

## К вопросу о гистогенезе опухоли почечной капсулы, индуцированной 1,2-диметилгидразином у мышей СВА

О. В. Морозова<sup>1</sup>, Е. Е. Антошина<sup>1</sup>, В. Н. Манских<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова»; Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

**Контакты:** Ольга Викторовна Морозова canceragent@gmail.com

**Введение.** У самцов мышей линии СВА 1,2-диметилгидразин (ДМГ) индуцирует андрогензависимую гемангиосаркому (ГАС) фиброзной почечной капсулы (ПК). Эта экспериментальная модель используется для изучения гормонзависимых опухолей. Полагают, что ПК, в которой развивается ГАС, не имеет сосудов. Для разъяснения природы такого парадоксального феномена мы изучали гистогенез этой опухоли.

**Материалы и методы.** Самцы мышей линии СВА получили 15 подкожных инъекций ДМГ. Длительность эксперимента составила 50 нед. Были приготовлены парафиновые срезы и пленчатые препараты ПК. Для исследования предшественников эндотелия и стволовых клеток проводили иммуногистохимическую реакцию с антителами CD34.

**Результаты.** Мы обнаружили отдельные клетки и редкие капиллярные структуры с выраженной экспрессией CD34 в интактной ПК. Тем не менее в начальных ГАС CD34 экспрессировался слабо по сравнению с интактной ПК или не экспрессировался вовсе. На поздних стадиях развития отмечена интенсивная экспрессия CD34.

**Заключение.** В результате мы впервые показали, что фиброзная ПК мыши не является полностью бессосудистым образованием, как полагали ранее. В процессе морфогенеза ГАС обнаружены фазовые изменения экспрессии антигена CD34.

**Ключевые слова:** 1,2-диметилгидразин, мыши линии СВА, почечная капсула, гемангиосаркома, гистогенез, иммуногистохимия

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-37-41

### About renal capsule tumour histogenesis, induced by 1,2-dimethylhydrazine in CBA mice

O. V. Morozova<sup>1</sup>, E. E. Antoshina<sup>1</sup>, V. N. Manskikh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University; Build. 73, 1 Leninskie Gory, Moscow 119992, Russia

**Background.** It is accepted that 1,2-dimethylhydrazine (DMH) induced androgen-dependent hemangiosarcoma (HAS) of fibrous renal capsule (RC) in CBA male mice. This experimental model is used to study hormone-dependent tumors. It is considered that RC (site of HAS growth) is avascular. For clarifying the nature of such paradoxical phenomenon we studied the tumour histogenesis.

**Materials and methods.** CBA male mice received 15 subcutaneous injections of DMH. The duration of the experiment was 50 weeks. From RC whole-mounted preparations and paraffin sections were made. Immunohistochemistry method with antibody against endothelium and stem cells CD34 were used to investigate the endothelium cell precursors.

**Results.** We have found single CD34 well expressive cells and capillary structures in intact RC. Nevertheless on the initial stages of HAS growth the CD34 expression was markedly weaker or completely absent compared with intact RC. In the late HAS develop the intensive CD34 expression was detected.

**Conclusions.** In summary, for the first time we have shown that murine fibrous RC is not completely avascular education, as it was supposed earlier. In the HAS morphogenesis process the phase alterations of CD34 antigen expression were found.

**Key words:** 1,2-dimethylhydrazine, mouse CBA, renal capsule, hemangiosarcoma, histogenesis, immunohistochemistry

#### Введение

Ранее была получена модель андрогензависимой опухоли почечной капсулы (ПК), индуцированной 1,2-диметилгидразином (ДМГ) у мышей-самцов линии СВА/Лас [1]. Выявлены резко выраженные различия в частоте возникновения этой опухоли у мышей разного пола и линий [2]. У мышей-самцов линии СВА ДМГ в большинстве (70–100 %) случаев индуцирует опухоли

ПК, в то время как у самок эти опухоли не возникают или возникают редко (1–2 %) [1]. Предварительная кастрация самцов предотвращает индукцию, а введение тестостерона пропионата (ТП) кастрированным самцам восстанавливает развитие опухолей ПК под действием ДМГ [2]. У овариэктомированных самок линии СВА одновременное введение ДМГ и ТП вызывает развитие этих опухолей в большинстве случаев [3].

Гистогенез опухоли был исследован, и она была определена как злокачественная сосудистая опухоль — гемангиосаркома (ГАС) (синонимы: ангиосаркома, злокачественная гемангиоэндотелиома) [4]. Удивительно, что эта сосудистая опухоль возникает *de novo* в бессосудистом органе — фиброзной ПК. У человека опухоли фиброзной ПК появляются редко, в основном это фибросаркома или лейомиосаркома, но сосудистые опухоли не встречаются [5]. Изучали морфогенез и гистогенез ГАС, индуцированной ДМГ у мышей, в результате был описан процесс ее возникновения и развития [6]. Авторы утверждают, что под действием ДМГ происходит образование атипичных эндотелиальных клеток в ПК, из которых затем формируется опухоль. Визуально опухоли появляются в виде телеангиоэктазий, затем в виде кисты, заполненной кровью, далее стенки полости утолщаются за счет разрастания опухолевого эндотелия. В некоторых случаях стенки опухоли прорываются, и кровь изливается в брюшную полость, что вызывает гибель животного. Иногда опухоль прорастает в ткань почки. Отсутствие эндотелия в нормальной ПК определяли методом импегрированного серебра, опухолевый эндотелий — с помощью световой и электронной микроскопии. Авторы сделали предположение о том, что ГАС может возникать из полипотентных клеток ПК.

В связи с тем, что данная экспериментальная модель используется для изучения гормонозависимой опухоли, появилась необходимость в дальнейшем уточнении ее происхождения и дополнительном изучении морфогенеза этой парадоксальной опухоли. В предыдущих исследованиях нами показано, что экспрессия *VEGFA* в ПК мышей линии СВА на ранних стадиях ДМГ-канцерогенеза не наблюдалась, тогда как на поздних стадиях обнаруживается его слабая экспрессия. Однако экспрессии основного рецептора *VEGFAR2* в образцах ПК ни на ранних этапах канцерогенеза, ни в опухолях не выявлено [7]. Сложность этого исследования заключается в том, что ПК плотно сращена с жировой капсулой, в которой имеются сосуды. Жировая ткань неизбежно попадает в образцы, особенно у возрастных мышей. Присутствие жировой ткани и вместе с ней, вероятно, эндотелия может искажать результат исследования полимеразной цепной реакции. Поэтому потребовалось применение другого метода исследования.

В настоящей работе иммуногистохимическим (ИГХ) методом мы попытались исследовать развитие ГАС, используя маркер эндотелия и стволовых клеток соединительной ткани CD34.

### Материалы и методы

В эксперименте использованы 44 3-месячных самца мышей линии СВА/Лас, содержащихся в стандартных условиях и полученных из лаборатории экспериментальной биологии «Виварий» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Водный раствор ДМГ вводили подкожно 1 раз в неделю в дозе 8 мг/кг в течение 15 нед. Животных разделили на 2 группы: 1-я ( $n = 34$ ) получала ДМГ; 2-я ( $n = 10$ ) — контрольная (интактные животные). Длительность эксперимента — 50 нед.

При некропсии выделяли ПК под бинокулярной лупой, готовили пленчатые (whole-mounted) препараты, фиксировали метиловым спиртом и для детекции эндотелия проводили иммуноокрашивание с моноклональными антителами к CD34 (553731, BD Biosciences Pharmingen, США). Связывание первичных антител детектировалось с помощью меченных биотином антикрысиных вторичных антител (559286, BD Biosciences Pharmingen, США) с последующей обработкой препарата стрептавидином — HRP (K0690, Dako, Дания).

При обнаружении видимых опухолей почку с капсулой фиксировали в 10 % нейтральном формалине в течение 24 ч и заключали в парафин. Срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. ИГХ-анализ проводили с антителами к CD34 по той же методике, что и с пленчатыми препаратами. Для исключения неспецифического связывания антител поставлены соответствующие контрольные эксперименты, результат которых был отрицательным.

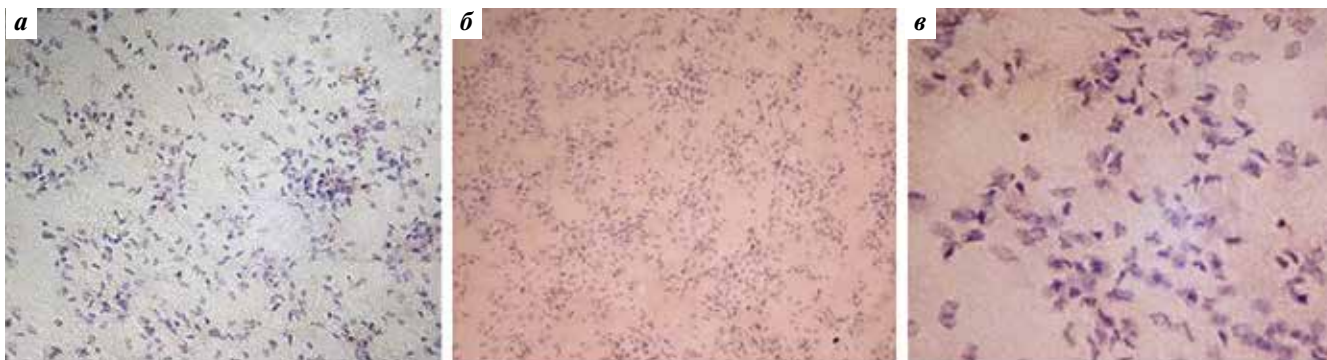
### Результаты

Все мыши дожили до окончания эксперимента. В 1-й группе опухоли ПК были обнаружены у 28 (82,4 %) из 34 самцов. Метастазы не выявлены. У 10 мышей 2-й группы опухоли не обнаружены. При микроскопическом исследовании отмечены кавернозные гемангиомы с атипией (начальные опухоли) и злокачественные ГАС с различной степенью дифференцировки. Низкодифференцированные опухоли зачастую были представлены солидными участками с большим количеством митозов, в том числе патологических. Гистологическая картинка индуцированных опухолей соответствовала ранее описанными ГАС [8].

При ИГХ-исследовании пленчатые препараты ПК мышей 2-й группы при иммуноокрашивании антителами к CD34 оказались отрицательными (рис. 1а, б). В пленчатых препаратах капсул мышей 1-й группы, но без опухолей белок CD34 также не экспрессировался (рис. 1в).

В парафиновых препаратах интактной ПК обнаруживались отдельные клетки с выраженной экспрессией антигена CD34 и редкие капиллярные структуры, которые могут быть предшественниками ГАС ПК (рис. 2). По-видимому, отрицательный результат в препаратах whole-mounted связан с многослойностью ПК и сложностью проведения ИГХ-реакции. Таким образом, ПК не является полностью аваскулярным образованием, как полагали ранее.

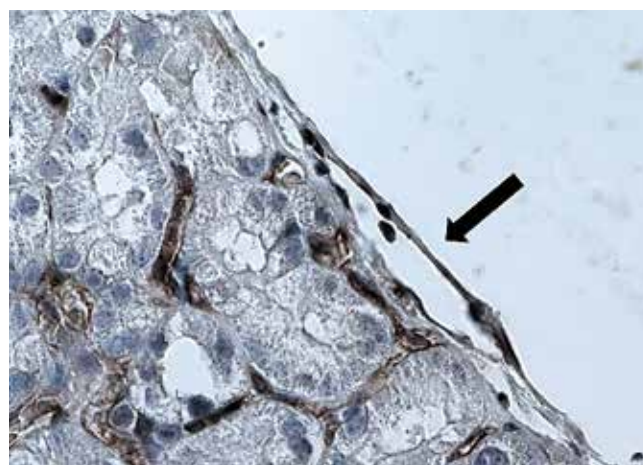
На начальных стадиях развития ГАС, представленной в виде небольших телеангиэктазий, антиген CD34 в эндотелиальных клетках опухоли экспрессировался заметно слабее (слабая окраска), чем в интактной



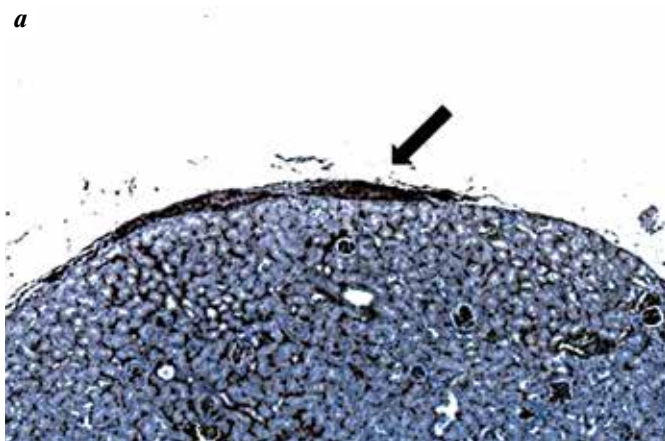
**Рис. 1.** Фиброзная почечная капсула, пленчатые препараты: а – капсула интактной мыши (окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ ); б – капсула интактной мыши, пленчатый препарат (окрашивание с антителами к CD34,  $\times 100$ ): отсутствие положительного окрашивания; в – капсула мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином, пленчатый препарат (окрашивание с антителами к CD34,  $\times 200$ ): отсутствие положительного окрашивания



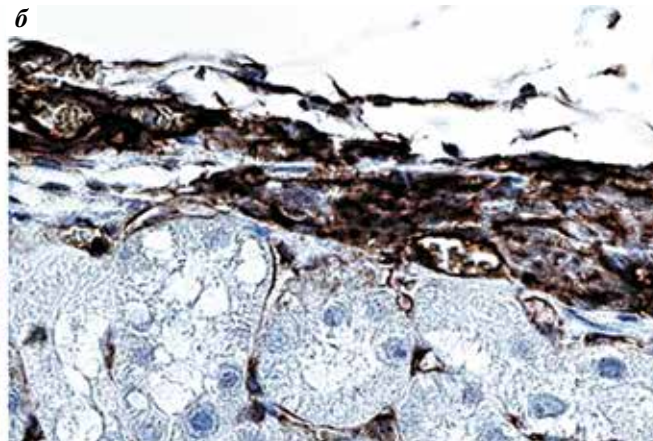
**Рис. 2.** Почечная капсула интактной мыши: положительная иммуногистохимическая реакция на CD34 в почечной капсуле ( $\times 1000$ )



**Рис. 3.** Почечная капсула мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином: слабая положительная иммуногистохимическая реакция на CD34, но выраженная в субкапсулярной зоне ( $\times 1000$ )



**Рис. 4.** Сплошная гемангиосаркома почечной капсулы мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином: положительная иммуногистохимическая реакция на CD34 ( $\times 100$  (а);  $\times 1000$  (б))



капсуле, в некоторых участках положительное окрашивание CD34 полностью отсутствовало (рис. 3). В развившихся ГАС ПК мы наблюдали интенсивное иммуноокрашивание CD34 в клетках опухолей различного строения (рис. 4, 5).

Примечательно то, что мы обнаружили развитие ГАС не только непосредственно в ПК, но и в субкапсулярной зоне почки (рис. 6а). Также мы наблюдали отчетливо выраженную экспрессию белка CD34 в кортикальной зоне почки, что указывает

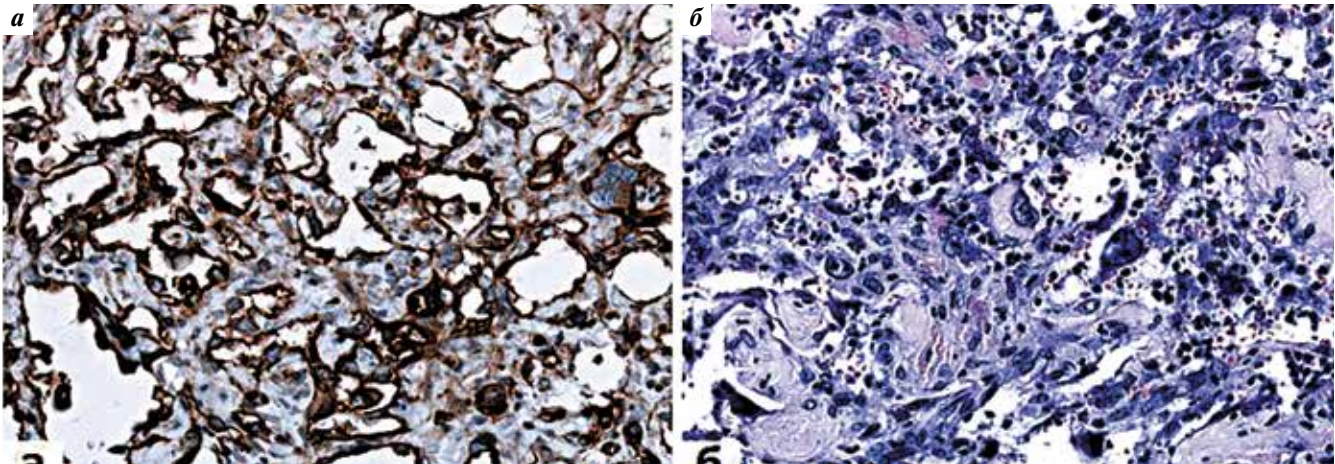


Рис. 5. Гемангиосаркома почечной капсулы мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином: положительная иммуногистохимическая реакция на CD34 ( $\times 400$ ): а – хорошо видны полости, которые, как правило, заполнены эритроцитами; б – хорошо виден клеточный полиморфизм (окраска гематоксилином и эозином)

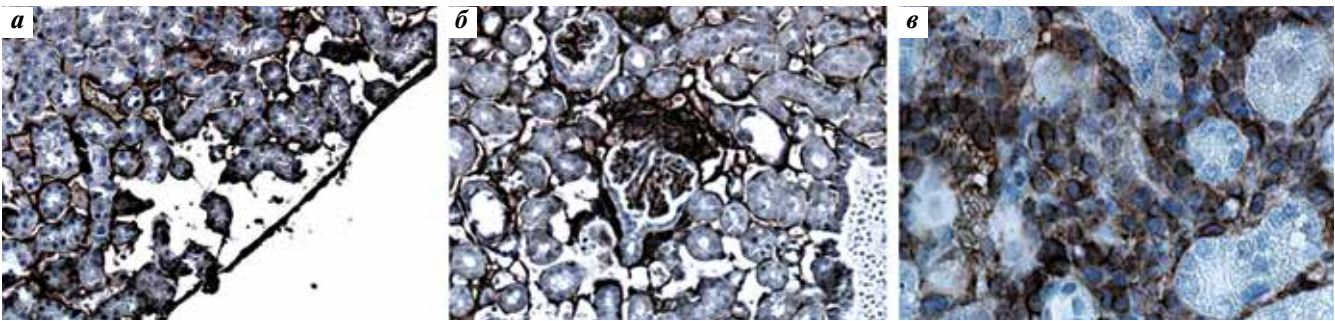


Рис. 6. Проплиферация эндотелия в почке мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином ( $\times 1000$ ): а – в субкапсулярной зоне; б – в около клубочковой области; в – в интерстиции в кортикальном слое

на активную пролиферацию эндотелия интерстиция (рис. бб, в).

### Обсуждение

Несмотря на полученные данные о том, что индуцированные ГАС ПК могут развиваться из отдельных клеток эндотелия и капиллярных структур, обнаруженных в нашем исследовании, нельзя исключить путь происхождения индуцированных ДМГ сосудистых опухолей в ПК из полипотентных мезенхимальных клеток. Можно также предположить, что 3-м источником возникновения этих опухолей может быть интерстиций, в котором мы выявили активную пролиферацию эндотелия.

Возможно, развитие неопластического васкулогенеза *de novo* и васкулогенеза в эмбриогенезе может иметь общие механизмы. Известно, что *VEGFA* – основной регулятор ангиогенеза. У мышей самым ранним маркером предшественников ангиобластов является *VEGFAR2 (flk1)*, в отсутствие которого эмбрионы погибают [9]. Связывание *VEGFA* с *VEGFAR2 (flk1)* запускает каскад сигнальных путей, что приводит к развитию новых сосудов, стимулирует их рост, выживание и пролиферацию и влияет на дифференцировку [8, 10, 11]. Существует ряд факторов, которые

играют роль в формировании и дифференцировке зрелых сосудов (ангиопоэтин 1, ангиопоэтин 2, bFGF, TGF $\beta$  и др.), а также могут усиливать активность *VEGFA* (например, фактор, индуцированный гипоксией 1 (HIF-1)) и, соответственно, влиять на неопластический васкулогенез. Известно, что Forkhead box D1 (Foxd1) играет существенную роль в эмбриональном васкулогенезе и развитии почки, в том числе ПК [12]. Кроме того, Foxd1-положительные мезенхимальные клетки развивающейся почки могут быть источником эндотелиальных предшественников, которые, вероятно, имеют решающее значение для формирования паттернов сосудистой сети [13]. Поскольку вопрос о существовании стволовых полипотентных клеток в ПК остается открытым, в дальнейших исследованиях для понимания механизмов образования сосудистых опухолей следует обратить внимание на изучение Foxd1-положительных клеток, а также экспрессию *VEGFA*, его рецепторов и других ангиогенных факторов.

### Заключение

Таким образом, нам удалось обнаружить в интактной фиброзной капсуле у самцов мышей линии СВА возможный альтернативный источник индуцированного ДМГ неопластического ангиогенеза – CD34-положительные

предшественники эндотелия и капилляры, в противоположность традиционным представлениям о происхождении клеток опухолевого эндотелия *de novo* путем дифференцировки из мезенхимальных полипотентных клеток. В процессе морфогенеза ГАС ПК, по-видимому, происходят фазовые изменения экспрессии антигена CD34,

закрывающиеся в частичном или полном отсутствии ее на начальных стадиях развития опухоли. Кроме того, мы показали, что мишенью канцерогена может стать не только капсула, но и эндотелий интерстиция кортикального слоя почки и субкапсулярная зона. Ранее этот эффект ДМГ не был описан.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests.** Authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чемерис Г.Ю. Влияние половых гормонов на индукцию ангиосарком почечной капсулы у мышей. Экспериментальная онкология 1989;11(2):71–2. [Chemeris G.Yu. Effect of sex hormones on the induction of renal capsule angiosarcoma in mice. Eksperimental'naya onkologiya = Experimental Oncology 1989;11(2):71–2. (In Russ.)].
2. Turusov V.S., Chemeris G.Y., Parfenov Y.D. Pararenal angiosarcoma induced in male mice by 1,2-dimethylhydrazine – a model for studying the role of androgens in chemical carcinogenesis. Carcinogenesis 1985;6(3):325–31.
3. Турусов В.С., Ланко Н.С. Параренальная ангиосаркома как проявление полового диморфизма в канцерогенезе. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1979;(7):74–5. [Turusov V.S., Lanko N.S. Pararenal angiosarcoma as a manifestation of sexual dimorphism in carcinogenesis. Bulletin' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 1979;(7):74–5. (In Russ.)].
4. Пожариский К.М., Кыштообаева А.Ш., Климашевский В.Ф., Чемерис Г.Ю. Морфология экспериментальной злокачественной гемангиоэндотелиомы. Вопросы онкологии 1990;36(3):321–7. [Pozhariskiy K.M., Kyshtoobaeva A.Sh., Klimashevskiy V.F., Chemeris G.Yu. Morphology of experimental malignant hemangiо-endothelioma. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 1990;36(3):321–7. (In Russ.)].
5. Billingsley E.D., Restrepo S. Kidney Sarcomas. In book: Medical radiology diagnostic imaging and radiation oncology. Eds.: A.L. Baert, Leuven K. Sartor, Heidelberg. Imaging of kidney cancer (Ed. Ali Guermazi). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. Pp. 145–159.
6. Пожариский К.М., Кыштообаева А.Ш., Климашевский В.Ф. и др. Морфогенез и гистогенез экспериментальной злокачественной гемангиоэндотелиомы. Вопросы онкологии 1990;36(4):440–8. [Pozhariskiy K.M., Kyshtoobaeva A.Sh., Klimashevskiy V.F. et al. Morphogenesis and histogenesis of experimental malignant hemangiоendothelioma. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 1990;36(4):440–8. (In Russ.)].
7. Морозова О.В., Карамышева А.Ф., Шавочкина Д.А. Экспрессия *VEGFA* в процессе индукции 1,2-диметилгидразином злокачественной гемангиоэндотелиомы почечной капсулы у мышей. Вопросы онкологии 2013;(6):766–70. [Morozova O.V., Karamysheva A.F., Shavochkina D.A. Expression of *VEGFA* during 1,2-dimethylhydrazine induction of malignant hemangiоendothelioma of renal capsule in mice. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 2013;(6):766–70. (In Russ.)].
8. Молекулярные механизмы ангиогенеза в физиологических и патологических процессах. Глава 10. В кн.: Введение в молекулярную медицину. Под ред. М.А. Пальцева. М.: Медицина, 2004. С. 469. [Molecular mechanisms of angiogenesis in physiological and pathological processes. Chapter 10. In book: Introduction to molecular medicine. Ed. M.A. Pal'tsev. Moscow: Meditsina, 2004. P. 469. (In Russ.)].
9. Coultas L., Chawengsaksophak K., Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. Nature 2005;438(7070):937–45.
10. Спринджук М.В. Ангиогенез. Морфология 2010;4(2):4–13. [Sprindzhuk M.V. Angiogenesis. Morfologiya = Morphology 2010;4(2):4–13. (In Russ.)].
11. Robert B., St John P.L., Hyink D.P., Abrahamson D.R. Evidence that embryonic kidney cells expressing flk1 are intrinsic, vasculogenic angioblasts. Am J Physiol 1996;271(3 Pt 2):744–53.
12. Levinson R.S., Batourina E., Choi C. et al. Foxd1-dependent signals control cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development. Development 2014;141:17–27.
13. Sims-Lucas S., Schaefer C., Bushnell D. et al. Endothelial progenitors exist within the kidney and lung mesenchyme. PLoS One 2013;8(6):e65993.

**Статья поступила:** 27.10.2017. **Принята в печать:** 09.11.2017.

**Article received:** 27.10.2017. **Accepted for publication:** 09.11.2017.