

КОГНИТИВНАЯ НАУКА В МОСКВЕ 2015

**КОГНИТИВНАЯ НАУКА
В МОСКВЕ: НОВЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ**

**МАТЕРИАЛЫ
КОНФЕРЕНЦИИ**



2015

Под ред. Е.В. Печенковой, М.В. Фаликман

ISBN 978-5-4465-0705-4



9 785446 507054 >

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОГНИТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СОБАК ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ ЛЕТУЧИХ МАРКЕРОВ ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ ИЗ СЛОЖНОЙ СМЕСИ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЯЕМОЙ БОЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ

Родионова Е.И. (1) *, Кочевалина М.Ю. (1), Морозова О.В. (2), Когунь Г.А. (3)

a.rodionova@gmail.com

1 — Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН; 2 — Научно-исследовательский институт канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; 3 — Кинологический отдел ДУАБ ОАО «Аэрофлот — Российские авиалинии»

Аннотация. Биомаркерами онкологических заболеваний, присутствующими в моче, могут быть летучие органические соединения. Когнитивные возможности и обоняние собак открывают широкие перспективы для идентификации летучих биомаркеров. Мы использовали мышинные модели онкологических заболеваний, чтобы исследовать способности собак к обнаружению гепатокарциномы (подкожное введение ткани ГКЦ Н33). При работе с собаками мы применяли протокол поиска образца по заданному запаху. Точность идентификации собаками образцов от мышей с опухолью на 1, 3 и 9 сутки после введения была 69.6 %, 80.0 %, 66.7 %, а чувствительность — 95.2 %, 97.3 %, 94.7 % соответственно. Когнитивные возможности собак позволяют им не только обнаруживать биомаркеры гепатокарциномы в моче, но и отличать развитие опухоли от сопутствующего воспаления.

Ключевые слова: обоняние, когнитивные возможности собак, гепатокарцинома, летучие биомаркеры

Введение

Уже довольно давно известно, что развитие злокачественных опухолей различной природы изменяет состав летучих органических соединений (ЛОС), выделяемых пациентами (Horváth et al., 2009; Horváth et al., 2010; Nakim et al., 2010). Все более аккуратно проводимые эксперименты показывают, что вероятность существования ЛОС, маркирующих конкретные онкологические заболевания на ранних стадиях высока (Walczak et al., 2012). Современные достижения инструментальных аналитических методов позволяют быстро анализировать ЛОС, полученные из дыхания, крови, кожи и мочи пациентов, и с большой точностью определять их состав и соотношение веществ. Но какие именно из выделяемых веществ свидетельствуют о прогрессии опухоли, приборы сообщить не могут.

Поэтому надежных биомаркеров (в том числе и летучих) онкологических заболеваний пока выделить не удалось.

Тем не менее в настоящее время показано, что онкологические заболевания могут быть обнаружены по запаху собаками (Godon et al., 2008; Horváth et al., 2008), причем надежность животных в выявлении онкологических заболеваний по запаху выше, чем современных приборов (Gordon et al., 2008; Horváth et al., 2008; Horváth et al., 2010; McCulloch et al., 2006; Sonoda et al., 2011). Этот факт дает надежду на то, что биомаркеры конкретных онкологических заболеваний могут быть найдены среди ЛОС, выделяемых организмом.

С нашей точки зрения успех поиска ЛОС, маркирующих онкозаболевания, в значительной степени зависит от возможности сравнивать комплексы ЛОС и выделять из массива проб те, в которых содержатся одинаковые, связанные с определенным заболеванием или стадией его развития комплексы ЛОС. В настоящее время не существует инструментальных методов, позволяющих делать такие сравнения. Однако очевидно, что животные-макросматики без труда распознают друг друга по запаху и из индивидуального запаха получают огромное количество сведений об особи — ее поле, социальном и гормональном статусе, степени родства с другими особями, болезнях и т.д. То есть когнитивные возможности этих животных позволяют им проводить тонкий анализ сложной смеси обонятельных стимулов, выделяемой конкретным организмом, и выделять из нее разные комплексы ЛОС, которые свидетельствуют о вышеперечисленных и других особенностях этого организма. «Запах болезни», исходящий как от конспецификов, так и от особей другого вида, — жизненно важная информация для животных, и они реагируют на этот запах даже без дополнительного обучения (Arakawa et al., 2011). Высокая чувствительность обонятельной системы и поведенческие задачи, которые эти животные решают с помощью обоняния в природе, привели к развитию у этих животных механизмов тонкого анализа и сравнения смесей запахов, позволяющих выделять из них сложные комплексы, связанные с гормональным, иммунным статусом особи и т.д. (McCulloch et al., 2006; Schoon et al., 2002). Когнитивные возможности собак мы можем использовать для поиска комплексов ЛОС, связанных с развитием злокачественных опухолей. Мы не можем получить от животных информацию о составе запаховой смеси, но их можно обучить или поставить эксперимент таким образом, чтобы животное указывало, какие именно смеси из предложенных содержат паттерны ЛОС, связанные с прогрессией опухоли.

В настоящее время практически все работы с собаками проводятся на людях, а анализ ЛОС выделений больного человека связан с большими трудностями, так как на их состав влияют не только тип опухоли, пора-

женный орган, но и пол, возраст, эмоциональное состояние, различные привычки людей (курение, диета), принимаемые медикаменты и многие другие факторы (Penn, Potts, 1998; Qin et al., 2010). Значительная часть ЛОС определяется генотипом индивида (Navlicek, Roberts, 2012), а человеческая популяция очень гетерогенна, поэтому состав ЛОС у разных людей значительно отличается. В связи с этим неясно, реагируют ли собаки на развитие болезни или, например, на эмоциональное состояние больных людей или принимаемые медикаменты. Мышиные модели онкологических заболеваний позволяют снизить разнообразие анализируемых ЛОС, так как генетические и другие различия между линейными мышами несравненно меньше, чем различия между людьми. Очень перспективна модель перевиваемых опухолей. Она дает возможность единовременного старта прогрессии опухоли на разных индивидах, а также возможность контролировать ее развитие и анализировать связанные с ним изменения в спектре ЛОС и выделять те комплексы, которые непосредственно связаны с ростом опухоли.

Использование когнитивных возможностей собак в сочетании с контролируемой моделью развития опухоли у мышей позволит, как мы предполагаем, найти ответы на многие вопросы. Если «запах прогрессии опухоли» действительно существует, мы надеемся, что собаки помогут нам в получении более детальной информации о кодирующих его ЛОС.

Методы

Экспериментальной моделью служили гибридные мыши BDF1-f1 (DBA2 x C57Bl/6), которым подкожно перевивали клетки низкодифференцированной гепатокарциномы Н33. 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, которым в тот же день, когда опытным мышам перевивали опухолевую ткань, вводили 1 мл физраствора. С 1 по 14 сутки после перевивки опухолевых клеток или введения физраствора у мышей собирали образцы мочи. Всего было использовано 79 больных и 91 здоровая мышь. После отбора образцы мочи замораживали при -20°C и размораживали непосредственно перед проведением эксперимента.

Гистологическое исследование реакции на подкожное введение 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. Образцы подкожных тканей забирали с 1 по 9 сутки после введения от трех мышей в каждый срок. Образцы фиксировали в буферном 10 % формалине, далее обезжировали в спиртах и заливали в парафин (гистопласт). Приготавливали серии срезов 5–7 мк и окрашивали гематоксилином и эозином.

Детекторами запахов были 4 собаки, обученные «выбору по подобию» — методу, применяемому в криминалистике. Собаку знакомили с запахом образца мочи больной мыши, помещенного в стандартную стеклянную банку, в течение одной минуты. Затем собака выбирала из предложенных в таких же банках 11 образцов, включающих в себя 1 образец мочи другой больной мыши и 10 образцов мочи здоровых мышей контрольной группы. Мы провели три серии экспериментов, предъявляя образцы мочи от больной мыши на 1, 3 и 9 сутки после перевивки опухолевой ткани. С собаками работали профессиональные инструкторы. При нахождении искомой пробы собаки садились и подавали голос. Инструктор, ведущий собаку, не знал, в какой банке лежит искомый образец. Для решения каждой из поставленных задач проводили 12 предъявлений. Результаты представлены в виде двух общепринятых показателей, чувствительности и специфичности. Чувствительность мы рассчитывали как отношение правильно определенных образцов мочи больных мышей к общему количеству образцов мочи больных мышей. Специфичность — это отношение контрольных образцов, неверно выбранных собаками, к общему количеству контрольных образцов.

Результаты

На 1 сутки после введения опухолевой ткани на месте травмы наблюдается кровоизлияние, опухолевая ткань представлена небольшими группами живых и погибших опухолевых клеток. На 3 сутки в опухолевой ткани наблюдается небольшое количество митозов, в том числе патологических, местами опухолевая ткань прорастает в межклеточное пространство жировой ткани. На 9 сутки опухолевый узел с многочисленными митозами, в т.ч. патологическими, и центральным некрозом окружен соединительнотканной капсулой. Наблюдается инвазия опухолевых клеток в капсулу, волосяные фолликулы, мышцы и жировую ткань.

Собаки выделяют образец мочи больной мыши на 1, 3, 9 сутки после инъекции опухолевых клеток с чувствительностью 69.6 %, 80.0 % и 66.7 %. Как мы видим, чувствительность определения проб больных животных собаками значительно меняется в зависимости от времени, прошедшего с момента перевивки мышам-донорам опухолевой ткани. Самый высокий результат мы получили на образцах от третьих суток после перевивки — собаки успешно определили 80 % проб больных животных. Чувствительность определения проб, отобранных как на 1, так и на 9 сутки после перевивки опухолевой ткани, значительно ниже. Этот результат коррелирует с результатами гистологического анализа развития опухоли у мышей. На первые-вторые сутки перевитая опухолевая ткань присутствует в небольшом количестве, многие клетки гибнут, заболевание еще не начало развиваться. На третьи сутки начинаются па-

тологические митозы опухолевых клеток и прорастание опухолевой в окружающие здоровые ткани, и, вероятно, больные животные начинают выделять четкий паттерн ЛОС, связанный с заболеванием. На 9 сутки в опухоли развиваются многочисленные дополнительные процессы — некроз, воспаление и другие, что мешает собакам четко выделять больное животное. Надо отметить, что при этом специфичность определения образцов мочи больной мыши на 1, 3, 9 сутки после инъекции опухолевых клеток практически не меняется и составляет соответственно 95.2 %, 97.3 % и 94.7 %. Это говорит о том, что собакам может быть трудно выбрать искомую пробу, но они очень редко выбирают вместо нее мочу здорового животного.

Заключение

Собаки способны проводить тонкий анализ индивидуального запаха мыши и показывать, в каких пробах присутствуют комплексы ЛОС, сопутствующие болезни. Более того, по-видимому, животные способны отличать эти комплексы от ЛОС, сопутствующих воспалению, иммунной реакции и т.д. Такая способность выделения комплексов веществ, несущих информацию о прогрессии опухоли в сочетании с последующим химическим анализом ЛОС, выделяемых больными и здоровыми животными, поможет сделать поиск биологических онкомаркеров более направленным.

Литература

- Cornu J.-N., Cancel-Tassin Gé., Ondet V., Girardet C., Cussenot O.* Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: a step forward in early diagnosis // *European urology*. 2011. Vol. 59. No. 2. P. 197–201.
- Gordon R.T., Schatz C.B., Myers L.J., Kosty M., Gonczy C., Kroener J., Tran M., Kurtzhals P., Heath S., Koziol J.A., others.* The use of canines in the detection of human cancers // *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2008. Vol. 14. No. 1. P. 61–67.
- Havlicek J., Roberts S.C.* MHC-correlated mate choice in humans: a review // *Psychoneuroendocrinology*. 2009. Vol. 34. No. 4. P. 497–512.
- Horvath G., Andersson H, Paulsson G.* Characteristic odour in the blood reveals ovarian carcinoma // *BMC cancer*. 2010. Vol. 10. No. 1. P. 643.
- Horvath G., af Klinteberg Järverud G., Järverud S., Horváth I.* Human ovarian carcinomas detected by specific odor // *Integrative cancer therapies*. 2008. Vol. 7. No. 2. P. 76–80.
- Horvath I., Lazar Z., Gyulai N., Kollai M., Losonczy G.* Exhaled biomarkers in lung cancer // *European Respiratory Journal*. 2009. Vol. 34. No. 1. P. 261–275.

- McCulloch M., Jeziarski T., Broffman M., Hubbard A., Turner K., Janecki T.* Diagnostic accuracy of canine scent detection in early-and late-stage lung and breast cancers // *Integrative cancer therapies*. 2006. Vol. 5. No. 1. P. 30–39.
- Peng G., Hakim M., Broza Y.Y., Billan S., Abdah-Bortnyak R., Kuten A., Tisch U., Haick H.* Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors // *British journal of cancer*. 2010. Vol. 103. No. 4. P. 542–551.
- Penn D., Potts W.K.* Chemical signals and parasite-mediated sexual selection // *Trends in Ecology & Evolution*. 1998. Vol. 13. No. 10. P. 391–396.
- Qin T., Liu H., Song Q., Song G., Wang H.-z., Pan Y.-y., Xiong F.-x., Gu K.-s., Sun G.-p., Chen Z.-d.* The screening of volatile markers for hepatocellular carcinoma // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010. Vol. 19. No. 9. P. 2247–2253.
- Schoon A., Haak R.* K9 suspect discrimination: Training and practicing scent identification line-ups. Brush Education, 2002.
- Sonoda H., Kohnoe S., Yamazato T., Satoh Y., Morizono G., Shikata K., Morita M., Watanabe A., Morita M., Kakeji Y., others.* Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection // *Gut*. 2011. Vol. 60. P. 814–819.

Use Of Dogs' Cognitive Abilities to Identify Volatile Markers Associated with Hepatocellular Carcinoma in a Complex Substance Mixture Secreted by Sick Animals

Rodionova E. * (1), Kochevalina M.(1), Morozova O. (2), Kogun G. (3)

a.rodionova@gmail.com

1 — Institute for Information Transmission Problems, Moscow, Russia;
2 — Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia; 3— Cynological Division of Aviation Security Service, Aeroflot — Russian Airlines, Moscow, Russia

Abstract. The biomarkers responsible for cancer signatures in urine could be volatile organic compounds. Dogs' cognitive abilities are very useful for the discovery of cancer's volatile biomarkers. We used mouse cancer models to investigate dogs' ability to detect hepatocarcinoma (HCC H33 tissue was inoculated subcutaneously). A match-to-sample-like protocol of scent identification lineups by dogs was used. The accuracy of the dogs' indication of 1-, 3- and 9-day tumor was 69.6%, 80.0%, 66.7% and sensitivity was 95.2%, 97.3%, 94.7%, respectively. Dogs' cognitive abilities allow them not only to detect hepatocarcinoma signatures in urine, but also to discriminate between cancer and concomitant inflammation.

Keywords: olfaction, dogs' cognitive abilities, hepatocarcinoma, cancer volatile biomarkers