

УДК 57.022:612.867.4:616.006.6

## ФИЗИЧЕСКАЯ ТРАВМА ИЗМЕНЯЕТ СПЕКТР ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МОЧИ МЫШЕЙ

© 2025 г. Е. И. Родионова\*, @, О. В. Морозова\*\*, М. Ю. Кочевалина\*,  
Г. А. Когунь\*\*\*, В. Г. Трунов\*

\*ФГБУ Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН,  
Большой Каретный переулок, д. 19, стр. 1, Москва, 127051 Россия

\*\*ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина”

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Каширское шоссе, д. 24, Москва, 115478 Россия

\*\*\*Кинологический отдел ДУАБ ОАО “Аэрофлот – Российские авиалинии”, ул. Арбат, д. 10, Москва, 119002 Россия

@E-mail: a.rodionova@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10.2024 г.

После доработки 20.11.2024 г.

Принята к публикации 20.11.2024 г.

Летучий метаболом, отражающий связанные с болезнью специфические и неспецифические метаболические изменения, формирует “обонятельный образ” болезни. Исследованы изменения летучего метаболома мочи мышей в результате легкой физической травмы – подкожной инъекции. Показано, что животные-детекторы, собаки и мыши, различают летучие метаболиты мочи модельных мышей, подвергшихся физической травме (введение физраствора), как от интактных мышей (контроль), так и от мышей, которым вводили здоровую и пораженную опухолью ткань печени. Две последовательные травмы увеличивали сходство запахов между здоровыми и пораженными опухолью мышами. Было сделано заключение, что физическая травма вносит значительный вклад в “обонятельный образ” болезни.

**Ключевые слова:** обоняние, запах болезни, физическая травма, собаки

**DOI:** 10.31857/S1026347025020075

Многочисленные исследования, проведенные за последние два десятилетия, предоставили убедительные доказательства способностей собак, крыс и мышей отличать заболевшие организмы с помощью обоняния. Количество заболеваний, хронических, паразитарных и инфекционных, изученных за последние два десятилетия, впечатляет, как и продемонстрированные способности обученных животных определять эти состояния (Kavaliers, Colwell, 1992; 1995; Penn *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 2002; Arakawa *et al.*, 2010; Bijland *et al.*, 2013; Kimball *et al.*, 2013; 2014; 2016a, b; Ols-son *et al.*, 2014; Gervasi *et al.*, 2018). Перспектива использования вариаций запаха тела для диагностики заболеваний породила большие надежды. Однако число вопросов не уменьшается. Пока непонятно – наблюдаемые изменения в запахе тела представляют собой неинвазивный портал в состояние здоровья организма или эти наблюдения только отвлекают исследователей от поиска эффективных биомаркеров?

Хотя не вызывает сомнений, что химические сигналы, состоящие из летучих органических

соединений (ЛОС) с небольшими молекулами, выделяемые организмом, передают информацию о его состоянии, попытки диагностики заболеваний аппаратными методами пока не очень успешны. Летучий метаболом, или волатилом, формирует “обонятельный отпечаток” болезни, отражая как специфические, так и неспецифические метаболические изменения, связанные с заболеванием. Этот отпечаток очень сложен, поскольку при развитии заболевания возникает множество особенностей в метаболизме, вносящих свою лепту в изменение запаха организма. Даже волатиломика инфекционных заболеваний, когда патогены метаболизируют субстраты хозяина и образуется набор ЛОС, существенно меняющий волатилом здорового организма, маркирующий конкретное заболевание, не может быть просто переведена в целевую клиническую волатиломику. Для обеспечения точности и достоверности результатов требуется стандартизация инструментальных рабочих процессов, идентификация соединений и разработка методов обработки данных (Fitzgerald *et al.*, 2024).

Одна из самых перспективных стратегий обнаружения, диагностики и исследования запахов заболеваний человека, животных и растений – использование обонятельных способностей животных-биодетекторов (Родионова и др., 2015; Кочевалина и др., 2020; Juge *et al.*, 2022; Kochevalina *et al.*, 2022). Обонятельная система животных позволяет им свободно оценивать выделяемые организмом тысячи ЛОС. Несмотря на то что имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что запаховые сигналы – это сложные смеси (Kwak *et al.*, 2010), животные-сенсоры – мыши, крысы, собаки – чрезвычайно искусны в выделении из смеси определенных паттернов ЛОС. Например, индивидуальный запах в моче не маскируется для животных-сенсоров изменениями диеты организма, гормональными сдвигами, старением, хотя известно, что все это связано со значительными изменениями спектра ЛОС индивида. (Kwak *et al.*, 2008). Однако нам неизвестно, какую часть смеси ЛОС собака выделяет для себя как маркирующую болезнь при обучении поиску больных организмов. Задача животного-биодетектора – получить вознаграждение и, так как обучающий животное человек не знает, какая именно часть спектра ЛОС маркирует заболевание, животное-биодетектор самостоятельно выбирает для себя эту “метку”.

“Запах болезни”, очевидно, складывается не только из событий, непосредственно связанных с развитием заболевания, но и многих сопутствующих заболеванию процессов, как внутренних – воспалительной реакции, гормональных изменений, – так и внешних. Например, при лечении большинства заболеваний пациентам наносятся мелкие и крупные физические повреждения, например, при инъекциях или биопсиях. Меняют ли они запах пациента? Изменения волатилома в результате небольшой физической травмы ранее не изучалось.

В ходе исследований изменения индивидуального запаха, связанного с развитием перевитой гепатокарциномы у мышей, мы изучали и изменение волатилома в результате физической травмы – подкожной инъекции. Нас интересовал вопрос, может ли простая инъекция сама по себе изменять запах в модели мыши и как влияет на комплекс ЛОС нанесение повторных травм. То есть может ли животное-биосенсор отличить мышей, перенесших одну или несколько инъекций от интактных мышей, по запаху проб мочи? В какой степени различные формы физической травмы, похожие на рутинные хирургические процедуры, могут независимо вызывать изменение запаха. Насколько нам известно, такие исследования никогда не публиковались.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Экспериментальные группы мышей.* В качестве мышей-моделей использовали гибридных самцов BDF1 (C57B1/6 × DBA2). Образцы мочи (60 мкл) собирали у 100 интактных животных один раз в сутки в течение 8 дней. Затем животных делили на три группы и делали им подкожные инъекции. Первой группе мышей вводили физраствор (0.5 мл), второй – суспензию здоровой ткани печени (100 мг в 0.5 мл физраствора), третьей – суспензию опухоли печени штамма H33 (100 мг в 0.5 мл физраствора). Схема введений показана на рис. 1.

Мы использовали трансплантируемый штамм опухоли печени H33, полученный в НИИ канцерогенеза им. Блохина из ГЦК, индуцированной внутрибрюшинным введением диэтилнитрозамином (90 мг/кг массы тела) тем же гибридным мышам BDF1 (Lazarevich *et al.*, 2004).

Одна и та же мышь могла быть использована для сбора разных контрольных и экспериментальных



Рис. 1. Схема инъекций и формирования экспериментальных групп мышей-“пациентов”.

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.

**Биосенсоры.** В качестве биосенсоров использовали 133 здоровых самца мышей СВА в возрасте от 2 до 7 месяцев и 5 специально обученных собак (два самца и три самки псово-шакальих гибридов) в возрасте от 5 до 10 лет из кинологического отдела Службы авиационной безопасности “Аэрофлота”.

**Эксперименты с мышами-биосенсорами.** Мы использовали модификацию метода “привыкания—восстановления” (habituation—dishabituation), который позволяет исследовать сходство и различие 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. Этот метод был признан эффективным и применялся многими исследователями (Schellinck *et al.*, 1995; Kiyokawa *et al.*, 2007; Yang, Crawley, 2009; Arbuckle, 2015; Tarland, Brosda, 2018; Sun *et al.*, 2021). 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 микропипеткой поместить в него 10 мкл мочи или воды, располагая каплю 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. Образцы мочи каждого экспериментального животного предъявляли каждому биосенсору только в одном эксперименте. 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.

Запах предъявлялся в 4–12 последовательных тестах по 3 минуты на тест. Экспериментом считали одну последовательность из 4–12 тестов. Интервал между тестами составлял 1 минуту, что примерно равно времени, необходимому для смены запахового стимула.

Привыкание определяется прогрессирующим снижением времени на исследование наконечника с пробой мочи (принюхивания) при повторном предъявлении того же запахового стимула. Изменение запаха определяется по резкому возрастанию времени обнюхивания образца.

Для оценки влияния различных манипуляций на запах индивида мы провели несколько серий экспериментов, 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.

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. В этой серии экспериментов сенсорам предъявляли 4 образца, в трех повторностях каждый, т. е. всего в каждом эксперименте было 12 предъявлений. Образцы предъявляли в следующих последовательностях: вода, два одинаковых образца мочи самца BDF после инъекции физиологического раствора и образец мочи самца BDF после инъекции ткани здоровой печени и в другом сочетании (обратном): вода, два одинаковых образца мочи самца BDF после инъекции ткани здоровой печени и образец мочи самца BDF после инъекции физиологического раствора. Всего провели по 10 таких экспериментов.

**Эксперименты с собаками-биосенсорами.** Мы использовали протокол идентификации запахов собаками по принципу “совпадение с образцом”, который применяется в криминалистике и научных исследованиях (Jeziarski *et al.*, 2008; Marchal *et al.*, 2016; Lazarowski *et al.*, 2021). В качестве сенсоров использовались пять собак (два кобеля и три суки) в возрасте от 5 до 10 лет. С собаками работали профессиональные тренеры.

В экспериментальной комнате (4 × 4 м) поддерживалась температура 18–20°C и влажность не менее 35%. На полу был размечен круг, состоящий

из 12 точек, расположенных на расстоянии 1 м друг от друга. Образцы мочи (60 мкл) в открытых пробирках Эппендорфа помещали в предварительно вымытые стеклянные стаканы объемом 0.2 л. Диаметр и высота стакана позволяли собаке только обнюхать стакан сверху, но не коснуться образца. Для каждой собаки использовали чистый набор стаканов. Двенадцать стаканов (11 из которых содержали контрольные образцы и один – искомый образец) в устойчивых подставках были размещены в точках окружности; один стакан с образцом, аналогичным (но, как было упомянуто выше, не идентичным) искомому, использовался для предъявления эталонного запаха собаке. Собаке в течение полуминуты предъявляли эталонный запах, затем она должна была обнаружить наиболее похожий запах в ряду из 12 образцов. При обнаружении искомого образца собака садилась перед банкой и лаяла. Применяли двойной слепой метод исследования: никто из присутствующих в экспериментальной комнате, включая дрессировщика, ведущего собаку, не знал, в каком из стаканов находится искомый образец. Экспериментатор, знающий расположение образцов, наблюдал за ходом эксперимента из соседней комнаты через стекло или экран монитора и давал сигнал звонком при совершении собакой правильного выбора.

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 в предыдущем эксперименте, и проветривали помещение. Каждой собаке ряд новых образцов предъявляли в чистых стаканах.

При поиске образца мыши с нанесенной травмой стартовым образцом служил запах мочи одной мыши, а в кругу для поиска среди контрольных образцов стоял образец мочи другой мыши с такой же травмой. Этот подход был необходим для того, чтобы собака не определяла образец по индивидуальному запаху мыши.

Если собака находила стакан с искомым запахом, мы фиксировали это как правильный выбор. Если собака выбирала контрольный образец (ложный сигнал), то это фиксировалось как неправильный выбор. Если собака обнюхивала все образцы и не выбирала ни один или подавала от одного до трех ложных сигналов, мы фиксировали, что собака не нашла тестовый образец. Перед каждым проходом место расположения контрольного образца менялось в случайном порядке, каждый раз собака начинала проход с новой точки.

*Обработка данных.* Все параметры экспериментов заносили в разработанную нами базу данных (Кочевалина, Трунов, 2016), что позволяло сопоставлять результаты различных наборов экспериментов.

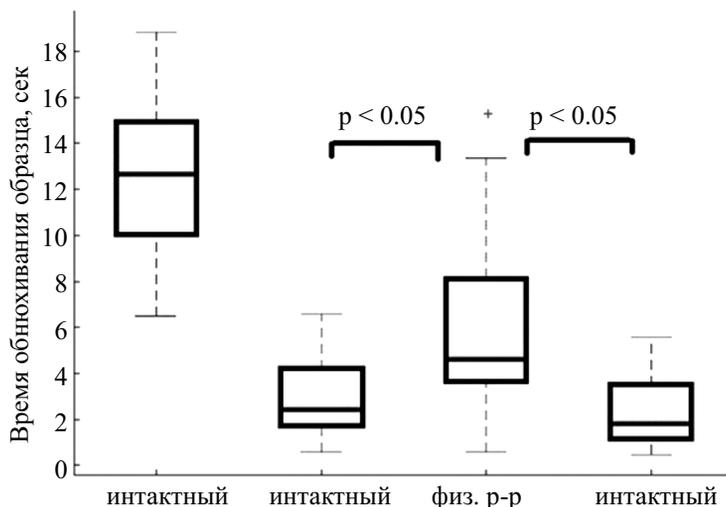
Результаты экспериментов с мышами обработаны с помощью парного рангового критерия Вилкоксона для зависимых переменных с использованием программного статистического пакета STATISTICA 8.

Различия по группам и достоверность в экспериментах с собаками рассчитывали с применением критерия Краскела – Уоллиса. В базе данных мы выбрали пробы мочи, предъявленные собакам во время экспериментов, и оценили количество реакций собак на пробы мочи модельных мышей, получивших различное количество (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 опухоли левой ткани.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой серии экспериментов показано, что мыши-сенсоры отличают по запаху образцы одного и того же самца BDF до и после введения физиологического раствора. На рис. 2 видно, что время обнюхивания запаховых образцов мочи мышами-сенсорами снижается от предъявления к предъявлению образцов 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-й образец по сравнению со вторым и с четвертым образцами ( $p < 0.05$ ). Видимо, изменения в организме донора после инъекции физиологического раствора, связанные с травмой, стрессом и воспалением, приводят к достаточным изменениям в паттерн ЛОС мочи, чтобы сенсор проявил к ним интерес. Это говорит о том, что паттерн ЛОС мочи содержит новую информацию.

Во второй серии экспериментов мыши-сенсору предъявляли 4 образца, в трех повторностях каждый, чередуя предъявление воды, образцов мочи самцов BDF после инъекции физиологического раствора и образцов мочи самцов BDF после инъекции ткани здоровой печени. На рис. 3 видно, что сенсоры хорошо отличают по запаху мочу мыши после подкожного введения физиологического раствора от мочи той же мыши, которой спустя 14 дней подкожно ввели здоровую ткань печени. Животные достоверно дольше ( $p < 0.05$ ) исследовали запаховые образцы мочи донора после контрольной инъекции, чем воду (образцы 3–4 на двух блоках рис. 3). Животные достоверно дольше ( $p < 0.05$ ) исследовали запаховые образцы мочи

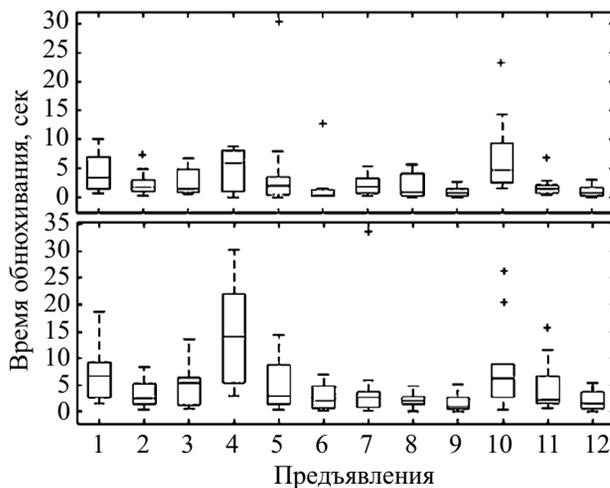


**Рис. 2.** Время исследования мышами-сенсорами образцов мочи самца BDF, собранных до и после инъекции физиологического раствора. По оси ординат отложено время обнюхивания запахового образца в секундах. По оси абсцисс указана последовательность предъявления запаховых образцов: первый, второй и последний 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. Жирная черта – медиана (0.5-квантиль). “Усы” диаграммы и крестики показывают минимальное, максимальное значение выборки и выбросы соответственно.

донора после контрольной инъекции другого типа, чем тот, что они уже исследовали (образцы 9–10 на двух блоках рис. 3). Эксперименты показали, что любое изменение в организме – простая травма (введение физиологического раствора) или введение чужеродной здоровой ткани печени – изменяет запах животного и что каждый тип введения меняет запах по-разному – мышь-сенсор легко различает запахи организмов после инъекций разных типов.

Использование в экспериментах самцов BDF, которым делали более одной инъекции, сделало возможным оценить влияние количества последовательных физических травм (различных инъекций) на спектр ЛОС мочи. На рис. 4 показано, сколько раз собаки выбирали мочу модельных мышей в зависимости от количества полученных ими инъекций.

В поисках мыши с перевитой гепатокарциномой собаки чаще выбирают образцы мочи мышей, получивших последовательно несколько травм. Чем больше травм у мыши, тем выше вероятность того, что собака найдет ее больной, независимо от того, есть у нее рак или нет. Наличие трех инъекций 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. Во всех этих случаях собаки-биосенсоры достоверно чаще



**Рис. 3.** Исследование образцов мочи донора 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 7–9 – 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. Поперечная черта – медиана (0,5-квантиль). “Усы” диаграммы и крестики показывают минимальное, максимальное значение выборки и выбросы значений соответственно.



**Рис. 4.** 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.

выбирают образцы мочи самцов BDF. На рис. 4 видно, что каждая инъекция в первую очередь делает мышшь с перевитой тканью гепатокарциномы “еще более больной”, увеличивая вероятность выбора собаками (светло-серые столбики). Но в случае, когда мышшь-доноры мочи получили три введения, мы наблюдаем достоверное увеличение количества выборов собаками проб мочи не только мышшь с перевитой тканью гепатокарциномы, но проб контрольных самцов BDF вне зависимости от того, получали они инъекции физраствора или перевивку ткани здоровой печени. Можно заключить, что запах контрольных мышшь, получивших три инъекции, гораздо ближе к запаху “больного животного”.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обобщая результаты экспериментов по влиянию легких травм – инъекций – на спектр ЛОС модельных мышшь, можно заключить, что собаки и мышшь по спектру летучих метаболитов мочи могут отличать мышшь, подвергшихся физическим травмам, связанными с различными инъекциями, как от интактных мышшь, так и от мышшь с перевитой здоровой тканью печени и мышшь с перевитой опухолевой тканью печени. Наши эксперименты показывают, что запах физической травмы и запах перевитой ткани – разные запахи. Мы впервые показали, что даже небольшие повреждения изменяют запах здоровой мышши, причем эффект накапливается, все более приближая

его к запаху больного организма с перевитой опухолью.

Этот результат несколько меняет взгляд на формирование спектра ЛОС, связанного с заболеванием. Так, при поиске маркеров заболеваний у людей с использованием как масс-спектрометрии и электронных носов, так и животных-биодетекторов, необходимо иметь в виду, что отличия в спектре выделяемых ЛОС между пациентами и контрольными людьми может быть обусловлены не только ростом опухоли, но и накоплением эффекта многих травм: введением различных препаратов больному, биопсиями и т.д.

Ранее нами было показано, что рост злокачественной опухоли непосредственно меняет спектр выделяемых организмом ЛОС, позволяя собакам-биодетекторам отличать животных, у которых опухоль растет интенсивно, от тех, у которых злокачественных клеток мало и рост опухоли замедлен (Кочевалина и др., 2020; Kochevalina *et al.*, 2022). Однако становится все более очевидно, что любые изменения метаболизма отражаются на спектре выделяемых организмом ЛОС, и “запаховый образ” болезни формируется не только злокачественным ростом, но и всеми – как специфическими, так и неспецифическими – метаболическими изменениями, связанными с болезнью. Известно, что иммунизация, воспаление, обширные повреждения, например искусственная черепно-мозговая травма, изменяют спектр выделяемых животным ЛОС (Kimball *et al.*, 2014; Gordon *et al.*, 2018;). Наши исследования показали, что и незначительные повреждения влияют на изменение запаха.

Как выделить из большого количества летучих компонентов, быстро меняющих соотношение, набор ЛОС, маркирующий злокачественный рост? Механизмы, лежащие в основе изменений запаха тела, вызванные патогеном или системными изменениями в организме, плохо изучены (Alves *et al.*, 2010; Arakawa *et al.*, 2010; Kimball *et al.*, 2013; Gouzerh *et al.*, 2022), а пока механизм, контролирующей модификацию ЛОС, не ясен, будет трудно понять, какие именно изменения в спектре ЛОС связаны с возникновением заболевания, и предсказать, как спектр ЛОС изменяется с прогрессирующим заболеванием.

Обоняние животных-биосенсоров – мышей, крыс, собак – пожалуй, самый чувствительный инструмент для выявления конкретного заболевания. Способность собак с высокой чувствительностью и специфичностью обнаруживать онкологические заболевания по запаху тела надежно доказана (Juge *et al.*, 2022; Concha, 2023). Можно заключить, что применение обоняния животных-биосенсоров в сочетании с контролируемыми мышинными моделями заболеваний – один из перспективных путей исследования “запаха болезни” и механизмов его формирования.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института (учреждения, организации). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол комиссии по биоэтике ИППИ РАН № 1 от 20 ноября 2017.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Родионова Е.И., Кочевалина М.Ю., Котенкова Е.В., Морозова О.В., Когунь Г.А., Батаева Е.Л., Амбарян А.В. Распознавание животными-макросматиками летучих органических веществ, связанных с развитием гепатокарциномы: подходы к поиску маркеров онкологических заболеваний // Изв. РАН. Сер. биол. 2015. № 3. С. 293–301.
- Кочевалина М.Ю., Трунов В.Г. Принципы организации базы данных для поведенческих экспериментов с животными-макросматиками // Успехи современной науки. 2016. Т. 3. № 4. С. 130–133.
- Кочевалина М.Ю., Трунов В.Г., Морозова О.В., Когунь Г.А., Родионова Е.И. Изменение запаха мочи мышей в динамике формирования перевитой опухоли гепатокарциномы Н33 // Изв. РАН. Сер. биол. 2020. № 5. С. 517–525.
- Alves G.J., Vismari L., Lazzarini R., Merusse J.L., Palermo-Neto J. Odor cues from tumor-bearing mice induces neuroimmune changes // *Behav. Brain Res.* 2010. V. 214. P. 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.003>
- Arakawa H., Arakawa K., Deak T. Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: a role for inflammatory processes // *Horm. Behav.* 2010. V. 57. № 3. P. 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.002>
- Arbuckle E.P., Smith G.D., Gomez M.C., Lugo J.N. Testing for odor discrimination and habituation in mice // *JoVE.* 2015. V. 99. P. e52615. DOI:10.3791/52615
- 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. V. 71. P. 300–307.
- Concha A. Detection of Human Diseases for Medical Diagnostics // *Olfactory Research in Dogs* / Ed. Lazzarowski L. Cham: Springer International Publishing. 2023. P. 291–331. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-39370-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-031-39370-9_12)
- Fitzgerald S., Holland L., Ahmed W., Piechulla B., Fowler S.J., Morrin A. Volatilomes of human infection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2024. V. 416. P. 37–53. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04986-z>
- Gervasi S.S., Opiekun M., Martin T., Beauchamp G.K., Kimball B.A. Sharing an environment with sick conspecifics alters odors of healthy animals // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 14255. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32619-4>
- Gordon A.R., Kimball B.A., Sorjonen K., Karshikoff B., Axelsson J., Lekander M., Lundström J.N., Olsson M.J. Detection of inflammation via volatile cues in human urine // *Chem. Senses.* 2018. V. 43. P. 711–719. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjy059>
- Gouzerh F., Bessière J.M., Ujvari B., Thomas F., Dujon A.M., Dormont L. Odors and cancer: Current status and future directions // *Biochim. Biophys. Acta (BBA). Reviews on Cancer.* 2022. V. 1877. P. 188644. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188644>
- Jeziński T., Walczak M., Górecka A. Information-seeking behaviour of sniffer dogs during match-to-sample training in the scent lineup // *Pol. Psychol. Bull.* 2008. P. ??? <https://doi.org/10.2478/v10059-008-0010-y>
- Juge A.E., Foster M.F., Daigle C.L. Canine olfaction as a disease detection technology: A systematic review // *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2022. V. 253. P. 105664. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2022.105664>

- Kavaliers M., Colwell D.D.* Exposure to the Scent of Male Mice Infected With the Protozoan Parasite, *Eimeria vermiformis*, Induces Opioid- and Nonopioid-Mediated Analgesia in Female Mice // *Physiol. Behav.* 1992. V. 52. P. 373–377.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90286-B](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90286-B)
- Kavaliers M., Colwell D.D.* Odours of parasitized males induce aversive responses in female mice // *Anim. Behav.* 1995. V. 50. P. 1161–1169.  
[https://doi.org/10.1016/0003-3472\(95\)80032-8](https://doi.org/10.1016/0003-3472(95)80032-8)
- Kimball B.A., Cohen A.S., Gordon A.R., Opiekun M., Martin T., Elkind J., Lundström J.N., Beauchamp G.K.* Brain injury alters volatile metabolome // *Chem. Senses.* 2016a. V. 41. № 5. P. 407–414.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjw014>
- Kimball B.A., Opiekun M., Yamazaki K., Beauchamp G.K.* Immunization alters body odor // *Physiol. Behav.* 2014. V. 128. P. 80–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.022>
- Kimball B.A., Wilson D.A., Wesson D.W.* Alterations of the volatile metabolome in mouse models of Alzheimer's disease // *Sci. Rep.* 2016b. V. 14. № 6, P. 19495.  
<https://doi.org/10.1038/srep19495>
- Kimball B.A., Yamazaki K., Kohler D., Bowen R.A., Muth J.P., Opiekun M., Beauchamp G.K.* Avian influenza infection alters fecal odor in mallards // *PLoS ONE.* 2013. V. 8. № 10. P. e75411.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075411>
- 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 // *Chem. Senses.* 2007. V. 32. № 1. P. 57–64.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjl036>
- Kochevalina M.Y., Bukharina A.B., Trunov V.G., Pen-to A.V., Morozova O.V., Kogun G.A., Simanovsky Y.O., Nikiforov S.M., Rodionova E.I.* Changes in the urine volatile metabolome throughout growth of transplanted hepatocarcinoma // *Sci. Rep.* 2022. V.12. P. 7774.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-11818-0>
- Kwak J., Willse A., Matsumura K., Curran Opiekun M., Yi W., Preti G., Yamazaki K., Beauchamp G.K.* Genetically-based olfactory signatures persist despite dietary variation // *PLoS One.* 2008. V. 3. P. e359.1  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003591>
- Kwak J., Willse A., Preti G., Yamazaki K., Beauchamp G.K.* In search of the chemical basis for MHC odourtypes // *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.* 2010. V. 277. P. 2417–2425.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0162>
- Lazarevich N.L., Cheremnova O.A., Varga E.V., Ovchinnikov D.A., Kudrjavitseva E.I., Morozova O.V., Fleishman D.I., Engelhardt N.V., Duncan S.A.* Progression of HCC in mice is associated with a down-regulation in the expression of hepatocyte nuclear factors // *Hepatology.* 2004. V. 39. P. 1038–1047.  
DOI 10.1002/hep.20155
- Lazarowski L., Davila A., Krichbaum S., Cox E., Smith J.G., Waggoner L.P., Katz J.S.* Matching-to-sample abstract-concept learning by dogs (*Canis familiaris*) // *J. Exp. Psychol. Anim. Learn. Cogn.* 2021. V. 47. P. 393–400.  
<https://doi.org/10.1037/xan0000281>
- Marchal S., Bregeras O., Puaux D., Gervais R., Ferry B.* Rigorous training of dogs leads to high accuracy in human scent matching-to-sample performance // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. e0146963.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146963>
- Olsson M.J., Lundström J.N., Kimball B.A., Gordon A.R., Karshikoff B., Hosseini N., Sorjonen K., Olgart Höglund C., Solares C., Soop A., Axelsson J.* The scent of disease: human body odor contains an early chemosensory cue of sickness // *Psychol. Sci.* 2014. V. 25. P. 817–823.  
<https://doi.org/10.1177/0956797613515681>
- Penn D.J., Schneider G., White K., Slev P., Potts W.* Influenza infection neutralizes the attractiveness of male odour to female mice (*Mus musculus*). *Ethology.* 1998. V. 104. P. 685–694.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1998.tb00102.x>
- Schellinck H.M., Rooney E., Brown R.E.* Odors of individuality of germfree mice are not discriminated by rats in a habituation-dishabituation procedure // *Physiol. Behav.* 1995. V. 57. P. 1005–1008.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)00353-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00353-7)
- Sun X, Li L, He W, Wang DR, Huang ZL, Wang YQ.* Adenosine A2A receptor neurons in the olfactory bulb mediate odor-guided behaviors in mice // *Brain Research.* 2021. V? P? Oct 1;1768:147590.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147590>
- Tarland E., Brosda J.* Male rats treated with subchronic PCP show intact olfaction and enhanced interest for a social odour in the olfactory habituation/dishabituation test // *Behav. Brain Res.* 2018. V. 345. P. 13–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.02.023>
- Yamazaki K., Boyse E.A., Bard J., Curran M., Kim D., Ross S.R., Beauchamp G.K.* Presence of mouse mammary tumor virus specifically alters the body odor of mice // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. V. 99. P. 5612–5615.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.082093099>
- Yang M., Crawley J.N.* Simple behavioral assessment of mouse olfaction // *Curr. Protoc. Neurosci.* 2009. V. 48. P. 8–24.  
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0824s48>

## Physical trauma alters the spectrum of volatile organic compounds in mouse urine

E. I. Rodionova<sup>1, #</sup>, O. V. Morozova<sup>2</sup>, M. Yu. Kochevalina<sup>1</sup>,  
G. A. Kogun<sup>3</sup>, V. G. Trunov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Moscow, 127994 Russia*

<sup>2</sup>*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation*

<sup>3</sup>*Cynological Division of Aviation Security Service, Aeroflot, Russian Airlines, ul. Arbat 10, Moscow, 119002 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: a.rodionova@gmail.com*

The volatile metabolome, reflecting disease-related specific and nonspecific metabolic changes, forms the “olfactory image” of the disease. We investigated changes in the urine volatile metabolome as a result of mild physical trauma – subcutaneous injection. We showed that detection animals, dogs and mice, distinguished the urinary volatile metabolites of model mice subjected to physical trauma (saline injection) from both intact controls and mice injected with healthy and tumor-affected liver tissue. Two successive injuries increased the similarity of odors between healthy and tumor-affected mice. We conclude that physical trauma contributes significantly to the “olfactory image” of the disease.

*Keywords:* olfaction, scent of disease, physical trauma, dogs