

Стан Т- і В-клітинної ланок специфічного захисту у собак при пухлинах молочних залоз

Н.А. Брода¹, О.І. Віщур¹, А.Р. Мисак², Ю.Т. Салига¹, І.О. Матюха³,
Д.І. Мудрак¹, М.Б. Масюк¹, К.Б. Смолянінов¹

¹ Інститут біології тварин НААН, Львів;

² Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького;

³ ПРАТ «Компанія Ензим», Львів; e-mail: broda_n@ukr.net

Мета дослідження полягала у визначенні активності Т- і В-клітинної ланок специфічного захисту при доброякісних і злоякісних пухлинах молочних залоз собак 9–13-річного віку для оцінки рівня імунної відповіді організму на патологічний процес. Активність клітинних факторів специфічного захисту оцінювали за кількістю Т-лімфоцитів і їх субпопуляцій та В-лімфоцитів у периферичній крові собак у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана. Клінічну класифікацію та визначення стадії пухлин молочних залоз здійснювали за системою TNM. Показано, що виникнення пухлинних захворювань молочних залоз у собак спричинило значний вплив на активність специфічних механізмів захисту, особливо Т-клітинної ланки імунної відповіді у тварин зі злоякісними неоплазіями. У крові цих тварин зафіксовано зниження кількості Т-лімфоцитів (загальних і, особливо, теофілінрезистентних) на тлі збільшення числа Т-супресорів, що є важливим критерієм для прогнозування перебігу хвороби. Вказані зміни спричинили зменшення значення імунорегуляторного індексу, що свідчить про зниження лімфоцитарної активності. При цьому у крові собак зі злоякісними неоплазіями виявлено тенденцію до збільшення кількості антигеннезалежних В-лімфоцитів. Подібні зміни, тільки виражені меншою мірою, констатовано також у крові собак з доброякісними новоутвореннями молочних залоз. Таким чином, результати проведених досліджень показали, що виникнення пухлинних захворювань молочних залоз у собак супроводжувалося імуносупресивним впливом на стан специфічних механізмів захисту, особливо Т-клітинної ланки імунної відповіді у тварин зі злоякісними неоплазіями.

Ключові слова: собаки; пухлини молочної залози; Т- і В-лімфоцити; імунологічні дослідження; кров.

ВСТУП

Неоплазійні ураження у людини, за даними статистики, займають друге місце після серцево-судинних захворювань [1]. Численні дослідження показали, що ціла низка спонтанних пухлин, що трапляються у тварин, і зокрема у собак, мають схожість з неоплазіями людини [2–4]. Подібність етіології, патогенезу, симптоматики та морфології неоплазій, а також можливість спільного перебування собаки і людини в однакових умовах довкілля зумовлює використання собак як моделей для вивчення біології пухлинного процесу та розробки сучасних діагностичних і терапевтичних заходів.

Створення при Всесвітній організації охорони здоров'я (ВООЗ) Консультативної ради з ветеринарної онкології, відкриття наукового підрозділу з вивчення пухлин дрібних домашніх тварин при Національному інституті раку США вказує на зацікавленість науковців та значної частини суспільства у подоланні цієї медико-біологічної та соціально-економічної проблеми.

Пухлини молочних залоз є найбільш поширеними новоутвореннями і становлять 35–52% від усіх пухлин у дрібних тварин [5, 6]. Крім основних причин їх виникнення (низький імунний потенціал організму, генетичні передумови, дія фізичних,

хімічних та біологічних чинників) слід зауважити, що розвитку патологічного процесу сприяє широке застосування препаратів гормональної контрацепції. Контрацептиви, які використовуються для тварин, викликають небажані побічні ефекти: піометру, гіпертрофію молочних залоз, цукровий діабет, пригнічення функції надниркових залоз тощо [7–9].

Дослідженню факторів імунного захисту організму у процесі розвитку онкологічних захворювань та у визначенні ефективності цитостатичної, променевої та таргетної терапії при різних видах пухлин присвячено низку наукових праць [10–13]. У попередніх наших роботах наведені дані моніторингу пухлинних захворювань дрібних домашніх тварин, а також вікова динаміка ураження молочних залоз у собак та показники, що характеризують стан клітинної й гуморальної ланок неспецифічної резистентності організму собак у разі пухлин молочних залоз [14–16]. Проте, незважаючи на значну кількість публікацій, проблема з питань вивчення механізмів формування імунного захисту, розробки засобів активації протипухлинного імунітету та його корекції за окремих нозологічних форм неоплазій далека від вирішення.

Актуальність досліджень у клінічній імунології зумовлена значним відсотком онкологічних захворювань у тварин, з одного боку, та можливістю використання отриманих результатів для виявлення порушень (дисфункції) окремих ланок специфічного захисту при злоякісних пухлин молочних залоз та в подальшому призначення ефективної імуномодулюючої терапії, з іншого.

Відомо, що імунна система є основним протипухлинним механізмом захисту організму. Серед клітинних факторів специфічної ланки імунітету чільне місце займають макрофаги, НК-клітини, Т- і В-лімфоцити та їх субпопуляції. Велика кількість наукових праць присвячена дослідженню механізмів дії імунних клітин у процесі розвитку

пухлини, ефективності обраної терапії та передбаченню подальшого перебігу і завершення хвороби [10–13].

Метою нашого дослідження була оцінка стану Т- і В-клітинної ланок специфічного захисту у собак при доброякісних та злоякісних пухлинах молочної залози.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 12 самицях собак 9–13-річного віку, які проходили обстеження та лікування у ветеринарних клініках Львова. До контрольної групи ввійшли клінічно здорові тварини (4 особи); до першої дослідної – тварини з доброякісними новоутвореннями молочних залоз: фіброаденома, ектазія протоків, кістозно-фіброзна мастопатія, аденоз; до другої дослідної – собаки зі злоякісними неоплазіями: внутрішньопроотова аденокарцинома ($pT_4N_0M_0G_1$), інфільтруюча карцинома ($pT_3N_1M_0G_{3-4}$), тубулопапілярна карцинома ($pT_3N_0M_0G_2$), папілярна аденокарцинома ($pT_3N_0M_0G_2$). Клінічну класифікацію та визначення стадії пухлин молочної залози у них здійснювали за системою TNM [17].

Матеріалом для лабораторних досліджень слугувала кров тварин, яку брали з підшкірної вени передпліччя та зразки пухлин молочних залоз, одержані за допомогою повного хірургічного видалення пухлини (ексцизійна біопсія). У цільній крові визначали відносну кількість Т- і В-лімфоцитів і їх субпопуляцій у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана за методом Jondal і співавт. [18]. Принцип методу полягає в здатності лімфоцитів, за відповідних умов, утворювати так звані «розетки» з гетерогенними еритроцитами, в центрі якої знаходиться лімфоцит, а по периферії еритроцити, завдяки наявності на мембранах лімфоцитів специфічних рецепторів. За кількістю еритроцитів, адсорбованих одним лімфоцитом, судять про ступінь активності Т-клітин, оскільки цей феномен зумовлений

щільністю рецепторів на поверхні лімфоцитів і характеризує функціональні властивості останніх.

Для приготування градієнта густини фікол-верографіну у мірний циліндр відважували 9,5 г фіколу, розчиняли його в теплій дистильованій воді (100 мл), додавали 20 мл верографіну 60%-ї концентрації. Відносну густину в діапазоні від 1074 до 1076 кг/м³ вимірювали за допомогою ареометра марки АС-ОН-1. Як маркер для приготування індикаторної системи використовували відмиті у фізіологічному розчині еритроцити барана, які отримували з цільної дефібрированої крові за допомогою центрифугування при 1000 об/хв протягом 10 хв. З осаду еритроцитів готували 0,5%-ву завесь еритроцитів барана для загальних Т-лімфоцитів (Е-РУЛ) та 1%-ву для В-лімфоцитів (ЕАС-РУЛ).

Мононуклеарну фракцію клітин виділяли з гепаринізованої крові собак. Кров розводили забуференим фізіологічним розчином (у чисту колбу відважували 8,2 г NaCl х.ч., 2,3 г Na₂HPO₄ та 0,2 г NaH₂PO₄, доводили дистильованою водою до 1 л і розчиняли; рН розчину 7,2–7,4) у співвідношенні 1:3. Розведену кров по стінці пробірки нашаровували на розчин фікол-верографіну і центрифугували протягом 20 хв при 1500 об/хв. Піпеткою відбирали верхній шар (плазму). Після цього шприцом з довгою голкою обережно відбирали білувате кільце мононуклеарних клітин у вигляді хмаринки на межі двох фракцій, переносили у чисту пробірку і тричі відмивали забуференим фізіологічним розчином за допомогою центрифугування при 1000 об/хв протягом 10 хв.

Відносну кількість Т-загальних лімфоцитів визначали методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана. Мікроскопію мазків проводили під імерсією при збільшенні у 630 разів. За Т-розеткоутворюючі лімфоцити приймали клітини, які приєднали до себе не менше ніж 3 еритроцити барана. При цьому розрізняли

їх за кількістю приєднаних еритроцитів: нульові, які не приєднали еритроцити, малодиференційовані, які приєднали від 3 до 5 еритроцитів, середньої авідності, які приєднали від 6 до 10, а більше ніж 10 еритроцитів барана – високодиференційовані лімфоцити.

Метод визначення теофілінрезистентних Т-хелперів ґрунтується на тому, що ці клітини несуть на своїй поверхні рецептори до імуноглобулінів класу М, а Т-супресори – до імуноглобулінів G. Хелперними вважають лімфоцити, які здатні формувати розетки після їх інкубації з теофіліном (теофілінрезистентні клітини). Число Т-клітин з супресорною активністю (Ts-РУЛ) вираховували відніманням загального числа теофілінрезистентних Т-клітин від загальної кількості Т-лімфоцитів.

Метод ідентифікації В-лімфоцитів (ЕАС-РУЛ – erythrocyte-ambocceptor-complement rosetting cell) ґрунтується на наявності в них мембранних імуноглобулінових рецепторів, що забезпечує приєднання до В-лімфоцитів індикаторних клітин, котрі на своїй поверхні містять комплемент-антиген-комплекс. Як індикаторні клітини використовували еритроцити барана, сенсibilізовані антитілами і комплементом. Для приготування комплемент-антиген-комплексу застосовували готову рідку гемолітичну сироватку (титр 1:1200) та сухий комплемент морської свинки. Для отримання ЕАС-розеток на В-лімфоцитах, до 0,1 мл чистої суспензії лімфоцитів додавали 0,1 мл 1%-ї суміші еритроцитів барана, котрі містять на своїй поверхні комплекс імуноглобулін – антитіло-комплемент. Суміш інкубували у термостаті протягом 7 хв при 37°C, центрифугували при 1000 об/хв і ставили у холодильник на одну годину, після чого фіксували 0,3%-м розчином глютарового альдегіду. Зупиняли фіксацію додаванням 0,4 мл дистильованої води, потім центрифугували 5 хв при 1000 об/хв, відбирали надосад, осад ресуспендували і

робили мазок на предметному склі. Мікроскопію мазків проводили аналогічно.

Тваринам дослідних груп проводили мастектомію та відбирали матеріал для патоморфологічного дослідження. Гістологію ексцизійного матеріалу виконували згідно з стандартною методикою [19]. Із кожної пухлини брали 3-4 зразки. При виготовленні гістологічних препаратів матеріал фіксували у розчині 10%-го нейтрального формаліну, проводили через спирти зростаючої концентрації і заливали у парафінові блоки. Виготовлені зрізи фарбували гематоксиліном і еозином. Патологоморфологічну верифікацію ексцизійного матеріалу здійснювали відповідно до Міжнародної гістологічної класифікації пухлин молочної залози у собак і кішок (ВООЗ, 1999) [20]. Мікроскопію гістозрізів виконували за допомогою вмонтованої у мікроскоп відеокамери з фіксацією зображення і програмним забезпеченням «Med. Can».

Обробку результатів здійснювалася за допомогою статистичного пакета STATISTICA 8.0 з використанням однофакторного дисперсійного аналізу варіативності (ANOVA) та апостеріорних порівнянь (тест Шеффе) [21]. Відмінності між результатами груп вважали вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Обстеження собак, які надходили у клініки з приводу онкологічного захворювання молочної залози, передбачало клінічне дослідження загального стану тварин, фізикальну оцінку неоплазії молочних пакетів та соно- і рентгенографічну візуалізацію патологічних процесів, а також морфологічну верифікацію ексцизійного матеріалу. Як засвідчили результати досліджень доброякісні новоутворення у тварин першої дослідної групи були представлені: фіброаденомою, ектазією протоків, кістозно-фіброзною мастопатією та аденозом молочної залози (рис. 1).

Серед злоякісних неоплазій у самиць дослідної групи було верифіковано: внутріш-

ньопротокову аденокарциному, $pT_4N_0M_0G_1$; інфільтруючу карциному, $pT_3N_1M_0G_{3-4}$; тубулопапілярну карциному, $pT_3N_0M_0G_2$ та папілярну аденокарциному молочної залози, $pT_3N_0M_0G_2$ (рис. 2).

Перевірка розподілу емпіричних даних за допомогою непрямих методів аналізу розподілу (оцінок коефіцієнтів асиметрії і ексцесу та їх стандартних помилок), розрахункових методів (критерієм Шапіро-Уїлка) та графічних методів (гістограмами частот, коробчастими діаграмами *Boxplot*, нормально-ймовірнісними графіками виявила його узгодженість з нормальним розподілом, що зумовило використання для аналізу цих параметричних критеріїв.

Проведений порівняльний аналіз ANOVA (табл. 1) виявив статистично значущі відмінності за кількістю Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-резистентних) та імунорегуляторним індексом.

За допомогою тесту Шеффе встановлено статистично нижчі значення ($P = 0,023282$) числа Т-загальних (тотальних) лімфоцитів у периферичній крові собак із злоякісними захворюваннями молочної залози (друга дослідна група) порівняно з контрольною групою (табл. 2).

Як відомо, Т-клітини, котрі мають молекули CD4 на своїй поверхні, поділяються на два типи ефекторних клітин. Т-клітини запалення або Т-лімфоцити-хелпери типу 1 (Тх1), секретують інтерлейкін-2 (ІЛ-2), γ -інтерферон (ІФН- γ) і тумор-некротичний фактор- α (ТНФ- α) та активують макрофаги, що призводить до захоплення і руйнування чужорідних патогенів. Хелперні Т-клітини типу 2 (Тх2) секретують інтерлейкіни 4, 5, 6, 10 (ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-10) та стимулюють перетворення антиген специфічних В-лімфоцитів у антитілосекретуючі плазматичні клітини. Диференціація CD4 Т-клітин в Тх1 або Тх2 визначається типом домінуючої імунної відповіді (гуморальної або клітинної) на антиген [22].

Встановлено зменшену кількість Т-хелперів (CD4⁺) у крові собак зі злоякісними

неоплазіями порівняно зі значеннями тварин контрольної групи ($P = 0,000589$) і першої дослідної групи ($P = 0,009881$). Ці результати свідчать про імуносупресивний вплив цього захворювання на кількість теофілінрезистентної популяції Т-лімфоцитів крові.

Порівняльний аналіз кількості Т-супресорів (теофілінчутливі) у крові собак вірогідних відмінностей не виявив, однак можна спостерігати тенденцію до збільшення кількості теофілінчутливих Т-лімфоцитів, особливо у тварин зі злоякісними неоплазіями (табл. 2). У багатьох працях супресорні $CD8^+$ -клітини вважаються цитотоксичними/супресорними лімфоцитами [23–25]. Вказані зміни спричинили істотний вплив на імунорегуляторний індекс, який відобра-

жає хелперно-супресорне співвідношення. У тварин з злоякісними пухлинами цей показник був на 41,71% нижчим порівняно з клінічно здоровими тваринами ($P = 0,007090$) та на 33,54% порівняно з тваринами першої дослідної групи ($P_1 = 0,044205$).

Визначення відношення $CD4/CD8$ у крові тварин використовується для оцінки лімфоцитарної функції лімфоцитів в нормі і при патології. Збільшення кількості $CD4$ -клітин свідчить про підвищення реактивності лімфоцитів і домінуванні Т-хелперів, а $CD8$ клітин – про зниження лімфоцитарної активності [22].

Важливою причиною прогресивного росту пухлин і утворення метастазів є збільшення кількості і підвищення функціональної

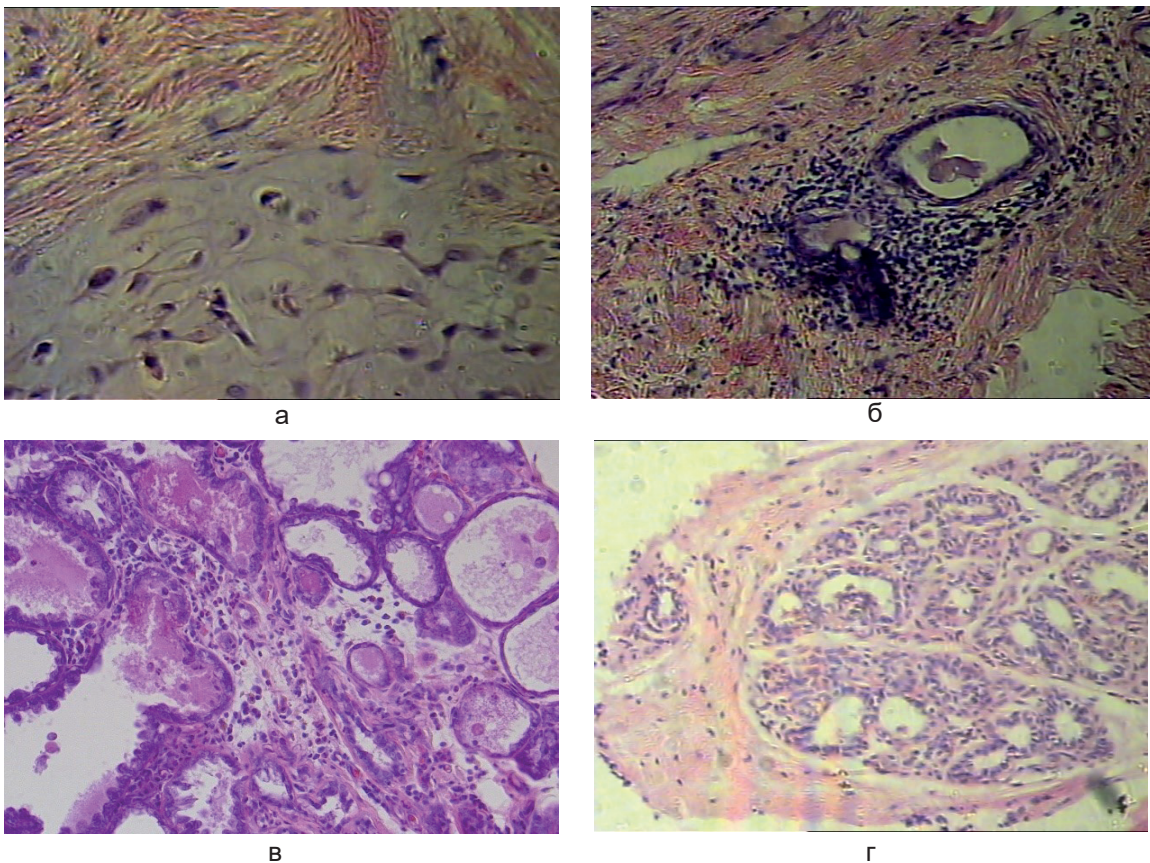


Рис. 1. Доброякісні новоутворення у тварин дослідної групи: а – фіброаденома (проліферація міоепітелію); б – сктазія протоків (розширення термінальних відділів протоків з застосом секрету та перидуктальним запальним інфільтратом); в – кістозно-фіброзна мастопатія (утворення кіст з атиповими клітинами по периферії); г – аденоз. Забарвлення гематоксиліном Караці та еозином. 3б. $\times 480$ (а, б, г), $\times 240$ (в)

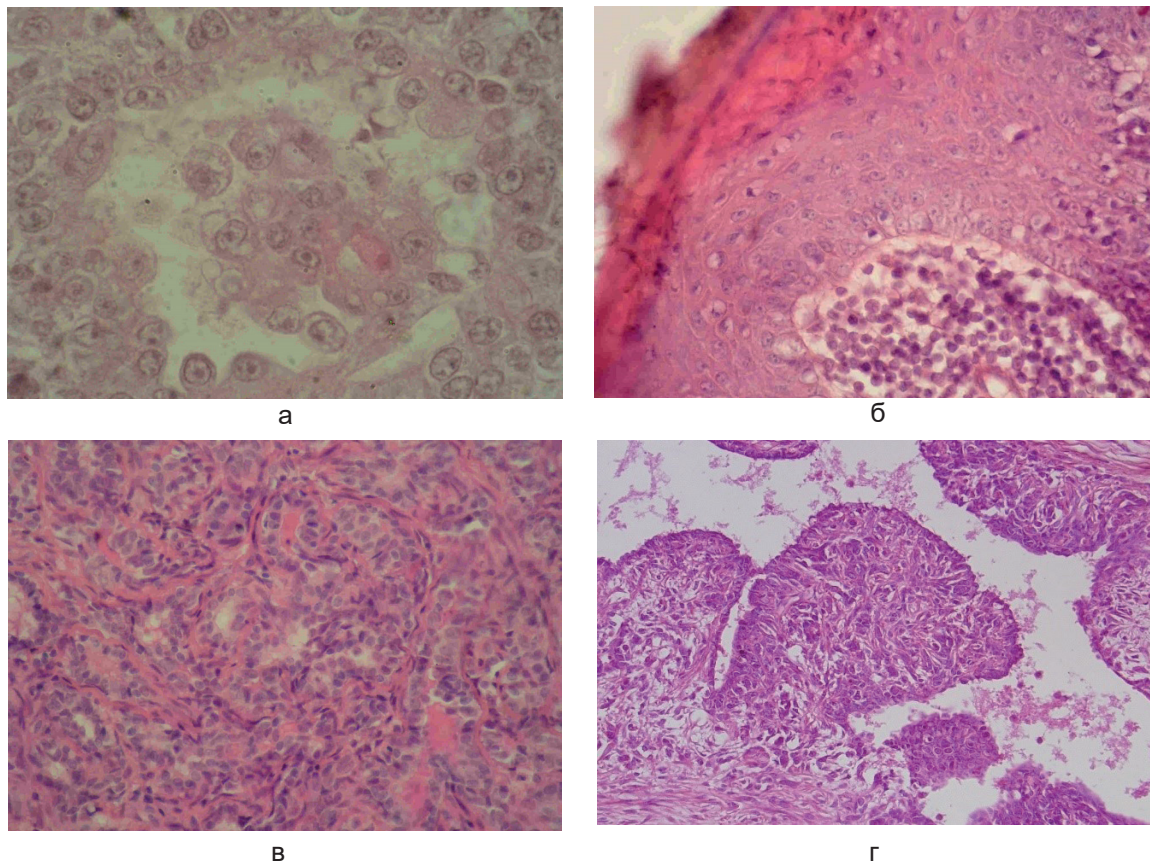


Рис. 2. Злоякісні новоутворення у тварин дослідної групи: а – внутрішньопотокова аденокарцинома; б – інфільтруюча карцинома (фрагмент проростання пухлини у шкіру); в – тубулопапілярна карцинома; г – папілярна аденокарцинома (сосочкоподібні вирости з атиповими дрібними клітинами). Забарвлення гематоксилином Караці та еозином. Зб. ×480 (а, в), ×240 (б, г)

Таблиця 1. Результати порівняльного аналізу (ANOVA) кількості Т- і В-лімфоцитів і їх популяцій у крові собак

Показники	Дисперсійний аналіз							Р
	сума квадратів ефекту	число ступенів свободи ефекту	середні квадрати ефекту	сума квадратів похибки	число ступенів свободи похибки	середні квадрати похибки	статистика Фішера	
Т-загальні лімфоцити, %	128,6667	2	64,3333	98,00000	9	10,88889	5,90816	0,022976
Т-хелпери, %	238,1667	2	119,0833	54,75000	9	6,08333	19,57534	0,000528
Т-супресори, %	18,5000	2	9,2500	55,75000	9	6,19444	1,49327	0,275402
В-лімфоцити, %	41,1667	2	20,5833	53,50000	9	5,94444	3,46262	0,076684
Т-хелпери/ Т-супресори	1,2695	2	0,6348	0,59957	9	0,06662	9,52812	0,005997

Примітка: відмінності між результатами статистично значущі при $P < 0,05$.

Таблиця 2. Результати порівняльного аналізу (тест Шеффе) кількості Т- і В-лімфоцитів і їх популяцій у периферичній крові собак ($M \pm m$, $n = 12$)

Показники	Контрольна група	Тварини з доброякісними пухлинами (І група)	Тварини зі злоякісними неоплазіями (ІІ група)
Т-загальні (тотальні) лімфоцити (Е-розеткоутворюючі лімфоцити), %	50,5±1,71	47,0±1,68 P=0,366357	42,5±1,55 P=0,023282 P ₁ =0,210860
Т-хелпери (теофілінрезистентні), %	32,8±1,11	29,0±1,08 P=0,154818	22,0±1,47 P=0,000589 P ₁ =0,009881
Т-супресори (теофілінчутливі), %	17,8±1,11	18,0±1,35 P=0,989972	20,5±1,26 P=0,339534 P ₁ =0,402383
В-лімфоцити (ЕАС-розеткоутворюючі лімфоцити), %	21,3±1,25	23,0±1,29 P=0,613994	25,3±1,11 P=0,079162 P ₁ =0,326153
Імунорегуляторний індекс (Т-хелпери/Т-супресори)	1,87±0,14	1,64±0,13 P=0,488375	1,09±0,12 P=0,007090 P ₁ =0,044205

P – статистичні відмінності між досліджуваними показниками у тварин дослідних груп порівняно з контролем; P₁ – статистичні відмінності між досліджуваними показниками у тварин другої дослідної групи порівняно з першою дослідною групою.

активності Т-супресорів [26]. Супресорні клітини з'являються у лімфоїдних органах вже через 24 год після інокуляції новоутворення і зберігаються в організмі протягом їх росту, пригнічуючи активність клітин, що здатні до відторгнення пухлини. Злоякісні пухлини ускладнюють протиракову імунну відповідь численними імуносупресивними механізмами. Вони зумовлюють накопичення імуносупресивних Т-регуляторних клітин [27].

У крові тварин обох дослідних груп кількість В-лімфоцитів істотно не змінювалась (див. табл. 2). Незначне підвищення числа цієї популяції лімфоцитів у тварин зі злоякісними неоплазіями можливо пов'язане з дією пробластомних факторів, які пригнічують імунну відповідь організму.

ВИСНОВКИ

Виникнення пухлинних захворювань молочних залоз у собак впливає на активність Т- і

В-клітинної ланок специфічних механізмів захисту організму – у крові тварин зі злоякісними новоутвореннями молочних залоз порівняно з клінічно здоровими тваринами зменшується кількість Т-лімфоцитів (загальних і, особливо теофілінрезистентних) на тлі збільшення кількості Т-супресорів. При цьому зафіксовано зниження імунорегуляторного індексу, що свідчить про зниження лімфоцитарної активності й імуносупресивний вплив цього захворювання на активність Т-клітинної ланки імунного захисту організму. Подібні зміни, тільки виражені меншою мірою, виявлено також у крові собак з доброякісними новоутвореннями молочних залоз.

Робота виконана в межах наукової тематики НДР: «Вивчити особливості формування імунної відповіді у тварин і птиці та розробити способи їх корекції за умов імунodefіциту» (державний реєстраційний но-

мер: 0106U003049) лабораторії імунології Інституту біології тварин НААН.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

N.A. Broda¹, O.I. Vishchur¹, A.R. Mysak², Y.T. Salyha¹, I.O. Matiukha³, D.I. Mudrak¹, M.B. Masyuk¹, K.B. Smolianinov¹

THE CONDITION OF T- AND B-CELLS SPECIFIC IMMUNITY IN DOGS WITH BREAST TUMORS

¹*Institute of animal biology NAAS, Lviv;*

²*Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv;*

³*PrJSC Enzym Company; e-mail: broda_n@ukr.net*

The purpose of the research was to determine the activity of T- and B-cell specific protection in dogs 9–13 years old age with benign and malignant tumors of the mammary glands to assess the level of immune response to the pathological process.

Assessment of the activity of cellular factors of immunity has been carried out by determining the number of T-lymphocytes and their subpopulations and B-lymphocytes in the peripheral blood of dogs in the reaction of spontaneous rosette formation with ram erythrocytes. The clinical classification and determination of the stage of breast tumors were carried out according to the TNM system. The studies have shown that the occurrence of breast tumor diseases in dogs has a significant effect on the activity of T- and B-cellular link of specific immunity mechanisms, especially the number of T-lymphocytes and their populations in animals with malignant neoplasia. In particular, in the blood of animals with malignant neoplasia of the mammary glands, the number of T-lymphocytes (common and, especially, theophylline resistant) decreases accompanied with an increase in the number of T-suppressors, which is an important criterion for predicting the course of the disease. These changes in the number of T-lymphocytes in the blood of dogs of the experimental groups have led to a decrease in the amount of immunoregulatory index, which indicates a decrease in lymphocytic activity. In the blood of dogs with malignant neoplasia, a tendency to increase the number of antigenic-dependent B-lymphocytes has been shown. Similar changes, only of a lesser extent, are also have been demonstrated in the blood of dogs with benign breast neoplasia. Thus, the results of the research showed that the development of mammary gland tumors in dogs was accompanied by an immunosuppressive effect on the specific

defense mechanisms, especially the T-cell link of the immune response in animals with malignant neoplasms.

Keywords: dogs; breast tumors; T- and B-lymphocytes; immunological research; blood.

REFERENCES

1. Bidyuk DM. Methodical instructions for a practical lesson for students of the III year of the medical faculty of the basics of clinical oncology. Lviv. 2019; 20 p. [Ukrainian].
2. Gargiulo G. Next-generation *in vivo* modeling of human cancers. *Front. Oncol.* 2018 Oct; 8(art 429):1-18.
3. Garden OA, Volk SW, Mason NJ, Perry JA. Companion animals in comparative oncology: One Medicine in action. *Vet J.* 2018; 240:6-13.
4. Willmann M, Hadzijusufovic E, Hermin O, Dacasto M, et al. Comparative oncology: The paradigmatic example of canine and human mast cell neoplasms. *Vet Comp Oncol.* 2019; 17(1):1-10.
5. Ivashkiv BB, Mysak AR, Homyn NM, Pricak VV. Monitoring of spontaneous neoplasia distribution in dogs in the conditions of Lviv and in the suburban area of the regional center. *Sci J Vet Med.* 2019; 2:97-104. [Ukrainian].
6. Mamchuk NA. Monitoring tumor diseases of small animals. *Sci Tech. Bull. of SSCIVMPFA and IAB.* Scientific and technical bulletin of state scientific research control institute of veterinary medical products and fodder additives and institute of animal biology. 2008; 9(3):184-8. [Ukrainian].
7. Vasetska AI. Sonographic diagnosis of changes in dog's reproductive organs and mammary gland after use contraception. *Problems of zooengineering and veterinary medicine: a collection of the Kharkiv State Zooveterinary Academy.* 2016; 32(2):52-3. [Ukrainian].
8. Prykhodko DO, Ponomarenko VP. The content of progesterone and estradiol in the blood of cats with pyometra. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The series: Veterinary Medicine.* 2013; 2(32):153-5. [Ukrainian].
9. Berezovskyi AV, Kharenko MI, Khomyn SP. Physiology and pathology of reproduction of small animals. Publishing House «Polissya». ISBN 978-966-655-851-3. 2017. [Ukrainian].
10. De Nardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell BB, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Dis.* 2011; 1 (1):54-67.
11. Fang H, DeClerck YA. Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer Res.* 2013; 73(16):4965-77.
12. Kroemer G, Senovilla L, Galluzzi L, Andre F, Zitvogel L. Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nat Med.* 2015; 21(10):1128-35.
13. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol.* 2016; 2(10):1354-60.

14. Broda NA. Species and age characteristics of tumor diseases of small domestic animals. *Sci J Vet Med.* 2010; 12(2(1)):24-7. [Ukrainian].
15. Broda NA. Humoral factors of the body's protection in dogs with tumors of the mammary glands. *Exp Clin Physiol Biochem.* 2009, 4:50-3. [Ukrainian].
16. Broda NA, Vishchur **OI**, Ratskyi MI, Leshovska NM. The number of immune complexes in the blood of dogs with tumors of the mammary glands. *Fiziol Zh.* 2014; 60(3S):208. [Ukrainian].
17. Owen LN. *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals.* Geneva: World Health Organisation. 1980.
18. Jondal M, Holm G, Wigrell A. Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med.* 1972; 36(2):207-15.
19. Goralskyj LP, Homych VT, Kononskyj OI. The main base of histological techniques and morphological methods in normal and pathological conditions. Zhytomyr: «Polissja». 2015. [Ukrainian].
20. Misdorp WE, Else R, Hellmen E, Lipscomb T. *Histological classification of mammary tumors of the dog and cat (2nd series).* Armed Forces Inst. Pathol. in cooperation with Amer. Registry of Pathol. and World Health Organization Collaborating Center for World Reference on Compar. Oncol. Washington DC. 1999; 58 p.
21. Petrovska I, Salyha Yu, Vudmaska I. Statistical methods in biological research: educational and methodological manual. Kyiv: Agrarian Science. 2022. [Ukrainian].
22. Abbas AK, Lichtman AH, Pillay S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System: 6th Edition.* Publishing house: «Medicine», manual. ISBN: 978-617-505-808-4 (9786175058084). 2020. [Ukrainian].
23. Rekalova E.M, Panasyukova OR, Matvienko YA, Grabchenko NI, Yasyr SG, Singaievskiy MB, Strafun OV, Kulik MI. Special features of systemic immunity in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease depending of smoking status. *Asthma Allergy.* 2016; 2:21-8. [Ukrainian].
24. Hrushko VV. Comparative characteristics of the results of using ademetionine and its remote effects on cellular immunity parameters in highly skilled athletes and in patients with chronic hepatitis C. *Achievements Clin Exp Med.* 2018; 4:75-80. [Ukrainian].
25. Kuznetsovoi LV, Babadzhanova VD, Kharchenko NV, editors. *Immunology. National textbook for medical universities of IV accreditation level and medical faculties of universities.* Vinnytsia TOV «Merkyuri-Podillya». 2013; 565 p. [Ukrainian].
26. Whiteside TI, Herberman RB. Extravasation of antitumor effector cells. *Invasive Metastasis.* 1992; 19:128.
27. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003; 4:330-6.

*Матеріал надійшов
до редакції 20.03.2023*