

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

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Родионова Елена Ивановна,
кандидат биологических наук

Москва 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1. Запах индивида и индивидуальный запах.	10
1.1.1. Формирование запахового образа индивида.	10
1.1.2. Влияние болезни на запах индивида. Подходы к поиску маркеров заболеваний.	16
1.2. Особенности развития злокачественной опухоли и их связь с формированием специфического паттерна летучих органических соединений. Специфические черты гепатокарциномы .	24
1.3. Использование модельных животных.	50
1.3.1. Мышиная модель рака.....	50
1.3.2. Эксперименты с животными-макросматиками....	53
1.4. Специализированные базы данных для хранения и обработки информации, полученной в биологических экспериментах.	62
Глава 2. Материалы и методы исследования	65
2.1. Экспериментальная модель опухоли.	65
2.1.1. Подготовка экспериментальной модели и контрольных групп мышей	65
2.1.2. Сбор образцов.	66
2.1.3. Исследование динамики изменений перевитой опухолевой ткани H33 и ткани здоровой печени мышей.	68
2.2. Эксперименты с животными-биосенсорами	68
2.2.1. Методики экспериментов с мышами-биосенсорами	68
2.2.2. Методика экспериментов с собаками	72
2.2.2.1. Обучение собак.	72
2.2.2.2. Эксперименты с собаками.	73
2.2.3. Оценка работоспособности групп животных-биосенсоров.	75
2.3. Создание и использование специализированной базы данных Odor of Disease (ODD)	79
Глава 3. Результаты и обсуждение	91

3.1. Изменения перевитой ткани опухоли и здоровой ткани печени91
3.2. Факторы, меняющие спектр летучих органических соединений мочи, не связанные с развитием опухоли	95
3.2.1. Влияние физической травмы. Эксперименты с мышами-сенсорами	96
3.2.2. Влияние перевитой чужеродной ткани. Эксперименты с мышами-сенсорами	98
3.2.3. Влияние последовательных инъекций. Эксперименты с собаками. Оценка по базе данных	103
3.2.4. Влияние возраста модельных мышей. Эксперименты с собаками. Оценка по базе данных	106
3.2.5. Влияние срока хранения образцов. Эксперименты с собаками. Оценка по базе данных	110
3.3. Изменение спектра летучих органических соединений мочи больных животных с перевитой гепатокарциномой	111
3.3.1. Сравнение образцов интактных и больных животных.	111
3.3.2. Сравнение образцов больных животных и мышей с разными контрольными инъекциями	116
3.4. Изменение спектра летучих органических соединений мочи на разных этапах развития опухоли	124
3.5. Специализированная база данных	129
Заключение132
Выводы	136
Список сокращений и условных обозначений	137
Список литературы138

ВВЕДЕНИЕ

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.

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.

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.

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.

На современном этапе развития методов хранения и обработки данных существует возможность формализовать различные переменные, которые могут иметь особое значение для биосенсоров, и создать логическую модель в виде базы данных, ориентированной на изучение влияния различных факторов. 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

мышь) 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-макросматики 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.

Структура работы: работа состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и списка литературы. Работа выполнена на 172 страницах, текст содержит 32 рисунка, 18 таблиц. Список литературы содержит 378 наименований источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Запах индивида и индивидуальный запах.

1.1.1. Формирование запахового образа индивида.

Информация, содержащаяся в запахе тела человека и животных, становится предметом все большего числа исследований, но представление о том, насколько велик объем информации, заключенной в запахе индивида, еще не до конца сформировано. На сегодня известно, что у людей запах тела содержит информацию об эмоциональном состоянии (Chen, Haviland-Jones, 2000; De Groot et al., 2014; Mutic et al., 2016; Zhou, Chen, 2009; Smeets et al., 2020), поле (De Groot et al., 2014, Bensafi et al., 2003; Parma et al., 2012), сексуальных предпочтениях (Martins et al., 2005; Lübke et al., 2012), сексуальном возбуждении (Gelstein et al., 2011), родстве (Porter, Schaal, 1995), совместимости с партнером (Havlicek et al., 2005), менструальной фазе (McClintock, 1971; Singh and Bronstad, 2001; Havlíček et al., 2006), хотя есть и противоположные мнения на этот счет (Zhengwei, Schank, 2006; Ziomkiewicz, 2006), состоянии здоровья (Moshkin et al., 2012; Olsson et al., 2014). Животные еще активнее используют запахи для получения информации о метаболическом статусе других животных: это информация о возрасте (Osada et al., 2003, 2008), рационе (Schellinck et al., 1992), генетических и половых различиях животных (Schaefer et al., 2002; Keller et al., 2006), о стрессе (Novotny et al., 1985; Schaal et al., 2003), о текущем состоянии здоровья (Penn, Potts, 1998; Yamazaki et al., 2002; Kavaliers et al., 2005; Arakawa et al., 2010, 2011; Moser, McCulloch, 2010).

В запахе тела содержатся не только временные изменения перцептивного качества запаха, но и, несмотря на постоянно меняющиеся химические сигналы, связанные, например, с эмоциональным состоянием, индивиды сохраняют некое

неизменное, постоянное качество своего запаха, которое могут легко «прочитать» другие индивиды. Это доказывают исследования, в которых показано, что братья и сестры могут надежно отличать запах брата или сестры от запаха незнакомца того же возраста и пола (Porter et al., 1986), люди могут отличить по запаху свою ношенную рубашку от 100 рубашек, которые носили другие (God and Kasprzak, 1989), и даже однояйцевые близнецы могут быть определены по запаху (Roberts et al., 2005). То есть в запахе тела есть индивидуальные неизменные и воспроизводимые «запаховые отпечатки пальцев».

Можно сказать, что в запахе тела животного содержатся три компонента, назовем их внешний, метаболический и индивидуальный (Penn et al., 2007). Внешний компонент зависит от внешних источников. Это, например, запах почвы, в которой расположена нора какого-то животного, или запах косметики и средств для ухода за кожей у человека. Метаболический компонент связан с диетой, гормональным состоянием, метаболическими расстройствами, заболеваниями и лекарствами (Brown J.S., 2013). Индивидуальный компонент генетически детерминирован и неизменен на протяжении всей жизни организма. Этот последний компонент мы будем называть индивидуальным запахом, в отличие от запаха индивида, включающего все три составляющие. Запах индивида зависит от окружающей среды, рациона, от обмена веществ, секреции желез, взаимодействия с бактериями, гормонального контроля и других проявлений метаболизма, но также включает в себя неизменный, генетически детерминированный индивидуальный запах (Brown J.S., 2013; Hale, 2017).

Очевидно, что для узнавания родственников и выбора партнера для размножения животные должны быть в состоянии различать индивидуальности. В случае узнавания родственников фенотипические различия, которые отличают «своих от чужих», позволяют животным рассматривать эти две группы индивидуумов по-разному. Принято считать, что выбор партнера основан на фенотипических различиях, которые указывают на «хорошие» гены в выбранном партнере. Запах тела животных – такая же часть фенотипа, как и внешний вид,

отражающий как переменные характеристики, так и геном организма (Natsch, Emter, 2020).

Во многих исследованиях показано, что гены главного комплекса гистосовместимости (МНС), имеющие решающее значение для иммунного ответа, являются также одним из источников хемосенсорной информации, которая позволяет животным идентифицировать друг друга. Первым предположил, что гены МНС могут быть вовлечены в индивидуальное узнавание, Льюис Томас (Thomas, 1975). Основываясь на теории, по которой гистосовместимость существует для распознавания «своего» и «чужого», он предположил, что гены гистосовместимости могут также придавать каждому индивиду особый характерный запах, и животные могут различать разные типы, например, человеческого МНС с помощью обоняния.

Главный комплекс гистосовместимости (МНС), у человека – человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) – это область генома, содержащая большое количество высокополиморфных генов, кодирующих белки, которые участвуют в распознавании чужеродного антигена (Roitt & Delves, 2001). Молекулы этого комплекса были обнаружены при исследовании реакции отторжения трансплантата при пересадке тканей и присутствуют у всех челюстноротых (Kaufman, 2018). МНС отличается полигенностью - присутствием нескольких неаллельных близко сцепленных генов, белковые продукты которых сходны в структурном отношении и выполняют идентичные функции, а также ярко выраженным полиморфизмом – существованием многих аллелей одного и того же гена.

МНС кодирует мембранные гликопротеины, необходимые для адаптивного иммунного ответа (Bjorkman et al., 1987), регулируя различение собственных и чужеродных пептидов. Молекулы МНС связывают пептиды и предъявляют их специфическим иммунным клеткам, которые затем либо инициируют иммунный ответ, либо нет (Knapp, 2005). Молекулы МНС делятся на классы I и II. Молекулы класса I (МНС-I) экспрессируются на мембранах почти всех ядросодержащих клеток. Они представляют пептиды цитотоксическим Т-клеткам, которые после

активации могут инициировать гибель клетки, несущей МНС-пептид (Klein, 1986). Молекулы класса II (МНС-II) экспрессируются антигенпрезентирующими клетками (например, макрофагами, В-клетками) и представляют собой поглощенные пептиды (Neefjes et al., 2011). Следовательно, МНС-I в основном представляет собой пептиды собственного происхождения и пептиды, происходящие от вирусов или других патогенов, проникших в клетку, в то время как молекулы МНС-II преимущественно представляют собой пептиды, полученные из экзогенных источников, таких как проглоченные бактерии или паразиты.

Пептидные фрагменты чужеродных белков служат сигналом для уничтожения клеток, таким образом, МНС связан по многим параметрам с тем, как лимфоциты, оснащенные специфическими рецепторами на антиген, обрабатывают химическую информацию из окружающей среды, а полигенность и полиморфизм генов МНС определяют антигенную индивидуальность каждой особи. Все вместе эти особенности делают гены МНС отличными кандидатами на маркировку каждого индивида уникальным «запаховым отпечатком» или индивидуальным запахом, другими словами, эти гены генетически программируют запах тела, с помощью которого можно отличить одного индивида от другого (Yamazaki et al., 1990).

В ранних исследованиях влияния МНС на индивидуальный запах лабораторных животных учили отличать запахи сородичей от других лабораторных видов. Результаты показали, что мыши могут различать запахи линий, различающихся только по МНС (Bard et al., 2000; Willse et al., 2006), что отличия запаха, связанные с МНС, обнаруживаются уже у детенышей (Yamazaki et al., 1992), и что МНС-запах плода распознается у беременных мышей (Beauchamp et al., 1994). Эксперименты Бичема и Ямазаки с соавторами на инбредных мышах показали справедливость прогнозов Томаса в поведении у мышей при выборе сексуального партнера с предпочтительным типом МНС (Klein, 1986; Yamazaki, 1976; Penn, 1998; Rammensee, 1997), при распознавании родителей и младенцев, в индивидуальном распознавании (Yamazaki &

Beauchamp, 2007). Животные распознавали тип МНС по запаху образцов мочи и крови (Yamazaki et al., 1998; Penn, 1998; Restrepo et al., 2006). Авторы предположили, что потенциальными одорантами в образцах могли быть молекулы МНС или их фрагменты, а также продукты разложения их пептидных лигандов (Penn, 1998; Beauchamp et al., 2003; Singer et al., 1997).

Эти новаторские исследования подверглись критике из-за небольшого размера выборок лабораторных линий с использованием в основном испытаний распознавания запаха в Y-лабиринте. Кроме того, оппоненты утверждали, что лабораторные животные могли обучиться различать предъявляемые запахи, в то время как их неподготовленные сородичи не смогут различить эти запахи в естественной ситуации (Penn & Potts, 1998). Однако работы, в которых тестировали нетренированных животных (пойманных в дикой природе и лабораторных) в проточных камерах и Y-лабиринтах, преимущественно подтверждают важную роль запаха, зависящего от МНС, в выборе партнера или узнавании родственников (Grieves et al., 2019).

Прогнозы Томаса проверяли на мышах (Beauchamp & Yamazaki, 2003; Beauchamp et al., 1985; Brown & Eklund, 1994; Novotny et al., 2007), крысах (Schellinck Ober et al., 1997), рыбах (Eizaguirre et al., 2011; Gahr et al., 2018), птицах (Griebel et al., 2020; Amo et al., 2012) и людях (Bolnick et al., 2014; Ober et al., 1997; Wedekind et al., 1997; Jacob et al., 2002). В экспериментах было показано, что изменения и в генах МНС, и в других локусах генома (фоновый генотип) как по отдельности, так и совместно приводят к качественным и количественным различиям спектра летучих соединений в обонятельных профилях мочи мышей (Eggert et al., 1996; Willse et al., 2006; Novotny et al., 2007; Zomer et al., 2009). Исследование метаболитов мочи МНС-конгенных линий мышей показало, что из 50 изученных метаболитов 53% находилось под влиянием рациона, 35% – регулировалось МНС, 12% – находилось под совместным влиянием МНС и рациона. Обонятельный паттерн образцов мочи изменялся не только под воздействием рациона, но и таких факторов, как доминирующее или подчиненное положение мыши, положение плода в матке матери, состояние здоровья и вес

особи (Ryan & Vandenberg, 2002), но изменение запаха образцов мочи под влиянием разных факторов, однако, не мешало животным идентифицировать тип МНС (Kwak et al., 2008); т.е. регулируемый МНС метаболический обонятельный образ имеет независимую от фона инвариантную составляющую, которую могут узнать животные.

МНС – область генома, содержащая более 160 генов, что позволяет ей играть центральную роль в регуляции иммунной системы организма, в определении совместимости трансплантации органов и тканей, подверженности организма инфекционным и аутоиммунным нарушениям (de Bakker et al., 2006; Allcock et al., 2002; Stewart et al., 2004; Horton et al., 2004). Очевидно, что этот комплекс генов принимает большое участие в изменении метаболизма при заболеваниях. Эти изменения не могут не сказываться на запахе индивида. Среди МНС генов существуют гены, определяющие степень ответа на конкретные антигены; гены, экспрессирующиеся выборочно в лимфоцитах, и другие, по-видимому, неспецифические гены. Известно о влиянии МНС на самые разные неиммунологические процессы, таких как регуляция массы тела у мышей и продукция яиц у кур; молекулы МНС I класса также могут входить в состав гормональных рецепторов. Кроме того, нельзя не учитывать и вышеупомянутого вклада фоновых генов в формирование запаха индивида, они также могут участвовать в формировании «запаха болезни».

Обнаружение заболеваний на расстоянии дает животным значительное избирательное преимущество, и оно настолько развито, что животные могут обнаруживать даже изменения метаболитов, вызванные иммунной реакцией и реакцией на стресс (Schaal et al., 2003; Kimball et al., 2014). Развитая интерпретация таких хемосенсорных сигналов позволяет потенциальным социальным партнерам осознать, что они должны «держаться на безопасном расстоянии» и/или избегать социальных взаимодействий с инфицированными сородичами.

Изменения в работе генов, связанные с заболеваниями и отражающиеся в трансформации метаболических путей, приводят к накоплению или дефициту

определенных метаболитов, которые, в свою очередь, оказывают влияние на состав ЛОС в выделениях пациентов. Следовательно, можно выделить часть запаха индивида и даже определенный набор ЛОС, который может быть маркером этих изменений в организме. Эти маркеры, в свою очередь, могут быть использованы при диагностике заболеваний или при контроле состояния пациента в ходе лечения. Это предположение лежит в основе перспективного направления исследований – использования запаха для диагностики заболеваний.

1.1.2. Влияние болезни на запах индивида. Подходы к поиску маркеров заболеваний.

Проблемы со здоровьем могут быть вызваны живыми организмами (глистные инвазии, бактериальные, грибковые инфекции), агентами, которые изменяют метаболизм хозяина, такими как вирусные инфекции и яды или физическими повреждениями (раны). Почти все перечисленные проблемы связаны с изменениями профиля ЛОС организма хозяина (Penn & Potts, 1998).

Течение инфекционных заболеваний сопровождается изменениями запаха различных выделений больного, что связано с жизнедеятельностью патогена или метаболическим ответом хозяина на инфекцию, а также сочетанием того и другого (Shirasu et al., 2011; Pavlou et al., 2000; Sethi et al., 2013; Lechner et al., 2005; Bruins et al., 2009). Большинство паразитов, грибов и бактерий сами выделяют в организм химические соединения. Они могут быть обнаружены, как ЛОС, и служить первыми обонятельными сигналами заболевания. Инфекционные заболевания определяли по запаху задолго до появления диагностических средств и методик. О том, что некоторые заболевания связаны с возникновением специфического запаха, известно со времен Древней Греции, где врачи использовали запах мочи, мокроты и других выделений пациента для постановки диагноза (Shirasu et al., 2011; Pavlou et al., 2000; Robroeks et al., 2010). В средние века был описан один из возбудителей газовой гангрены, бактерия *Clostridium perfringes*, вызывающая тяжелую инфекцию мягких тканей и кожи. В описании

был отмечен тяжелый запах, связанный с инфекцией. (Bakker et al., 1996). Позже анализ летучих соединений выдыхаемого воздуха использовали при диагностике заболеваний полости рта (White et al., 2007; Parkin et al., 2001; Parkin, 2004), а также при тестировании на наркотики (Xue et al., 2008; Cardinali et al., 2000). Во время Первой и Второй мировых войн врачи ввиду отсутствия диагностических средств полагались на свои органы обоняния и диагностировали по фруктовому запаху, исходящему от ран, синегнойную палочку *Pseudomonas aeruginosa* (Bijland et al., 2013).

В клинической медицине известны примеры инфекционных заболеваний, которым сопутствуют специфические запахи, например, дифтерия сопровождается сладковато-гнилостным запахом (Stitt et al., 1995), брюшной тиф – запахом затхлого хлеба (Pavlou, 2000), желтая лихорадка – запахом мясного магазина (Liddell, 1976). Исследования летучих соединений, выделяющиеся в случае микробного заражения организма, начались в конце прошлого века (Liddell, 1976). Показано, что при заражении таким возбудителем внутрибольничных инфекций человека, как синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) характерный виноградный аромат возникает из-за накопления 2-аминоацетофенона (Labows et al., 1980; Scott-Thomas et al., 2010; Savelev et al., 2010; Robroeks et al., 2010). Неприятный запах, связанный с изменением содержания метаболитов никотиновой кислоты, иногда сопутствует туберкулезу (Fend et al., 2006; Syhre & Chambers, 2008). Для многих других заболеваний также показано, какие ЛОС ответственны за изменения запаха выделений больных. У пациентов с инвалидным аспергиллезом, аллергическим бронхолегочным аспергиллезом и хроническим грибковым синуситом (Lin et al., 2001) был обнаружен 2-пентилфуран, также выделенный из пространства над культурой *Aspergillus fumigatus* (Syhre et al., 2008, 2009), что позволило предложить его в качестве биомаркера для ранней диагностики этих заболеваний, а также для мониторинга прогрессирования заболевания (Syhre et al., 2008, 2011). Микроорганизмы не только выделяют токсины, но токсины и жизнедеятельность бактерий влияют на хозяина, а спровоцированный ими метаболический ответ

находит отражение в летучих веществах, которые выделяются с дыханием, мочой, калом и потом.

Перемены в запахе выделений, вызванные изменениями метаболизма (иммунный ответ, воспаление, непереваренная пища, токсины), могут быть связаны и с особенностями метаболизма пациента. Последние исследования подтвердили, что многие заболевания, в том числе и неинфекционные, могут вызывать выделение ЛОС с характерным запахом (Shirasu & Touhara 2011; Trivedi et al., 2019) Наиболее известные примеры, которые до сих пор используются в современной медицине – сильный затхлый запах изо рта при печеночной недостаточности, указывающий на прогрессирующее заболевание печени, и фруктовый запах кетонов в выдыхаемом воздухе, указывающий на диабетический кетоацидоз. (Bijland et al., 2013). В образцах фекалий детей при некротическом энтероколите обнаружено пониженное содержание сульфидов и азотсодержащих соединений. У недоношенных детей наблюдается пониженное содержание сложных эфиров в ЛОС образцов кала. Это связано с тем, что большинство ЛОС фекалий образуется при ферментации пищи с участием кишечной микрофлоры, которая у недоношенных детей не сформирована (Miekisch et al., 2012). Отсутствие углеводов и терпенов при заболеваниях, связанных с нарушениями функций кишечника, связывают с присутствием бактерии *Campylobacter sp.*, а отсутствие фуранов свидетельствовало о заражении бактерией *Clostridium difficile* (Probert et al., 2009). При почечной недостаточности, в крови повышается количество мочевины, в результате образуются аммиак и триметиламин, что приводит к появлению неприятного, мочеподобного запаха (Shirasu & Touhara, 2011). Характерный запах, сопутствующий пациентам с уреимией и пациентам с циррозом печени, связан с накоплением азотсодержащих и серосодержащих соединений соответственно (Hanai et al., 2012).

Изменение запаха выделений может быть связано с генетически обусловленными заболеваниями обмена веществ и нарушениями метаболизма другой природы. Например, пациенты с изовалериановой ацидезией –

наследственным нарушением метаболизма лейцина, обладают специфическим запахом тела, который можно описать как сырный или похожий на запах потных ног. Причиной этого запаха считают производные изовалериановой кислоты, накапливающиеся в крови и моче (Shirasu & Touhara, 2011). Наследственный дефицит б-метионин-аденозилтрансферазы вызывает гиперметионинемия и демиелинизацию нейронов, что приводит к накоплению большого количества диметилсульфида, из-за которого появляется характерный капустный запах (Shirasu & Touhara, 2011). При триметиламинурии, генетическом заболевании, характеризующемся неспособностью к окислению триметиламина до триметиламина N-оксида (Whittle et al., 2007; Cashman & Zhang, 2002), появляется запах гнилой рыбы (Zhang et al., 2003). При фенилкетонурии – наследственном дефиците печеночной фенилаланингидроксилазы, преобразующей фенилаланин в тирозин, фенилаланин аномально метаболизируется до фенилпировиноградной кислоты и фенилацетата, что приводит к появлению затхлого запаха. Это дало возможность диагностировать первые случаи заболевания детей с фенилкетонурией, так как их мамы жаловались на специфический запах (Centerwall et al., 2000). При диабете 1 типа организм человека не синтезирует инсулин, из-за чего глюкоза накапливается в крови и выводится с мочой. В этих условиях клетки в качестве источника энергии используют жирные кислоты, а не глюкозу. Метаболизм жирных кислот сопровождается образованием кетоновых соединений, которые повышают кислотность крови, приводя к кетоацидозу. Накопление кетонов в моче и в выдохе приводит к возникновению фруктового запаха (Buszewski et al., 2007; Mochalski et al., 2009).

Рассмотренные выше примеры свидетельствуют о том, что заболевания влияют на спектр ЛОС, выделяемых больными. Эти изменения отражают перестройки метаболизма, которые происходят в ответ на патологические факторы (Kwak et al., 2013). Для некоторых заболеваний механизм, лежащий в основе изменения запаха тела, кажется очевидным, но, как правило, влияние метаболизма на паттерн ЛОС происходит сложным и часто не очевидным образом. Изменение запаха больного организма имеет биологический смысл и,

видимо, играет большую роль в сохранении здоровья популяций. Так как профилактика заболеваний эффективнее лечения, то сигнал, дающий возможность избежать инфекции, очевидно, полезен. Избегание больных особей опосредуется не только визуальными и поведенческими сигналами, но и запахом болезни, причем не только инфекционной. Так, например, показано, что активация воспалительного процесса введением мышам инородных антигенов – красных кровяных клеток овец (Moshkin et al., 2002) или интерлейкинов-1 (Avitsur et al., 1997) уменьшали привлекательность их запаха для конспецификов. Эти и другие исследования убедительно доказывают участие воспалительных процессов в формировании запахов, сигнализирующих о заболевании другим животным того же, а возможно, и других видов (Arakawa et al., 2011). По-видимому, эти сигналы можно считать компонентами поведенческой иммунной системы. ЛОС, по-видимому, отражают широкий спектр физиологических состояний, которые включают бактериальные, вирусные или паразитарные инфекции, а также более общие сигналы о заболеваниях, которые непосредственно не связаны с инфекционными процессами (Mykytowycz and Goodrich, 1974; Kavaliers et al., 2005; Arakawa et al., 2011). Взаимодействие между обонятельными рецепторами, МНС и рецепторами Т-клеточного антигена в совокупности изменяет поведение животных так, что они уклоняются от патогенов, а также дает возможность выбора наиболее генетически пригодных и здоровых партнеров. Таким образом, можно предположить, что запах индивида через обонятельную систему влияет на поведение конспецификов. В этом отношении обонятельную систему можно считать важным компонентом поведенческой иммунной системы. (Tizard et al., 2021).

Так как изменения в составе выделяющихся ЛОС, а также определенные ЛОС или их комплексы выделяются в течение заболеваний, они могут быть использованы медиками в качестве биомаркеров (Pavlou, Turner, 2000; Garner et al., 2007). Результаты исследований показывают, что есть изменения в спектре ЛОС, связанные с конкретными заболеваниями, например, с диабетом (Novak et al., 2007), с желудочно-кишечными и печеночными заболеваниями (Probert et al.,

2009), с заболеваниями легких (Boots et al., 2012), с различными типами рака (Horvath et al., 2009; Nakim et al., 2012; Seaman et al., 2006), с инфекциями (Dummer et al., 2011; Chambers et al., 2012) и с наследственными заболеваниями (Yamazaki et al., 1991; Handa et al., 2014; Miekisch et al., 2012). Можно сказать, что запах индивида содержит много информации, которая может быть важна при постановке диагноза, особенно для сложно диагностируемых заболеваний. С развитием технологий и накоплением информации о ЛОС такой подход к скринингу заболеваний может оказаться более быстрым и экономически более выгодным по сравнению с другими подходами. С развитием аналитических методов исследований ЛОС количество работ, посвященных этому вопросу, растет с каждым годом. Вещества, потенциально способные выполнять функции биомаркеров, исследовали в образцах выдыхаемого воздуха (Boots et al., 2012; Girona et al., 2001), мочи (Guernion et al., 2001), фекалий (Garner et al., 2007), пота (Dummer et al., 2011; Van den Velde et al., 2008) и крови (McCullough et al., 2007).

В настоящее время особенно важным считается применение ЛОС именно для ранней диагностики заболеваний и отслеживанию состояния пациента после лечения. Все больше данных свидетельствуют о том, что биохимические пути, спровоцированные заболеваниями, влекут за собой формирование специфического набора летучих метаболитов. Развитию этой области способствует прогресс в развитии аналитических методов и определении ЛОС, связанных с заболеваниями, однако пока механизмы формирования «запаха болезни» изучены недостаточно полно для идентификации и выделения надежных биомаркеров заболеваний, и в клинической практике используется лишь небольшое количество соединений, поскольку на сегодня ни один из предложенных биомаркеров не имеет адекватной чувствительности и специфичности и не обладает необходимым уровнем надежности для использования в клинических условиях (Xue et al., 2008; Khatcheressian et al., 2006). Многие летучие вещества, концентрации которых значительно отличались между контрольной группой и пациентами, были поспешно заявлены в качестве потенциальных биомаркеров заболеваний, однако среди них оказались

углеводороды, присутствующие в атмосфере при загрязнении окружающей среды, – октан, декан и производные бензола, например, этилбензол, и толуол – вещества, входящие в состав потребительских товаров: пластификаторы, например, фталаты и связанные с ними соединения, силоксаны, органические растворители, например, изопропиловый спирт, простые эфиры и другие загрязнители (Fiehn, 2016). Концентрации некоторых соединений, предположительно связанных с заболеваниями, оказываются выше в выдыхаемом воздухе, чем в помещении, но не обязательно производятся эндогенно, что может вносить погрешность в метод определения (Kusano et al., 2011; Bajtarevic et al., 2009). Экзогенные ЛОС, которые попадают в организм, могут с кровью разноситься и накапливаться в разных частях тела, то есть повышенный уровень некоторых веществ в спектре ЛОС может быть связан с их накоплением в организме с возрастом, так как они растворяются и накапливаются в жировой ткани (Singer et al., 1997). В исследовании, где крысы дышали воздухом с повышенным содержанием пентана, а пробы выдоха затем промывали чистым воздухом в течение 90 минут, не удалось удалить экзогенный пентан из выдоха, так как значительное количество соединения было поглощено и сохранено в теле животных (Singer et al., 1997).

Существует также большой индивидуальный разброс в содержании летучих метаболитов, который может привести к ложноположительным или ложноотрицательным результатам диагностики (Fiehn, 2016). Например, уровень изопрена в дыхании пациентов был предложен в качестве биомаркера в некоторых клинических исследованиях. Изопрен – основной углеводород, обнаруживаемый в дыхании человека, чья концентрация в выдохе обычно выше, чем в окружающем воздухе, а его присутствие в организме связано с биосинтезом холестерина, но точное его происхождение в организме не является полностью понятным (Singer et al., 1997). Его повышенный уровень в дыхании наблюдался у пациентов с острым инфарктом миокарда, у реципиентов трансплантата легкого, у пациентов с заболеваниями печени, у пациентов с раком легкого, а также у пациентов с воспалительным заболеванием кишечника и с сепсисом (Singer et al.,

1997). Ряд других исследований показал, что изменение концентрации изопрена в дыхании связано с частотой сердечных сокращений, физическими упражнениями и состоянием сна и бодрствования, кроме того, его уровень в дыхании повышается при курении и с возрастом (Singer et al., 1997). Следовательно, остается непонятным, с какими процессами в организме может быть связано изменение концентрации изопрена, поэтому изопрен нельзя использовать в качестве биомаркера заболеваний.

Еще одна трудность в поиске биомаркеров заболеваний может быть связана с тем, что при заболевании происходят не качественные, а количественные изменения спектра, т.е. меняется соотношение всегда присутствующих в спектре ЛОС (Abaffy et al., 2010). Например, на формирование паттерна ЛОС скорее всего влияют и те метаболические пути, которые более активны в здоровых, чем в трансформированных клетках, и подавляются при развитии опухоли (Probert et al., 2009), что приводит к изменению спектра ЛОС в выделениях. Один аналитический метод может идентифицировать только ограниченное количество метаболитов, и поэтому для расширения визуализации необходимы дополнительные аналитические платформы. Основной путь поиска маркеров заключается в разработке методов качественного и количественного определения летучих органических веществ различных выделений пациентов (Schallschmidt et al., 2016; Xue et al., 2008; Kusano et al., 2011).

Идентификация биомаркеров особенно сложна в тех случаях, когда заболеванию сопутствуют разнообразные патофизиологические изменения, а клинические проявления носят индивидуальный характер, например, при шизофрении или онкологических заболеваниях. При отсутствии четких физиологических маркеров заболевания диагностика шизофрении традиционно была основана на поведенческих признаках и нейропсихологическом тестировании уже в период проявления болезни (Singh et al., 2009). Поиск биомаркеров, которые могли бы помочь в определении группы риска, с учетом широкого спектра причин возникновения и развития шизофрении (травмы и инфекции, особенно перенесенные в пренатальный период, стресс, а также

генетическая предрасположенность), остается актуальным. На «особый запах» пациентов с шизофренией обращали внимание в психиатрических больницах еще в XIX веке (Hutton, 1878; Melançon, 1870). В 1960 году Смит и Синес показали, что обученные крысы могут отличить пот пациентов с шизофренией от пота контрольной группы по запаху (Smith & Sines, 1960). Девять лет спустя в запахе пота пациентов с диагнозом шизофрения выделили специфический компонент, транс-3-метил-2-гексеновую кислоту (Smith et al., 1969), однако позднее было показано присутствие этого вещества в поту здоровых пациентов (Gordon et al., 1973), что делает необходимым поиск других биомаркеров. Другим кандидатом может служить нейротоксин и маркер перекисного окисления липидов CS_2 , который в конце прошлого столетия удалось выделить в выдохе пациентов с шизофренией и который также был предложен в качестве биомаркера (Phillips et al., 1993). Сложность в использовании этого маркера связана с тем, что присутствие CS_2 в выдохе пациентов с шизофренией может быть связано не только с течением заболевания, но и с рядом других факторов (Phillips et al., 1995).

1.2. Особенности развития злокачественной опухоли и связь с формированием специфического паттерна летучих органических соединений.

Рак уже давно признан заболеванием, характеризующимся чрезмерным клеточным ростом, но в последние несколько десятилетий стало ясно, насколько сложна эта болезнь. В конце прошлого века в большом количестве исследований были получены сведения, позволившие заключить, что рак – скорее группа постоянно развивающихся заболеваний, при которых клетки не только активно размножаются, но и приобретают способность распространяться и выживать в отдаленных от первичного появления таких клеток органах. С тех пор были накоплены данные, обеспечившие первые шаги к пониманию сложных процессов, необходимых для перехода от здоровой одиночной клетки к метастатическому

заболеванию. На рубеже веков Ханахан и Вайнберг (Hanahan & Weinberg, 2000) опубликовали свой фундаментальный обзор «Основные признаки рака», определив шесть основных свойств раковых клеток. Нормальные клетки растут и делятся, однако существует множество механизмов жесткого контроля этих процессов. Клетки растут под стимулирующим влиянием факторов роста. Деление поврежденных клеток тормозится «молекулярными тормозами» до тех пор, пока клетки не будут восстановлены. Клетки, повреждения которых невозможно исправить, подвергаются запрограммированной гибели (апоптозу). Количество делений нормальных клеток ограничено, каждая клетка – часть общей структуры ткани. Клетке необходимо преодолеть защитные механизмы, чтобы превратиться в раковую, но каждый механизм контролируется несколькими белками, которые могут стать нефункциональными, если геном поврежден в результате соматических мутаций. Это происходит в несколько этапов, которые Ханахан и Вайнберг называют отличительными чертами. Они определили признаки рака «как приобретенные функциональные способности, которые позволяют раковым клеткам выживать, размножаться и распространяться». Нормальные клетки постепенно приобретают эти отличительные признаки и многоступенчатый процесс патогенеза опухоли может быть объяснен потребностью зарождающихся раковых клеток приобрести черты, которые позволят им стать онкогенными и в итоге, злокачественными (Hanahan & Weinberg, 2000). Позже, в 2011 году, Ханахан и Вайнберг расширили список характеристик, определяющих рак, до восьми признаков (Hanahan & Weinberg, 2011). Сейчас широко признано, что прогрессия рака определяется восемью отличительными свойствами, которые включают поддержание пролиферативной сигнализации, обход супрессоров роста, сопротивление клеточной смерти, обеспечение репликативного бессмертия, индуцирование ангиогенеза, активацию инвазии и метастазирования, дерегуляцию клеточной энергетики и избегание иммунного разрушения. Кроме того, «нестабильность генома и мутации и способствующее развитию опухоли воспаление» были добавлены в качестве двух

благоприятных характеристик для достижения отличительных признаков (Hanahan & Weinberg, 2015).

Для создания и развития макроскопических опухолей раковые клетки нуждаются в неограниченном репликативном потенциале, что приводит к резким отличиям в поведении клеток от большинства нормальных клеточных линий в организме, которые способны проходить только через ограниченное количество последовательных циклов роста и деления. Это ограничение связано с двумя четкими барьерами на пути распространения: старение, т.е. вход в непролиферативное, но жизнеспособное состояние, и кризис, который включает в себя гибель клеток.

Поддержка пролиферации

Одна из самых характерных черт раковых клеток – их способность поддерживать хроническую пролиферацию. В здоровых тканях синтез и секреция сигналов, которые руководят стадиями роста и деления клеток, тщательно контролируются. Это обеспечивает поддержание постоянного числа клеток и нормальную работу ткани. Такими сигнальными функциями в значительной степени обладают факторы роста, которые связываются с рецепторами на поверхности клетки (Hanahan & Weinberg, 2011). Раковые клетки, регулируя эти сигналы, становятся «хозяевами своей судьбы». Они препятствуют действию этих сигналов с помощью различных механизмов, начиная от секреции собственных факторов роста, которые действуют аутокринно. Факторы роста, в свою очередь, связываются с рецепторами, обычно наделенными тирозинкиназной активностью, которая регулирует прогрессию клеточного цикла. Клетки опухоли могут приобрести способность поддерживать пролиферативную передачу сигналов разными путями, например, они не только могут производить фактор роста, но также могут повышать чувствительность рецепторов, делая такие клетки гиперчувствительными даже к небольшому количеству фактора роста. Подобный эффект может быть результатом структурных изменений в рецепторных молекулах (Hanahan & Weinberg, 2011). Кроме того, раковые клетки могут посылать сигналы для стимуляции нормальных клеток из своего окружения,

которые в ответ снабжают их различными факторами роста (Cheng et al., 2008; Chen & Song, 2019). Отметим, что накапливается все больше свидетельств того, что гетеротипические взаимодействия раковых клеток с соседними, связанными с опухолью, но здоровыми стромальными клетками, могут индуцировать в этих здоровых клетках экспрессию фенотипа злокачественных клеток (Karnoub & Weinberg, 2006–2007; Brabletz et al., 2001).

Уклонение от опухолевых супрессоров

В дополнение к способности стимулировать и поддерживать действие факторов, способствующих пролиферации, раковые клетки также должны обходить мощные программы, которые подавляют клеточную пролиферацию. Многие из этих программ зависят от действий генов – супрессоров опухолей. В разных формах рака животных и человека были обнаружены десятки опухолевых супрессоров, ограничивающих рост и пролиферацию клеток разными способами (Witsch et al., 2010; Malumbres & Barbacid et al., 2009). Наиболее заметное тормозное влияние на клеточное деление и прогрессии клеточного цикла оказывают белки Rb и p53. Они действуют как центральные управляющие узлы в двух ключевых комплементарных клеточных регуляторных схемах, которые запускают пролиферацию клеток или, напротив, активируют старение и программы апоптоза.

Белок Rb объединяет сигналы от разных внеклеточных и внутриклеточных источников и в ответ решает, следует ли клетке проходить цикл роста и деления (Ku et al., 2017). В Rb - пути сигналы стресса, такие как онкогены, индуцируют ингибиторы, которые фосфорилируют и, следовательно, инактивируют Rb во время фазы G1 клеточного цикла. Rb также контролирует экспрессию многочисленных генов и влияет на транскрипцию нескольких генов, необходимых для продвижения через фазы клеточного цикла. Белок Rb также регулирует активность p53. В раковых клетках очень часто мутирует ген *TP53*, являющийся супрессором опухолей, что приводит к исчезновению или потере активности у его продукта — белка p53, который регулирует клеточный цикл и играет важнейшую роль в предотвращении образования злокачественных

опухолей (Hanahan & Weinberg, 2011). Белок Rb трансформирует сигналы ингибирования роста, которые возникают в основном вне клетки. TP53 получает сигналы от внутриклеточных операционных систем клетки: если степень повреждения генома чрезмерна или уровни нуклеотидных пулов, сигналы стимулирования роста, уровень глюкозы или оксигенации являются неоптимальными, TP53 может остановить дальнейшее прохождение клеточного цикла до тех пор, пока эти факторы не будут нормализованы. Под действием сигналов тревоги, указывающих на подавляющее или непоправимое повреждение клеточных подсистем p53 может инициировать апоптоз.

Примечательно, что различные эффекты активированного TP53 являются сложными и сильно зависящими от контекста, от типа клеток, а также от степени тяжести и продолжительности клеточного стресса и геномного повреждения. Два канонических супрессора пролиферации TP53 и Rb имеют важнейшее значение для регуляции клеточной пролиферации, однако, есть данные, которые свидетельствуют о том, что каждый из них действует как часть более крупной сети (Hanahan & Weinberg 2011).

Разрушение клеточных контактов

Показано, что межклеточные контакты, при образовании плотных популяций нормальных клеток, размножаемых в двумерной культуре, подавляют клеточную пролиферацию, что способствует образованию плотных клеточных монослоев. Такое контактное торможение не работает в культурах разных типов раковых клеток. То есть контактное торможение *in vitro* – это отражение механизма, который действует *in vivo* для обеспечения нормального развития тканей и тормозится при канцерогенезе (Hanahan & Weinberg, 2011). В настоящее время механизмы этого способа контроля становятся все более ясными. Один из опухолевых супрессоров усиливает клеточную адгезию и влияет на рецепторы фактора роста, ограничивая их способность эффективно излучать митогенные сигналы (Mendonsa & Gumbiner, 2018; Cui et al., 2019).

Второй механизм контактного торможения включает белок эпителиальной полярности, который формирует структуру эпителия и помогает поддерживать

целостность ткани и может блокировать митогенные эффекты мощного онкогена Мус, когда последний активируется в организованных покоящихся эпителиальных структурах. При подавлении экспрессии одного из опухолевых супрессоров целостность эпителия нарушается, а эпителиальные клетки становятся восприимчивыми к индуцированной Мус трансформации (Li & Zhu, 2020). Этот белок был идентифицирован как ген – супрессор опухоли, который теряется при развитии некоторых злокачественных новообразований человека (Sun et al., 2020), что, возможно, отражает его функцию подавителя неадекватной пролиферации в здоровом организме. Очевидно, что механизмы, позволяющие клеткам создавать и поддерживать сложную архитектуру тканей, являются важными средствами подавления и уравнивания несоответствующих пролиферативных сигналов.

Подавление апоптоза

Запрограммированная гибель клеток – апоптоз – служит естественным барьером развитию рака (Adams & Cory, 2007; Ruscetti et al., 2018; Evan and Littlewood, 1998).

Изучение схем сигналов, управляющих программой апоптоза, показало, как в ответ на различные физиологические стрессы, которые раковые клетки испытывают в процессе развития опухоли или в результате противоопухолевой терапии, запускается апоптоз. Среди стрессов, вызывающих апоптоз, следует отметить сигнальный дисбаланс, возникающий в результате повышенного уровня сигналов онкогенов, и повреждение ДНК, связанное с гиперпролиферацией. В многоклеточных организмах аберрантные клетки уничтожаются путем клеточной смерти для сохранения организма. Изучение схемы сигнализации, управляющей программой апоптоза, показало, что он запускается в ответ на различные физиологические стрессы, которые испытывают раковые клетки в ходе развития опухоли или в результате противоопухолевой терапии. Апоптоз запускается, например, в ответ на дисбаланс, возникающий в результате учащения передачи сигналов онкогена или в присутствии продуктов окислительного стресса и

активных форм кислорода (Menget al., 2021).

Существуют также и внутриклеточные системы контроля роста, сигналами для которых могут быть, например, неоптимальный уровень глюкозы или оксигенации, а также высокая степень повреждения генома. В этих случаях внутренние супрессоры могут остановить дальнейшее развитие клеточного цикла или могут вызвать апоптоз. Хотя такие супрессоры имеют первостепенное значение в регуляции клеток, разные свидетельства указывают на то, что каждый из них работает как часть более крупной сети, которая поддерживает функциональную избыточность (Hanahan & Weinberg, 2011).

Для опухолевых клеток крайне важно уменьшить или устранить механизм апоптоза во время их развития. Наиболее распространенной стратегией является потеря опухолевого супрессора TP53, который является датчиком критического повреждения схемы, индуцирующей апоптоз. TP53 индуцирует апоптоз в ответ на хромосомные аномалии путем повышения экспрессии белков. Потеря функции TP53 устраняет этот датчик повреждений и подавляет апоптоз, позволяя раковым клеткам выживать и размножаться. Альтернативной стратегией избегания апоптоза является увеличение экспрессии антиапоптотических регуляторов или сигналов выживания путем подавления проапоптотических факторов или приобретением кратковременной невосприимчивости к сигналам о переходе к апоптозу. Механизмы избегания апоптоза, по-видимому, отражают разнообразие сигналов, индуцирующих апоптоз, с которыми популяции раковых клеток сталкиваются во время их эволюции до злокачественного состояния (Adams & Cory, 2007; Ruscetti et al., 2018). Другие исследования показали, что апоптоз ослабляется в опухолях, которым удается прогрессировать до состояния злокачественности высокой степени и устойчивости к терапии. Апоптотический механизм состоит из восходящих регуляторов и нисходящих эффекторных компонентов (Adams & Cory, 2007; Ruscetti et al., 2018). Регуляторы, в свою очередь, разделены на два основных контура: один принимает и обрабатывает внеклеточные сигналы, вызывающие смерть, – внеклеточная апоптотическая программа. Другие рецепторы воспринимают и интегрирует различные сигналы

внутриклеточного происхождения – внутриклеточная программа. Кульминацией каждого из этих путей является активация латентной протеазы, которая запускает каскад протеолиза с участием эффекторных каспаз, ответственных за апоптоз. Клетка постепенно разбирается и затем поглощается как соседями, так и профессиональными фагоцитирующими клетками. Внутренняя апоптотическая программа чаще фигурирует в качестве барьера на пути патогенеза рака.

Клеточные условия, запускающие апоптоз, еще не полностью изучены, однако было выявлено несколько сенсоров нарушений, играющих ключевую роль в развитии опухолей (Adams & Cory, 2007; Ruscetti et al., 2018). Наиболее заметным является датчик повреждения ДНК, который функционирует через опухолевый супрессор TP53 (Hamid et al., 2019); TP53 индуцирует апоптоз путем повышения экспрессии определенных белков, делая это в ответ на значительное количество разрывов ДНК и других хромосомных аномалий. В качестве альтернативы – недостаточная сигнализация факторов выживания (например, недостаточный уровень интерлейкина-3 в лимфоцитах или инсулиноподобного фактора роста в эпителиальных клетках) может вызывать апоптоз. Еще одно состояние, приводящее к гибели клеток, связано с гиперактивной сигнализацией определенных онкопротеинов, таких как Мус, если не уравновешивается антиапоптотическими факторами (Hamid et al., 2019; Ruscetti et al., 2018).

С одной стороны, активные формы кислорода индуцируют вступление клетки в апоптоз, с другой, стойкий окислительный стресс приводит к развитию резистентности к апоптозу и может индуцировать преимущественный отбор клеток с устойчивым к апоптозу фенотипом, у которых выключен ген p53 (Villanueva-Paz et al., 2016; Piccirillo et al., 2009).

Аутофагия

Помимо апоптотической программы существуют и другие формы гибели клеток, которые расширяют сферу «запрограммированной гибели клеток» в качестве барьера для рака (Hanahan & Weinberg, 2011). Аутофагия представляет собой важный клеточно-физиологический ответ, который, как и апоптоз, обычно работает на базовых уровнях в клетках, но может быть индуцирован в

определенных состояниях клеточного стресса, наиболее очевидным из которых является дефицит питательных веществ. Программа аутофагии позволяет клеткам разрушать клеточные органеллы, такие как рибосомы и митохондрии, а полученные катаболиты перерабатывать и использовать для биосинтеза и энергетического обмена. В зависимости от типа опухоли аутофагия может подавлять рост раковой клетки или, наоборот, способствовать выживанию и разрастанию злокачественных клеток. В рамках этой программы образуются низкомолекулярные метаболиты, которые поддерживают выживание раковых клеток в стрессовой, ограниченной питательными веществами среде (Chen et al., 2018; Gao et al., 2020).

Механизмы, с помощью которых аутофагия подавляет опухолевый генез, пока неясны, но возможно избирательное уничтожение поврежденных митохондрий в периоды стресса, снижение реактивных видов кислорода, метаболический гомеостаз, деградация сверхэкспрессированных белков, участие в иммунном надзоре и защите от потенциально канцерогенных бактерий и вирусов (Galluzzi et al., 2015; Ozpolat & Benbrook, 2015).

С другой стороны, есть данные, указывающие на участие аутофагии в выживании и прогрессии опухолей; повышенная аутофагия (и даже зависимость от аутофагии) является характерной чертой многих злокачественных опухолей (White, 2012). Аутофагия может, напротив, способствовать выживанию раковых клеток в условиях жесткого метаболического стресса и гипоксии, уклоняться от иммунного надзора, приобретать инвазивный и метастатический характер (Keulers et al., 2016; Galluzzi et al., 2015; Mowers et al., 2017) и, таким образом, представляет собой еще один стрессовый ответ с контекстно-зависимой ролью в разных условиях и на разных стадиях опухоли, который может быть использован для общего выживания опухоли (White, 2012). При недостатке питательных веществ опухолевые клетки используют альтернативные пути для приобретения глутамина и других аминокислот и внеклеточных белков путем макропиноцитоза или путем фагоцитоза соседних апоптотических продуктов, а также путем поглощения и расщепления соседних живых клеток (Ghaffari et al., 2015).

Нерегулируемое потребление питательных веществ выходит за пределы повышенного потребления глюкозы и глутамина, что также может быть отличительной чертой развития опухоли. Кроме того, раковые клетки могут сжиматься и впадать в состояние обратимой заторможенности. В случае получения доступа к большому количеству питательных веществ эти клетки могут выйти из этого состояния и возобновить активный рост и пролиферацию (Hanahan & Weinberg, 2011; Ghaffari et al., 2015).

Существует взаимосвязь между путями, регулируемыми аутофагией, апоптозом и клеточным гомеостазом. Киназы сигнального пути стимулируются различными сигналами «выживания», что приводит к блокированию апоптоза и ингибирует аутофагию. Однако когда сигналов выживания недостаточно, регуляторная активность снижается, в результате чего могут быть индуцированы апоптоз и аутофагия (Gao et al., 2020).

Некроз

В отличие от апоптоза, некротические клетки высвобождают содержимое в тканевое микроокружение. Видимо, более существенно, что погибающие некротические клетки, в отличие от апоптоза и аутофагии, высвобождают провоспалительные сигналы. Как следствие, некротические клетки могут привлекать воспалительные клетки иммунной системы (Grivennikov et al., 2010; White et al., 2010; Galluzzi and Kroemer, 2008). Их основная функция заключается в исследовании степени повреждения тканей и удаления связанных с повреждением некротических обломков. Однако в контексте неоплазии многочисленные доказательства указывают на то, что воспалительные клетки могут активно способствовать развитию опухоли, поскольку способны стимулировать ангиогенез, пролиферацию раковых клеток и инвазивность (Hanahan & Weinberg, 2011).

Некротические клетки могут высвобождать биологически активные регуляторные факторы, которые могут стимулировать соседние жизнеспособные клетки к пролиферации, что может способствовать неопластической прогрессии (Grivennikov et al., 2010). Таким образом, некротическая гибель клеток, на первый

взгляд противостоящая гиперпролиферации ассоциированной со злокачественным ростом, в итоге может принести больше вреда, чем пользы. Зарождающиеся неоплазии и потенциально инвазивные и метастатические опухоли могут получать преимущество благодаря некоторой некротической гибели клеток, привлекая способствующие развитию опухоли воспалительные клетки, которые доставляют факторы, стимулирующие рост выживших раковых клеток внутри этих новообразований.

Репликативное бессмертие

Известно, что раковые клетки требуют неограниченного репликативного потенциала, чтобы генерировать макроскопические опухоли. Эта способность резко контрастирует с поведением клеток в большинстве нормальных клеточных линий в организме, которые способны проходить через ограниченное число последовательных циклов роста и деления клеток. Это ограничение связано с двумя барьерами для распространения – старением, типично необратимым входом в непролиферативное, но жизнеспособное состояние, и кризисом, который связан с гибелью клеток (Berti et al., 2020; Murai et al., 2019; Calcinotto et al., 2019).

Способность клеток опухоли размножаться без признаков старения или перехода к апоптозу, видимо, связана с тем, что теломеры защищают участки хромосом, вовлеченных в процесс неограниченного роста. Наличие теломеразной активности коррелирует с устойчивостью к индукции как старения, так и апоптоза, и, наоборот, подавление активности теломеразы приводит к укорочению теломер и к активации одного из этих пролиферативных барьеров. Вероятно, большинство зарождающихся неоплазий исчерпывают свой запас репликативных удвоений и тормозятся одним из этих барьеров. Однако некоторые клетки, образующие опухоли, видимо, способны поддерживать теломерную ДНК достаточно длинной, чтобы помогает избегать запуска процессов старения или апоптоза. Сокращение теломер стали рассматривать как устройство, которое определяет ограниченный репликативный потенциал нормальных клеток и, следовательно, как препятствие, которое должно быть

преодолено раковыми клетками (Maciejowski and de Lange, 2017; Ong et al., 2018).

Индукция ангиогенеза

Как и нормальные ткани, опухоли нуждаются в питательных веществах и кислороде, а также должны удалять продукты метаболизма и углекислый газ. Связанная с опухолью сосудистая сеть, генерируемая процессом ангиогенеза, направлена на обеспечение опухоли всем необходимым. Опухоли не могут вырасти больше 1-2 мм в размере без индукции ангиогенеза. Ангиогенез – это процесс прорастания, деления, миграции и образования эндотелиальных клеток из уже существующих сосудов (Carmeliet, 2000). В здоровом организме он используется во время эмбриогенеза для расширения и ремоделирования сосудистых сетей, а также является частью постнатальных событий, заживления ран, женского репродуктивного цикла и хронического воспаления (Ribatti et al., 2015). Однако в этих случаях работают механизмы самоограничения ангиогенеза, в отличие от злокачественных опухолей, где этот процесс постоянно активирован. В регуляции ангиогенеза участвуют про- и антиангиогенные факторы; их баланс определяет состояние «ангиогенного триггера». Когда триггер переключает баланс в сторону проангиогенных факторов (как в случае злокачественной опухоли), в тканях со спокойными сосудами появляются признаки ангиогенеза (Carmeliet, Jain, 2000).

Наиболее важный триггер ангиогенеза – гипоксия. Эндотелиальные клетки обладают рядом механизмов чувствительности к кислороду, в основном взаимодействующих с семейством транскрипционных факторов, индуцируемых гипоксией, регулирующих экспрессию множества генов, участвующих не только в ангиогенезе, но и в выживании клеток, метаболизме и воспалении. В ответ на гипоксию инициируется адаптивный транскрипционный ответ, многие продукты которого являются факторами, участвующими во включении ангиогенного переключателя (Yang et al., 2013). Поскольку гипоксия является характерной чертой опухолей, то неудивительно, что уровень транскрипционных факторов повышен при многих видах рака, что коррелирует с плохим клиническим прогнозом (Hashimoto and Shibasaki, 2015). Другие триггеры ангиогенного

переключателя в опухолях включают метаболическую перестройку эндотелиальных клеток, создающую кислое микроокружение опухоли, изменения в генах, контролирующих производство ангиогенных регуляторов, механический стресс и инфильтрат воспалительных клеток (Carmeliet and Jain, 2000). Эти триггеры могут быть опухолевыми и тканеспецифическими и могут чередоваться на разных стадиях развития опухоли (Petrovic, 2016).

Прорастающая опухолевая сосудистая сеть отличается от нормальной (Carmeliet and Jain, 2000; Hida et al., 2016). Рост опухоли сопровождается преждевременным прорастанием капилляров, искаженными и увеличенными сосудами с извилистым и чрезмерным разветвлением, неустойчивым кровотоком, микрокровоотечениями и аномальным уровнем пролиферации и апоптоза эндотелиальных клеток (Nagy and Armbruster, 2012; Siveen et al., 2017), которые помогают поддерживать новообразования. Некоторые опухоли, в том числе такие высокоагрессивные типы, как аденокарциномы протоков поджелудочной железы, гиповаскуляризованы и изобилуют стромальными «пустотами», которые в основном бессосудистые. Многие другие опухоли, в том числе почечные и поджелудочные нейроэндокринные карциномы плотно васкуляризованны.

Установлено, что клетки врожденной иммунной системы, особенно макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки и миелоидные предшественники, образующиеся в костном мозге, играют решающую роль в патологическом ангиогенезе. Они проникают в зоны предраковых поражений и прогрессирующие опухоли, собираются на полях таких повреждений. Воспалительные клетки помогают отключить ангиогенный переключатель в ранее покоящейся ткани и поддерживать постоянный ангиогенез, связанный с ростом опухоли. Кроме того, они могут помочь защитить сосудистую сеть от воздействия лекарств, нацеленных на передачу сигналов эндотелиальных клеток. В некоторых случаях наблюдалось несколько типов «сосудистых клеток предшественников» костного мозга, которые мигрировали в опухоли и превращались в виде перициты или эндотелиальные клетки, запуская васкуляризацию (Siveen et al., 2017; Chen et al., 2020; Hanahan & Weinberg, 2011).

Предполагалось, что ангиогенез важен только при формировании быстро растущих макроскопических опухолей, но результаты последних исследований указывают на то, что ангиогенез также способствует микроскопической предраковой фазе неопластической прогрессии, что еще более укрепило его статус как неотъемлемый признак развития опухоли.

Инвазия и метастазирование

Активация инвазии и метастазирования – главный из всех отличительных признаков, который вносит наибольший вклад в развитие злокачественной опухоли и смертность от рака. Инвазия и метастазирование представляют собой взаимосвязанный каскад, который начинается с инвазии опухолевых клеток – выхода этих клеток за пределы больного органа, заселения ближайших органов и тканей – и продолжается расселением опухолевых клеток в отдаленные органы с последующим образованием там новых опухолевых узлов – метастазированием – и успешным ростом метастатических колоний (Clark & Vignjevic, 2015).

Многоступенчатый процесс инвазии и метастазирования схематично можно представить как последовательность отдельных шагов, часто называемых каскадом инвазии – метастазирования (Dongre, Weinberg, 2019). В начале происходит локальное вторжение, затем – инвазия раковых клеток в близлежащие кровеносные и лимфатические сосуды; следующая ступень – транзит раковых клеток через лимфатическую и кровеносную системы с последующим выходом раковых клеток из сосудов в паренхиму отдаленных тканей – экстравазация; далее происходит образование мелких узелков раковых клеток (микрометастазы) и, наконец, рост микрометастатических поражений в макроскопические опухоли (этот последний шаг называется колонизацией).

При инвазии и метастазировании изменяются молекулы клеточной адгезии, связывающие клетки с другими клетками и внеклеточным матриксом. Для преодоления межтканевых барьеров и базальных мембран внеклеточного матрикса опухолевые клетки должны проявить совершенно новые свойства, способствующие их эффективной миграции в условиях очень разнообразного нового окружения, существенно отличающегося от старого. Один из этапов

приобретения клетками новых свойств является эпителиально-мезенхимальный переход, при котором клетки, ранее объединенные межклеточными контактами в единый эпителиальный пласт, теряют эти контакты и начинают двигаться поодиночке аналогично движению фибробластов. В активацию эпителиально-мезенхимального перехода вовлечены генетические и эпигенетические механизмы (Kalluri, Weinberg, 2009). Эпителиально-мезенхимальный переход – нормальный процесс в эмбриогенезе и органогенезе, но при инвазии и метастазировании этот процесс в значительной степени дерегулируется. Это программа дедифференцировки, в которую включен широкий спектр транскрипционных факторов, оказывающих широкое влияние на регуляцию генов и эпигенетические механизмы.

Программа эпителиально-мезенхимального перехода связана с мезенхимальным типом инвазивности. Были выявлены также два других способа инвазии раковых клеток (Fouad, Aanei, 2017). Коллективная инвазия представляет собой массово продвигающиеся в соседние ткани узелки раковых клеток. Она характерна, например, для плоскоклеточных карцином. При амебоидной форме инвазии (Madsen and Sahai, 2010; Sabeh et al., 2009) отдельные раковые клетки приобретают морфологическую пластичность, позволяющую им не прокладывать себе путь, как это происходит при мезенхимальной и коллективной формах инвазии, а пробираться через существующие промежутки во внеклеточном матриксе.

Еще одна концепция предполагает содействие воспалительными клетками инвазии раковых клеток. Воспалительные клетки собираются на границах опухоли и вырабатывают разрушающие внеклеточный матрикс ферменты, а также другие факторы, обеспечивающие инвазивный рост (Kessenbrock et al., 2010; Qian and Pollard, 2010). Раковые клетки могут выделять аттрактанты, которые привлекают воспалительные клетки, вместо того чтобы самим производить ферменты, разрушающие матрикс.

Метастазирование долгое время считали последним шагом в многоступенчатой прогрессии первичной опухоли, и действительно, для многих

опухолей это, скорее всего, так и есть (Yachida et al., 2010). С другой стороны, показано, что клетки могут распространяться очень рано, рассеиваясь из якобы неинвазивных предзлокачественных образований как у мышей, так и у людей (Coghlin and Murray, 2010). Кроме того, микрометастазы могут возникать из первичных опухолей, которые не являются явно инвазивными, но имеют неоваскулатуру, лишенную целостности просвета (Gerhardt and Semb, 2008).

Отметим, что колонизация вряд ли зависит исключительно от клеточно-автономных процессов. Скорее всего, она требует создания благоприятного микроокружения опухоли, состоящего из критически важных стромальных поддерживающих клеток. По этим причинам процесс колонизации, вероятно, охватывает большое количество клеточных программ, которые в совокупности значительно более сложны и разнообразны, чем предшествующие этапы метастазирования.

Перепрограммирование энергетического обмена

Опухолевые клетки усиливают свой клеточный и энергетический метаболизм, чтобы поддерживать устойчивую пролиферацию и адаптироваться к сложному микроокружению опухоли (Croucher et al., 2016; Psaila et al., 2006). Уже почти столетие отмечается, что метаболизм раковых клеток отличается от нормального из-за перестройки энергетического обмена для поддержания гиперпролиферативного состояния (Fouad, Aanei, 2017).

Хроническая и часто неконтролируемая пролиферация клеток, которая представляет собой сущность опухолевого заболевания, включает в себя не только отсутствие контроля пролиферации клеток, но также отсутствие регулирования энергетического обмена топливных элементов для роста и деления. В аэробных условиях нормальные клетки обрабатывают глюкозу – сначала до пирувата посредством гликолиза в цитозоле, а затем до диоксида углерода в митохондриях. В анаэробных условиях действующим механизмом становится гликолиз, и относительно мало пирувата отправляется в потребляющие кислород митохондрии. Варбург впервые заметил аномалию клеточного энергетического обмена раковых клеток (Warburg, 1956). Действительно, заметное увеличение

поглощения и утилизации глюкозы были зарегистрированы во многих типах опухолей человека. Было показано, что гликолитический обмен связан с активированными онкогенами (например, MYC) и супрессорами опухоли (например, TP53) (DeBerardinis and Chandel 2016). Зависимость от гликолиза может усиливаться в условиях гипоксии, которые сопровождают рост многих опухолей (Berretta et al., 2017).

Даже в присутствии достаточного количества кислорода клетки опухоли могут перепрограммировать обмен глюкозы, что приводит к состоянию, которое было названо «аэробным гликолизом». Такое перепрограммирование энергетического обмена на первый взгляд кажется нелогичным, т.к. клетки должны компенсировать резкое снижение эффективности продукция АТФ. Частичная компенсация происходит путем увеличения переносчиков глюкозы, которые увеличивает импорт глюкозы в цитоплазму (Pavlou, Diamandis, 2010).

Интересно, что некоторые опухоли содержат две субпопуляции раковых клеток, которые отличаются своими энергетическими путями. Одна субпопуляция состоит из клеток, которые секретируют лактат, а клетки второй подгруппы преимущественно импортируют и используют лактат, выделяемый соседями, в качестве основного источника энергии, для этого используется часть цикла лимонной кислоты (Kennedy and Dewhirst, 2010). Эти две популяции, видимо, функционируют симбиотически. Подобный тип внутриопухолевого симбиоза между лактатсекретирующими и утилизирующими лактат клетками для стимулирования роста опухоли не является изобретением опухоли, подобный механизм описан в работе мышц (Hartke et al., 2017). Оксигенация от нормоксии до гипоксии необязательно присутствует в опухоли, но может присутствовать в разное времени в какой-то из частей опухоли (Hanahan & Weinberg, 2011), вероятно, в результате нестабильности и хаотической организации новообразованных сосудов, связанных с опухолью.

Уклонение от иммунологического надзора

Несмотря на постоянное давление иммунной системы, появляются клоны раковых клеток, способные «уходить» от иммунного надзора. На этапе «побега»

клетки опухоли, способные избежать обнаружения и последующего устранения их иммунной системой, начинают расти неконтролируемым образом и формируют клинически обнаруживаемую опухоль, используя накопленные генетические и эпигенетические изменения (Malmberg, 2004). Процессы, которые позволяют опухоли уклоняться от деятельности иммунной системы и формировать злокачественное образование, включают в себя три фазы: «элиминация», «равновесие» и «побег». Элиминация является стадией иммунного надзора за раком, в результате которой врожденный и адаптивный иммунитеты сотрудничают, чтобы остановить развитие опухоли. У элиминации выделяют четыре этапа: (1) распознавание опухолевых клеток средствами врожденного иммунитета и их максимальное уничтожение, (2) созревание и миграция антигенпрезентирующих клеток и перекрестное праймирование Т-лимфоцитов, (3) генерация опухолевых антигенспецифических Т-лимфоцитов и активация цитотоксических механизмов и (4) возвращение опухолевых антигенспецифических Т-лимфоцитов к месту опухоли и устранение опухолевых клеток (Dunn et al., 2002). Затем следует фаза равновесия, которая включает в себя непрерывный отбор клеток с пониженной иммуногенностью. В это время происходит создание вариантов клеток, устойчивых к иммунитету, раковые клетки могут переходить в состояние покоя и оставаться скрытыми для иммунной системы в течение длительного времени (Malladi et al., 2016).

Раковые клетки могут нейтрализовать цитотоксичность компонентов иммунной системы посредством секреции иммунодепрессивных факторов или могут секретировать иммуносупрессивные факторы, усиливая экспрессию других иммуносупрессивных молекул (Welte et al., 2016; Jin et al., 2016), а также образовывать экзосомы, сигналы которых подавляют функции иммунитета (Muller et al., 2016).

Роль дефектов иммунологического мониторинга опухолей подтверждается поразительным увеличением встречаемости некоторых видов рака у лиц с ослабленным иммунитетом (Vajdic, van Leeuwen, 2009). В последние годы все больше фактов, как из исследований генетически модифицированных мышей, так

и из клинической эпидемиологии, свидетельствует о том, что иммунная система действует как действенный барьер при образовании и прогрессии опухолей, по крайней мере, в некоторых формах рака.

Кроме того, эксперименты по трансплантации показали, что раковые клетки, которые первоначально возникали у иммунодефицитных мышей, часто неэффективны при иницировании вторичных опухолей у сингенных иммунокомпетентных хозяев, тогда как раковые клетки опухолей, возникающих у иммунокомпетентных мышей, одинаково эффективны при иницировании трансплантированных опухолей у обоих типов хозяев (Teng et al., 2008; Kim, Emi and Tanabe, 2007).

Воспаление

Воспаление считается важнейшим компонентом многих опухолей, способствующим их возникновению и прогрессии. Воспалительные клетки – важные компоненты микроокружения опухоли и незаменимые участники неопластического процесса, которые способствуют пролиферации, выживанию и миграции клеток. Известно, что связанный с опухолью воспалительный ответ имеет непредвиденный, парадоксальный эффект усиления опухолевого генеза и прогрессии, фактически содействующий зарождающимся новообразованиям приобретать характерные признаки. Существует многочисленные и убедительные данные, свидетельствующие, что иммунные клетки, в основном из врожденной иммунной системы, воздействуют на опухоль и способствуют ее развитию (DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010).

Важно отметить, что воспаление в некоторых случаях проявляется на самых ранних стадиях развития опухоли и, очевидно, способно стимулировать развитие зарождающихся опухолей в полномасштабные раковые заболевания (de Visser et al., 2006). Воспалительные клетки также могут выделять химические вещества, в частности, поставщиков активных форм кислорода, которые мутагенны для ближайших раковых клеток и ускоряют их генетическую эволюцию к состояниям повышенной злокачественности (Grivennikov et al., 2010). Таким образом,

воспаление может считаться благоприятным фактором для приобретения основных характеристик злокачественного процесса.

Даже беглый обзор основных признаков злокачественного роста дает представление о связанных с ним масштабах перестройки обмена веществ в организме. Приобретение перечисленных выше отличительных признаков зависит в значительной степени от последовательности изменений в геноме опухолевой клетки. Определенные мутантные генотипы придают избирательное преимущество субклонам клеток, обеспечивая разрастание и возможное доминирование в местной тканевой среде. Многоступенчатое развитие опухоли может быть изображено как последовательность специфических признаков, каждый из которых запускается случайным приобретением генотипа мутанта. Эпигенетические механизмы, включающие метилирование ДНК, модификации гистонов и некодирующие РНК, влияют на структуру хроматина и регулируют экспрессию генов. Эти механизмы контролируют нормальное эмбриональное развитие и взрослую жизнь, а их дерегуляция способствует развитию ряда заболеваний, включая рак (Darwiche, 2020). Процесс опухолеобразования сложен и является результатом эволюции разных «признаков рака». Можно заключить, что дефекты в поддержании генома избирательно выгодны и полезны для прогрессирования опухоли хотя бы потому, что они увеличивают скорость, при которой развивающиеся предраковые клетки могут накапливать благоприятные генотипы (Artandi and DePinho, 2010). Развитие злокачественных опухолей зависит от последовательности использования метаболических путей и набора признаков, которые варьируются среди разных видов опухолей. Например, васкуляризация является важной отличительной чертой рака, но некоторые опухоли – гиповаскуляризованы и не могут определяться по этому признаку (Carmeliet and Jain, 2000). Другим примером является тканеспецифичное использование аминокислот с разветвленной цепью в раковых клетках, содержащих ту же мутацию (Mayers et al., 2016).

Злокачественная опухоль – не просто комок клеток, которые беспорядочно делятся, вторгаются и распространяются, а многоуровневый, точно настроенный

процесс, требующий участия всего организма. Географически разделенные раковые ткани сообщаются между собой, образуя систему, которая взаимодействует с остальным организмом через системные патогенные сети вызванные злокачественным ростом (Paul D., 2020). Характерные для рака сложные сети взаимодействий расположены на разных уровнях – клеточном, тканевом, организменном. Как описано в работе Дэниса Нобла (Noble, 2013), эти три уровня сетей взаимозависимы, взаимодействуют и влияют друг на друга.

За последнее десятилетие было предложено несколько моделей рака как системного заболевания. В 2010 году Микала Эгеблад и ее коллеги представили модель опухоли как органа, который может влиять на иммунитет, метаболизм и коагуляционный статус хозяина (Egeblad et al., 2010). В работе, опубликованной в том же году, Сандра МакАллистер и Роберт Вайнберг (McAllister, Weinberg, 2010) предположили, что взаимодействие опухоли и хозяина выходит далеко за пределы локального тканевого микроокружения, и представили концепцию «провоцирования» опухоли, согласно которой первичные опухоли нарушают нормальную работу органов хозяина и поддерживают рост метастатических опухолей в отдаленных анатомических участках. Они перечислили несколько факторов, секретируемых опухолями и обладающих системным действием: фактор роста эндотелия сосудов, а в последующей публикации те же авторы усовершенствовали свою первоначальную модель, подкрепив идею о том, что системные процессы также могут оказывать на опухоли существенное влияние (McAllister, Weinberg, 2010). В 2014 году исследовательская группа из Австрии ввела понятие макроокружения опухоли и описала глобальные метаболические изменения, которые опухоли оказывают на весь организм (Al-Zoughbi et al., 2014).

Такое системное заболевание отражается на комплексах веществ, выделяемых с выдохом, потом, фекалиями, мочой. Описанные выше перестройки метаболизма, перестройка работы генов, изменение типа клеточного дыхания, включение одних и выключение других метаболических путей сказывается на комплексе ЛОС выделений больного организма. В частности, «фенотип метаболизма рака» предполагает, что присутствующие мутации преимущественно

сгруппированы в несколько путей при разных видах рака, поэтому конечные воздействия на метаболизм схожи: высокое поглощение глюкозы, увеличение гликолитической активности, снижение активности митохондрий для производства энергии, низкие биоэнергетические затраты, увеличение оборота фосфолипидов и изменение профиля липидов, увеличение аминокислот, перенос белка и синтез ДНК, увеличение гипоксии и увеличение толерантности к реактивным формам кислорода. Метаболическое перепрограммирование давно признано одной из отличительных черт рака, а измененный метаболом злокачественной опухоли ассоциируется с агрессивным ростом и прогрессией рака (Hee et al., 2021). Эти процессы могут быть связаны с конкретными химическими сигналами, свидетельствующими о начале или распространении рака, и поэтому аналитические методы химии должны иметь возможность контролировать эти химические изменения. Соответственно, использование ЛОС в качестве маркеров заболевания остается актуальным, особенно учитывая то, что онкологические заболевания имеют индивидуальную динамику. На общую картину заболевания влияет еще и то, что отличительные признаки могут проявляться не только в разной степени, но даже в разной последовательности, что в свою очередь приводит к формированию специфического состава ЛОС (Fouad, Aanei, 2017).

В последние годы показано, что линии разных опухолевых клеток, в том числе и гепатокарцинома, выделяют специфические ЛОС *in vitro* (Filipiak et al., 2008; Amal et al., 2012). Более того, для гепатокарциномы было получено первое свидетельство существования измеримых профилей ЛОС метастатического потенциала опухоли (Amal et al., 2012). Но исследования *in vitro* игнорируют воздействие пролиферации опухоли на весь организм и лишены трудностей аналогичных исследований выделений целого организма – влияния на состав ЛОС возраста, пола, образа жизни индивида, употребления им лекарств, присутствия у него других заболеваний и т.д. Таким образом, результаты, основанные на исследованиях клеточных линий, можно рассматривать лишь как ориентировочные. Исследования ЛОС в выдыхаемом воздухе и моче пациентов с

использованием газовой хроматографии и масс-спектрометрии показали, что метаболические изменения, связанные с развитием злокачественных опухолей, влияют на спектр высвобождаемых ЛОС (Peng et al., 2014; Lubes, Goodarzi, 2017). Однако существуют значительные трудности по выявлению конкретных маркеров, связанных, несмотря на определенные успехи в исследованиях ЛОС, с онкологическими заболеваниями; до идентификации надежных летучих биомаркеров и эффективной неинвазивной диагностики онкологических заболеваний еще достаточно далеко. О ЛОС, маркирующих онкологические заболевания, известно очень мало: пока еще не совсем понятно, для всех ли онкологических заболеваний характерны определенные ЛОС, нет точных данных о том, существуют ли общие ЛОС для всех или нескольких заболеваний или для каждого типа опухоли характерен свой набор. Был выделен ряд веществ, предположительно ассоциированных с несколькими видами рака легкого (Lubes, Goodarzi, 2017; Filipiak et al., 2010), рака молочной железы (Candelli et al., 2004) и меланомы (Phillips et al., 2007). У пациентов с раком молочной железы были выделены алканы и монометилированные алканы (Ligor et al., 2009), при раке печени были обнаружены гексанал и 1-октен-3-ол (Miller et al., 2020). С гепатоцеллюлярными карциномами чаще всего ассоциированы α -фетопротеин, дезоксикарбокситромбин и фукозилированный α -фетопротеин (Peng et al., 2020; Miller et al., 2020). Однако все эти соединения связаны и с другими заболеваниями.

Например, диметилтрисульфид был предложен в качестве основного биомаркера, сопутствующего развитию опухоли груди (Shirasu et al., 2009), но этот маркер также может присутствовать при развитии инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, что осложняет его использование в качестве биомаркера онкологического заболевания (Shirasu, Touhara, 2011). Гексанал, обнаруживаемый при развитии рака печени или почек, является одним из продуктов перекисного окисления липидов (McCullough, Bartfay, 2007) и присутствует в спектре ЛОС выделений здоровых людей (Ramonì et al., 2001). Надо отметить, что до сих пор ни одно сообщение о выделенных летучих биомаркерах сложных заболеваний не

привело к их использованию в клинической практике.

Масс-спектрометрия очень чувствительна, избирательна и легко автоматизируется, поэтому является перспективным методом определения клинического диагноза по средством поиска биомаркеров онкологических заболеваний. Их обнаружение привело бы к созданию онкологических тестов на основе метаболитов на ранней стадии развития заболевания. Тем не менее, консенсуса среди авторов пока не существует. В метаанализе, проведенном Dent et al. (Dent, Sutedja and Zimmerman, 2013), рассматриваются результаты исследований рака груди несколькими группами с 2003 по 2012 год. Авторы обзора пришли к выводу, что «отпечаток ЛОС» значительно отличается в разных публикациях. То же можно сказать и про другие виды онкологических заболеваний. Постепенно многие исследователи, включая и нашу группу, приходят к выводу, что ключ к успешному выявлению рака – это исследование закономерностей изменений метаболома при развитии заболеваний (Kimball, 2016). В этих исследованиях нос животных послужит очень полезным прибором.

Основные черты гепатокарциномы

Модельной опухолью нам послужила гепатоцеллюлярная карцинома (далее – ГЦК). Поиск биомаркеров и создание неинвазивных методов скрининга особенно актуальны для заболеваний, скорость излечения которых сильно зависит от ранней диагностики. Исследования показывают, что в случае злокачественных опухолей ранняя диагностика имеет решающее значение для выживания пациента и эффективного лечения (Trinchet et al., 2009). Поэтому поиск ЛОС, маркирующих эти заболевания, – одно из важнейших направлений в поиске первых симптомов злокачественного роста. ГЦК – особенно агрессивный вид рака с очень мрачным прогнозом (Hussain et al., 2001). Раннее выявление рака печени и успехи в хирургии значительно улучшили краткосрочную выживаемость для людей с диагнозом ГЦК. Однако частота рецидивов в послеоперационном периоде достигает 70%, что является основным препятствием для долгосрочного выживания пациента (Feng et al., 2011). Субклинические метастазы первичной опухоли являются основной причиной рецидива опухоли и высокой смертности

пациентов с раком печени (Li et al., 2020). ГЦК – пятый из наиболее распространенных типов опухоли и третья из наиболее распространенных причин смертности от рака в мире (Masuda, Miyoshi, 2011). Чаще всего ГЦК развиваются на фоне хронических заболеваний печени, в частности цирроза. По современным представлениям развитие ГЦК на фоне цирроза печени – многоступенчатый процесс в виде прогрессирования тканевого и клеточного атипизма и изменений васкуляризации (Llovet et al., 2021). Для своевременной точной диагностики, позволяющей провести радикальное лечение и максимально увеличить продолжительность жизни больного, необходима биопсия – выяснение морфологических изменений ткани печени. Сейчас выделяют три типа ГЦК очаговых образований при хронических болезнях печени: большие регенеративные узелки, диспластические узелки низкой степени, диспластические узелки высокой степени и ГЦК (Berretta et al., 2017). Наиболее сложно проводить дифференциальный диагноз в случае диспластических узелков высокой степени. Одной морфологии часто оказывается недостаточно, и требуются результаты дополнительных исследований для выявления процессов неоваскуляризации и капилляризации.

Внепеченочное распространение присутствует более чем в 15% случаев при диагнозе ГЦК и чаще встречается, когда первичная опухоль достигает диаметра более 5 см. При ГЦК метастазы обнаруживают чаще всего в легких, а также во внутрибрюшных лимфатических узлах, костях, надпочечниках и реже в мозгу (Umeda et al., 2018). Так как основная причина рецидива опухоли и смерти пациента от рака печени это метастазы от первичной опухоли, возникшие до операции, ранняя диагностика ГЦК, в том числе и выделение новых высокочувствительных и специфических ранних маркеров, имеет решающее значение для эффективного лечения и повышения выживаемости пациентов (Trinchet et al., 2009). Однако раннее выявление часто невозможно из-за бессимптомной природы заболевания на начальном этапе его развития, а также из-за высоких затрат на эффективное обследование (Umeda et al., 2018). Постоянно разрабатываемые новые методы, такие как компьютерная томография,

магнитно-резонансная томография, позитронно-эмиссионная томография, позволяют с достаточно высокой точностью диагностировать рак. Однако их высокая стоимость, большие затраты времени и некоторые риски для здоровья пациентов (например, увеличение риска развития рака при радиационном воздействии (Jett, 2005) и потенциальная опасность ненужных биопсий при доброкачественных поражениях (Zlotta, Nam, 2012)) не позволяют выявлять все случаи гепатокарциномы на ранних стадиях.

Целью скрининга является выявление заболевания на стадии, когда лечение является максимально эффективным и наименее травмирующим. В идеале скрининг-тест должен идентифицировать бессимптомных пациентов (Pinsky, 2015). Но на сегодня скрининговые тесты онкологических заболеваний не показали своей эффективности (Bedell et al., 2020).

Прогрессирование опухоли является сложным многоступенчатым процессом, включающим разные факторы и изменения разных генов. Во время прогрессирования опухоли число, вид, распределение и уровень экспрессии опухолевых маркеров у пациентов с ГЦК могут значительно различаться. Большое количество маркеров ГЦК предложено для применения в клинике, однако в большинстве случаев предложенные соединения недостаточно надежны для определения этого заболевания. В клинической практике существует большое количество маркеров ГЦК, однако в большинстве случаев один маркер не обладает специфичностью и приводит к разной степени ложноположительной реакции при некоторых доброкачественных заболеваниях. Основные биомаркеры ГЦК – альфа-фетопротеин и дез-гамма-карбокситромбин – используются для раннего выявления ГЦК и в качестве маркеров рецидива заболевания при наблюдении за пациентами. Однако у ~30% пациентов с ГЦК этих маркеров не обнаружено (Masuda, Miyoshi, 2011). Первое свидетельство существования профилей ЛОС метастатического потенциала опухоли для ГЦК было получено *in vitro* в 2012 году (Amal et al., 2012). Однако исследования *in vitro* игнорируют воздействие пролиферации опухоли на весь организм и не учитывают влияния на состав ЛОС выделений целого организма связанных, например, с возрастом,

полом, образом жизни индивида, употребления им лекарств, присутствия у него других заболеваний и т.д. Таким образом, результаты, основанные на исследованиях клеточных линий, можно рассматривать лишь как ориентировочные. Показано также, что ЛОС, выделенные из выдоха пациентов, могут быть полезны в качестве маркеров ГЦК (Qin et al., 2010).

Следовательно, актуальна разработка эффективных стратегий тестирования для улучшения ранней диагностики ГЦК, включая и комбинированное обнаружение нескольких биомаркеров, которые могут дополнять друг друга, что повышает шансы ранней диагностики. Определение, сравнение и расшифровка вариантов паттернов ЛОС, которые тесно связаны с возникновением и путем развития гепатокарциномы – один из обнадеживающих вариантов поиска маркеров этого заболевания.

1.3. Использование модельных животных.

1.3.1. Мышиная модель рака.

Экспериментальная онкология использует модели, в которых течение заболевания коррелирует с развитием заболевания у человека. Учитывая особенности моделей, полученные данные можно применять в клинике, где их корректируют или отвергают, что придает выбору подходящей для исследования модели исключительное значение.

Изучение онкологических заболеваний животных помогло выявить основные закономерности роста злокачественной опухоли. Опухоли встречаются у многих животных, однако лишь некоторые из них могут служить моделями, которые применимы для исследований процессов онкогенеза у людей (Побяржин и др., 2018).

В качестве модельного объекта используют линии дрозофил, для которых характерна высокая частота развития спонтанных опухолей. На них проводятся исследования механизмов генетической предрасположенности к опухолям.

Опухоли разных тканей у рыб – удобная модель для исследования канцерогенных факторов. Для изучения вирусного канцерогенеза используют лягушек и домашних кур. У лягушек удается индуцировать опухоли канцерогенными веществами или вирусами, но спонтанные опухоли у них встречаются редко. Наиболее удобна для исследования карцинома почек леопардовой лягушки, для которой доказано вирусное происхождение. У домашних кур довольно часто возникает вирусная саркома, поэтому эта модель также применяется для изучения вирусного канцерогенеза. У кроликов часто возникает вызываемая вирусом спонтанная папиллома. Она представляет собой доброкачественные бородавчатые разрастания на коже ушей, которые впоследствии превращаются в злокачественную опухоль, дающую метастазы в легкие и лимфоузлы. Эта модель с успехом применяется для решения проблем вирусологии и иммунологии опухолей. Спонтанные опухоли собак иногда используют на последних предклинических этапах испытания противоопухолевых химических соединений. Доброкачественные и злокачественные опухоли разных органов встречаются у обезьян, некоторые из них образуют метастазы. Однако появляются опухоли у этих животных в возрасте 10–15 лет, что делает модель дорогостоящей (Попова, 2000).

Чаще всего используются в качестве модельных животных для экспериментальной онкологии лабораторные мыши и крысы, которых легко содержать, они быстро размножаются, и существует много разных линий этих животных. Их используют для решения многих проблем онкологии, например, для исследования роли генотипа и вирусов в возникновении опухолей, роли гормонов, проблемы предраковых образований, тестирования канцерогенов и противоопухолевых соединений (Попова, 2000).

Существует значительное сходство во многих характеристиках рака и факторов риска у людей и лабораторных грызунов (Anisimov et al., 2005). Течение заболевания, показатели смертности, а также изменение риска заболевания раком в зависимости от возраста показывают заметное сходство в развитии онкологического заболевания у людей и грызунов. Эксперименты на грызунах

внесли существенный вклад в понимание причин изменения скорости протекания, снижения риска возникновения рака и сузили список возможных причин для дифференциации, селекции и соматического образования раковых клеток.

Наличие параллелей между канцерогенезом у мышей и человека не отменяет существующие важные различия в патогенезе опухоли и формировании метастазов на клеточном и молекулярном уровнях, но позволяет создать оптимальные условия для изучения заболеваний. Значительные различия онкогенеза у людей и грызунов не уменьшают важность исследований моделей рака на животных. У «модельных пациентов» один пол, возраст и минимальные генетические различия, что значительно облегчает изучение заболевания, но недостижимо при работе с людьми. Адекватная экстраполяция результатов экспериментов приводит к пониманию процессов, сопутствующих развитию опухоли, и повышает надежность диагностики и лечения заболевания (Olson et al., 2018).

Один из широко распространенных методов моделирования опухоли на мышах – перевивка опухоли. Хотя перевиваемые опухоли, как модели, имеют существенный недостаток – при трансплантации опухоль переносится в организм здорового животного и, по сравнению со спонтанными опухолями, это искусственная ситуация – эта методика имеет много преимуществ. Использование перевитой опухоли позволяет без необходимости дожидаться появления спонтанной соматической опухоли получать достаточное количество материала, большое число сравниваемых групп животных. Перевивка опухоли с одной особи на другую в пределах одной линии мышей почти всегда успешна. Опухоль можно одномоментно перевить большому количеству животных, получив таким образом одинаковый старт развития. Можно следить за развитием опухоли, например, за изменением ее размеров. Любую спонтанно возникшую или индуцированную опухоль можно превратить в перевиваемый штамм, то есть опухоль, сохраняющую свои свойства при последующих перевивках (Попова, 2000). Эта модель позволяет значительно снизить не связанные с болезнью различия в спектрах ЛОС выделений больных и здоровых организмов и позволяет наблюдать

за развитием болезни и сопутствующими изменениями спектра ЛОС в ограниченный период времени. В этом случае различия в генетике «испытуемых» и контрольных животных, в их диете, возрасте, всем том, что добавляет отличий в запах индивида, за исключением болезни, сведено к минимуму. Кроме того, перевитая опухолевая ткань позволяет исследовать изменение запаха заболевания на разных стадиях развития опухоли в организме. Точно определенное по времени начало заболевания и быстрое развитие опухоли, изменяющееся буквально по дням, позволяет сравнить запах одних и тех же организмов на разной стадии болезни. Приблизительно оценить развитие заболевания можно по количеству опухолевой ткани.

1.3.2. Эксперименты с животными-макросматиками.

До сих пор не существует приборов, способных сравнивать запахи и выявлять их тонкие отличия. Животные делают это легко, поэтому многие исследователи используют животных для сравнения запахов организмов и выявления отличий, связанных, например, с болезнью. Наиболее перспективными исследованиями являются работы с животными-макросматиками, т.е. животными с хорошо развитым обонянием, которые в состоянии достоверно распознавать запахи исследуемых объектов.

Все больше исследователей используют животных, чтобы повысить эффективность ранней диагностики ряда заболеваний, таких как рак и туберкулез (Pflumm, 2011). Мыши и крысы – распространенные лабораторные животные, поэтому это одна из используемых групп биосенсоров.

Использование поведения, управляемого запахом, в качестве первоначального теста на различия запахов имеет ряд преимуществ. Во-первых, грызуны обладают острым обонянием, способностью обнаруживать низкие концентрации запахов (Bodyak & Slotnick, 1999) и выявлять тонкие различия в стимулах (Chapuis & Wilson, 2011; Barnes et al., 2008). Кроме того, грызуны демонстрируют высокий уровень мотивации к поиску и исследованию запахов

(Brown, 1979; Doty, 1986; Baum & Keverne, 2002). Обученные африканские крысы *Cricetomys gambianus* определяли случаи туберкулеза в образцах мокроты человека с точностью более чем 90% (Kanaan et al., 2021), а Матсумура с соавт. (Matsumura et al., 2010) показал, что обученные мыши-биосенсоры отличают мочу мышей с индуцированной опухолью легких от мочи мышей контрольной группы, и эти различия в моче могут быть проанализированы методами масс-спектрометрии и газовой хроматографии (Cambau, Poljak, 2020). Эти исследования могут служить ключом к поиску летучих биомаркеров мочи (Shirasu, Touhara, 2011). Также ряд исследований показал, что мыши могут распознавать связанный с МНС запах мочи мышами-биосенсорами (Yamaguchi et al., 1981; Beauchamp, Yamazaki, 2003; Willse et al., 2006). Показано, что хотя мыши могут распознавать ЛОС мочи и крови (Yamazaki et al., 1979, 1999; Yamaguchi et al., 1981), моча, видимо, представляет собой более сильный и эффективный источник запаха (Yamaguchi et al., 1981).

Для работы с мышами-биосенсорами широко используют Y-лабиринт и методику habituation-dishabituation. В Y-лабиринте взрослых мышей обучают обнаруживать различия в образцах запахов, используя вознаграждение водой (Yamaguchi et al., 1981; Beauchamp, Yamazaki, 2003). После успешного обучения испытания без вознаграждения начинают перемежаться с испытаниями с вознаграждением, чтобы приучить мышей к периодическому отсутствию вознаграждения после правильного ответа. Действительно, метод Y-лабиринта имеет много преимуществ для оценки информации, содержащейся в биологических сигналах. Возможно, самым полезным из них является то, что он позволяет судить о сходстве запахов. По сути, этот метод позволяет задать животному-сенсору вопрос о степени сходства двух запахов (Beauchamp, Yamazaki et al., 1990; Duncan et al., 1992).

Другой альтернативный способ установить степень сходства запахов – использование метода «привыкания-восстановления» (habituation-dishabituation). Этот метод считается более естественным, так как в нем используется спонтанная реакция необученных мышей (Schellinck et al., 1995; Penn et al., 1998). В этой

методике (Penn, Potts, 1998; Brown et al., 1987) животному-сенсору предъявляют несколько последовательных одинаковых образцов источника запаха, например, мочу какого-либо животного, и регистрируют количество времени, затраченное на исследование каждого из них. Как правило, сенсор тратит все меньше времени на исследование каждого следующего образца. Он адаптируется к одному и тому же сигналу, когда тот повторяется. Когда вводится новый образец, например, образец мочи другого животного, мышь «восстанавливается» и исследует новый образец дольше, чем предыдущий. Это доказывает, что мышь может различать эти образцы, при условии, что были проведены все соответствующие проверки. Считается, что тест на привыкание-восстановление по точности не уступает тесту в Y-лабиринте.

Необыкновенное обоняние собак в сочетании с возможностью обучения путем оперантного обусловливания позволяет использовать собак для медицинской детекции в широком диапазоне применений. В настоящее время собак используют при обнаружении наркотических (Jeziński et al., 2014) и взрывчатых веществ (Furton & Myers, 2001), при поиске потерявшихся людей (Ferry et al., 2019), исчезающих видов животных и паразитов (Brown et al., 2006). После того, как Уильямс и Пемброк сообщили о пациенте, чья собака постоянно обнюхивала родинку на ноге, которая оказалась гистологически подтвержденной меланомой (Williams, Pembroke, 1989), подобные случаи продемонстрировали, что собаки могут быть обучены определять меланому на коже добровольцев. Проводимые с тех пор исследования способности собак выявлять людей с инфекционными или неинфекционными заболеваниями многообещающи, но по сравнению с устоявшимся и признанным использованием собак в полиции, армии и на таможне применение собак в медицине все еще находится в зачаточном состоянии. В последнее время все больший интерес вызывает использование собак в качестве диагностического и лабораторного инструмента для поиска «запаха болезни» (Koivusalo, Reeve, 2018; WHO R & D, 2021¹).

Сложный процесс распознавания запахов начинается с возникновения и

¹ URL: <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19>.

состава запахов (Angle et al., 2016). Большинство запахов, обнаруживаемых собаками при вдыхании, представляют собой ЛОС разного состава, находящиеся в воздухе (Angle et al., 2016). ЛОС могут различаться по величине молекул, их летучести и концентрации. Концентрация вещества в воздухе коррелирует с концентрацией его источника, летучестью, площадью поверхности, выделяющей запах, объемной скоростью потока, движением окружающего воздуха и скоростью диффузии внутри источника (Kesselmeier, Staudt, 2000). Кроме того, в зависимости от материалов, контактирующих со специфическими запахами, происходит адсорбция или поглощение ЛОС окружающими поверхностями, что важно для отбора проб и представления образцов собакам. Как правило, жидкости и пластиковые полимеры поглощают запахи, в то время как поверхности, такие как металл, стекло, дерево и хлопок, адсорбируют и выделяют их (Goss, 2019).

Биогенные ЛОС, например, изопрен и монотерпены (наиболее распространенные соединения), а также алканы, алкены, карбонилы, спирты, эфиры, эфиры и кислоты (Kesselmeier, Staudt, 2000), имеют сильный запах, производятся и выделяются животными, растениями и микроорганизмами. ЛОС-паттерн организма регулируется клетками, продуцирующими ЛОС, и в значительной степени определяется его физиологическим или патофизиологическим метаболизмом. Однако, последний подвержен экзогенным воздействиям, таким, например, как курение (Kesselmeier, Staudt, 2000). ЛОС выделяются из разных тканей и жидкостей организма. Наиболее распространенные биологические жидкости и ткани для диагностического тестирования – кожные выделения, моча, кровь, слюна и фекалии, различающиеся по составу ЛОС (Vamford, 2015). Животные выделяют обширный репертуар ЛОС, который зависит от возраста, диеты, пола, генетики, физиологического или патологического состояния и может рассматриваться как маркер индивидуальности (Shirasu, Touhara, 2011). Патологии изменяют запах тела либо путем производства новых ЛОС, либо путем изменения соотношений в паттерне ЛОС. Эти изменения обнаруживают собаки (Shirasu, Touhara, 2011). Поэтому одно из важнейших условий обучения собак для биодетекции – создать такие

условия, чтобы собаки не могли использовать в качестве «запаховых маркеров» индивидуальные запахи субъектов или запахи среды, в которой были получены образцы (например, больничной запах), а реагировали только на специфический запах болезни (паттерн ЛОС) и успешно завершали процесс обобщения.

Разные заболевания вызывают появление и выделение более или менее специфических паттернов ЛОС (Shirasu, Touhara, 2011), которые могут быть использованы в качестве диагностических обонятельных биомаркеров. Куадер с соавт. (Qader et al., 2015) определил ЛОС, связанные с патогенами, выделяемые вирусными и бактериальными культурами, в то время, как группа Степперта (Steppert et al., 2021) обнаружила разницу в выделяемых ЛОС между инфекциями SARS-CoV-2 и Influenza-A в дыхании человека. Запах больного индивида состоит из тысяч разных ЛОС, отличающихся по величине молекулы, летучести и концентрации. На состав ЛОС могут влиять разные параметры, такие как генетика, условия окружающей среды, возраст, гидратация, питание, микробиом, болезни и фармацевтические препараты.

Исследования показали, что хотя чувствительность и специфичность для каждой отдельной собаки оказались немного разными для каждого представленного образца, в целом они довольно схожи для каждого типа выделений (Jendryn et al., 2021). Возможно, собаки выделяют для себя как положительный не один и тот же паттерн ЛОС, а немного разные. К сожалению, невозможно предсказать, какой именно комплекс ЛОС «выберет» собака как положительный при обучении поиску «запаха больного», поскольку пока неизвестны маркеры заболеваний и невозможно предъявить животным «чистый» искомый запах, как это делают, например, обучая собак поиску взрывчатых веществ или наркотиков. Тем не менее результаты работ разных исследовательских групп показывают, что все собаки успешно обучаются выделять запах, свойственный определенному заболеванию, иначе не удалось бы достичь результатов, перечисленных ниже (Jendryn, 2020; Jendryn et al., 2021).

В современной литературе нет ясности относительно обонятельных способностей конкретных пород и обсуждается влияние генетического

полиморфизма по сравнению с поведением и обучаемостью (Polgár et al., 2016; Siniscalchi, 2016; Hall et al., 2015).

Следует также отметить, что в большинстве исследований не проводился предварительный отбор собак по их пригодности к биодетекции, но если бы такой отбор был проведен и в работе использовались бы только собаки с наилучшими показателями, результаты существенно улучшились бы.

Дизайн обучения и тестирования в разных исследованиях отличался, но обучение собак во всех работах было основано на положительном подкреплении. Как на тренировках, так и в экспериментах в большинстве исследований использовались линейки с разным количеством представленных образцов. В качестве искомым использовались образцы, полученные от больных людей или животных, контрольные образцы были получены от здоровых людей или животных. Чувствительность в разных исследованиях менялась от 65 до 100%. В нескольких работах было показано, что собаки могут быть обучены выявлению онкологических заболеваний на основе запаха мочи или опухолевой ткани пациента (Moser, McCulloch, 2010). Рак молочной железы и легких собаки определяют на самых ранних стадиях с точностью не менее 88% по образцам выдыхаемого воздуха (McCulloch et al., 2006). Запах рака простаты собаки могут распознать в моче человека с чувствительностью 91% (Lippi et al., 2011). Обученные собаки могут различать образцы крови от пациентов с раком яичников и другими гинекологическими онкологическими заболеваниями (Horvath et al., 2010). Стадия рака, возраст, курение и рацион пациентов не влияли на диагностические характеристики собак, причем как с образцами дыхания, так и с образцами мочи (Gordon et al., 2008; Amundsen et al., 2014). Несмотря на многообещающие результаты работы собак по обнаружению запаха болезни (Fischer-Tenhagen et al., 2018), этот метод пока широко не используется в лабораторных исследованиях.

Отмечаются как преимущества, так и недостатки существующих методик исследований с собаками (Jeziarski et al., 2015). Из ограничений применения собак в первую очередь нужно назвать отсутствие в настоящее время стандартных

методов обучения и применения собак для обнаружения заболеваний. Попытка выработки таких стандартов была предпринята в нескольких исследованиях собак (Koivusalo, Reeve, 2018; Edwards et al., 2017). Кроме того, каждая собака имеет индивидуальный характер, индивидуальный уровень подготовки, и собаки разных пород несхожи по характеру и успешности обучения, что нужно учитывать экспериментатору. Собаки – живые существа, и изменения среды значительно влияют на показатели обнаружения, а уровень обучения должен поддерживаться регулярными тренировками.

Результаты испытаний показали, что полицейские собаки ошибаются при отслеживании и обнаружении запаховых улик (McCartney, 1968). Затем были рассмотрены критерии проверки реакции собак (Ferry et al., 2018; Katz et al., 2007; Cook, 2002). Изменения в поведении от первоначального внимания к росту ошибок связывают с тем, что собаки первоначально усердно ищут образец запаха, наиболее похожий на стартовый, но в ходе обучения находят более простые решения для различения образцов. Другими словами, во время обучения собаки узнают, что запаховый образец избыточен или существуют некоторые подсказки при постановке эксперимента (Hale, 2017). Поэтому успешность применения собак во многом зависит от работающих с ними экспериментаторов и умения последних правильно ставить задачу для животных. Однако пока немного известно о факторах, способных влиять на идентификацию запаха собакой.

После того как собака выучила общую процедуру, она может пытаться использовать другие сигналы, чтобы найти целевой образец в ряду. По этой причине все образцы в ряду должны иметь одинаковый внешний вид без каких-либо характерных деталей, которые могут быть использованы собакой, чтобы отличить этот образец визуально (Hall et al., 2015). Собака может использовать пространственную информацию, например, руководствоваться тем, где был скрыт искомый образец во время предыдущего испытания. Процессы, используемые собаками для кодирования пространственного положения скрытого объекта, очень гибкие. Они, как правило, основаны на эгоцентрической пространственной информации, в соответствии с собственной пространственной координатой. Если

же экспериментальная ситуация исключает успешное использование эгоцентрической пространственной информации, собаки способны кодировать аллоцентрическую пространственную информацию, используя пространственные соотношения между местоположением искомого образца и объектами, окружающими его (Fiset et al., 2000). Местоположение искомого образца должно меняться таким образом, чтобы предотвратить у собаки формирование привычки чаще указывать на какую-то конкретную позицию. Полная рандомизация в изменении расположения искомого образца также не всегда полезна потому, что некоторые собаки могут чаще указывать на определенную позицию, например, на первую или последнюю. Поэтому многие аспекты эксперимента, в том числе и расположение искомого образца, всегда должны быть тщательно продуманы исследователем (Hall et al., 2015).

Другой потенциальной проблемой может быть т. н. «эффект умного Ганса» - бессознательная подача инструктором некоторых сигналов собаке. Чтобы избежать бессознательной связи между обработчиком и собакой во время поиска, местоположение целевого образца необходимо скрывать как от собаки, так и от инструктора (Soproni et al., 2001, 2009; Сулимов, 2005).

В отличие от аналитических инструментов, собаки подвержены скуке, усталости, голоду и внешним воздействиям для отвлечения от работы. Эти проблемы имеют особое значение в лабораторной работе, когда необходимо определенное количество повторений, что не так интересно собаке, как погоня за запахами на улице (Hackner, Pleil, 2017).

Остается открытым вопрос, является ли положительный ответ собаки реакцией на запах, специфичный для развития заболевания, или собаки реагируют на запахи, косвенно с ним связанные, такие как воспаление, некроз или метаболитические продукты, которые часто существуют у пациентов с развитой опухолью, но не являются особенностью онкологического заболевания (Shirasu, Touhara, 2011; Jezierski et al., 2015).

Исследования по обнаружению заболеваний собаками различаются по постановке эксперимента, материалу образца (моча, дыхание, кровь, слюна,

фекалии, пот), методу отбора проб, индивидуальным характеристикам собак, методам дрессировки собак и стратегиям оценки результатов.

Преимуществами кинологического метода являются, прежде всего, неинвазивность, быстрота, почти мгновенный результат, экономичность, мобильность, высокая чувствительность и специфичность носа собаки, простота и безопасность отбора проб, процедуры тестирования, хранения образцов и оценки результатов. Образцы могут быть сохранены в течение некоторого времени и представлены нескольким собакам, что может повысить точность сравнения запахов.

Большое преимущество применения собак состоит в его эффективности. Собаки могут обследовать большое количество образцов за короткое время с высокой точностью выбора. После успешного этапа обучения собак можно использовать в любых условиях, тогда как большинство инструментальных методов требуют стандартных условий окружающей среды для надежного функционирования. В целом этот метод имеет многообещающий потенциал для эффективного выявления инфекционных и неинфекционных заболеваний как в лабораторных условиях, так и в условиях скрининга заболеваний. Однако для скрининга необходима стандартизация и валидация использования собак.

Период обучения собак для исследований новых заболеваний требует гораздо меньше времени, чем изобретение нового технологического метода тестирования. После завершения обучения процедура тестирования становится простой и экономит время. Отметим, что животные обладают способностью, пока недоступной приборам, – они умеют сравнивать запахи и выбирать из предложенной линейки запах, наиболее схожий с эталонным образцом. Собаки не только обладают хорошим обонянием с низкими пороговыми значениями (McCulloch et al., 2006), но и могут анализировать обонятельную информацию, различать и находить нужный образец, используя эталонные выученные обонятельные образы. Основное различие между использованием собак и аналитических инструментов заключается в том, что аналитические приборы, используемые для газовой хроматографии, сосредоточены на выявлении

отдельных соединений или группы соединений (Gasparri et al., 2016; Aggio et al., 2016), тогда как собака воспринимает закономерности бесчисленных биохимических реакций, которые приводят к определенному запахному образу (McCulloch et al., 2006; Vikov et al., 2015).

Кроме того, собаку, обученную работать по выбору запаха, наиболее схожего с эталонным образцом, легко переключать с одной задачи на другую, не затрачивая много времени на переучивание. Так, собака, обученная поиску взрывчатых веществ, легко и быстро переключается на поиск образца больного организма среди здоровых.

При тестировании существует четыре варианта реакции собаки на предъявленные образцы: истинно положительная реакция означает, что собака правильно указывает на положительный образец болезни. Ложноположительная реакция означает, что собака неправильно указывает на контрольный или отвлекающий образец. Истинно отрицательная реакция: собака правильно не указывает на контрольный или отвлекающий образец. Ложноотрицательная реакция – собака неправильно не указывает на положительный образец.

1.4. Специализированные базы данных для хранения и обработки информации, полученной в биологических экспериментах.

В любой работе, связанной с большими наборами данных, может возникнуть ряд проблем при их обработке и анализе. Общей проблемой является объединение данных из нескольких систем в единую базу данных, поскольку отдельные фрагменты данных могут находиться в нескольких хранилищах, что не позволяет использовать отдельные данные в полном объеме и затрудняет анализ информации. База данных позволяет решить эти проблемы и представляет из себя совокупность массивов и файлов данных, организованные по определённым алгоритмам и предусматривающим стандартные принципы описания, хранения и обработки информации независимо от ее вида и формата (Campigotto et al., 2020).

Растущий объем данных может позволить исследователям решать более комплексные и сравнительные вопросы, однако распространение и доступность данных являются препятствиями для этого. Сокращение времени, необходимого для сбора данных, облегчило бы анализ, но информация должна быть доступна в удобном формате, другими словами у исследователей существует потребность в базе данных, которая обеспечивает легкий доступ и визуализацию информации. (do Nascimento et al., 2020).

На современном этапе развития методов хранения и обработки данных есть возможность создание логической модели в виде базы данных, позволяющую не только хранить данные, но и осуществлять массовое управление, анализ и интеграцию с другой лабораторной и клинической информацией. Все эти функции может выполнять реляционная база данных (структура связанных таблиц) в комплексе с программной поддержкой планирования и проведения экспериментов и алгоритмами анализа результатов. Анализ требований конкретной области для интеграции и масштабной обработки данных может обеспечить необходимые модификации схемы, которые откроют дополнительные функциональные возможности реляционной базы данных. (Drakos et al., 2008; Кочевалина, Трунов, 2016).

Интеграция информации имеет большое значение для решения многих проблем при анализе данных. Реляционные базы данных позволяют хранить и переводить данные из разных форматов таким образом, чтобы облегчить конечным пользователям, как проведение исследований, так и изучение конкретных случаев. Схема базы данных организована таким образом, что позволяет выполнять синтаксически простые запросы, которые предоставляют необходимые результаты для изучения данных (Drakos et al., 2008).

Еще одной общей проблемой, которую помогает решить использование базы данных, является то, что анализ данных биомедицинских исследований, часто основывается на однофакторном статистическом анализе. Подобный подход позволяет вычислить средние значения и стандартные отклонения отдельно для каждой переменной или определить, верхнюю и нижнюю границу, а также

определить, есть ли различия между данными, взятыми из двух групп. Однако такой подход игнорирует тот факт, что собранные данные часто коррелируют в той или иной форме. Многофакторный анализ больше подходит для экспериментов с большим количеством переменных, поскольку позволит обнаружить различия в наборах данных, которые традиционный одномерный подход может не выявить (Vargason et al., 2017).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальная модель опухоли.

2.1.1. Подготовка экспериментальной модели и контрольных групп мышей.

Экспериментальной моделью служили самцы гибридных мышей BDF1-f1 (DBA2 x C57Bl/6) – экспериментальные биомодели для исследования механизмов развития опухолевых процессов и оценки эффективности противоопухолевых средств на основе перевиваемых опухолей. Мы использовали штамм H33 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 (Lazarevich et al., 2004). Опухолевые клетки трансплантировали 2–3-месячным гибридным самцам BDF1, а затем ткань развившейся (100 мг измельченной опухолевой ткани в 0,5 мл 0,9% физиологического раствора) опухоли подкожно перевивали 2–3-месячным экспериментальным животным, использовавшимся в исследовании. У животных собирали мочу и фекалии для исследования на присутствие ЛОС, связанных с развитием 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 (100 мг измельченной ткани здоровой печени в 0,5 мл 0,9% физиологического раствора). Инъекции физиологического раствора и перевивку здоровой ткани печени делали подкожно в лопаточную область одновременно с перевивкой опухолевой ткани опытным

мышам иглой того же диаметра, что и при перевивке. Для инъекции ткань печени измельчали аналогично тому, как это делали с опухолевой тканью.

Хранение и ведение ткани гепатокарциномы, перевивку ткани гепатокарциномы и ткани здоровой печени, инъекцию физиологического раствора, а также изготовление и описание срезов перевитой ткани осуществляла кандидат биологических наук старший научный сотрудник в лаборатории канцерогенных веществ НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН О. В. Морозова.

2.1.2. Сбор образцов.

Одна и та же мышь могла быть использована для сбора разных контрольных и экспериментальных образцов мочи. Сначала могли быть собраны образцы мочи от интактной особи, затем этой особи вводили физраствор и собирали образцы мочи. Не менее чем через месяц той же особи могла быть перевита ткань здоровой печени, а затем, также спустя месяц, опухолевая ткань. В экспериментах использовали разные сочетания перевивок, но за время использования в экспериментах одному и тому же животному делали не более трех введений. Это было необходимо для сравнения запаха одной и той же мыши в разных состояниях.

Всего было использовано 658 (в эксперимент попала моча 465 животных) модельных животных. Эти животные поступали очередно группами от 5 до 200 особей одномоментно. Всего поступило 22 группы животных. Животных каждой группы метили отрезанием пальцев на задних ногах. Каждая группа животных и каждая мышь индивидуально получали идентификационный номер, который вносили в электронную базу данных (описание смотри в пункте 2.3.).

Экспериментальных мышей содержали по 10 штук в полипропиленовых клетках (36 x 24,5 x 10,5 см). Все мыши получали рацион лабораторного грызуна «Лабораторкорм» (Москва, Россия). Все животные содержались в одинаковых условиях в помещении с контролируемой температурой (21°C) и при 12 x 12-часовом цикле свет–темнота. Уход осуществлялся в соответствии с

Руководством по уходу и использованию лабораторных животных и экспериментальных протоколов «ОЭСР. Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009).

Образцы мочи и фекалий собирали у интактных мышей ежедневно в течение 14–270 дней, а у мышей после трансплантации ткани или введения физраствора – с 1 по 14 сутки после введения. Образцы мочи и фекалий собирали с помощью специальных пластиковых клеток со вставным сетчатым дном, в которой мышь держали до того момента, пока не отойдет моча и/или фекалии, но не более 2 часов. За мышами в клетках постоянно наблюдали и собирали мочу сразу после ее выделения, стараясь, чтобы ни части тела субъекта, ни фекалии не попали в пробирку с образцом. С помощью автоматического дозатора мочу делили на порции по 60 мкл и переносили для хранения в микроцентрифужные пробирки Eppendorf. Таким образом из одной порции мочи мыши мы могли получить от 1 до 12 абсолютно идентичных образцов, собранных от одной мыши в одно время. Их сразу замораживали при -23°C и размораживали непосредственно перед проведением эксперимента. Аналогично в микроцентрифужных пробирках Eppendorf в замороженном состоянии хранили и образцы фекалий. Каждая пробирка с образцом получала идентификационный номер, зарегистрированный в электронной базе данных так, что всегда можно было установить соответствие пробы конкретному зверьку и времени сбора.

Всего было собрано 8859 (в описанных ниже экспериментах использовано 2716 проб) проб мочи и 827 проб фекалий. Всего в экспериментах использовали 512 самцов мышей BDF1-f1. 174 из них сразу перевили опухолевую ткань, 251 самцу делали только контрольные инъекции, 87 самцам после контрольной инъекции перевивали опухолевую ткань. Часть проб мочи была использована для обучения собак, часть проб была разморожена в холодильнике во время аварии городской электросети и была исключена из экспериментов.

Из них – пробы мочи 669 интактных, 631 – с перевитой опухолевой тканью (H33), 442 – с физраствором, 974 – с перевитой тканью печени. С 1 введением – 1071 (1255), с 2 введениями – 532 (753), с 3 введениями – 314 (417).

2.1.3. Исследование динамики изменений перевитой опухолевой ткани H33 и ткани здоровой печени мышей.

Для исследования изменения массы и объема перевитой ткани и ее гистологического исследования в первые 10–14 дней после трансплантации ткани было подготовлено две группы мышей. Одна группа состояла из 45 2-месячных мышей с трансплантированной гепатокарциномой и 45 2-месячных мышей с перевитой тканью здоровой печени, вторая группа включала 100 2-месячных мышей с трансплантированной гепатокарциномой и 140 2-месячных мышей с перевитой тканью здоровой печени. В течение 14 дней при работе с первой группой и 10 дней при работе со второй группой с помощью эфира умерщвляли каждые 24 часа по 3 самца в первой группе и по 10 самцов во второй группе из групп 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 мышцы) перевитой ткани. Затем проводили вскрытие брюшной полости и осматривали внутренние органы, регистрируя наличие опухолей и других аномалий.

2.2. Эксперименты с животными-биосенсорами

2.2.1. Методики экспериментов с мышами-биосенсорами.

В качестве биосенсоров использовали 133 здоровых самца мышей линии СВА в возрасте от 2 до 7 месяцев. За 10 суток до начала экспериментов животных рассаживали по одному в стандартные полипропиленовые клетки (25 x 12 x 10 см)

с сетчатой крышкой, где они содержались между экспериментами при вышеописанных условиях содержания.

Мы использовали модификации метода «привыкания-восстановления» (habituation-dishabituation, H-D), который позволяет сравнивать степень сходства и различия запахов. Метод основан на спонтанном угасании исследовательской реакции мышей при многократном предъявлении одного и того же ольфакторного стимула и восстановлении ее при последующем предъявлении нового незнакомого стимула; модификации были признаны эффективными и применялись многими исследователями.

При использовании H-D метода на первом этапе тестирования мыши-биосенсору через равные промежутки времени предъявляют образцы одного и того же запаха. С каждым последующим предъявлением интерес животного к этому запаху угасает, что выражается в снижении времени исследования образцов. Этот этап эксперимента называют «фазой привыкания» (habituation phase). На завершающем этапе эксперимента биосенсору предъявляют запах по какому-то из параметров, отличающегося от предыдущего (запах другого животного, запах того же животного в ином физиологическом состоянии и т.д.). Новый запах вызывает у животного интерес, что выражается в возрастании времени исследования этого запаха. Восстановление исследовательского поведения (dishabituation phase) свидетельствует о том, что животные отличают новый запах от предъявленного ранее. Если же время исследования на этой стадии предъявления не возрастает, то нельзя заключить, что животные различают эти запахи (Halpin, 1980, 1986).

В настоящей работе мы использовали два варианта H-D метода (далее H-D1 и H-D2). В H-D1 мы несколько раз последовательно предъявляли запах для привыкания, а затем предъявляли новый запах. В H-D2 мы один раз предъявляли запах для привыкания, а затем предъявляли пару запаховых образцов – «старый» и «новый» запахи.

Эти методы успешно применялись многими исследователями (Schellinck & Brown, 1994; Schellinck, 1995; Vache et al., 2001; Woodley and Baum, 2003;

Kiyokawa, Kikusui, et al., 2007; Yang, Crawley, 2010; Arbuckle, 2015).

Мы проводили эксперименты в чистых полипропиленовых клетках 25 x 23 x 20 см со свежей подстилкой. Мышь-биосенсора помещали в клетку за 60 минут до начала эксперимента, чтобы дать возможность ознакомиться с новым помещением. Наконечник автоматического дозатора объемом 1 мл обрезали так, чтобы через образовавшееся отверстие можно было поместить в него 10 мкл мочи или воды так, чтобы капля располагалась в 3–4 мм от отверстия. В этом случае мышь могла чувствовать запах жидкости, но не могла прикасаться к ней. Наконечник закрепляли на решетчатой крышке клетки так, чтобы срез его кончика был на одном уровне с прутьями крышки и сенсор не мог касаться самого наконечника, обнюхивая образец мочи. Опыты начинали не ранее 17:00, т.е. в период максимальной активности мышей. Эксперименты проводили 2–3 раза в неделю, интервал между экспериментальными днями для каждого животного составлял не менее 10 суток. Животным никогда не предъявляли дважды мочу одной и той же мыши. Если сенсор не проявлял интерес к образцу в течение 10 минут, эксперименты с ним в этот день больше не проводили. В конце экспериментальной сессии клетки и крышки тщательно промывали горячей водой и проветривали не менее 24 часов. Регистрацию времени обнюхивания проводили с помощью секундомеров с точностью 0,1 сек.

Методика H-D1.

Мы использовали два варианта предъявления образцов в рамках этой методики. В первом варианте использовали последовательность из четырех образцов (рисунок 1), причем первый, второй и четвертый образцы были идентичными (образцы по 60 мкл в трех разных пробирках, собранные из одной пробы мочи мыши), а третий образец отличался по какому-либо признаку. Последовательное предъявление не одного и того же, но идентичных образцов позволяло нам убедиться в том, что образцы мочи из одной пробы, хранящиеся в разных пробирках, по-прежнему не отличаются по запаху.

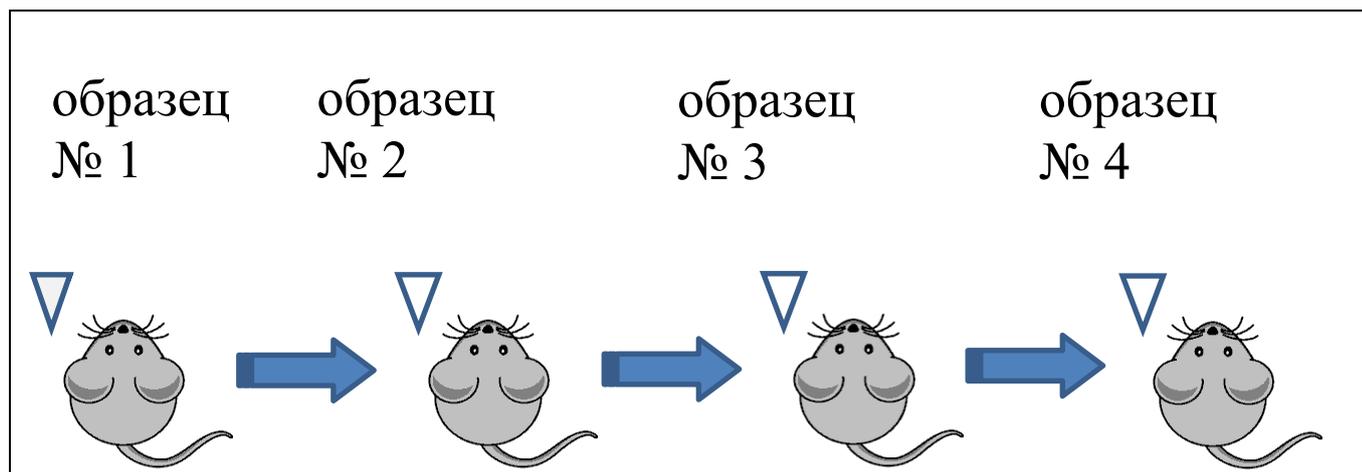


Рис. 1. Схема расположения предъявляемых образцов в экспериментах по первому варианту методики Н-D1

Во втором варианте также использовали четыре образца, но каждый образец предъявляли мышам-биосенсорам трижды, т.е. эксперимент с одним животным состоял из последовательного предъявления 12 запаховых стимулов. Первым образцом была вода, затем следовали два идентичных образца, а затем – образец, отличающийся по какому-либо признаку (рисунок 2).

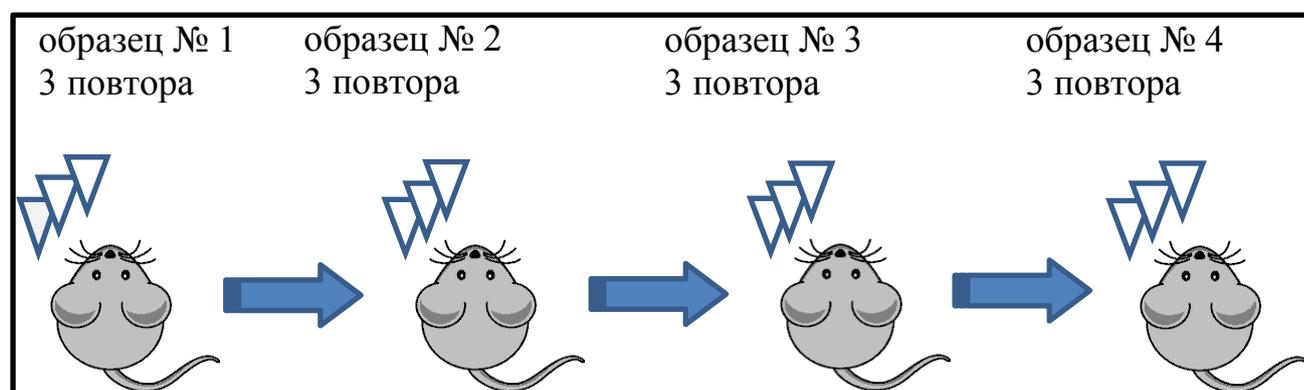


Рис. 2. Схема расположения предъявляемых образцов в экспериментах по второму варианту методики Н-D1

Каждое предъявление длилось 3 минуты от момента начала обнюхивания образца. Интервал между предъявлением образцов составлял 1 минуту.

Протокол Н-D2.

В этом случае мышам-биосенсорам на стадии привыкания предъявляли определенный образец, а затем – одновременно два других запаха. При этом один

из этих запахов был идентичен стартовому образцу (рисунок 3). Предъявление как первого образца, так и последующей пары длилось 3 минуты от момента начала обнюхивания образца. Интервал между предъявлениями составлял 1 минуту.

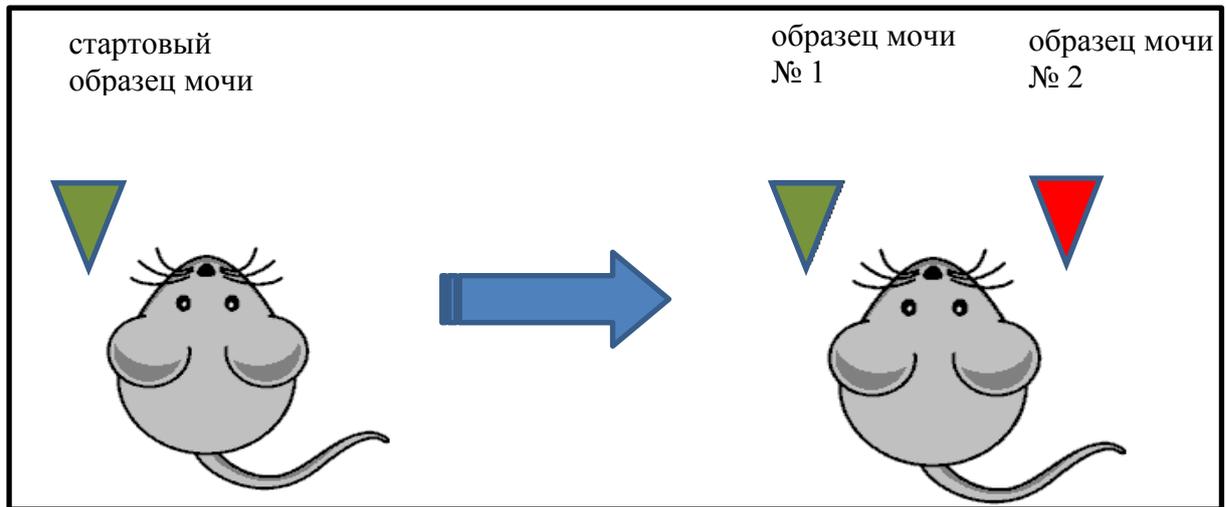


Рис. 3. Схема расположения предъявляемых образцов в экспериментах по методике Н-D2

Каждое предъявление образца длилось 3 минуты от момента начала его обнюхивания. Интервал между стимулами составлял 1 минуту. Регистрацию времени обнюхивания в первых двух сериях экспериментов проводили с помощью секундомера с точностью до 0,1 сек.

2.2.2 Методика экспериментов с собаками.

2.2.2.1. Обучение собак.

Для сравнения по запаху образцов мочи были использованы специально обученные собаки породной группы «шалайки» (гибрид шакала и ненецкой оленегонной лайки; *собака Сулимова*) питомника кинологического отдела САБ ОАО «Аэрофлот – российские авиалинии». Эти собаки со щенячьего возраста отбираются по направленности на поиск и обучаются поиску различных веществ.

Всего в экспериментах участвовало 5 взрослых собак (3 кобеля и 2 суки) до 10 лет. Обучение и сопровождение собак в оборудованном для экспериментов помещении осуществляли кинологи питомника Кинологического отдела САБ ОАО «Аэрофлот — российские авиалинии».

2.2.2.2. Эксперименты с собаками

Эксперименты проводили в комнате (4 x 4 м), где поддерживалась температура 18–20°C и влажность не менее 35%. На полу комнаты на одинаковом расстоянии одна от другой (1,1 м) были нанесены краской 12 точек, образующих круг. Образец мочи мыши в открытой пластиковой пробирке помещали на дно чисто вымытого горячей водой и высушенного стакана 0,2 л. В этой ситуации собака, обнюхивая, не могла прикоснуться к источнику запаха. Каждый стакан ставили в стеклянную банку с металлическим экраном, на одну из точек, отмеченных на полу. Металлический экран необходим для придания большей устойчивости установки и для снятия статического электричества. Стаканы было легко менять, и это позволяло предъявлять каждой собаке ряд новых образцов в чистых стаканах. Банки с образцами расставляли по точкам на полу (рисунки 5 и 6). Экспериментом мы считали одно предъявление одной собаке одного набора контрольных и исследуемых образцов мочи мышей. После каждого эксперимента пол в комнате тщательно мыли водой без моющих средств, чтобы ликвидировать запахи, оставленные предыдущей собакой, и проветривали помещение.

Животные были обучены работе «выбору по подобию», который применяется в криминалистической одорологии и научных исследованиях (Родионова и др., 2015). Перед каждым экспериментом собаку приводили в экспериментальную комнату и в стороне от размещенных образцов в течение 30 сек давали ей знакомиться со «стартовым» образцом, аналогичным которому она должна была обнаружить среди контрольных образцов, например, моча больной мыши. Собака запоминала запах стартового образца (рисунок 4), а затем выбирала наиболее похожий на него из предложенных 12 образцов (рисунок 5).



Рис. 4. Собака знакомится с заданным к поиску запахом



Рис. 5. Проведение эксперимента



Рис. 6. 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 образец мочи другой больной мыши. Этот подход был необходим для того, чтобы собака не определяла образец по индивидуальному запаху мыши.

В кругу случайным образом размещали искомый образец (аналогичный предъявляемому в начале), десять контрольных образцов и так называемый свидетель – образец, идентичный стартовому образцу. Схема расположения

образцов представлена на рисунке 6. Свидетель был поставлен в круг для того, чтобы можно было похвалить собаку, если она не находила искомый образец.

Все образцы мочи в одном кругу были собраны от разных мышей и предъявлялись только одной собаке. Эксперименты проводили двойным слепым методом, т.е. ни, ведущий собаку инструктор, ни присутствующие в комнате наблюдатели не знали расположения образцов. При нахождении искомой пробы собаки садились перед банкой и подавали голос. Мы считали, что собака сделала правильный выбор, если она нашла банку, содержащую мочу больной мыши. Если собака садилась перед контрольной пробой, мы считали этот выбор ошибочным. Если собака обнюхала все банки и не совершила ни одной посадки либо совершила от одной до трех ложных посадок, мы считали, что животное не обнаружило тестовой пробы. Собаке разрешали пройти весь круг с образцами не более 3 раз. Необходимость проходить экспериментальный круг несколько раз связана с поведенческими особенностями собак. Некоторые собаки никогда не проявляют никаких реакций, проходя круг в первый раз, а иногда и во второй раз. Каждый эксперимент фиксировался в бумажном протоколе и на видеозаписи.

После эксперимента данные из бумажного протокола и видеоматериал заносили в электронную таблицу Experiments Dogs или Double-Blind Experiments Dogs базы данных ODD, подробное описание которой представлено в разделе 2.3 диссертации.

2.2.3. Оценка работоспособности групп животных-биосенсоров.



ОЦЕНКА ОБОНЯНИЯ МЫШЕЙ-БИОСЕНСОРОВ

Для оценки работоспособности группы мышей-сенсоров (самцы линии СВА) мы провели выборочный тест на различение индивидуального запаха гибридных мышей BDF1-f1 с использованием методики H-D1 (рисунок 1, раздел 2.2.1.). На первом этапе мыши-сенсору предлагали образец мочи одного гибридного самца, а на втором – другой образец мочи того же самца в паре с образцом мочи другого

гибридного самца (таблица 1 и рисунок 7). Мы провели 21 эксперимент с такой схемой предъявления образцов.

Таб. 1. Время обнюхивание мышами образцов мочи интактных животных.

Квантили	Время обнюхивания образцов мочи (сек.)		
	самец_1	самец_1	самец_2
0,25	3,2	1,5	3,65
0,5	5,5	2,5	5,0
0,75	9,6	6,0	7,5
Значения парного рангового критерия Вилкоксона	p=0,039		p=0,0078

Из данных в таблице 1 видно, что при предъявлении пары запахов сенсоры не проявляют интереса к образцу уже знакомого гибридного самца (столбцы 1 и 2; $p < 0,05$), но к новому образцу проявляют такой же интерес, как и к самому первому образцу, т.е. предпочитают исследовать образец мочи незнакомого самца (столбцы 1 и 3; $p < 0,01$).

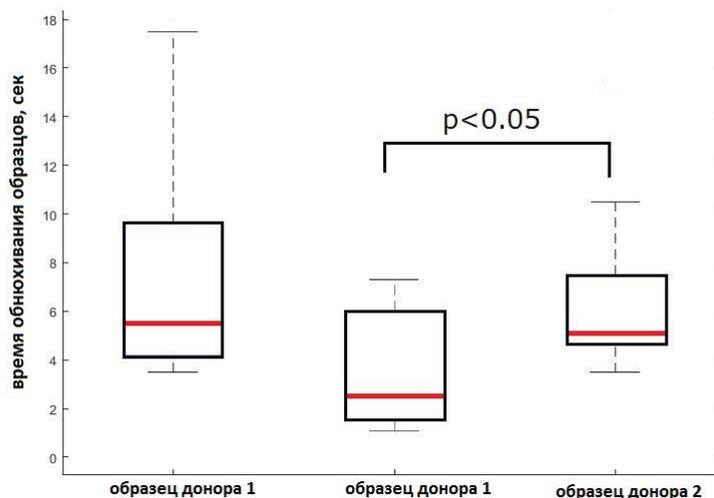


Рис. 7. Распознавание мышами-сенсорами интактных животных по запаху мочи. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов: первый и второй столбцы – образцы от самца №1, третий столбец – образец от

самца №2. 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.

Можно заключить, что мыши-сенсоры отобранной группы обладают хорошим обонянием и успешно различают запаховые образцы мочи по индивидуальному запаху гибридных самцов. Индивидуальное распознавание по запаху лежит в основе формирования социальных отношений у многих животных, в том числе и у мышей, поэтому индивидуальный запах незнакомого здорового самца мог представлять для сенсора такой же или даже больший интерес, чем запах мочи больного животного. Так как мы не обучали мышей реагировать на «запах болезни», а использовали их спонтанные реакции, во всех последующих экспериментах по исследованию «запаха болезни» с мышами-сенсорами мы предъявляли мышам-сенсорам для сравнения мочу одной и той же мыши в разных состояниях. Поскольку такой подход был связан с тем, что менялось не только состояние мыши, но и ее возраст, мы оценили влияние возраста на запах гибридной мыши в специальных экспериментах (рис. 26, таб. 9).

Влияние индивидуальных особенностей собак на распознавание образцов больных и здоровых животных. Оценка по базе данных.



Одним из важных параметров, с которым сталкивается исследователь при работе с собаками, – их индивидуальные особенности. Собаки ищут пробу мочи модельной мыши, чтобы получить вознаграждение. Характер поведения собак указывает на то, что ряд реакций некоторых из них связан не с тем, что они нашли пробу, которая похожа на стартовую, но выделили ту пробу, которая отличается от остальных и за которую, по их мнению, они могут получить вознаграждение. То есть, как уже упоминалось, во время обучения или во время проведения эксперимента собаки ищут и иногда находят более простые решения для различения образцов. Другими словами, собаки узнают, что запаховый образец

избыточен или существуют некоторые подсказки при постановке эксперимента. Количество таких ошибок неодинаково для разных собак.

С помощью вычислительной части базы данных мы провели оценку влияния индивидуальных особенностей собак. Влияние индивидуальных особенностей собак на количество реакций показано на рисунке 8 и в таблице 2.

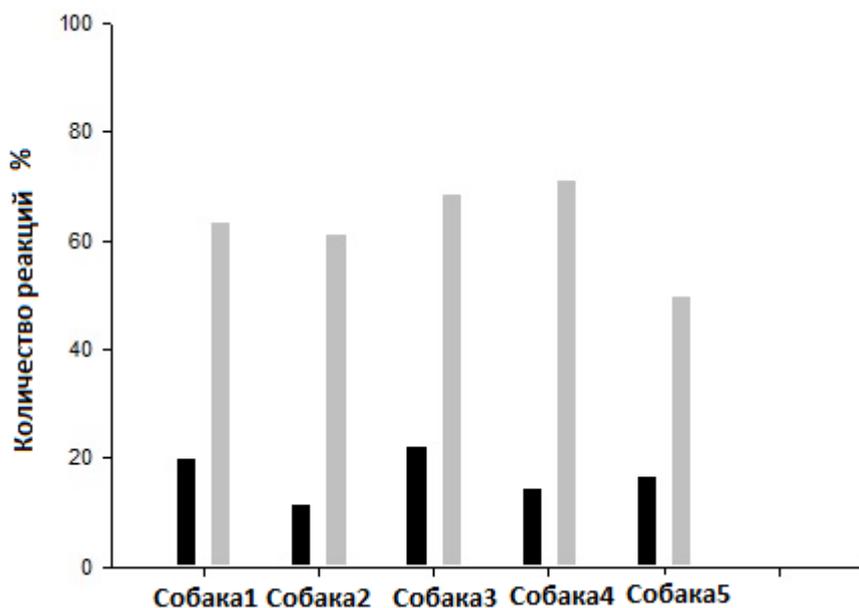


Рис. 8. Влияние индивидуальных особенностей собак на поиск образцов больных животных (серые столбцы) в присутствии образцов здоровых животных (черные столбцы). По оси ординат отложено количество реакций собак на запаховые пробы мочи в процентах от общего количества проб данного типа. По оси абсцисс указан номер собаки. Черные столбцы – количество реакций собак на образцы мочи здоровых животных. Серые столбцы – количество реакций собак на образцы мочи мышей с перевитой гепатокарциномой

Таб. 2. Влияние индивидуальных особенностей собак на поиск образцов больных животных

	Количество обследованных проб мочи мышей и реакций собак на эти пробы			
	Контрольная группа мышей		Мыши с перевитой гепатокарциномой	
Собака	Всего проб, шт.	Реакции, %	Всего проб, шт.	Реакции, %
1	330	20	33	63,6
2	440	11,6	44	61,4
3	510	22,2	54	68,6
4	490	14,8	49	71,4

5	180	16,7	18	50
---	-----	------	----	----

На рисунке 8 видно, что собаки результативность собак различна. У собак 3 и 4, например, высокий процент истинно положительных реакций (правильный выбор пробы больного животного) при низком проценте ложноположительных реакций (ошибочный выбор пробы контрольного животного), в то время как у собак 1 и 3 процент ложноположительных реакций значительно выше. У собаки 5 достаточно низкий процент истинно положительных реакций и высокий процент ложноположительных; другими словами, она плохо различает образцы больных и здоровых животных. Исходя из полученных данных, мы исключили собаку 5 из рабочей группы собак для поиска проб больных животных.

2.3. Создание и использование специализированной базы данных Odor of Disease (ODD)

Сложность нашего исследования состояла не только в большом количестве информации о каждом животном, но и в большом количестве дополнительных факторов, влияющих на результаты. Мы использовали большое количество животных – как испытуемых, так и биосенсоров. Необходимо было учитывать их особенности такие, как возраст, тип и количество инъекций. Мы собрали большое количество образцов мочи от разных животных в разное время, они хранились в одинаковых условиях, но разное время. Было множество других факторов, возможно, влияющих на результаты исследования. Необходимо было собрать о них информацию, систематизировать и проанализировать их взаимное влияние. При постановке экспериментов все эпизоды, из которых они состояли, являлись элементами своеобразного «конструктора». Все параметры каждого такого эпизода или элементарного события были занесены в нашу базу данных. Такой подход позволил отвечать на вопросы, ради которых были организованы эксперименты, но и кроме того, формировать из этих элементарных событий эксперименты, которые не проводили в реальности, но могли показать, как

животные реагируют на отличающийся фактор.

При помощи реляционной системы управления базами данных (СУБД) Microsoft Access нами была создана база данных Odor of Disease (ODD). Благодаря встроенному в СУБД Microsoft Access языку программирования Visual Basic for Applications разработанная база данных была дополнена рядом подпрограмм, которые обеспечили удобство работы с исходными данными. В основу базы данных ODD (рисунок 9) легла информация, собранная в результате описанных в настоящей работе экспериментов с перевиваемыми опухолями и влиянием их на ЛОС мочи. База данных не только упрощает ввод, обработку и поиск данных, но и позволяет легко сопоставлять разные массивы данных.

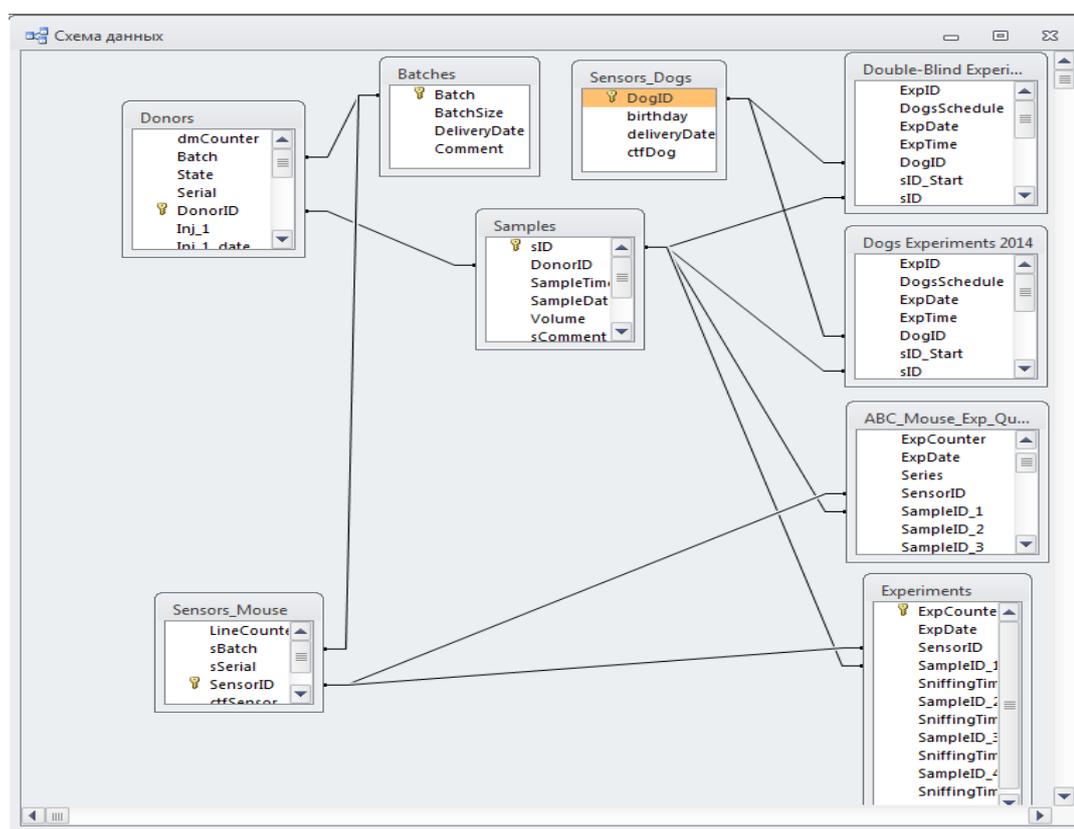


Рис. 9. Схема базы данных ODD

Структуру базы данных ODD формировали в соответствии с особенностями экспериментов – учитывали основные условия жизни животных, хранения биологических образцов и проведения экспериментов. У нас было 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.

Созданная нами база данных сочетает в себе две части – информационную и вычислительную. Информационная часть, сформированная в виде связанных таблиц (таблица 3), содержащих характеристики каждой группы животных: возраст, линию, тип и количество инъекций, дату выхода из экспериментов, дату и время суток сбора образцов, длительность хранения образцов, характеристики перевитой ткани. Связь между отдельными таблицами организована по принципу «один-ко-многим», использование ключевых полей и кодировки позволяет избежать ошибочного дублирования информации. На рисунке 9 приведена «схема данных» базы ODD, в которой продемонстрированы связи между таблицами.

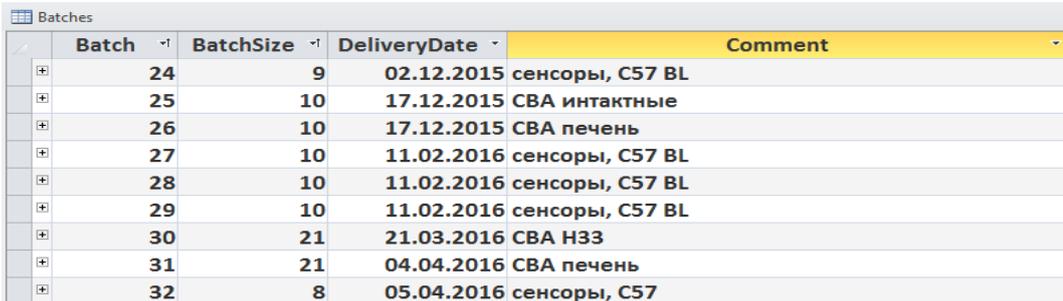
Данные в таблицы помещали таким образом, чтобы избежать дублирования описательных данных. Основную информацию располагали в 9 таблицах, название и краткое описание которых приведено в таблице 3. Четыре таблицы содержат информацию о животных, которые участвуют в экспериментах, как в качестве испытуемых, так и в качестве биосенсоров. Еще 5 таблиц содержат данные об условиях проведения экспериментов и собственно результаты. В БД предусмотрено добавление графической информации: фотографии опухоли, видео эксперимента и т.д. При формировании таблиц в конструкторе таблиц вносили краткое описание каждого столбца о хранящейся в нем информации, которое можно видеть при работе с данными.

Таб. 3. Таблицы базы данных ODD

Название таблицы	Содержание
Batches	Характеристики партий мышей: линия, возраст
Donors	Характеристики мышей: тип трансплантации и ее порядковый номер, возраст животного на момент манипуляций, дата смерти животного

Sensors_Mouse	Характеристики мышей-биосенсоров: уникальный номер и дата начала и прекращения использования в экспериментах
Sensors_Dogs	Характеристики собак: кличка, возраст и дата начала участия и выбывания из экспериментов
Samples	Характеристики образцов мочи: дата и время суток сбора, сутки после трансплантации ткани или введения физраствора, время хранения и дата использования образца
ExpMouse_ABC	Условия (дата, сенсор, мышь) и данные эксперимента с мышами-сенсорами, проводимого по методу HD-1
ExpMouse_serials12	Условия (дата, сенсор, мышь) и данные эксперимента, проводимого с мышами-сенсорами по методу HD-2
Experiments Dogs	Условия (дата, сенсор, мышь) и данные эксперимента, проводимого собаками
Double-Blind Experiments Dogs	Условия эксперимента (дата, сенсор, мышь) и данные эксперимента, проводимого методом «выбора по подобию», в условиях двойного слепого эксперимента
Parameters of tissue development of the donor	Тип перевитой ткани, даты введения и измерения, характеристики животного

Информация в базе собрана в логические группы, например, всю информацию о поступающих мышях вводят в таблицу Batches, где каждая партия получает свой уникальный номер (рисунок 10).



Batch	BatchSize	DeliveryDate	Comment
24	9	02.12.2015	сенсоры, C57 BL
25	10	17.12.2015	СВА интактные
26	10	17.12.2015	СВА печень
27	10	11.02.2016	сенсоры, C57 BL
28	10	11.02.2016	сенсоры, C57 BL
29	10	11.02.2016	сенсоры, C57 BL
30	21	21.03.2016	СВА НЗЗ
31	21	04.04.2016	СВА печень
32	8	05.04.2016	сенсоры, C57

Рис. 10. Таблица Batches

Информацию о дальнейшей судьбе сенсоров и модельных мышей заносили соответственно в таблицы Mouse_sensors (рисунок 11) и Donors (рисунок 12).

LineCounter	sBatch	sSerial	SensorID	ctfSensor	SensorComme
3	12	58	12S58	12.08.2014	
2	12	60	12S60	12.08.2014	
23	15	1	15S1	18.01.2014	
32	15	10	15S10	30.07.2015	
24	15	2	15S2	18.01.2014	
25	15	3	15S3	18.01.2014	
26	15	4	15S4	30.07.2015	

Рис. 11. Таблица Mouse_sensors

dm	Batch	State	Serial	DonorID	Inj_1	Inj_1_date	Inj_2	Inj_2_date	Inj_3	Inj_3_date	Inj_4	Inj_4_date	Inj_5	Inj_5_date	ctfDonor	DonorHis
63	16	0	4	16-0-4	0	24.10.2014	1	15.12.2014	1	15.04.2015	2	28.04.2015	2	18.05.2015	15.06.2015	
64	16	0	5	16-0-5	0	24.10.2014	1	15.12.2014	1	15.04.2015	2	28.04.2015	3	18.05.2015	31.07.2015	
65	16	0	6	16-0-6	0	24.10.2014									26.11.2014	
66	16	0	7	16-0-7	0	24.10.2014	1	15.12.2014	1	15.04.2015	2	28.04.2015	3	18.05.2015	31.07.2015	
115	18	0	10	18-0-10	0	09.02.2015	1	15.04.2015	2	28.04.2015	3	18.05.2015			31.07.2015	
107	18	0	2	18-0-2	0	09.02.2015	1	15.04.2015	2	28.04.2015	2	18.05.2015			15.06.2015	
110	18	0	5	18-0-5	0	09.02.2015	1	15.04.2015	2	28.04.2015					15.06.2015	
117	21	1	1	21-1-1	1	15.04.2015	2	28.04.2015							31.07.2015	
118	21	1	2	21-1-2	1	15.04.2015	2	28.04.2015	2	18.05.2015					15.06.2015	
123	21	1	7	21-1-7	1	15.04.2015	2	28.04.2015	3	18.05.2015					31.07.2015	
145	26	2	1	26-2-1	2	17.12.2015	2	18.01.2016	3	02.02.2016					14.02.2016	
165	30	3	1	30-3-1	3	21.03.2016									28.03.2016	

Рис. 12. Таблица Donors

Необходимость создания базы данных можно пояснить на примере таблицы Donors, в которой регистрировали историю каждого модельного животного. Мы использовали нестандартные параметры при регистрации животных и описании их «биографии». Например, столбец State содержит информацию о «статусе» каждой особи при поступлении, т.е. какие манипуляции были проведены с модельной мышью при поступлении в лабораторию: 0 – интактное животное (никаких манипуляций не проводили), 1 – животному подкожно ввели физиологический раствор, 2 – животному подкожно ввели ткань здоровой печени, 3 – животному подкожно ввели опухолевую ткань. Поскольку с животными могли проводить несколько манипуляций с некоторым промежутком времени между

ними, были созданы столбцы `Inj_n`, `Inj_n_data` (n – код манипуляции), где отмечали тип манипуляции и дату ее проведения. На основе описанных данных создавался уникальный идентификатор модельной мыши (`DonorID`). Его формировали как `Batch-State-Serial`, т.е. номер партии – манипуляции, проведенные с мышью на момент начала работы – порядковый номер в партии. Порядковый номер животному присваивали перед проведением первой инъекции – удаляли соответствующий палец на задних лапах. Столбец `ctfDonor` (дата смерти животного) использовали для дополнительного контроля за образцами и при формировании запросов.

В аналогичных таблицах были собраны данные о мышах-сенсорах, собаках-сенсорах (каждое животное получило уникальный идентификатор и в таблицу были занесены все данные о каждом животном), каждом собранном образце мочи. Последнее значительно облегчало планирование экспериментов с собаками, в которых для каждой из 5 собак мы должны были собрать ряд контрольных образцов от одних и тех же мышей, собранных в одно и то же время. Поиск таких образцов без базы данных занимал бы огромное количество времени.

Таблицей, в которой содержится информация об условиях сбора образцов и длительности их хранения, является таблица `Samples`. В нее вносили информацию об условиях и событиях, сопутствующих сбору образцов, а также состояние животного на момент взятия образца (рисунок 13).

При регистрации образцов мочи мышей уникальный номер им (`sID` – `sample identification`) присваивался автоматически при помощи специальной функции во вкладке «Тип данных» в конструкторе таблиц – «Счетчик» и именно это поле является ключевым в данной таблице.

SID	DonorID	SampleDate	SampleTime	Volume	contamination
7900	26-2-1	07.02.2016	11	65,0	
7901	25-0-4	07.02.2016	11	65,0	
7902	26-2-3	23.01.2016	11	65,0	
7903	26-2-10	23.01.2016	11	65,0	
7904	39-0-15	27.02.2019	11	40,0	
7905	39-0-15	27.02.2019	11	40,0	
7906	39-0-15	27.02.2019	11	60,0	
7907	39-0-15	27.02.2019	11	60,0	
7908	39-0-15	27.02.2019	11	60,0	
7909	39-0-03	27.02.2019	11	60,0	
7910	39-0-03	27.02.2019	11	60,0	
7911	39-0-03	27.02.2019	11	60,0	
7912	39-0-03	27.02.2019	11	40,0	
7913	39-0-03	27.02.2019	11	40,0	
7914	39-0-12	27.02.2019	11	40,0	
7915	39-0-12	27.02.2019	11	40,0	
7916	39-0-12	27.02.2019	11	60,0	
7917	39-0-12	27.02.2019	11	60,0	
7918	39-0-12	27.02.2019	11	60,0	
7919	39-0-12	27.02.2019	11	60,0	
7920	39-0-28	27.02.2019	11	40,0	
7921	39-0-28	27.02.2019	11	40,0	
7922	39-0-28	27.02.2019	11	60,0	
7923	39-0-28	27.02.2019	11	60,0	

Рис. 13. Таблица Samples.

Таблицы для внесения условий проведения и данных экспериментов представлены на соответствующих рисунках: ExpMouse_ABC (рисунок 14), ExpMouse_serials12 (рисунок 15) и Double-Blind Experiments dogs (рисунок 16).

Series	SniffingTime_A	SniffingTime_B	SniffingTime_C	SampleID_C	eComment
H33_1/H33_2	8,771	3,094	7,148	5166	д а н и и л
H33_1/H33_2	3,807	2,565	3,898	5171	п р о б и р
H33_1/H33_2	2,877	0,7767	2,745	5166	д а н и и л
H33_1/H33_2	3,989	1,428	1,223	5166	д а н и и л
H33_1/H33_2	4,904	1,627	7,361	5166	Г а л я :)
H33_1/H33_2	0,4411	0,8396	0	5166	Г а л я
H33_1/H33_2	2,696	0,8611	4,144	5166	Г а л я
H33_1/H33_2	3,069	3,506	6,999	5166	д а н и и л
H33_1/H33_2	4,269	5,511	3,251	5166	д а н и и и
H33_1/H33_2	2,118	0	2,614	5166	д а н и и л
H33_1/H33_2	2,749	5,076	7,545	5173	д а н и и л
H33_1/H33_2	4,022	1,829	1,653	5173	д а н и и л

Рис. 14. Таблица ExpMouse_ABC

В таблицу ExpMouse_ABC вносили данные экспериментов с мышами-сенсорами, проведенных по методике H-D2 (рисунок 3 раздел 2.2.1.).

ExpCoun	ExpDate	SensorID	SampleID_1	SniffingTime_1	SampleID_2	SniffingTime_2	SampleID_3	SniffingTime_3	SampleID_4	Sniff
26	08.02.2014	12S30	77	5,06	77	0,47	71	8,35	77	
27	08.02.2014	12S31	77	14,49	77	3,44	71	8,03	77	
28	08.02.2014	12S32	78	18,86	78	1,81	71	7,74	2	
29	08.02.2014	12S60	78	11,67	78	0,5	71	2,72	2	
30	25.01.2014	12S58	79	10,81	79	5,99	72	1,65	3	
31	25.01.2014	12S57	79	22,6	79	3,66	72	5,84	3	
32	25.01.2014	12S40	74	8,37	74	2,48	72	5,15	74	
33	25.01.2014	12S60	74	6,03	74	2,49	72	3,6	74	
34	25.01.2014	12S50	73	9,58	73	1,9	72	5,05	73	
35	25.01.2014	12S53	73	8,23	73	1,09	72	4,78	73	

Рис. 15. Таблица ExpMouse_serials12

В таблицу ExpMouse_serials12 вносили данные экспериментов с мышами-сенсорами, проведенных по методике Н-D1 (рисунок 2 раздел 2.2.1.).

ExpID	DogsSch	ExpDate	ExpTime	DogID	sID_Star	sID	State	Respons	sPosition	Serial	ExpertEvaluatio
150131_d1	1	31.01.2015	17:30	Рава	329	316	0	1	1	9	1
150131_d2	2	31.01.2015		Фея	332	340	3	8	1	11	5
150131_d3	3	31.01.2015		Бриф	335	296	2	1	1	4	1
150131_d4	4	31.01.2015		Рив	337	285	2	1	1	2	1
150131_d5	5	31.01.2015		Барин	331	317	0	1	1	6	1
150208_d1	1	08.02.2015		Рава	2221	920	0	1	1	4	1
150208_d1	1	08.02.2015		Рава	2221	920	0	1	1	17	1
150208_d2	2	08.02.2015		Фея	2220	885	2	1	1	10	1
150208_d3	3	08.02.2015		Бриф	1688	434	1	1	1	9	1
150208_d4	4	08.02.2015		Рив	1690	436	1	1	1	5	1

Рис. 16. Таблица Double-Blind Experiments dogs

В таблицы Experiments Dog и Double-Blind Experiments dogs вносили данные экспериментов с собаками (рисунок 6 раздел 2.2.2.). Особенность этой таблицы в том, что в эксперименте с собакой нельзя зафиксировать местоположение первой банки, к которой подходила собака. Для каждой собаки первая банка стояла на новом месте и в ней лежала проба со своим личным уникальным номером – sID. Кроме того, собаки могли от 1 до 3 раз пройти мимо каждой из проб. Для записи это эксперимента мы ввели параметр Serial – порядковый номер пробы для собаки (от 1 до 36) и sPosition – номер местоположения банки в комнате (от 1 до 12), т.к. места в кругу для постановки образцов пронумерованы.

Вычислительная часть базы представляет собой комплекс алгоритмов обработки данных (формирование запросов, агрегирование данных экспериментов, построение диаграмм и графиков). Запрос – это структура, позволяющая осуществлять выбор необходимой информации из базы данных. Можно сказать, что вопрос, адресованный БД, и является запросом. При формировании запроса можно использовать как информацию, расположенную в таблицах, так и информацию, рассчитанную в других запросах. Однородность и одновременно дискретность множества параметров позволила создать и сформировать архив данных, в котором каждый запрос на анализ выбранного множества данных использует не эксперимент целиком, а разбивает эксперимент

на элементарные события, которые можно группировать для анализа с целью получения ответов на поставленные вопросы.

Основное количество запросов, которые мы сформировали и использовали, были так называемые запросы по образцу (Query by example). При их создании достаточно заполнить бланк в окне конструктора запросов без использования специального языка запросов. При анализе данных нам было необходимо рассчитывать некоторые показатели, основываясь на уже известной и внесенной в таблицы информации. Для основных показателей касающихся животных был сформирован запрос DonorsQuery (рисунок 17).

DonorID	BirthDate	ctfDonor	Inj_1	Inj_2	Inj_3	Inj_4	Inj_5	AE1	AE2	AE3	AE4	AE5	dTag	LifeD	ECou	dTagPrefix
16-0-11	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-12	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-13	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-14	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-15	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-16	25.08.2014	31.07.2015	0	1	2	0	3	60	112	147	233	266	01203:60:112:147:233:266.	340	5	01203
16-0-17	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-18	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-19	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-2	25.08.2014	31.07.2015	0	1	1	2	2	60	112	233	246	266	01122:60:112:233:246:266.	340	5	01122
16-0-20	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-21	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-22	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-23	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-24	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-25	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123
16-0-26	25.08.2014	20.02.2015	0	1	2	3		60	112	147	168		0123:60:112:147:168.	179	4	0123

Рис. 17. Запрос DonorsQuery

Ниже приведены описания расчетов для некоторых показателей, которые использовали в запросах. В этих расчетах использовали формулы из списка имеющихся в СУБД, на языке Visual Basic for Applications. В запросе DonorsQuery были рассчитаны такие показатели, как

1) возраст животного на момент проведения инъекции AEn, в сутках

AEn: $\text{DateDiff}('y'; [\text{DeliveryDate}]; [\text{Inj_n_date}]) + 60$, где n – это номер инъекции, а 60 – константа возраста начала использования животного в сутках. Т.е. всех животных начинали использовать в экспериментах в возрасте 60 дней. [DeliveryDate] – дата поступления животного, информация о которой находится в

таблице Batches (рисунок 8), [Inj_n_date] – дата проведения инъекции, информацию о которой запрашивали в таблице Donors (рисунок 10).

2) продолжительность использования животного LifeDur, в сутках

LifeDur: DateDiff('y';[DeliveryDate];[ctfDonor])+60, где [DeliveryDate] – дата поступления животного, информация о которой находится в таблице Batches, [ctfDonor] – дата смерти животного, информацию о которой запрашивали в таблице Donors.

3) общее количество инъекций за время использования животного ECount, шт.

ECount: 5+IsNull([AE2])+IsNull([AE3])+IsNull([AE4])+IsNull([AE5]), где использовали рассчитанные ранее величины (см. пункт расчета AEn).

4) история использования животного в кратком виде dTag, где знак “.” является разделителем, цифры перед ним показывают тип и последовательность инъекций, цифры после него отображают возраст на момент проведения инъекций.

dTag:

CStr([Inj_1])+CStr(Nz([Inj_2]))+CStr(Nz([Inj_3]))+CStr(Nz([Inj_4]))+CStr(Nz([Inj_5]))+":" +CStr(Nz([AE1]))+"." +CStr(Nz([AE2]))+"." +CStr(Nz([AE3]))+"." +CStr(Nz([AE4]))+"." +CStr(Nz([AE5]))

5) последовательность и типы инъекций, которые проводили животному dTagPrefix, т.к. иногда удобно использовать эту информацию безотносительно возраста животного.

dTagPrefix:

CStr([Inj_1])+CStr(Nz([Inj_2]))+CStr(Nz([Inj_3]))+CStr(Nz([Inj_4]))+CStr(Nz([Inj_5]))

Для показателей, относящихся к состоянию образцов, был сформирован запрос SamplesQuery, который представлен на рисунке 18. В этом запросе были рассчитаны такие показатели, как

1) возраст животного на момент взятия образца AAS, в сутках

AAS: DateDiff('y';DonorsQuery!BirthDate;Samples!SampleDate), SampleDate – дата сбора образца, информацию о которой запрашивали в таблице Samples.

sID	Donc	Sarr	Volur	sCommer	BirthDate	ctfDonor	Inj1	Inj2	AE1	AE2	AE3	dTag	SampleDate	AAS	sTagP1	Ev	sTag	sTagP2		
3316	21-1-7	11	65,0	п е ч 5 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	03.05.2015	78	2	5	3	12.60.73/5	12
3317	21-1-7	11	65,0	п е ч 5 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	03.05.2015	78	2	5	3	12.60.73/5	12
3318	21-1-7	11	65,0	п е ч 5 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	03.05.2015	78	2	5	3	12.60.73/5	12
3319	21-1-7	11	65,0	п е ч 5 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	03.05.2015	78	2	5	3	12.60.73/5	12
3527	21-1-9	14	65,0	п е ч 9 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	07.05.2015	82	2	9	3	12.60.73/9	12
3605	21-1-7	17	65,0	п е ч 9 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	07.05.2015	82	2	9	3	12.60.73/9	12
3606	21-1-7	17	65,0	п е ч 9 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	07.05.2015	82	2	9	3	12.60.73/9	12
3607	21-1-7	17	65,0	п е ч 9 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	07.05.2015	82	2	9	3	12.60.73/9	12
3608	21-1-7	17	65,0	п е ч 9 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	07.05.2015	82	2	9	3	12.60.73/9	12
3609	21-1-7	17	65,0	п е ч 9 с	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	07.05.2015	82	2	9	3	12.60.73/9	12
3671	21-1-9	17	65,0	Н 33 1 с у	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	19.05.2015	94	3	1	3	123.60.73.93/123	
3672	21-1-9	17	65,0	Н 33 1 с у	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	19.05.2015	94	3	1	3	123.60.73.93/123	
3673	21-1-9	17	65,0	Н 33 1 с у	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	19.05.2015	94	3	1	3	123.60.73.93/123	
3678	21-1-7	11	65,0	Н 33 2 с у	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	20.05.2015	95	3	2	3	123.60.73.93/123	
3679	21-1-7	11	65,0	Н 33 2 с у	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	20.05.2015	95	3	2	3	123.60.73.93/123	
3680	21-1-7	11	65,0	Н 33 2 с у	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	20.05.2015	95	3	2	3	123.60.73.93/123	
3690	21-1-9	11	65,0	Н 33 2 с у	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	20.05.2015	95	3	2	3	123.60.73.93/123	
3808	21-1-9	11	65,0	Н 33 2 с у	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	20.05.2015	95	3	2	3	123.60.73.93/123	
3809	21-1-9	11	65,0	Н 33 2 с у	14.02.2015	31.07.2015	1	2	3	60	73	93	123.60.73.93..	20.05.2015	95	3	2	3	123.60.73.93/123	

Рис. 18. Запрос SamplesQuery.

2) общее количество инъекций животного на момент взятия образца
EvCount

EvCount: InStr(1;CStr([dTag]);":")-1, где [dTag] запрашивали в запросе DonorsQuery.

3) После какой по счету инъекции взят образец - sTagP1

sTagP1:

Switch([AAS]>=[AE5];'5';[AAS]>=[AE4];'4';[AAS]>=[AE3];'3';[AAS]>=[AE2];'2';[AAS]>=[AE1];'1').

4) На какой день после инъекции взят образец - sTagP2

sTagP2: Switch([AAS]>=[AE5];[AAS]-[AE5];[AAS]>=[AE4];[AAS]-[AE4];[AAS]>=[AE3];[AAS]-[AE3];[AAS]>=[AE2];[AAS]-[AE2];[AAS]>=[AE1];[AAS]-[AE1]).

5) история животного на момент взятия образца в кратком виде sTag

sTag:

Choose(CInt([sTagP1]);CStr([Inj_1])+"":CStr([AE1])+""/"+CStr([sTagP2]);CStr([Inj_1])+"":CStr(Nz([Inj_2]))+"":CStr([AE1])+".""+CStr(Nz([AE2]))+""/"+CStr([sTagP2]);CStr([Inj_1])+"":CStr(Nz([Inj_2]))+"":CStr(Nz([Inj_3]))+"":CStr([AE1])+".""+CStr(Nz([AE2]))

+ "."+CStr(Nz([AE3]))+"/"+CStr([sTagP2]);CStr([Inj_1])+CStr(Nz([Inj_2]))+CStr(Nz([Inj_3]))+CStr(Nz([Inj_4]))+":":CStr([AE1])+ "."+CStr(Nz([AE2]))+ "."+CStr(Nz([AE3]))+ "."+CStr(Nz([AE4]))+ "."+CStr(Nz([AE5]))+"/"+CStr([sTagP2]);CStr([Inj_1])+CStr(Nz([Inj_2]))+CStr(Nz([Inj_3]))+CStr(Nz([Inj_4]))+CStr(Nz([Inj_5]))+":":CStr([AE1])+ "."+CStr(Nz([AE2]))+ "."+CStr(Nz([AE3]))+ "."+CStr(Nz([AE4]))+ "."+CStr(Nz([AE5]))+"/"+CStr([sTagP2])),

где – номер инъекции, [sTagPn] и [AEn] – величины, рассчитанные в этом запросе выше

б) история животного на момент взятия образца в кратком виде, но без уточнения возраста на момент проведения инъекций – sTagPrefix, т.е. только часть показателя sTag, расположенная перед разделителем “.”

sTagPrefix:

Choose(CInt([sTagP1]);CStr([Inj_1]);CStr([Inj_1])+CStr(Nz([Inj_2]));CStr([Inj_1])+CStr(Nz([Inj_2]))+CStr(Nz([Inj_3]));CStr([Inj_1])+CStr(Nz([Inj_2]))+CStr(Nz([Inj_3]))+CStr(Nz([Inj_4]));CStr([Inj_1])+CStr(Nz([Inj_2]))+CStr(Nz([Inj_3]))+CStr(Nz([Inj_4]))+CStr(Nz([Inj_5]))).

Для удобства расчетов при использовании общей информации о животных и образцах был сформирован запрос DonorAndSampleTagQuery (рисунок 19), в котором не рассчитывали новые показатели, но объединили наиболее востребованные параметры из описанных выше запросов DonorQuery и SamplesQuery.

DonorID	dTag	sTag	sID	AAS	Sampl	Volur	sComment	sTagPrefix	sTagP1	sTagP2	ctfSamp	dTagPrefix	sTagL
39-0-26	03.60.119...	03.60.119/14	9145	133	11	60,0	H 33-14	03	2	14	03		
39-0-26	03.60.119...	03.60.119/14	9144	133	11	60,0	H 33-14	03	2	14	03		
39-0-26	03.60.119...	03.60.119/14	9143	133	11	60,0	H 33-14	03	2	14	03		
39-0-26	03.60.119...	03.60.119/14	9142	133	11	60,0	H 33-14	03	2	14	03		
39-0-26	03.60.119...	03.60.119/14	9141	133	11	60,0	H 33-14	03	2	14	03		
39-0-26	03.60.119...	03.60.119/14	9140	133	11	60,0	H 33-14	03	2	14	03		
39-0-26	03.60.119...	03.60.119/14	9139	133	11	60,0	H 33-14	03	2	14	03		
39-0-26	03.60.119...	03.60.119/14	9138	133	11	60,0	H 33-14	03	2	14	03		
39-0-26	03.60.119...	03.60.119/14	9137	133	11	60,0	H 33-14	03	2	14	03		

Рис. 19. Запрос DonorAndSampleTagQuery.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изменения перевитой ткани опухоли и здоровой ткани печени

Морфологическое исследование изменений перевитой ткани опухоли и ткани здоровой печени проводили по трем параметрам – объем ткани, масса ткани и относительная масса ткани.

Измерения перевитой ткани проводили у 10 самцов BDF каждой группы (три разных контрольных группы и группа больных мышей, см. раздел 2.1.1.) каждые 24 часа в течение 14 дней. Фиксировали изменения массы мыши, массы и объема перевитой ткани, а также рассчитывали относительную массу опухолевой ткани, т.е. отношение массы перевитой ткани к массе зверька до извлечения перевитой ткани. Данные представлены на рисунках 20 и 21.

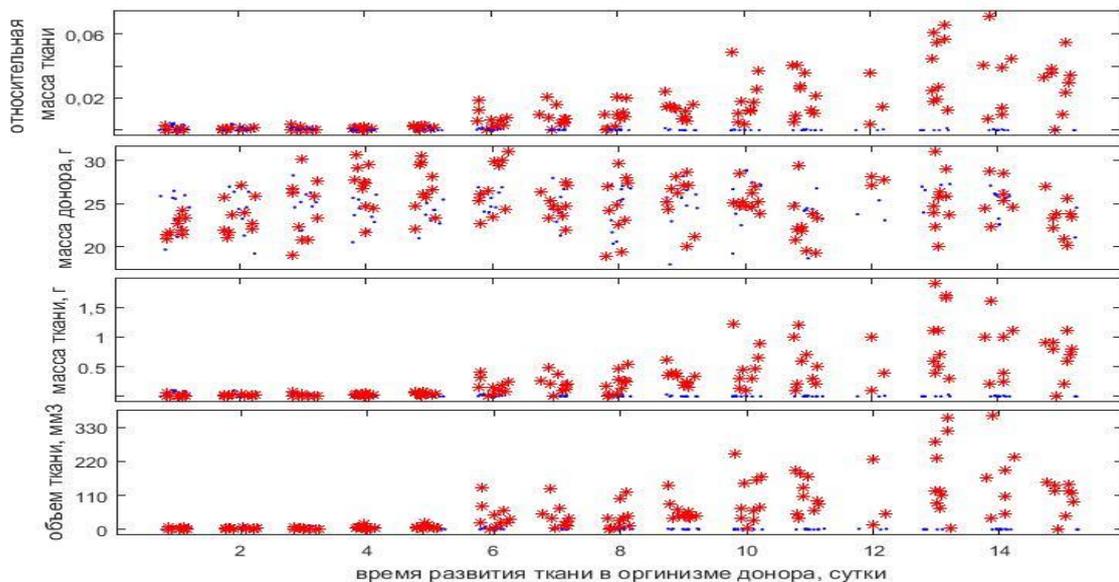


Рис. 20. Изменение параметров перевитой ткани гепатокарциномы Н33 и ткани здоровой печени по суткам. Красными звездочками показаны значения для опухолевой ткани, синими точками – для ткани печени. По оси ординат указаны исследуемые параметры. Нижний блок диаграммы рассеяния показывает изменение объема перевитой ткани в мм^3 , в следующем блоке показаны изменения массы перевитой ткани в г, в третьем снизу блоке представлено

изменение массы мышц в г, а в верхнем блоке – относительная масса перевитой ткани по отношению к массе тела животного. По оси абсцисс отложено время после перевивки ткани в сутках.

На рисунке 20 видно, что вес животных не изменился за 14 дней. Масса и объем перевитой ткани уменьшаются в первые три дня, затем параметры ткани изменяются неодинаково. Детально эти изменения показаны на рисунке 2. Можно видеть, что уже ко 2 суткам масса и объем здоровой ткани печени сильно уменьшаются и затем значения ее массы и объема становятся близкими к нулю. В то же время масса и объем опухолевой ткани резко уменьшаются к 3 суткам, а затем начинают интенсивно расти, и к 6 суткам в несколько раз превышают начальные значения и продолжают далее увеличиваться.

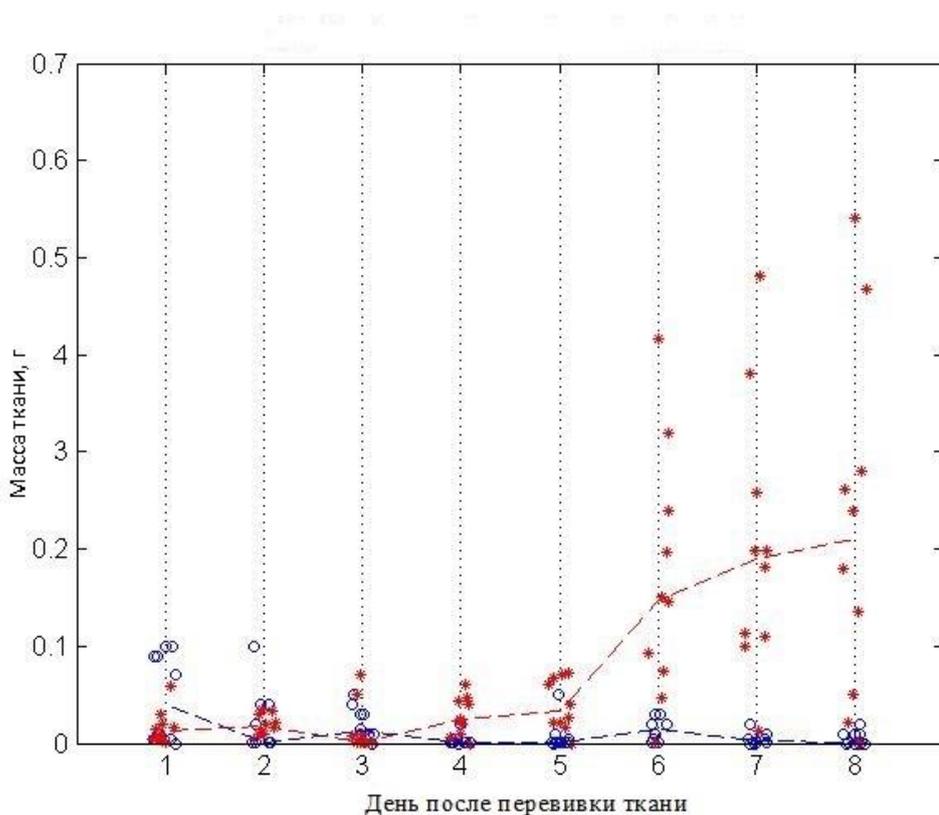


Рис.21. Изменение массы ткани гепатокарциномы НЗЗ (красные звездочки) и здоровой ткани печени (синие кружки) по суткам после перевивки. По оси абсцисс показаны сутки после перевивки, по оси ординат – значения массы измененной ткани в граммах. Медианы однопунктирных измерений массы соединены пунктирными линиями

Образцы ткани из каждой партии отбирали и фиксировали в формалине для проведения гистологического исследования. Описание гистологических срезов образцов ткани приведено в таблице 4. Следует отметить, что при вскрытии проводили осмотр внутренних органов животных, как у мышей с перевитой опухолевой тканью, так и у мышей с перевитой тканью здоровой печени, и ни в одном из случаев не обнаружили никаких патологических изменений.

Таб. 4. Описание срезов образцов опухолевой ткани и ткани печени, извлеченных из самцов мышей после перевивки

Сутки	Опухолевая ткань (НЗЗ)	Ткань здоровой печени
1	Клеток опухоли не видно или их очень мало. Видны участки некроза с активной лейкоцитарной реакцией и инфильтрацией.	Часть ткани печени сохраняет целостность клеток с ядрами и балочное строение.
2	Фрагменты опухоли с очагами некрозов. Клеточный детрит. Небольшие зоны ткани с целостными оболочками и ядрами и разбухшей цитоплазмой. Присутствие реактивного лейкоцитоза. Митозов, как правило, нет.	В ткани печени – сохранность опорных балок и целостность клеток. Частичная гибель клеток, клеточный детрит. Реактивный лейкоцитоз с инфильтрацией. Фагоцитоз. Клетки с сохранившимися оболочками, набухшие, с зернистой цитоплазмой.
3	Очаги некроза с инфильтрацией лейкоцитов и с сохранением небольших участков опухоли. Митозов нет или они редкие.	Ткань печени представлена клеточным детритом – некроз. Присутствуют сохраненные набухшие клетки с крупными ядрами без ядрышек. Некоторые ядра сморщены. Нарушена целостность оболочки клеток.
4	Некроз, реактивный лейкоцитоз и гибель клеток сохраняются. Присутствуют митозы, хоть и редкие, но по всей опухолевой ткани, есть прорастание опухолевой ткани в окружающие ткани. Часть опухоли лежит солидным пластом.	Клеточный детрит окружен лейкоцитарным валом, образование тяжей из соединительной ткани вокруг. Иногда видны клетки с набухшей зернистой цитоплазмой округлым ядром и частично сохранившейся оболочкой.
5	Узлы окружены соединительной тканью. Лейкоцитоз, фибробласты. В центральной части обширный некроз. Митозы.	Клеточный детрит, окруженный лейкоцитарными элементами и соединительной тканью. Увеличенное количество фибробластов.
6	Узлы опухоли окружены тонкой соединительнотканной капсулой. Обширный центральный некроз. В ткани опухоли – частые митозы, прорастание в окружающие ткани.	Участки клеточного детрита окружены лейкоцитарными клетками и соединительнотканными тяжами.
7	Узлы опухоли, окруженные соединительнотканной оболочкой с прорастанием в окружающие ткани.	Участки клеточного детрита, окруженные более плотными тяжами соединительной ткани.

	Многочисленные митозы, отсевы. Обильный лейкоцитоз.	
9	Узлы опухоли с соединительнотканной капсулой, некоторые с обширным некрозом. Митозы. Лейкоцитарные элементы.	Участки клеточного детрита в толстой плотной соединительнотканной капсуле. Вокруг организация соединительнотканых тяжей.
11	Солидные опухоли в толстой соединительнотканной капсуле, гибнущие клетки, клеточный детрит, митозы, лейкоцитарные элементы с инфильтратом.	Клеточный детрит в капсуле, присутствие лейкоцитоза, часть соединительной ткани с организацией после травмы без сохранения целостности клеточных компонентов. Присутствие лейкоцитов. Фагоцитоз.
12	Узлы солидной опухоли с множественными митозами и очагами некроза.	В капсуле: клеточный детрит, эозинофильные участки с полигональными клетками. Прорастание соединительнотканых тяжей внутрь полости.
13–15	Крупные узлы с прорастанием в окружающие ткани, очаги некроза, множественные митозы. Иногда увеличено замещение соединительной ткани, наблюдается детрит опухолевой ткани.	Ткань выглядит как организация рубца в гиподерме. Срез напоминает организованный рубец.

Гистологическое исследование развития перевитой опухолевой ткани показало, что на 1–2-е сутки наблюдается массовая гибель клеток опухолевой ткани. 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 2–3-и сутки, и далее перевитая ткань представлена клеточным детритом. В обоих случаях с первых по третьи 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 3-х суток – количество перевитой здоровой ткани печени продолжает уменьшаться, в то время как количество опухолевой ткани начинает быстро увеличиваться. Похоже, что на 3-и сутки процессы в эксперименте и контроле достигают наибольшего сходства – иммунная система реагирует на чужеродные клетки, снижая их число. Можно ожидать, что количество ЛОС, маркирующих заболевания в этот период развития опухоли, минимально.

Динамика развития опухолевой ткани неоднородная. На рисунке 21 видно, что у двух мышей на 3-и сутки после перевивки масса опухолевой ткани значительно больше, чем у других. Это возможно по двум причинам – либо к 3-м суткам осталось еще много перевитой ткани, либо, напротив, отбор новых опухолевых клеток и рост опухоли по каким-то причинам у этих мышей идет активнее, чем у других. На этом же рисунке видны большие различия в дальнейшем изменении массы опухоли у разных мышей. Такое поведение перевитой ткани согласуется с известным фактом, что глобальные перестройки метаболических путей организма в случае развития каждой опухоли имеют индивидуальные особенности, так как ее развитие связано с повреждением некоторых генов и последующим эволюционным развитием, отбором злокачественных клеток (Rozhok, DeGregori, 2016). Из представленных данных можно заключить, что мы получили удачную модель для исследования развития роста опухоли на ЛОС мочи – за небольшой срок, всего несколько дней, мы наблюдаем уменьшение количества опухолевой ткани, а затем резкое его возрастание с появлением различных сопутствующих процессов – воспалением, некрозом, прорастанием в окружающие ткани, что не может не отразиться на составе ЛОС выделений мышей. Однако, необходимо отслеживать, пробы мочи каких именно животных будут предъявляться собакам, так как развитие опухоли – индивидуальный процесс.

3.2. Факторы, меняющие спектр летучих органических соединений мочи, не связанные с развитием опухоли

Животные-биосенсоры могут выделять пробы мочи модельных мышей с перевитой гепатокарциномой по признакам, не имеющим прямого отношения к развитию онкологического заболевания. Поэтому мы поставили перед собой задачу понять, что выделяют для себя животные-биосенсоры в обонятельном паттерне мочи – запах определенного заболевания или же они больше

ориентируются на запах сопутствующих стресса, травмы, воспалительного процесса и иммунного ответа. Для ответа на эти вопросы мы предъявляли животным-сенсорам запаховые образцы мочи мышей с перевитой ГК, а для сравнения предъявляли образцы мочи животных разных контрольных групп. Использование в качестве контрольных образцов мочи интактных мышей, мышей с введенным подкожно физраствором и перевитой тканью здоровой печени позволило определить, каково влияние на спектр ЛОС мочи процессов, протекающих в организме животного, параллельно с развитием опухоли.

3.2.1. Влияние физической травмы



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С МЫШАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

Очевидно, что сама процедура перевивки, подкожного введения клеток или фрагментов 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.

Для оценки влияния различных манипуляций на запах индивида мы провели несколько серий экспериментов по методике HD-2, в которых мышам-сенсорам предъявляли для сравнения образцы мочи одного и того же самца до и после введения физиологического раствора. Сначала оценили изменения запаха индивида после подкожного введения физиологического раствора. Было проведено 14 экспериментов. В каждом из них мышам-сенсорам предъявляли образцы мочи одного и того же самца до и после инъекции физиологического раствора (рисунок 22, таблица 5).

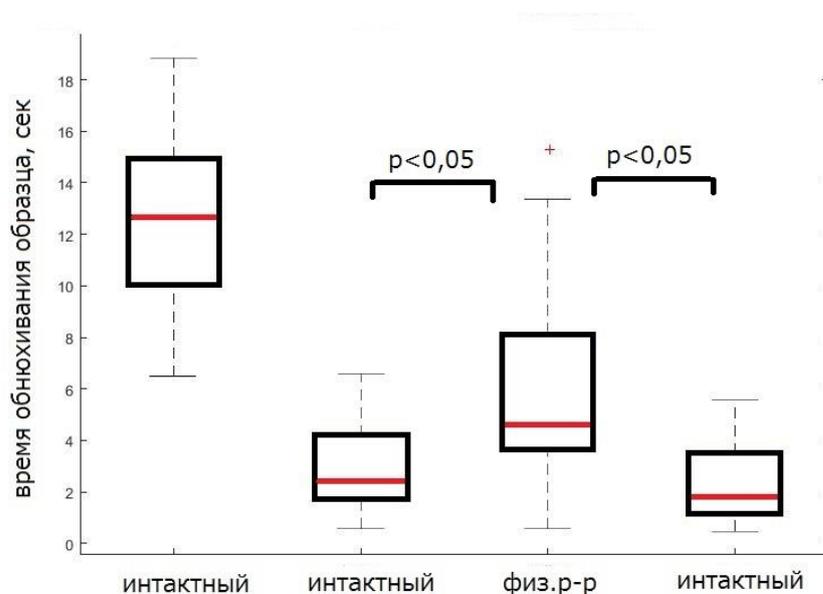


Рис. 22 Время исследования мышами-сенсорами образцов мочи самца BDF, собранных до и после инъекции физиологического раствора. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов: первый, второй и последний столбцы – время исследования запаховых образцов мочи интактного самца (intact), третий столбец – время исследование запахового образца мочи того же самца, но после введения физиологического раствора (saline). Нижняя и верхняя граница прямоугольника – 0,25- и 0,75-квантили. Красная черта – медиана (0,5-квантиль). «Усы» диаграммы и крестики показывают минимальное, максимальное значение выборки и выбросы соответственно

Таб. 5. Время исследования мышами-сенсорами образцов мочи животных до и после инъекции физиологического раствора

Квантили	Образцы мочи после инъекций			
	Без инъекции	Без инъекции	Инъекция физраствора	Без инъекции
0,25	10,0	1,6	3,6	1,1
0,5	12,7	2,4	4,6	1,8
0,75	15,0	4,2	8,1	3,5
Значения парного рангового критерия Вилкоксона между предъявлениями				
1-2	2-3	3-4	1-3	1-4
0,00012207	0,018555	0,010498	0,00012207	0,00012207

На рисунке 22 видно, что время обнюхивания снижается от предъявления к предъявлению запаховых образцов мочи интактного самца BDF (столбцы 1 и 2), но возрастает при предъявлении образца мочи того же самца, собранной после инъекции физиологического раствора.

Сенсор достоверно дольше обнюхивал 3 образец по сравнению со 2 и 4 образцами ($p < 0,05$). Видимо, изменения в организме животного после инъекции физиологического раствора, связанные с травмой, стрессом и воспалением, приносят достаточные изменения в паттерн ЛОС мочи, чтобы сенсор проявил к ним интерес.

В этой серии экспериментов 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.

3.2.2. Влияние перевитой чужеродной ткани



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С МЫШАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

В следующей серии мышам предъявляли образцы мочи одного и того же животного до и после подкожного введения ткани здоровой печени. Этот тип контрольной инъекции позволяет получить представление о том, насколько важными для сенсоров являются изменения в запаховом паттерне мочи животного, связанные с введением чужеродной ткани. Серия из 10 экспериментов. Данные представлены на рисунке 23 и в таблице 6.

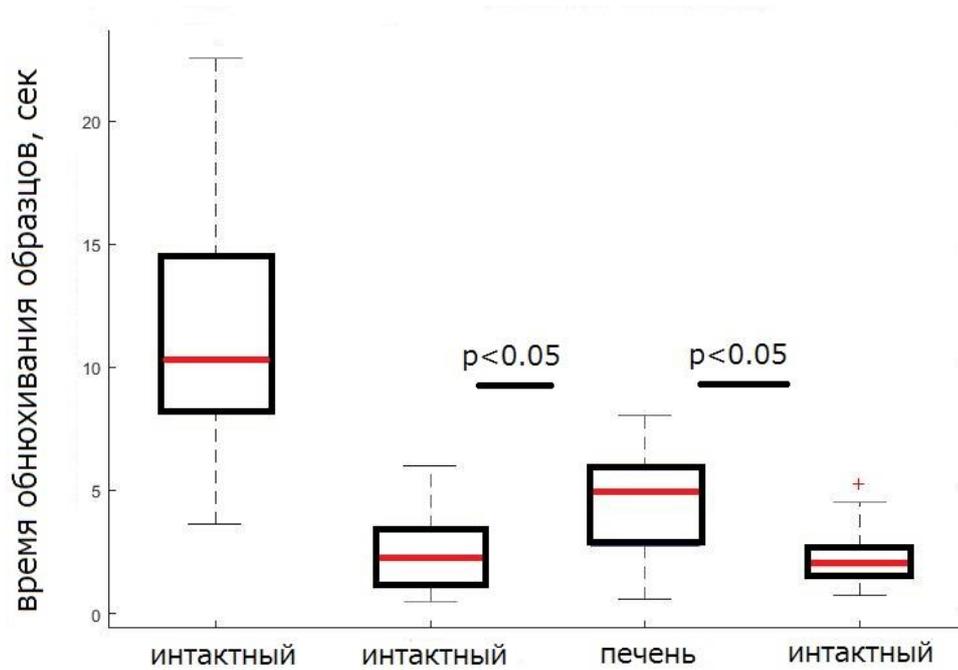


Рис. 23. Время исследования образцов мочи животных до и после перевивки здоровой ткани печени. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов: первый, второй и последний столбцы – время исследования запаховых образцов мочи от интактного самца, третий столбец – время исследование запахового образца мочи того же самца, но после подкожного введения ткани здоровой печени. Нижняя и верхняя граница прямоугольника – 0,25- и 0,75-квантиль. Красная черта – медиана. «Усы» диаграммы и крестики показывают минимальное и максимальное значение выборки и выбросы соответственно

На рисунке 23 видно, что время обследования образца мышью-сенсором уменьшается по мере последовательного предъявления запаховых образцов мочи от одного и того же интактного самца BDF (столбцы 1 и 2), но время достоверно ($p < 0,05$) увеличивается при предъявлении образца мочи того же самца после подкожного введения ткани здоровой печени.

Таб. 6. Время исследования мышами-сенсорами образцов мочи животных до и после инъекции ткани печени

Квантили	Время обнюхивания образцов мочи после инъекций			
	Без инъекции	Без инъекции	Ткань печени	Без инъекции
0,25	8,2	1,1	2,7	1,5
0,5	10,2	2,2	4,9	1,9

0,75	14,5	3,4	5,8	2,7
Значения парного рангового критерия Вилкоксона между предъявлениями				
1-2	2-3	3-4	1-3	
0,0019531	0,0359	0,0058594	0,0019531	

Использование ткани здоровой печени в качестве контрольной инъекции связано с тем, что перевивка ткани опухоли опытной группе животных имеет ряд особенностей. Перевивка чужеродной ткани запускает специфический иммунный ответ организма, который наверняка имеет свое отражение в паттерне ЛОС мочи. Эти изменения отличаются от влияния инъекции физиологического раствора на паттерн ЛОС мочи животного, поэтому для определения запаха самой болезни было необходимо использовать дополнительную инъекцию контрольного типа, по своим характеристикам подобную перевиваемой ткани опухоли.

Эксперименты показали, что подкожное введение здоровой ткани печени изменяет спектр ЛОС мочи животного, достаточно для того, чтобы мышши-сенсоры легко отличили его от запаха того же животного в интактном состоянии.

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 не ранее, чем через 2 недели, но не позднее чем через 4 недели тому же самцу ткани здоровой печени. Эксперименты проводили модифицированным методом HD-2.

В этой серии экспериментов сенсору предъявляли 4 образца, в трех повторностях каждый, т.е. всего в эксперименте было 12 предъявлений. Образцы предъявляли в следующей последовательности: вода, два одинаковых образца мочи самца BDF после инъекции физиологического раствора и образец мочи самца BDF после инъекции ткани здоровой печени. 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. Результаты экспериментов представлены в таблице 7 и на рисунке 24.

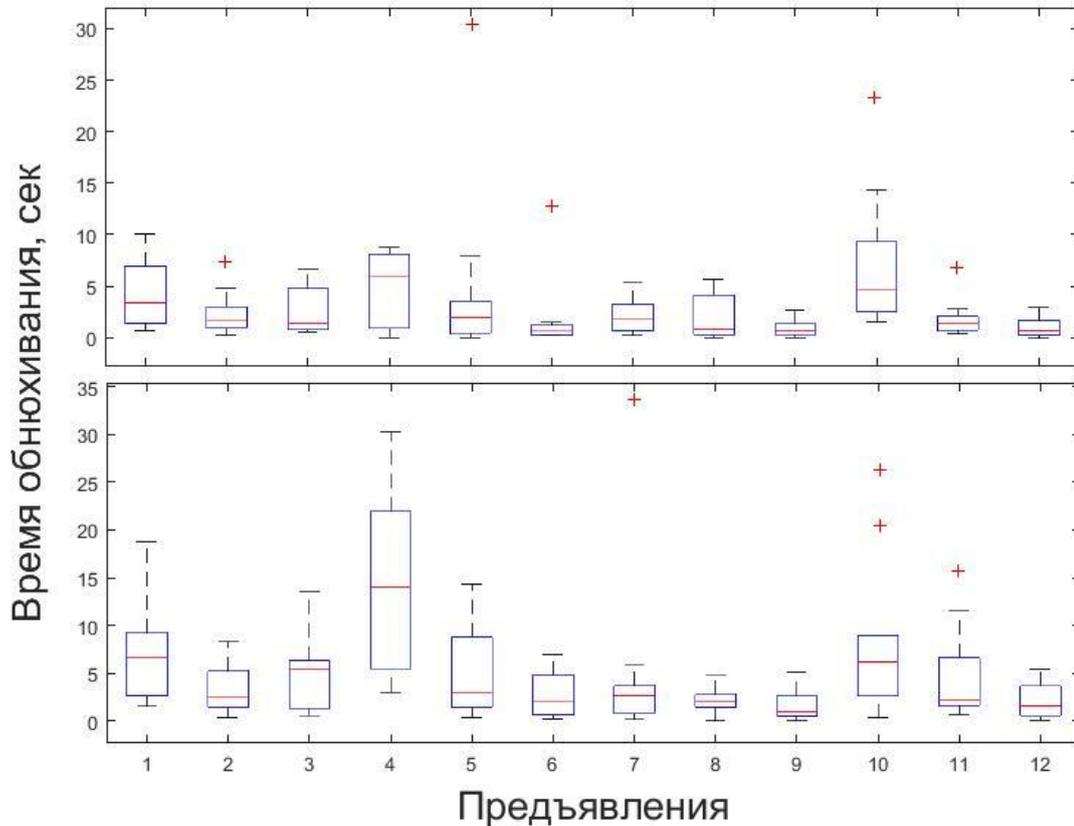


Рис. 24. Исследование образцов мочи самцов мышей после инъекций физиологического раствора и ткани здоровой печени. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов: 1-3 столбцы – образцы воды, столбцы 4-6 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

Таб. 7. Время исследования образцов мочи животных после инъекций физиологического раствора и ткани печени

	Образцы
	Верхний блок рисунка 11
	Образцы мочи после инъекций

	Вода			Ткани печени						Физиологического раствора		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Предъявление												
Среднее время обнюхивания образцов, сек	4,1	2,4	2,5	4,6	5,2	2,0	2,2	1,9	0,9	7,2	1,9	1,0
	Нижний блок рисунка 11											
	Вода			Образцы мочи после инъекций								
				Физиологического раствора						Ткани печени		
Предъявление	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Среднее время обнюхивания образцов, сек	7,2	3,4	5,3	14,4	4,9	2,7	5,5	2,0	1,8	8,3	4,7	2,0

На рисунке 24 видно, что сенсоры хорошо отличают по запаху мочу мышей после подкожного введения физиологического раствора от мочи той же мыши, которой спустя 14 дней подкожно ввели здоровую ткань печени. Животные достоверно дольше ($p < 0,05$) исследовали запаховые образцы мочи самцов мышей после контрольной инъекции, чем воду (образцы 3-4 на двух блоках рисунка 24). Животные достоверно дольше ($p < 0,05$) исследовали запаховые образцы мочи самцов мышей после смены контрольной инъекции, отличающейся от той, что они уже исследовали (образцы 9-10 на двух блоках рисунка 24). Кроме того, мыши-сенсоры хорошо различают «запаховые образы» индивида после введения физиологического раствора и перевивки ткани здоровой печени. В последнем случае к травме добавляется иммунная реакция на чужеродную ткань. Ранее было показано, что и иммунизация, и воспаление изменяют выделяемый животным спектр ЛОС (Gordon et al., 2018; Kimball et al., 2014). Было также показано, что инъекции липополисахарида, мощного иммунного активатора и промотора воспаления, приводит к изменению запаха мочи мыши (Arakawa et al., 2010; Voillat et al., 2021). Поэтому и травма, сопровождающаяся воспалением, также может создавать специфический «запаховый образ».

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что запаховые сигналы это сложные смеси (Kwak et al., 2010). Было показано, что обученные

мыши и крысы чрезвычайно искусны в распознавании паттернов ЛОС, даже если те замаскированы другими запахами. Например, индивидуальный запах в моче не маскируется изменениями диеты животного, хотя известно, что они связаны со значительными изменениями спектра ЛОС мочи (Kwak et al., 2008). Поэтому неудивительно, что животные-сенсоры легко идентифицировали изменения спектра ЛОС, выделяемого животным, даже при небольшой физической травме. Аналогичные результаты были получены при исследовании черепно-мозговой травмы на спектр ЛОС (Kimball et al., 2016).

Летучий метаболом, отражающий как специфические, так и неспецифические метаболические изменения, связанные с болезнью, формирует «обонятельный образ» болезни. При лечении большинства заболеваний пациентам наносятся мелкие и значительные физические повреждения, например, многочисленные инъекции или биопсии. 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 ревыяснить, находит ли накопление травм отражение в комплексе ЛОС, выделяемом животными.

3.2.3. Влияние последовательных инъекций.



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С СОБАКАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

ОЦЕНКА ПО БАЗЕ ДАННЫХ

Использование в экспериментах самцов BDF, которым неоднократно вводили подкожно разные субстанции, сделало необходимым оценить влияние количества последовательных физических травм (различных инъекций) на спектр ЛОС мочи. Для ответа на этот вопрос использовали базу данных. Мы выбрали пробы мочи, предъявленные собакам во время экспериментов, и оценили количество реакций собак на пробы мочи модельных мышей, получивших от 1 до 3 инъекций. Инъекции, как правило, были разного типа, например, инъекция физиологического раствора, затем перевивка ткани здоровой печени, а затем –

ткани опухоли. Однако это могли быть и повторяющиеся одинаковые инъекции, например, первая и вторая были инъекциями физиологического раствора, а третья – ткани здоровой печени или опухолевой ткани. На рисунке 25 показано, сколько раз собаки выбирали мочу модельных мышей в зависимости от количества полученных инъекций. Количество проб мочи от самцов мышей с определенной «историей» приведено в таблице 8.

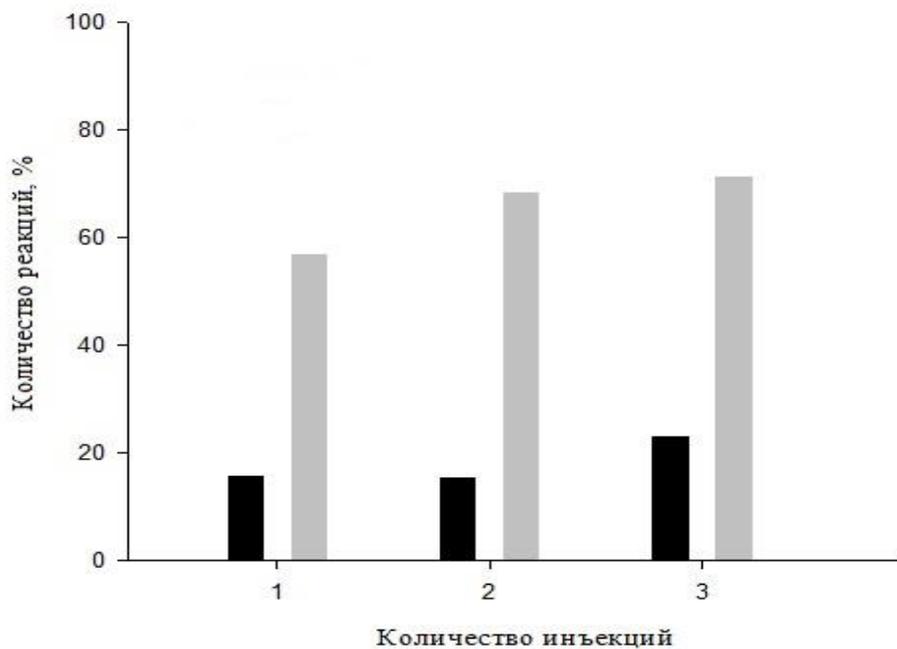


Рис. 25. Влияние количества инъекций у самцов мышей на реакцию собак. По оси ординат отложено количество реакций собак на запаховые пробы мочи в % от общего количества проб данного типа, участвовавших в эксперименте. На оси абсцисс указано количество инъекций. Серые столбцы показывают количество реакций на пробы мочи больных животных, черные – на пробы мочи животных контрольной группы

Таб. 8. Влияние количества инъекций у самцов мышей, которые были сделаны до текущей инъекции, на реакцию собак

Количество введений	Контрольные введения			Перевивка ткани опухоли		
	1	2	3	1	2	3
Количество проб, шт	926	430	180	145	102	134

Количество реакций собаки, %	16,0	15,7	23,3*	57,2	68,6	71,6*
------------------------------	------	------	-------	------	------	-------

Наличие трех введений в истории модельной мыши статистически достоверно увеличивает вероятность выбора собакой-биосенсором образца этого животного как больного. 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. На рисунке 25 и в таблице 8 видно, что каждая инъекция в первую очередь делает мышь с перевитой тканью гепатокарциномы «еще более больной», облегчая выбор собакам (светло-серые столбики). Но в случае, когда самцам мышей проводили три контрольных введения в любом сочетании, мы наблюдаем достоверное увеличение количества выборов собаками проб мочи не только мышей с перевитой тканью гепатокарциномы, но и проб контрольных самцов BDF вне зависимости от того, получали они инъекции физраствора или перевивку ткани здоровой печени. Можно заключить, что и 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, связанными с разными 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 физическая травма вносит значительный вклад в «обонятельный образ» пациента. То есть количество физических повреждений оказывает существенное влияние на запах индивида.

С одной стороны, наши эксперименты показывают, что запах физической травмы и запах перевитой опухолевой ткани – разные запахи. С другой, мы впервые показали, что последовательные повреждения изменяют запах здоровой мышки, приближая его к запаху больного организма с перевитой опухолью.

Этот результат поднимает множество вопросов. Например, в какой степени разные формы физических травм изменяют запах организма, как долго сохраняются эти изменения. Кроме того, при поиске маркеров заболеваний у людей необходимо иметь в виду, что накопление эффекта многих травм, например длительного введения различных препаратов больному, биопсии и другие травмы, могут существенно менять спектр выделяемых им ЛОС.

3.2.4. Влияние возраста модельных мышей на спектр летучих органических соединений



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С СОБАКАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

ОЦЕНКА ПО БАЗЕ ДАННЫХ

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 решили провести оценку влияния возраста мышей на поиск собаками-биосенсорами образцов мочи модельных мышей с перевитой гепатокарциномой. Так как мы использовали модельных мышей с несколькими последовательными введениями различных субстанций, между которыми проходило 30 дней, выходило, что мышь, получившая три инъекции, могла быть старше интактной на два месяца и более. Продолжительность жизни мыши невелика и два месяца, и даже месяц для них – значительный срок жизни. Мы выделили по базе данных модельных мышей разного возраста, пробы мочи которых предъявляли собакам в экспериментах, и разделили их на три группы по возрасту: до 3 месяцев, от 3 до 4 месяцев и более 4

месяцев. Так как мыши поступали к нам в возрасте 2 месяцев, получалось, что мыши первой группы провели у нас до месяца, мыши второй – от одного до двух месяцев, мыши третьей – более двух месяцев. В каждую возрастную группу попало не менее 550 самцов BDF контрольной группы и не менее 100 больных самцов. Затем по материалам базы данных мы оценили количество реакций собак на предъявление проб мочи выделенных групп мышей. Необходимо отметить, что, как правило, ряды проб мочи, предъявляемые собакам, были составлены из проб одновозрастных модельных мышей. Исключения были единичными. Количество реакций собак на запаховые пробы мочи контрольных и больных животных показаны на рисунке 26 и в таблице 9.

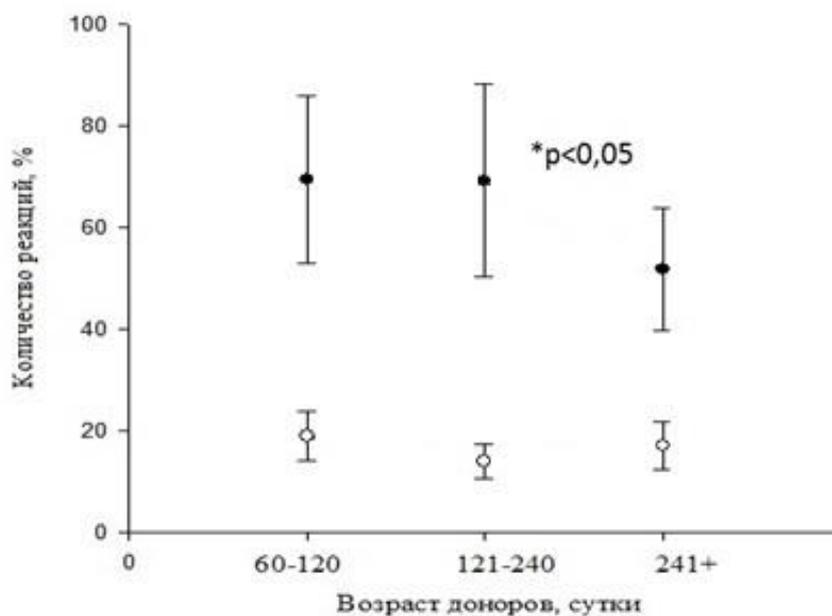


Рис. 26. Влияние возраста самцов BDF на количество реакций собак на пробы мочи контрольных мышей (белые кружки) и мышей с трансплантированной тканью гепатокарциномы (черные кружки). «Усы» соответствуют 95%-му доверительному интервалу для каждого. По оси ординат отложено количество реакций собак на пробы 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 26 видно, что в «молодых» группах – мыши до 4 месяцев и от 4 до 8 месяцев – собаки уверенно отличают пробы мочи мышей с перевитой

гепатокарциномой от контрольных особей. Однако в «старшей» группе (мыши старше 8 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.

Таб. 9. Влияние возраста самцов мышей на реакцию собак

	Контрольные группа			Больные мыши		
	60-90	90-120	120+	60-90	90-120	120+
Возраст животного на момент взятия образца мочи, сутки						
Количество проб, шт.	877	550	566	143	152	103
Количество реакций собак, доли	19,1	14,3	16,6	69,4	69,3	51,8

Из наших данных следует, что спектр ЛОС, выделяемый мышами с развивающейся опухолью, схож со спектром ЛОС стареющих особей. Этому явлению может быть несколько объяснений. Например, с возрастом у линейных мышей могут развиваться другие онкологические заболевания, дающие свой вклад в комплекс ЛОС. Мы пока не знаем, есть ли общий «запах рака», но собак, участвующих в нашем эксперименте, не учили дифференцировке заболеваний, и они могут реагировать на «общий запах больного животного» аналогично тому, как это происходит с модельными мышами, получившими травму. При вскрытии мышей мы визуальным образом осматривали внутренние органы животных, но это была выборочная поверхностная проверка, так что среди стареющих животных могли быть и животные с другими развивающимися онкологическими заболеваниями. Рак часто определяют как болезнь старения. На людях показано, что риск развития рака и многих процессов деградации в тканях и клетках

экспоненциально увеличиваются с возрастом (Aunan et al., 2017; Siegel et al., 2018). Поэтому есть вероятность возникновения другого онкологического заболевания у модельных мышей. Современные исследования прослеживают сложную взаимосвязь между стареющей локальной и системной микросредой и ее вкладом в возникновение и прогрессирование опухолей. Показано, что старение функционально связано с предрасположенностью к раку. Ассоциированные с возрастом изменения создают благоприятные условия для онкогенной трансформации (Campisi et al., 2013). Большинство раковых заболеваний возникает у пожилых людей, поэтому признаки старения являются частью фенотипа раковых клеток. Однако важной отличительной чертой является то, что многие исследования показывают, что старение может резко повлиять на нормальные клетки опухолевого микроокружения, которые могут способствовать прогрессированию опухоли и метастазированию. Фибробласты и иммунные клетки оказываются особенно восприимчивыми к этому возрастному воздействию.

С другой стороны, 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 существует много общих признаков старения и роста опухоли. Это геномная нестабильность, истощение теломер, эпигенетические изменения, потеря протеостаза, снижение чувствительности к питательным веществам и изменение метаболизма. Существует несколько возрастных эпигенетических дефектов, напоминающих те, которые обычно наблюдаются при раке, что позволяет предположить потенциальную связь между биологическими изменениями, зависящими от возраста, и сопутствующим повышенным риском развития рака, наблюдаемым в пожилом населении. К ним относятся несколько глобальных изменений в хроматине, изменение экспрессии генов и общая нестабильность генома. Определенные события сайт-специфического гиперметиличирования в

промоторах генов, участвующих в старении, происходят и при раке, например, гиперметилирование генов-супрессоров опухолей (Hartley et al., 2017).

Интересно, что старение и рак также имеют схожие характеристики экспрессии, например, геномная стабильность при старении и раке следует схожей схеме на уровне транскриптома, и терапевтическое вмешательство в одну из них может обеспечить двойную пользу – антистарение и профилактику рака (Aunan et al., 2017).

Такое сходство метаболических путей при старении и раке не может не находить отражения в комплексах ЛОС, выделяемых модельными мышами, что приводит собак, не обученных различать эти особенности, к ошибкам.

3.2.5. Влияние срока хранения образцов.



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С СОБАКАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

ОЦЕНКА ПО БАЗЕ ДАННЫХ

Собранные пробы мы хранили в морозильной камере при температуре -18°C . Несмотря на то, что, исходя из общепринятых правил хранения и использования проб мочи, мы извлекали их только один раз перед проведением эксперимента, хранились пробы в течение разного времени (до 12 мес). Влияние длительности хранения проб на выбор собаками модельных мышей с перевитой гепатокарциномой на фоне контрольных мы оценивали с помощью базы данных. Были выбраны три группы образцов – со сроками хранения до 90 дней, от 90 до 270 дней и более 270 дней. Анализ данных показал, что отличия во времени хранения проб для отдельных экспериментов даже более чем на 10 месяцев – не оказало значительного влияния на выбор собак (таблица 10), то есть хранение проб в морозильной камере до 12 месяцев допустимо, пробы не теряют своих качеств. Однако, несмотря на полученные результаты, в наших экспериментах мы использовали пробы, хранившиеся не более 6 месяцев.

Таб. 10. Влияние длительности хранения проб здоровых и больных мышей на реакцию собак.

	Время хранения замороженных образцов, сутки					
	Контрольная группа			Больные животные		
	до 90	90-270	270+	до 90	90-270	270+
Количество проб, шт.	1043	487	462	128	146	124
Количество реакций собак, %	18,3	15,4	16,2	64,1	65,1	65,3

3.3. Изменение спектра летучих органических соединений мочи больных животных с перевитой гепатокарциномой

Главной задачей нашего исследования было изучить изменение запаха больного животного, которое происходит из-за развития в организме перевитой гепатокарциномы. Для выявления «запаха гепатокарциномы» мы провели опыты с животными-биосенсорами, учитывая все вышеописанные факторы, которые могут повлиять на ошибочный выбор проб животными.

3.3.1. Сравнение образцов интактных и больных животных.



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С МЫШАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

Для определения вклада перевитой гепатокарциномы в спектр ЛОС мочи больных животных 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. Эту серию экспериментов проводили с использованием модифицированной методики метода HD-1. Сначала сенсорам предъявляли запаховый образец мочи здорового самца BDF, а затем предъявляли одновременно два образца – другого здорового самца BDF и запаховый образец

третьего самца BDF с перевитой гепатокарциномой. Все самцы были одного возраста. Данные 33 экспериментов приведены на рисунке 27 и в таблице 11.

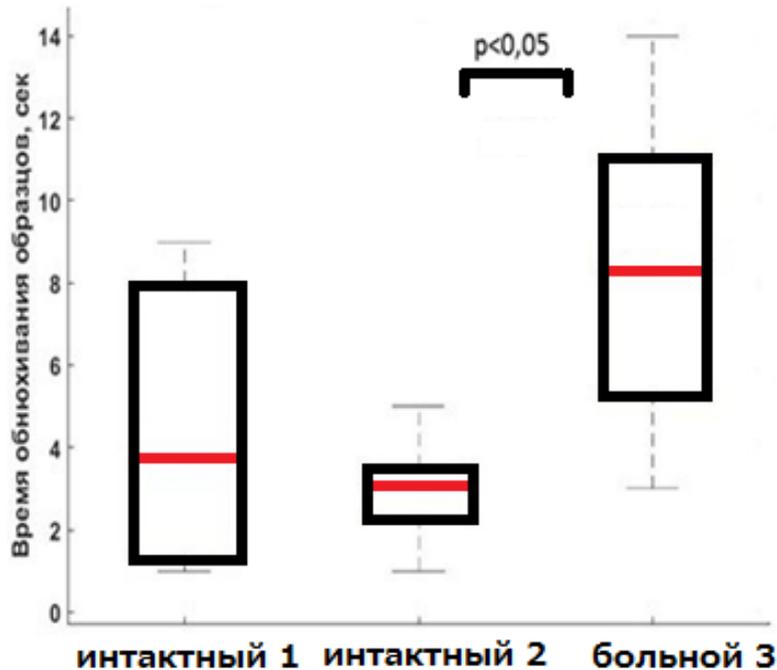


Рис. 27. Распознавание мышами-сенсорами запаховых образцов мочи здоровых самцов BDF и модельной мыши с перевитой гепатокарциномой. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов: первый и второй столбцы – 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 27 видно, что оба образца мочи на стадии распознавания отличались от стартового образца по индивидуальному запаху, но сенсора больше заинтересовал образец модельной мыши с перевитой опухолевой тканью.

Таб. 11. Время обнюхивание сенсорами образцов мочи интактных и больных самцов мышей

Квантили	Образцы мочи самцов мышей		
	самец_1 интактный	самец_2 интактный	самец_3 больной

0,25	1,2	2,2	5,2
0,5	3,75	3,1	8,25
0,75	8,0	3,5	11,0
Значения парного рангового критерия Вилкоксона	1 и 2 образцы $p=0,375$	1 и 3 образцы $p=0,00195$	2 и 3 образцы $p=0,000853$

Из данных в таблице 11 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 ($p<0,01$). Другими словами, хотя оба образца мочи на стадии распознавания отличались от стартового образца по индивидуальному запаху, сенсора больше привлек именно образец самца с перевитой опухолевой тканью. Данные экспериментов свидетельствуют в пользу того, что запахи онкологических больных и здоровых животных существенно различаются для сенсоров ($p<0,01$).

Запах болезни – мощный стимул для животных, и они реагируют на этот запах без дополнительного обучения (Arakawa et al., 2011). Животные-макросматики без предварительного обучения достоверно отличают по запаху выделения животных с трансплантированной подкожно опухолью гепатокарциномы от выделений здоровых животных, т.е. ЛОС, характерные для ГЦК, вероятно, содержатся в моче больных животных.



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С СОБАКАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

В первых экспериментах 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 отличать. Для отбора контрольных образцов мочи и фекалий в этих опытах мы использовали

интактных самцов мышей BDF. Полученные результаты представлены на рисунке 28 и в таблице 12.

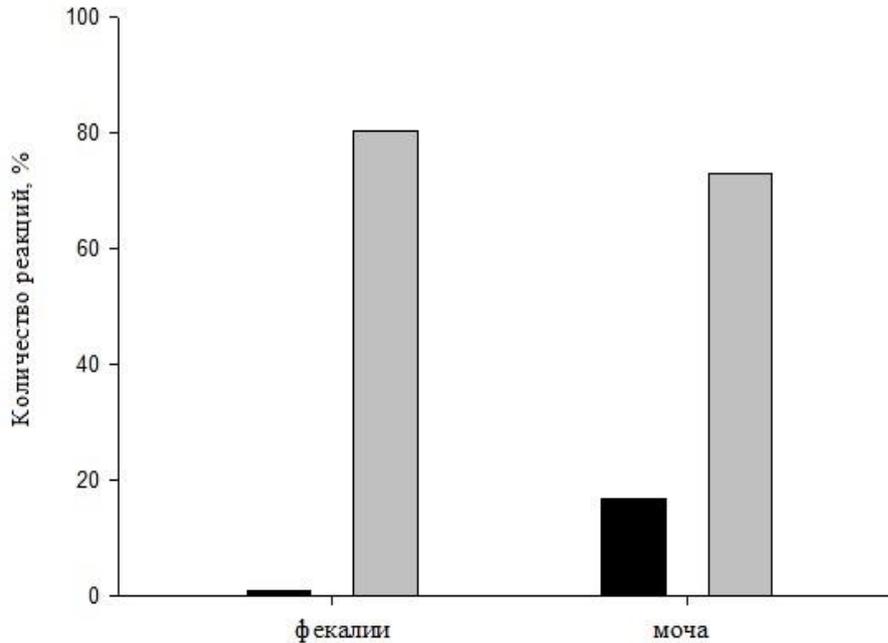


Рис. 28. Определение собаками запаховых образцов фекалий и мочи модельных мышей с перевитой ГК на фоне интактных мышей. По оси ординат отложено количество реакций собак на запаховые пробы мочи в % от общего количества проб данного типа. По оси абсцисс указан тип выделений для получения запаховых образцов: фекалии и моча от интактных самцов BDF контрольной группы (черные столбцы) и самцов BDF с перевитой гепатокarciномой (серые столбцы)

Таб. 12. Количество реакций собак на образцы выделений (моча и фекалии) больных и здоровых (интактных) мышей

	Тип образцов выделений интактных и больных животных			
	Фекалии		Моча	
	Интактные	Больные	Интактные	Больные
Всего проб	710	71	590	59
Количество реакций, %	1 %	80,3 %	16,8 %	72,9 %

В опытах с фекалиями больные животные были определены собаками верно в 80,3% случаев и только в 1% случаев собаки ошибочно выбрали пробы

здоровых мышей из 781 предъявленных. В проведенных экспериментах с мочой больные животные были определены правильно в 72,9% случаев из 649 предъявленных проб, в то время как здоровые были ошибочно выбраны в 16,8% случаев. Эти данные свидетельствуют о том, что собаки не всегда находят пробу выделений больного животного, однако редко по каким-то причинам указывают на пробы здоровых животных вместо больных.

Результаты экспериментов показали, что сенсоры, как мыши, так и собаки, достоверно отличают по запаху образцы выделений животных с перевитой опухолевой тканью от образцов выделений интактных животных. Собаки выделяли больных животных как по образцам мочи, так и по образцам фекалий.

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. Присутствие таких веществ в этих типах выделений показано нам впервые. Однако эти эксперименты не отвечают на вопрос, какова природа этого запаха, связан ли он с развитием опухоли, воспалением или иммунной реакцией организма. 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), животные-сенсоры легко отличали мышей с перевитой опухолевой тканью от контрольных. Это позволило предположить, что животные-сенсоры ориентировались на ЛОС, связанные именно с развитием опухоли, а не с системной реакцией организма на травму. Эксперименты показали, что предлагаемый метод позволяет без больших временных затрат менять условия задачи, предлагаемой для решения животным-сенсорам. Так, мыши легко переключились с оценки индивидуального запаха животных на запах болезни.

Аналогично в экспериментах с собаками мы легко перешли с исследований проб мочи на исследования проб фекалий, используя одну и ту же группу собак. Животные с высокой вероятностью стали выделять больных животных по фекалиям.

Чувствительность метода в экспериментах с собаками несколько ниже, чем в некоторых исследованиях, где собаки выбирали пробы выделений больных людей (Bransbury et al., 2004; McCulloch et al., 2006; Horváth et al., 2009). Такие результаты могут быть обусловлены несколькими причинами. С одной стороны, в отличие от других исследователей мы ставили перед собаками более сложную задачу. Обычно собака выбирает образец выделений больного организма из 5–6 проб (Bransbury et al., 2004; Cornu et al., 2011; Gordon et al., 2008.; Horvath et al., 2008; Sonoda et al., 2011), наши же собаки выбирали 1 пробу из 12. Кроме того, высокая чувствительность, полученная в экспериментах другими исследователями, может быть обусловлена тем, что собаки ориентируются при определении больных людей не только на запах болезни, но и на другие комплексы ЛОС. В одном из исследований, например, было проверено это предположение, и результаты показали, что в случае, когда образцы выделений здоровых людей отбираются у тех, которые работают или подолгу находятся в той же больнице, чувствительность выбора собаками больных людей снижается примерно до уровня, полученного в наших экспериментах (Walczak et al., 2012).

3.3.2. Сравнение образцов больных животных и мышей с разными контрольными инъекциями

Развитие злокачественной опухоли – сложное заболевание. Помимо собственно злокачественного роста, больной организм отличают от здорового и многие другие процессы. Возможно, собаки способны выделять именно комплекс веществ, непосредственно связанный с изменением метаболизма злокачественных клеток, но, скорее всего, при поиске они пользуются и другими сигналами, реагируя на запах метаболитов процессов, связанных со злокачественным ростом,

таких как воспаление, ангиогенез и некроз. Собаки могут воспринимать «обонятельный образ» больного организма аналогично тому, как мы, наблюдая бледность, потливость, воспаленные глаза у другого человека, понимаем, что он болен, хотя и не знаем, каким конкретно заболеванием. 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. Для усложнения выбора нужного образца мы провели животным контрольной группы инъекции, которые запускали в их организме процессы, сходные с теми, что запускает инъекция опухолевой ткани. 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 создали 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. Это, в свою очередь, позволило животным-сенсорам использовать при определении образцов только ту часть паттерна ЛОС, которая относилась именно к развитию модельной гепатокарциномы.



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С МЫШАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

Эксперименты с мышами-сенсорами проводили с использованием образцов мочи от одной и той же модельной мыши, которой сначала делали контрольную инъекцию (физиологический раствор или ткань печени), собирали образцы мочи, а затем через 14–21 день перевивали ткань гепатокарциномы и вновь собирали образцы мочи. Собранные образцы от одной модельной мыши в разных состояниях предъявляли сенсорам, используя модифицированный метод HD-2, который представляет собой последовательное экспонирование запаховых образцов. Первые два образца, а также последний – четвертый образец мочи были

идентичными и собраны после контрольной инъекции (физиологический раствор или ткань здоровой печени). Третий предъявляемый образец был собран после того, как животному перевели опухолевую ткань. Всего было проведено 36 экспериментов, 20 – с использованием в качестве контрольных образцов мочи самцов BDF после инъекции физиологического раствора (таблица 13 и рисунок 29) и 16 экспериментов – с использованием в качестве контрольных образцов мочи самцов мышей после инъекции ткани здоровой печени (таблица 14 и рисунок 30).

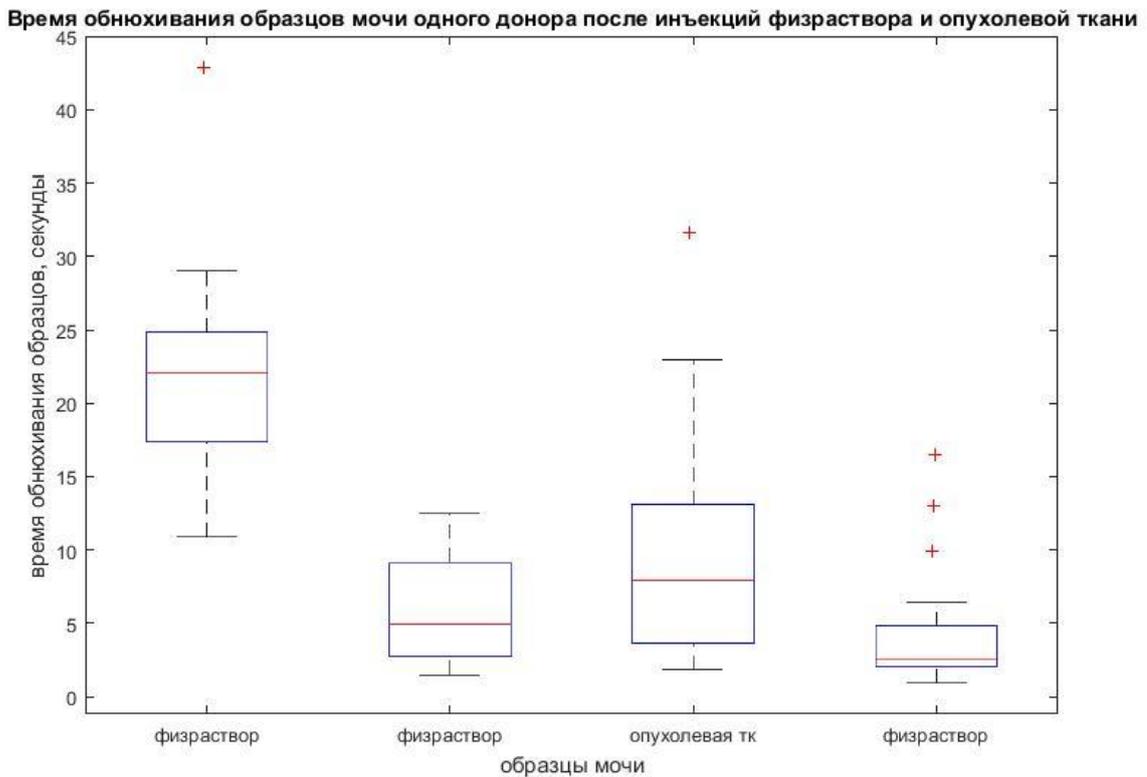


Рис. 29. Время обнюхивания мышами-сенсорами образцов мочи самца BDF после инъекции физиологического раствора и мочи того же самца после первивки опухолевой ткани. (Нижняя и верхняя граница прямоугольника – 0,25- и 0,75-квантиль. Красная черта – медиана (0,5-квантиль). «Усы» диаграммы и крестики показывают 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 (опухолевая тк). Все образцы собраны от одного самца BDF. Первый, второй и четвертый образцы – идентичны

Интерес мышей-сенсоров к запаху образца угас при втором предъявлении идентичного образца (первый и второй столбцы, $p < 0,01$), однако сильно возрос при предъявлении образца мочи, собранного от той же модельной мыши после перевивки ткани гепатокарциномы, несмотря на то, что индивидуальный запах животного не изменился ($p < 0,01$).

Таб. 13. Время обнюхивания мышами-сенсорами образцов мочи животного после инъекции физиологического раствора и после перевивка опухолевой ткани.

Квантили	Время обнюхивания образцов мочи после инъекций			
	Физраствор	Физраствор	Опухолевая ткань	Физраствор
0,25	17,35	2,8	3,6	2,1
0,5	22,1	4,9	7,9	2,6
0,75	24,8	9,15	13,1	4,8
Значение парного рангового критерия Вилкоксона между предъявлениями				
1-2		2-3		3-4
p=8,8575e-05		p=0,0089616		p=0,00013995

Аналогично первому эксперименту, во втором интерес мышей-сенсоров угас 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 возрос при предъявлении образца мочи после перевивки ткани гепатокарциномы ($p < 0,01$).

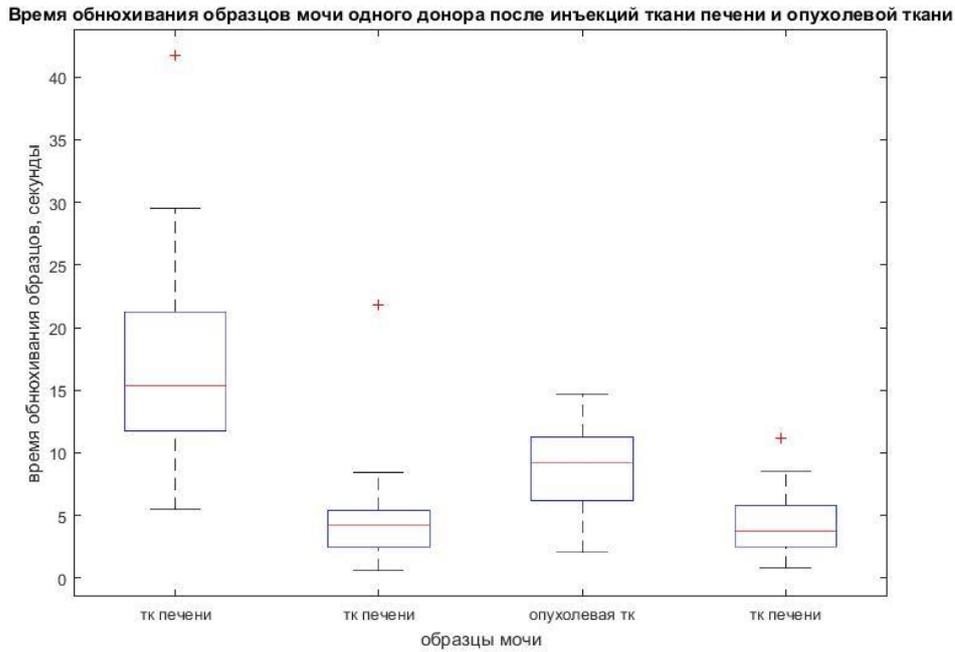


Рис. 30. Время обнюхивания образцов мочи самцов мышей после инъекции ткани здоровой печени и после инъекции опухолевой ткани. (Нижняя и верхняя граница прямоугольника – 0,25- и 0,75-квантиль. Красная черта – медиана (0,5-квантиль). «Усы» диаграммы и крестики показывают минимальное, максимальное значение 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 (тк печени), третий столбец – после перевивки ткани гепатокарциномы (опухолевая тк). Все образцы собраны от одного самца. Первый, второй и четвертый образцы – идентичны друг другу

Таб. 14. Время обнюхивания мышами-сенсорами образцов мочи одного животного после инъекции ткани печени и после инъекции опухолевой ткани

Квантили	Время обнюхивания образцов мочи после инъекций			
	Ткань печени	Ткань печени	Опухолевая ткань	Ткань печени
0,25	11,7	2,4	6,2	2,5
0,5	15,4	4,3	9,2	3,7
0,75	21,3	5,4	11,3	5,8
Значение парного рангового критерия Вилкоксона между предъявлениями				
1-2	2-3		3-4	
p=0,0004	p=0,0044		p=0,0003	

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) и по количеству манипуляций – больные мыши, получившие перевивку гепатокарциномы, получили и две травмы – при получении 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.



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С СОБАКАМИ

ОЦЕНКА ПО БАЗЕ ДАННЫХ

Мы провели две серии экспериментов, в которых собакам-сенсорам предъявляли пробу мочи модельной мыши с перевитой гепатокарциномой в ряду с образцами мочи контрольных мышей. В первой серии опытов контролем служили образцы мочи самцов BDF с введенным подкожно физраствором, а во второй – образцы мочи самцов BDF с перевитой тканью здоровой печени. Полученные результаты представлены в таблицах 15 и 16.

Таб. 15. Реакции собак при определении образцов мочи мышей с гепатокарциномой на фоне контрольных образцов мочи мышей после инъекции физиологического раствора

Наличие реакции	Количество образцов мочи после инъекции (шт.)	
	физраствора	опухолевой ткани
есть реакция	54	18
нет реакции	216	9
Всего	270	27

Количество реакций (%)	20,0	66,7
------------------------	------	------

Таб. 16. Реакции собак при определении образцов мочи мышей с перевитой гепатокарциномой на фоне контрольных образцов мочи мышей после инъекции ткани здоровой печени.

Наличие реакции	Образцы мочи мышей после инъекций, шт.	
	ткани здоровой печени	опухолевой ткани
Есть реакция	175	57
Нет реакции	735	34
Всего реакций	910	91
Количество реакций, %	19,2	62,6

Результаты этих экспериментов подтвердили результаты опытов с мышами-сенсорами. Собаки правильно выбрали образцы мочи мышей с перевитой гепатокарциномой в 66,7% предъявлений на фоне мочи мышей с инъекцией физраствора и в 62,6% случаев с перевитой здоровой тканью печени. Доля ошибок составила 20% и 19,2% соответственно. Снижение процента истинно положительных реакций собак на пробы мочи мышей с перевитой гепатокарциномой привело нас к предположению, что с усложнением предъявляемых контрольных проб (пробы интактных мышей, пробы мышей с введенным физраствором, пробы мышей с перевитой здоровой тканью печени) процент истинно положительных реакций будет падать, а ложноположительных – расти, т.к. с каждым изменением контроля спектр ЛОС будет все более сходным со спектром ЛОС мочи мышей с перевитой гепатокарциномой. Мы проверили это предположение, используя базу данных.

На рисунке 31 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. Данные, использованные для построения этой диаграммы, представлены в таблице 12

(интактные), таблице 15 (физиологический раствор) и таблице 16 (ткань здоровой печени).

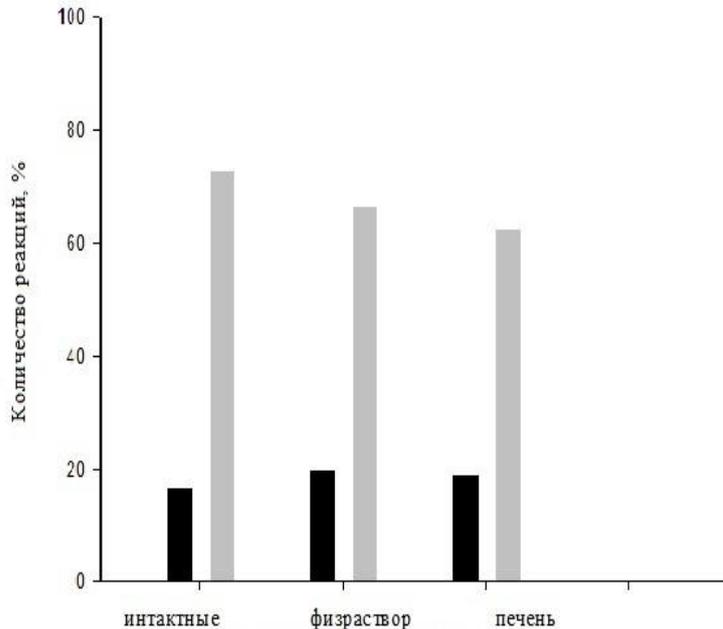


Рис. 31. Определение собаками запаховых образцов мочи мышей с перевитой ГК на фоне контрольных образцов разных типов. По оси ординат отложено количество реакций собак на запаховые пробы мочи, в % от общего количества проб данного типа. По оси абсцисс указан тип инъекции мышей контрольной группы, образцы которого использовали в данном эксперименте. Серые столбцы показывают количество реакций на пробы мочи животных с перевитой ГК, 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.

Полученные результаты показывают, что животные-макросматики, как собаки, так и мыши, без предварительного обучения достоверно отличают по запаху выделений животных с трансплантированной подкожно опухолью гепатокарциномы от выделений здоровых животных, т.е. ЛОС, характерные для ГК, содержатся в выделениях больных животных, как в фекалиях, так и в моче.

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 позволяет предположить, что животные-сенсоры ориентировались на ЛОС, связанные именно с развитием опухоли, а не на системную реакцию организма на травму. Если это так, то тогда должна быть зависимость от стадии развития заболевания. Наша модель гепатокарциномы дает возможность проверить эту гипотезу

3.4. Изменения спектра летучих органических соединений мочи на разных стадиях развития опухоли.

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 все меняется – количество перевитой здоровой ткани печени продолжает уменьшаться, в то время как количество опухолевой ткани начинает быстро увеличиваться. Если животные-биосенсоры выделяют комплекс ЛОС, связанный со злокачественным ростом, возможно, они по-разному будут реагировать на пробы мочи, собранные у модельных животных с перевитой гепатокарциномой на разных этапах развития перевитой опухоли.

С пробами мочи, собранными в первые восемь суток развития опухоли, было проведено по 12–15 экспериментов по выявлению собаками больных животных (всего 103 эксперимента).



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С МЫШАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

Эксперименты с мышами-сенсорами проводили методом «привыкания – генерализации». Первым на стадии привыкания предъявляли один образец мочи

больного животного, собранный через 24 часа после перевивки опухолевой ткани, а на стадии распознавания – сразу два образца: образец, идентичный первому, и образец того же животного, но через 2, 3, 5 и 7 дней после инъекции. Всего провели 111 экспериментов (1/2 сутки – 26; 1/3 – 33; 1/5 – 19; 1/7 – 33). Данные представлены в таблице 17, из них видно, что мыши дольше обнюхивают вновь предъявленный образец (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). Различия в чувствительности определения мышами-сенсорами запаховых образцов мочи больных животных в зависимости от времени после перевивки ткани гепатокарциномы, однако недостаточно велико для того, чтобы считать их статистически достоверными.

Таб. 17. Время обнюхивания мышами-сенсорами мочи одного и того же животного, собранной в разные дни после инъекции опухолевой ткани

День после инъекции и Среднее время обнюхивания (сек) образца на стадии привыкания		День после инъекции и Среднее время обнюхивания (сек) образца на стадии распознавания	
1 день	4,0	1 день	1,9
		2 день	2,7
1 день	4,4	1 день	1,9
		3 день	2,5
1 день	8,2	1 день	3,7
		5 день	3,9
1 день	8,3	1 день	2,15
		7 день	3,1



ЭКСПЕРИМЕНТЫ С СОБАКАМИ-БИОСЕНСОРАМИ

Эксперименты по выявлению различий в запахе образцов мочи мышей с перевитой гепатокарциномой и с перевитой тканью здоровой печени мы провели также с использованием собак. Стартовый и искомый образцы были собраны от разных самцов мышей, но на одни и те же сутки после введения опухолевой ткани. Контрольные образцы были собраны от разных животных контрольной группы, но так, чтобы время, прошедшее после введения ткани печени, совпадало со временем, которое прошло после перевивки опухолевой ткани. Эксперименты

проводили двойным слепым методом. Результаты представлены в таблице 18 и на рисунке 32.

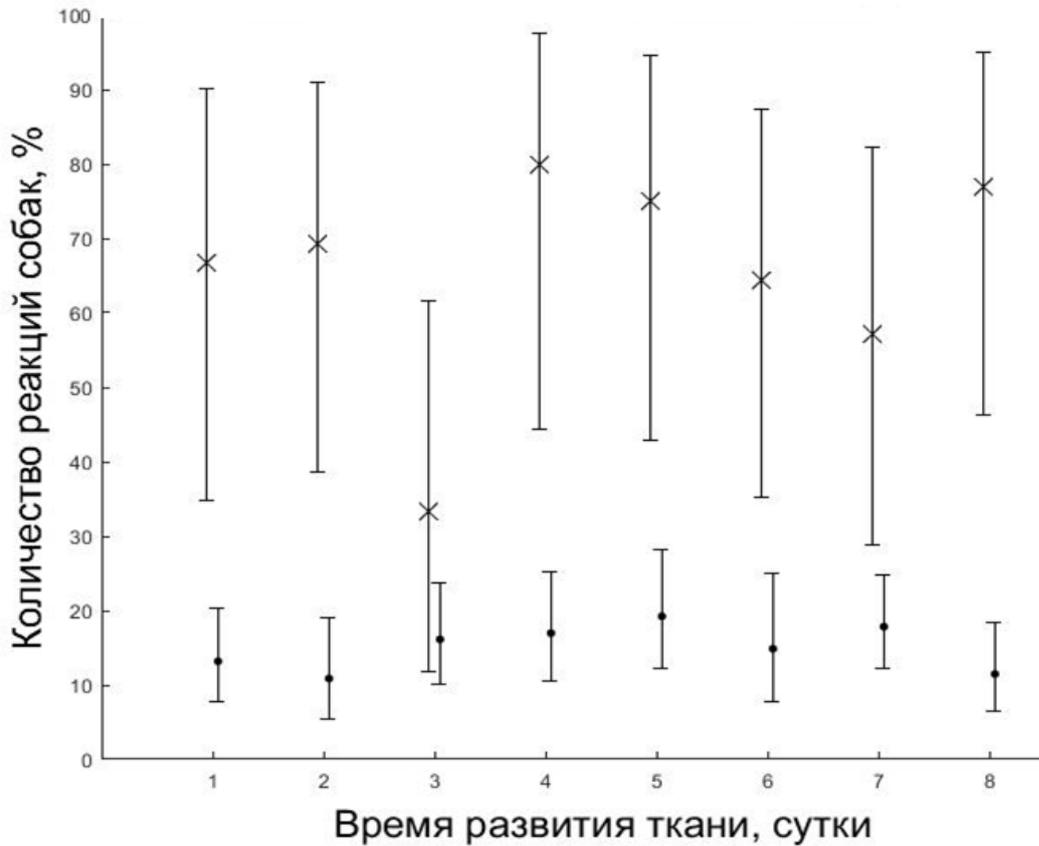


Рисунок 32 – Количество реакций собак на запаховые образцы мочи больных животных (крестики) и доноров контрольной группы (кружки) в зависимости от дня после перевивки ткани. На оси абсцисс указаны дни эксперимента с момента перевивки опухолевой ткани гепатокарциномы (крестики) и ткани здоровой печени (кружки). «Усы» соответствуют 95%-ному доверительному интервалу.

На рисунке 32 видно, что собаки успешно отличают запаховые пробы больных животных с перевитой опухолью гепатокарциномы от проб мышей с перевитой здоровой тканью печени, однако на 3-и сутки после перевивки количество реакций собак на образцы мочи от мышей с пересаженной опухолевой тканью резко снижается, то есть собаки почти не различают образцы мочи больных мышей и мышей контрольной группы. 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.

Таб. 18. Среднее значение чувствительности и специфичности определения собаками образцов мочи животных после введения опухолевой ткани на разные сутки после ее инъекции.

День после инъекции	Количество контрольных образцов	Количество реакций	Количество опытных образцов	Количество реакций
1	103	17	12	8
2	62	9	13	9
3	74	17	15	5
4	111	19	10	8
5	81	14	15	11
6	128	21	14	9
7	91	17	14	8
8	112	13	13	10

С 4 суток после перевивки опухолевой ткани обнаружение больных мышей не вызывает трудностей у собак, и количество реакций собак меняется от минимальных 57% на 7-е сутки после перевивки до 80% на 4-е сутки после перевивки ткани опухоли. Количество ложноположительных реакций на контрольные пробы значительно не изменяется и не превышает 18,7%.

В наших экспериментах успешность собак в поиске больного организма среди здоровых хорошо согласуется с динамикой развития перевитой опухолевой ткани. Первые трое суток 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 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 сутки небольшие группы опухолевых клеток присутствуют в месте введения в жировой и соединительной подкожной ткани, а на 4 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 сутки, и далее перевитая ткань представлена клеточным детритом. То есть объем опухолевой ткани у экспериментальных животных, а также активность опухолевых клеток минимальны на 3 сутки. На 1–2 сутки присутствует еще достаточное количество опухолевых клеток и метаболитов животного, но их количество существенно сокращается к 3 суткам. С 4 суток начинается активная пролиферация опухолевых клеток. Похоже, что именно на 3 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 сутки 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.

Отметим, что не во всех случаях динамика развития опухолевой ткани одинакова. На рисунке 1 видно, что у двух мышей на 3 сутки после перевивки масса опухолевой ткани значительно больше, чем у других. Это возможно по двум причинам – либо к 3 суткам осталось еще много перевитой ткани, либо, напротив, отбор новых опухолевых клеток и рост опухоли по каким-то причинам у этих мышей идет активнее, чем у других. На этом же рисунке видны большие различия в дальнейшем изменении массы опухоли у разных мышей. Это согласуется с известным фактом о том, что глобальные перестройки метаболических путей организма в случае развития каждой опухоли имеют индивидуальные особенности, так как злокачественный рост связан с повреждением генов и последующим эволюционным развитием, отбором клеток злокачественной опухоли (Rozhok, DeGregori, 2016). Исходя из того, что масса опухолевой ткани на 4 сутки после перевивки возрастает незначительно (рисунки 15 и 16), а количество верных выборов собаками проб мочи больного организма в то же время вырастает более чем вдвое, считаем, что успешность узнавания собаками «больного» организма связана не с массой опухолевой ткани, а с активностью опухолевой пролиферации. Метаболиты, маркирующие процессы,

специфические для роста опухоли, выделяются в мочу, и поскольку методика предъявления запаха гарантирует, что биосенсоры не имеют прямого контакта с источниками запаха, можно заключить, что это ЛОС, которые могут быть потенциальными маркерами начальных этапов развития опухоли.

Характерный для развития опухоли селективный рост клеток, их пролиферативное преимущество, перепрограммирование энергетического обмена, изменение реакции на стресс, благоприятствующее общей выживаемости клеток, васкуляризация опухоли, инвазия, метастазирование, специфическое опухолевое микроокружение или формирование преметастатических ниш, иммунная модуляция и другие процессы связаны со значительными перестройками метаболизма не только опухолевых клеток, но и клеток иммунной системы, микроокружения опухоли и т.д. (Hanahan, Weinberg, 2011; Fouad, Aanei, 2017). В основе этих процессов лежит нестабильность генома опухолевой клетки, генерирующая генетическое разнообразие клеток (Hanahan, Weinberg, 2011). Все эти особенности связаны с перестройкой метаболизма, что не может не отражаться на составе мочи, составе ее летучих компонентов и, следовательно, запахе (Yamazaki et al., 1999).

3.5. Специализированная база данных

Сформированная база данных ODD служит источником информации о влиянии различных параметров на реакцию биосенсоров, а следовательно, на отличия в паттерне ЛОС животных. Однородность параметров экспериментов позволила сформировать массив данных, в котором запрос использовал "элементарные события" эксперимента. Для упрощения выбора и определения критериев отбора данных, были сформированы дополнительные номинальные переменные, которые помогают формировать запросы не из данных таблиц, а используя другие запросы. Например, для оценки влияния возраста больных и здоровых животных на паттерн ЛОС их мочи (рисунок 26).

Следуя логике построения запроса, все пробы, которые участвовали в экспериментах с собаками, разделили на две группы по статусу - здоровый и больной. Такое разделение возможно провести, если сопоставить номер пробы в эксперименте (таблица эксперимента, например DogExp) с датой получения пробы и номером донора (таблица Samples), затем в таблице Donors определить тип инъекции этого донора в момент сбора пробы. Подобное сопоставление для всех проб мы сделали в запросе Donors&SamplesQuery, и ввели переменную State, значение которой можно использовать при формировании новых запросов, не обращаясь к таблицам. Затем здоровых и больных животных разделили на три возрастных группы, в чем помогла сформированная в запросе Donors&SamplesQuery - переменная AAS, которая сопоставляет возраст донора и номер пробы. И уже внутри каждой возрастной группы посчитали количество реакций собак на количество проб в группе (таблица 9). Собственная база не только позволила выявить, что для биосенсоров важен возраст животного, но и позволила сделать это с минимальными затратами, благодаря системе связанных запросов разного уровня сложности.

Связь этого блока с соответствующими программами статистической обработки данных (Excel, Matlab, SigmaPlot 12.5) позволила определить чувствительность метода при работе с мышами-сенсорами (таблицы 13 и 14) и собаками (таблицы 12, 15 и 16). Оценили влияние разных показателей на реакцию сенсоров: влияние длительности хранения образцов (таблица 10), влияние индивидуальных особенностей собак (таблица 2), отличия в состоянии животного после контрольных инъекций разного типа (таблицы 5–7). Возможность проводить анализ данных позволила установить влияние возраста животного (таблица 9) и накопительного эффекта травмы при проведении нескольких инъекций на реакцию животных-биосенсоров (таблица 8). А также удалось объяснить сложность определения собаками запаховых образцов мочи больных животных с точки зрения особенностей формирования опухоли после перевивки ткани (таблица 18).

База данных позволяет вносить данные новых экспериментов и сравнивать

их с уже накопленными, используя «элементы конструктора», для получения новых результатов. Например, объяснить отсутствие реакции собак на пробы некоторых больных мышей. Можно предположить, что у этих мышей опухоль развивалась медленнее, что вполне возможно решить с помощью запроса к нашей базе данных.

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 присутствует 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 (Arakawa et al., 2010; Voillat et al., 2021). 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 (Aunan et al., 2017; Siegel et al., 2018).

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 сокращений и условных обозначений

БД - база данных

ГЦК - гепатоцеллюлярная карцинома

ЛОС - летучие органические соединения

BDF1-f1 - самцы гибридных мышей линии BDF1-f1

СВА - самцы мышей сенсоров линии СВА

Н-D метод - метод «привыкания-генерализации», от англ. habituation-dishabituation

HLA - человеческий лейкоцитарный антиген, от англ. human leucocyte antigens

МНС - главный комплекс гистосовместимости, от англ. major histocompatibility complex

ODD - база данных Odor of Disease

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корневский Ю. Экспертиза запаховых следов в следственной и судебной практике // Российская юстиция. – 2000. – № 8. – С. 29.
2. Кочевалина М.Ю., Трунов В.Г. Принципы организации базы данных для поведенческих экспериментов с животными-макросматиками // Успехи современной науки. – 2016. – №4. – Т. 3. – С. 130-133.
3. Крутова В.И., Сулимов К.Т., Зинкевич Э.П. Время появления индивидуального запаха в онтогенезе серых крыс (*Rattus norvegicus*) по данным кинологического анализа // Сенсорные системы. – 1997. – Т. 11. – № 3. – С. 340-345.
4. Побяржин В.В., Пашинская Е.С., Семенов В.М., Гончаров А.Е. Методологические аспекты постановки онкологических моделей в условиях эксперимента // Вестник ВГМУ. – 2018. – № 6.
5. Попова Н.А. Модели экспериментальной онкологии // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6. – № 8. – С. 33-38.
6. Родионова Е.И., Кочевалина А.М., Котенкова Е.В., Морозова В. и др. Обнаружение летучих органических соединений, ассоциированных с гепатоцеллюлярной карциномой, макросматическими животными: подходы к поиску новых онкомаркеров // Изв. Академии наук. Серия Биология. – 2015, Май-июнь. – № (3). – С. 293-301.
7. Соколов В.Е., Сулимов К.Т., Крутова В.И. Кинологическая идентификация индивидуальных запахов в следах жизнедеятельности четырех видов позвоночных // Изв. АН СССР. Серия Биология. – 1990. – № 4. – С. 56-64.
8. Сулимов К.Т. К вопросу об оперативном определении функционального состояния и особенностей поведения собаки // Ежегодник Российского психологического общества. Специальный выпуск. – Т. 2. – М. : Эслан, 2005. – С. 297-299.

9. Хромушин В.А. и др. Оптимизация базы данных для многофакторного анализа с помощью алгебраической модели конструктивной логики / В.А. Хромушин, Т.С. Фадеева, О.В. Хромушин, Д.В. Пацукова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – Тула, 2014. – № 1.
10. Abaffy T., Duncan R., Riemer D.D., Tietje O., et al. Differential volatile signatures from skin, naevi and melanoma: a novel approach to detect a pathological process // PLoS One. – 2010. – Nov 4; № 5(11). – P. e13813.
11. Abd El Qader A., Lieberman D., Shemer Avni Y., Svobodin N., et al. Volatile organic compounds generated by cultures of bacteria and viruses associated with respiratory infections // Biomed Chromatogr. – 2015. – Dec; № 29(12). – P. 1783-90.
12. Ackerl K., Atzmüller A., Grammer K. The scent of fear // Neuroendocrinol. Lett. – 2001. – V. 23. – P. 79–84.
13. Adams J.M., Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential // Curr Opin Immunol. – 2007. – Oct; № 19(5). – P. 488-96.
14. Aggio R.B., de Lacy Costello B., White P., Khalid T., et al. The use of a gas chromatography-sensor system combined with advanced statistical methods, towards the diagnosis of urological malignancies // J Breath Res. – 2016. – Feb 11; № 10(1). – P. 017106.
15. Allcock R.J., et al. The MHC haplotype project: a resource for HLA-linked association studies // Tissue Antigens. – 2002. – № 59. – P. 520–1.
16. Al-Zoughbi W., Huang J., Paramasivan G.S., Till H., et al. Tumor macroenvironment and metabolism // Semin Oncol. – 2014. – № 41. – P. 281-95.
17. Amal H., Ding L., Liu B.B., Tisch U., et al. The scent fingerprint of hepatocarcinoma: in-vitro metastasis prediction with volatile organic compounds (VOCs) // International journal of nanomedicine. – 2012. – № 7. – P. 4135-46.
18. Amo L., López-Rull I., Pagán I., Garcia C.M. Male quality and conspecific scent preferences in the house finch, *Carpodacus mexicanus* // Anim. Behav. – 2012. – № 84. – P. 1483-1489.

19. Amundsen T., Sundstrøm S., Buvik T., Gederaas O.A., Haaverstad R. Can dogs smell lung cancer? First study using exhaled breath and urine screening in unselected patients with suspected lung cancer // *Acta Oncol.* – 2014. – Mar; № 53(3). – P. 307-15.
20. Angle C., Waggoner L.P., Ferrando A., et al. Canine detection of the volatilome: a review of implications for pathogen and disease detection // *Front Vet Sci.* – 2016. – № 24(3). – P. 47.
21. Anisimov V.N., Ukraintseva S.V., Yashin A.I. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? // *Nat Rev Cancer.* – 2005.
22. Arakawa H., Arakawa K., Deak T. Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: a role for inflammatory processes // *Hormones and behavior.* – 2010. – V. 57. – № 3. – P. 330-341.
23. Arakawa H., Cruz S., Deak T. From models to mechanisms: odorant communication as a key determinant of social behavior in rodents during illness-associated states // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2011. – V. 35. – № 9. – P. 1916-1928.
24. Artandi S.E., DePinho R.A. Telomeres and telomerase in cancer // *Carcinogenesis.* – 2010. – № 31. – P. 9-18.
25. Aunan J.R., Cho W.C. & Soreide K. The biology of aging and cancer: a brief overview of shared and divergent molecular hallmarks // *Aging Dis.* – 2017. – № 8. – P. 628-642.
26. Avitsur R., Pollak Y., Yirmiya R. Administration of interleukin-1 into the hypothalamic paraventricular nucleus induces febrile and behavioral effects // *Neuroimmunomodulation.* – 1997. – Sep-Dec; № 4(5-6). – P. 258-65.
27. Bajtarevic A., Ager C., Pienz M., Klieber M., et al. Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath // *BMC Cancer.* – 2009. – Sep, № 29. – P. 9:348.
28. Bakker D.J., van der Kleij A.J. Soft Tissue Infections Including Clostridial Myonecrosis: Diagnosis and Treatment // In: Oriani G, Marroni A, Wattel F, eds. *Handbook on hyperbaric medicine.* – Milano: Springer Milan, 1996.

29. Bamford K. Canine Olfaction: An Overview of the Anatomy, Physiology and Genetics. – 2015. – <https://www.semanticscholar.org/paper/Canine-Olfaction-%3A-An-Overview-of-the-Anatomy-%2C-and-Bamford/5a43b175f925c5637258484008ef4c5c82525d46>. Accessed 12 June 2021.
30. Bard J., K. Yamazaki, M. Curran, E.A. Boyse, G.K. Beauchamp. Effect of B2m gene disruption on MHC-determined odortypes // Immunogenetics. – 2000. – Jun; № 51(7). – P. 514-518.
31. Barnes D.C., Hofacer R.D., Zaman A.R., Rennaker R.L., et al. Olfactory perceptual stability and discrimination // Nat Neurosci. – 2008. – № 11. – P. 1378-1380.
32. Baum M.J. & Keverne E.B. Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine // Hormones and Behavior. – 2002. – № 41. – P. 213-219.
33. Beauchamp G.K., Yamazaki K. Chemical signalling in mice // Biochem Soc Trans. – 2003. – Feb; № 31(Pt 1). – P. 147-151.
34. Beauchamp G.K., Yamazaki K., Curran M., Bard J., et al. Fetal H-2 odortypes are evident in the urine of pregnant female mice // Immunogenetics. – 1994. – № 39(2). – P. 109-113.
35. Beauchamp G.K., Yamazaki K., Duncan H., Bard J., Boyse E.A. // In Chemical Signals in Vertebrates 5 (MacDonald D.W., Müller-Schwarze D. and Natynczuk S.E., eds.). – Oxford University Press, Oxford, 1990. – P. 244-254.
36. Beauchamp G.K., Yamazaki K., Wysocki C.J., Slotnick B.M., et al. Chemosensory recognition of mouse major histocompatibility types by another species // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1985, Jun. – № 82(12). – P. 4186-4188.
37. Bedell S.L., Goldstein L.S., Goldstein A.R., Goldstein A.T. Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future // Sex Med Rev. – 2020. – Jan; № 8(1). – P. 28-37.
38. Bensafi M., Brown W.M., Tsutsui T., Mainland J.D., et al. Sex-steroid derived compounds induce sex-specific effects on autonomic nervous system function in

- humans // *Behav. Neurosci.* – 2003. – № 117. – P. 1125–1134.
39. Berretta M., Alessandrini L., De Divitiis C., Nasti G., et al. Serum and tissue markers in colorectal cancer: State of art // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2017. – Mar. – № 111. – P. 103-116.
40. Berti M., Cortez D., Lopes M. The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2020. – Oct. – № 21(10). – P. 633-651.
41. Bijland L.R., Bomers M.K., Smulders Y.M. Smelling the diagnosis: a review on the use of scent in diagnosing disease // *Neth J Med.* – 2013. – № 71. – P. 300-307.
42. Bikov A., Lázár Z., Horvath I. Established methodological issues in electronic nose research: how far are we from using these instruments in clinical settings of breath analysis? // *J Breath Res.* – 2015, Jun. – № 9(3). – P. 034001.
43. Bjorkman P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2 // *Nature.* – 1987. – Oct 8-14. – № 329(6139). – P. 506-512.
44. Bodyak N. & Slotnick B. Performance of mice in an automated olfactometer: odor detection, discrimination and odor memory // *Chem Senses.* – 1999. – № 24. – P. 637-645.
45. Boedeker E., Friedel G., Walles T. Sniffer dogs as part of a bimodal bionic research approach to develop a lung cancer screening // *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery.* – 2012. – V. 14. – P. 511-515.
46. Boehm T., Zufall F. MHC peptides and the sensory evaluation of genotype // *Trends Neurosci.* – 2006. – № 29. – P. 100-107.
47. Boillat M., Carleton A., Rodriguez I. From immune to olfactory expression: neofunctionalization of formyl peptide receptors // *Cell and Tissue Research.* – 2021, Jan. – № 383(1). – P. 387-393.
48. Bolnick D.I., Snowberg L.K., Caporaso J.G., Lauber C., et al. Major histocompatibility complex class IIb polymorphism influences gut microbiota composition and diversity // *Mol Ecol.* – 2014. – № 23. – P. 4831-4845.

- 49.Boots A.W., van Berkel J.J., Dallinga J.W., Smolinska A., et al. The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease // *J Breath Res.* – 2012, Jun. – № 6(2). – P. 027108.
- 50.Brabletz T., Jung A., Reu S., Porzner M., et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001, Aug 28. – № 98(18). – P. 10356-61.
- 51.Bransbury A.J., Church M.R.T., Church J.C.T. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study // *BMJ.* – 2004. – V. 329. – P. 712-717.
- 52.Brown C., Stafford K., Fordham R. The use of scent-detection dogs // *Ir Vet J.* – 2006. – № 59(2). – P. 97-104.
- 53.Brown J.L., Eklund A. Kin recognition and the major histocompatibility complex – an integrative review // *Am. Nat.* – 1994. – № 143. – P. 435-461.
- 54.Brown R.E. Mammalian social odors // *Adv Study Behav.* – 1979. – № 10. – P. 107-161.
- 55.Brown R.E., Singh P.B., Roser B. The major histocompatibility complex and the chemosensory recognition of individuality in rats // *Physiology & behavior.* – 1987, Jan 1. – № 40(1). – P. 65-73.
- 56.Bruins M., Bos A., Petit P.L.C., Eadie K., et al. Device-independent, real-time identification of bacterial pathogens with a metal oxide-based olfactory sensor // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – № 28. – P. 775-780.
- 57.Buszewski B., Kesy M., Ligor T., Amann A.. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases // *Biomed Chromatogr.* – 2007, Jun. – № 21(6). – P. 553-66.
- 58.Calcinotto A., Kohli J., Zagato E., Pellegrini L., et al. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury // *Physiol Rev.* – 2019, Apr 1. – № 99(2). – P. 1047-1078.
- 59.Cambau E., Poljak M. Sniffing animals as a diagnostic tool in infectious diseases // *Clin Microbiol Infect.* – 2020, Apr. – № 26(4). – P. 431-435.

60. Campigotto A., Bernardo T., Stone E., Stacey D. An animal health example of managing and analyzing a large volume of data on a PC: Modeling body weight and age of over 13 million cats for explanatory and predictive purposes // *Prev Vet Med.* – 2020, Jan. – №174. – P. 104824.
61. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer // *Annu. Rev. Physiol.* – 2013. – № 75. – P. 685-705.
62. Candelli M., Armuzzi A., Nista E.C., Fini L., et al. ¹³C-methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2004. – № 19. – P. 243.
63. Cardinali F.L., Ashley D.L., Wooten J.V., McCraw J.M., et al. The use of solid-phase microextraction in conjunction with a benchtop quadrupole mass spectrometer for the analysis of volatile organic compounds in human blood at the low parts-per-trillion level // *J Chromatogr Sci.* – 2000, Feb. – № 38(2). – P. 49-54.
64. Carmeliet P. and Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases // *Nature.* – 2000. – № 407. – P. 249-257.
65. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis // *Nat Med.* – 2000. – № 6. – P. 389-396.
66. Cashman J.R., Zhang J. Interindividual differences of human flavin-containing monooxygenase 3: genetic polymorphisms and functional variation // *Drug Metab Dispos.* – 2002, Oct. – № 30(10). – P. 1043-52.
67. Centerwall S.A., Centerwall WR. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist // *Pediatrics.* – 2000, Jan. – № 105(1 Pt 1). – P. 89-103.
68. Chambers S., Syhre M., Murdoch D., McCartin F., Epton M.J. Detection of 2-pentylfuran in the breath of patients with *Aspergillus fumigates* // *Med. Mycol.* – 2009. – № 47. – P. 468-476.
69. Chambers S.T., Bhandari S., Scott-Thomas A., Syhre M. Novel diagnostics: progress toward a breath test for invasive *Aspergillus fumigates* // *Med. Microbiol.* – 2011. – № 49(Suppl 1). – P. S54-S61.

70. Chambers S.T., Scott-Thomas A., Epton M. Developments in novel breath tests for bacterial and fungal pulmonary infection // *Curr. Opin. Pulm. Med.* – 2012. – № 18. – P. 228-232.
71. Chapuis J., Wilson D.A. Bidirectional plasticity of cortical pattern recognition and behavioral sensory acuity // *Nat Neurosci.* – 2011. – № 15. – P. 155-161.
72. Chen C., Lu L., Yan S., Yi H., et al. Autophagy and doxorubicin resistance in cancer // *Anticancer Drugs.* – 2018, Jan. – № 29(1). – P. 1-9.
73. Chen D., Haviland-Jones J. Human olfactory communication of emotion. *Percept* // *Mot. Skills.* – 2000. – № 91. – P. 771-781.
74. Chen X., Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts // *Nat Rev Drug Discov.* – 2019, Feb. – № 18(2). – P. 99-115.
75. Chen Z., Morales J.E., Avci N., Guerrero P.A., et al. The Vascular Endothelial Cell-Expressed Prion Protein Doppel Promotes Angiogenesis and Blood-Brain Barrier Development // *Development.* – 2020. – № 147. – dev193094.
76. Cheng N., Chytil A., Shyr Y., Joly A., Moses H.L. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion // *Mol Cancer Res.* – 2008, Oct. – № 6(10). – P. 1521-33.
77. Clark A.G., Vignjevic D.M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment // *Curr Opin Cell Biol.* – 2015. – № 36. – P. 13-22.
78. Coghlin C., Murray G.I. Current and emerging concepts in tumour metastasis // *J Pathol.* – 2010, Sep. – № 222(1). – P. 1-15.
79. Cook R.G., Same-different concept formation in pigeons // In: M. Bekoff, C. Allen, G.M. Burghardt (Eds.). *The Cognitive Animal.* – MIT, Cambridge, MA, 2002. – P. 229-237.
80. Cornu J.N., Cancal-Tassin G., Ondet V., et al. Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: A step forward to early diagnosis // *Eur Urology.* – 2011. – V. 59. – P. 197-201.
81. Croucher P.I., McDonald M.M., Martin T.J. Bone metastasis: the importance of the neighbourhood // *Nat Rev Cancer.* – 2016. – № 16. – P. 373-386.

- 82.Cui Y., Groth S., Troutman S., Carlstedt A., et al. The NF2 tumor suppressor merlin interacts with Ras and RasGAP, which may modulate Ras signaling // *Oncogene*. – 2019, Sep. – № 38(36). – P. 6370-6381.
- 83.Daulton E., Wicaksono A.N., Tiele A., Kocher H.M., et al. Volatile organic compounds (VOCs) for the non-invasive detection of pancreatic cancer from urine // *Talanta*. – 2021, Jan 1. – № 221. – P. 121604.
- 84.de Bakker P.I., McVean G., Sabeti P.C., Miretti M.M., et al. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC // *Nat Genet*. – 2006, Oct. – № 38(10). – P. 1166-72.
- 85.De Groot J.H.B., Semin G.R., Smeets M.A.M. Chemical communication of fear: A case of male-female asymmetry // *J. Exp. Psychol. Gen.* – 2014. – № 143. – P. 1515-1525.
- 86.De Visser K.E., Eichten A., Coussens L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development // *Nat. Rev. Cancer*. – 2006. – № 6. – P. 24-37.
- 87.DeBerardinis R.J., Chandel N.S. Fundamentals of cancer metabolism // *Sci Adv*. – 2016, May 27. – № 2(5). – P. e1600200.
- 88.DeNardo D.G., Andreu P., Coussens L.M. Interactions between. – 2010.
- 89.Dent A., T. Sutedja, P. Zimmerman. Exhaled breath analysis for lung cancer // *Journal of Thoracic diseases*. – 2013. – Vol. 63. – № 2. – P. 164-168.
- 90.Do Nascimento Fernandes de Souza E., Hawkins J.A. Ewé: a web-based ethnobotanical database for storing and analysing data // *Database (Oxford)*. – 2020, Jan 1. – 2020. – baz144.
- 91.Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2019, Feb. – № 20(2). – P. 69-84.
- 92.Doty R.L. Odor-guided behavior in mammals // *Experientia*. – 1986. – № 42. – P. 257-271.
- 93.Drakos J., Karakantza M., Zoumbos N.C., Lakoumentas J., et al. A perspective for biomedical data integration: design of databases for flow cytometry // *BMC Bioinformatics*. – 2008, Feb 14. – № 9. – P. 99.

94. Dummer J., Storer Swanney M., McEwan M., Scott-Thomsad A., et al. Analysis of biogenic volatile organic compounds in health and disease // *Trends Anal. Chem.* – 2011. – № 30. – P. 960-967.
95. Duncan H.J., Beauchamp G.K., Yamazaki K. Assessing odor generalization in the rat: A sensitive technique // *Physiology & behavior.* – 1992, Sep 1. – № 52(3). – P. 617-620.
96. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape // *Nat Immunol.* – 2002. – № 3. – P. 991-998.
97. Edwards T., Browne C., Schoon A., Cox C., et al. Animal olfactory detection of human diseases: guidelines and systematic review // *J Vet Behav Clin Appl Res.* – 2017.
98. Egeblad M., Nakasone E.S., Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism // *Dev Cell.* – 2010. – № 18. – P. 884-901.
99. Eggert F., Müller-Ruchholtz W., Ferst R. Olfactory cues associated with the major histocompatibility complex // *Genetica.* – 1999. – № 104. – P. 191-197.
100. Eizaguirre C., Lenz T.L., Sommerfeld R.D., Harrod C., et al. Parasite diversity, patterns of MHC II variation and olfactory based mate choice in diverging three-spined stickleback ecotypes // *Evol Ecol.* – 2011. – № 25. – P. 605-22.
101. Evan G., Littlewood T. A matter of life and cell death // *Science.* – 1998, Aug 28. – № 281(5381). – P. 1317-22.
102. Fend R., Kolk A.H., Bessant C., Buijtelts P., et al. Prospects for clinical application of electronic-nose technology to early detection of *Mycobacterium tuberculosis* in culture and sputum // *J Clin Microbiol.* – 2006, Jun. – № 44(6). – P. 2039-2045.
103. Feng Y.X, Wang T., Deng Y.Z., Yang P., et al. Sorafenib suppresses postsurgical recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma in an orthotopic mouse model // *Hepatology.* – 2011, Feb. – № 53(2). – P. 483-92.

104. Ferry B., Ensminger J.J., Schoon A., Bobrovskij Z., et al. Scent lineups compared across eleven countries: Looking for the future of a controversial forensic technique // *Forensic Sci Int.* – 2019, Sep. – № 302. – P. 109895.
105. Fiehn O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling // *Curr Protoc Mol Biol.* – 2016, Apr 1. – № 114. – P. 30.4.1-30.4.32.
106. Filipiak W., Sponring A., Filipiak A., Ager C., et al. TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells in vitro // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2010, Jan. – № 19(1). – P. 182-95.
107. Filipiak W., Sponring A., Mikoviny T., Ager C., et al. Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro // *Cancer Cell Int.* – 2008, Nov 24. – № 8. – P. 17.
108. Fischer-Tenhagen C., Johnen D., Nehls I., Becker R. A Proof of Concept: Are Detection Dogs a Useful Tool to Verify Potential Biomarkers for Lung Cancer? // *Front Vet Sci.* – 2018, Mar 14. – № 5. – P. 52.
109. Fiset S., Gagnon S., Beaulieu C. Spatial encoding of hidden objects in dogs (*Canis familiaris*) // *J Comp Psychol.* – 2000, Dec. – № 114(4). – P. 315-24.
110. Fouad Y.A., Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer // *Am J Cancer Res.* – 2017, May 1. – № 7(5). – P. 1016-1036.
111. Furton K.G., Myers L.J. The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives // *Talanta.* – 2001, May 10. – № 54(3). – P. 487-500.
112. Gahr C.L., Boehm T., Milinski M. Female assortative mate choice function-ally validates synthesized male odours of evolving stickleback river-lake ecotypes // *Biol Lett.* – 2018. – № 14. – P. 20180730.
113. Galluzzi L., Pietrocola F., Bravo-San Pedro J.M., Amaravadi R.K., et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression // *EMBO J.* – 2015. – № 34. – P. 856-880.
114. Galluzzi, L., Kroemer, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis // *Cell.* – 2008. – № 135. – P. 1161-1163.

115. Gao L., Loveless J., Shay C., Teng Y. Targeting ROS-Mediated Crosstalk Between Autophagy and Apoptosis in Cancer // *Adv Exp Med Biol.* – 2020. – № 1260. – P. 1-12.
116. Garner C.E., Smith S., Costello B., White P., et al. Volatile organic compounds from faeces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease // *The FASEB Journal.* – 2007. – V. 21. – № 8. – P. 1675-1688.
117. Gasparri R., Santonico M., Valentini C., Sedda G., et al. Volatile signature for the early diagnosis of lung cancer// *J Breath Res.* – 2016, Feb 9. – № 10(1). – P. 016007.
118. Gelstein S., Yeshurun Y., Rozenkrantz L., Shushan S., et al. Human tears contain a chemosignal // *Science.* – 2011. – № 331. – P. 226-231.
119. Gerhardt H., Semb H. Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis? // *J Mol Med (Berl).* – 2008, Feb. – № 86(2). – P. 135-44.
120. Ghaffari P., Mardinoglu A., Nielsen J. Cancer Metabolism: A Modeling Perspective // *Front Physiol.* – 2015, Dec 16. – № 6. – P. 382.
121. Girona J., Vallvé J.C., Ribalta J., Heras M., et al. 2,4-Decadienal downregulates TNF-alpha gene expression in THP-1 human macrophages // *Atherosclerosis.* – 2001, Sep. – № 158(1). – P. 95-101.
122. Gordon A.R., Kimball B.A., Sorjonen K., Karshikoff B., et al. Detection of inflammation via volatile cues in human urine // *Chemical senses.* – 2018, Nov 1. – № 43(9). – P. 711-719.
123. Gordon R.T., Schatz C.B., Myers L.J., et al. The use of canines in the detection of human cancers // *J Altern Complement Med.* – 2008. – V. 14. – P. 61-67.
124. Gordon S.G., Smith K., Rabinowitz J.L., Vagelos P.R. Studies of trans-3-methyl-2-hexenoic acid in normal and schizophrenic humans // *J Lipid Res.* – 1973, Jul. – № 14(4). – P. 495-503.
125. Goss K.U. The physical chemistry of odors – consequences for the work with detection dogs // *Forensic Sci Int.* – 2019. – № 296. – P. 110-114.

126. Griebel I.A., Dawson R.D. Nestling tree swallows (*Tachycineta bicolor*) alter begging behaviour in response to odour of familiar adults, but not their nests // *Ethology*. – 2020. – № 126. – P. 630-636.
127. Grieves L.A., Gloor G.B., Bernards M.A., MacDougall-Shackleton E.A. Songbirds 624 show odour-based discrimination of similarity and diversity at the major histocompatibility complex // *625 Animal Behaviour*. – 2019. – № 58. – P. 131-138.
128. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer // *Cell*. – 2010. – № 140. – P. 883-899.
129. Guernion N., Ratcliffe M., Spencer-Phillips P.T., Howe R.A. Identifying bacteria in human urine: current practice and the potential for rapid, near-patient diagnosis by sensing volatile organic compounds // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2001. – № 39. – P. 893-906.
130. Hackner K., Pleil J. Canine olfaction as an alternative to analytical instruments for disease diagnosis: understanding 'dog personality' to achieve reproducible results // *J Breath Res.* – 2017, Jan 9. – № 11(1). – P. 012001.
131. Hakim G.M., Broza Y.Y., Billan S., et al. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors // *Br J Cancer*. – 2010. – V. 103. – P. 542-551.
132. Hakim M., Broza Y.Y., Barash O., Peled N., et al. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways // *Chem. Rev.* – 2012. – № 112. – P. 5949-5966.
133. Hale E. Canine human-scent-matching: The limitations of systematic pseudo matching-to-sample procedures / *Forensic Sci Int.* – 2017, Oct. – № 279. – P. 177-186.
134. Hale Ellen. Canine human-scent-matching: The limitations of systematic pseudo matching-to-sample procedures // Forensic Science International. – October 2017. – V. 279. – P. 177-186.
135. Hall N.J., Glenn K., Smith D.W., Wynne C.D.L. Performance of Pugs, German Shepherds, and Greyhounds (*Canis lupus familiaris*) on an Odor-

- Discrimination Task Performance of Pugs, German Shepherds, and Greyhounds // *J Comp Psychol.* – 2015. – № 129. – P. 237.
136. Hall N.J., Smith D.W., Wynne C.D. Pavlovian conditioning enhances resistance to disruption of dogs performing an odor discrimination // *J Exp Anal Behav.* – 2015, May. – № 103(3). – P. 484-497.
137. Hamid A.A., Gray K.P., Shaw G., MacConaill L.E., et al. Compound Genomic Alterations of TP53, PTEN, and RB1 Tumor Suppressors in Localized and Metastatic Prostate Cancer // *Eur Urol.* – 2019, Jul. – № 76(1). – P. 89-97.
138. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer. An organizing principle for cancer medicine // *Cancer: Principles & Practice of Oncology.* – 2015.
139. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* – 2011. – № 144. – P. 646-674.
140. Hanahan D., Weinberg RA. The hallmarks of cancer // *Cell.* – 2000. – № 100. – P. 57-70.
141. Hanai Y., Shimono K., Matsumura K., et al. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2012. – V. 76. – P. 679-684.
142. Hanai Y., Shimono K., Oka H., Baba Y., et al. Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice // *Cancer cell international.* – 2012. – V. 12. – P. 7-19.
143. Handa H., Usuba A., Maddula S., Baumbach J.I., et al. Exhaled breath analysis for lung cancer detection using ion mobility spectrometry // *PLoS One.* – 2014, Dec 9. – № 9(12). – P. e114555.
144. Hartke J., Johnson M., Ghabril M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma // *Semin Diagn Pathol.* – 2017, Mar. – № 34(2). – P. 153-159.
145. Hartley A.V., Martin M., Lu T. Aging: Cancer – an unlikely couple // *Aging (Albany NY).* – 2017. – № 9(9). – P. 1949-1950.
146. Hashimoto T., Shibasaki F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch // *Front Pediatr.* – 2015. – № 3. – P. 33.

147. Havlíček J., Dvořáková R., Bartoš L., Flegr J. Non -advertized does not mean concealed: body odour changes across the human menstrual cycle // *Ethology*. – 2006, Jan. – № 112(1). – P. 81-90.
148. Havlicek J., Roberts S.C., Flegr J. Women's preference for dominant male odour: Effects of menstrual cycle and relationship status // *Biol. Lett.* – 2005. – № 1. – P. 256-259.
149. Havlicek J.L., Roberts S.C. MHC-correlated mate choice in humans: a review // *Psychoneuroendocrinology*. – 2009. – V. 34. – № 4. – P. 497-512.
150. Hayes S.A., Haefliger S., Harris B., Pavlakis N., et al. Exhaled breath condensate for lung cancer protein analysis: a review of methods and biomarkers // *J Breath Res.* – 2016, Jul 5. – Vol. 10. – № 3.
151. Heth G., Todrank J. Individual odour similarities across species parallel phylogenetic relationships in the *S. ehrenbergi* superspecies of mole-rats // *Anim Behav.* – 2000. – V. 60. – P. 789-795.
152. Hida K., Maishi N., Torii C., Hida Y. Tumor angiogenesis-characteristics of tumor endothelial cells / *Int J Clin Oncol.* – 2016. – № 21. – P. 206-212.
153. Hinz C., Namekawa I., Namekawa R., Behrmann-Godel J., et al. Olfactory imprinting is triggered by MHC peptide ligands // *Sci Rep.* – 2013. – № 3. – P. 2800.
154. Horne S.D., Pollick S.A., Heng H.H. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer // *Int J Cancer.* – 2015. – № 136. – P. 2012-2021.
155. Horton R., et al. Gene map of the extended human MHC // *Nat Rev Genet.* – 2004. – № 5. – P. 889-899.
156. Horvath G., Andersson H., Paulsson G. Characteristic odour in the blood reveals ovarian carcinoma // *BMC Cancer.* – 2010. – V. 10. – P. 643.
157. Horvath G., Järverud G., Järverud S., Horváth I. Human Ovarian Carcinomas Detected by Specific Odor // *Integrative Cancer Therapies.* – 2008. – V. 7. – P. 76-80.
158. Horváth I., Lázár Z., Gyulai N., Kollai M., et al. Exhaled biomarkers in lung cancer // *Eur Respir J.* – 2009. – V. 34. – P. 261-275.

159. Hristova V.A., Chan D.W. Cancer biomarker discovery and translation: proteomics and beyond // *Expert Rev Proteomics*. – 2019, Feb. – №16(2). – P. 93-103.
160. Hussain S.A., Ferry D.R., El-Gazzaz G., et al. Hepatocellular carcinoma // *Ann Oncol*. – 2001. – V. 12. – P. 161-172.
161. Hutton T.J. The value of clinical odors. – New York, M.J., 1878.
162. Jacob S., McClintock M.K., Zelano B., Ober C. Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor // *Nat Genet*. – 2002. – № 30. – P. 175-179.
163. Jemal A., Bray F., Center M.M., et al. Global cancer statistics // *CA Cancer J Clin*. – 2011. – V. 61. – P. 69-90.
164. Jendry P., Schulz C., Twele F., Meller S, et al. Scent dog identification of SARS-CoV-2 infection // *BMC Infect Dis*. – 2020. – № 20. – P. 536.
165. Jendry P., Twele F., Meller S., et al. Scent dog identification of SARS-CoV-2 infections in different body fluids // *BMC Infect Dis*. – 2021. – № 21. – P. 707.
166. *Jessica S., Brown Paola, A. Prada, Allison M. Curran, et al. Furton. Applicability of emanating volatile organic compounds from various forensic specimens for individual differentiation// Forensic Science International. – V. 226, Issues 1-3. – 10 March, 2013. – P. 173-182.*
167. Jett J.R. Limitations of screening for lung cancer with low-dose spiral computed tomography // *Clinical Cancer Research*. – 2005, Jul 1. – № 11(13). – P. 4988s-92s.
168. Jezierski T., Adamkiewicz E., Walczak M., Sobczyńska M., et al. Efficacy of drug detection by fully-trained police dogs varies by breed, training level, type of drug and search environment // *Forensic Sci Int*. – 2014, Apr. – № 237. – P. 112-118.
169. Jezierski T., Walczak M., Ligor T., Rudnicka J., Buszewski B. Study of the art: canine olfaction used for cancer detection on the basis of breath odour.

- Perspectives and limitations // *J Breath Res.* – 2015, May 6. – № 9(2). – P. 027001.
170. Ji Hee Ha Muralidharan, Jayaraman Revathy, Nadhan Srishti, et al. Unraveling Autocrine Signaling Pathways through Meta-bolic Fingerprinting in Serous Ovarian Cancer Cells // *Biomedicines.* – 2021. – № 9(12). – P. 1927.
171. Jin P., Zhao Y., Liu H., Chen J., et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α polarize bone marrow stromal cells uniformly to a Th1 phenotype // *Sci Rep.* – 2016. – № 6. – P. 26345.
172. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition // *J Clin Invest.* – 2009. – № 119. – P. 1420-1428.
173. Kanaan R., Farkas N., Hegyi P., Soós A., et al. Rats sniff out pulmonary tuberculosis from sputum: a diagnostic accuracy meta-analysis // *Sci Rep.* – 2021, Jan 21. – №11(1). – P. 1877.
174. Karagoz K., Sinha R., Arga K.Y. Triple negative breast cancer: a multi-omics network discovery strategy for candidate targets and driving pathways // *OMICS.* – 2015, Feb. – № 19(2). – P. 115-130.
175. Karnoub A.E, Weinberg R.A. Chemokine networks and breast cancer metastasis // *Breast Dis.* – 2006-2007. – № 26. – P. 75-85.
176. Katz J.S., Wright A.A., Bodily K.D. Issues in the Comparative Cognition of Abstract-Concept Learning // *Comp Cogn Behav Rev.* – 2007, Jan 1. – № 2. – P. 79-92.
177. Kaufman Jim. Unfinished Business: Evolution of the MHC and the Adaptive Immune System of Jawed Vertebrates // *Annu Rev Immunol.* – 2018, Apr 26. – № 36. – P. 383-409.
178. Kavaliers M., Choleris E., Agmo A., Muglia L.J., et al. Involvement of the oxytocin gene in the recognition and avoidance of parasitized males by female mice // *Anim. Behav.* – 2005a. – V. 70. – P. 693-702.
179. Kavaliers M., Choleris E., Pfaff D.W. Recognition and avoidance of the odors of parasitized conspecifics and predators: differential genomic correlates // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2005b. – V 29. – P. 1347-1359.

180. Keller M., Douhard Q., Baum M.J., Bakker J. Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice // *Chem. Senses.* – 2006a. – V. 31. – P. 315-323.
181. Keller M., Pierman S., Douhard Q., Baum M.J., et al. The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice // *Eur. J. Neurosci.* – 2006b. – V. 23. – P. 521-530.
182. Kennedy K.M., Dewhirst M.W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation // *Future Oncol.* – 2010, Jan. – № 6(1). – P. 127-148.
183. Kesselmeier J., Staudt M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology // *Environ Pollut.* – 2000. – № 109. – P. 175.
184. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment // *Cell.* – 2010. – № 141. – P. 52-67.
185. Keulers T.G., Schaaf M.B., Rouschop K.M. Autophagy-dependent secretion: contribution to tumor progression // *Front Oncol.* – 2016. – № 6. – P. 251.
186. Khatcheressian J.L., Wolff A.C., Smith T.J., Grunfeld E., et al. American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting // *J Clin Oncol.* – 2006, Nov 1. – № 24(31). – P. 5091-5097.
187. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape // *Immunology.* – 2007. – № 121. – P. 1-14.
188. Kimball B.A. Volatile metabolome: problems and prospects // *Bioanalysis.* – 2016, Oct. – № 8(19). – P. 1987-1991.
189. Kimball B.A., Opiekun M., Yamazaki K., Beauchamp G.K. Immunization alters body odor // *Physiology & behavior.* – 2014, Apr 10. – № 128. – P. 80-85.
190. Kiyokawa Y., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. Removal of the vomeronasal organ blocks the stress-induced hyperthermia response to alarm pheromone in male rats // *Chemical Senses.* – 2007. – V. 32, Issue 1. – P. 57-64.

191. Klein J., F Figueroa. Evolution of the major histocompatibility complex // *Crit Rev Immunol.* – 1986. – № 6(4). – P. 295-386.
192. Knapp L.A. Denaturing gradient gel electrophoresis and its use in the detection of major histocompatibility complex polymorphism // *Tissue Antigens.* – 2005, Mar. – № 65(3). – P. 211-219.
193. Kochevalina M.Y., Bukharina A.B., Trunov V.G., Pento A.V., et al. Changes in the urine volatile metabolome throughout growth of transplanted hepatocarcinoma // *Sci Rep.* – 2022, May 11. – № 12(1). – P. 7774.
194. Koczulla R., Hattesoehl A., Biller H., et al. Comparison of four identical electronic noses and three measurement set-ups // *Pneumologie.* – 2011. – P. 465-470.
195. Koivusalo M., Reeve C. Biomedical scent detection dogs: would they pass as a healthtechnology // *Pet Behav Sci.* – 2018. – № 6. – P. 1–6.
196. Ku S.Y., Rosario S., Wang Y., Mu P., Seshadri M., et al. Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance // *Science.* – 2017, Jan 6. – № 355(6320). – P. 78-83.
197. Kusano M., Mendez E., Furton K.G. Development of headspace SPME method for analysis of volatile organic compounds present in human biological specimens // *Anal Bioanal Chem.* – 2011, Jun. – № 400(7). – P. 1817-1826.
198. Kwak J., Gallagher M., Ozdener M.H., et al. Volatile biomarkers from human melanoma cells // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2013. – V. 931. – P. 90-96.
199. Kwak J., Willse A., Matsumura K., Curran Opiekun M., et al. Genetically-based olfactory signatures persist despite dietary variation // *PLoS One.* – 2008. – № 3(10).
200. Labows J.N., McGinley K.J., Webster G.F., Leyden J.H. Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Clin. Microbiol.* – 1980. – № 12. – P. 521-526.

201. Lakatos G., Soproni K., Dóka A., Miklósi A. A comparative approach to dogs' (*Canis familiaris*) and human infants' comprehension of various forms of pointing gestures // *Anim Cogn.* – 2009, Jul. – № 12(4). – P. 621-31.
202. Lazarevich N.L., Cheremnova O.A., Varga E.V., et al. Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors // *Hepatology.* – 2004. – V. 39. – P. 1038-1047.
203. Lechner M., Fille M., Hausdorfer J., Dierich M.P., et al. Diagnosis of bacteria in vitro by mass spectrometric fingerprinting: a pilot study // *Curr. Microbiol.* – 2005. – № 51. – P. 267-269.
204. Li J., Peng Y., Liu Y., Li W., et al. Investigation of potential breath biomarkers for the early diagnosis of breast cancer using gas chromatography-mass spectrometry // *Clin Chim Acta.* – 2014, Sep 25. – № 436. – P. 59-67.
205. Li T.T., Zhu H.B. LKB1 and cancer: The dual role of metabolic regulation // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2020, Dec 1. – № 132. – P. 110872.
206. Li X., Hu J., Gu B., Paul M.E., et al. Animal model of intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma: establishment and characteristic // *Sci Rep.* – 2020, Sep 16. – № 10(1). – P. 15199.
207. Liddell K. Smell as a diagnostic marker // *Postgrad Med J.* – 1976, Mar. – № 52(605). – P. 136-138.
208. Ligor M., Ligor T., Bajtarevic A., Ager C., Pienz M., et al. Determination of volatile organic compounds appearing in exhaled breath of lung cancer patients by solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry // *Clin Chem Lab Med.* – 2009. – № 47. – P. 550-560.
209. Lin S.J., Schranz J., Teutsch S.M. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature // *Clin Infect Dis.* – 2001, Feb 1. – № 32(3). – P. 358-66.
210. Lippi G. Re: Jean-Nicolas Cornu, Géraldine Cancel-Tassin, Valérie Ondet, et al. Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: a step forward in early diagnosis // *Eur urol.* – 2011. – № 59. – P. 197-201 // *Eur Urol.* – 2011, Oct. – № 60(4). – P. e29.

211. Llovet J.M., Kelley R.K., Villanueva A., Singal A.G., et al. Hepatocellular carcinoma // *Nature reviews Disease primers*. – 2021, Jan 21. – № 7(1). – P. 1-28.
212. Lord T., Kasprzak M. Identification of self through olfaction // *Perceptual and motor skills*. – 1989, Aug. – № 69(1). – P. 219-224.
213. Lubes G., Goodarzi M. Analysis of Volatile Compounds by Advanced Analytical Techniques and Multivariate Chemometrics // *Chem Rev.* – 2017, May 10. – № 117(9). – P. 6399-6422.
214. Lübke K.T., Hoenen M., Pause B.M. Differential processing of social chemosignals obtained from potential partners in regards to gender and sexual orientation // *Behav. Brain Res.* – 2012. – № 228. – P. 375-387.
215. Maciejowski J., de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2017, Mar. – № 18(3). – P. 175-186.
216. Madsen C.D., Sahai E. Cancer dissemination – lessons from leukocytes // *Dev Cell.* – 2010, Jul 20. – № 19(1). – P. 13-26.
217. Maes E., Cho W.C., Baggerman G. Translating clinical proteomics: the importance of study design // *Expert Rev Proteomics.* – 2015, Jun. – № 12(3). – P. 217-219.
218. Malladi S., Macalinao D.G., Jin X., He L., et al. Metastatic latency and immune evasion through autocrine inhibition of WNT // *Cell.* – 2016. – № 165. – P. 45-60.
219. Malmberg K.J. Effective immunotherapy against cancer // *Cancer Immunol Immunother.* – 2004. – № 53. – P. 879-892.
220. Malumbres M., Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm // *Nat Rev Cancer.* – 2009. – № 9. – P. 153-166.
221. Marcondes-Braga F.G., Gioli-Pereira L., Bernardez-Pereira S., Batista G.L., et al. Exhaled breath acetone for predicting cardiac and overall mortality in chronic heart failure patients // *ESC Heart Fail.* – 2020, Aug. – № 7(4). – P. 1744-1752.

222. Martins, Y., Preti G., Crabtree C.R., Runyan T., et al. Preference for human body odors is influenced by gender and sexual orientation // *Psychol. Sci.* – 2005. – № 16. – P. 694-701.
223. Masuda T., Miyoshi E. Cancer biomarkers for hepatocellular carcinomas: from traditional markers to recent topics // *Clinical chemistry and laboratory medicine.* – 2011, Jun 1. – № 49(6). – P. 959-66.
224. Matsumura K., Opiekun M., Oka H., et al. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer: a proof of principle study using odor signatures in mouse models of lung cancer // *PLoS One.* – 2010. – V. 5. – P. e8819.
225. Mayers J.R., Torrence M.E., Danai L.V., Papagiannakopoulos T., et al. Tissue of origin dictates branched-chain amino acid metabolism in mutant Kras-driven cancers // *Science.* – 2016. – № 353. – P. 1161-1165.
226. McAllister S.S., Weinberg R.A. Tumor-host interactions: a far-reaching relationship // *J Clin Oncol.* – 2010. – № 28. – P. 4022-4028.
227. McCartney W. *Olfaction and Odours: An Oosphresiological Essay.* – Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.
228. McClintock M.K. Menstrual Synchrony and Suppression // *Nature.* – 1971. – № 229. – P. 244-245.
229. McCulloch M., Jezierski T., Broffman M., et al. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers // *Interact Canc Ther.* – 2006. – V. 5. – P. 30-39.
230. McCullough K.D., Bartfay W.J. The dose-dependent effects of chronic iron overload on the production of oxygen free radicals and vitamin E concentrations in the liver of a murine model // *Biol Res Nurs.* – 2007, Apr. – № 8(4). – P. 300-304.
231. Melançon S.B. L'odeur particulière des schizophrènes [The peculiar odor of schizophrenics] // *Union Med Can.* – 1970, Aug. – № 99(8). – P. 1445-1446.
232. Mendonsa A.M., Na T.Y., Gumbiner B.M. E-cadherin in contact inhibition and cancer // *Oncogene.* – 2018, Aug. – № 37(35). – P. 4769-4780.

233. Meng X., Dang T., Chai J. From Apoptosis to Necroptosis: The Death Wishes to Cancer // *Cancer Control*. – 2021, Jan–Dec. – № 28. – P. 10732748211066311.
234. Miekisch W., Herbig J., Schubert J.K. Data interpretation in breath biomarker research: pitfalls and directions // *J Breath Res*. – 2012, Sep. – № 6(3). – P. 036007.
235. Milinski M. The Major Histocompatibility Complex, Sexual Selection, and Mate Choice // *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. – 2006. – № 37(1). – P. 159-186.
236. Milinski M., Croy I., Hummel T., Boehm T. Major histocompatibility complex peptide ligands as olfactory cues in human body odour assessment // *Proc Biol Sci*. – 2013. – № 280. – P. 20122889.
237. Miller-Atkins G., Acevedo-Moreno L.A., Grove D., Dweik R.A., et al. Breath Metabolomics Provides an Accurate and Noninvasive Approach for Screening Cirrhosis, Primary, and Secondary Liver Tumors // *Hepatology Commun*. – 2020, Apr 26. – № 4(7). – P. 1041-1055.
238. Mochalski P., Wzorek B., Sliwka I., Amann A. Suitability of different polymer bags for storage of volatile sulphur compounds relevant to breath analysis // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. – 2009, Jan 15. – № 877(3). – P. 189-196.
239. Moser E., McCulloch M. Canine scent detection of human cancers. A review of methods and accuracy // *J. Vet. Behav*. – 2010. – № 5. – P. 145-152.
240. Moshkin M., Litvinova N., Litvinova E.A., Bedareva A., et al. Scent recognition of infected status in humans // *The journal of sexual medicine*. – 2012, Dec 1. – № 9(12). – P. 3211-3218.
241. Moshkin Y.M., Belyakin S.N., Rubtsov N.B., Kokoza E.B., et al. Microdissection and sequence analysis of pericentric heterochromatin from the *Drosophila melanogaster* mutant Suppressor of Underreplication // *Chromosoma*. – 2002, Jul. – № 111(2). – P. 114-125.

242. Mowers E.E., Sharifi M.N., Macleod K.F. Autophagy in cancer metastasis // *Oncogene*. – 2017. – № 36. – P. 1619-1630.
243. Muller L., Mitsuhashi M., Simms P., Gooding W.E., et al. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets // *Sci Rep*. – 2016. – № 6. – P. 20254.
244. Murai J., Thomas A., Miettinen M., Pommier Y. Schlafen 11 (SLFN11), a restriction factor for replicative stress induced by DNA-targeting anti-cancer therapies // *Pharmacol Ther*. – 2019, Sep. – № 201. – P. 94-102.
245. Mutic S., Parma V., Br nner Y.F., Freiherr J. You smell dangerous: Communicating fight responses through human chemosignals of aggression // *Chem. Senses*. – 2016. – № 41. – P. 35-43.
246. Mykityowycz R., Goodrich B.S. Skin glands as organs of communication in mammals // *J Invest Dermatol*. – 1974, Mar. – № 62(3). – P. 124-131.
247. Nadine Darwiche Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair // *Am J Cancer Res*. – 2020. – № 10(7). – P. 1954-1978.
248. Nagy J.D., Armbruster D. Evolution of uncontrolled proliferation and the angiogenic switch in cancer // *Math Biosci Eng*. – 2012, Oct. – № 9(4). – P. 843-876.
249. Nathaniel j. Hall, David W. Smith, Clive D. Wynne. Pavlovian conditioning enhances resistance to disruption of dogs performing an odor discrimination // *Journal of the experimental analysis of behavior*. – 2015. – № 103. – P. 484-497 number 3 (may).
250. Natsch A., Emter R. The specific biochemistry of human axilla odour formation viewed in an evolutionary context // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. – 2020, Jun 8. – № 375(1800). – P. 20190269.
251. Neefjes J., Jongsma Marlieke L.M., Petra Paul. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation // *Nat Rev Immunol*. – 2011, Nov 11. – № 11(12). – P. 823-836.
252. Noble D. A biological relativity view of the relationships between genomes and phenotypes // *Prog Biophys Mol Biol*. – 2013. – № 111. – P. 59-65.

253. Novak B.J., Blake D.R., Meinardi S., Rowland F.S., et al. Exhaled methyl nitrate as a noninvasive marker of hyperglycemia in type 1 diabetes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – № 104. – P. 15613-15618.
254. Novotny M., Harvey S., Jemiolo B., Alberts J. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – V. 82. – P. 2059-2061.
255. Novotny M.V., Soini H.A., Koyama S., Wiesler D., et al. Chemical identification of MHC-influenced volatile compounds in mouse urine. I: quantitative proportions of major chemosignals // *J. Chem. Ecol.* – 2007. – № 33. – P. 417-434.
256. O'Neill H.J., Gordon S.M., O'Neill M.H., et al. A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer // *Clin Chem.* ➔ 1988. ➔ V. 34. ➔ № 8. ➔ P. 1613-1618.
257. Ober C., Weitkamp L.R., Cox N., Dytch H., et al. HLA and mate choice in humans // *Am J Hum Genet.* – 1997. – № 61. – P. 497-504.
258. Olson B., Li Y., Lin Y., Liu E.T. A. Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research // *Cancer Discov.* – 2018, Nov. – № 8(11). – P. 1358-1365.
259. Olsson M.J., Lundström J.N., Kimball B.A., Gordon A.R., et al. The scent of disease: Human Body Odor Contains an Early Chemosensory Cue of Sickness // *Psychol. Sci.* – 2014. – № 25. – P. 817-823.
260. Ong A.L.C., Ramasamy T.S. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming // *Ageing Res Rev.* – 2018, May. – № 43. – P. 64-80.
261. Osada K., Tashiro T., Mori K., Izumi H. The identification of attractive volatiles in aged male mouse urine // *Chem. senses.* – 2008. – V. 33. – № 9. – P. 815-823.
262. Osada K., Yamazaki K., Curran M., Bard J., et al. The scent of age // *Proc. R. Soc. Lond., Biol. Sci.* – 2003. – V. 270. – № 1518. – P. 929-933.

263. Ozpolat B., Benbrook D.M. Targeting autophagy in cancer management-strategies and developments // *Cancer Manag Res.* – 2015. – № 7. – P. 291-299.
264. Parkin D.M. International variation // *Oncogene.* – 2004. – № 23. – P. 6329.
265. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. Int. J. Global cancer statistics // *Cancer.* – 2001. – № 94. – P. 153.
266. Parma V., Tirindelli R., Bisazza A., Massaccesi S., et al. Subliminally perceived odours modulate female intrasexual competition: An eye movement study // *PLoS ONE.* – 2012. – № 7. – P. e30645.
267. Paul D. The systemic hallmarks of cancer // *Journal of Cancer Metastasis and Treatment.* – 2020, Aug 28. – № 6. – P. 29.
268. Pauling L., Robinson A.B., Teranishi R., Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1971. – V. 68. – P. 2374-2376.
269. Pavlou A.K., Turner A.P. Sniffing out the truth: clinical diagnosis using the electronic nose // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2000. – № 38. – P. 99-112.
270. Pavlou M.P., Diamandis E.P. The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? // *J Proteomics.* – 2010, Sep 10. – № 73(10). – P. 1896-1906.
271. Peng Q.L., Wei S.M., Zhang L., Gan L.Y., et al. [GPCR48 promotes invasion and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells] // *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* – 2021, Sep 20. – № 29(9). – P. 849-854. Chinese.
272. Penn D., Potts W. How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences // *Adv. Immunol.* – 1998, Jan 1. – № 69. – P. 411-36.
273. Penn D., Potts W.K. Chemical signals and parasitemediated sexual selection // *Trends Ecol. Evol.* ➔ 1998. ➔ V. 13. ➔ P. 391-396.
274. Penn D., Potts W.K. Untrained mice discriminate MHC-determined odors // *Physiology & Behavior.* – 1998, Jun 1. – № 64(3). – P. 235-243.

275. Penn D.J., Oberzaucher E., Grammer K., Fischer G., et al. Individual and gender fingerprints in human body odour. *Journal of the Royal society interface* // 2007, Apr 22. – № 4(13). – P. 331-340.
276. Persaud K., Dodd G. Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose // *Nature*. – 1982. – V. 299. – P. 352-355.
277. Petrovic N. Targeting angiogenesis in cancer treatments: where do we Stand? // *J Pharm Pharm Sci*. – 2016. – № 19. – P. 226-238.
278. Pflumm M. Animal instinct helps doctors ferret out disease // *Nat Med*. – 2011, Feb. – № 17(2). – P. 143.
279. Phillips M., Altorki N., Austin J.H., Cameron R.B., et al. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath // *Cancer Biomarkers*. – 2007. – № 3. – P. 95-109.
280. Phillips M., Erickson G.A., Sabas M., Smith J.P., e al. Volatile organic compounds in the breath of patients with schizophrenia // *J Clin Pathol*. – 1995, May. – № 48(5). – P. 466-469.
281. Phillips M., Sabas M., Greenberg J. Increased pentane and carbon disulfide in the breath of patients with schizophrenia // *J Clin Pathol*. – 1993, Sep. – № 46(9). – P. 861-864.
282. Piccirillo S., Filomeni G., Brüne B., Rotilio G., et al. Redox mechanisms involved in the selective activation of Nrf2-mediated resistance versus p53-dependent apoptosis in adenocarcinoma cells // *J Biol Chem*. – 2009, Oct 2. – № 284(40). – P. 27721-27733.
283. Pinsky P.F. Principles of Cancer Screening // *Surg Clin North Am*. – 2015, Oct. – № 95(5). – P. 953-966.
284. Polgár Z., Kinnunen M., Újváry D., Miklosi A., et al. A test of canine olfactory capacity: comparing various dog breeds and wolves in a natural detection task // *PloS one*. – 2016. – № 11. – P. 0154087.

285. Porter R.H., Balogh R.D., Cernoch J.M., Franchi C. Recognition of kin through characteristic body odors // *Chemical Senses*. – 1986, Aug 1. – № 11(3). – P. 389-395.
286. Porter R.H., Schaal B. Olfaction and development of social preferences in neonatal organisms // In *Handbook of Olfaction and Gustation*; Doty R.L., Ed.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1995. – P. 299-321.
287. Probert C.S., Ahmed I., Khalid T., Johnson E., et al. Volatile organic compounds as diagnostic biomarkers in gastrointestinal and liver diseases // *J Gastrointestin Liver Dis*. – 2009, Sep. – № 18(3). – P. 337-343.
288. Psaila B., Kaplan R.N., Port E.R., Lyden D. Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche // *Breast Dis*. – 2006. – № 26. – P. 65-74.
289. Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis // *Cell*. – 2010, Apr 2. – № 141(1). – P. 39-51.
290. Qin T., Liu H., Song Q., et al. The screening of volatile markers for hepatocellular carcinoma // *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prev*. ➤ 2010. ➤ V. 19. ➤ P. 2247-2253.
291. Rammensee H.G., Bachmann J., Stevanovic S. *MHC Ligands and Peptide. – Motifs* Springer, Heidelberg, 1997. – P. 1-16.
292. Rammensee H.G., Falk K., Rotzschke O. // *Annu. Rev. Immunol*. – 1993. – № 11. – P. 213-244.
293. Ramoni R., Vincent F., Grolli S., Conti V., et al. The insect attractant 1-octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein // *J Biol Chem*. – 2001, Mar 9. – № 276(10). – P. 7150-7155.
294. Restrepo D., Lin W., Salcedo E., Yamazaki K., Beauchamp G. Odortypes and MHC peptides: complementary chemosignals of MHC haplotype? // *Trends Neurosci*. – 2006. – № 29. – P. 604-609.
295. Ribatti D., Nico B., Crivellato E. The development of the vascular system: a historical overview // *Methods Mol Biol*. – 2015. – № 1214. – P. 1-14.

296. Roberts S.C., Gosling L.M., Spector T.D., Miller P., et al. Body odor similarity in noncohabiting twins // *Chemical senses*. – 2005, Oct 1. – № 30(8). – P. 651-656.
297. Robroeks C.M., van Berkel J.J.B.N., Dallinga J.W., Jobsis Q., et al. Metabolomics of volatile organic compounds in cystic fibrosis patients and controls // *Pediatr. Res.* – 2010. – № 68. – P. 75-80.
298. Roitt I.M., Delves P.J. *Roitt's Essential Immunology*, 10th edn. – Oxford: Blackwell Science, 2001.
299. Rozhok A.I., DeGregori J. The evolution of lifespan and age-dependent cancer risk // *Trends Cancer*. – 2016. – V. 2. – № 10. – P. 552-560.
300. Ruscetti M., Leibold J., Bott M.J., Fennell M., Kulick A., et al. NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination // *Science*. – 2018, Dec 21. – № 362(6421). – P. 1416-1422.
301. Ryan B.C., Vandenberg J.G. Intrauterine position effects // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2002, Oct. – № 26(6). – P. 665-678.
302. Sabeh F., Shimizu-Hirota R., Weiss S.J. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited // *J Cell Biol.* – 2009, Apr 6. – № 185(1). – P. 11-19.
303. Savelev S.U., Perry J.D., Bourke S.J., Jary H., et al. Volatile biomarkers of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and noncystic fibrosis bronchiectasis // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2011. – № 52. – P. 610-613.
304. Schaal B., Coureaud G., Langlois D., Ginies C., et al. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone // *Nature*. – 2003. – V. 424. – P. 68–72.
305. Schaefer M.L., Yamazaki K., Osada K., Restrepo D., Beauchamp G.K. Olfactory fingerprints for major histocompatibility complex-determined body odors II: relationship among odor maps, genetics, odor composition, and behavior // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22. – P. 9513–9521.
306. Schallschmidt K., Becker R., Jung C., Bremser W., et al. Comparison of volatile organic compounds from lung cancer patients and healthy controls-

- challenges and limitations of an observational study // *J Breath Res.* – 2016, Oct 12. – № 10(4). – P. 046007.
307. Schellinck H.M., Rooney E., Brown R.E. Odors of individuality of germfree mice are not discriminated by rats in a habituation-dishabituation procedure // *Physiology & behavior.* – 1995, May 1. – № 57(5). – P. 1005-1008.
308. Schellinck H.M., Slotnick B.M., Brown R.E. Odors of individuality originating from the major histocompatibility complex are masked by diet cues in the urine of rats // *Anim. Learn. Behav.* – 1997. – № 25. – P. 193-199.
309. Schellinck H.M., West A.M., Brown R.E. Rats can discriminate between the urine odors of genetically identical mice maintained on different diets // *Physiol Behav.* – 1992. – V. 51. – № 5. – P.1079-1082.
310. Schoon A., Haak R. *K9 Suspect Discrimination: Training and Practicing Scent Identification Line-Ups.* →Calgary; Alberta; Canada: Detselig Enterprises. 2002.
311. Scott-Thomas A., Syhre M., Pattemore P.K., Epton M.J, et al. 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung // *BMC Pulm. Med.* – 2010. – № 10. – P. 56.
312. Seaman S. Management of malignant fungating wounds in advanced cancer // *Semin Oncol Nurs.* – 2006, Aug. – № 22(3). – P. 185-193.
313. Sethi S., Nanda R., Chakraborty T. Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases // *Clin Microbiol Rev.* – 2013, Jul. – № 26(3). M P. 462-475.
314. Shirasu M., Nagai S., Hayashi R., Ochiai A., Touhara K. Dimethyl trisulfide as a characteristic odor associated with fungating cancer wounds // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2009, Sep. – № 73(9). – P. 2117-2120.
315. Shirasu M., Touhara K. The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder // *J Biochem.* – 2011, Sep. – № 150(3). – P. 257-266.
316. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – № 68. – P. 7-30.

317. Singer A.G., Beauchamp G.K., Yamazaki K. Volatile signals of the major histocompatibility complex in male mouse // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997, Mar 18. – № 94(6). – P. 2210-2214.
318. Singh D., Bronstad P.M. Female body odour is a potential cue to ovulation // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 268.1469. – 2001. – P. 797-801.
319. Siniscalchi M. Olfaction and the Canine Brain. In: *Canine olfaction science and law: advances in forensic science, medicine, conservation, and environmental remediation* // Taylor and Francis. – 2016. – P. 31-38.
320. Siveen K.S., Prabhu K., Krishnankutty R., Kuttikrishnan S., et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2017. – № 15(4). – P. 339-351.
321. Smeets M.A., Rosing E.A., Jacobs D.M., van Velzen E., et al. Chemical fingerprints of emotional body odor // *Metabolites.* – 2020, Mar. – № 10(3). – P. 84.
322. Smith K., Sines J.O. Demonstration of a peculiar odor in the sweat of schizophrenic patients // *AMA Arch Gen Psychiatry.* – 1960, Feb. – № 2. – P. 184-188.
323. Smith K., Thompson G.F., Koster H.D. Sweat in schizophrenic patients: identification of the odorous substance // *Science.* – 1969, Oct 17. – № 166(3903). – P. 398-399.
324. Sonoda H., Kohnoe S., Yamazato T., et al. Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection // *Gut.* ➔ 2011. ➔ V. 60. ➔ P. 814-819.
325. Soproni K., Miklósi A., Topál J., Csányi V. Comprehension of human communicative signs in pet dogs (*Canis familiaris*) // *J Comp Psychol.* – 2001, Jun. – № 115(2). – P. 122-126.

326. Sorokowska A., Sorokowski P., Szmajke A. Does personality smell? Accuracy of personality assessments based on body odour // *Eur. J. Pers.* – 2012. – № 26. – P. 496-503.
327. Spehr M., Kelliher K.R., Li X.H., Boehm T., et al. Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands // *J Neurosci.* – 2006. – № 26. – P. 1961-1970.
328. Steppert C., Steppert I., Sterlacci W., Bollinger T. Rapid detection of SARS-CoV-2 infection by multicapillary column coupled ion mobility spectrometry (MCC-IMS) of breath. A proof of concept study // *J Breath Res.* – 2021. – № 15. – P. 027105.
329. Stewart C.A. et al. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping // *Genome Res.* – 2004. – № 14. – P. 1176–87.
330. Stitt W.Z., Goldsmith A. Scratch and sniff. The dynamic duo // *Arch. Dermatol.* – 1995, Sep. – № 131(9). – P. 997-999.
331. Sun Z., Jiang Q., Li J., Guo J. The potent roles of salt-inducible kinases (SIKs) in metabolic homeostasis and tumorigenesis. Signal transduction and targeted therapy. – 2020, Aug 12. – № 5(1). – P. 1-5.
332. Syhre M., Chambers S.T. The scent of *Mycobacterium tuberculosis* // *Tuberculosis (Edinb.)* – 2008. – № 88. – P. 317–323.
333. Syhre M., Scotter J.M., Chambers S.T. Investigation into the production of 2-pentylfuran by *Aspergillus fumigatus* and other diagnostics: progress toward a breath test for invasive *Aspergillus fumigates* // *Med. Mycol.* – 2008. – № 6. – P. 209-215.
334. Thomas L. Symbiosis as an immunologic problem // In: Neter E., Milgrom F., editors. *The immune system and infectious disease. 4th International Convocation on Immunology.* – Buffalo, New York: S. Karger, 1975. – P. 2–11.
335. Tisch U., Haick H. Nanomaterials for cross-reactive sensor arrays // *MRS Bull.* ➤ 2010. ➤ V. 35. ➤ P. 797.

336. Tizard I., Skow L.. The olfactory system: The remote-sensing arm of the immune system // *Animal Health Research Reviews*. – 2021. – № 22(1). – P. 14-25.
337. Trinchet J.C., Alperovitch A., Bedossa P., Degos F., et al. Epidémiologie, prévention, dépistage et diagnostic du carcinome hépatocellulaire [Epidemiology, prevention, screening and diagnosis of hepatocellular carcinoma] // *Bull Cancer*. – 2009, Jan. – № 96(1). – P. 35-43.
338. Trivedi D.K., Sinclair E., Xu Y., Sarkar D., et al. Discovery of volatile biomarkers of Parkinson's disease from sebum // *ACS Central Science*. – 2019. – № 5. – P. 599-606.
339. Umeda S., Kanda M., Kodera Y. Emerging evidence of molecular biomarkers in hepatocellular carcinoma // *Histol Histopathol*. – 2018, Apr. – № 33(4). – P. 343-355.
340. Vajdic C.M., van Leeuwen M.T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation // *Int. J. Cancer*. – 2009. – № 125. – P. 1747-1754.
341. Van den Velde S., Nevens F., Van Hee P., van Steenberghe D., Quirynen M. GC-MS analysis of breath odor compounds in liver patients. *J. Chromatogr. B // Anal. Technol. Biomed. Life Sci*. – 2008. – № 875. – P. 344-348.
342. Vargason T., Howsmon D.P., McGuinness D.L., Hahn J. On the Use of Multivariate Methods for Analysis of Data from Biological Networks // *Processes (Basel)*. – 2017. – № 5(3). – P. 36.
343. Villanueva-Paz M., Cordero M.D., Pavón A.D., Vega B.C., et al. Amitriptyline induces mitophagy that precedes apoptosis in human HepG2 cells // *Genes Cancer*. – 2016, Jul. – № 7(7-8). – P. 260-277.
344. Walczak M., Jezierskie T., Górecka-Bruzda A., et al. Impact of individual training parameters and manner of taking breath odor samples on the reliability of canines as cancer screeners // *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*. – 2012. – V. 7. – P. 283-294.
345. Warburg O. On the origin of cancer cells // *Science*. – 1956, Feb 24. – № 123(3191). – P. 309-314.

346. Wedekind C., Furi S. Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity? // *Proc Biol Sci.* – 1997. – № 264. – P. 1471-1479.
347. Welte T., Kim I.S., Tian L., Gao X., et al. Oncogenic mTOR signalling recruits myeloid-derived suppressor cells to promote tumour initiation // *Nat Cell Biol.* – 2016. – № 18. – P. 632-644.
348. White C.L., Fakharzadeh S., Eades J., Preti G., et al. Human breath odors and their use in diagnosis // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007. – № 1098. – P. 252-266.
349. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer // *Nat Rev Cancer.* – 2012. – № 12. – P. 401-410.
350. White E., DiPaola R.S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer // *Clin Cancer Res.* – 2009, Sep 1. – № 15(17). – P. 5308-5316.
351. White E., Karp C., Strohecker A.M., Guo Y., et al. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2010. – № 22. – P. 212-217.
352. Whittle C.L., Fakharzadeh S., Eades J., Preti G. Human breath odors and their use in diagnosis // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007, Mar. – № 1098. – P. 252-266.
353. Who R., Blueprint D. COVID-19 Consultation on the use of trained dogs for screening COVID-19 cases // WHO. – 8 March 2021.
354. Wilbur M.A., Shih I.M., Segars J.H., Fader AN. Cancer implications for patients with endometriosis // *Semin Reprod Med.* – 2017. – № 35. – P. 110-116.
355. Williams H., Pembroke A. Sniffer dogs in the melanoma clinic? // *Lancet.* – 1989, Apr 1. – № 1(8640). – P. 734.
356. Williams M., Johnston J.M. Training and maintaining the performance of dogs (*Canis familiaris*) on an increasing number of odor discriminations in a controlled setting // *Applied Animal Behaviour Science.* – 2002. – V. 78. – P. 55-65.
357. Willse A., Kwak J., Yamazaki K., Preti G., et al. Individual odortypes: interaction of MHC and background genes // *Immunogenetics.* – 2006, Dec. – № 58(12). – P. 967-982.

358. Witsch E., Sela M., Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression // *Physiology*. – 2010. – № 25. – P. 85-101.
359. Xue R., Dong L., Zhang S., et al. Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry // *Rapid Commun Mass Spectrom*. – 2008. – V. 22. – P. 1181-1186.
360. Yachida S., Jones S., Bozic I., Antal T., et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer // *Nature*. – 2010, Oct 28. – № 467(7319). – P. 1114-1117.
361. Yamaguchi M., Yamazaki K., Beauchamp G.K., Bard J., et al. Distinctive urinary odors governed by the major histocompatibility complex locus of the mouse // *Proc Natl Acad Sci*. – 1981. – № 78. – P. 5817-5820.
362. Yamazaki K., Beauchamp G.K. Genetic basis for MHC-dependent mate choice // *Adv Genet*. – 2007. – № 59. – P. 129-145.
363. Yamazaki K., Beauchamp G.K., Imai Y., Bard J., et al. Expression of urinary H-2 odortypes by infant mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1992, Apr 1. – № 89(7). – P. 2756-2758.
364. Yamazaki K., Beauchamp G.K., Imai Y., Bard J., et al. Odor types determined by the major histocompatibility complex in germfree mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1990, Nov. – № 87(21). – P. 8413-8416.
365. Yamazaki K., Beauchamp G.K., Singer A. Origin, functions and chemistry of H-2 regulated odorants // *Geneticavolume104*. – 1998. – P. 235-240.
366. Yamazaki K., Beauchamp G.K. Genetic basis for MHC-dependent mate choice // *Adv Genet*. – 2007. – V. 59. – P. 129-145.
367. Yamazaki K., Beauchamp G.K., Shen F.W., Bard J., et al. A distinctive change in odortype determined by H-2D/L mutation // *Immunogenetics*. – 1991. – № 34(2). – P. 129-131.
368. Yamazaki K., Beauchamp G.K., Singer A., Bard J., et al. Odortypes: their origin and composition // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999, Feb 16. – № 96(4). – P. 1522-1525.

369. Yamazaki K., Boyse E.A., Bard J., Curran M., et al. Presence of mouse mammary tumor virus specifically alters the body odor of mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – № 8. – P. 5612-5615.
370. Yamazaki K., et al. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex // *J. Exp. Med.* – 1976. – № 144. – P. 1324-1335.
371. Yamazaki K.M., Yamaguchi M., Baranoski L., Bard J., et al. Recognition among mice. Evidence from the use of a Y-maze differentially scented by congenic mice of different major histocompatibility types // *The Journal of experimental medicine.* – 1979, Oct 1. – № 150(4). – P. 755-760.
372. Yang Y., Sun M., Wang L., Jiao B. HIFs, angiogenesis, and cancer // *J Cell Biochem.* – 2013. – № 114. – P. 967-974.
373. Zhang J., Tran Q., Lattard V., Cashman J.R. Deleterious mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene causing trimethylaminuria // *Pharmacogenetics.* – 2003, Aug. – № 13(8). – P. 495-500.
374. Zhengwei, Y., Schank, J.C. Women do not synchronize their menstrual cycles // *Hum. Nat.* – 2006. – № 17. – P. 433-447.
375. Zhou W., Chen D. Fear-related chemosignals modulate recognition of fear in ambiguous facial expressions // *Psychol. Sci.* – 2009. – № 20. – P. 177-183.
376. Ziolkiewicz A. Menstrual synchrony: Fact or artifact? // *Hum. Nat.* – 2006. – № 17. – P. 419-432.
377. Zlotta A.R., Nam R.K. To biopsy or not to biopsy – thou shall think twice // *European urology.* – 2012, Jun 1. – № 61(6). – P. 1115-1117.
378. Zomer S., Dixon S.J., Xu Y., Jensen S.P., et al. Consensus multivariate methods in gas chromatography mass spectrometry and denaturing gradient gel electrophoresis: MHC-congenic and other strains of mice can be classified according to the profiles of volatiles and microflora in their scent-marks // *Analyst.* – 2009, Jan. – № 134(1). – P. 114-123.