

Л.М. Шлапацька
І.А. Захарова
С.В. Міхалап
Л.М. Ковалевська
Г.Г. Бердова
О.В. Юрченко
Л.А. Налескіна
С.П. Сидоренко

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: рак молочної залози, протеїнкіназа D, ядерний антиген проліферуючих клітин, Р-глікопротеїн.

ЕКСПРЕСІЯ ПРОТЕЇНКІНАЗ D1 І D2 У ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Резюме. У роботі вперше вивчено рівень експресії кіназ PKD1 і PKD2 (PKD1/2) та їх аутофосфорильовання/активації (pPKD1/2) в пухлинних клітинах 40 хворих на рак молочної залози (PM3) з урахуванням гістологічного типу пухлини, ступеня злоякісності, віку хворих та стадії захворювання. Встановлено, що варіабельність числа клітин хворих на PM3, які експресують pPKD1/2, на відміну від кількості PKD1/2⁺-клітин, залежить від гістологічного типу та ступеня диференціації пухлин. Не виявлено кореляцію між рівнем активації PKD1/2 та показниками експресії Р-глікопротеїна, а також ядерного антигену проліферуючих клітин, що визначається моноклональними антитілами IPO-38.

Молекулярно-генетичні дослідження в онкології відносяться до пріоритетних напрямків сучасної фундаментальної науки, результати яких знаходять впровадження в клінічній практиці. Визначення молекулярно-генетичних маркерів дозволяє оптимізувати стратегію і тактику індивідуалізованого лікування хворих, а також проводити моніторинг його результатів. Одними із нових молекулярних маркерів, що можуть характеризувати ріст та метастазування пухлин, є протеїнкінази D (PKD).

До родини PKD належать серин-треонінкінази PKD1/PKC μ , PKD2 та PKD3/PKC ν , які експресуються в клітинах ссавців, мають високу структурну гомологію і схожі за механізмами активації. Нещодавно їх було віднесено до групи кальцій-кальмодулінзалежних кіназ [1]. Протеїнкінази цієї родини приймають участь у регуляції проліферації клітин, апоптозу, реакцій на оксидативний стрес, адгезії та рухливості клітин [2–6]. Кінази родини PKD регулюють функції клітин шляхом модуляції низки клітинних сигнальних каскадів, асоційованих з протеїнкіназами ERK і JNK. Крім того, PKD регулюють функціонування апарату Гольджі, організацію цитоскелету, епігенетичний контроль експресії генів (організацію хроматина та релокалізацію гістонових деацетилаз), а також активацію ядерного фактора транскрипції NF- κ B [7–12].

Участь кіназ родини PKD у регуляції проліферації та функціональної активності клітин викликала зацікавленість онкологів. Так, на моделі раку передміхурової залози встановлено, що E-кадгерин, який залучений в процес агрегації та адгезії пухлинних клітин, взаємодіє з PKD1 і є її субстратом [6, 13]. Пригнічення активності PKD1 у лініях клітин, що походять з раку простати, призводить до зниження агрегації клітин, і навпаки, гіперекспресія PKD1 підвищує адгезивні та інвазивні властивості клітин [6]. Більш того, кіназний домен PKD1 безпосередньо взаємодіє з бета-катеніном [6, 14] — ще одним представником

кадгерін-катенінового білкового комплексу, який бере участь у Wnt (Wingless type) сигнальному каскаді, асоційованому з проліферацією клітин. Прямим доказом участі PKD1 в процесах клітинної адгезії є блокування процесу фокальної адгезії клітин фібробластів NIH 3T3 як наслідок порушення безпосередньої взаємодії PKD1 з альфа-бета3-інтегрином [15]. На сьогодні існують дані стосовно експресії PKD1 в клітинах ліній, що походять з пухлинних клітин хворих на рак молочної залози (PM3) [16, 17], які підтверджують участь PKD1 у процесах адгезії злоякісних клітин. PKD1 транслокується з цитозоля до мембрани у відповідь на інкубацію клітин лінії MDA-MB-435 з *cis*-поліненасиченою жирною кислотою (*cis*-PUFA), що в подальшому приводить до підвищення активності бета-1-інтегринів [17]. Більше того, PKD, кортактин і паксилін формують протеїновий комплекс, утворення якого в інвадоподіях корелює з інвазивним фенотипом пухлинних клітин при PM3 [17]. У той же час зовсім не вивчена експресія PKD кіназ в первинних пухлинах молочної залози. Метою нашої роботи було вивчення експресії кіназ PKD1 і PKD2 та рівня їх аутофосфорильовання/активації в пухлинних клітинах хворих на PM3 з урахуванням деяких біологічних характеристик злоякісних клітин.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі були використані операційні зразки пухлин молочної залози 40 хворих віком від 36 до 78 років, які попередньо не отримували протипухлинної терапії і знаходились на лікуванні у науководослідному відділі пухлин молочної залози Інституту онкології АМН України (нині ДУ «Національний інститут раку»). Розподіл досліджених випадків PM3 проводили з урахуванням гістологічного типу пухлин та ступеня їх диференціації. Найбільшу групу склали 26 хворих на інфільтративний протоковий рак молочної залози (ІП PM3). Другою по чисельності була група хворих на інфільтративний дольковий рак мо-

лочної залози (ІД РМЗ) — 9 випадків. 5 випадків виділили в окрему групу інвазивного низькодиференційованого раку молочної залози (ІНД РМЗ). Морфологічні дослідження проводили на парафінових зрізах тканин, забарвлених гематоксилін-еозинном. Для з'ясування прогнозу перебігу захворювання важливе значення має визначення ступеня диференціації пухлин (G), який визначали згідно з градацією за Bloom (1957) та Нотінгемською модифікацією за Ellston та Ellis (1991). Низький ступінь диференціації (G3) відзначено у 7 хворих на ІП РМЗ віком від 45 до 71 року. В інших випадках РМЗ встановлено помірний (G2) та високий (G1) ступінь диференціації пухлин. Згідно з TNM-системою класифікації пухлин, затвердженою American Joint Committee on Cancer (AJCC) та International Union Against Cancer (IUAC) у 1989 р., хворі були розподілені наступним чином: T2N1M0 — 23; T2N2M0 — 10; T4N3M0 — 1, T3N1M0, T2N0M0, T3N2M0 — по 2 хворі.

Оскільки для оцінки рівня експресії та фосфорильовання кіназ в тканинах оптимальним є аналіз цих параметрів в окремих клітинах, нами було використано імуногістохімічний метод. Надзвичайно висока структурна та функціональна гомологія PKD1 та PKD2 не дозволяє диференціювати ці кінази методами імуногістохімії. Тому нами вивчався загальний рівень експресії та аутофосфорильовання/активації кіназ PKD1 та PKD2 (PKD1/2) з використанням антитіл, що розпізнають обидві кінази. Імуногістохімічні дослідження проводили на зразках пухлинної тканини хворих на РМЗ, видаленій під час оперативного втручання, з використанням імунопероксидазного методу та системи візуалізації EnVision («Dako Cytomation», Данія). Реакцію проводили за стандартною методикою на парафінових зрізах [18]. Експресію PKD1/2 та аутофосфорильовану форму цих кіназ визначали за допомогою специфічних кролячих поліклональних антитіл анти-PKD1/2 та анти-rPKD1/2, що були люб'язно надані проф. Ван Лінтом (Бельгія) [19].

Оцінку проліферативного потенціалу пухлини проводили із застосуванням MkAT IPO-38, які виявляють ядерний антиген проліферуючих клітин [20]. Продукт гена множинної лікарської резистентності Р-глікопротеїн (Р-gp) визначали з використанням MkAT, клон 4Е3 («Dako Cytomation», Данія). При кожному дослідженні в якості позитивного контролю застосовували MkAT до цитокератину (ІЕПОР, Україна), а негативного контролю — MkAT анти-CD45 (ІЕПОР, Україна). Рівень експресії досліджуваних кіназ і їх фосфорильованих форм, ядерного антигену проліферуючих клітин та Р-gp визначали за інтенсивністю забарвлення продукту імуногістохімічної реакції і оцінювали як негативний, низький, помірний або високий. Результат кожної імуногістохімічної реакції обчислювали за кількістю клітин з позитивною реакцією на 1000 клітин досліджуваного зразка і виражали в процентах. Аналіз взаємозв'язку між певними показниками проводили з врахуванням коефіцієнта рангової кореляції Spearman (r).

Результати імуногістохімічного дослідження експресії PKD1/2 кіназ у зрізах пухлинної тканини хворих на РМЗ свідчать про високий рівень експресії у всіх вивчених випадках незалежно від гістологічного типу пухлини, ступеня злоякісності, віку хворих та стадії захворювання за системою TNM. PKD1/2 була експресована в 50–100% пухлинних клітин, при цьому у 87,5% хворих на РМЗ PKD1/2 виявляли у цитоплазмі 80–100% клітин.

Аналіз результатів імуногістохімічних досліджень експресії аутофосфорильованої/активованої PKD1/2 свідчить про гетерогенність показників її експресії у хворих на ІП РМЗ та ІД РМЗ. Нами відзначено 3 типи реакції: відсутність експресії rPKD1/2, або виявлення rPKD1/2 в незначній кількості пухлинних клітин — 5–20% (рисунок, а); інтенсивна позитивна реакція в 50–70% пухлинних клітин (рисунок, б); в абсолютній більшості пухлинних клітин (80–100%) наявне аутофосфорильовання PKD1/2 (рисунок, в). Варіабельність числа клітин хворих на РМЗ, що експресують rPKD1/2 в межах від 0 до 100% стала передумовою для визначення значущих клінічних характеристик захворювання та біологічних маркерів клітин, що асоціюються з певною кількістю rPKD1/2⁺-клітин.

Попередньо в групі хворих на ІП РМЗ не встановлено кореляційного зв'язку між експресією PKD1/2 та рівнем її активації ($r = -0,1$ $p > 0,05$). Проте ми вважали за доцільне виділити серед хворих на ІП РМЗ окрему групу пацієнтів віком від 42 до 78 років, у яких при дослідженні аутофосфорильовання PKD1/2 реакція була негативною, або кількість rPKD1/2⁺-пухлинних клітин не перевищувала 20% (34,6% випадків), тоді як кількість PKD1/2⁺-клітин дорівнювала 50–100%. Зазначимо, що цю групу склали 9 хворих на РМЗ T2N1M0 (33,3%), T2N2M0 (33,3%), T3N1M0 (22,2%) і T4N3M0 (11,2%) стадій. У більшості з них відзначено низький ступінь диференціації пухлин (G3) і лише у 2 (22,2%) — помірний та високий. При аналізі зразків пухлинної тканини хворих на ІП РМЗ з низькою або відсутньою експресією rPKD1/2 встановлено обернений сильний кореляційний зв'язок між кількістю rPKD1/2⁺ і PKD1/2⁺-клітин ($r = -0,7$) та достовірну різницю між показниками rPKD1/2 і PKD1/2 ($p < 0,05$). Другу групу склали 17 хворих у віці від 36 до 76 років на ІП РМЗ T2N1M0 (64,7%), T2N2M0 (23,5%), T3N2M0 (11,8%) стадій, у яких при виявленні rPKD1/2 кількість позитивних пухлинних клітин становила 60–100%, а показники експресії PKD1/2 знаходились у діапазоні від 80% до 100%. Треба зазначити, що у всіх досліджених випадках кількість PKD1/2⁺-клітин завжди перевищувала число rPKD1/2⁺-клітин. В пухлинах цих хворих були встановлені кореляційний зв'язок між експресією PKD1/2 та rPKD1/2 ($r = -0,6$) та достовірна різниця між числом rPKD1/2⁺ і PKD1/2⁺-клітин ($p < 0,05$). Слід зауважити, що в обох групах хворих на ІП РМЗ відзначено різний характер

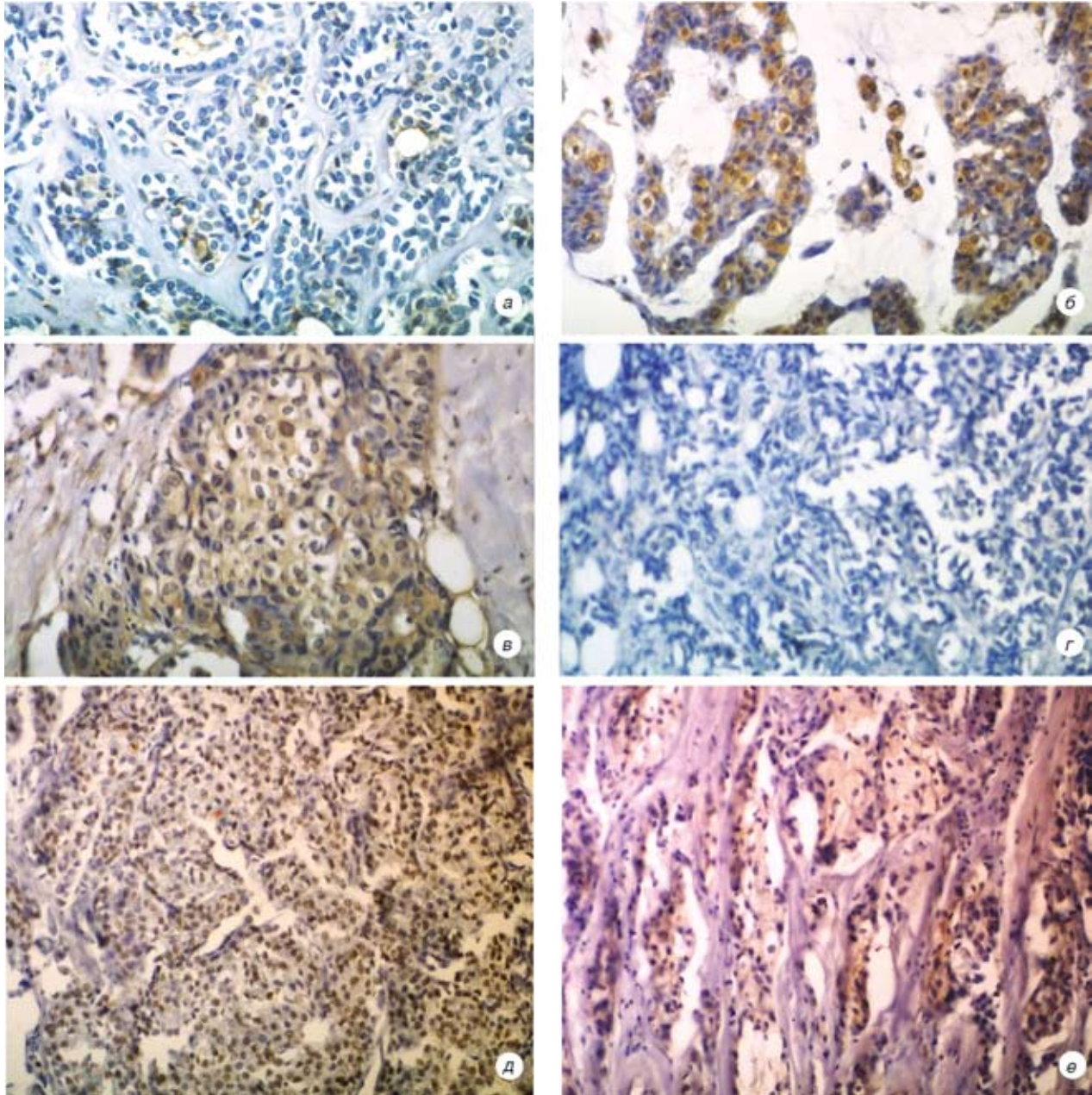


Рисунок. Імуногістохімічне дослідження експресії рPKD1/2 в пухлинах хворих на ІП РМЗ (а, б, в) (х 400) та ІНД РМЗ (г) (х 200); експресії ядерного антигену проліферуючих клітин (д) (х 200) та Р-gr (е) (х 200) в пухлинних клітинах хворих на ІП РМЗ

росту пухлин — солідний, папілярний та скіррозний, проте залежності експресії PKD1/2 та рPKD1/2 від гістологічної будови ІП РМЗ не встановлено. У всіх досліджуваних випадках у лімфоцитах, які інфільтрують пухлину, нами констатовано позитивну реакцію з антитілами анти-рPKD1/2 та анти-PKD1/2.

Експресію рPKD1/2 в пухлинних клітинах хворих (віком від 37 до 58 років) на ІД РМЗ T2N1M0 і T2N2M0 стадій виявляли в 20–100% клітин. Зазначимо, що у 8 з 9 пацієнток з ІД РМЗ, для якого є характерним більш сприятливий перебіг захворювання (порівняно з ІНД та ІП РМЗ), в 60–100% пухлинних клітин відзначено високий рівень експресії рPKD1/2. Лише в 1 випадку аутофосфорильовання PKD1/2 виявлено лише в 20% клітин. Враховуючи те, що кількість PKD1/2⁺-клітин при ІД РМЗ становила 70–

100%, була виявлена пряма кореляційна залежність між PKD1/2 та рPKD1/2 ($r = 0,55$, $p > 0,05$).

Найменш чисельну групу в наших дослідженнях склали хворі віком від 46 до 62 років, у яких було діагностовано ІНД РМЗ (стадії T1N1M0 та T2N1M0). Результати імуногістохімічних досліджень показали, що у 4 хворих пухлинні клітини не містять фосфорильовану по сайту аутофосфорильовання PKD1/2 (рисунок, г), тоді як експресія PKD1/2 виявлена в 80–100% клітин. Лише в 1 випадку кількість рPKD1/2⁺-клітин становила 20%. Аналіз кореляційних зв'язків між експресією PKD1/2 та рPKD1/2 в пухлинних клітинах хворих на ІНД РМЗ показав обернену високу кореляційну залежність ($r = -0,8$), хоча різниця між цими показниками була недостовірною ($p > 0,05$), що можливо обумовлено невеликою кількістю досліджуваних випадків.

Таким чином, аналіз одержаних результатів імуногістохімічних досліджень показав, що рівень експресії pPKD1/2 у пухлинних клітинах хворих на РМЗ не залежить від віку хворих та стадії пухлинного процесу. Варіабельність показників pPKD1/2 залежить від гістологічного варіанта РМЗ та ступеня диференціації пухлини. Встановлено, що PKD1/2 знаходиться у неактивному (нефосфорильованому стані) у пухлинних клітинах хворих на ІНД та ІП РМЗ з низьким ступенем диференціації.

Оскільки в експериментальних системах *in vitro* був виявлений зв'язок між активністю PKD1/2 та сигнальними каскадами, що регулюють проліферацію клітин, нами був проведений аналіз рівня аутофосфорильовання PKD1/2 з урахуванням експресії ядерного антигену проліферуючих клітин, що визначається МкАТ ІПО-38. МкАТ ІПО-38, так як і антитіла до антигену проліферуючих клітин Ki-67, розпізнають антиген, який не експресується у клітинах, що знаходяться в G₀-фазі клітинного циклу. Проте, на відміну від Ki-67, МкАТ ІПО-38 реагують з клітинами, які перебувають на ранній G₁-фазі клітинного циклу [21]. Результати досліджень по визначенню експресії ядерного антигену проліферуючих клітин свідчать про варіабельність кількості ІПО-38⁺-клітин у межах кожного гістологічного варіанта РМЗ від 0 до 100%. Так, у групі хворих на ІП РМЗ у 4 випадках виявлена негативна реакція, в 10 випадках число позитивних клітин коливалось від 10 до 50%, а в 12 випадках кількість позитивних клітин була вищою за 50% (рисунк, д). Зазначимо, що у хворих на ІП РМЗ з низьким ступенем диференціації пухлин (G₃) більшість пухлинних клітин не взаємодіяли з МкАТ ІПО-38: у 5 з 7 хворих позитивна реакція відзначена в 0–30% клітин та у 2 випадках — в 50% клітин. Саме в клітинах хворих цієї групи не було виявлено аутофосфорильовання PKD1/2 і коефіцієнт рангової кореляції між цими показниками становив $r = -0,79$ ($p < 0,05$). У всіх інших хворих на ІП РМЗ у пухлинах не встановлено зв'язку між кількістю ІПО-38⁺-клітин, ступенем диференціації злоякісних клітин та активацією PKD1/2. У пухлинних клітинах хворих на ІНД та ІД РМЗ також відзначена гетерогенність показників експресії антигену, що визначається МкАТ ІПО-38 від 0 до 100%. У цих гістологічних групах хворих кількість ІПО-38⁺-клітин також не залежала від стадії пухлинного процесу. Як було зазначено вище, у хворих на ІНД РМЗ і у хворих на ІП РМЗ, що мали низький ступінь диференціації клітин, у більшості випадків не відзначали аутофосфорильовання PKD1/2. Проте, на відміну від хворих на ІП РМЗ (ступінь диференціації G₃), серед хворих на ІНД РМЗ у 3 спостереженнях кількість ІПО-38⁺-клітин становила 70–100% клітин, а у 2 — 0% та 20%. Таким чином, загальний аналіз результатів імуногістохімічних досліджень свідчить про відсутність кореляційної залежності між активацією PKD1/2 в пухлинних клітинах хворих на РМЗ та експресією ядерного антигену проліферуючих клітин, що визначається МкАТ ІПО-38 ($r = -0,11$). На сьогодні існують різні думки відносно

доцільності визначення в якості незалежного прогностичного маркера для хворих на РМЗ експресії антигену проліферуючих клітин Ki-67 [22–25]. Рівень експресії цього антигену в пухлинних клітинах хворих на РМЗ не асоціюється зі швидкістю росту пухлини та метастазів [26, 27]. Слід враховувати ще й те, що частина Ki-67⁺-клітин елімінується шляхом апоптозу ще до їх вступу в мітоз [28]. Результати наших досліджень також є свідченням того, що визначення ядерного антигену проліферуючих клітин недоцільно використовувати в якості самостійного прогностичного маркера при РМЗ, оскільки показники його експресії не корелюють з гістологічним типом РМЗ, стадією пухлинного процесу. Проте характеристика проліферативного потенціалу пухлини поряд з іншими молекулярними маркерами при РМЗ може сприяти подальшій індивідуалізації схем лікування.

Існує ряд прямих та опосередкованих доказів зв'язку Р-глікопротеїну (Р-gp), продукту гена MDR1, з кіназами родини РКС [28]. Показано, що в клітинах лінії MCF-7/AdrR, резистентної до доксорубіцину, Р-gp копреципітує з 5 ізоферментами родини РКС і, можливо, є субстратом цих кіназ [29]. Вважають, що фосфорильовання цього білка модулює його функції як трансмембранного транспортера. Більш того, виявлена кореляція між рівнем експресії деяких ізоформ РКС та підвищенням рівнем експресії MDR1-регульованих генів [29].

Хоча кінази родини PKD не копреципітують з Р-gp [29], ці кінази також є субстратами різних ізоферментів родини РКС і, можливо, існує зв'язок між фосфорильованням PKD та експресією Р-gp. Для перевірки цього припущення нами був проаналізований рівень аутофосфорильовання PKD1/2 в пухлинних клітинах хворих на РМЗ з урахуванням експресії Р-gp. Експресія Р-gp була виявлена в пухлинних клітинах 9 із 39 досліджених випадків, з них в 6 — ІП РМЗ (рисунк, е) та 3 — ІД РМЗ. Для всіх Р-gp-позитивних випадків характерним був високий відсоток пухлинних клітин (> 50%) з високим рівнем аутофосфорильовання PKD1/2. В Р-gp-негативних випадках РМЗ у 15 хворих експресію pPKD1/2 спостерігали в 50–100% клітин, у 5 хворих — в 10–20% клітин та у 10 хворих не відзначено позитивної реакції. Таким чином, у результаті наших досліджень не встановлено достовірну кореляцію між показниками pPKD1/2 та Р-gp ($r = -0,30$, $p > 0,05$).

ВИСНОВКИ

1. Експресія PKD1/2 у пухлинних клітинах хворих на РМЗ не залежить від гістологічного типу пухлини, ступеня диференціації, віку хворих та стадії процесу.

2. Варіабельність показників аутофосфорильовання/активації PKD1/2 обумовлена гістологічним варіантом РМЗ та ступенем диференціації пухлини. Відсутність або наявність експресії pPKD1/2 не більше ніж в 20% злоякісних клітин хворих на РМЗ корелює з низьким ступенем диференціації пухлини та більш агресивним перебігом захворювання.

3. Не виявлено кореляції між рівнем активації PKD1/2 та експресією як ядерного антигену проліферуючих клітин, що визначається МКАТ ІПО-38, так і P-гр.

ЛІТЕРАТУРА

1. Manning G, Whyte DB, Martinez R, *et al.* The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; **298** (5600): 1912–34.
2. Sidorenko SP, Law CL, Klaus SJ, *et al.* A Protein kinase C mu (PKC mu) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling. *Immunity* 1996; **5** (4): 353–63.
3. Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D. Protein kinase D. A selective target for antigen receptors and a downstream target for protein kinase C in lymphocytes. *J Exp Med* 2000; **191** (12): 2075–82.
4. Storz P, Toker A. NF-kappaB signaling—an alternate pathway for oxidative stress responses. *Cell Cycle* 2003; **2** (1): 9–10.
5. Storz P, Toker A. Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *Embo J* 2003; **22** (1): 109–20.
6. Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, *et al.* E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer Res* 2005; **65** (2): 483–92.
7. Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, *et al.* T Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol* 2002; **12** (4): 193–200.
8. VanLint JV, Rykx A, Vantus T, Vandenheede JR. Getting to know protein kinase D. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; **34** (6): 577–81.
9. Hurd C, Waldron RT, Rozengurt E. Protein kinase D complexes with C-Jun N-terminal kinase via activation loop phosphorylation and phosphorylates the C-Jun N-terminus. *Oncogene* 2002; **21** (14): 2154–60.
10. Baron CL, Malhotra V. Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 2002; **295** (5553): 325–8.
11. Dequiedt F, Van Lint J, Lecomte E, *et al.* Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Exp Med* 2005; **201**: 793–804.
12. Parra M, Kasler H, McKinsey TA, *et al.* Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem* 2005; **280**: 13762–70.
13. Yap AS. The morphogenetic role of cadherin cell adhesion molecules in human cancer: a thematic review. *Cancer Invest* 1998; **16** (4): 252–61.
14. Jaggi M, Du C, Zhang W, Balaji KC. Protein kinase D1: a protein of emerging translational interest. *Front Biosci* 2007; **12**: 3757–67.
15. Woods AJ, White DP, Caswell PT, Norman JC. PKD1/PKCmu promotes alpha5beta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *EMBO J* 2004; **23** (13): 2531–43.
16. Brändlin I, Eiseler T, Salowsky R, Johannes FJ. Protein kinase C(mu) regulation of the JNK pathway is triggered via phosphoinositide-dependent kinase 1 and protein kinase C(epsilon). *J Biol Chem* 2002; **277** (47): 45451–7.
17. Palmantier R, George MD, Akiyama SK, *et al.* Cis-polyunsaturated fatty acids stimulate beta1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type IV collagen by activating protein kinases C-epsilon and -mu. *Cancer Res* 2001; **61** (6): 2445–52.
18. Kovalevska LM, Yurchenko OV, Shlapatska LM, *et al.* Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in malignant human lymphomas. *Exp Oncol* 2006; **28** (3): 225–30.
19. Van Lint J, Sinett-Smith JV, Rozengurt JE. Expression and characterization of PKD, a phorbol ester and diacylglycerol-stimulated serine protein kinase. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1455–61.

20. Сидоренко СП, Шлапацька ЛН, Ветрова ЕП і др. Моноклональні антитіла ІПО-38 к ядерному антигену проліферуючих кліток. *Експ онкологія* 1994; **16** (2–3): 145–50.
21. Lopez F, Mikhalap S, Belloc F, *et al.* Comparison of three monoclonal antibodies (Ki-67, MIB1, IPO-38) for flow cytometric identification of proliferating cells. *Biol Cell* 1994; **79**: 234–5.
22. Ahlin C, Aaltonen K, Amini RM, *et al.* Ki67 and cyclin A as prognostic factors in early breast cancer. What are the optimal cut-off values? *Histopathology* 2007; **4**: 491–8.
23. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, *et al.* Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; **99** (2): 167–70.
24. Yamashita H, Toyama T, Nishio M, *et al.* p53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; **8** (4): R48.
25. Martínez-Arribas F, Núñez MJ, Piqueras V, *et al.* Flow cytometry vs Ki67 labelling index in breast cancer: a prospective evaluation of 181 cases. *Anticancer Res* 2002; **22**: 295–8.
26. Rew DA, Campbell ID, Taylor I, Wilson GD. Proliferation indices of invasive breast carcinomas after in vivo 5-bromo-2'-deoxyuridine labelling: a flow cytometric study of 75 tumours. *Br J Surg* 1992; **79** (4): 335–9.
27. Stanton PD, Cooke TG, Forster G, *et al.* Smith D, Going JJ. Cell kinetics in vivo of human breast cancer. *Br J Surg* 1996; **83** (1): 98–102.
28. Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, *et al.* Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology* 2006; **48** (6): 674–82.
29. Yang JM, Chin KV, Hait WN. Interaction of P-glycoprotein with protein kinase C in human multidrug resistant carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; **56** (15): 3490–4.

EXPRESSION OF PROTEIN KINASES D1 AND D2 IN TUMOR CELLS OF BREAST CANCER PATIENTS

L.M. Shlapatska, I.A. Zakharova, C.V. Mikhalap,
L.M. Kovalevska, G.G. Berdova, O.V. Yurchenko,
L.A. Naleskina, S.P. Sidorenko

Summary. For the first time the level of PKD1 and PKD2 (PKD1/2) expression and autophosphorylation/activation was evaluated in tumor cells of 40 patients with histologically graded breast cancer. It was shown that the number of tumor cells with autophosphorylated PKD1/2, unlike PKD1/2 positive cells, depends on histological type and grade of tumors. However, we did not find the correlation between the levels of PKD1/2 activation and expression of P-glycoprotein and also antigen of proliferating cells IPO-38.

Key Words: breast cancer, protein kinase D, nuclear antigen of proliferating cells, P-glycoprotein.

Адреса для листування:

Шлапацька Л.М.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: larisash@onconet.kiev.ua