Współczesna Onkologia (2004) vol. 8; 7 (328–337)

Kliniczne znaczenie immunohistochemicznej ekspresji białek p53, Bcl-2 i Bax u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca

Praca poglądowa

Clinical value of immunohistochemical assessment of expression of p53, Bcl-2 and Bax proteins in Non Small Cell Lung Cancer

Review

Grzegorz Faran[1], Dorota Dworakowska[2], Ewa Jassem[3]

[1]Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, AM w Gdańsku
[2]Klinika Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy, AM w Gdańsku
[3]Klinika Alergologii, AM w Gdańsku

Rak płuca jest nowotworem o złym rokowaniu – to najczęstsza przyczyna zgonów spośród nowotworów złośliwych w Polsce. Poznanie biologii tego guza może przyczynić się do lepszego doboru chorych do skojarzonych metod leczenia oraz stworzyć nowe możliwości terapii. Dotychczasowe badania wskazują, że zaburzenia programowanej śmierci komórek (apoptozy) mogą mieć wpływ na przebieg niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). W pracy przedstawiono informacje na temat kluczowych dla apoptozy białek p53, Bcl-2 i Bax. P53 – białko regulujące wiele szlaków molekularnych (cykl komórkowy, syntezę DNA, apoptozę i inne) uważane jest za jeden z najbardziej istotnych elementów kancerogenezy. Białka Bcl-2 i Bax, jedno hamujące, a drugie promujące apoptozę, należą do grupy białek BCL. Ich rola w niedrobnokomórkowym raku płuca jest przedmiotem ciągłych badań.

W pracy dokonano przeglądu piśmiennictwa dotyczącego rokowania chorych na NDRP z ekspresją powyższych białek badanych w tkance nowotworowej metodami immunohistochemicznymi. Część autorów wykazała niekorzystny wpływ nadmiernej ekspresji p53 na przeżycie chorych na NDRP. Natomiast zwiększona ekspresja Bcl-2 u chorych na NDRP była związana raczej z niekorzystnym rokowaniem. Rola ekspresji Bax nie została dotychczas jednoznacznie określona.

Praktyczne zastosowanie tych wyników wymaga jednak dalszych badań.

Słowa kluczowe: niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP), białko p53, białko Bcl-2, białko Bax, apoptoza, rokowanie.

WPROWADZENIE

Rak płuca jest nowotworem o złym rokowaniu. Od lat wyniki leczenia tego guza są niezadowalające, a 5-letnie przeżycie jest udziałem niewielkiego odsetka chorych. Wydaje się, że lepsze poznanie biologii raka płuca i wprowadzenie molekularnych czynników rokowniczych może przyczynić się do lepszego doboru chorych do skojarzonych metod leczenia oraz stworzyć nowe możliwości terapii, np. poprzez zastosowanie terapii genowej [1–3].

Zaburzenia regulacji podstawowych czynności komórki są istotnym elementem kancerogenezy. Dotychczasowe badania wskazują, że zmiany ekspresji białek uczestniczących w apoptozie mogą mieć wpływ na przebieg niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie klinicznego znaczenia ekspresji białek p53, Bcl-2 i Bax w komórkach tego raka.

APOPTOZA

W prawidłowych warunkach apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórek, jest niezbędna do utrzymania w równowadze liczby czynnych komórek.

W przebiegu apoptozy wyróżnia się 3 etapy zmian: inicjację, fazę efektorową i destrukcję [4]. Faza inicjacji obejmuje działanie czynnika sprawczego i uszkodzenie

Lung cancer is the main cause of death due to neoplasms in Poland. Understanding of the lung cancer biology may result in a better selection of patients for combined therapy and new therapeutic strategies. According to the previous studies, abnormalities of programmed cell death (apoptosis) can accelerate the progress of the non small cell lung carcinoma (NSCLC).

A review indicates the role of proteins involved in apoptosis in lung carcinogenesis. P53, Bcl-2 and Bax control a number of molecular pathways (cell cycle, DNA synthesis, apoptosis and others). Thus, an abnormal expression of these proteins is considered as one of the most important carcinogenesis mechanisms.

The clinical value of immunohistochemical assessment of expression of p53, Bcl-2 and Bax proteins in NSCLC is also reviewed. Some studies showed that overexpression of p53 has an adverse effect on the prognosis, whereas the overexpression of Bcl-2 usually improves the prognosis in NSCLC. The role of Bax expression in NSCLC has not been established yet. The practical use of those data requires further studies.

Key words: carcinoma, non-small cell lung cancer (NSCLC), protein p53, bcl-2 proto-oncogene protein, Bax protein, apoptosis, prognosis.

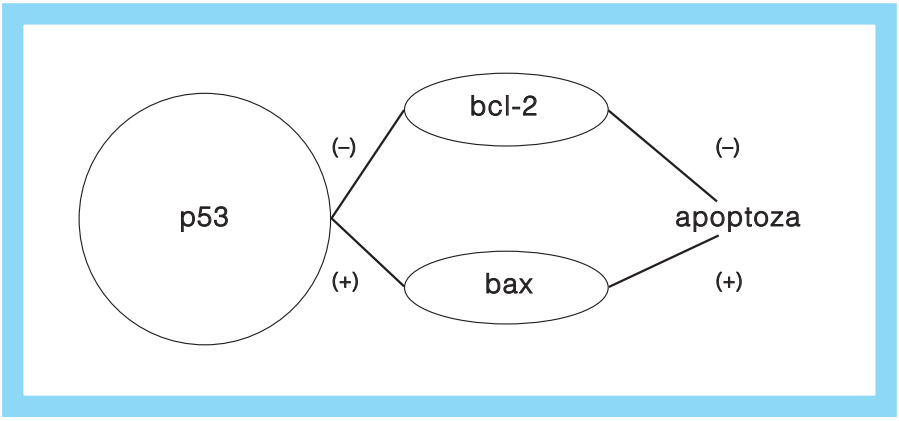
komórki. Czynnik sprawczy z reguły prowadzi do krytycznego dla komórki uszkodzenia DNA bądź do *stresu metabolicznego* (np. spadku stężenia cytokin, zwiększenia wytwarzania wolnych rodników) lub aktywacji receptorów zaprogramowanej śmierci komórki (np. CD95/APO-1 – jednego z receptorów rodziny TNF) [5]. Istotnym elementem fazy inicjacji jest białko p53. W przypadku prawidłowego działania p53 na tym etapie podejmowana jest decyzja, czy otrzymany sygnał jest na tyle silny, by uruchomić apoptozę, czy też istnieje możliwość zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1 i uruchomienia mechanizmów naprawczych. Jeżeli sygnał jest wystarczająco silny, komórka wchodzi w fazę efektorową, poddającą się jeszcze wewnętrznej regulacji, np. białek z grupy Bcl (białko Bax jest *kluczem* odblokowującym kolejne etapy apoptozy, podczas gdy Bcl-2 jest białkiem *ostatniej szansy*, mogącym zatrzymać destrukcję komórki). W następnym etapie zdarzenia osiągają punkt nieodwracalny – rozpoczyna się aktywacja kaskady kaspaz (ang. *caspases – **c**ysteinyl **asp**artate-specyfic protein**ases***) [6, 7]. Jest to początek fazy destrukcji, w której dochodzi do zaburzeń strukturalnych i funkcjonalnych błon komórkowych (zmiany potencjałów błonowych, prezentacji antygenów układu zgodności tkankowej, wzrostu przepuszczalności jonów wapnia), niedoborów energetycznych (spadek ATP) oraz zaburzenia proporcji reakcji anabolicznych do katabolicznych. Pozostałości zniszczonej komórki są fagocytowane, najczęściej przez makrofagi tkankowe.

BIAŁKO P53

Białko p53 jest fosfolipoproteiną o ciężarze 53 kDa, kodowaną przez gen znajdujący się na krótszym ramieniu chromosomu 17 (17p13). Prawidłowe p53 (tzw. *dzika forma*) zbudowane z 393 aminokwasów wiąże swoiście DNA, regulując transkrypcję genów białek zależnych od p53.

W ten sposób uczestniczy, m.in. w regulacji cyklu komórkowego (hamowanie cyklu w fazie G1), syntezie i naprawie nici DNA (poprzez m.in. Gadd45 – *growth arrest and DNA damage genes*), angiogenezie (za pośrednictwem trombospondyny-1) oraz regulacji apoptozy (głównie za pośrednictwem białek Bcl-2 i Bax) (ryc. 1.) [8, 9].

Dzikie p53 nie jest wykrywalne przy użyciu metod immunohistochemicznych z uwagi na krótki czas półtrwania (kilkanaście minut). Formy zmutowane mają wydłużony czas półtrwania, dzięki czemu mogą być wykrywane przy użyciu tych technik [10]. W komórkach NDRP metoda immunohistochemiczna pozwala na stwierdzenie 55–90 proc. mutacji wykrytych przy użyciu PCR [11]. Wyjątkiem



Ryc. 1. Wpływ białka p53 na białka regulujące apoptozę
Fig. 1. P53 protein influence the apoptosis proteins

jest mutacja typu *null*, w wyniku której tworzy się na nici DNA kodon *stop*, czego dalszym efektem jest zahamowanie transkrypcji genu i brak białka p53. W wyniku mutacji gen p53 traci właściwości czynnika transkrypcyjnego [10].

Prawidłowe p53 może utracić swoje działanie także w wyniku zablokowania przez zmutowane p53, zmutowane mdm-2 (ang. *murine double minute-2*, białko będące naturalnym inhibitorem dla p53) lub białka wirusowe (np. SV40, adenowirus E1b, Ebr, CMV) [9].

RODZINA BIAŁEK BCL

Najlepiej poznaną grupą białek regulujących kaskadę apoptozy jest rodzina Bcl, która obejmuje proteiny hamujące apoptozę, np. Bcl-2 [12], Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1, BAG-1, lub ją nasilające, np. Bax, Bak, Bcl-X_S, Bad, Bim, Bid, NOXA [13]. Podstawowymi funkcjonalnymi częściami białek Bcl są proteina p26, odpowiadająca za wiązanie, np. Bcl-2 z błonami wewnątrzkomórkowymi (tzw. kotwica błonowa), oraz białka BH (ang. *Bcl-2 homolology*):

- podjednostka BH1 – warunkuje regulację apoptozy,
- podjednostka BH2 – wiąże białka pokrewne, czyli odpowiada za tworzenie homo- lub heterodimerów z innymi białkami rodziny Bcl,
- podjednostka BH3, która poza białkami z grupy Bcl występuje także w innych białkach regulujących apoptozę, np. wirusowych produktach genów bhrf-1, E1B19K lub genie mcl-1 wyizolowanym z komórek białaczki szpikowej (ang. *Myeloma cell leucemia*), a także ced-9 [14, 15],
- podjednostka BH4, która prawdopodobnie warunkuje antyapoptotyczne działanie, np. białek Bcl-2 i Bcl-XL.

W rodzinie Bcl można wyróżnić 3 grupy białek – pierwszą stanowią te, które posiadają wszystkie domeny i działają hamująco na apoptozę (np. Bcl-2, Bcl-X_L). Druga grupa zawiera większość domen białkowych i zwykle działa proapoptotycznie (np. Bax, Bak, Bad). Trzecia grupa (ang. *BCL-like proteins*), wg niektórych autorów nienależąca do rodziny, zawiera jedynie niektóre domeny (najczęściej BH3), posiada jednak wpływ na zaprogramowaną śmierć komórki (np. Bim, Bid, Bik) [5].

BIAŁKO BCL-2

Białko Bcl-2 (nazwa pochodzi od ang. *B cell lymphoma/leucemia*) jest produktem genu bcl-2 zlokalizowanego na chromosomie 18 w *locus* 18q21.3 [16, 17]. Gen ten został opisany w 1984 r. jako onkogen odpowiedzialny za powstawanie chłoniaków nieziarniczych z komórek B w przypadkach translokacji t(14;18). Translokacja ta powodowała wstawienie genu bcl-2 w obszar częstej transkrypcji DNA (sąsiedztwo łańcuchów ciężkich globulin) i w efekcie zwiększone wytwarzanie białka Bcl-2 [17, 18].

W prawidłowych warunkach ekspresja Bcl-2 jest regulowana przez białko p53, np. u myszy pozbawionych genu p53 wykrywa się wyższe stężenia Bcl-2 [19].

Bcl-2 ma działanie chroniące komórkę przed apoptozą [12, 20], dlatego w warunkach fizjologicznych jego ekspresję stwierdza się w komórkach wszystkich 3 listków zarodkowych embrionów, w komórkach *nieodnawialnych* (np. neuronach) i długo żyjących oraz w komórkach niższych warstw nabłonków [21, 22]. Bcl-2 jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, choć jego brak nie jest bezwzględnym czynnikiem letalnym. Na przykład myszy pozbawione genu bcl-2 obciążone są ciężkimi wadami rozwojowymi (np. wielotorbielowatością nerek, hipopigmentacją, atrofią śledziony i grasicy, wadami jelita cienkiego) i krótszym przeżyciem [23, 24].

Uważa się, że Bcl-2 spełnia funkcję antyapoptotyczną poprzez tworzenie heterodimerów z cząsteczkami nasilającymi apoptozę, takimi jak Bax czy Bak. W wyniku działania p53 zwiększa się ilość białek nasilających apoptozę (Bax) oraz zmniejsza ilość białek hamujących (Bcl-2), co prowadzi do zaburzenia równowagi między tymi białkami i umożliwia powstanie homodimerów (Bax + Bax). Z kolei homodimery Bax umożliwiają uaktywnienie kaspaz i rozkład struktur komórkowych [12, 19, 25].

Białko Bcl-2 wykrywane jest w błonie mitochondrialnej, a w mniejszych ilościach także w siateczce endoplazmatycznej oraz błonie jądrowej [12, 13, 26, 27], przy czym *zakotwiczenie* w błonie mitochondrialnej warunkuje działanie białka [6, 14]. Do wykrywania Bcl-2 używa się metod immunochistochemicznych [11, 20], Western-Blott lub cytometrii przepływowej, przy czym wszystkie te metody zostały określone jako porównywalne [11].

Oprócz blokowania białek proapoptotycznych Bcl-2 stabilizuje błony komórkowe (poprzez zwiększenie potencjału błonowego, wzmożenie syntezy ATP, zahamowanie *ucieczki* jonów wapnia), a także pobudza białka regulatorowe fazy G1 (w tym p53) [18, 28].

Ciekawa jest teoria wskazująca, że aktywacja w dalszych etapach programowanej śmierci komórki może prowadzić do konwersji Bcl-2 w białko proapoptotyczne, co w konsekwencji prowadzi do lawinowego przyspieszenia przebiegu apoptozy [29]. Wykazano także zmniejszenie proliferacji komórek nowotworowych po zablokowaniu translacji Bcl-2 [1] oraz związek tego białka z angiogenezą [8].

Wzmożona ekspresja Bcl-2 może chronić przed apoptozą komórki uszkodzone i wadliwe, co daje możliwość ich zezłośliwienia [28]. Podwyższone stężenie Bcl-2 w komórce stwierdza się w różnych rodzajach nowotworów (m.in. w dużym odsetku chłoniaków nieziarniczych, raku piersi, gruczolakoraku prostaty oraz rzadziej w nowotwo-

rach nosogardzieli, żołądka, jelita grubego i niedrobnokomórkowym raku płuca) [12, 27, 30, 31]. W przypadku chłoniaków przyczyną zwiększonej ekspresji najczęściej jest translokacja t(14;18), która powoduje umieszczenie genu bcl-2 w aktywnym *locus* łańcucha ciężkiego immunoglobuliny [17]. W guzach litych przyczyną zwiększonej ekspresji Bcl-2 najczęściej są mutacje punktowe [11, 30].

BIAŁKO BAX

Białko Bax jest najlepiej znanym proapoptotycznym białkiem grupy Bcl. *Locus* genu bax znajduje się na chromosomie 19 (19q13.3) [32]. W wyniku obróbki potranskrypcyjnej (*splicing*) powstaje kilka form mRNA i w efekcie kilka form białkowych Bax (*alfa, beta, delta, tau* itp.) [32]. Funkcjonalne białko Bax jest proteiną o masie 21 kD i budowie zbliżonej do Bcl-2 (u ludzi w 21 proc. struktura identyczna, w 43 proc. podobna) [18, 33]. Charakterystyczną cechą jest obecność domen BH1 i BH2, a także *kotwicy* błonowej przy końcu C', która warunkuje wiązanie z błonami komórkowymi [33].

Mechanizm regulacji zaprogramowanej śmierci komórki przez Bax nie jest w pełni poznany. Zwraca się uwagę na rolę tworzenia przez Bax dimerów z Bcl-2 (Bax + Bcl-2) lub homodimerów (Bax + Bax). Tak jak Bcl-2 również Bax pełni prawdopodobnie funkcję kanału błonowego dla Ca^{2+}, co może mieć wpływ na mechanizmy oksydacyjne w mitochondriach [34].

Oprócz działania nasilającego zainicjowaną apoptozę Bax przyśpiesza wejście komórki w fazę S (replikacji materiału genetycznego). W związku z tym Bax wydaje się mieć także działanie proliferacyjne, a więc promujące nowotworzenie [34, 35]. Fakt ten tłumaczyłby, dlaczego nowotwory o wyższym stężeniu Bax wykazują gorsze rokowanie, a dobrze rokującym czynnikiem jest wysoki indeks $^{Bcl\text{-}2}/_{Bax}$ [35, 36].

Zwiększenie ekspresji Bax stwierdza się w komórkach wczesnej białaczki z komórek B linii UOC-B1 z translokacją (t17;19) a także w niektórych mutacjach p53 (tzw. *loop-sheet-helix*). W różnych typach nowotworów wykazano różny odsetek guzów z dodatnim barwieniem w kierunku Bax. Wydaje się, że wysoka ekspresja Bax związana jest ze zwiększoną wrażliwością komórek raka na chemioterapię [37–39], ale też z gorszym rokowaniem [35, 36].

KLINICZNE ZNACZENIE BIAŁEK P53, BCL-2 I BAX

Występowanie zaburzeń ekspresji białek p53, Bcl-2 i Bax w komórce raka niedrobnokomórkowego płuca ocenia się odpowiednio na 22–62 proc., 16–65 proc. oraz 47–72 proc. (tab. 1.–3.). Niektórzy autorzy zwracają uwagę na zależność występowania tych zaburzeń z poszczególnymi typami histologicznymi NDRP. Stwierdzono np. częstsze występowanie zwiększonej ekspresji Bcl-2 (+) w grupie chorych na płaskonabłonkowego raka płuca [20, 27, 28, 31, 40–42]. Podobną zależność wykazano w przypadku p53 [40]. Ponadto wykazano występowanie zwiększonej ekspresji Bcl-2 we wczesnych stopniach zaawansowania NDRP [20]. Natomiast dodatnie barwienia w kierunku p53 miały związek z występowaniem przerzutów [43].

Część badaczy uważa, że zwiększona ekspresja p53 ma w NDRP niekorzystne znaczenie rokownicze (tab. 1.).

W ocenie rokowniczego znaczenia ekspresji Bcl-2 u chorych na NDRP nadal istnieją rozbieżności (tab. 2.). W opublikowanej w 2003 r. metaanalizie 28 prac badających wpływ Bcl-2 na rokowanie w raku płuca (drobno- i niedrobnokomórkowym) 11 z nich wykazało korzystny, a 3 niekorzystny wpływ ekspresji Bcl-2 na przeżycie. W pozostałych badaniach występowanie ekspresji białka nie miało znaczenia rokowniczego na poziomie statystycznie znamiennym [44].

Piśmiennictwo dotyczące rokowniczego znaczenia ekspresji Bax w NDRP jest jeszcze uboższe. Dotychczas nie wykazano związku między występowaniem Bax w komórkach NDRP a rokowaniem chorych (tab. 3.). Gorsze rokowanie, związane ze zwiększoną ekspresją Bax, stwierdzono natomiast w innych nowotworach, np. w raku prostaty [36]. Wykazano także, że w komórkach raka piersi przy braku lub słabej ekspresji Bax (<10 proc. komórek) dochodzi do apoptozy, jednak wymaga ona silniejszych sygnałów inicjacyjnych (np. większych stężeń leków cytostatycznych), a chore narażone są na szybszą wznowę [45].

Ohsaki i wsp. [20] oraz Ishida i wsp. [46], analizując rokownicze znaczenie jednoczesnej ekspresji białek p53 i Bcl-2, stwierdzili, że fenotyp p53(-)/Bcl-2(+) charakteryzuje się najlepszym, a fenotyp p53(+)/Bcl-2(-) najgorszym rokowaniem. W 2 pracach jednocześnie oceniających rokowniczą wartość białek Bcl-2 i Bax korzystne rokowanie związane z Bcl-2 wydaje się równoważyć niekorzystny wpływ białka Bax (tab. 4.) [25, 35].

Uważa się, że nasilenie apoptozy komórek guza nowotworowego związane jest z jego większą chemiowrażliwością. W wielu pracach udowodniono związek między zaburzoną ekspresją białka p53 a chemiooopornością komórek raka [47–51]. Prace oceniające wpływ Bcl-2 i/lub Bax na chemiowrażliwość wykazują rozbieżne wyniki. Część prac nie wykazuje takiego związku [47, 52–54]. W innych zwiększenie ekspresji Bcl-2 uważane jest za przyczynę oporności na cisplatynę i napromienianie [55]. Część prac dotyczących roli Bax w odpowiedzi na leczenie chemiczne wykazuje większą wrażliwość komórek raka na chemioterapię przy zwiększonej ekspresji białka [37–39].

Tab. 1. Rokownicze znaczenie ekspresji p53 w niedrobnokomórkowym raku płuca
Table 1. Prognostic value of p53 protein expression in Non Small Cell Lung Carcinoma

Autor	Rok publikacji	Liczba chorych	Typ nowotworu	Stopnie zaawansowania	Przeciwciała	Interpretacja dodatnich wyników (proc.)	Odsetek dodatnich wyników (proc.)	Wpływ obecności białka (+) na przeżycie/wznowę
Quinlan [56]	1992	114	AC+SqC	I–II	PAb1801 (OS)	>0	43	negatywny (p<0,001)
Ebina [57]	1994	123	NSCLC	I–IV	DO7 (D)	>10	23	w grupie chorych operacyjnych negatywny (p=0,0027)
Fontaini [43]	1995	101	NSCLC	*primary resectable*	PAb1801 (OS)	>1	68	nieznamienny
Harpole [58]	1995	150	AC	T1–2N0M0	PAb1801 (OS)	>0 siła >++ (w skali do +++)	33	negatywny (p<0,035 w analizie wieloczynnikowej)
Dalquen [59]	1996	247	NSCLC	I–IV	CM1Ab (MEDAG)	≥1	48	w grupie bez przerzutów do węzłów negatywny (p=0,032)
Ohsaki [20]	1996	99	NSCLC	I–IV	DO7 (D)	>20	44	nieznamienny
Xu [60]	1996	119	AC+SqC	I–II	PAb1801 (OS)	>5	45	negatywny (p=0,01)
Xu [60]	1996	66	LC	I–IV	PAb1801 (OS)	>5	56	negatywny (p=0,06)
Apolinario [25]	1997	116	NSCLC	I–IIIa	DO7 (D)	>0	48	nieznamienny
Ishida [46]	1997	114	AC	I–IIIa	DO7 (D)	>20	39	negatywny (p<0,001)
Koukourakis [61]	1997	107	AC+SqC	I–II	CM1Ab (N)	>10	52	nieznamienny
MacKinnon [62]	1997	162	NSCLC	I–IV	DO7 (D)	>10 przy sile >=++ (w skali do ++++) >0 przy sile ++++	62	nieznamienny
Pastorino [63]	1997	515	NSCLC	I	CM1Ab (N) + DO7 (D)	>10	43	nieznamienny
Jassem [31]	1998	95	NSCLC	I–IV	DO7 (D)	>25	45	nieznamienny
Borner [21]	1999	49	NSCLC	*primary resectable*	DO7 (D)	>50	61	nieznamienny
D'Amico [64]	2000	408	NSCLC	I	(BioGenex Lab.)	>50	43	negatywny (HR=1,63)
Hwang [65]	2001	68	AC+SqC	IIIa–IIIb + I	DO1 (StCruzB)	>50	22	nieznamienny
Grossi [40]	2003	269	AC	I–IIIa	DO7 (D)	>0 przy sile >= ++ (w skali do +++)	30	negatywny (p=0,032 w analizie wieloczynnikowej)
Poleri [42]	2003	53	NSCLC	I	DO1 (I)	>10	43	nieznamienny
Gregorc [66]	2003	102	NSCLC	III–IV	Pab 1801 (N)	>1	45	nieznamienny

OS – Oncogen Scence, D – Dako, N – Novocastra, StCruzB – Santa Cruz Biotechnology, I – Immunotech

Tab. 2. Rokownicze znaczenie ekspresji Bcl-2 w niedrobnokomórkowym raku płuca
Table 2. Prognostic value of Bcl-2 protein expression in Non Small Cell Lung Carcinoma

Autor	Rok publikacji	Liczba chorych w badaniu	Stopnie zaawansowania	Przeciwciała	Interpretacja dodatnich wyników (proc.)	Odsetek dodatnich (proc.)	Wpływ (+) na przeżycie/wznowę
Pezzella [41]	1993	115	I–II	*clone* 100	brak	22	pozytywny (p<0,1)
Fontaini [43]	1995	91	*primary resectable*	*clone* 124 (Dako)	>1	65	pozytywny (p=0,0002)
Ritter [67]	1995	126	T1N0M0	*clone* 124 (Dako)	>5	37	nieznamienny
Ohsaki [20]	1996	99	I–IV	*clone* 124 (Dako)	>20	19	pozytywny (p<0,05)
Anton [68]	1997	427	I–IV	*clone* 124 (Dako)	≥10	47	nieznamienny
Apolinario [25]	1997	116	I–IIIa	*clone* 100 (dr J. Cordell)	>0	49	nieznamienny
Higashiyama [69]	1997	182	I–IIIB	*clone* 124 (Dako)	>10	20	pozytywny (p=0,039)
Ishida [46]	1997	114	I–IIIa	*clone* 124 (Dako)	>20	38	pozytywny (p<0,05)
Koukourakis [61]	1997	107	I–II	*clone* 100 (Dako)	jak Pezzella	19	pozytywny (p=0,01)
Pastorino [63]	1997	515	I	*clone* 100	>10	16	nieznamienny
Silvestrini [27]	1997	229	I–IIIa	*clone* 124 (Dako)	>1	22	negatywny (p=0,02)
Fleming [70]	1998	106	*primary resectable*	*clone* 124 (Dako)	≥5	27	nieznamienny
Borner [21]	1999	49	*primary resectable*	*clone* 124 (Dako)	>50	31	negatywny (p=0,02)
Dosaka-Akita [28]	1999	116	I–IV	*clone* 124 (Dako)	>10	34	nieznamienny
Huang [35]	1999	203	I–IIIB	*clone* 124 (Dako)	HSCORE*>50	39	pozytywny (p=0,0006)
Laudanski [31]	1999	84	I–IIIa	*clone* 124 (Dako)	>5	46	pozytywny (p=0,008)
D'Amico [64]	2000	408	I	(Biogenez Lab.)	>50	23	nieznamienny
Hwang [65]	2001	68	IIIa–IIIb + I	*clone* 124 (Dako)	>50	43	negatywne (p<0,01)
Grossi [40]	2003	269	I–IIIa	*clone* 124 (Dako) =	>0 przy sile ≥ ++ (w skali do +++)	26	nieznamienny
Gregorc [66]	2003	102	III–IV	*clone* 100/D5 (Novocastra)	>1	8	pozytywny (p<0,02)
Poleri [42]	2003	53	I	*clone* 100 (Immunotech)	>33	30	negatywny (p=0,007 w analizie wieloczynnikowej)

**HSCORE – intensywność barwienia od 0 do 3 razy proc. komórek*

Tab. 3. Rokownicze znaczenie ekspresji Bax w niedrobnokomórkowym raku płuca
Table 3. Prognostic value of Bax protein expression in Non Small Cell Lung Carcinoma

Autor	Rok publikacji	Liczba chorych	Stopnie zaawansowania	Przeciwciała	Interpretacja dodatnich wyników (proc.)	Odsetek dodatnich (proc.)	Wpływ obecności białka (+) na przeżycie/wznowę
Apolinario (25)	1997	61	I	N-20 (Santa Cruz Biotechnology)	>0	51	nieznamienny
Borner (21)	1999	49	*primary resectable*	surowica poliklonalna	>50	47	nieznamienny
Huang (35)	1999	203	I–IIIB	N-20 (Santa Cruz Biotechnology)	HSCORE*>50	72	nieznamienny
Krug (53)	2003	28	Iii–IV	(Immunotech)	>10	68	nieznamienny

**HSCORE – intensywność barwienia od 0 do 3 razy proc. komórek*

Tab. 4. Rokownicze znaczenie korelacji między białkami p53, Bcl-2 i Bax
Table 4. Prognostic value of correlation between expression of p53, Bcl-2 and Bax

Autor	Rok publikacji	Liczba chorych	Stopnie zaawansowania	Związki między markerami	Wpływ związków między markerami na przeżycie
Fontaini [43]	1995	101	*primary resectable*	p53/bcl-2 >1 (p=0,01)	
Ohsaki [20]	1996	99	I–IV	brak związku bcl–2 i p53	bcl-2(+)/p53(-) ma lepsze rokowanie niż inne kombinacje (p. od 0,012 do 0,039)
Apolinario [25]	1997	116	I–IIIa	brak związku bcl-2 i p53, korelacja z bax nie badana	w analizie wieloczynnikowej układ bcl(-)/bax(+) w stopniu I ma negatywny wpływ na przeżycie
Ishida [46]	1997	114	I–IIIa	brak związku bcl-2 i p53	p53(+)/bcl2(-) ma gorsze rokowanie niż inne konfiguracje (p. od p<0,001 do p<0,05)
Koukourakis [61]	1997	107	I–II	brak związku bcl-2 i p53	
Fleming [70]	1998	106	*p.r.*	brak związku bcl-2 i p53	
Tormannen [7]	2001	103	brak	bax(+) koreluje z bcl-2(+) (p=0,03)	
Borner [21]	1999	49	*p.r.*	p53 pozytywna korelacja z bcl2 (p=0,02), odwrotna z bax (p=0,008)	
Dosaka-Akita [28]	1999	116	I–IV	brak związku bcl-2 i p53	
Huang [35]	1999	203	I–IIIB	p53 z mutacją *loop-sheet-helix* daje wyższą ekspresję bax, brak związku bcl-2 i p53	bcl2/bax>1 ma lepsze rokowanie (p=0,0004)
Grossi [40]	2003	269	I–IIIa	korelacja p53(+) a bcl-2(+) (p<0,001)	
Kitagawa [30]	1996	51	I–III	korelacja p53(-) i bcl-2(+) nie podano p.	
Gregorc [66]	2003	102	III–IV	brak związku bcl-2 i p53	

KIERUNKI ROZWOJU BADAŃ

Rola zaburzeń ekspresji białka p53 w kancerogenezie raka płuca jest dobrze udokumentowana. Kliniczna rola tego białka oraz białek Bcl-2 i Bax nie jest jednak jednoznacznie ustalona. W codziennej praktyce oznaczanie ekspresji tych białek w komórkach NDRP nie znajduje obecnie uzasadnienia. Ciekawa natomiast wydaje się możliwość zastosowania terapii celowanej, uwzględniającej zaburzenia funkcji tych białek w nabłonku drzewa oskrzelowego, także we wczesnych etapach kancerogenezy. Próby kliniczne i *in vitro* z *dzikim* genem p53 wprowadzanym do komórek nowotworowych za pomocą wektorów wirusowych (retrowirusów lub adenowirusów) wykazały, że ten typ terapii jest bezpieczny, a wyniki obiecujące [3]. Badania *in vitro*, mające na celu zmniejszenie ekspresji Bcl-2 za pomocą terapii antysensowej (wprowadzenie blokującej sekwencji mRNA genu bcl-2) [1] lub w wyniku naświetlenia komórek światłem czerwonym po uprzedniej fotosensybilizacji [14], skutkują nasileniem apoptozy komórek raka. Ponieważ jednak prace laboratoryjne i kliniczne wykazują rozbieżne wyniki, poznanie znaczenia białek regulujących apoptozę i ich praktyczne zastosowanie wymaga dalszych badań.

PIŚMIENNICTWO

1. Koty PP, Zhang H, Levitt ML. *Antisense bcl-2 treatment increases programmed cell death in non-small cell lung cancer cell lines.* Lung Cancer 1999; 23: 115-27.
2. Moon C, Oh Y, Roth JA. *Current satus of gene therapy for lung cancer and head and neck cancer.* Clin Cancer Res 2003; 9: 5055-67.
3. Roth JA, Swisher SG, Meyn RE. *p53 tumor supressor gene therapy for cancer.* Oncology 1999; 13: 148-54.
4. Caputi M, Groeger AM, Esposito V, et al. *Frequent high expression of bax pro-apoptotic protein in non-small cell lung cancer.* Anticancer Res 1999; 19: 825-7.
5. Budd RC. *Activation-induced cell death.* Curr Opin Immunol 2001; 13: 356-62.
6. Nicholson DW, Thornberry NA. *Caspases: killer proteases.* Trends Biochem Sci 1997; 22: 299-306.
7. Tormanen-Napankangas U, Soini Y, Kahlos K, et al. *Expression of caspases-3, -6 and -8 and their relation to apoptosis in non-small cell lung carcinoma.* Int J Cancer 2001; 93: 192-8.
8. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. *Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1.* Science 1994; 265: 1582-4.
9. Jassem E, Góźdź S, Jassem J i wsp. *Występowanie białka p53 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca.* Nowotwory 1999; 49: 25-9.
10. Jassem E, Rosell R, Jassem J i wsp. *Ocena wartości rokowniczej mutacji genu p53 u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca.* Pneumonol Alergol Pol 1998; 66: 290-5.
11. Laudański J. *Znaczenie prognostyczne zaburzeń genu p53 i ekspresji białka Bcl-2 w niedrobnokomórkowym raku płuca u chorych leczonych operacyjnie.* Rozprawa habilitacyjna; BWA sp. z o.o., Białystok 1999.
12. Hanada M, Aime-Sempe Ch, Sato T, et al. *Structure-function analysis of bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax.* J Biol Chem 1995; 270: 11962-9.
13. Marschitz I, Tinhofer I, Hittmair A, et al. *Analysis of bcl-2 protein expression in chronic lymphocytic leukemia. A comparison of three semiquantitation techniques.* Am J Clin Pathol 2000; 113: 219-29.
14. Usuda J, Chiu S, Murphy ES, et al. *Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane-anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosesitization.* J Biol Chem 2002; 278: 2021-9.
15. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. *BH1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax.* Nature 1994; 369: 321-3.
16. Korsmeyer SJ. *Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death.* Blood 1992; 80: 879-86.
17. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. *Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation.* Science 1984; 226: 1097-9.
18. Reed JC. *Bcl-2 and regulation of programmed cell death.* J Cell Biol 1994; 124: 1-6.
19. Salgia R, Skarin AT. *Molecular abnormalities in lung cancer.* J Clin Oncol 1998; 16: 1207-17.
20. Ohsaki Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, et al. *Bcl-2 and p53 protein expression in non-small cell lung cancers: correlatoin with survival time.* Clin Cancer Res 1996; 2: 915-20.
21. Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, et al. *Expression of apoptosis regulatory proteins of the bcl-2 family and p53 in primary resected non-small--cell lung cancer.* Br J Cancer 1999; 79: 952-58.
22. Hockenbery D, Zutter M, Hickey W, et al. *BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death.* Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 6961-5.
23. Kamada S, Shimono A, Shinto Y, et al. *Bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine.* Cancer Res 1995; 55: 345-59.
24. Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, et al. *Targeted disruption of Bcl-2 alfa beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease and lymphocytopenia.* Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 3700-4.
25. Apolinario RM, van Der Valk P, de Jong JS, et al. *Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularisation in patients with radically resected non--small-cell lung cancer.* J Clin Oncol 1997; 15: 2456-66.
26. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.* Nature 1990; 348: 334-6.
27. Silvestrini R, Costa A, Lequaglie C, et al. *Bcl-2 protein and prognosis in patients with potentially curable non--small-cell lung cancer.* Virchows Arch 1998; 432: 441-4.
28. Dosaka-Akita H, Katabami M, Hommura H, et al. *Bcl-2 expression in non--small cell lung cancers: higher frequency of expression in squamous cell carcinomas with earlier pT status.* Oncology 1999; 56: 259-64.

29. Joseph B, Ekedahl J, Sirzen F, et al. *Differences in expression of pro-caspases in small cell and non-small cell lung carcinoma.* Biochem Biophys Res Commun 1999; 262: 381-7.
30. Kitagawa Y, Wong F, Lo P, et al. *Overexpresion of Bcl-2 and mutations in p53 and K-ras in resected human non-small cell lung cancers.* Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 15: 45-54.
31. Laudański J, Chyczewski L, Niklińska WE, et al. *Expression of bcl-2 protein in non-small cell lung cancer: correlation with clinicopathology and patient survival.* Neoplasma 1999; 46: 25-30.
32. Apte SS, Mattei MG, Olsen BR. *Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of novel alternatively spliced transcript, BAX delta.* Genomics 1995; 26: 592-4.
33. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.* Cell 1993; 74: 609-19.
34. Brady HJ, Gil-Gomez G. Bax. *The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax.* Int J Biochem Cell Biol 1998; 30: 647-50.
35. Huang C, Kohno N, Infusa H, et al. *Overexpression of bax associated with mutations in the loop-sheet-helix motif of p53.* Am J Pathol 1999; 155: 955-65.
36. Ng AY, Bales W, Veltri RW. *Phenylbutyrate-induced apoptosis and differential expression of Bcl-2, Bax, p53 and Fas in human prostate cancer cell lines.* Anal Quant Cytol Histol 2000; 22: 45-54.
37. Bukholm IK, Nesland JM. *Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas.* Virchows Arch 2000; 436: 224-8.
38. Groeger AM, Esposito V, Cassandro R, et al. *A model of BAX gene delivery to human lung cancer.* Anticancer Res 2001; 21: 3627-30.
39. Perez-Soler R, Kemp B, Wu QP, et al. *Response and determinants of sensitivity to paclitaxel in human non-small cell lung cancer tumors heterotransplanted in nude mice.* Clin Cancer Res 2000; 6: 4932-8.
40. Grossi F, Loprevite M, Chiaramondia M, et al. *Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, cd34 in radically resected non-small cell lung cancers.* Eur J Cancer 2003; 39: 1242-50.
41. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, et al. *Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma.* N Engl J Med 1993; 329: 690-4.
42. Poleri C, Morero JL, Nieva B, et al. *Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma: histopathologic and immunohistochemical analysis.* Chest 2003; 123: 1858-67.
43. Fontanini G, Vignati S, Bigini D, et al. *Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small-cell lung cancer.* Br J Cancer 1995; 71: 1003-7.
44. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, et al. *Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis.* Br J Cancer 2003; 89: 55-64.
45. Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, et al. *Reduced expression of proapoptotic gene bax is assiociated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma.* Cancer Res 1995; 55: 4471-8.
46. Ishida H, Irie K, Itoh T, et al. *The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-76 growth fraction.* Cancer 1997; 80: 1034-45.
47. Harada T, Ogura S, Yamazaki K, et al. *Predictive value of expression of p53, Bcl-2 and lung resistance-related protein for response to chemotherapy in non-small cell lung cancers.* Cancer Sci 2003; 94: 394-9.
48. Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, et al. *Immunohistochemical p53 protein status in nonsmall cell lung cancer is a promising indicator in determining in vitro chemosensitivity to some anticancer drugs.* J Surg Oncol 1998; 68: 19-24.
49. Lai SL, Perng RP, Hwang J. *p53 gene status modulates the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells.* J Biomed Sci 2000; 7: 64-70.
50. Perdomo JA, Naomoto Y, Haisa M, et al. *In vivo influence of p53 status on proliferation and chemoradiosensitivity in non-small-cell lung cancer.* J Cancer Res Clin Oncol 1998; 124: 10-8.
51. Rush V, Klimistra D, Venkatraman E, et al. *Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer.* Cancer Res 1995; 55: 5038-42.
52. Brattstrom D, Berqvist M, Lamberg K, et al. *Complete sequence of p53 gene in 20 patients with lung cancer: comparison with chemosensitivity and immunohistochemistry.* Med Oncol 1998; 15: 256-61.
53. Krug LM, Miller VA, Filippa DA, et al. *Bcl-2 and bax expression in advanced non-small cell lung cancer: lack of correlation with chemotherapy response or survival in patients treated with docetaxel plus vinorelbine.* Lung Cancer 2003; 39: 139-43.
54. Reeve JG, Xiong J, Morgan J, et al. *Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumour cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resistance.* Br J Cancer 1996; 73: 1193-200.
55. van De Vaart PJ, Bederbos J, De Jong D, et al. *DNA-adduct levels as a predictor of outcome for NSCLC patients receving cisplatin and radiotherapy.* Int J Cancer 2000; 89: 160-6.
56. Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, et al. *Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer.* Cancer Res 1992; 52: 4828-31.
57. Ebina M, Steineberg SM, Mulshine JL, et al. *Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer.* Cancer Res 1994; 54: 2496-503.
58. Harpole DH, Marks JR, Richards WG, et al. *Localized adenocarcinoma of the lung: oncogene expression of erbb-2 and p53 in 150 patients.* Clin Cancer Res 1995; 1: 659-64.
59. Dalquen P, Sauter G, Torhorst J, et al. *Nuclear p53 overexpression is an independent prognostic parameter in node-negative non-small cell lung carcinoma.* J Pathol 1996; 178: 53-8.
60. Xu HJ, Cagle PT, Hu SX, et al. *Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis.* Clin Cancer Res 1996; 2: 1169-76.
61. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, O'Byrne KJ, et al. *Potential role of bcl-2 as a supressor of tumour angiogenesis in non-small-cell lung cancer.* Int J Cancer 1997; 74: 565-70.
62. MacKinnon M, Kerr KM, King G, et al. *P53, c-erbB-2 and nm23 expression have no prognostic significance in primary pulmonary adenocarcinoma.* Eur J Cardiothorac Surg 1997; 11: 838-42.

63. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, et al. *Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis.* J Clin Oncol 1997; 15: 2858-65.
64. D'Amico TA, Aloia TA, Moore MB, et al. *Molecular biologic substaging of stage I lung cancer according to gender and histology*. Ann Thorac Surg 2000; 69: 882-6.
65. Hwang JH, Lim SC, Kim YC, et al. *Apoptosis and bcl-2 expression as predictors of survival in radiation-treated non-small-cell lung carcinoma.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 50: 13-8.
66. Gregorc V, Darvish S, Ludovini V, et al. *The clinical relevance of Bcl-2, Rb and p53 expression in advanced non-small cell lung cancer.* Lung Cancer 2003; 42: 275-81.
67. Ritter JH, Dresler CM, Wick MR. *Expression of bcl-2 protein in stage t1nomo non-small cell lung carcinoma.* Hum Pathol 1995; 26: 1227-32.
68. Anton RC, Brown RW, Younes M, et al. *Absence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases.* Hum Pathol 1997; 28: 1079-82.
69. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, et al. *Bcl-2 oncoprotein in surgically resected nonsmall cell lung cancer: possibly favorable prognostic factor in association with low incidence of distant metastasis.* J Surg Oncol 1997; 64: 48-54.
70. Fleming MV, Guinee DG, Chu WS, et al. *Bcl-2 immunochistochemistry in a surgical series of non-small cell lung cancer patients.* Hum Pathol 1998; 29: 60-4.

ADRES DO KORESPONDENCJI
lek. Grzegorz Faran
Klinika Nefrologii,
Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Akademia Medyczna
ul. Dębinki 7
80-211 Gdańsk
tel. +48 58 349 25 57
e-mail: g.f@wp.pl