

На правах рукописи

Кочевалина Марина Юрьевна

ИЗМЕНЕНИЯ ЗАПАХА ИНДИВИДА, СВЯЗАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ ПЕРЕВИТОЙ
ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ

1.5.8. – Математическая биология, биоинформатика

1.5.5. - Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем передачи информации им. А. А. Харкевича Российской академии наук (ИППИ РАН).

Научный руководитель:

Родионова Елена Ивановна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории № 8 «Обработка сенсорной информации»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Александрова Антонина Юрьевна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов канцерогенеза

ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

Бонарцев Антон Павлович

доктор биологических наук, доцент кафедры Биотехнологии

МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук.

Защита состоится « _____ » _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.101.01 при Институте проблем передачи информации имени А. А. Харкевича Российской академии наук (ИППИ РАН) по адресу: 127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д. 19, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИППИ РАН, а также на сайте ИППИ РАН по адресу: <http://iitp.ru/ru/dissertation/>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Казенников О.В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. С развитием новых методов лечения онкологических заболеваний становится более актуальной и их ранняя диагностика. По данным на 2008 год, основными причинами смерти людей были сердечно-сосудистые заболевания и злокачественные опухоли. К настоящему времени ситуация существенно не изменилась. Выживаемость пациентов, как правило, зависит от того, на какой стадии развития диагностировали опухоль, и пациент получил лечение. Так, средняя пятилетняя выживаемость пациентов с диагностированными злокачественными опухолями легкого (первое место по частоте встречаемости у мужчин и второе после рака молочной железы — у женщин) составляет 16,3 %, но при обнаружении новообразования на стадии локализованной опухоли выживаемость составляет 52 %, а на стадии регионарных и отдаленных метастазов выживаемость снижается до 24 % и 4 % соответственно. Результаты исследований показывают, что и для других видов злокачественных опухолей, например, гепатокарциномы — одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей с высоким уровнем заболеваемости и смертности, ранняя диагностика имеет решающее значение для эффективного лечения и выживаемости пациентов.

Развитие злокачественных опухолей различной природы уже на ранних стадиях изменяет состав летучих органических соединений (ЛОС), что делает перспективным поиск новых подходов к ранней неинвазивной диагностике этих заболеваний. Изменения состава ЛОС, связанные с развитием злокачественных опухолей, исследуются несколько десятилетий. Приборы и технологии распознавания ЛОС непрерывно совершенствуются, однако надежные для диагностики летучие биомаркеры пока не обнаружены, что ограничивает развитие неинвазивной диагностики онкологических заболеваний.

Большинство существующих исследований проводилось на людях, но анализ ЛОС выделений больного человека связан с большими трудностями. На состав ЛОС влияют не только тип и особенности опухоли, но и пол, возраст, эмоциональное состояние, привычки (курение, диета и др.), принимаемые медикаменты и многие другие факторы. Особое влияние на формирование ЛОС оказывает геном, так как значительная часть ЛОС определяется генотипом индивида, а человеческая популяция очень гетерогенна. Во всех выделениях человека очень много ЛОС, например, в выдыхаемом воздухе их насчитывается более трех тысяч. Все эти факторы превращают сравнение состава ЛОС у разных людей и поиск веществ, маркирующих заболевание, в непростую задачу.

Проблему многообразия анализируемых ЛОС при их изучении мы предложили решить, используя в качестве модели «унифицированных пациентов» линейных мышей, генетические и другие различия между которыми существенно меньше, чем различия между

людьми. Известно, что в развитии онкологических заболеваний у мышей и человека есть некоторые различия, но в данной работе речь идет о принципах поиска значимых ЛОС, а не о самих веществах. Мы предлагаем использовать мышей, выведенных для исследования механизмов развития опухолевых процессов на основе перевиваемых опухолей, и перевиваемые опухоли. Эта методика позволяет одновременно перевить примерно равное количество опухолевой ткани всем подопытным животным, что приводит к относительно синхронному развитию у них опухолей. Такая модель дает возможность контролировать развитие опухоли и анализировать изменения в спектре ЛОС, связанные с этапами и особенностями ее развития.

Для поиска маркирующих заболевания ЛОС необходимо не только анализировать состав выделений, но также иметь инструмент для сравнения запаховых смесей, выделяемых больными и здоровыми организмами, и выявления компонентов, связанных с болезнью. В настоящее время не существует инструментальных методов для решения этой задачи. К поиску летучих маркеров нужны другие подходы, которые способствовали бы разрешению главных сложностей в решении этой задачи: снижению разнообразия анализируемых ЛОС, контролю течения болезни и быстрому сравнению паттернов ЛОС для обнаружения присутствия летучих маркеров заболевания.

В отличие от даже самых современных газовых анализаторов, животные-макросматики с успехом решают задачу сравнения запаховых смесей и выделения компонентов, связанных с болезнью. Поэтому мы предлагаем использовать собак и мышей для сравнения запахов здоровых и больных животных и получения подтверждения того, что запахи однозначно различны, и эти различия связаны с развитием заболевания. Обонятельная система этих животных очень чувствительна, она содержит более 1000 активных обонятельных рецепторов. Благодаря этому, а также тем поведенческим задачам, которые эти животные решают с помощью обоняния в природе, они способны запоминать большое количество искомым веществ, анализировать и сравнивать смеси, выделяя из них значимые компоненты. Запах болезни — мощный стимул для животных, и они реагируют на этот запах без дополнительного обучения. Более того, недавно показано существование специализированного семейства генов обонятельных рецепторов млекопитающих, которые с большой вероятностью специализированы для выявления инфицированных индивидов по их выделениям.

Мы не можем получить от животных информацию о составе запаховой смеси, но в отличие от приборов, животные могут выделять из смесей ЛОС заданные паттерны, связанные с теми или иными особенностями организма (полом, индивидуальным запахом, болезнью).

Можно обучить животное или поставить эксперимент таким образом, чтобы оно указывало именно на те смеси из предложенных, которые содержат близкие паттерны ЛОС. Такие способности дают возможность использовать собак и мышей в качестве лабораторных биосенсоров. Создание логической модели в виде базы данных, ориентированной на изучение влияния различных факторов позволит формализовать различные переменные, которые могут иметь особое значение для биосенсоров. Структура таблиц в комплексе с алгоритмами анализа данных необходима для эффективной оценки сведений о влиянии переменных, оказывающих различное влияние на выбор животного биосенсора. При этом системность решения задачи состоит в объединении знаний в области поведенческой зоологии, онкологии, иммунологии и информатики.

Целью настоящего исследования было показать, что гепатокарцинома с ранних стадий развития влияет на формирование специфического комплекса ЛОС у больных животных.

В рамках поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Проследить динамику изменений параметров модельной опухоли и выделить основные этапы развития перевитой ткани гепатокарциномы.
2. Выявить факторы, не связанные с развитием гепатокарциномы, изменяющие комплекс ЛОС в выделениях модельных животных.
3. Показать изменение комплекса ЛОС в выделениях животных под влиянием развития перевитой гепатокарциномы.
4. Выяснить, существует ли комплекс ЛОС, связанный со злокачественным ростом, а не с сопутствующими ему процессами.
5. Создать специализированную базу данных для анализа влияния факторов, не связанных с развитием опухоли, как на формирование комплекса ЛОС, так и на определения комплекса ЛОС животными-сенсорами. С помощью базы данных проанализировать влияние этих факторов на спектр ЛОС.

Объектом исследования является комплекс ЛОС мочи модельных пациентов с перевитой опухолью гепатокарциномы.

Предметом исследования является изменение комплекса ЛОС мочи доноров, которое происходит как под влиянием развития опухоли, так и под влиянием других факторов.

Научная новизна исследования:

1. Впервые показано, что гепатокарцинома меняет запах индивида, формируя специфический комплекс ЛОС в различных выделениях (фекалиях и моче), который могут отличить две разные группы животных-сенсоров (собаки и мыши) и который не зависит от процессов, сопровождающих многие заболевания, например, от воспаления, иммунного ответа, стресса и др.

2. Сопоставление данных экспериментов с животными-сенсорами и результатов исследования параметров перевитой опухолевой ткани показало, что комплекс ЛОС меняется от стадии к стадии развития опухоли, и животные-биосенсоры способны уловить эти изменения.
3. Создана специализированная база данных, которая позволила проанализировать влияние на комплекс ЛОС большого количества факторов, не связанных с развитием опухоли.
4. Использование базы данных позволило впервые показать, что возраст модельной мыши и любая, даже небольшая, физическая травма оказывают существенное влияние на запах индивида, увеличивая его сходство с запахом животных с развивающейся опухолью. Эффект от последовательно полученных животным травм накапливается — каждое следующее повреждение все больше изменяет спектр ЛОС здоровой мыши, приближая его к запаху больного организма с перевитой опухолью.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Животные-сенсоры различают комплекс ЛОС, связанный с развитием гепатокарциномы, в выделениях (моче и фекалиях) больных и здоровых мышей.
2. Существует специфический комплекс ЛОС, связанный с развитием злокачественной опухоли и не зависящий от сопутствующих процессов, например таких, как воспаление, иммунный ответ на введение чужеродной ткани и стресс.
3. Стадия развития злокачественной опухоли влияет на формирование специфического комплекса ЛОС.
4. Использование базы данных позволяет оценить вклад в формирование комплекса ЛОС и значимость вклада параметров эксперимента, не связанных с течением заболевания, для животных-сенсоров.

Практическая значимость исследования. Наши эксперименты позволяют заключить, что использование животных-макросматиков в сочетании с регулируемой моделью развития опухоли весьма перспективно и может быть очень полезным для поиска маркеров злокачественного роста. Животные-макросматика способны детектировать как весь спектр ЛОС, сопутствующих болезни, так и незначительные изменения этого спектра при ее течении. Используя «модельных пациентов»-мышей, сопоставляя стадии развития болезни, реакцию собак, гистологический и физиологический анализ процессов, протекающих в организме, с полученными с помощью современных аналитических методов спектрами ЛОС, в будущем можно будет предположить, какие метаболические пути ответственны за изменения запаха и диагностический потенциал спектров ЛОС. Исследования состава ЛОС на ранних стадиях развития опухоли полезны для поиска ранних

диагностических маркеров злокачественного роста, а также могут выявить механизмы, лежащие в основе изменений спектра ЛОС в ходе злокачественного роста.

Апробация работы. Диссертация апробирована _____ года на научной конференции лаборатории № 8 «Обработка сенсорной информации» Института проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН.

Основные результаты работы были доложены и обсуждены на следующих конференциях:

- 1) «Европейская организация исследований хеморецепции», ECRO 2019 (Триест, 2019).
- 2) «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2017).
- 3) «Европейская организация исследований хеморецепции», ECRO 2014 (Дижон, 2014).
- 4) «Информационные технологии и системы 2014» (Нижний Новгород, 2014).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение; обзор литературы материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Диссертация включает 32 рисунка и 18 таблиц. В конце работы дан список литературы, содержащий 378 ссылок.

Степень достоверности и апробация результатов. По материалам диссертации опубликованы три статьи, которые изданы в журналах, рекомендованных ВАК, и представлены в 15 публикациях тезисов докладов международных и российских конференций.

Личный вклад. Все результаты, включенные в диссертацию, получены лично соискателем или при его непосредственном участии, за исключением разделов 2.1.1. и 2.2.2.1., выполненных соавторами публикации. Обсуждение и интерпретация результатов осуществлялись автором совместно с научным руководителем и соавторами публикаций.

Основное содержание работы

Введение содержит обоснование актуальности исследований, формулируется цель, ставятся задачи диссертационной работы, излагается научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Глава 1. Обзор литературы. Раздел 1.1. Запах индивида и индивидуальный запах. Первая часть литературного обзора посвящена современным представлениям о том, что такое индивидуальный запах и запах индивида. В ней особенное внимание уделено вкладу генома и влиянию заболеваний на обонятельный паттерн индивида. Изменения в метаболических путях в работе генов, связанных с заболеваниями, приводят к накоплению или дефициту определенных метаболитов, которые, в свою очередь, оказывают влияние на

состав ЛОС в выделениях пациентов. Следовательно, можно выделить часть запахового образа и даже определенные ЛОС, которые могут быть маркерами этих изменений в организме, вызванных заболеваниями. Эти маркеры, в свою очередь, могут быть использованы при диагностике заболеваний или при контроле состояния пациента в ходе лечения.

Раздел 1.2. Особенности развития злокачественной опухоли и их связь с формированием специфического паттерна ЛОС. Специфические черты гепатокарциномы. Во второй части литературного обзора представлена информация о специфике развития онкологических заболеваний. Прогрессия опухоли — сложный многоступенчатый процесс, включающий изменения работы различных генов и перестройки метаболизма, что приводит к формированию специфического комплекса ЛОС в выделениях больного. Приведены некоторые особенности гепатокарциномы.

Раздел 1.3. Использование модельных животных. В третьей части описаны эксперименты с животными. Животных используют и для моделирования развития опухолей, и как биосенсоров. Уже несколько десятилетий известно, что животные-биосенсоры могут по запаху выделений больного организма детектировать наличие у него онкологического заболевания, однако остается открытым вопрос, что именно в выделениях больного служит для биосенсоров маркером злокачественного роста. Кроме того, во всех выделениях любого организма тысячи ЛОС, несущих информацию не только о здоровье донора, но и о рационе, возрасте, возможном сопутствующем стрессе и о многом другом. Достоверно неизвестно, как животные выделяют в этом многообразии запахов маркирующий заболевания паттерн ЛОС. В этой главе описаны различные методики работы с животными-биосенсорами (мышами и собаками), их достоинства и недостатки, а также исследования «запаха болезни», проведенные с использованием биосенсоров.

Раздел 1.4. Специализированные базы данных для хранения и обработки информации, полученной в биологических экспериментах. В заключительной части представлены примеры применения баз данных, а также приведены варианты проблем, которые базы данных помогают решить. Обсуждается необходимость создания и использования специализированной базы данных как основного инструмента для анализа большого числа различных показателей, ориентированной на изучение влияния разных факторов.

Глава 2. Материалы и методы исследования.

Раздел 2.1. Экспериментальная модель опухоли. Сбор образцов. Экспериментальной моделью служили самцы гибридных мышей BDF1-f1 (DBA2 x C57Bl/6). Мы использовали штамм Н33 перевиваемой гепатокарциномы мышей, полученный в НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН из ГЦК, индуцированной ранее у таких же

гибридных самцов мышей BDF1-f1 однократным внутрибрюшинным введением 90 мг/кг диэтилнитрозамина. Опухолевые клетки трансплантировали 2-месячным гибридным самцам BDF1, а затем ткань развившейся опухоли подкожно перевивали 2-месячным экспериментальным животным, использовавшимся в исследовании. Перевиваемая опухоль дает возможность следить за ее развитием и анализировать изменения спектра ЛОС, связанные со стадией развития опухоли. В качестве контроля использовали здоровых гибридных мышей BDF1 того же пола и возраста, содержащихся в тех же условиях на той же диете, что и мыши с перевитой опухолью. Были использованы три группы контрольных животных. Первая группа — интактные здоровые мыши, вторая — животные, подкожно инъецированные 0,5 мл 0,9 % физиологического раствора, и третья — мыши с трансплантированной тканью здоровой печени. Всего было использовано 658 животных. У мышей собирали образцы мочи и фекалий для предъявления животным-биосенсорам. Всего было собрано 8859 проб мочи и 827 проб фекалий.

Исследование изменений перевитой опухолевой ткани H33 и ткани здоровой печени мышей. Для исследования изменения массы и объема перевитой ткани в первые 10–14 дней после трансплантации ткани было использовано 145 мышей. В течение 10–14 суток с помощью эфира каждые 24 часа умерщвляли от 3 до 10 самцов с перевитой тканью здоровой печени и с перевитой опухолевой тканью. Животных взвешивали, вскрывали кожу в области лопаток и описывали количество узлов перевитой ткани, их цвет, прорастание сосудами и месторасположение. Ткань развивающейся опухоли извлекали, измеряли длину, ширину, толщину узлов, взвешивали их и рассчитывали общий объем и относительную массу (отношение массы перевитой ткани к массе мыши) перевитой ткани.

Раздел 2.2. Эксперименты с животными биосенсорами. В этом разделе описаны схемы экспериментов с двумя группами сенсоров: мыши и собаки. Эксперименты с мышами-сенсорами проводили методом «привыкания-генерализации», который позволяет оценивать степень сходства и различия запахов, в двух разных модификациях (рис. 1). Первая модификация метода заключается в том, что на стадии привыкания предъявляли один образец мочи мыши, а на стадии распознавания — одновременно два образца (один из них мог быть таким же, как первый, а второй всегда отличался от первого). Вторая модификация метода отличается от первой тем, что на стадии распознавания сенсорам последовательно по одному предъявляли несколько образцов. Парное предъявление образцов позволяло быстро сравнивать запахи, например, запах мочи здорового и больного донора. Последовательное предъявление образцов позволяло предъявлять мышам до 12 образцов и сравнивать образцы, полученные от одной и той же мыши, взятые в разных состояниях, например, до и после контрольной инъекции или после контрольных инъекций

разного типа. Метод основан на спонтанных реакциях мышей при предъявлении запаховых раздражителей, метод был признан эффективным и применялся многими исследователями.

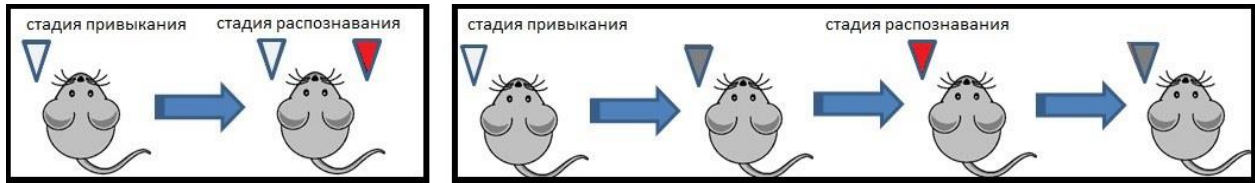


Рис. 1. Модификации метода «привыкание-генерализации». В левой части рисунка показана модификация, во время которой на стадии распознавания сенсорам предъявляли одновременно два образца. Правая часть рисунка — на стадии распознавания сенсорам последовательно предъявляли по одному образцу.

Для сравнения по запаху образцов мочи также были использованы специально обученные собаки. Собак обучали и сопровождали профессиональные инструкторы. Собаки были обучены методу поиска «выбор по подобию», который применяется в научных исследованиях и в криминалистической одорологии. Перед каждым экспериментом собаке давали занюхать банку со «стартовым» (эталонным) образцом, аналогичным тому, который она должна была обнаружить среди контрольных образцов. Собака запоминала запах стартового образца, а затем выбирала наиболее похожий на него из предложенных 12 образцов (рис. 2).



Рис. 2. Расположения образцов в зале для проведения экспериментов с собаками.

При поиске образца мыши с перевитой опухолью стартовым образцом служил запах

мочи одной больной мыши, а в кругу для поиска среди контрольных образцов стоял тестовый образец мочи другой больной мыши для того, чтобы собака не определяла образец по индивидуальному запаху мыши. Мы считали, что собака сделала правильный выбор, если она нашла банку, содержащую мочу больной мыши. Каждый эксперимент фиксировался в бумажном протоколе и на видеозаписи.

Раздел 2.3. Создание специализированной базы данных Odor of disease (ODD).

Современные исследования показывают, что практически любое изменение обмена веществ организма отражается на выделяемом им комплексе ЛОС. Перед нами стояла задача проанализировать факторы, которые могли повлиять как на комплекс ЛОС, выделяемый животным. Мы проверяли влияние 11 факторов на формирование специфического паттерна ЛОС мочи. Среди этих факторов были такие, например, как возраст мышей; количество инъекций, перенесенных животным; время хранения образца мочи. Трудоемкость экспериментов по исследованию изменений комплекса ЛОС с одной стороны и необходимость анализа влияния перечисленных факторов на результаты экспериментов с другой привели нас к поиску метода, позволяющего оценить влияние упомянутых факторов без проведения прямых экспериментов по исследованию каждого из них. Современные электронные базы данных позволяют не только накапливать и хранить данные, но формулировать новые вопросы ко всей совокупности данных. Даже относительно простая системная обработка данных, собранных в базе, выявляет принципиально новую информацию.

С самого начала исследований мы строили эксперименты так, чтобы каждый из них можно было разбить на «элементарные события» — реакцию животного-биосенсора на определенную пробу мочи для того, чтобы можно было сравнивать «элементарные события» из различных экспериментов. Все эксперименты проводили в одних и тех же строго контролируемых условиях и подбирали переменные параметры проб таким образом, чтобы от «события к событию» менялся только один параметр, редко — два. Таким образом, был собран большой архив данных, для анализа которых была создана специализированная реляционная база данных. В собранном архиве каждый эксперимент записан в виде комплекса «элементарных событий». Этот метод был особенно эффективен для экспериментов с собаками, каждый из которых содержал 12 проб мочи мышей, которые собака должна была исследовать. Каждая проба отличалась по набору параметров: мыши из разных контрольных и экспериментальных групп, разный возраст мышей, разное расположение проб в кругу и т. д. Собранные в базе такие «элементарные события» можно по-разному группировать для анализа с целью получения ответов на поставленные вопросы. Это позволило проанализировать влияние количественных и качественных характеристик образцов и условий эксперимента на реакцию животного-биосенсора. Созданная нами база

данных объединяет информацию о мышах — моделях заболевания, всех собранных пробах мочи, животных-сенсорах, условиях и результатах проведения экспериментов. Таким образом было создано несколько блоков данных: информация о животных, о пробах и экспериментах. Эта информация легла в основу создания таблиц. Разработка структуры базы данных проходила в два этапа: создание таблиц с уникальными структурами, оптимизирующими сбор данных экспериментов, и анализ информации, для чего предусмотрели наличие связей между таблицами и сформировали запросы, в структуру которых входили как сами таблицы, так и другие запросы, причем каждый запрос на анализ выбранного множества данных использует не эксперимент, а определяемый в запросе уникальный набор «элементарных событий», которые могут соответствовать проведенному реальному эксперименту или подбираться согласно необходимым для анализа параметрам.

Благодаря встроенному в СУБД Microsoft Access языку программирования VBA (Visual Basic for Applications) разработанная база данных дополнена рядом подпрограмм, которые обеспечили удобство работы с исходными данными. Связь между отдельными таблицами в базе организована по принципу «один-ко-многим», использование ключевых полей и кодировки позволяет избежать ошибочного дублирования информации (рис. 3).

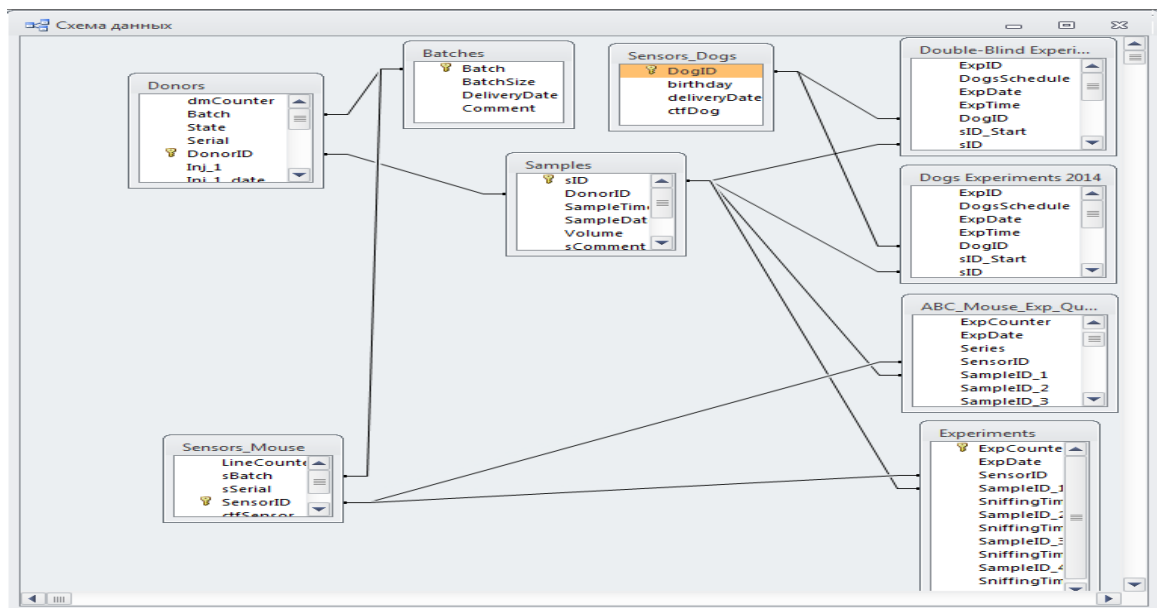


Рис. 3. Схема базы данных.

Глава 3. Результаты и обсуждение.

Раздел 3.1. Изменения перевитой ткани опухоли и здоровой ткани печени. В

разделе приведены результаты морфологического исследования перевитой ткани. Исследование проводили по трем параметрам: объем ткани, масса ткани и относительная масса ткани. Динамика изменения параметров представлена на примере изменения массы перевитой ткани (рис. 4).

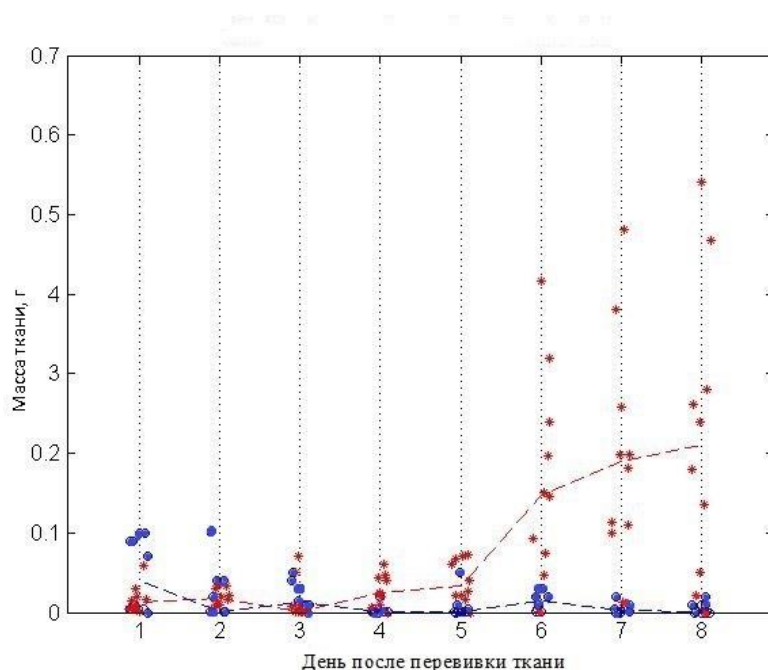


Рис. 4. Изменение массы ткани опухоли (красные точки) и здоровой ткани печени (синие кружки) по дням после перевивки и графики их средних значений (пунктиром). По оси абсцисс показаны дни после перевивки.

Масса перевитой ткани уменьшалась в первые трое суток. На 4-е сутки и далее значения массы здоровой ткани печени были близкими к нулю, а масса опухолевой ткани, напротив, начинала расти. К 6-м суткам масса перевитой опухолевой ткани в несколько раз превышала свою начальную массу и продолжала увеличиваться.

Раздел 3.2. Оценка влияния факторов, не связанных с болезнью. В разделе представлены результаты по исследованию влияния факторов, не связанных с прогрессией опухоли, на спектр ЛОС, выделяемый животным. Очевидно, что инъекция физиологического раствора, процедура перевивки здоровой или опухолевой ткани может менять запах тела животного. Мы исследовали, меняется ли запах тела при проведении этой простой медицинской процедуры, насколько большой вклад вносит физическое повреждение животного в его «обонятельный образ» и к чему приведет повторение наносимых повреждений.

Нами было показано, что мыши-сенсоры отличают по запаху образцы одного и того же самца BDF до и после введения физиологического раствора. Это говорит о том, что паттерн ЛОС мочи содержит информацию о травме, стрессе и воспалительном процессе, иммунной реакции организма, которые сопутствуют даже небольшой травме.

Для ответа на вопрос о том, насколько различны спектры ЛОС, выделяемые экспериментальными животными после инъекций физиологического раствора и ткани здоровой печени, мы провели серию экспериментов по сравнению запаха образцов мочи

одного и того же самца BDF, собранных после введения физиологического раствора и последующего введения ткани здоровой печени. Введения проводили последовательно с промежутком от двух до четырех недель. Всего провели 10 таких экспериментов и 10 экспериментов, в которых запаховые образцы мочи самцов мышей после инъекции физиологического раствора и после инъекции ткани здоровой печени предъявляли в обратном порядке. На рисунке 5 видно, что сенсоры хорошо отличают по запаху мочу мыши после подкожного введения физиологического раствора от мочи той же мыши, которой спустя 14 дней подкожно ввели здоровую ткань печени.

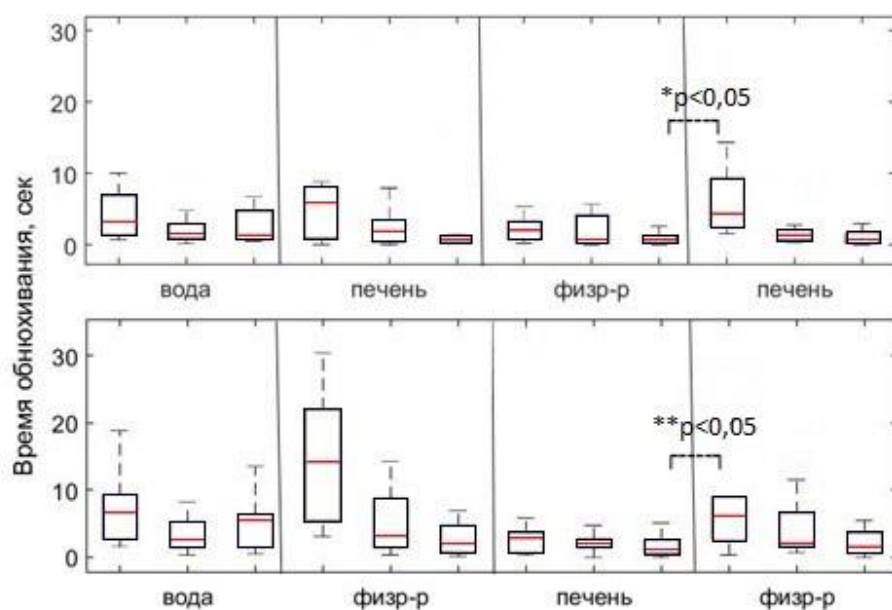


Рис. 5. Исследование образцов мочи самцов мышей после инъекций физиологического раствора и ткани здоровой печени. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов: 1–3 столбцы — образцы воды, столбцы 4–6 и 5–9 — два последовательно предъявляемых образца мочи самца BDF после введения ткани здоровой печени (верхний блок) и после инъекции физиологического раствора (нижний блок). Столбцы 10–12 — образцы мочи самца BDF после введения физиологического раствора (верхний блок) и ткани здоровой печени (нижний блок). Нижняя и верхняя граница прямоугольника — 0,25- и 0,75-квантиль. Красная черта — медиана (0,5-квантиль). «Усы» диаграммы и крестики показывают минимальное, максимальное значение выборки и выбросы значений соответственно.

Летучий метаболом, отражающий как специфические, так и неспецифические метаболические изменения, связанные с болезнью, формирует «обонятельный образ» болезни. При лечении большинства заболеваний пациентам наносятся различные физические повреждения, например, многочисленные инъекции, биопсии, резекции и т. д. Однако изменение метаболома летучих веществ в результате физической травмы ранее не изучалось. Мы впервые показали, что даже незначительные травмы меняют спектр ЛОС, выделяемый

животным, и решили расширить наш эксперимент и выяснить, находит ли накопление травм отражение в комплексе ЛОС, выделяемом животными.

Наличие трех введений в истории модельной мыши статистически достоверно увеличивает вероятность выбора собакой-биосенсором образца этого животного как больного (рис. 6). Причем, не имеет значения, было ли последнее введение контрольным (введение физраствора или ткани здоровой печени) или перевитой опухолевой ткани гепатокарциномы. В обоих случаях собаки-биосенсоры достоверно чаще выбирают образцы мочи самцов BDF, воспринимая их как больных.

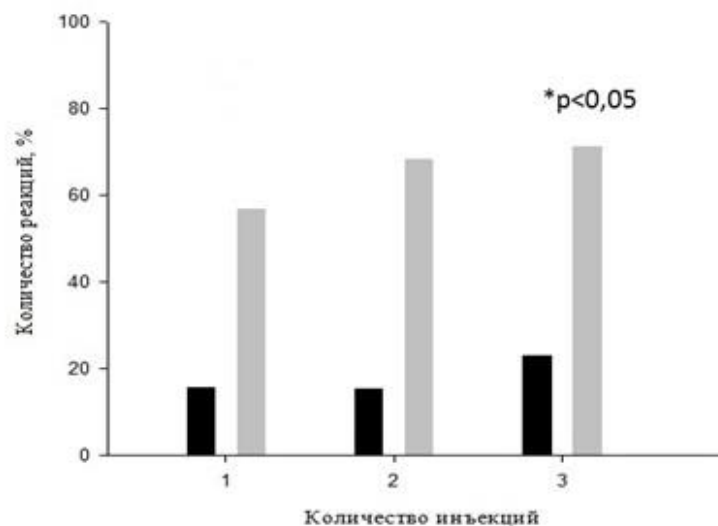


Рис. 6. Влияние количества инъекций у самцов мышей на реакцию собак. По оси ординат отложено количество реакций собак на запаховые пробы мочи в % от общего количества проб данного типа, участвовавших в эксперименте. На оси абсцисс указано количество инъекций. Серые столбцы показывают количество реакций на пробы мочи больных животных, черные — на пробы мочи животных контрольной группы.

На рисунке 6 видно, что каждая инъекция делает мышь с перевитой тканью гепатокарциномы «еще более больной», облегчая выбор собакам (светло-серые столбики). Но в случае, когда мыши-доноры мочи получили три введения, мы наблюдаем достоверное увеличение количества выборов собаками проб мочи не только мышей с перевитой тканью гепатокарциномы, но проб и контрольных самцов BDF вне зависимости от того, получали они инъекции физраствора или перевивку ткани здоровой печени. Можно заключить, что запах контрольных мышей, получивших три инъекции, гораздо ближе к запаху «больного животного».

Обобщая результаты экспериментов по влиянию различных введений на спектр ЛОС модельных мышей, можно заключить, что собаки и мыши на основе летучих метаболитов мочи могут отличать мышей, подвергшихся физическим травмам, связанных с различными инъекциями, от интактных мышей, от мышей с перевитой здоровой тканью печени и мышей с перевитой опухолевой тканью печени. Две последовательные травмы с интервалом в 30 дней значительно увеличивают количество ошибок, допускаемых собаками при поиске

образцов мочи больных мышей среди здоровых. Мы пришли к выводу, что количество физических повреждений оказывает существенное влияние на запах индивида.

Как мы уже упоминали, при рассмотрении влияния разных факторов на спектр ЛОС мочи модельных мышей необходимо иметь в виду, что возраст животного также оказывает влияние на спектр ЛОС, выделяемый организмом. Мы старались предъявлять животным-сенсорам в каждом эксперименте пробы мочи мышей одного возраста, но это не всегда удавалось. Поэтому мы провели оценку влияния возраста мышей на поиск собаками-биосенсорами образцов мочи модельных мышей с перевитой гепатокарциномой. Мы использовали модельных мышей с несколькими последовательными введениями различных субстанций, между которыми проходило 30 дней, поэтому мышь, получившая три инъекции, могла быть старше интактной на два месяца и более. Продолжительность жизни мыши невелика, редко превышает 1,5–2 года, один или два месяца для них — значительная часть жизни. Мы оценили частоту реакции собак на пробы мочи мышей трех возрастных групп: до 4 месяцев, от 4 до 8 месяцев и более 8 месяцев (рис. 7).

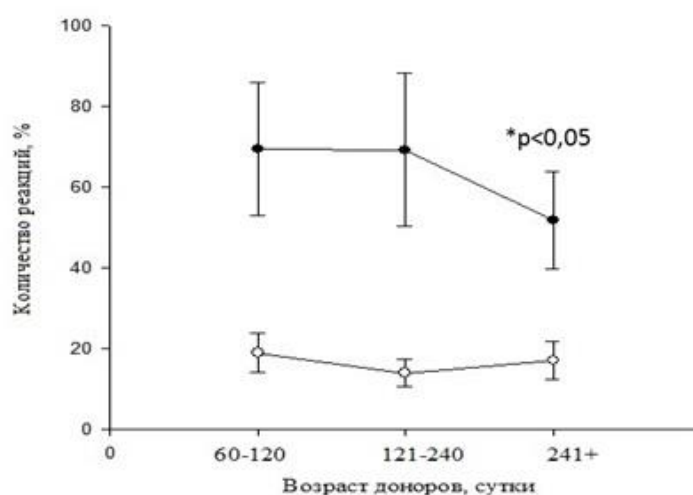


Рис. 7. Влияние возраста самцов BDF на количество реакций собак на пробы мочи контрольных мышей (белые кружки) и мышей с трансплантированной тканью гепатокарциномы (черные кружки). «Усы» соответствуют 95 % доверительному интервалу для каждого. По оси ординат отложено количество реакций собак на пробы мочи в долях от общего количества проб данного типа. По оси абсцисс отложен возраст самцов BDF в днях: от 60 до 120 дней (60+), от 121 до 240 дней (240+) и более 241 дня (240+) и возраст больных животных.

На рисунке 7 видно, что в «молодых» группах — мыши 2–4 месяца и 4–6 месяцев — собаки уверенно отличают пробы мочи мышей с перевитой гепатокарциномой от контрольных особей. Однако в «старшей» группе (мыши старше 6 месяцев) картина меняется: собаки начинают путать пробы контрольных и больных животных. Наблюдается эффект, противоположный воздействию количеству инъекций. В то время как каждая полученная животным травма все ярче «метит» больное животное, облегчая собакам поиск его проб, возраст свыше 4-х месяцев затрудняет поиск, собаки начинают путать больных и

контрольных животных. Из полученных данных следует, что спектр ЛОС, выделяемый мышами с развивающейся опухолью, схож со спектром ЛОС стареющих особей.

Раздел 3.3. Изменение спектра летучих органических соединений мочи больных животных с перевитой гепатокарциномой. Раздел посвящен изменению спектра ЛОС мочи модельных мышей с развитием перевитой гепатокарциномы. Для того чтобы убедиться, что животные-биосенсоры способны детектировать «запах гепатокарциномы», мы провели эксперименты с учетом всех описанных выше дополнительных факторов, которые могут повлиять на выбор проб животными.

В экспериментах мы сравнили запаховые образцы мочи модельных мышей с перевитой гепатокарциномой с образцами интактных здоровых самцов BDF. В экспериментах с мышами-сенсорами мы использовали образцы от трех разных незнакомых мышам-сенсорам самцов BDF, чтобы исключить влияние индивидуального запаха на выбор сенсора. Все самцы были одного возраста. Результаты экспериментов приведены на рисунке 8.

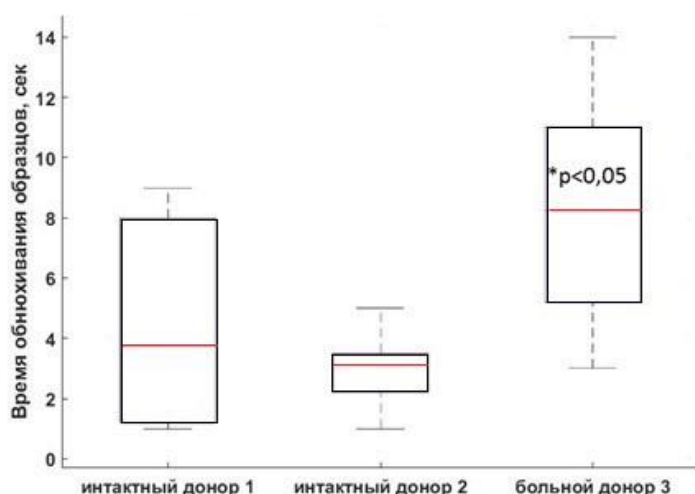


Рис. 8. Распознавание мышами-сенсорами запаховых образцов мочи здоровых самцов BDF и модельной мыши с перевитой гепатокарциномой. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов: первый и второй столбцы — образцы от интактных здоровых самцов BDF № 1 и № 2, третий столбец — образец модельной мыши с перевитой гепатокарциномой № 3. Верхняя и нижняя граница прямоугольника соответствуют 0,25- и 0,75-квантилю. Красная черта — медиана (0,5-квантиль). «Усы» диаграммы показывают минимальное, максимальное значение выборки.

На рисунке 8 видно, что нет различий во времени обнюхивания образцов мочи здоровых самцов 1 и 2 ($p=0,375$) несмотря на то, что они отличаются по индивидуальному запаху, однако запах мочи животного с перевитой опухолевой тканью гепатокарциномы НЗЗ значительно сильнее привлекает сенсора ($p<0,01$).

В первой серии экспериментов с собаками использовали фекалии и мочу мышей для того, чтобы убедиться в наличии «запаха болезни» в различных выделениях больных животных и в том, что собаки могут его детектировать. Для отбора контрольных образцов мочи и фекалий в этих опытах мы использовали интактных самцов мышей BDF. Полученные результаты представлены на рисунке 9.

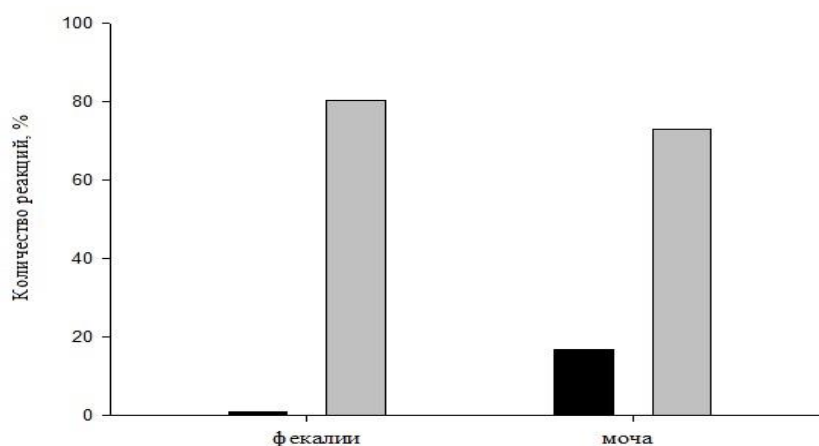


Рис. 9. Определение собаками запаховых образцов фекалий и мочи модельных мышей с перевитой ГК на фоне интактных мышей. По оси ординат отложено количество реакций собак на запаховые пробы мочи в % от общего количества проб данного типа. По оси абсцисс указан тип выделений для получения запаховых образцов: фекалии и моча от интактных самцов BDF контрольной группы (черные столбцы) и больных самцов BDF с перевитой гепатокарциномой (серые столбцы).

Собаки успешно выделяют пробы больных животных на фоне выделений интактных доноров для образцов фекалий и мочи, 80,3 % и 72,2 % случаев соответственно. Количество ошибок составило 1 % и 16,8 % для образцов фекалий и мочи соответственно. Результаты экспериментов показали, что собаки достоверно ($p < 0,05$) отличают по запаху образцы выделений животных (как по образцам мочи, так и по образцам фекалий) с перевитой опухолевой тканью от образцов выделений интактных животных.

Полученные результаты показывают, что животные-сенсоры, как предварительно обученные собаки, так и мыши без предварительного обучения, достоверно отличают по запаху выделения животных с трансплантированной подкожно опухолью гепатокарциномы от выделений здоровых животных, т. е. ЛОС, характерные для ГЦК, содержатся в выделениях больных животных — как в фекалиях, так и в моче. Для этого типа опухолей это показано впервые. Однако эти эксперименты не отвечают на вопрос, на какой именно запах реагируют животные-сенсоры: связанный с развитием опухоли или же с сопутствующими процессами — воспалением или иммунной реакцией организма.

В следующей серии экспериментов собаки и мыши сравнивали спектры ЛОС мочи больных животных и животных с разными контрольными инъекциями. До сих пор нет

четких доказательств того, что собаки способны выделять комплекс ЛОС, связанный именно со злокачественным ростом, поэтому мы усложнили им поиск запахового образца мочи больных мышей, изменив контрольные группы животных.

Представленные выше результаты показывают, что травма меняет запаховый паттерн мочи, более того, эффект травмы накапливается, а перевитая чужеродная ткань вне зависимости от того, здоровая это ткань печени или ткань гепатокарциномы, добавляет в паттерн ЛОС мочи часть, характерную для специфического иммунного ответа. Мы сформировали контрольные группы мышей с использованием введения физиологического раствора и перевивки ткани здоровой печени. Подкожное введение этих инъекций позволило максимально сблизить характеристики процессов, происходящих в теле здоровых и больных мышей, вынуждая животных-сенсоров выделять ту часть паттерна ЛОС, которая относилась именно к развитию модельной гепатокарциномы.

Эксперименты с мышами-сенсорами проводили с использованием образцов мочи от одной и той же модельной мыши, которой сначала делали контрольную инъекцию физиологического раствора (рис. 10) или ткани печени (рис. 11), собирали образцы мочи, а затем через 14–21 день перевивали ткань гепатокарциномы и вновь собирали образцы мочи.

В экспериментах с разными контрольными инъекциями интерес мышей-сенсоров угасал при последовательном предъявлении идентичных образцов (первый и второй столбцы $p < 0,01$), однако, несмотря на то, что образцы были собраны от одной и той же модельной мыши, интерес сильно возрастал при предъявлении образца мочи после перевивки ткани гепатокарциномы ($p < 0,01$).

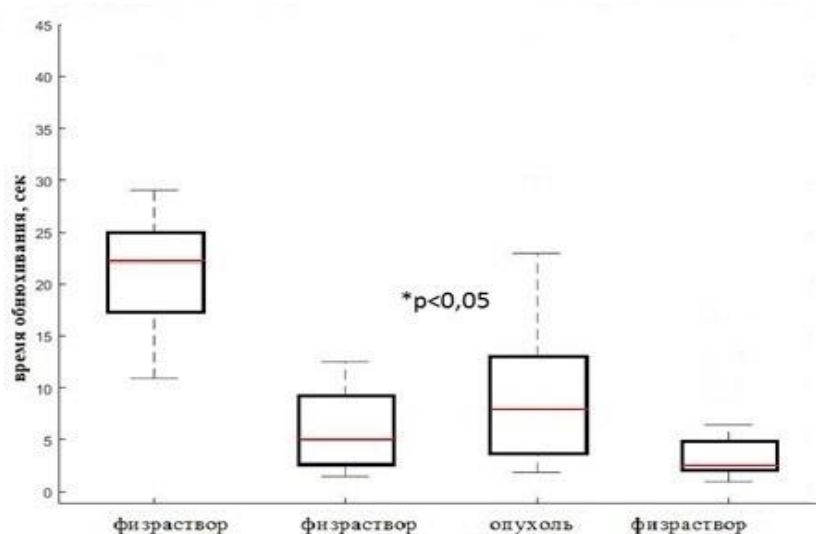


Рис. 10. Время обнюхивания мышами-сенсорами образцов мочи самца BDF после инъекции физиологического раствора и мочи того же самца после перевивки опухолевой ткани. Нижняя и верхняя граница прямоугольника — 0,25- и 0,75-квантиль. Красная черта — медиана (0,5-квантиль). «Усы» диаграммы и крестики показывают минимальное,

максимальное значение выборки и выбросы значений соответственно. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов мочи: первый, второй и четвертый столбцы — образцы мочи самца BDF после инъекции физиологического раствора (физраствор), третий столбец — после перевивки ткани гепатокарциномы (опухоль). Все образцы собраны от одного самца BDF. Первый, второй и четвертый образцы идентичны.

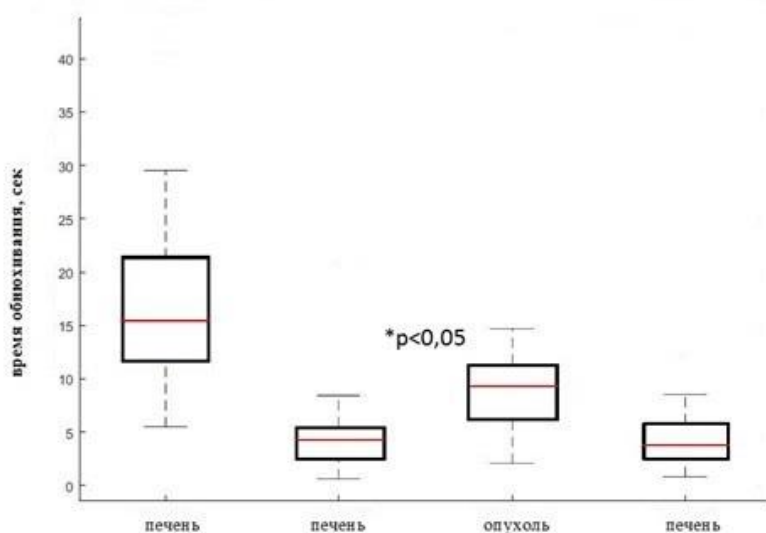


Рис. 11. Время обнюхивания образцов мочи самцов мышей после инъекции ткани здоровой печени и после инъекции опухолевой ткани. Нижняя и верхняя граница прямоугольника — 0,25- и 0,75-квантиль. Красная черта — медиана (0,5-квантиль). «Усы» диаграммы и крестики показывают минимальное, максимальное значение выборки и выбросы соответственно. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов мочи: первый, второй и четвертый столбцы — время исследования образцов после инъекции ткани здоровой печени (печень), третий столбец — после перевивки ткани гепатокарциномы (опухоль). Все образцы собраны от одного самца. Первый, второй и четвертый образцы идентичны друг другу.

Эксперименты показывают, что мыши-сенсоры достоверно различают запах мочи одних и тех же модельных мышей после контрольной инъекции (как физиологического раствора, так и перевивки здоровой ткани печени) и после перевивки опухолевой ткани ($p < 0,001$). Однако в этом эксперименте больные мыши отличались еще и по возрасту (пробы мочи после перевивки гепатокарциномы собирали у тех же мышей, но спустя 30 дней после сбора мочи после контрольных инъекций), а также по количеству манипуляций — больные мыши, получившие перевивку гепатокарциномы, получили и две травмы от проведения контрольной инъекции и перевивки гепатокарциномы. Наши предыдущие исследования показали, что оба эти отличия могли изменять спектр ЛОС мочи животных, и наличие этих изменений подтверждает интерес мышей-сенсоров. Поэтому мы провели проверочную серию экспериментов с собаками.

На рисунке 12 показано, как изменяется количество истинно положительных и ложноположительных реакций собак при предъявлении им проб мочи мышей с перевитой

гепатокарциномой на фоне разных контрольных проб: проб мочи интактных мышей, проб мочи мышей с инъекцией физраствора и проб мочи мышей с перевитой тканью здоровой печени.

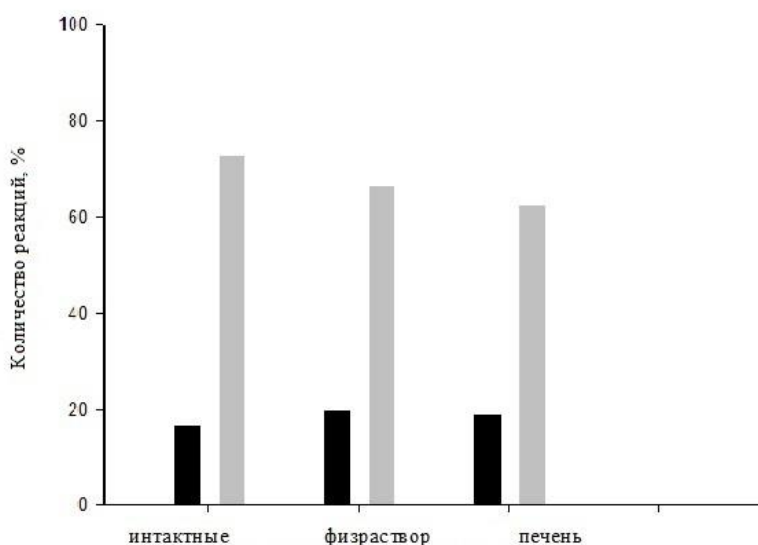


Рис. 12. Определение собаками запаховых образцов мочи мышей с перевитой гепатокарциномой на фоне контрольных образцов разных типов. По оси ординат отложено количество реакций собак на запаховые пробы мочи в % от общего количества проб данного типа. По оси абсцисс указан тип инъекции мышей контрольной группы, образцы которого использовали в данном эксперименте. Серые столбцы показывают количество реакций на пробы мочи животных с перевитой гепатокарциномой, черные — на пробы мочи животных контрольной группы. Контрольные образцы от интактных мышей, контрольные образцы от мышей после инъекции физиологического раствора, контрольные образцы от мышей после инъекции ткани здоровой печени.

Несмотря на то, что в экспериментах с собаками часть здоровых мышей, моча которых служила контролем при предъявлении запаха больных животных, была так же травмирована, как и больные (им подкожно вводили физиологический раствор той же иглой и в таком же количестве, как и при введении другим животным измельченной опухолевой ткани), а в экспериментах с мышами-сенсорами контролем служили только травмированные мыши, животные-сенсоры легко отличали мышей с перевитой опухолевой тканью от контрольных. Это указывало, что животные-сенсоры ориентировались на ЛОС, связанные именно с развитием опухоли, а не на системную реакцию организма на травму, что позволило нам предположить наличие зависимости паттерна ЛОС от стадии развития заболевания. Наша модель гепатокарциномы дает возможность проверить эту гипотезу.

Раздел 3.4. Изменение спектра летучих органических соединений мочи на разных этапах развития опухоли содержит результаты исследований изменения спектра ЛОС мочи на разных стадиях развития опухоли. Эксперименты проводили с собаками (рис. 13).

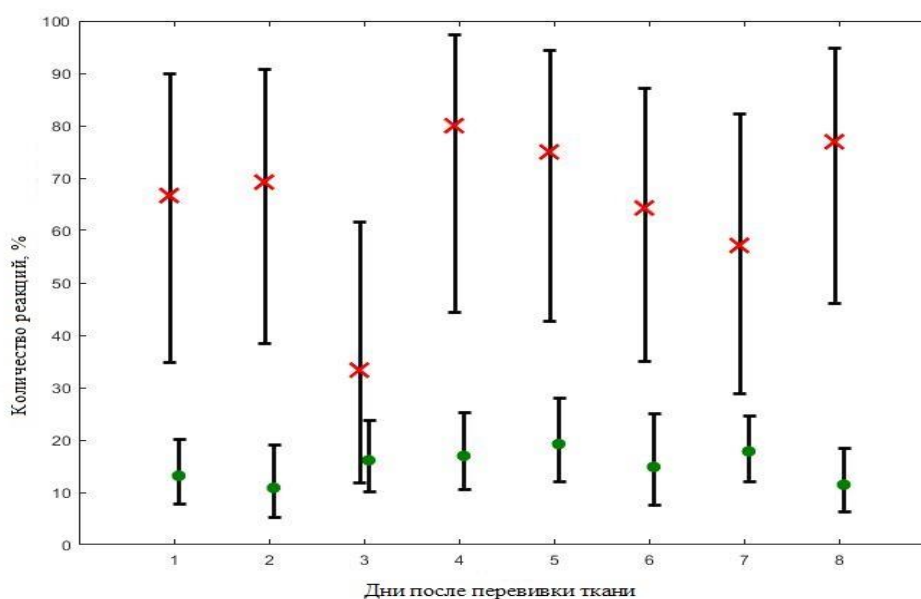


Рис. 13. Количество реакций собак на запаховые образцы мочи больных животных (красные крестики) и доноров контрольной группы (зеленые кружки) в зависимости от дня после перевивки ткани. На оси абсцисс указаны дни эксперимента с момента перевивки опухолевой ткани гепатокарциномы (красные крестики) и ткани здоровой печени (зеленые кружки). «Усы» соответствуют 95 %-му доверительному интервалу.

Описанный выше анализ развития перевитой ткани показал, что в 1–3-и сутки после перевивки ткани основной процесс, идущий в месте локализации перевитой ткани, — снижение ее относительной массы как у большинства мышей с опухолевой тканью, так и у большинства мышей с тканью здоровой печени. Примерно с 4-х суток происходят значительные изменения: количество перевитой здоровой ткани печени продолжает уменьшаться, в то время как количество опухолевой ткани начинает быстро увеличиваться. Результаты эксперимента показывают, что собаки способны не только определять комплекс ЛОС, связанный со злокачественным ростом, но, возможно, они также способны различать стадии развития перевитой гепатокарциномы.

На рисунке 13 видно, что в наших экспериментах успешность собак в поиске больного организма среди здоровых хорошо согласуется с динамикой развития перевитой опухолевой ткани. С 1-х по 3-и сутки основной процесс, идущий в месте локализации перевитой ткани, — снижение ее относительной массы как у большинства мышей с опухолевой тканью, так и у большинства мышей с тканью здоровой печени. Примерно с 4-х суток все меняется: количество перевитой здоровой ткани печени продолжает уменьшаться, в то время как количество опухолевой ткани начинает быстро увеличиваться. Гистологические исследования развития опухолевой ткани и ткани здоровой печени показали, что в опухолевой ткани на 1–2-е сутки наблюдается массовая гибель клеток. На 3-и сутки небольшие группы опухолевых клеток присутствуют в месте введения в жировой и соединительной подкожной ткани, а на 4-е сутки гибель клеток продолжается, но уже

присутствуют митозы, в том числе патологические, и наблюдается прорастание в окружающие ткани. Клетки здоровой ткани печени гибнут на 3–4-е сутки, и далее перевитая ткань представлена клеточным детритом. То есть объем опухолевой ткани у экспериментальных животных, а также активность опухолевых клеток минимальны на 3-и сутки. На 1–2-е сутки присутствует еще достаточное количество опухолевых клеток и метаболитов животного, но их количество существенно сокращается к 3-м суткам. С 4-х суток начинается активная пролиферация опухолевых клеток. Похоже, что именно на 3-и сутки процессы в эксперименте и контроле достигают наибольшего сходства — иммунная система губит чужеродные клетки, что и отражается на реакции собак. Активизация пролиферации клеток на 4-е сутки после перевивки ткани совпадает с возрастанием чувствительности собак к запаху болезни. Можно заключить, что именно этот процесс является источником паттерна ЛОС, маркирующих больной организм на этом этапе развития опухоли.

Раздел 3.5. Специализированная база данных. С помощью базы данных мы провели оценку вклада факторов, которые, на наш взгляд, могли влиять на реакцию биосенсоров. Связь этого блока с соответствующими программами статистической обработки данных (Excel, Matlab, SigmaPlot 12.5) позволила определить чувствительность метода при работе с животными-биосенсорами. Мы оценили влияние разных показателей на реакцию сенсоров: влияние длительности хранения образцов, влияние индивидуальных особенностей собак, отличия в состоянии доноров после контрольных инъекций разного типа. Возможность проводить многофакторный анализ данных позволила установить влияние возраста донора и накопительного эффекта травмы при проведении нескольких инъекций на реакцию животных-биосенсоров.

Созданная база данных позволяет как формировать новые запросы к уже существующему архиву данных, так и добавлять данные, сравнивая ранее проведенные и новые эксперименты. Формулировка запросов к базе данных позволяет не только анализировать результаты проведенных экспериментов, но и получать принципиально новую информацию. Накопленные данные свидетельствуют, что почти каждое возмущение в организме животного приводит к изменению спектра ЛОС. Созданная нами база данных позволяет получать новую информацию в ответ на вопросы, возникающие по мере исследования. В этих исследованиях есть свидетельства характерных изменений, связанных с разными метаболическими путями в организме, дающими основания полагать, что летучие метаболиты могут специфично маркировать многие заболевания.

Заключение

В первые два дня после перевивки ткани в теле животного присутствуют чужеродные опухолевые клетки и метаболиты, но их количество и активность минимальны к 3 дню. На 3 день присутствуют лишь небольшие группы опухолевых клеток в месте введения в жировой и соединительной подкожной ткани. Основной процесс, идущий в месте локализации перевитой ткани – массовая гибель клеток и снижение ее относительной массы, как у большинства мышей с опухолевой тканью, так и у большинства мышей с тканью здоровой печени. С 4 дня все меняется – количество перевитой здоровой ткани печени продолжает уменьшаться, и далее она представлена клеточным детритом, в то время как начинается активная пролиферация опухолевых клеток. Похоже, что именно на 3 день процессы в теле больных и контрольных животных достигают наибольшего сходства – иммунная система губит чужеродные клетки, что и отражается на реакции собак. Активизация пролиферации клеток на 4 день после перевивки ткани совпадает с возрастанием чувствительности собак к запаху болезни. Можно заключить, что именно этот процесс является источником метаболитов, маркирующих больной организм на этом этапе развития опухоли.

Накопленные данные свидетельствуют, что почти каждое возмущение в организме животного приводит к изменению спектра ЛОС, которое связано с разными метаболическими путями в организме. Видимо, летучие метаболиты могут специфично маркировать многие заболевания.

Интересный вопрос заключается в том, может ли операция сама по себе изменять запах животного, и если да, то на какой срок. Можно ли дифференцировать животных после хирургического вмешательства от интактных на основе запаха, используя, например, обученных биосенсоров и/или химический анализ профилей ЛОС мочи? Было бы интересно и, возможно, важно в будущем определить, в какой степени разные формы физической травмы, в том числе похожие на хирургические процедуры, могут вызывать изменение запаха. Насколько нам известно, такие исследования не были опубликованы к настоящему времени.

Эксперименты показали, что мыши-сенсоры хорошо различают «запаховые образы» индивида после введения физиологического раствора и перевивки ткани здоровой печени. В этом случае к травме добавляется иммунная реакция на чужеродную ткань, поскольку ранее было показано, что и иммунизация, и воспаление изменяют спектр ЛОС животного, что согласуется с литературными данными о том, что инъекции липополисахарида, мощного иммунного активатора и промотора воспаления, приводит к изменению запаха мочи мыши. Поэтому и травма, сопровождающаяся воспалением, также может создавать специфический «запаховый образ».

Но в случае, когда мыши получили три введения, мы наблюдали, достоверное увеличение количества выборов собаками проб мочи не только мышей с перевитой тканью гепатокарциномы, но и проб контрольных самцов вне зависимости от того, получали они инъекции физраствора или перевивку ткани здоровой печени. Можно заключить, что и запах контрольных мышей, получивших три инъекции, ближе к запаху «больного животного».

Обобщая результаты экспериментов по влиянию разных введений на спектр ЛОС модельных мышей, можно заключить, что собаки и мыши на основе летучих метаболитов мочи могут отличать мышей, после физических травм, связанных с разными инъекциями, от интактных мышей, от мышей с перевитой здоровой тканью печени и мышей с перевитой опухолевой тканью печени. Три последовательные травмы с интервалом в 30 дней значительно увеличивают количество ошибок, допускаемых собаками при поиске образцов мочи больных мышей. Мы пришли к выводу, что физическая травма вносит значительный вклад в «обонятельный образ» пациента. То есть количество физических повреждений оказывает существенное влияние на запах индивида.

Из наших данных следует, что спектр ЛОС, выделяемый мышами с развивающейся опухолью, схож со спектром ЛОС стареющих особей. Аналогичные выводы были получены в работах, где показали, что в основе механизмов как рака, так и старения лежит зависящее от времени накопление клеточных повреждений. Несмотря на то, что процессы развития опухоли (гиперпролиферация, увеличение выживаемости клеток) и старения (снижение функциональности) в клетке, на первый взгляд, выглядят противоположными, современные исследования показывают, что существуют много общих признаков старения и роста опухоли.

Животные-макросматики, как собаки, так и мыши, отличаются по запаху выделений животных с трансплантированной подкожно опухолью гепатокарциномы от выделений здоровых животных, т.е. ЛОС, характерные для гепатоцеллюлярного рака, содержатся в выделениях больных животных.

По-видимому, комплекс ЛОС в выделениях организма, связанный с развитием опухоли, достаточно сложный. Следовательно, изменение обмена веществ опухолевых клеток, приводит к появлению ЛОС, характерных для определенного типа опухоли. Изменения метаболизма группы клеток в организме отражаются на ЛОС, выделяемых целым организмом.

Очевидно, опухоль, развивающаяся в организме, вызывает ответную реакцию иммунной системы. Возможно, определенные ЛОС, маркирующие то или иное онкологическое заболевание, до сих пор не идентифицированы из-за того, что разные исследователи выделяют вещества из разных участков «спектра» ЛОС, связанных с развитием заболевания, а соотношение участков «спектра» меняется у разных пациентов.

Наши эксперименты позволяют заключить, что использование животных-макросматиков в сочетании с инструментальным анализом ЛОС, сопутствующих онкологическим заболеваниям, и регулируемой модели развития опухоли на мышах весьма перспективно и может быть очень полезным для решения многих вышеперечисленных задач. Хотя предлагаемый метод не позволяет определить химическую структуру или состав одорантов, мы получаем информацию о сходстве и различиях запахов, предлагаемых животным-сенсорам для «анализа». Использование животных позволяет определять, в каких пробах существуют комплексы ЛОС, сопутствующие болезни. Мы считаем, что применение животных-макросматиков позволит отделить эти комплексы от ЛОС, сопутствующих воспалению, иммунной реакции и т.д. Это сделает поиск ЛОС с помощью инструментальных методик более направленным.

Огромное число перестроек метаболизма, сопутствующее даже не очень значительным клеточным событиям в организме, указывает не только на то, что количество возможных комбинаций одорантов в моче огромно, но также и что вероятность существования уникального летучего вещества, связанного со злокачественным ростом, почти исключена.

Полученные нами данные позволяют предположить, что собаки способны воспринимать как весь спектр ЛОС, сопутствующих болезни, так и незначительные изменения этого спектра при ее течении.

Используя «модельных пациентов» – мышей, сопоставляя стадии развития болезни и реакцию собак со спектрами ЛОС, полученных с помощью современных аналитических методов, со временем можно будет предположить, какие метаболические пути ответственны за изменения запаха и диагностический потенциал спектров ЛОС.

Исследования состава ЛОС на ранних стадиях развития опухоли полезны для поиска ранних диагностических маркеров злокачественного роста, а также могут пролить свет на механизмы, лежащие в основе изменений спектра ЛОС в ходе злокачественного роста.

Выводы

1. Показаны три основных этапа развития экспериментальной опухоли в теле донора: интенсивная гибель опухолевой ткани, начальное проявление активности уже новых опухолевых клеток и массовый рост опухолевой ткани. Первые два этапа единообразно проходят у разных доноров, тогда как интенсивность роста опухоли индивидуальна и может сильно отличаться от особи к особи.
2. Показано, что старение модельных мышей и полученные ими даже незначительные физические травмы влияют на комплекс ЛОС их мочи, сближая его с комплексом ЛОС мышей с перевитой гепатокарциномой, причем каждая последующая травма все более сближает спектр ЛОС мочи травмированных животных со спектром ЛОС

мышей с перевитой гепатокарциномой. Влияние на комплекс ЛОС физических травм и эффект его накопления показаны впервые.

3. Показано, что собаки и мыши достоверно отличают по запаху образцы мочи животных с перевитой опухолевой тканью от контрольных образцов разной сложности, то есть злокачественный рост меняет запах индивида, формируя специфический комплекс ЛОС, который не зависит от процессов, сопровождающих многие заболевания, например, от воспаления, иммунного ответа, стресса и др.
4. Показана корреляция изменения запаха больного животного с этапами развития модельной злокачественной опухоли, что отражается на результатах детекции собаками образцов больных животных.
5. Создана новая специализированная реляционная база данных, позволяющая исследовать факторы, потенциально влияющие на результаты экспериментов и были получены принципиально новые результаты о возрасте модельного животного и количестве полученных им травм, описанные выше. Созданная нами база данных - это один из эффективных методов нашего исследования.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых международных научных журналах, входящих в основные библиометрические базы данных (PubMed, WoS, Scopus, РИНЦ)

1. Родионова Е. И., Кочевалина М. Ю., Котенкова Е. В., Морозова О. В., Когунь Г. А., Батаева Е. Л. и Амбарян А. В. Распознавание животными-макросматиками летучих органических веществ, связанных с развитием гепатокарциномы: подходы к поиску маркеров онкологических заболеваний // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2015. – № 3. – С. 293–301. doi: 10.7868/S0002332915030108
2. Кочевалина М. Ю., Трунов В. Г., Морозова О. В., Родионова Е. И. Изменение запаха мочи мышей в динамике образования трансплантированной опухоли гепатокарциномы Н33 // Бюллетень биологии. – 2020. – № 47 (5). – С. 506–513. doi: 10.31857/S0002332920050057
3. Kochevalina M.Y., Bukharina A.B., Trunov V.G., Pento A.V., Simanovsky Ya. O., Nikiforov S.M. & Rodionova E. Changes in the urine volatile metabolome throughout growth of transplanted hepatocarcinoma // Sci Rep. – 2022, May 11. – № 12(1). – P. 7774. doi: 10.1038/s41598022118180

Результаты работы, опубликованные в сборниках тезисов международных и российских конференций:

1. Kochevalina M., Ambaryan A., Morozova O., Kogun' G., Rodionova E., Animals biosensors detect odor signatures of hepatocellular carcinoma in urine of mice with experimental tumors. // *Chemical Senses*. – 2015. – Vol. 40, № 7. – P. 640.
2. Kochevalina M., Ambaryan A., Morozova O., Kogun' G., Rodionova E. Dogs and mice detect odor signatures of hepatocellular carcinoma in urine of mice with experimental tumors. // *Chemical Senses*. – 2015. – Vol. 40, № 3. – P. 278.
3. Kochevalina M., Rodionova E., Trunov V., Kogun' G., Morozova O. The role of multivariate analysis in the study of the changes in animal odor after hepatocellular carcinoma transplantation. // *Social Science and Humanity*. – 2016. – № 3. – P. 62–70.
<https://scieuro.com/wp-content/uploads/2017/01/62-70.pdf>
4. Кочевалина М. Ю., Морозова О. В., Трунов В. Г., Родионова Е. И. Обоняние и когнитивные способности собак в поиске маркеров онкологических заболеваний. // XIII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» – 2017.
5. А.Б. Бухарина, М.Ю. Кочевалина, А.В. Пенто, Е.И. Родионова. Лазерная масс спектрометрия летучих органических соединений урины животных для диагностики патологических процессов. // Девятый съезд ВМСО VIII всероссийская конференция «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» - 2019.
http://brainres.ru/work/Sudak_2017_13_Congress_Proceedings.pdf
6. Bukharina A., Kochevalina M., Pento A. Laser mass spectrometry of volatile organic compounds for diagnosis of pathological processes. 19th International Conference Laser Optics (ICLO 2020) – 2020.
<https://publications.hse.ru/en/books/523969913>
7. Rodionova E, Kochevalina M, Trunov V, Morozova O, Kogun G. Physical trauma alters the mice volatile urine odor. // *Chemical Senses*. – 2020. - Vol. 45, № 2 - P. 156-15.
8. Kochevalina, M., Rodionova, E., Morozova, O., Nikiforov, S., Pento, A. and Bukharina, A. Influence of model hepatocarcinoma development time on sick animals' detection by dogs and laser mass spectrometer. // *Chemical Senses*. – 2020. - Vol. 45, № 2 - P. 163-163.