

Analiza apoptozy u chorych na raka piersi

Analysis of apoptosis in breast cancer patients

Hanna Romanowicz-Makowska¹, Beata Smolarz¹, Marek Zadrozny², Elżbieta Kozłowska¹, Tomasz Stetkiewicz³, Bogdan Westfal², Tomasz Pertyński³

Cel: Proces apoptozy (programowanej śmierci komórki) może podlegać aktywacji w chorobach nowotworowych. W pracy przedstawiono przegląd badań dotyczących analizy apoptozy u chorych na raka piersi.

Materiały i metody: Aby określić znaczenie apoptozy dla progresji raka piersi badano jej aktywność w próbkach o różnym stopniu zaawansowania nowotworu. Aktywność apoptozy została określona poprzez zastosowanie różnych technik biologii molekularnej: metod elektroforetycznych oraz techniki TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling of DNA fragments).

Wyniki i wnioski: Badania sugerują, że aktywność apoptozy może odgrywać rolę czynnika prognostycznego u kobiet z rakiem piersi, zarówno w okresie przed- i pomenopauzalnym.

Słowa kluczowe: rak piersi, apoptoza, TUNEL, techniki elektroforetyczne

(Przegląd Menopauzalny 2004; 1: 28–33)

Wstęp

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet na świecie. Jak do tej pory nie sprecyzowano konkretnego czynnika przyczynowego jego powstawania i rozwoju. Przyjmuje się, że rak piersi jest następstwem wielu elementów o różnym znaczeniu, zarówno genetycznych, jak i środowiskowych. Poznanymi czynnikami ryzyka zmian nowotworowych są: predyspozycja rodzinna, wiek powyżej 45 lat, pierwsza ciąża w późnym wieku (po 35. roku życia), poronienia, późna menopauza, otyłość, dieta bogata w tłuszcze nasycone i cukier, cukrzyca, narażenie na działanie promieni jonizujących, obecność zmian niezłośliwych [1, 2].

Postęp osiągnięty w badaniach nad rakiem piersi jest nadal niewielki w stosunku do skali problemu, jaki on

stanowi. Przegląd badań przedstawionych w artykule ma na celu określenie znaczenia programowanej śmierci komórki – apoptozy oraz niektórych genów i kodowanych przez nie białek regulujących ten proces dla rozwoju raka piersi u kobiet w okresie menopauzalnym.

Wiele czynników odgrywa istotną rolę w zapoczątkowaniu rozwoju nowotworu gruczołu piersiowego, a wśród nich ważne miejsce zajmują czynniki genetyczne. Istotnymi regulatorami prawidłowych biologicznych procesów w komórce, np. różnicowania i proliferacji są protoonkogeny komórkowe. Wiele zmian molekularnych, głównie mutacji, może zaburzać funkcje protoonkogenów, prowadząc do ich przekształcenia w onkogeny. Produkty białkowe onkogenów są czynnikami aktywującymi rozwój nowotworu. W nowotworach piersi zaobserwowano zjawisko powstawania wie-

¹ Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

² Klinika Chirurgii Onkologicznej i Chorób Piersi, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, kierownik: dr n. med. Marek Zadrozny

³ Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, kierownik: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński



lu kopii (amplifikacji) niektórych onkogenów, lub nadmiernej ekspresji kodowanych przez nie białek. Zjawisko to wiąże się ze zwiększeniem złośliwości guza nowotworowego i tym samym ze złym rokowaniem. Do najczęściej opisywanych onkogenów ulegających powtarzalnym zaburzeniom w raku piersi należą *erbB-2* (*HER2/neu*), *c-myc* oraz *int2* [3, 4]. Onkogen *erbB-2* jest zlokalizowany w 17q21 i koduje glikoproteinę o masie 185 kDa, która jest zaliczana do rodziny receptorów czynników wzrostowych, do których należą m. in. receptor nabłonkowego czynnika wzrostowego (EGFR), oraz białka kodowane przez *erbB-3* i *erbB-4*. Badania wskazują, że onkogen *erbB-2* jest markerem agresywności nowotworu gruczołu piersiowego [5].

Geny supresorowe są to geny, które w przypadku utraty swoich funkcji poprzez mutacje somatyczne, głównie delecje, prowadzą w niektórych przypadkach do wzrostu aktywności onkogenów i rozwoju guza nowotworowego. Najsilniej związane z powstawaniem raka piersi są geny supresorowe *BRCA1* i *BRCA2* [6]. Sugeruje się też, że mutacje w genie supresorowym *p53* są koniecznym krokiem w rozwoju wielu nowotworów, w tym raka piersi [7, 8]. Gen supresorowy *p53* koduje białko jądrowe, które hamuje progresję cyklu komórkowego, stymuluje naprawę uszkodzonego DNA, jest czynnikiem transkrypcyjnym oraz pełni ważną rolę w indukowaniu apoptozy. Apoptoza indukowana przez *p53* pełni istotną rolę w rozwoju nowotworów *in vivo*, a liczne sygnały mitogenne antagonizują działanie *p53* [9, 10].

Apoptoza – jej znaczenie i funkcja

Apoptoza jest genetycznie uwarunkowanym procesem fizjologicznym, polegającym na zmianach biochemicznych i morfologicznych komórek, które prowadzą poprzez proteolityczną i nukleolityczną degradację składników komórki do jej śmierci. Obecnie wiadomo, że występowanie i rozwój nowotworu jest wynikiem nie tylko nagromadzenia się w komórkach zmian genetycznych powstałych w konsekwencji nadekspresji lub mutacji protoonkogenów, czy też utraty lub zmian genów supresorowych. Za równie istotny czynnik w tych procesach uważa się obniżenie zdolności komórek do prawidłowego przeprowadzania programu aktywnej śmierci – apoptozy, jako odpowiedzi na bodźce pochodzące z otaczającego środowiska [11, 12]. Może to prowadzić do nieprawidłowego zwiększania się żywotności komórek, wydłużania ich życia i utrwalania już zaistniałych mutacji. Apoptoza stanowi odpowiedź komórki na działanie wielu czynników patogennych, w tym zwłaszcza na uszkodzenia DNA, wywołane bardzo różnymi związkami stosowanymi w chemioterapii nowotworów, czy też promieniowaniem γ i UV. Do induktorów apoptozy zalicza się m.in.: niedotlenienie, szok termiczny, usunięcie czynników wzrostowych, zaburzenia przebiegu cyklu

komórkowego, pobudzenie określonych receptorów błonowych. Po tej najwcześniejszej fazie indukcji apoptozy, dla komórek określonych typów następują już etapy wspólne. W fazie efektorowej dochodzi do odebrania i amplifikacji sygnału do apoptozy, a następnie przekazaniu informacji do wielu białek – wykonawców apoptozy. W fazie wykonawczej przeprowadzają one proteolizę różnych białek komórkowych, nukleolityczną degradację DNA, uczestniczą w przekształceniach błony komórkowej. W efekcie dochodzi do fragmentacji jądra i cytoplazmy z powstaniem tzw. ciałek apoptotycznych [12].

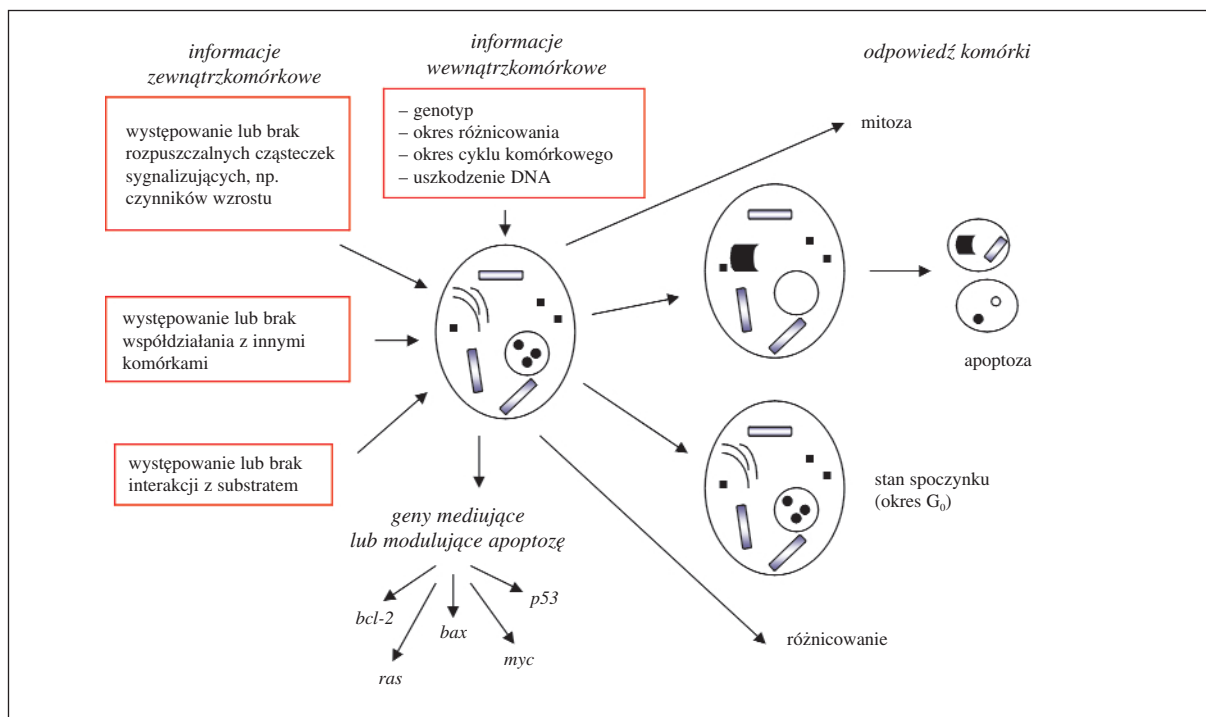
Apoptoza – aktywna śmierć komórki

Apoptoza to programowana, aktywna śmierć komórki, nazywana śmiercią fizjologiczną lub samobójczą, zależna od indukcji specyficznych genów. Apoptozę można podzielić na 2 etapy: 1) w pierwszym dochodzi do indukcji procesu samounicestwienia komórki, poprzez odebranie sygnałów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych, 2) w drugim etapie następuje uaktywnienie genów, których produkty biorą udział w procesie apoptozy (ryc. 1.).

Aktywna śmierć komórki towarzyszy organizmowi od początku jego rozwoju w okresie embriogenezy, morfogenezy, jak również jest podstawą do prawidłowego funkcjonowania dojrzałego organizmu [12]. Programowana śmierć komórki jest niezbędna do utrzymania prawidłowej homeostazy tkankowej oraz zapobiegania rozrostom hiperplastycznym. Proces apoptozy związany jest również ze stanami patologicznymi, np. neurodegradacją komórek nerwowych podczas choroby Alzheimera, Huntingtona oraz Parkinsona. Komórki nowotworowe również umierają śmiercią samobójczą wywołaną spontanicznie lub indukowaną przez promieniowanie jonizujące i cytotoksyny. Śmierć komórki na drodze apoptozy mogą wywołać również mutageny środowiskowe o właściwościach kancerogennych, np. dwuchromian potasu. Niektóre leki przeciwnowotworowe aktywują proces apoptozy w zaatakowanych komórkach, należą do nich pochodne związków platyny, takie jak CDDP (ang. *cis diammine dichloro platinum*), JM 149 [ang. *cis ammine dichloro (cyclohexylamine)trans dihydroxo platinum (IV)*], JM335 [ang. *trans ammine dichloro (cyclohexylamine)dihydroxo platinum (IV)*]; leki alkilujące; winkrystyna, metatroksan, etopozyd, deksametazon, cykloheksimid [13].

Podczas apoptotycznej śmierci komórki w pierwszym etapie dochodzi do obkurczenia komórki, co wiąże się z aktywacją enzymów proteolitycznych, błona komórkowa traci asymetryczną strukturę, co związane jest z przemieszczeniem fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony. Chromatyna w jądrze ulega zagęszczeniu i marginalizacji. W końcowej części pierwszego eta-





Ryc. 1. Odpowiedzi komórki na sygnały zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe

pu aktywnej śmierci komórki dochodzi do fragmentacji DNA. Chromatyna ulega wielostopniowym podziałom zależnym od aktywności endonukleaz. Pierwszym sygnałem jest fragmentacja na długie odcinki 700, 300 kilo par zasad (kpz). Odcinki o długości 300 kpz odpowiadają heksametyrycznym pętłom, znanym jako struktura rozety. Następnie dochodzi do powstania mniejszych fragmentów o długości 50 kpz odpowiadających pojedynczym pętłom DNA. W późniejszym okresie może dojść do fragmentacji na regularne odcinki o długości 200 par zasad (pz), widoczne podczas analizy metodami konwencjonalnej elektroforezy w żelu agarozowym w postaci charakterystycznej drabinki apoptotycznej.

Drugi etap wiąże się z powstawaniem ciałek apoptotycznych poprzez uwypuklenie się błony cytoplazmatycznej. Ciała apoptotyczne zawierają dobrze zachowane składniki komórki oraz jądra komórkowe i są szybko usuwane z przestrzeni międzykomórkowych dzięki procesowi fagocytozy. Podczas pierwszego etapu apoptozy może dojść do naprawy uszkodzeń, czyli cofnięcia procesu programowanej śmierci komórki. Po fragmentacji DNA komórka traci możliwość naprawy.

Charakterystyka białek regulujących apoptozę

Apoptoza w przeciwieństwie do martwicy jest aktywną śmiercią komórki, wymagającą w przebiegu

syntezy RNA i białka. Kluczową rolę w regulacji apoptozy w jej fazie decyzyjnej odgrywają białka z rodziny Bcl-2 [14, 15]. Mogą one zatem stanowić markery dla rozwoju tego procesu.

Rodzinę Bcl-2 dzieli się na 3 podrodziny: podrodzinę Bcl-2 (np. występujące u ssaków Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs, A1), podrodzinę Bax (Bax, Bak, Bok) oraz podrodzinę BH3 (Bad, Bik, Bid). Białka z podrodziny Bcl-2 (z wyjątkiem Bcl-xs) są inhibitorami apoptozy, natomiast białka z podrodziny Bax i BH3 są promotorami aktywnej śmierci komórki.

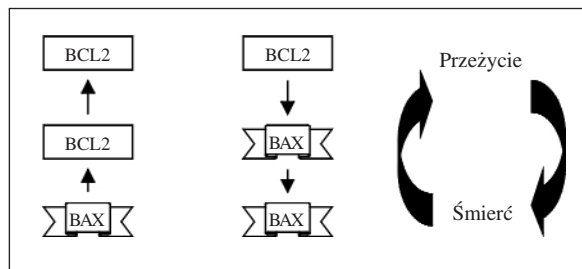
Protoonkogen *bcl-2* został po raz pierwszy wykryty w wyniku chromosomalnej translokacji t(14;18) powszechnie stwierdzanej w nie-Hodkinowskich chłoniakach. *bcl-2* jest w warunkach prawidłowych zlokalizowany w chromosomie 18q21, jednakże w wyniku translokacji dostaje się pod wpływ genu IgH w chromosomie 14q32, co w konsekwencji prowadzi do wzmożenia ekspresji genu i nadprodukcji białka Bcl-2. Nadekspresja *bcl-2* występuje w wielu typach złośliwych guzów litych i jest odpowiedzialna za ich oporność na radio- i chemioterapię. Dowiedzono, że w 57% raków piersi występuje nadekspresja *bcl-2* [16]. Spośród wszystkich znanych dotychczas białek komórkowych Bcl-2 jest najsilniejszym inhibitorem apoptozy wywołanej przez różnorodne czynniki: promieniowanie jonizujące, deficyt czynników wzrostowych, glikokortykoidy, chemioterapeutyki czy też reaktywne formy tlenu.



W przeciwieństwie do *bcl-2*, *bax* (*bcl-2 associated X protein*) jest najlepiej opisanym promotorem apoptozy. *bax* jest zależny od czynnika transkrypcyjnego p53, jakkolwiek w niektórych typach komórek nie zawsze aktywacja genu *p53* indukuje proces apoptozy za pośrednictwem wyżej wymienionego białka [17, 18]. U człowieka gen *bax* jest zlokalizowany w 19q13.3–13.4. W wyniku procesu alternatywnego splicingu pierwotnego transkryptu powstają aż 3 różne formy dojrzałego białka. Są to: aktywna biologicznie forma Bax α , oraz cytozolowe białka Bax β i Bax γ . Podobnie jak w przypadku *bcl-2* najwyższy poziom ekspresji *bax* występuje w komórkach nowotworowych i transformowanych. Badania przeprowadzone na liniach ludzkich komórek nowotworowych: raka sutka MCF-7, raka jajnika U373MG, raka jajnika PA1 i raka okrężnicy COLO205 z zastosowaniem laserowej cytometrii skaningowej wykazały zależność ekspresji *bax* od cyklu komórkowego z najwyższym poziomem Bax w komórkach w fazie G₂/M. Generalnie Bax jest bardziej rozpowszechniony w zdrowych tkankach niż Bcl-2. Model wzajemnych powiązań między Bcl-2 i Bax w regulacji zaprogramowanej śmierci komórki prezentuje ryc. 2.

W regulacji apoptozy istotną rolę odgrywają onkogeny i geny supresorowe. Geny supresorowe *p53*, *Rb*, oraz *c-myc* kodują białka o przeciwstawnym działaniu na proces apoptozy. Białko p53 indukuje apoptozę, natomiast białko pRb hamuje jej przebieg. Białko c-MYC zależnie od typu komórek, stopnia ich zróżnicowania i rodzaju czynnika zewnętrznego promuje proliferację komórek lub ich apoptozę [19]. Białkom onkogennym c-Ras i c-Abl przypisuje się także wpływ na regulację apoptozy.

W komórkach nieuszkodzonych, niestymulowanych do apoptozy poziom p53 jest niski, natomiast wzrasta dramatycznie po wywołaniu w nich uszkodzeń DNA. Apoptoza indukowana przez p53 pełni istotną rolę w rozwoju nowotworów *in vivo*, a liczne sygnały mitogenne antagonizują działanie p53. Działanie p53 powoduje zahamowanie cyklu komórkowego lub wywołanie apoptozy komórek w wyniku jego działania jako czynnika transkrypcyjnego, który wiąże się z określonymi sekwencjami DNA w miejscach p53RE (ang. *p53 responsive element*). Do genów aktywowanych przez p53 należy *bax*, gen kodujący białko FAS, receptor cytokiny TRAIL tzw. KILLER, białko wiążące IGF, katepsyna D, oraz białko p85. Do regulacyjnego działania p53 w apoptozie należy także hamowanie przez nie ekspresji antyapoptotycznego genu *bcl-2*. Szereg obserwacji wskazuje na powiązania apoptotycznego działania p53 z przeciwdziałającym apoptozie funkcjonowaniem białka pRb. Świadczy o tym korelacja utraty aktywnego białka pRb z pojawieniem się apoptozy komórek, a także brak apoptozy i niekontrolowane podziały komórek przy wyłączeniu działania obydwu genów *p53* oraz *Rb*.



Ryc. 2. Białka regulujące proces apoptozy

W chwili obecnej mechanizmy regulujące apoptozę w nowotworach nie są jeszcze w pełni poznane. Istnieją doniesienia dotyczące analizy częstości apoptozy u chorych na różne nowotwory złośliwe: raka jelita grubego [20, 21], raka jajnika [22], raka trzonu macicy [23], a także raka sutka [24]. Badania są prowadzone od niedawna i nie przyniosły jeszcze ostatecznych wyników co do możliwości uznania apoptozy jako czynnika prognostycznego dla rozwoju nowotworów.

W Polsce badania nad apoptozą prowadzi się głównie z wykorzystaniem linii komórek nowotworowych i dotyczą one przeważnie wpływu leków antynowotworowych na regulację tego procesu [25]. Dane literaturowe wskazują, że częstość apoptozy w przypadku nowotworów najczęściej ocenia się metodą TUNEL [26]. Metoda TUNEL dostarcza informacji o obecności komórek apoptotycznych, jednakże nie wskazuje na stopień uszkodzeń DNA w komórce. Dlatego też oprócz tej metody stosuje się metodę elektroforezy pulsacyjnej, pozwalającej na wykrywanie dużych fragmentów DNA o długości od kilku kbpz (kilo par zasad) do 10 mpz [27, 28] oraz standardową elektroforezę agarozową w celu wykrywania krótkich fragmentów DNA (drabinki apoptotyczne powstające w końcowej fazie apoptozy) [28, 29].

Apoptoza w raku piersi

Zaburzenie prawidłowej programowanej śmierci komórki może odgrywać ważną rolę w patogenezie i progresji raka sutka [30, 31]. U chorych o niskim stopniu zaawansowania raka sutka apoptoza wydaje się przebiegać częściej niż u chorych o wysokim stopniu zaawansowania nowotworu [32, 33]. W raku sutka, podobnie jak w innych nowotworach często wykrywa się obecność zmutowanych białek z rodziny Bcl-2, szczególnie dotyczy to białka Bax [34]. Stwierdzono obecność punktowych mutacji w domenach BH1 i BH2 Bax, w liniach komórek nowotworowych raka jelita grubego. W przypadku raka sutka brak jest danych na temat występowania tego typu mutacji. Przypuszcza się, że w raku sutka zahamowanie apoptozy może wiązać się z mutacjami w obrębie otwartej ramki odczytu genu *bax*. Jednakże mutacje te prawdopo-



dobnie nie są wystarczające do *wyłączenia* apoptozy, lecz muszą korelować z mutacjami wywołującymi zwiększoną ekspresję genów kodujących anty-apoptyczne białka Bcl-2 i Bcl-xL [35].

W raku sutka stwierdza się podwyższoną ekspresję białek antyapoptycznych Bcl-2 i Bcl-x, co jest związane z opornością na chemioterapię. U chorych na raka sutka redukcja ekspresji genu *bax* kodującego białko promujące apoptozę koreluje ze złą odpowiedzią na chemioterapię i krótszym czasem przeżycia. W chwili obecnej nie wiadomo dokładnie, jaki mechanizm odpowiada za redukcję ekspresji genu *bax*.

Metody analizy apoptozy

1. TUNEL

Metoda TUNEL wykorzystuje aktywność terminalnej deoksynukleotydylo transferazy (TdT) enzymu wprowadzającego biotynylowaną trójfosforodeoksyurydynę dUTP do 3' końca pofragmentowanej cząsteczki DNA [36]. Znakowane komórki są wizualizowane przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego. Wymieniona technika jest powszechnie stosowana przy analizie apoptozy, ale umożliwia ona jedynie obserwację wybranych pojedynczych komórek. Bywają przypadki braku zmian morfologicznych w apoptotycznych komórkach, dlatego też obok analizy morfologicznej należy stosować analizę biochemiczną opartą na badaniu całej populacji komórek. Degradację DNA można śledzić przy użyciu różnych technik elektroforetycznych.

2. Analiza apoptozy metodą elektroforezy pulsacyjnej (PFGE)

Metoda pozwala na analizę dużych fragmentów DNA: 700 kpz, 300 kpz, i 50 kpz. Do badań są wykorzystywane próbki komórek nowotworowych z guzów sutka w ilości 5×10^7 na każdy ml stosowanej w badaniach odpowiednio przygotowanej agarozoy. Analizę

prowadzi się z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów odczynników.

3. Analiza apoptozy metodą elektroforezy w żelu agarozowym

Do badania potencjalnych zmian apoptotycznych w DNA stosowana jest technika elektroforezy klasycznej w żelu agarozowym, umożliwiającą identyfikację nukleosomowych fragmentów DNA o długości 180–200 pz lub ich wielokrotności – odcinków oligo- i polinukleosomowych. Podczas analizy elektroforetycznej powstaje charakterystyczna *drabinka DNA* – jeden z markerów dla procesu apoptozy.

W raku piersi znanych jest obecnie wiele czynników prognostycznych, do których można zaliczyć: typ histologiczny raka, rozmiar guza, stan węzłów chłonnych pachowych, stopień złośliwości histologicznej, stopień proliferacji komórek rakowych, ploidię DNA – czyli zawartość DNA w komórkach raka, wiek chorej, receptory steroidowe, biomarkery inwazyjności: aktywatory i inhibitory plazminogenu oraz receptory czynników wzrostu o aktywności kinazy tyrozynowej. Obecność wielu markerów prognostycznych w raku piersi pozwala dostrzec, jak bardzo skomplikowany jest proces progresji tego nowotworu. Jest mało prawdopodobne, aby analiza zaburzeń jakiegokolwiek jednego genu pozwoliła na wyjaśnienie wszystkich ważnych cech biologicznych nowotworu człowieka. Złośliwy fenotyp jest prawdopodobnie odzwierciedleniem współdziałania produktów wielu genów i z ich obecności lub braku można domyślać się cech biologicznych guza. Badania sugerują, że zaburzenie prawidłowej programowanej śmierci komórki może odgrywać ważną rolę w patogenezie i progresji nowotworów, w tym raka sutka.

Praca powstała w ramach grantów uzyskanych z Komitetu Badań Naukowych nr 3P05C 066 24 i 3 P05C 06923.

Summary

Objective: Apoptosis process (programmed cell death) has been shown to be activated in the majority of cancer tissues. Results from studies that assayed apoptosis in breast cancer samples are reviewed.

Materials and method: To study apoptosis activation during the progression of breast cancer, its activation in tissues of various stages of breast cancer was analysed. The levels of the apoptosis status in breast cancer and normal tissues using various molecular genetic methods: electrophoresis methods and the TUNEL assay (terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling of DNA fragments) were investigated.

Results and conclusion: Several data suggest that the quantitative analysis of apoptosis may play a potential role as prognostic adjuncts for both premenopausal and postmenopausal patients with breast cancer.

Key words: breast cancer, apoptosis, TUNEL, electrophoresis methods



Piśmiennictwo

1. Jassem J. *Rak sutka*. Springer PWN, Warszawa, 1998.
2. Spaczyński M. *Onkologia ginekologiczna*. Urban & Partner. Wrocław, 1997.
3. Sjogren S, Ingham M, Lindgren A, et al. *Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers*. J Clin Oncol 1998; 16: 462-9.
4. Stark A, Hulka B, Scott J, Novotny D. *HER-2/neu amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer*. J Clin Oncol 2000; 18: 267-274.
5. Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. *ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance*. Eur J Cancer 1998; 34: 791-808.
6. Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C, et al. *Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited*. Cancer Res 1998; 58: 1588-92.
7. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *p53 mutations in human cancers*. Science 1991; 253: 49-53.
8. Gretarsdottir S, Thorlacius S, Valgarsdottir R, et al. *BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability*. Cancer Res 1998; 58: 859-62.
9. Symonds H, Krall L, Remington L, et al. *p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo*. Cell 1994; 78: 703-11.
10. Hong M, Lai MD, Lin YS, Lai MZ. *Antagonism of p53-dependent apoptosis by mitogen signals*. Cancer Res 1999; 59: 2847-52.
11. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972; 26: 239-57.
12. Wyllie AH. *Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview*. Cancer and Metastasis Reviews 1992; 11: 95-103.
13. Lipponen P. *Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters*. Endocr Relat Cancer 1999; 6: 13-6.
14. xReed JC. *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. J Cell Biol 1994; 124: 1-6.
15. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, et al. *BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy*. J Cell Biochem 1996; 60: 23-32.
16. Zhang CJ, Kimijima I, Watanabe T, et al. *Correlation between apoptotic index, bcl-2 protein expression and progression and prognosis in breast carcinoma*. Gan To Kagaku Rycho 1998; 25: 415-21.
17. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van DT. *Bax suppresses tumorigenesis and stimulates in vivo*. Nature 1997; 385: 637-40.
18. Gascoyne RD, Krajewska M, Krajewsky S, et al. *Prognostic significance of BAX protein expression in diffuse aggressive Non-Hodgkin's lymphoma*. Blood 1997; 90: 3173-8.
19. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, et al. *Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene*. Int J Cancer 2000; 87: 517-21.
20. Ozawa A, Konishi F, Fukayama M, Kanazawa MD. *Apoptosis and its regulation in flat-type early colorectal carcinoma: comparison with that in polypoid-type early colorectal carcinoma*. Dis Colon Rectum 2000; 4: 23-8.
21. Nomura M, Watari J, Yokota K, et al. *Morphogenesis of nonpolypoid colorectal adenomas and early carcinomas assessed by cell proliferation and apoptosis*. Virchows Arch 2000; 437: 17-24.
22. Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, et al. *Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer*. J Clin Oncol 2000; 18: 3775-81.
23. Morsi HM, Leers MP, Radespiel-Troger M, et al. *Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: An approach using multiparameter flow cytometry*. Gynecol Oncol 2000; 77: 7-11.
24. Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, et al. *Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer*. Endocr Relat Cancer 1999; 6: 29-40.
25. Ciesielska E, Studzian K, Zyner E, et al. XXXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Poznań 2000.
26. Villa R, Folini M, Perego P, et al. *Telomerase activity and telomere length in human ovarian cancer and melanoma cell lines: correlation with sensitivity to DNA damaging*. Int J Oncol 2000; 16: 995-1002.
27. Luo Y, Kessel D. *Detection of early and late stage apoptosis with field inversion gel electrophoresis*. Biotechniques 1996; 21: 812-6.
28. Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, et al. *A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments*. Nucleic Acid Res 1994; 24: 5506-7.
29. Simao TA, Andrada-Serpa MJ, Mendonca GAS, et al. *Detection and analysis of apoptosis in peripheral blood cells from breast cancer patients*. Braz J Med Biol Res 1999; 32: 403-6.
30. Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, et al. *Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer*. Endocr Relat Cancer 1999; 6: 29-40.
31. Vakkala M, Lahteenmaki K, Raunio H, et al. *Apoptosis during breast carcinoma progression*. Clin Cancer Res 1999; 5: 319-24.
32. Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, et al. *Apoptosis in breast cancer and its relationship to clinicopathological characteristics and prognosis*. J Surg Oncol 1999; 71: 226-34.
33. Hassan HI, Walker RA. *Decreased apoptosis in non-involved tissue from cancer-containing breasts*. J Pathol 1998; 184: 258-64.
34. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, et al. *Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene*. Int J Cancer 2000; 87: 517-21.
35. Mendez O, Manas S, Peinado, et al. *Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas*. Breast Cancer Res Treat 2001; 65: 171-7.
36. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. *Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance*. Pathol Annu 1982; 17: 229-59.

Adres do korespondencji

Hanna Romanowicz-Makowska
Pracownia Biologii Molekularnej
Zakład Patomorfologii Klinicznej
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki,
ul. Rzgowska 281/289
93-338 Łódź
tel. 0 (prefiks) 42 271 12 80
faks 0 (prefiks) 42 271 14 21

