 49(2), 330-340. <https://doi.org/10.1177/0300985811409253>

237. Razavirad, A., Rismanchi, S., Mortazavi, P., & Muhammadnejad, A. (2024). Canine Mammary Tumors as a Potential Model for Human Breast Cancer in Comparative Oncology. *Veterinary Medicine International*, 2024(1), 9319651. <https://doi.org/10.1155/2024/9319651>

238. Riesco-Martinez, M., Parra, K., Saluja, R., Francia, G., & Emmenegger, U. (2017). Resistance to metronomic chemotherapy and ways to overcome it. *Cancer letters*, 400, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.027>

239. Rizvi, F., Shaukat, L., Azhar, A., Jafri, A., Aslam, U., & Imran-ul-Haq, H. (2021). Preclinical meritorious anticancer effects of Metformin against breast cancer: An In vivo trial. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 16(4), 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2021.02.006>

240. Rodigheri, S. M., Paiva, F. N. D., Firmo, B. F., Fuchs, T., Mani, C. B., & Nardi, A. B. D. (2023). Parameters of Metabolic Response to Surgical Trauma Induced via Unilateral Total Mastectomy Associated or Not to Ovariohysterectomy in Dogs. *Animals*, 13(5), 926. <https://doi.org/10.3390/ani13050926>

241. Rodríguez, J., Santana, Á., Herráez, P., Killick, D. R., & de Los Monteros, A. E. (2022). Epidemiology of canine mammary tumours on the Canary Archipelago in Spain. *BMC veterinary research*, 18(1), 268. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03363-9>

242. Romiti, A., Cox, M. C., Sarcina, I., Di Rocco, R., D'Antonio, C., Barucca, V., & Marchetti, P. (2013). Metronomic chemotherapy for cancer treatment: a decade of clinical studies. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 72(1), 13–33. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2125-x>

243. Rossi, G., Errico, G., Perez, P., Rossi, G., & Paltrinieri, S. (2010). Paraneoplastic hypoglycemia in a diabetic dog with an insulin growth factor-2-producing mammary carcinoma. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(4), 480–484. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2010.00260.x>
244. Rossi, F., Sabattini, S., Vascellari, M., & Marconato, L. (2018). The impact of toceranib, piroxicam and thalidomide with or without hypofractionated radiation therapy on clinical outcome in dogs with inflammatory mammary carcinoma. *Veterinary and comparative oncology*, 16(4), 497–504. <https://doi.org/10.1111/vco.12407>
245. Rueda, J. R., Porto, C. D., Franco, R. P., da Costa, I. B., Bueno, L. M. C., Girio, R. J. S., ... & Repetti, C. S. F. (2024). Mammary neoplasms in female dogs: Clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Veterinárni medicína*, 69(4), 99. <https://doi.org/10.17221/4/2024-VETMED>
246. Ryu, T. Y., Park, J., & Scherer, P. E. (2014). Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes & metabolism journal*, 38(5), 330–336. <https://doi.org/10.4093/dmj.2014.38.5.330>
247. Saeki, K., Watanabe, M., Tsuboi, M., Sugano, S., Yoshitake, R., Tanaka, Y., ... & Nakagawa, T. (2015). Anti-tumour effect of metformin in canine mammary gland tumour cells. *The Veterinary Journal*, 205(2), 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.026>
248. Saengboonmee, C., Sanlung, T., & Wongkham, S. (2021). Repurposing Metformin for Cancer Treatment: A Great Challenge of a Promising Drug. *Anticancer research*, 41(12), 5913–5918. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.15410>
249. Saisho Y. (2015). Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 15(3), 196–205. <https://doi.org/10.2174/1871530315666150316124019>
250. Salgado, B. S., Monteiro, L. N., Colodel, M. M., Figueiroa, F. C., Soares, L. M., Nonogaki, S., ... & Rocha, N. S. (2013). Clinical, cytologic, and histologic features of a mammary micropapillary carcinoma in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 42(3), 382–385. <https://doi.org/10.1111/vcp.12060>

251. Samoiliuk G. V. (2021). The prevalence of tumor pathology in dogs of the metropolis. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 9(2), 98–104. <https://doi.org/10.32819/2021.92016>

252. Santos, A. A. F., Oliveira, J. T., Lopes, C. C. C., Amorim, I. F., Vicente, C. M. F. B., Gärtner, F. R. M., & Matos, A. J. F. (2010). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. *Journal of comparative pathology*, 143(4), 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.04.006>

253. Santos, A. A., Lopes, C. C., Ribeiro, J. R., Martins, L. R., Santos, J. C., Amorim, I. F., Gärtner, F., & Matos, A. J. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC veterinary research*, 9, 1. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-1>

254. Santos, M., Correia-Gomes, C., Marcos, R., Santos, A., De Matos, A., Lopes, C., & Dias-Pereira, P. (2015). Value of the Nottingham Histological Grading Parameters and Nottingham Prognostic Index in Canine Mammary Carcinoma. *Anticancer research*, 35(7), 4219–4227.

255. Santos, A., Lopes, C., Gärtner, F., & Matos, A. J. F. (2016). VEGFR-2 expression in malignant tumours of the canine mammary gland: a prospective survival study. *Veterinary and comparative oncology*, 14(3), 83–92. <https://doi.org/10.1111/vco.12107>

256. Santos, T. R., Castro, J. R., Andrade, J. C., Silva, A. C., Silva, G. M., Ferreira, F. A., ... & Saut, J. P. E. (2020). Risk factors associated with mammary tumors in female dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40, 466–473. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6360>

257. Santos, D. B., Fernandez, G. J., Pardini, L. M., Pardini, M. I. M., & Ferrasi, A. C. (2023). Transcriptomic profile of canine mammary ductal carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5212. <https://doi.org/10.3390/ijms24065212>

258. Sarli, G., Preziosi, R., Benazzi, C., Castellani, G., & Marcato, P. S. (2002). Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine

malignant mammary tumors. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 14(1), 25–34. <https://doi.org/10.1177/104063870201400106>

259. Sasaki, H., Asanuma, H., Fujita, M., Takahama, H., Wakeno, M., Ito, S., ... & Kitakaze, M. (2009). Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation*, 119(19), 2568–2577. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.798561>

260. Scharovsky, O. G., Rico, M. J., Mainetti, L. E., Perroud, H. A., & Rozados, V. R. (2020). Achievements and challenges in the use of metronomics for the treatment of breast cancer. *Biochemical Pharmacology*, 175, 113909. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113909>

261. Sennazli, G., Yildirim, F., Arun, S. S., Gurel, A., & Sonmez, K. (2015). Immunohistochemical detection of tumour cell proliferation and intratumoural microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Journal of Veterinary Research*, 59(2), 255–261. <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0038>

262. Sewoyo, P. S., Ayu Mirah Adi, A. A., Oka Winaya, I. B., & Wirata, I. W. (2023). Mammary Tumors in Dogs, Recent Perspectives and Antiangiogenesis as a Therapeutic Strategy: Literature Study. *Jurnal Medik Veterinar*, 6(2). <https://doi.org/10.20473/jmv.vol6.iss2.2023.271-287>

263. Silva, H. do C., de Oliveira, A. R., Horta, R. dos S., Rassele Merísio, A. C., de Sena, B. V., Carlos de Souza, M. C., & Flecher, M. C. (2019). Epidemiology of Canine Mammary Gland Tumours in Espírito Santo, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 47(1). <https://doi.org/10.22456/1679-9216.89901>

264. Silva, L. P., Yamamoto, P. A., de Araújo Machado, M. C., Neves, F. M. F., Azeredo, F. J., dos Santos Silva, A. C. S., ... & Estrela-Lima, A. (2023). A pilot study of chemotherapy combinations in rats: Focus on mammary cancer treatment in female dogs. *Research in Veterinary Science*, 156, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.01.009>

265. Simon, D., Schoenrock, D., Baumgärtner, W., & Nolte, I. (2006). Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in

dogs with doxorubicin and docetaxel. *Journal of veterinary internal medicine*, 20(5), 1184–1190. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb00720.x>

266. Shen, H. M., & Liu, Z. G. (2006). JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6), 928–939. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.056>

267. Shi, B., Hu, X., He, H., & Fang, W. (2021). Metformin suppresses breast cancer growth via inhibition of cyclooxygenase-2. *Oncology Letters*, 22(2), 1–14. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12876>

268. Shia, W. Y., Liu, S. M., Lee, C. S., Lin, J. L., Chou, C. C., Yuasa, Y., ... & Lee, W. M. (2011). The activity of plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker to reflect the tissue level of mammary glands tumor in dogs. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41(1), 111–118. <https://doi.org/10.56808/2985-1130.2271>

269. Shin, J. I., Lim, H. Y., Kim, H. W., Seung, B. J., Ju, J. H., & Sur, J. H. (2016). Analysis of obesity-related factors and their association with aromatase expression in canine malignant mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 155(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.05.005>

270. Sleenckx, N., Van Brantegem, L., Van den Eynden, G., Fransen, E., Casteleyn, C., Van Cruchten, S., Veldhuis Kroeze, E., & Van Ginneken, C. (2014). Angiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. *Journal of comparative pathology*, 150(2–3), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.09.005>

271. Smith, L. M., Quinnell, R., Munteanu, A., Hartmann, S., Dalla Villa, P., & Collins, L. (2022). Attitudes towards free-roaming dogs and dog ownership practices in Bulgaria, Italy, and Ukraine. *Plos one*, 17(3), e0252368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252368>

272. Song, J., Du, J., Han, L., Lin, X., Fan, C., & Chen, G. (2023). The Effect of Metformin on Triple-Negative Breast Cancer Cells and Nude Mice. *Alternative therapies in health and medicine*, 29(8), 389–395.

273. Sorenmo, K. U., Kristiansen, V. M., Cofone, M. A., Shofer, F. S., Breen, A. M., Langeland, M., ... & Goldschmidt, M. H. (2009). Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and comparative oncology*, 7(3), 162–172. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x>

274. Sorenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V., & Goldschmidt, M. H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary pathology*, 48(1), 85–97. <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>

275. Šošćarić-Zuckermann, I. C., Severin, K., Hohšteter, M., Artuković, B., Beck, A., Gudan Kurilj, A., ... & Grabarević, Ž. (2013). Incidence and types of canine tumours in Croatia. *Veterinarski arhiv*, 83(1), 31–45.

276. Souza, M. C. C. D., Flecher, M. C., Arrais, F. M., Sena, B. V. D., Giuliano, A., & Horta, R. D. S. (2023). Comparison of surgical resection of Axillary Lymph Nodes in Dogs with Mammary Gland Tumors with or without sentinel lymph node visualization with patent blue dye. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1149315. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1149315>

277. Sowbharenaya, C., Dharmaceelan, S., Subramanian, M., & Kumaresan, A. (2019). Low dose metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and piroxicam for the management of canine mammary neoplasms. *Indian Journal of Animal Research*, 53(10), 1372–1376. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3666>

278. Stan, F. (2015) Qualitative morphological assesement of tumor associated lymphatic vasculature in mammary gland neoplasia of female dogs in relation with sentinel lymph nodes metastatic infiltration. *Scientific Works. Series C, Veterinary Medicine*, 61(2).

279. Stratmann, N., Failing, K., Richter, A., & Wehrend, A. (2008). Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Veterinary surgery*, 37(1), 82–86. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2007.00351.x>

280. Suarez, L., Bautista-Castaño, I., Peña Romera, C., Montoya-Alonso, J. A., & Corbera, J. A. (2022). Is dog owner obesity a risk factor for canine obesity? a

“one-health” study on human–animal interaction in a region with a high prevalence of obesity. *Veterinary Sciences*, 9(5), 243. <https://doi.org/10.3390/vetsci9050243>

281. Suryawanshi, R. V. (2021). Assessment of efficacy and toxicity of cyclophosphamide chemotherapy in canines with malignant mammary tumor: A retrospective study. *Veterinary medicine international*, 2021(1), 5520603. <https://doi.org/10.1155/2021/5520603>

282. Szczubiał, M., & Łopuszynski, W. (2011). Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Veterinary and comparative oncology*, 9(4), 296–303. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00268.x>

283. Tamarindo, G. H., Novais, A. A., Chuffa, L. G. A., & Zuccari, D. A. P. C. (2023). Metabolic alterations in canine mammary tumors. *Animals*, 13(17), 2757. <https://doi.org/10.3390/ani13172757>

284. Tilley, H. B., Ho, S. P., Woodhouse, F., & Whitfort, A. (2023). Population Estimates and the Effect of Trap-Neuter Return Program on the Free-Roaming Dog Population in Hong Kong SAR. *Journal of applied animal welfare science: JAAWS*, 1–15. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/10888705.2023.2240229>

285. Tkaczyk-Wlizło, A. N. G. E. L. I. K. A., Śmiech, A. N. N. A., Kowal, K. R. Z. Y. S. Z. T. O. F., Róžańska, D. O. R. O. T. A., & Ślaska, B. R. Y. G. I. D. A. (2023). Histopathological evaluation of canine mammary gland tumours: a study of 92 cases. *Med Weterynaryjna*, 79(06), 6771–2023. <https://doi.org/10.21521/mw.6771>

286. Tohamy, A. F., Hussein, S., Moussa, I. M., Rizk, H., Daghash, S., Alsubki, R. A., ... & Hemeg, H. A. (2021). Lucrative antioxidant effect of metformin against cyclophosphamide induced nephrotoxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 2755–2761. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.039>

287. Tohme, S., Simmons, R. L., & Tsung, A. (2017). Surgery for cancer: a trigger for metastases. *Cancer research*, 77(7), 1548–1552. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1536>

288. Totton, S. C. (2009). *Stray dog population health and demographics in Jodhpur, India following a spay/neuter/rabies vaccination program* (Doctoral dissertation, University of Guelph).

289. Tran, C. M., Moore, A. S., & Frimberger, A. E. (2016). Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. *Veterinary and Comparative oncology*, *14*(3), 252–262. <https://doi.org/10.1111/vco.12092>

290. Trevejo, R., Yang, M., & Lund, E. M. (2011). Epidemiology of surgical castration of dogs and cats in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *238*(7), 898–904. <https://doi.org/10.2460/javma.238.7.898>

291. Ueda, Y., Wong, C., & Borchers, A. (2018). Severe lactic acidosis and hypoglycemia due to acute metformin intoxication in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, *28*(3), 274–278. <https://doi.org/10.1111/vec.12711>

292. Valdivia, G., Alonso-Diez, Á., Pérez-Alenza, D., & Peña, L. (2021). From Conventional to Precision Therapy in Canine Mammary Cancer: A Comprehensive Review. *Frontiers in veterinary science*, *8*, 623800. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.623800>

293. Varma, C. G., Teja, L., & Lavanya, K. (2021). K. Assessment of risk factors for incidence of canine mammary tumors. *The Pharma Innovation Journal*, *10*(5), 554–556.

294. Varney, D., O'Neill, D., O'Neill, M., Church, D., Stell, A., Beck, S., Smalley, M. J., & Brodbelt, D. (2023). Epidemiology of mammary tumours in bitches under veterinary care in the UK in 2016. *The Veterinary record*, *193*(5), e3054. <https://doi.org/10.1002/vetr.3054>

295. Vazquez, E., Lipovka, Y., Cervantes-Arias, A., Garibay-Escobar, A., Haby, M. M., Queiroga, F. L., & Velazquez, C. (2023). Canine Mammary Cancer: State of the Art and Future Perspectives. *Animals: an open access journal from MDPI*, *13*(19), 3147. <https://doi.org/10.3390/ani13193147>

296. Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827–839. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
297. Wang, J. C., Li, G. Y., Wang, B., Han, S. X., Sun, X., Jiang, Y. N., ... & Liu, P. J. (2019). Metformin inhibits metastatic breast cancer progression and improves chemosensitivity by inducing vessel normalization via PDGF-B downregulation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1211-2>
298. Wesolowski, C. A., Wanasundara, S. N., Babyn, P. S., & Alcorn, J. (2020). Comparison of the gamma-Pareto convolution with conventional methods of characterising metformin pharmacokinetics in dogs. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 47(1), 19–45. <https://doi.org/10.1007/s10928-019-09666-z>
299. Worley D. R. (2014). Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. *Veterinary and comparative oncology*, 12(3), 215–226. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00354.x>
300. Wypij J. M. (2017). Pilot study of oral metformin in cancer-bearing cats. *Veterinary and comparative oncology*, 15(2), 345–354. <https://doi.org/10.1111/vco.12169>
301. Xavier, P. L., Cordeiro, Y. G., Rochetti, A. L., Sangalli, J. R., Zuccari, D. A., Silveira, J. C., ... & Fukumasu, H. (2018). ZEB1 and ZEB2 transcription factors are potential therapeutic targets of canine mammary cancer cells. *Veterinary and comparative oncology*, 16(4), 596–605. <https://doi.org/10.1111/vco.12427>
302. Xie, F., Ke, A. B., Bowers, G. D., & Zamek-Gliszczyński, M. J. (2015). Metformin's Intrinsic Blood-to-Plasma Partition Ratio (B/P): Reconciling the Perceived High In Vivo B/P > 10 with the In Vitro Equilibrium Value of Unity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 354(2), 225–229. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.225698>

303. Xu, C. X., Zhu, H. H., & Zhu, Y. M. (2014). Diabetes and cancer: Associations, mechanisms, and implications for medical practice. *World journal of diabetes*, 5(3), 372. <https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i3.372>
304. Yenmis, G., Sarac, E. Y., Besli, N., Soydas, T., Tastan, C., Kancagi, D. D., ... & Sultuybek, G. K. (2021). Anti-cancer effect of metformin on the metastasis and invasion of primary breast cancer cells through mediating NF-kB activity. *Acta Histochemica*, 123(4), 151709. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151709>
305. Zaki, H. M., Ali, K. M., Abd Allah, M. Y. Y., Abouelnaga, A. M., Abdraboh, M. E., & Hussein, O. (2024). Metronomic cyclophosphamide and metformin inhibited tumor growth and repopulated tumor-infiltrating lymphocytes in an experimental carcinoma model. *BMC Research Notes*, 17(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06651-1>
306. Zeugswetter, F. K., & Schwendenwein, I. (2020). Basal glucose excretion in dogs: The impact of feeding, obesity, sex, and age. *Veterinary Clinical Pathology*, 49(3), 428-435. <https://doi.org/10.1111/vcp.12899>
307. Zhang, Y. G., Juan, D. U., Tian, X. X., Zhong, Y. F., & Fang, W. G. (2007). Expression of E-cadherin, beta-catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas. *Chinese medical journal*, 120(18), 1597–1605.
308. Zhang, D., Zhou, Q., Huang, D., He, L., Zhang, H., Hu, B., ... & Ren, D. (2019). ROS/JNK/c-Jun axis is involved in oridonin-induced caspase-dependent apoptosis in human colorectal cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 513(3), 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.011>
309. Zuccari, D. A., Santana, A. E., Cury, P. M., & Cordeiro, J. A. (2004). Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Veterinary clinical pathology*, 33(1), 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00345.x>

ДОДАТКИ

Додаток А. Список праць, опублікованих за темою дисертації

Додаток Б. Відомості щодо апробації матеріалів дисертації

Додаток В. Акти впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес і науково-дослідну роботу

Додаток Г. Акти впровадження результатів дисертації в практичну діяльність

Додаток Д. Висновок біоетичної експертизи

Додаток А. Список праць, опублікованих за темою дисертації

Наукові праці, які відображають основні наукові результати дисертації:

Статті у наукових виданнях,

включених до наукометричної бази даних Scopus:

1. **Kovalenko, M., & Bilyi, D.** (2021). Prognostic value of vascular invasion in breast tumours in she-dogs (pilot study). *Scientific Horizons*, 24(2), 54–61. [https://doi.org/10.48077/scihor.24\(2\).2021.54-61](https://doi.org/10.48077/scihor.24(2).2021.54-61) (Дисертантом проведено дослідження щодо прогностичного значення інвазії ракових клітин у кровоносні і лімфатичні судини, проаналізовано їх результати, оформлено рукопис до друку).

Статті у наукових виданнях,

включених до наукометричної бази даних Web of Science:

2. **Kovalenko, M. S., Bilyi, D. D., Skliarov, P. M., Maslikov, S. N., Suslova, N. I., Spitsyna, T. L., & Yevtushenko, I. D.** (2021). Prognostic markers of canine mammary tumours: Retrospective study of 142 cases. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(4), 649–654. <https://doi.org/10.15421/022189> (Дисертантом проведено клінічні дослідження відносно визначення предикторів за неоплазій молочної залози у сук, надано аналітичну оцінку отриманим результатам, підготовлено рукопис до друку).

3. **Kovalenko, M. S., Bilyi, D. D., & Hrebenuk, K. R.** (2023). The prognostic significance of the activities of matrix metalloproteinases-2 and -9 in dogs for mammary gland neoplasia (pilot study). *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(2), 273–277. <https://doi.org/10.15421/022340> (Здобувачем встановлено рівень експресії матриксних металопротеїназ-2 і -9 у сук із неоплазіями молочної залози і динаміку їх змін на тлі мастектомії, проаналізовано отримані дані та оформлено роботу до друку).

Статті у наукових фахових виданнях України:

4. Bilyi, D. D., & **Kovalenko, M. S.** (2023). Efficacy of metformin treatment for bitches with the mammary gland carcinoma. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 11(2), 21–28. <https://doi.org/10.32819/2023.11009> (Здобувачем розроблено протокол лікування до складу якого входив метморфін, проведено його клінічну апробацію та оцінку ефективності, підготовлено рукопис до друку).

Додаток Б. Відомості щодо апробації матеріалів дисертації

1. Коваленко, М. С. (2020). Гістологічна діагностика новоутворень молочної залози у сук. У І. В. Кирпичова, Л. І. Пархоменко, С. М. Мічківський, А. М. Поляков, Д. С. Сопов, С. В. Цвяткова, Д. Г. Руднік (Ред.), *Актуальні проблеми та наукові звершення молоді на початку третього тисячоліття (357–359)*. Луганський національний аграрний університет.

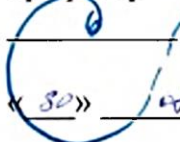
2. **Коваленко, М. С. & Білий, Д. Д.** (2021) Імуногістохімічна характеристика злоякісних пухлин молочної залози у сук. У О.А. Шуст, О.М. Варченко, С.В. Мерзлов, Т.М. Димань, В.В. Сахнюк, Р.В. Шаганенко, І.О. Ластовська, О.Г. Олешко (Ред.), *Сучасний розвиток ветеринарної медицини (50–52)*. Білоцерківський національний аграрний університет. *(Дисертант виконав імунохімічні дослідження зразків патологічного матеріалу неоплазій молочної залози, провів аналіз їх діагностичного і прогностичного значення, оформив статтю до друку)*.

3. **Коваленко, М. С. & Білий, Д. Д.** (2022). Ефективність хіміотерапії ендоксаном у сук за новоутворень молочної залози. У М. І. Цвіліховський, С. І. Голопура, Н. Г. Грушанська, П. В. Шарандак, Т. В. Немова, Т. А. Палюх (Ред.), *«Єдине здоров'я–2022» (89–91)*. Національний університет біоресурсів і природокористування України. *(Здобувач проаналізував клінічні результати метрономної хіміотерапії ендоксаном у кішок за новоутворень молочної залози, підготував до друку тези)*.

4. **Kovalenko, M., Dankevych, N. & Bilyi, D.** (2023). Clinical significance of biological markers for mammary gland neoplasms in bitches. In S. S. Arun, D. Dalgin, N. Decaro, G. Dupre, P. Freeman, J. Haggstrom, C. Mooney, H. Oguz, M. Ok, K. Özer, M. Rinkinen, G. von Samson, B. Ulutas, H. Erdogan, S. Erdogan, İ. Polat, S. Masson, J. Mortier, H. Radke, M. Aksay, A. Barut, J. Hedley, E. Kalemzaki, N. Mitchell, H. Ömer, H. Ruel (Ed.), *17th Turkish Small Animal Veterinary Association International Continuing Education Congress (222–224)*. Istanbul. *(Здобувач встановив об'єктивні біологічні маркери та можливість їх практичного впровадження, підготував тези до публікації)*.

Додаток В. Акти впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес і науково-дослідну роботу

«Затверджую»
Перший проректор –
проректор з навчальної роботи,
професор


Дмитро ОНОПРІЄНКО
« 30 » _____ 2024 р.

«Погоджено»
Проректор з наукової та
інноваційної діяльності, професор


Юрій ТКАЛІЧ
« 3 » _____ 2024 р.

Акт впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес та науково-дослідну роботу

Матеріали дисертаційної роботи аспіранта кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максима Станіславовича «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метронуомної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак» використовуються в навчальному процесі за програмою підготовки здобувачів другого (магістерського) і третього (освітньо-наукового) рівнів вищої освіти з дисциплін «Загальна і спеціальна хірургія», «Хірургічні хвороби собак і котів», «Клінічна онкологія», а також наукових дослідженнях на кафедрі ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету (протокол № 1 від 28.08.2024 р.).

Декан факультету ветеринарної
медицини Дніпровського державного
аграрно-економічного університету, доцент



Іван БІБЕН

Завідувач кафедри ветеринарної
хірургії і репродуктології Дніпровського державного
аграрно-економічного університету,
професор



Дмитро БІЛИЙ



Затверджую»
Проректор з освітньої, виховної
та організаційної діяльності
Білоцерківського національного
аграрного університету,
д-р с.-г. наук, професор
 Тетяна ДИМАНЬ
« 05 » вересня 2024 р.

АКТ

про впровадження результатів у освітній процес

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи аспіранта кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максима Станіславовича «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак» використовуються в навчальному процесі за програмою підготовки здобувачів другого (магістерського) і третього (освітньо-наукового) рівнів вищої освіти з дисциплін «Клінічна онкологія», «Сучасні клініко-інструментальні методи діагностики, лікування і профілактики хвороб тварин». «Хірургічні хвороби дрібних тварин з анестезіологією та реаніматологією», а також наукових дослідженнях на кафедрі ветеринарної хірургії та анестезіології Білоцерківського національного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри ветеринарної хірургії та анестезіології Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 4 від 4 вересня 2024 р.)

Декан факультету ветеринарної
медицини Білоцерківського національного
аграрного університету,
доктор ветеринарних наук, доцент




Світлана ВЛАСЕНКО

Завідувач кафедри ветеринарної
хірургії та анестезіології,
доктор ветеринарних наук, професор,
академік НААНУ



Михайло РУБЛЕНКО

«Погоджено»
Проректор з наукової роботи
та інноваційної діяльності,
професор


Оксана ТОНХА

«23» жовтня 2024 р.

«Затверджую»
Проректор з науково-педагогічної роботи
та цифрової трансформації,
професор


Тетяна ЛАЗУНОВА

«23» жовтня 2024 р.

Акт

про впровадження результатів дисертації у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метроромної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак», що представлена на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 21 «Ветеринарія» та спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» виконаної аспірантом кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максимом Станіславовичем, розглянуто на засіданні кафедри ветеринарної хірургії імені акад. І.О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України (протокол № 5 від 16 жовтня 2024 року).

Результати досліджень впроваджено в навчальну програму кафедри для викладання дисциплін «Хвороби собак і котів», «Загальна і спеціальна хірургія», «Оперативна хірургія з основами топографічної анатомії, анестезіологія» під час підготовки фахівців ОС «Магістр» із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Національному університеті біоресурсів і природокористування України.

Декан факультету ветеринарної
медицини, доктор біологічних наук,
професор, академік НААН України

Завідувач кафедри ветеринарної
хірургії імені академіка І.О. Поваженка,
доктор ветеринарних наук, професор



Микола ЦВІЛІХОВСЬКИЙ



Микола МАЛЮК

«Затверджую»

Проректор з науково-педагогічної та
навчальної роботи, професор



Маргарита ЛИШЕНКО

2024 р.

Акт

**впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у
навчальний процес та науково-дослідну роботу**

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи аспіранта кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максима Станіславовича «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрорномної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак» використовуються в навчальному процесі за програмою підготовки здобувачів другого (магістерського) і третього (освітньо-наукового) рівнів вищої освіти з дисциплін «Загальна і спеціальна хірургія», «Ветеринарні хірургічні технології», «Хірургічні хвороби тварин», «Оперативна хірургія з топографічною анатомією», а також наукових дослідженнях на кафедрі акушерства та хірургії Сумського національного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри акушерства та хірургії Сумського національного аграрного університету (протокол № 12 від 28.08.2024 р.).

Декан факультету ветеринарної
медицини Сумського національного
аграрного університету, професор

Людмила НАГОРНА

Завідувач кафедри акушерства та хірургії
Сумського національного аграрного
університету, професор

Оксана ШКРОМАДА

«Затверджую»
Проректор з науково-педагогічної
та методичної роботи, доцент


Інна Малецька

«30» жовтня 2024 р.

«Погоджено»
Проректор з наукової роботи та
міжнародних зв'язків, старший
дослідник


Тетяна НЕБОГА

«30» жовтня 2024 р.

Акт

впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес та науково-дослідну роботу

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи аспіранта кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максима Станіславовича на тему «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метроромної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак» використовуються в навчальному процесі за програмою підготовки здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти освітньої програми «Ветеринарна медицина» спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» в освітніх компонентах «Загальна і спеціальна хірургія», «Оперативна хірургія з основами топографічної анатомії та анестезіології», «Акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин» та здобувачів вищої освіти третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти освітньо-наукової програми «Ветеринарна медицина» спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» при викладанні освітнього компоненту варіативної складової «Експериментальна хірургія хвороб дрібних тварин», а також наукових дослідженнях на кафедрі хірургії, акушерства та хвороб дрібних тварин Одеського державного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри хірургії, акушерства та хвороб дрібних тварин Одеського державного аграрного університету (протокол № 5 від 28.10.2024 р.)

В. о. декана факультету ветеринарної
медицини Одеського державного
аграрного університету, доцент





Катерина РОДІОНОВА

В. о. завідувача кафедри хірургії,
акушерства та хвороб дрібних тварин
(Одеського державного аграрного
університету), доцент



Микола МОРОЗОВ

Додаток Г. Акти впровадження результатів наукових досліджень у практичну діяльність

Приватна лікарня ветеринарної медицини «VetVille»
м. Дніпро, пр. Богдана Хмельницького, 41

АКТ

ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ПРАКТИЧНУ ДІЯЛЬНІСТЬ

Складений в тому, що в умовах приватної лікарні ветеринарної медицини «VetVille» міста Дніпра протягом 2018-2024 років проведено моніторинг пухлинної захворюваності дрібних домашніх тварин та визначення зрушень прогностичних біологічних маркерів захворювання.

Результати дисертаційної роботи аспіранта кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максима Станіславовича "Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак" впроваджено при лікуванні сук із новоутвореннями молочної залози: після їх електрокоагуляції застосовується циклофосфамід і метформін у метрономному режимі протягом 6 місяців. Комбінована схема дозволила покращити результати лікування онкохворих пацієнтів, відновити регенеративні механізми протягом 14 днів після хірургічного втручання, що підтверджено клінічними результатами, а також динамікою гематологічних і біохімічних показників крові.

Директор приватної ветеринарної
лікарні «VetVille», спеціаліст
ветеринарної медицини


Юлія ГЕРГАУЛОВА

Приватна лікарня ветеринарної медицини «Ветсервіс»

м. Дніпро, вул. Калинова, 53

АКТ

**ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ
НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ПРАКТИЧНУ ДІЯЛЬНІСТЬ**

Складений в тому, що в умовах лікарні ветеринарної медицини «Ветсервіс» міста Дніпро проведено клінічну апробацію комплексної схеми лікування новоутворень молочної залози у собак, яка передбачала ад'ювантну хіміотерапію циклофосфамідом у комбінації із метформіном (перепрофільований лікарський засіб). Встановлено скорочення термінів регенерації післяопераційних ран на тлі відновлення гематологічних і біохімічних маркерів за злоякісних пухлин молочної залози у сук, зокрема із надлишковою масою тіла.

Результати дисертаційної роботи аспіранта кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максима Станіславовича «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак» застосовуються в практичній діяльності спеціалістів лікарні ветеринарної медицини «Ветсервіс» міста Дніпро з метою профілактики, рецидивування і метастазування у онкохворих пацієнтів.

Директор приватної ветеринарної
клініки «Ветсервіс», магістр
ветеринарної медицини

Сергій МАТЮШЕНКО

Приватна лікарня ветеринарної медицини «Best»
м. Запоріжжя, вул. Петра Сагайдачного, буд. 52

АКТ
ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ
НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ПРАКТИЧНУ ДІЯЛЬНІСТЬ

Складений в тому, що в умовах клініки ветеринарної медицини «Best» міста Запоріжжя в рамках співпраці із Дніпровським державним аграрно-економічним університетом протягом 2018-2023 років проведено дослідження частоти реєстрації онкологічної патології у собак, клінічних ознак новоутворень молочної залози, гематологічних і біохімічних зрушень крові, активності макроциклічних металопротеїназ у цих пацієнтів. Встановлені результати використовуються в комплексі діагностичних заходів за неоплазій молочної залози у сук, а також контролю ефективності лікування

Протоколи лікування за новоутворень молочної залози у сук, патогенетично обґрунтовані та розроблені аспірантом кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максимом Станіславовичем при виконанні дисертаційної роботи «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метроромної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак» використовуються в практичній діяльності спеціалістами лікарні. Застосування за злоякісних пухлин молочної залози на тлі мастектомії протягом 6 місяців метроромного режиму циклофосфаміду (ендоксану) та метформіну у дозі 12,5 мг/м² та 10 мг/кг, відповідно, дозволила подовжити медіану виживання у сук із нормальним індексом тіла (з 135,8 днів до 178,6 днів) та у пацієнтів, які мають надлишкову масу тіла (з 93,4 днів до 237,8 днів).

Директор приватної лікарні ветеринарної
медицини «Бест»
медицини «BEST»

s



ГЛУЩЕНКО
Юлія Ігорівна

**Навчально-науково-виробничий центр факультету ветеринарної
медицини ДДАЕУ
м. Дніпро, вул. Космічна, 16Б**

**АКТ
ВПРОВАДЖЕННЯ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ПРАКТИЧНУ
ДІЯЛЬНІСТЬ**

Складений у тому, що в умовах Навчально-науково-виробничого центру факультету ветеринарної медицини ДДАЕУ проведено вивчення поширення, факторів ризику, особливостей перебігу новоутворень молочної залози у сук, а також клінічна апробація розробленого протоколу їх діагностики і лікування.

Спеціалістами клініки запроваджено в практичну діяльність удосконалену схему діагностики неоплазій молочної залози у собак, яка включає додаткове визначення біологічних маркерів неоангіогенезу, проліферації та інвазії, що забезпечує об'єктивну оцінку тяжкості перебігу захворювання та біологічної поведінки пухлин молочної залози. За лікування сук із неоплазіями молочної залози, насамперед за надмірної маси тіла та ожиріння, застосовується протокол, розроблений аспірантом кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максимом Станіславовичем за виконання дисертаційної роботи «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак». Метрономна ад'ювантна терапія циклофосфамідом і метформіном на тлі мастектомії дозволяє покращити результати лікування і мінімізувати ризик прогресування захворювання.

Головний лікар ветеринарної медицини
Навчально-науково-виробничого центру
факультету ветеринарної медицини ДДАЕУ



Валерія ПЯТИБРАТ

**Державна лікарня ветеринарної медицини Шевченківського та
Соборного районів міста Дніпро
Дніпропетровська обл., Дніпровський р-н, с. Дослідне,
вул. Наукова, 67**

**АКТ
ВПРОВАДЖЕННЯ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ПРАКТИЧНУ
ДІЯЛЬНІСТЬ**

Складений у тому, що в умовах державної лікарні ветеринарної медицини Шевченківського та Соборного районів м. Дніпро проведено вивчення стану вирішення проблеми новоутворень молочної залози у собак. Зокрема, встановлено фактори ризику, терапевтичні мішені, а також ефективність хірургічного лікування та його комбінації із удосконаленою схемою лікування.

Результати дисертаційної роботи аспіранта кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максима Станіславовича «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак» використовуються в практичній діяльності. Визначення маркерів неоангіогенезу, проліферації та інвазії обґрунтовують метрономне використання циклофосфаміду і метформіну на тлі хірургічного лікування. Рекомендований протокол дозволяє підвищити ефективність лікування сук із злоякісними пухлинами молочної залози та суттєво зменшити ризики подальшого метастазування.

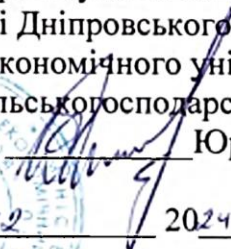
Завідувач державної лікарні ветеринарної
медицини Шевченківського та
Соборного районів м. Дніпро, к.вет.н.



Ігор ТКАЧУК

Додаток Д. Висновок біоетичної експертизи

«Затверджую»

Проректор з наукової та інноваційної діяльності Дніпровського державного аграрно-економічного університету, доктор сільськогосподарських наук, професор  Юрій ТКАЛІЧ

« 26 » 12 2024 р.



ВИСНОВОК З БІОЕТИЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

Дніпровського державного аграрно-економічного університету щодо експериментальних досліджень аспіранта кафедри ветеринарної хірургії і репродуктології Коваленко Максима Станіславовича, викладених у дисертаційній роботі на здобуття ступеня доктор філософії (PhD) «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак»

Комісія з біоетики Дніпровського державного аграрно-економічного університету в складі: голови комісії, доктора ветеринарних наук, професора Склярова П.М., заступника голови комісії, доктора ветеринарних наук, професора Сосницького О.І., членів комісії: кандидата ветеринарних наук, доцента Бібена І.А., кандидата ветеринарних наук, доцента Зажарського В.В., та секретаря комісії, кандидата ветеринарних наук, доцента Чумака В.О., розглянула матеріали досліджень дисертаційної роботи Коваленко Максима Станіславовича, викладених у дисертаційній роботі на здобуття ступеня доктор філософії (PhD) «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак».

Висновок комісії: експериментальні дослідження аспіранта факультету ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету Коваленко Максима Станіславовича, викладених у дисертаційній роботі на здобуття ступеня доктор філософії (PhD) «Клініко-експериментальне обґрунтування хірургічного лікування та метрономної хіміотерапії за пухлин молочної залози у собак» проведені з

урахуванням «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах», схвалених на Національному конгресі з біоетики (м. Київ, 2001 р.), дотриманням міжнародних вимог Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.) та відповідають Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (м. Київ, 2006 р.). За проведення діагностики та лікування собак дотримувались основних принципів біоетики, оперативні втручання здійснювали із застосуванням адекватного загального і місцевого знеболювання.

Голова комісії,
д.вет.н., професор

Павло СКЛЯРОВ

Заступник голови комісії,
д.вет.н., професор

Олександр СОСНИЦЬКИЙ

Члени комісії:
к.вет.н., доцент

Іван БІБЕН

к.вет.н., доцент

Володимир ЗАЖАРСЬКИЙ

секретар комісії,
к.вет.н., доцент

Владислав ЧУМАК

Підписи професорів Павла Склярова, Олександра Сосницького, доцентів Владислава Чумака, Івана Бібена, Володимира Зажарського «Завіряю»:

Начальниця відділу кадрів
Дніпровського державного
аграрно-економічного університету



Юлія КАРАМУШКА