

*Kuzmin A.N., Giniyatullin R.U.,  
Kozel A.I., Astakhova L.V.*

## **THE INFLUENCE OF RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN AND LASER INFRARED RADIATION ON THE COURSE OF ISCHEMIC STROKE IN RATS**

*State Budgetary Institution Health Center provide  
specialized medical care «Chelyabinsk State  
Institute of Laser Surgery» by the Ministry of  
Health of Chelyabinsk region, Chelyabinsk, Russian  
Federation*

**Abstract.** The dynamics of morphological changes in the focus of the experimental cerebral ischemia in rats exposed to recombinant erythropoietin and laser radiation is assessed. It is shown that the combined effect of the drug with the physical factor increases in the early stages of practicing tolerance to hypoxic damage to neurons, significantly reduces infarct area, enhances the proliferation of endothelial cells to the development of the new vascular bed. This is followed by an earlier regression of neurological disorders, behavioral improvement in experimental animals. On the basis of experimental findings it is possible to conclude:

1. The effect of Recombinant EPO in combination with laser radiation significantly reduces infarct area, enhances the proliferation of endothelial cells and angiogenesis in the early stages of trials.

2. These structural changes are accompanied by earlier regression of neurological disorders and behavioral improvement in experimental models of animals.

**Keywords:** brain; ischemia; Recombinant erythropoietin; laser radiation

### REFERENCES

1. Gusev E. I., Skvortsova V.I., Martynov M. Y., Kamchatnov P.R. Cerebral stroke: Problems and Solutions. Herald RGMU.- 2006. - № 4. - P. 28- 32.
2. Siren A. L., Fratelli M., Brines M. et. al. Erythropoietin prevents

neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -2001. -V. 98. -P. 4044-4049.

3. Wang L., Zhang Z., Wang Y., Zhang R., Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. Stroke. -2004. -V. 35. -P. 1732-1737.

4. Kozel A.I., Popov G. K., Giniyatullin R. U. , Astakhova L. V., Kuzmin A. N., Ignatieva E. N., Kravchenko T.G. Method for treating of cerebral ischemia in experiment : RF Patent № 2495688 from 20.10.2013.

5. Mchedlishvili G. I. Modeling diseases of the central nervous system . Modeling diseases. Edited by S. V. Andreev. -M.: Medicine , 1973 . -P. 79-81.

6. Volchegorsky I. A., Dolgushin I. I., Kolesnikov O. L., Tseilikman V.E., Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions. – Chelyabinsk: CSPU Publisher, 2000. –P. 25- 33.

### Authors

Kuzmin Andrey N.  
State Budget Institution of Health Regional Clinical Hospital №3  
Chairman of the Department of Neurosurgery  
Russian Federation, Chelyabinsk, Prospekt Pobedy 287, 454021  
ak\_n@rambler.ru

Giniyatullin Ravil U.  
State Budget Institution of Health Center to provide specialized medical care,  
«Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery»

Ph.D., M.Sc., Professor, Vice Director  
Chelyabinsk, Russian Federation, Prospekt Pobedy 287, 454021  
main@cgilh.chel.su

Kozel Arnold I.  
State Budget Institution of Health Center to provide specialized medical care,  
«Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery»  
Ph.D., M.Sc., Professor, Director  
Chelyabinsk, Russian Federation, Prospekt Pobedy 287, 454021

Astakhova Lyudmila V.  
State Budget Institution of Health Center to provide specialized medical care,  
«Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery»  
Ph.D., Head of the Department of the Scientific Research  
Chelyabinsk, Russian Federation, Prospekt Pobedy 287, 454021

УДК 576.524

## *Сазонов С.В., Засадкевич Ю.М., Бриллиант А.А., Самодуров А.С., Казанцева Н.В.* **РОЛЬ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ E- И P-КАДГЕРИНОВ, А ТАКЖЕ B- И P120-КАТЕНИНОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий;  
ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация

**Резюме.** Изучены особенности экспрессии молекул клеточной адгезии E- и P-кадгеринов и ассоциированных с ними  $\beta$ - и p120-катенинов в эпителиальных клетках молочной железы. В исследуемую группу вошли 30 случаев интактной ткани молочной железы, взятых от пациенток с диагнозами, исключающими рак молочной железы. Экспрессию кадгеринов и ассоциированных с ними молекул на клетках молочной железы определяли при помощи иммуногистохимического метода с использованием специфических антител. В большинстве случаев (97%) обнаружена экспрессия E-кадгерина в клетках однослойного столбчатого эпителия. Экспрессия P-кадгерина обнаружена в миоэпителиальных клетках в 100% случаев. Ассоциированные с E- и P-кадгеринами  $\beta$ - и p120-катенины экспрессировались в обоих типах эпителиальных и миоэпителиальных клетках всех случаев. Экспрессия эпителиальных кадгеринов, а также  $\beta$ - и p120-катенинов необходима для поддержания межклеточной адгезии эпителиальных клеток, а также для реализации сигнальных путей, обеспечивающих регуляцию дифференцировки и пролиферации клеток.

**Ключевые слова:** E-кадгерин, P-кадгерин, катенины, клеточная адгезия

### Введение

Молочные железы являются видоизмененными потовыми железами. Они формируются в процессе эмбриогенеза из эктодермы путем впячивания эпидермиса. Протоки молочной железы представлены клетками однослойного кубического или столбчатого эпителия, образующими между собой адгезионные контакты при помощи молекул E-кадгерина — белка межклеточной адгезии, обеспечивающего гомофильную связь между эпителиоцитами. Под однослойным эпителием залегает слой миоэпителиальных клеток, который образуется путём дифференцировки сар-клеток и играет важную роль при лактации, а также необходим для поддержания фенотипа протоков. Для миоэпителиальных клеток характерна экспрессия P-кадгерина, обеспечивающего адгезию между миоэпителиоцитами. Кроме того, эпителиальные E- и P-кадгеринины играют важную роль в регуляции дифференцировки и пролиферации эпителиальных клеток за счет образования комплексов с молекулами  $\beta$ - и p120-катенинов (т.н. кадгерин-катениновые комплексы) и их участия во внутриклеточных регуляторных механизмах [1–4].

Нарушение экспрессии эпителиальных кадгеринов приводит к

дизинтеграции кадгерин-катениновых комплексов, в результате чего происходит высвобождение сигнальных молекул  $\beta$ - и p120-катенинов из комплекса и запуск нескольких сигнальных путей, таких как канонический сигнальный путь Wnt и сигнальный путь с участием Rho GTPаз. Активация указанных сигнальных путей приводит, главным образом, к увеличению пролиферации и миграции клеток, что имеет значение для функционирования молочной железы, а также регенерации поврежденного эпителия [5, 6].

**Целью нашего исследования** было изучить экспрессию эпителиальных E- и P-кадгеринов, а также  $\beta$ - и p120-катенинов кадгерин-катениновых комплексов в неизменной ткани молочной железы.

#### Материалы и методы

Материал отбирался в патологоанатомической лаборатории Свердловского областного онкологического диспансера. Исследовался постоперационный материал пациенток с подтвержденным диагнозом доброкачественного заболевания молочной железы в пределах здоровой ткани. Отбор материала производился врачом патологоанатомом. Были изучены 30 соответствующих случаев. Исследование проводилось на базе ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий с использованием иммуногистохимического метода. Для определения экспрессии E-кадгерина использовались кроличьи моноклональные античеловеческие антитела E-cadherin (Clone EP700Y, Cell Marque, США), P-кадгерина — мышинные моноклональные античеловеческие антитела P-cadherin (Clone 56C1, Monosan, Нидерланды),  $\beta$ -катенина - мышинные моноклональные античеловеческие антитела  $\beta$ -catenin (Clone 14, Ventana, США), p120-катенина — мышинные моноклональные античеловеческие антитела p120 catenin (Clone 98, Ventana, США). Иммуногистохимические реакции проводились в автостейнере "DAKO" (Дания) с использованием буфера Dako Wash Buffer, системы визуализации Dako EnVision+Dual Link System-HRP, хромогена Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System фирмы (DAKO, Дания). Для оценки реакций использовался микроскоп "Zeiss Imager M" (Германия).

Оценка окрашивания осуществлялась полуколичественным методом. Экспрессия E-кадгерина оценивалась как положительная при окрашивании  $\geq 70\%$  мембран исследуемых клеток [7]. Наличие экспрессии P-кадгерина определялось при мембранном окрашивании  $>10\%$  эпителиальных клеток [8-11]. Экспрессия  $\beta$ -катенина считалась положительной при окрашивании  $>10\%$  клеток эпителия [12]. Экспрессия p120-катенина считалась положительной при цитоплазматическом окрашивании  $>10\%$  эпителиальных клеток [13].

#### Результаты и обсуждение

Нами изучена экспрессия E- и P-кадгерина и ассоциированных с ними  $\beta$ - и p120-катенинов. В клетках однослойного кубического эпителия наличие экспрессии E-кадгерина на мембране было выявлено в 29 (97%) случаях (рис. 1), экспрессия P-кадгерина не была обнаружена ни в одном случае. Экспрессия белков  $\beta$ - и p120-катенинов была выявлена во всех 30 случаях (рис. 2, 3). Таким образом, клетки однослойного эпителия образуют между собой адгезионные связи при помощи молекул E-кадгерина, внутриклеточный домен которого формирует комплекс с молекулами  $\beta$ - и p120-катенинов, образуя E-кадгерин-катениновые комплексы.

В миоэпителиальных клетках экспрессия E-кадгерина обнаружена не была, в то время, как экспрессия P-кадгерина наблюдалась во всех 30 случаях (рис. 4). Экспрессия молекул  $\beta$ - и p120-катенинов на мембране миоэпителиальных клеток, была выявлена во всех 30 случаях. Полученные данные означают, что адгезию между миоэпителиоцитами обеспечивают молекулы P-кадгерина, внутриклеточный домен которого образует P-кадгерин-катениновые комплексы с  $\beta$ - и p120-катенинами.

Существование кадгерин-катениновых комплексов играет важную роль в морфогенезе, формировании и поддержании клеточных пластов, а также обеспечивает регулируемую подвижность, миграцию и пролиферацию клеток. Экспрессия E- и P-кадгеринов на мембране эпителиальных клеток обеспечивает формирование двух слоев в стенке протока молочной железы – слоя эпителиаль-

ных клеток, обращенных к просвету протока и подлежащего слоя миоэпителиальных клеток. Такая структура имеет важное значение для функционирования молочной железы. Так, при лактации, эпителиальные железистые клетки обеспечивают секрецию молока в просвет протока, а миоэпителиальные клетки, сокращаясь, выталкивают его из молочной железы.

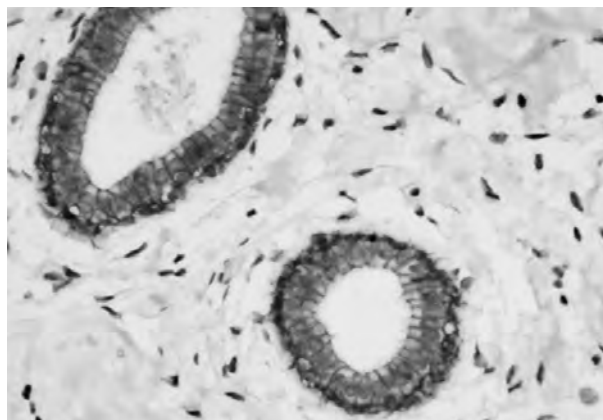


Рисунок 1. Экспрессия E-кадгерина в интактной ткани молочной железы, x400.

Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера

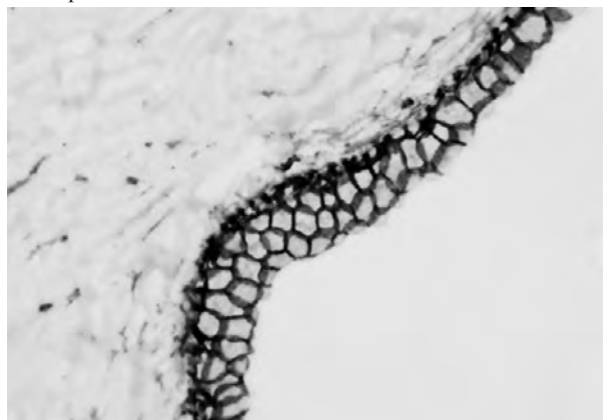


Рисунок 2. Экспрессия  $\beta$ -катенина в интактной ткани молочной железы, x400.

Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера

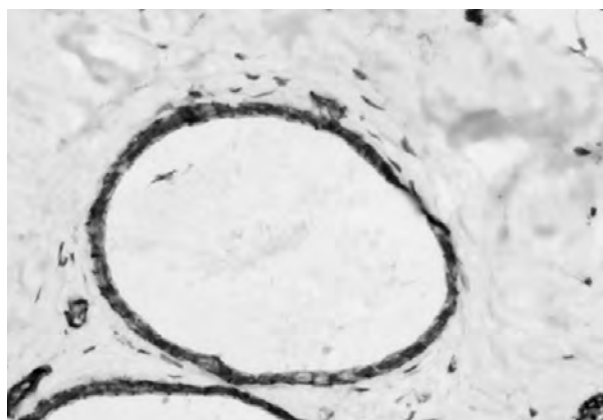


Рисунок 3. Экспрессия p120-катенина в интактной ткани молочной железы, x100.

Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера

Помимо этого,  $\beta$ - и p120-катенины кадгерин-катениновых комплексов участвуют в функционировании внутриклеточных сиг-

нальных путей, таких как канонический сигнальный путь Wnt и сигнальный путь с участием Rho ГТФаз [5, 6].

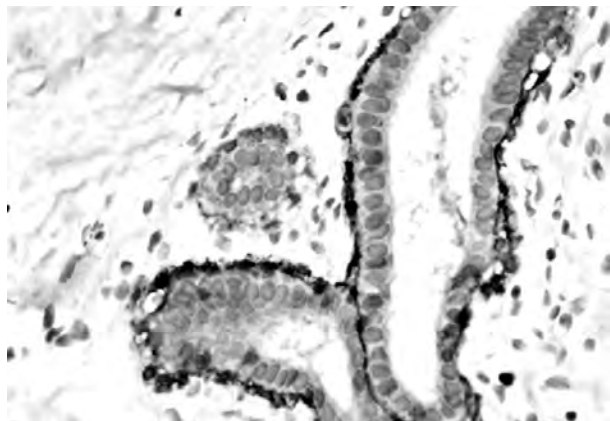


Рисунок 4. Экспрессия Р-кадгерина в интактной ткани молочной железы, х400.

Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера

В основе канонического пути Wnt лежит изменение концентрации цитоплазматического белка  $\beta$ -катенина. В норме  $\beta$ -катенин связан в прочный кадгерин-катениновый комплекс. При нарушении экспрессии E-кадгерина свободная цитозольная форма  $\beta$ -катенина в норме связывается с аксином, фосфорилируется гликогенсинтазакиназой 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) сигнального комплекса APC-аксин-казеинкиназа 1 и впоследствии утилизируется при помощи убиквитин-протеосом. При активированном сигнальном пути Wnt, приводит снижение скорости деградации  $\beta$ -катенина. Свободная форма  $\beta$ -катенина перемещается в ядро и активирует гены, ответственные за пролиферацию клеток [14,15].

Кроме того, дестабилизация кадгерин-катениновых комплексов ведет к накоплению в цитоплазме p120-катенинов, что приводит к дезактивации белка RhoA, регулирующего прочность цитоскелета, а также к активации белков Rac1 и Cdc42, отвечающих за образование ламеллоподий, обеспечивающих подвижность клеток [16, 17].

Таким образом, связывание  $\beta$ - и p120-катенинов в кадгерин-катениновые комплексы играет важную роль для регуляции нормального функционирования клеток молочной железы.

#### Заключение

В различных эпителиальных клетках молочной железы экспрессируются два типа эпителиальных кадгерининов: E- и P-кадгерининов. Это обеспечивает формирование двух функционально различающихся слоев в стенке протока молочной железы, что имеет огромное значение в оптимальном функционировании молочной железы.

Белки  $\beta$ - и p120-катенины экспрессируются во всех эпителиальных клетках. Они необходимы для образования кадгерин-катениновых комплексов, которые стабилизируют структуру кадгерининов посредством связывания их с актиновым цитоскелетом, а также участвуют в ряде внутриклеточных сигнальных путей, способствуя пролиферации, миграции и дифференцировке эпителиальных клеток молочной железы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Karen A.K., Margaret J.W. Cadherins and the Mammary Gland// *Journal of Cellular Biochemistry* 95:488–496 (2005)
2. Jennifer L.A., Alvin C.K. Julie R.H. The role and function of cadherins in the mammary gland// *Breast Cancer Research* 2012, 14:203
3. Albergaria A., Ribeiro A.S., Vieira A.F., et al. P-cadherin role in normal breast development and cancer// *Int.J.Dev.Biol.*-2011.-N55.-P.811-822.
4. Засадкевич Ю.М., Сазонов С.В. Роль молекулы клеточной адгезии E-кадгерина в онтогенезе человека в норме и патологии// *Морфология.*-2014.-Т.146.-№5.-с. 78-82.
5. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. Molecular portraits of human

breast tumours//*Nature.*-2000.- V.406.-N6797.-P.747-52.

6. Paredes J., Figueiredo J., Albergaria A., et al. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer// *Biochimica et Biophysica Acta.*-2012.-N1826.-P.297-311.

7. Kowalski P.J., Rubin M.A., Kleer C.G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases// *Breast Cancer Research.*-2003.-N5.-P.217-222.

8. Vieira A.F., Ricardo S., Ablett M.P. et al. P-cadherin is coexpressed with CD44 and CD49f and mediates stem cell properties in Basal-like breast cancer// *Stem cells.*-2012.-N30.-P.854-864.

9. Faria G., Cardoso M.J., Martins D., et al. P-cadherin as prognostic factor for loco-regional relapse in breast cancer// *Acta Med Port.*-2012.-V.25.-N2.-P.97-105.

10. Paredes J., Albergaria A., Oliveira J.T. et al. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation// *Clin Cancer Res.*-2005.-N11.-P.5869-5877.

11. Paredes J., Milanezi F., Viegas L. et al. P-cadherin expression is associated with high-grade ductal carcinoma in situ of the breast// *Virchows Arch.*-2002.-N44.-P.16-21.

12. Ikeda S., Fujimori M., Shibata S. et al. Combined immunocytochemistry of  $\beta$ -catenin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 is useful in discriminating primary lung adenocarcinomas from metastatic colorectal cancer// *BMC Cancer.*-2006.-V.6.-N31.

13. Liu Y., Wang Y., Zhang Y., et al. Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer// *Lung Cancer.*-2009.-N63.-P.375-382.

14. Ribeiro A.S., Sousa B., Carreto L. et al. P-cadherin role is dependent on E-cadherin cellular context: a proof of concept using the breast cancer model// *J Pathol.*-2013.-N229.-P.705-718.

15. Li D.-M., Feng Y.-M. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets// *Breast Cancer Res Treat.*-2011.-N128.-P.7-21.

16. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer// *J Clin Oncol.*-2007.-N25.-P.118-145.

17. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis// *Mod. Pathol.*-1998.-N89.-P.111-117.

Авторская справка  
Сазонов Сергей Владимирович  
д. м. н., профессор  
prof-ssazonov@yandex.ru

Засадкевич Юлия Михайловна  
yulkat@bk.ru

Бриллиант Александр Александрович  
к. б. н.  
alex\_brilliant@mail.ru

Самодуров Андрей Сергеевич  
an\_d\_r\_ew@mail.ru

Казанцева Наталья Владимировна

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий  
Лаборатория патоморфологии  
Российская Федерация, 620036, г. Екатеринбург, ул. Соболева, 25

ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет  
кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии  
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

*Sazonov S.V., Zasadkevich Y.M., Brilliant A.A.,  
Samodurov A.S., Kazantseva N.V.*

## **THE ROLE OF EPITHELIAL E- AND P-CADHERINS, AND ALSO ASSOCIATED WITH THEM B- AND P120-CATENINS IN THE MAMMARY GLAND FUNCTIONING**

Institute of Medical Cell Technologies,

Yekaterinburg, Russian Federation;

Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the research was to study expression of epithelial E- and P-cadherins, as well as  $\beta$ - and p120-catenins in epithelial cells of mammary gland. Presence of E-cadherin expression in the luminal epithelial cells was found in 98% cases, but none of the cells express P-cadherin. In myoepithelial cells the expression of P-cadherin was found in 96% cases, but E-cadherin expression was not found. The expression of  $\beta$ - and p120-catenins was found in both types of tissues in 100% cases.

Thus, different epithelial cells express different types of cadherins. This ensures the formation of two functionally different layers in the wall of the duct of the mammary gland. E-and P-cadherin play the important role in the functioning of the mammary gland.  $\beta$ - and p120-catenins express in all epithelial cells. They are necessary for the formation of cadherin-catenin complexes that stabilize the structure of cadherin by linking them to the actin filaments and participate in several signal pathways, the main of which is the canonical Wnt signaling pathway.

**Keywords:** E-cadherin, P-cadherin, catenins, cell adhesion

### REFERENCES

1. Karen A.K., Margaret J.W. Cadherins and the Mammary Gland. *Journal of Cellular Biochemistry* 95:488–496 (2005)

2. Jennifer L.A., Alvin C.K. Julie R.H. The role and function of cadherins in the mammary gland. *Breast Cancer Research* 2012, 14:203

3. Albergaria A., Ribeiro A.S., Vieira A.F., et al. P-cadherin role in normal breast development and cancer. *Int.J.Dev.Biol.*-2011.-N55.-P.811-822.

4. Zasadkevich Y.M., Sazonov S.V. The Role of E-cadherin cell adhesion molecule in human ontogenesis in norm and pathology. *Morphology*.-2014.-V.146.-N5.-p.78-82.

5. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*.-2000.- V.406.-N6797.-P.747-52.

6. Paredes J., Figueiredo J., Albergaria A., et al. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*.-2012.-N1826.-P.297-311.

7. Kowalski P.J., Rubin M.A., Kleer C.G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Research*.-2003.-N5.-P.217-222.

8. Vieira A.F., Ricardo S., Ablett M.P. et al. P-cadherin is coexpressed with CD44 and CD49f and mediates stem cell properties in Basal-like breast cancer. *Stem cells*.-2012.-N30.-P.854-864.

9. Faria G., Cardoso M.J., Martins D., et al. P-cadherin as prognostic factor for loco-regional relapse in breast cancer. *Acta Med Port*.-2012.-V.25.-N2.-P.97-105.

10. Paredes J., Albergaria A., Oliveira J.T. et al. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res*.-2005.-N11.-P.5869-5877.

11. Paredes J., Milanezi F., Viegas L. et al. P-cadherin expression is associated with high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *Virchows Arch*.-2002.-N44.-P.16-21.

12. Ikeda S., Fujimori M., Shibata S. et al. Combined immunochemistry of  $\beta$ -catenin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 is useful in discriminating primary lung adenocarcinomas from metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*.-2006.-V.6.-N31.

13. Liu Y., Wang Y., Zhang Y., et al. Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer. *Lung Cancer*.-2009.-

N63.-P.375-382.

14. Ribeiro A.S., Sousa B., Carreto L. et al. P-cadherin role is dependent on E-cadherin cellular context: a proof of concept using the breast cancer model. *J Pathol*.-2013.-N229.-P.705-718.

15. Li D.-M., Feng Y.-M. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast Cancer Res Treat*.-2011.-N128.-P.7-21.

16. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N. et al. American Society of Clinical Oncology. College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*.-2007.-N25.-P.118-145.

17. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol*.-1998.-N89.-P.111-117.

### Authors

Sazonov Sergey V.

MD, professor, the Head of the department of histology, cytology and embryology laboratory of pathomorphology  
prof-ssazonov@yandex.ru

Zasadkevich Yulia M.

researcher  
yulkat@bk.ru

Brilliant Aleksandr A.

PhD, senior researcher  
alex\_brilliant@mail.ru

Samodurov Andrey S.

student, researcher  
an\_d\_r\_ew@mail.ru

Kazantseva Natalia V.

doctor of and the laboratory of pathomorphology

Government Budget Educational Organization «Ural State Medical University» of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Department of histology, cytology and embryology 620028 Repina str.,3, Yekaterinburg, Russian Federation  
Government Autonomic Healthcare Organization of Sverdlovsk Region «Institute of Medical Cell Technologies» 620137, Vilonova str., 76a, Yekaterinburg, Russian Federation  
imct@celltechnologies.ru