

# **Identyfikacja zapachowych biomarkerów czerniaka w moczu myszy, z zastosowaniem metod behawioralnych i analitycznych**

Agata Kokocińska-Kusiak  
Streszczenie rozprawy doktorskiej

*Promotor: Prof. dr. hab. Tadeusz Jezierski*

*Recenzenci: Prof. dr hab.n.wet. Tadeusz Stefaniak*

*Dr hab. Iwona Janczarek prof. UP w Lublinie*

Kluczowe znaczenie w walce z chorobami nowotworowymi ma wczesna diagnoza, do której przyczyniają się skuteczne i powszechnie dostępne badania przesiewowe, co umożliwia zastosowanie mniej inwazyjnej, tańszej i skuteczniejszej terapii oraz prognozuje dłuższe przeżycie pacjentów. Badania przesiewowe, oparte głównie na technikach obrazowania dają niekiedy wynik fałszywie pozytywny, a ponadto wymagają kosztownej aparatury i wyszkolonego personelu, dlatego ich powszechna dostępność jest często niewystarczająca. Alternatywną metodą może być detekcja metabolitów, w tym zapachu, który powstaje w organizmie w trakcie rozwoju nowotworu. Dotychczasowe badania wykazały, że charakterystyczny zapach może być sytymem nowotworów, lecz przeważnie w zaawansowanych stadiach klinicznych. Niniejsza rozprawa jest próbą uzyskania odpowiedzi na pytanie, czy zmiany zapachu metabolitów, w tym przypadku moczu, mogą pojawiać się przed widocznymi zmianami klinicznymi. W badaniach postawiono następujące hipotezy:

- Zmiany zapachu moczu myszy, związane z powstawaniem czerniaka są wyczuwalne zarówno przez zmysł węchu zwierząt makrosmatycznych (myszy), jak i przez człowieka jako gatunek mikrosmatyczny (obdarzony słabszym węchem),
- Zmiany zapachu pojawiają się przed powstaniem pierwszych objawów klinicznych,
- Możliwe jest zidentyfikowanie przy pomocy chromatografii gazowej / spektrometrii mas konkretnych lotnych związków organicznych warunkujących zmiany zapachu moczu w trakcie rozwoju czerniaka u myszy.

W badaniach wyodrębniono 3 główne zadania:

1. Olfaktoryczne badania behawioralne z wykorzystaniem mysiego zmysłu węchu
2. Badania olfaktoryczne z wykorzystaniem ludzkiego zmysłu węchu
3. Analizy chemiczne próbek moczu myszy z wykorzystaniem chromatografii gazowej ze spektrometrią mas.

Próbki moczu pobrano od 40 samców myszy szczepu C57Bl/6J, którym inokulowano ortotopowo komórki czerniaka B16F0. Mocz pobierano przed inokulacją, 2-3 dni po inokulacji w stadium bez widocznych zmian klinicznych i w stadium z widocznym guzem czerniaka. Jako myszy wachające próbki moczu użyto innych 15 samców i 11 samic w teście spontanicznej preferencji zapachu w „otwartym polu” i w labiryncie Y oraz 20 samców i 20 samic trenowanych do rozróżniania zapachu moczu osobników zdrowych i chorych w labiryncie Y, z zastosowaniem warunkowania instrumentalnego. Testy odróżniania zapachu moczu myszy z wykorzystaniem ludzkiego zmysłu węchu, przeprowadzono z udziałem 20 osób i metody szeregu zapachowego. Wyniki umożliwiły wyciągnięcie następujących wniosków:

- Myszy laboratoryjne można wytrenować w kierunku rozróżniania zapachu moczu osobników u których rozwija się czerniak, od zapachu moczu osobników zdrowych.
- Różnice w zapachu moczu myszy u których rozwija się czerniak i myszy zdrowych są wyczuwalne zarówno przez myszy jak i przez niektórych ludzi.
- Zmiany zapachu moczu myszy występują już przed powstaniem widocznych zmian klinicznych.
- Spadek zawartości n-heksanu i chlorku metylenu, oraz pojawianie się acetonu i zanik octanu etylu, pozwalają na odróżnienie z dużą trafnością osobników zdrowych od chorych, w tym we wczesnym stadium bez objawów klinicznych.

## **Identification of odour biomarkers of melanoma in mouse urine, using behavioural and analytical methods**

Agata Kokocińska-Kusiak

Summary of the Phd-thesis

*Doctoral advisor: Prof. Tadeusz Jezierski Phd, DSc*

*Reviewers: Prof. Tadeusz Stefaniak DVM, PhD, DSc*

*Dr. Iwona Janczarek PhD, DSc Univ.Prof.*

An early diagnosis plays a crucial role in combating cancer diseases. Efficient and commonly accessible screening methods contribute to the early diagnosis, which enables a less invasive, less expensive and more efficient cancer therapy and results in a longer outliving. Screening methods that are based on various imaging techniques, produce sometimes false positive outcomes and require high-cost equipment as well as highly qualified staff. Therefore the accessibility to such screening procedures is often insufficient. Alternatively, screening methods based on detection of metabolites including odours that are produced in organism during cancer development, could be taken into consideration. Studies conducted so far have shown that a characteristic odour that could be considered as cancer marker, is identifiable mostly in advanced stages of cancer. The aim of the present PhD-thesis is to answer a question if changes in odour of metabolites in mouse urine could appear before visible clinical symptoms of melanoma. It was hypothesized that:

- Changes in mouse urine odour, related to the development of melanoma, are detectable both by the sense of smell of macrosmatic animals (mice) and by human sense of smell (microsmatic – with poor sense of smell)
- The changes in urine odour appear before visible clinical symptoms of melanoma
- It is feasible to identify specific volatile organic compound responsible for changes in urine odour, using gas chromatography / mass spectrometry (GCMS).

Three main research tasks were implemented:

1. Behavioural tests on mouse olfaction and training
2. Olfactory test using human sense of smell
3. Chemical analyses of mouse urine samples using GCMS

Urine samples were collected from 40 male mice of the C57Bl/6J strain, which were inoculated with melanoma cells B16F0. Urine samples were collected before inoculation and 2-3 days after inoculation without visible symptoms and subsequently when melanoma symptoms were clearly visible. For olfactory tests another individuals were used (15 males and 11 females for spontaneous preference tests in open field and in Y maze, as well as 20 males and 20 females for the training to discriminate urine samples from healthy vs. melanoma conspecifics, using operant conditioning. The olfactory tests on the ability of human sense of smell to discriminate odours of mouse urine were conducted with 20 persons, using the scent lineup method.

The following conclusions could be drawn:

- Laboratory mice can be trained to discriminate urine odour of healthy conspecifics vs those in which the melanoma develops.
- Differences in murine urine odour of individuals in which the melanoma develops, can be perceived both by murine sense of smell as well by some humans.
- The changes in odour of murine urine may appear before visible clinical symptoms
- A decrease in the content of n-hexane and methylene chloride as well as appearing of acetone and disappearing of ethyl acetate in murine urine allow to distinguish and to identify with a high reliability and validity individual mice with melanoma, including those in early pre-clinical stages of the disease.