

Исследование одорологического профиля мочи мышей, больных гепатокарциномой

М.Ю. Кочевалина

Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН

kochevalina@iitp.ru

Е.И. Родионова

Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН

rad@iitp.ru

А. Амбарян

Институт проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова РАН

aambaryan@gmail.com

А.С. Бородков

Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН

abors@mail.ru

О.В. Морозова

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ГУ РОНЦ им.

Н.Н.Блохина РАМН

canceragent@gmail.com

Аннотация

Одновременное применение животных-макросматиков таких, как собаки, мыши, крысы, в качестве «биосенсеров» и использование новых инструментальных методов анализа, при помощи которых возможно проанализировать множество соединений, принципиально отличающихся по химическим и физическим свойствам, позволяет выйти за рамки простого сравнения комплекса летучих органических соединений (ЛОС), выделяемых больными и здоровыми организмами. Способности животных-макросматиков способствуют выделению значимых для сравнения комплексов ЛОС при сравнении одорологических профилей запаховых смесей.

1. Введение

Онкологические заболевания в большинстве случаев диагностируются на поздних стадиях, когда плохо поддаются лечению. Путем ранней диагностики неблагоприятные последствия онкологических заболеваний могут быть предупреждены или отсрочены. В настоящее время, работы в этом направлении интенсивно развиваются в различных научных группах [1, 4, 10]. Часто целью исследований является поиск биомаркеров, но эффективность точной диагностики заболевания по известным биомаркерам пока недостаточна из-за их низкой специфичности. Относительно новое и активно развивающееся направление диагностики - анализ присутствующих в выделениях исследуемого организма летучих органических соединений (ЛОС), связанных с различными заболеваниями, в частности, с онкологическими [2, 9, 10]. Разработка высокочувствительных анализаторов

ЛОС ведется уже в течение почти трех десятилетий, но не дала значительных для медицины результатов. Прямой анализ ЛОС в выделениях больного организма по сравнению со здоровым, не приводит к выделению надежных летучих биомаркеров онкологических заболеваний предположительно из-за того, что на состав ЛОС, выделяемых животными, в том числе и человеком, влияют многие факторы, например, диета, пол, возраст, гормональный фон, социальный статус, генотип и др.

В ряде публикаций было показано, что животные отличаются здоровых людей от больных с онкологическими заболеваниями кожи, предстательной железы, легких, мочевого пузыря, молочной железы и яичников [4, 8, 9]. Это значит, что «живой нос» может выделить именно те ЛОС, которые маркируют заболевания. В данной работе, для более эффективного поиска летучих биомаркеров, в качестве испытуемых (пациентов) использовали мышей. На мышах можно не только контролировать переменные, но и экспериментально влиять на паттерн выделяемых ЛОС и анализировать их масс-спектрометрически, что в дальнейшем может существенно приблизить к пониманию принципов «кодирования» запаха заболевания.

2. Материалы и методы

2.1. Экспериментальной моделью служили гибридные мыши BDF1-f1 (DBA2 x C57Bl/6). Мышам подкожно перевивали клетки низкодифференцированной гепатокарциномы H33. Гомогенизированную опухолевую ткань (1 мл) вводили подкожно. Образцы мочи собирали у мышей от 1 до 14 дня после перевивки опухолевых клеток. В качестве контроля использовали образцы мочи здоровых гибридных

мышей BDF того же пола и возраста, содержащихся в тех же условиях на том же самом рационе. Контрольной группе мышей в тот же день, когда опытным мышам перевивали опухолевую ткань, вводили 1 мл физраствора. Всего было использовано 79 больных и 91 здоровая мышь. После отбора образцы мочи замораживали при -23°C и размораживали либо непосредственно перед проведением эксперимента, либо за 24 часа до проведения эксперимента.

2.2. Животные биосенсоры

2.2.1. *Эксперименты с собаками.* Детекторами запахов были 4 собаки (2 самца и 2 самки) в возрасте от пяти до десяти лет обученные "выбору по подобию", метода, применяемого в криминалистике и научных исследованиях [11]. Собаку знакомили с запахом образца мочи больной мыши, помещенного в стандартную стеклянную банку, в течение одной минуты. Затем собака выбирала из предложенных 11 образцов, расположенных по кругу и включающих в себя 1 образец мочи другой больной мыши и 10 образцов мочи мышей контрольной группы. Часть экспериментов, представленных ниже, мы проводили, используя образцы мочи как контрольных, так и больных мышей, размороженные непосредственно перед экспериментом, а часть – за 24 часа. Мы провели три серии предъявлений для определения образцов мочи от больной мыши на 1, 3 и 9 сутки после перевивки опухолевой ткани. Дополнительно была проведена серия предъявлений, в которых один из образцов мочи в контрольной группе, был собран от той же мыши, чья моча представлена на старте, но до введения ей опухолевой ткани. Т.е. мы хотели проверить, не будут ли собаки ориентироваться при выборе образца на индивидуальный запах мыши. С собаками работали профессиональные инструкторы. В экспериментальном помещении поддерживалась температура $18-21^{\circ}\text{C}$ и влажность не менее 35%. 50 мкл мочи мыши наносили на ткань и помещали в стеклянные банки. При нахождении искомой пробы собаки садились и подавали голос. Инструктор, ведущий собаку, не знал, в какой банке лежит искомый образец. Каждый эксперимент был зафиксирован в бумажном протоколе и на видео. Для решения каждой из поставленных задач проводили не менее 12 предъявлений. Результаты представлены в виде двух общепринятых показателей, чувствительность и специфичность. Чувствительность метода рассчитывали, как отношение корректно определенных образцов мочи от больных мышей к общему количеству образцов мочи от больных мышей. Специфичность - это показатель, который отражает отношение контрольных образцов, неверно выбранных собаками, к общему количеству контрольных образцов.

2.2.2. *Эксперименты с мышами.* В экспериментах использовано 48 половозрелых самцов в возрасте 3-6 мес. Применялась модификация методика «привыкания» - habituation-dishabituation [13]. В каждом опыте самцу предъявляли запахи одного и того же донора мочи. Каждый опыт включал четыре трехминутных последовательных предъявления запахов. При первом, втором и четвертом предъявлении зверьку давали обнюхать образец мочи одного и того же здорового самца-донора. Во время третьего – образец мочи того же самца - донора, но через 24 часа после перевивки опухолевой ткани или физиологического раствора. В случае определения реакции мышисенсора на образец мочи после перевивки опухолевой ткани, контрольные образцы были собраны на 4 сутки после введения мышидонору физиологического раствора. При определении реакции мышисенсора на образец после мочи после введения физиологического раствора, контрольные образцы были собраны у интактного донора. Обычно во время второго предъявления исследовательская активность зверька по отношению к запаху образца мочи резко падает, то есть время его исследования резко уменьшается по сравнению с первым предъявлением. Считается, что если в дальнейшем при предъявлении запаха исследовательская реакция (то есть время обнюхивания) возрастает по сравнению с предыдущим разом, то животное различает эти запахи и они не являются для него идентичными. 10-15 мкл мочи с помощью автоматической пипетки наносили внутрь стандартного пластикового наконечника Эппендорф, который предварительно обрезали со стороны заостренного конца на 3 мм. Наконечник с мочой на $\frac{1}{2}$ его длины вставляли в отверстия между прутьями крышки, где содержался самец-реципиент. С помощью секундомера фиксировали время исследования мышью каждого запаха с точностью до 0,1 с. Обработку результатов проводили при помощи критерия Вилкоксона для зависимых переменных.

2.3. Химический анализ

2.3.1. *Поверхностно активированная лазерная десорбция-ионизация (SALDI).* В качестве масс-анализатора использовался времяпролетный масс-спектрометр, собранный по линейной схеме. В качестве источника лазерного излучения применяли Nd:YAG лазер с диодной накачкой (третья гармоника, длина волны 355 нм), работающий с частотой повторения 300 Гц. Плотность энергии лазерного излучения регулировали в диапазоне 5-40 мДж/см² с помощью аттенуатора. Для увеличения облучаемой площади применяли двузеркальное электромеханическое устройство сканирования поверхности лазерным лучом. Исследование проводили в режиме регистрации отрицательных

ионов. Этим методом мы проводили сравнение образцов мочи, собранных от одной и той же мыши со 2 по 9 сутки после введения клеток опу- холи.

2.3.2. Ионизация электрораспылением (ESI). Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием хромато-масс-спектрометра вы- сокого разрешения Exactive фирмы Thermo Finnigan. Масс-спектрометрический анализ вы- полнен в условиях электрораспылительной иони- зации при регистрации положительных ионов. Внешняя калибровка шкалы масс осуществлялась с использованием смеси пептидов Glu1- Fibrinopeptide B, Neurotensin, Angiotensin I, des- Arg1-Bradykinin. Этим методом мы проводили сравнение образцов мочи, собранных от одной мыши, до и после введения клеток опухолевой ткани.

2.4. Гистологическое исследование.

Гистологическое микроскопическое исследование реакции на подкожное введения опухолевой ткани Н33 было проведено для выявления динамики развития заболевания. Исследовано 27 случаев подкожного введения ткани мышинного штамма ГЦР Н33 3-х месячным самцам BDF. Материал забирался в с 1-х по 9-е сутки после введения от 3-х мышей в каждый срок. Образцы фиксировали в буферном 10% формалине, далее обезвоживали в спиртах и заливали в парафин (гистопласт). Приготавливали срезы 5-7 мк и окрашивали гематоксилином и эозином.

3. Результаты

3.1. Животные биосенсеры.

3.1.1. Эксперименты с собаками. Собаки выделяют образец мочи больной мыши на 1, 3, 9 сутки после инъекции опухолевых клеток с чувствительностью 69,6%, 80,0% и 66,7%. Специфичность определения образцов мочи больной мыши на 1, 3, 9 сутки после инъекции опухолевых клеток составила соответственно 95,2%, 97,3% и 94,7%.

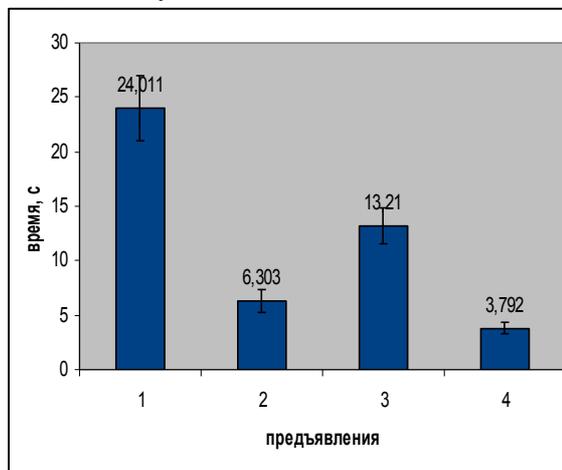
При поиске образца больной мыши, образец индивидуального запаха, присутствующий среди контрольных, выделили 3 из 4 собак, но только при первом его предъявлении. Затем все собаки верно определяли образец мочи больной мыши в ряду и не реагировали на образец с индивидуальным запахом.

При сравнении результатов мы не выявили никакой разницы в определении собаками образцов мочи от больных мышей при изменении времени выдерживания размороженных образцов перед экспериментом.

3.1.2. Эксперименты с мышами. Мыши-сенсоры достоверно отличали не только запах больной мыши от ее же запаха после введения

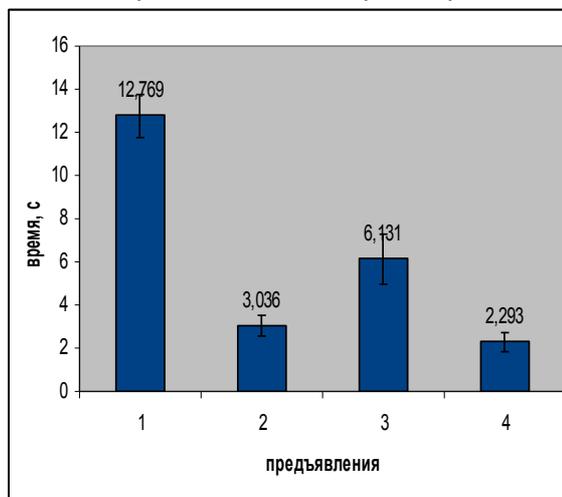
физиологического раствора, но и запах мыши, которой ввели физиологический раствор, от ее же запаха до нанесения каких-либо повреждений. Результаты представлены на диаграммах 1 и 2.

Диаграмма 1. Реакция мыши-сенсора на образец мочи мыши-донора, 1 сутки после введения опухолевой ткани



1, 2 и 4 предъявления – контрольные образцы мочи мыши-донора. 3 предъявление – исследуемый образец мочи мыши-донора

Диаграмма 2. Реакция мыши-сенсора на образец мочи мыши-донора, 1 сутки после введения физиологического раствора

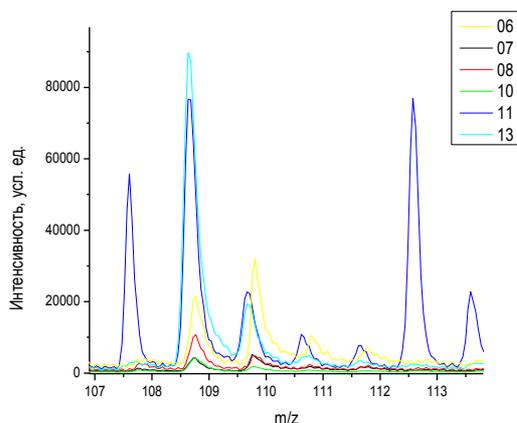


1, 2 и 4 предъявления – контрольные образцы мочи мыши-донора. 3 предъявление – исследуемый образец мочи мыши-донора

3.2. Химический анализ.

Поверхностно активированная лазерная десорб- ция-ионизация. Мы проводили сравнение образ- цов мочи, собранных от одной и той же мыши со 2 по 9 сутки после перевивки опухолевой ткани. Данные представлены на рисунке 1. Метод позво- ляет получить масс-спектр от 20 до 500 m/z, но на наш взгляд наиболее значимые различия в масс- спектрах можно наблюдать на малых массах к концу цикла (рисунок 1).

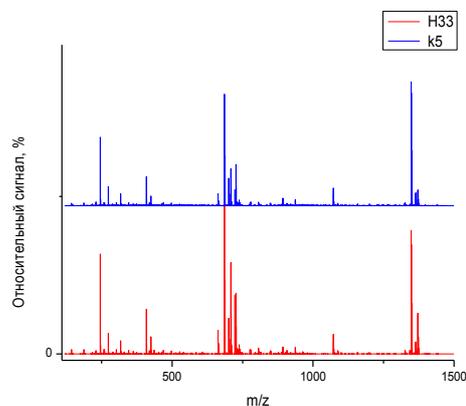
Рисунок 1 Динамика изменения масс-спектров мочи одной и той же мыши по мере развития опухоли. Участок масс-спектра 107 – 113 m/z



Нумерация кривых (06 – 13) соответствует суткам сбора образцов мочи после перевивки опухолевой ткани: 06 – образец мочи, собранный на вторые сутки после перевивки опухолевой ткани, а 13 - образец мочи, собранный, соответственно, на девятые сутки после перевивки опухолевой ткани.

Ионизация методом электрораспыления (ESI). На рисунке 2 приведены масс-спектры мочи, собранной от одной и той же мыши до перевивки опухолевой ткани и на 4 сутки после нее.

Рисунок 2 Сравнение масс-спектров мочи одной и той же мыши до и после перевивки опухолевой ткани



На рисунке 2 сверху, синим цветом изображен масс-спектр мочи интактной мыши, снизу красным цветом масс-спектр мочи той же мыши, но на 4 сутки после введения опухолевой ткани.

3.3. Гистологическое исследование.

На 1 сутки после введения опухолевой ткани наблюдается кровоизлияние на месте травмы, опухолевая ткань представлена небольшими группами клеток.

На 2 сутки наблюдаются признаки кровоизлияния, а также живые и погибшие опухолевые клетки, местами опухолевая ткань прорастает в межклеточное пространство

жировой ткани.

На 3 сутки присутствуют признаки кровоизлияния. Группы опухолевых клеток присутствуют в месте введения в жировой и соединительной ткани. В опухоли имеется небольшое количество митозов, в том числе патологических.

На 9 сутки опухолевый узел с многочисленными митозами, в т.ч. патологическими, и центральным некрозом, окружен соединительнотканной капсулой. Наблюдаются множественные митозы, инвазия в капсулу, в волосяные фолликулы, в мышцы и в жировую ткань.

В представленных образцах наблюдается временное изменение кровотока (кровоизлияния) вследствие травмы иглой для трансплантации с первых по девятые сутки после введения ткани.

4. Обсуждение.

Установлено, что выдерживание размороженной пробы мочи мыши при комнатной температуре в течение 24 часов не влияет на анализ запахов проб собаками. Изменения в составе и соотношении ЛОС сразу после размораживания пробы и в течение 24 часов после нее, даже если они есть, позволяют животному правильно определять образец мочи больной мыши.

Чувствительность определения проб больных животных собаками значительно меняется в зависимости от времени, прошедшего с момента перевивки мышам-донорам опухолевой ткани. Специфичность метода изменяется не существенно, то есть собакам может быть трудно выбрать искомую пробу, но они очень редко выбирают вместо нее мочу здорового животного.

Самый высокий результат мы получили на образцах от третьих суток после перевивки – собаки успешно определили 80% проб больных животных. На первые сутки чувствительность ниже, и на 9 сутки она опять снижается. Этот результат, с нашей точки зрения, коррелирует с результатами гистологического анализа. На первые сутки присутствует в небольшом количестве перевитая (чужеродная) опухолевая ткань, многие клетки гибнут, заболевание еще не начало развиваться. На третьи сутки начинаются патологические митозы опухолевых клеток и прорастание опухолевой в окружающие здоровые ткани, и больные животные начинают предположительно выделять четкий паттерн ЛОС, связанный с заболеванием. На 9 сутки в опухоли развиваются дополнительные процессы – некроз, воспаление и другие, что, возможно, мешает собакам четко выделять больное животное.

Собаки не обращали внимание на индивидуальный запах животных в исследуемых образцах. Это значит, что они действительно выделяют запах болезни. Тем не менее, мы провели дополнительные опыты с другими

животными- сенсорами – мышами. Они достоверно отличали образцы запаха мочи мыши с введенным подкожно физраствором от образца мочи той же мыши с перевитой опухолевой тканью. Поскольку перевивка ткани сопровождается повреждением кожи, подкожных тканей и воспалением, следы которого сохраняются даже на 9 сутки после введения ткани, мы исследовали, отличают ли мыши интактную мышь от нее же, но после инъекции физраствора, и убедились, что отличают. Это значит, что мыши, так же как и собаки, отличают изменения в запахе мочи, возникающие у животного при введении опухолевой ткани, как от запаха мочи интактного животного, так и от мочи животного с повреждениями кожи, подкожных тканей, воспалением.

Сравнение полученных масс-спектров образцов, позволяет сделать предположение о связи ряда пиков с инъекцией клеток опухоли. Увеличивается содержание отдельных веществ после перевивки опухолевой ткани (рисунок 2). На 9 и более сутки после перевивки опухолевой ткани резко увеличивается высота пиков (рисунок 1), что с одной стороны коррелирует с гистологическим исследованием, а с другой может объяснять снижение чувствительности и специфичности обнаружения образцов собаками до минимального уровня, 66,7% и 94,7%, соответственно. Полагаем, что в дальнейшем использование нескольких методов ионизации позволит значительно повысить вероятность обнаружения биомаркеров заболевания. Представленный подход с применением мышинной модели развития опухоли позволит дифференцировать запахи при поиске биомаркеров онкологических заболеваний. Можно заключить, что использование животных-макросматиков для сравнения ЛОС в сочетании с современными высокочувствительными инструментальными методами – перспективный метод исследований.

5. Литература

1. E. Boedeker, G. Friedel and T. Walles, *Sniffer dogs as part of a bimodal bionic research approach to develop a lung cancer screening*, Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, 2012, pp. 511–515

2. G Horváth, Z. Lázár, N. Gyulai, M. Kollai, G. Losonczy. *Exhaled biomarkers in lung cancer*, Eur Respir J., 2009, pp. 261–75
3. Y. Hanai, K. Shimono, K. Matsumura, A. Vachani, S. Albelda, K. Yamazaki, G.K. Beauchamp, H. Oka. *Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer*, Biosci Biotechnol Biochem. 2012; pp. 679-84
4. Y. Hanai, K. Shimono, H. Oka, Y. Baba, K. Yamazaki and G. K. Beauchamp, *Analisis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice*, Cancer cell international, 2012, pp. 1-13
5. G. Horvath, G. Järverud, S. Järverud, I. Horváth, *Human ovarian carcinomas detected by specific odor*, Integrative Cancer Therapies, 2008, pp. 76-80
6. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, *Global cancer statistics*, CA Cancer J Clin, 2011, pp. 69-90
7. R. Koczulla, A. Hattesoehl, H. Biller, J. Hofbauer, J. Hohlfeld, C. Oeser, *Comparison of four identical electronic noses and three measurement set-ups*, Pneumologie, 2011, pp. 465–70
8. M. Kuano, E.Mendez, K.G. Furton, *Development of headspace SPME method or analisis of volatile organic compounds present in human biological specimens*, Anal Bioanal Chem, 2011, pp. 1817-1826
9. K. Matsumura, M. Opiekun, H. Oka, A. Vachani, S.M. Albelda, K. Yamazaki, G.K. Beauchamp. *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, p. 8819
10. G. Peng, M. Hakim, Y.Y. Broza, S. Billan, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten., *Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors*, Br J Cancer, 2010, pp. 542–551
11. Ю. Корневский, *Экспертиза запаховых следов в следственной и судебной практике*, Российская юстиция, 2000, №8
12. A Review of Human Carcinogens. F. *Chemical agents and related occupations*, IARC Monographs, 20012, Volume 100 (F)
13. D.C Wood, *Habituation in Stentor produced by mechanoreceptor channel modification*, Journal of Neuroscience, 1988, pp 2254–2258
14. Young Ah Goo, David R. Goodlett, *Advances in proteomic prostate cancer biomarker discovery*, Journal of proteomics, 2010, pp. 1839-1850