

Apoptoza jest fizjologiczną formą śmierci komórki, podczas której eliminowane są zużyte lub uszkodzone komórki. Apoptoza nazywana jest również programowaną śmiercią komórki, ponieważ jej wystąpienie jest ściśle uwarunkowane genetycznie. W jej regulację zaangażowanych jest wiele genów, szczególnie zaś gen *P53*, *BCL2* oraz *BAX*. Białko p53 wraz z zależnym od siebie białkiem bax aktywuje apoptozę, natomiast białko bcl-2 hamuje proces samobójczej śmierci komórki. Białko p53 aktywuje apoptozę w odpowiedzi na uszkodzenie komórki, a jego aktywność proapoptotyczna może zostać zahamowana przez białko mdm2. Dzięki interakcji pomiędzy białkami mdm2-pRb istnieje ścisła zależność pomiędzy dwoma genami supresorowymi *P53* i *RB* w regulacji apoptozy indukowanej przez białko p53. Sugeruje się, że gen *RB* pełni rolę genu antyapoptotycznego. Zaburzenia funkcji genów supresorowych oraz aktywacja protoonkogenów, poprzez deregulację procesu apoptozy, może prowadzić do rozwoju nowotworu złośliwego. Prawidłowa regulacja umożliwia utrzymanie równowagi pomiędzy namnażaniem się komórek oraz ich obumieraniem. Poza apoptozą, śmierć komórki może przebiegać na drodze nekrozy. Martwica jest procesem patologicznym i różni się zasadniczo od apoptozy. Najczęstszą metodą stosowaną do oceny występowania komórek apoptotycznych jest reakcja TUNEL, polegająca na przyłączeniu znakowanych nukleotydów do końców 3'-OH fragmentów DNA. Rokownicze znaczenie odsetka komórek apoptotycznych występujących w guzach chorych na raka płuca pozostaje przedmiotem kontrowersji. W niniejszej pracy przedstawiono przegląd piśmiennictwa na temat klinicznego znaczenia wskaźnika apoptotycznego w niedrobnokomórkowym raku płuca.

Słowa kluczowe: wskaźnik apoptotyczny, niedrobnokomórkowy rak płuca.

Kliniczne znaczenie wskaźnika apoptotycznego w niedrobnokomórkowym raku płuca

Clinical significance of the apoptotic index in non-small cell lung cancer

Dorota Dworakowska

Klinika Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy, Akademia Medyczna w Gdańsku

Apoptoza jest fizjologiczną formą śmierci komórki, podczas której eliminowane są zużyte lub uszkodzone komórki. Proces ten, poprzez regulację liczby komórek, jest niezwykle istotny w utrzymaniu homeostazy tkankowej oraz poprzez usuwanie potencjalnie niebezpiecznych komórek (w tym komórek nowotworowych czy komórek zainfekowanych przez wirusy) w zwalczaniu wielu chorób [1]. Apoptoza nazywana jest również programowaną śmiercią komórki, ponieważ jej wystąpienie jest ściśle uwarunkowane genetycznie.

W regulację apoptozy zaangażowanych jest wiele genów, szczególnie zaś gen *P53*, *BCL2* oraz *BAX*. Białko p53 wraz z zależnym od siebie białkiem bax aktywuje apoptozę, natomiast białko bcl-2 hamuje proces samobójczej śmierci komórki [1]. Zasadnicza funkcja *P53* wiąże się z zapobieganiem przekazywania zaburzeń genetycznych komórkom potomnym przez wydłużenie fazy G₁ cyklu komórkowego, co umożliwia naprawę uszkodzonych fragmentów nici DNA. Jeśli uszkodzenie materiału genetycznego jest zbyt duże, gen ten uruchamia proces apoptozy [2]. Mutacje genu *P53* mogą powodować z jednej strony możliwość przekazywania komórkom potomnym uszkodzonych fragmentów DNA oraz z drugiej – umożliwiają powstanie komórki *nieśmiertelnej* [3]. Istnieją dwie formy białka p53. Pierwszą z nich jest białko *zdrowe*, określane najczęściej jako *dzikie* (*wild-type p53*). Drugą formą jest białko powstające na drodze mutacji genu *P53*, które jest pozbawione swojej funkcji supresorowej i określane jako białko *zmutowane* (*mutant-type p53*). Poza mutacjami genu *P53*, przyczyną unieczynnienia białka p53 może być tworzenie nieaktywnych kompleksów z innymi białkami, np. z białkiem mdm2 [4–9]. Do utraty funkcji supresorowej może dojść także w wyniku przeniesienia białka p53 z jądra komórkowego do cytoplazmy oraz wskutek jego degradacji pod wpływem niektórych wirusów [7, 10, 11]. Mutacje genu *P53* typu *missense* powodują stabilizację białka p53 i jego gromadzenie w jądrze komórkowym [12, 13]. Dzikie białko p53 charakteryzuje się bardzo krótkim okresem półtrwania. Z tego powodu w badaniach immunohistochemicznych nie stwierdza się jego obecności, podczas gdy białko zmutowane (*mt-p53*), w związku z wydłużonym okresem półtrwania jest wykrywane za pomocą tej metody [13].

Dzięki interakcji pomiędzy białkami mdm2-pRb istnieje ścisła zależność pomiędzy dwoma genami supresorowymi *P53* i *RB* w regulacji apoptozy indukowanej przez białko p53 [14]. Sugeruje się, że gen *RB* pełni rolę genu antyapoptotycznego, ponieważ utrata jego funkcji w komórkach, które posiadają zdrowy gen *P53*, powoduje aktywację apoptozy [15]. p53-zależne pobudzenie białka p21^{WAF1/CIP1} po uszkodzeniu DNA powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₁, natomiast nie pobudza apoptozy [16]. W badaniach *in vitro* wykazano, że białko p21^{WAF1/CIP1} hamuje apoptozę [17]. Zaburzenia dotyczące każdego z po-

Apoptosis remains a physiological form of cell death, which enables elimination of damaged cells. Apoptosis is also called programmed cell death, because this process is exactly regulated by several genes including P53, BCL2 and BAX. p53 protein and bax activate apoptosis, whereas bcl-2 protein inhibits the process of programmed cell death. p53 protein activates apoptosis in response to cell injury and its proapoptotic function might be inhibited by mdm2 protein, which forms with p53 the autoregulatory feed-back loop. Additionally, a close correlation between mdm2-pRb explains how the two most important tumor suppressor genes P53 and RB cooperate in p53 dependent activation of apoptosis. It seems that RB has an antiapoptotic activity, because in cells in which the function of RB was lost, apoptosis was activated due to healthy P53 gene. Disturbances in the function of tumor suppressors genes and activation of protooncogenes could result in cancer development. Proper regulation of apoptosis enables keeping a balance between cell death and proliferation. Instead of apoptosis, the cell can die due to necrosis. Apoptosis of the tumor cells was usually assessed with the use of the TUNEL technique. In current literature, the prognostic value of occurrence of apoptotic cells in lung cancer remains controversial. In this paper the author presented the clinical significance of the apoptotic index in non-small cell lung cancer.

Key words: apoptotic index, non-small cell lung cancer.

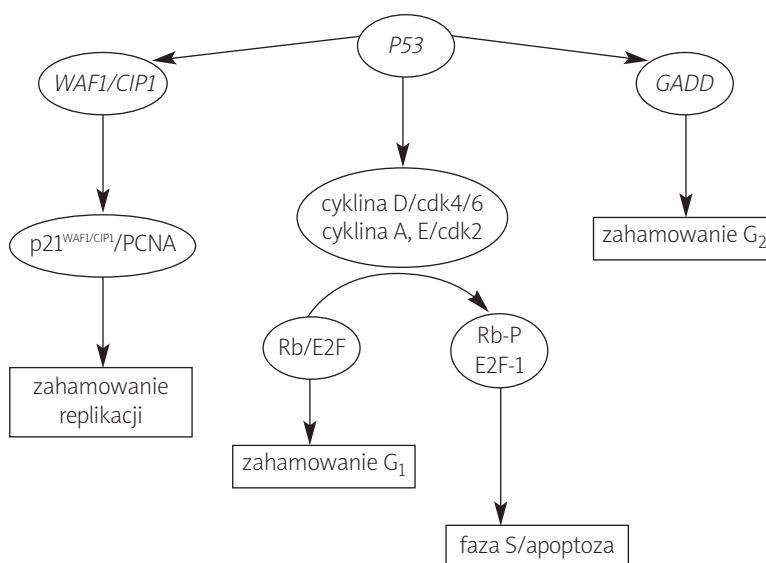
wyższych białek wpływa niezależnie na proces apoptozy, upośledzając w ten sposób naturalne mechanizmy ochronne organizmu (ryc. 1).

Aktywacja genów kontrolujących apoptozę może następować pod wpływem czynników wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych (ryc. 2.). Prawidłowa regulacja umożliwi utrzymanie równowagi pomiędzy namnażaniem się komórek oraz ich obumieraniem. Zaburzenia procesu apoptozy występują w szeregu schorzeń, m.in. w chorobie Alzheimera, chorobie Parkinsona, zakażeniu wirusem HIV, chorobach autoimmunologicznych czy chorobach rozrostowych [1, 18].

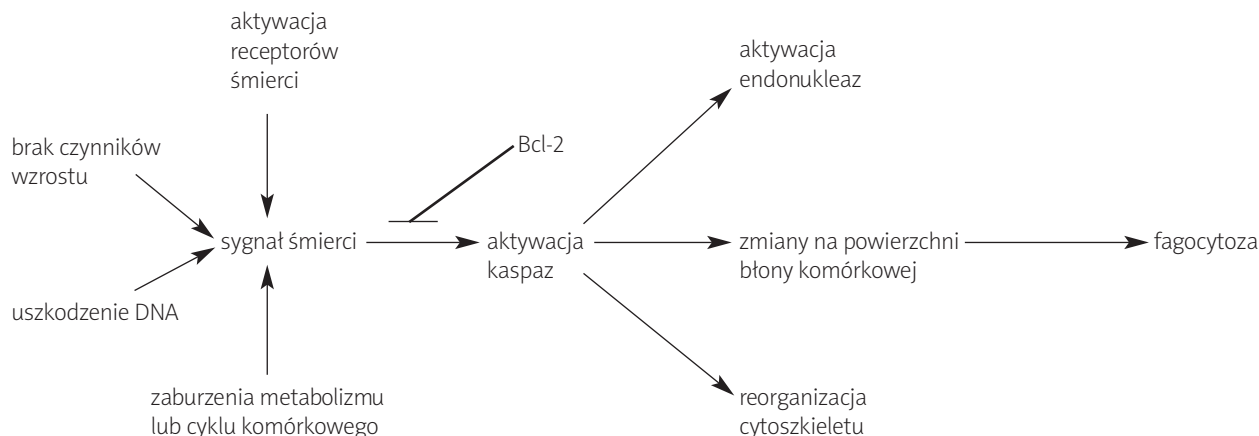
Proces apoptozy składa się z trzech kolejno następujących po sobie faz, obejmujących inicjację, fazę efektorową oraz degradację. Podczas inicjacji komórka otrzymuje sygnał zaczynający proces programowanej śmierci komórki, podczas fazy efektorowej dochodzi m.in. do depolaryzacji błony mitochondrialnej, w fazie tej proces jest jeszcze odwracalny. Po osiągnięciu tzw. punktu bez odwrotu, komórka ulega destrukcji [19, 20].

Poza apoptozą, śmierć komórki może przebiegać na drodze drugiego alternatywnego mechanizmu – nekrozy. Martwica jest procesem patologicznym i różni się zasadniczo od apoptozy. Podstawowe rozbieżności dotyczą etiologii martwicy, ponieważ jest ona zawsze związana z poważnym chemicznym lub fizycznym uszkodzeniem komórek poprzez działanie czynników zewnętrznych, takich jak urazy, niedotlenienie czy zatrucia. Martwica dotyczy większej liczby komórek oraz wywołuje odczyn zapalny w otaczających tkankach. Apoptoza dotyczy pojedynczych komórek, które nie tracą integralności błon komórkowych, a co za tym idzie, nie powodują odczynu zapalnego [21, 22].

Podczas procesu apoptozy dochodzi do obkurczania się jądra komórkowego, kondensacji chromatyny jądrowej oraz powstania ciałek apoptotycznych, zawierających zagęszczoną chromatynę oraz niezmiennione organella komórkowe. Ciałka te są fagocytowane przez sąsiednie komórki tej samej tkanki lub przez komórki żerne. Charakterystyczne zmiany morfologiczne podczas procesu apoptozy są wynikiem fragmentacji chromatyny w wyniku aktywacji endonukleaz. Enzymy te tną nić DNA na fragmenty początkowo o wielkości od ok. 300 do 50 tysięcy par zasad (które prawdopodobnie odpowiadają domenom chromatyny), a następnie na mniejsze fragmenty od 180 do 200 par zasad [21].



Ryc. 1. Działanie wybranych czynników uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego
Fig. 1. The function of selected parameters involved in cell cycle regulation



Ryc. 2. Apoptoza
Fig. 2. The apoptosis

Morfologiczne cechy apoptozy (zmniejszenie objętości komórki, kondensacja chromatyny jądrowej, fragmentację jądra, a nawet całej komórki na mniejsze ciała apoptotyczne) można rozpoznać w mikroskopie elektronowym. Większe fragmenty DNA (od ok. 300 do 50 tys. par zasad) można uwidocznić stosując elektroforezę pulsacyjną, natomiast mniejsze (od 180 do 200 par zasad) można wykazać za pomocą elektroforezy DNA na żelu agarozowym. Dodatkowo mniejsze fragmenty DNA mają wolne końce 3'-OH, które można wykryć za pomocą technik immunocytochemicznych (*in situ* *nic-end labeling*). Najczęściej stosuje się metodę polegającą na przyłączeniu znakowanych nukleotydów do końców 3'-OH fragmentów DNA (reakcja TUNEL – *TdT-mediated deoxyuridine triphosphate biotin/digoxigenin nick end-labeling*) [21, 22].

Apoptoza komórek nowotworowych w niedrobnokomórkowym raku płuca (NDKRP) najczęściej oceniana była przy użyciu techniki TUNEL [4, 23–30]. Metoda ta pozwala na wykrycie komórek z typowymi cechami apoptozy, także tych we wczesnych stadiach samobójczej śmierci komórki, które nie wykazują jeszcze widocznych zmian morfologicznych [31]. Ze względu na możliwość fałszywie dodatnich reakcji, związanych z obecnością komórek martwiczych, oznaczenie apoptozy za pomocą techniki TUNEL nie jest pozbawione ograniczeń [32]. Aby wykluczyć martwicę, ocenę apoptozy należy przeprowadzić z równoczesną oceną tego samego skrawka guza barwionego hematoksyliną-eozyną [26, 28–31]. Z drugiej strony – przedłużony okres utrwalania tkanek w formalinie może spowodować fałszywie ujemny wynik reakcji TUNEL [33], dlatego część autorów wykluczyła z analizy przypadki, w których podczas barwienia nie stwierdzono ani jednej komórki apoptotycznej [27].

W większości opracowań dotyczących NDKRP, występowanie komórek apoptotycznych wyrażono za pomocą wskaźnika apoptotycznego (WA, *Apoptotic Index – AI*), określającego łączną liczbę komórek apoptotycznych występujących wśród 1 000 komórek nowotworowych [4, 23–31]. W pracach tych średnia wartość WA dla całej grupy wyno-

siła 11–23, natomiast mediana kształtowała się w zakresie od 8 do 15 [23, 25–27, 29–31, 34].

Pomimo tego samego sposobu oznaczania występowania komórek apoptotycznych w poszczególnych pracach dotyczących NDKRP, istnieją również pewne czynniki utrudniające wspólną analizę wyników przedstawionych przez różnych autorów. Trudności te dotyczą faktu różnego podziału chorych na podgrupy podczas analizy statystycznej. Część autorów postuluje się podziałem opartym na medianie oraz dolnym i górnym kwartylu [27, 29, 31], inni natomiast dzielą badaną grupę jedynie na dwie podgrupy, opierając podział na średniej wartości WA [26, 34, 35]. W niektórych pracach podział na dwie podgrupy wynika z małej liczebności badanej grupy [34]. Wydaje się jednak, że podział chorych na podstawie mediany oraz dolnego i górnego kwartyla, jest podziałem lepszym, umożliwiającym dokładniejszą analizę, jakkolwiek wymagającym również większej liczebnie grupy.

Równowaga pomiędzy proliferacją komórkową a apoptozą oceniana była w wielu nowotworach złośliwych [23, 27, 31]. Sugeruje się, że rozrost guza nowotworowego może wynikać ze zwiększonej proliferacji, zahamowania apoptozy lub z obu przyczyn łącznie [27]. W pracach dotyczących chłoniaków złośliwych, nowotworów złośliwych jelita grubego czy piersi, stwierdzono silny związek pomiędzy nasileniem apoptozy a zwiększeniem różnych wskaźników proliferacji komórkowej [36–38]. W NDKRP stwierdzono również zależność pomiędzy WA a wskaźnikiem mitotycznym [25, 35] oraz ekspresją białka PCNA [25, 31].

W jednej z najciekawszych prac, oceniających łącznie WA oraz W PCNA w komórkach NDKRP, chorych podzielono na podstawie mediany oraz dolnego i górnego kwartyla na cztery podgrupy, o bardzo niskim, niskim, wysokim i bardzo wysokim WA [29]. Autorzy tej pracy sugerowali ścisły związek pomiędzy apoptozą a proliferacją komórek NDKRP, ponieważ w badaniu tym wzrostowi WA towarzyszył wzrost średniego wskaźnika proliferacji [29]. W kolejnej pracy tych samych autorów sugerowano, że zwiększo-

Tabela 1. Kliniczne znaczenie wskaźnika apoptotycznego w NDKRP w wybranych badaniach
Table 1. Clinical relevance of the apoptotic index in NSCLC in selected publications

Autor	Liczba chorych	Wpływ na przeżycie	Inne obserwacje
Tormanen i wsp. [23]	75	zwiększony odsetek komórek apoptotycznych korelował z gorszym rokowaniem	brak zależności pomiędzy WA a markerami proliferacji oraz akumulacją białka p53 wyższy WA u chorych z rakiem płaskonabłonkowym niż u chorych z gruczolakorakiem
Langendijk i wsp. [24]	161	zwiększony odsetek komórek apoptotycznych korelował z gorszym rokowaniem	
Hanaoka i wsp. [26]	70	WA bez znaczenia rokowniczego	wyższy WA u chorych z rakiem płaskonabłonkowym niż u chorych z gruczolakorakiem brak związku pomiędzy WA a ekspresją białek bax i bcl-2
Puglisi i wsp. [27]	96	bez znaczenia rokowniczego dla WA rozpatrywanego pojedynczo, podczas łącznej oceny wartości rokowniczej WA i W PCNA, najgorsze rokowanie przy fenotypie <i>najniższy WA/najwyższy W PCNA</i>	brak zależności pomiędzy WA a markerami proliferacji oraz akumulacją białka p53
Tanaka i wsp. [29]	236	gorsze rokowanie u chorych z pośrednim WA w porównaniu do chorych z najwyższym i najniższym WA	związek pomiędzy ilością komórek apoptotycznych a zwiększoną proliferacją komórkową brak zależności pomiędzy WA a akumulacją białka p53
Tanaka i wsp. [31]	185	nie badano	zwiększony odsetek komórek apoptotycznych jako skutek aktywacji proliferacji komórkowej jedynie przy zachowanych prawidłowo działających mechanizmach pobudzających apoptozę
Dworakowska i wsp. [34]	50	zwiększony odsetek komórek apoptotycznych korelował z gorszym rokowaniem	zależność pomiędzy niskim WA a obecnością białka mdm2, brak zależności pomiędzy WA a nagromadzeniem białka p53, pRb i p21 ^{WAF1/CIP1}
Shoji i wsp. [39]	233	nie badano	brak zależności pomiędzy WA a ekspresją białka p21 ^{WAF1/CIP1}

WA – wskaźnik apoptotyczny, W PCNA – wskaźnik ekspresji białka PCNA

ny odsetek komórek apoptotycznych może być skutkiem aktywacji proliferacji komórkowej, ale tylko przy zachowanych prawidłowo działających mechanizmach pobudzających apoptozę, tj. w przypadku obecności *dzikiego* białka p53 [31]. Tanaka i wsp. [29] nie potwierdzili wcześniejszych obserwacji Puglisiego i wsp. oraz Tormanena i wsp. [23, 27] o braku zależności pomiędzy markerami proliferacji i apoptozy w komórkach NDKRP.

W części prac analizowano zależność pomiędzy wysokością WA a obecnością innych parametrów, uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego (m.in. białka p53, pRb, mdm2, czy p21^{WAF1/CIP1}). Brak zależności pomiędzy WA a akumulacją białka p53 [23, 27, 29, 35] oraz WA a nagromadzeniem białka p21^{WAF1/CIP1} [39] stwierdzono w niektórych badaniach dotyczących NDKRP. W badaniach własnych naszego zespołu stwierdzono zależność pomiędzy niskim WA a obecnością białka mdm2 [34]. Obserwacja ta mogłaby mieć uzasadnienie teoretyczne, ponieważ białko mdm2 poprzez wpływ na białko p53 pozostaje inhibitorem apoptozy [7, 9]. Wielu autorów wysuwa hipotezę o *współgrze* fenotypów (*the gain of function*) pomiędzy białkiem mdm2 i białkiem p53. Białka te tworzą pętlę sprzężenia zwrotnego, w której p53 pobudza białko mdm2, natomiast białko mdm2 hamuje aktywność białka p53 [7]. Identyfikacja interakcji pomiędzy białkiem mdm2 a pRb ustaliła ścisły związek pomiędzy dwoma naj-

piej poznanymi genami supresorowymi *RB* oraz *P53* [40]. Ostatnie badania potrójnego kompleksu białkowego pRb-mdm2-p53 potwierdziły, że oba geny supresorowe uczestniczą w regulacji apoptozy, indukowanej przez gen *P53* [14]. Białko pRb hamując białko mdm2, powoduje zwiększenie ilości białka p53 w komórce i przez to indukcję apoptozy [14, 41].

Podczas oceny zależności pomiędzy WA a cechami demograficznymi i klinicznymi chorych na NDKRP, niektórzy autorzy wykazali częstsze występowanie wyższego WA w raku płaskonabłonkowym [26, 27], inni natomiast w gruczolakorakach [23]. W jednej z prac stwierdzono, że komórki NDKRP o średnim lub niskim stopniu zróżnicowania charakteryzowały się wyższym WA [31]. W badaniach własnych naszego zespołu nie wykazano żadnego związku pomiędzy wysokością WA a cechami klinicznymi chorych na NDKRP [34].

We współczesnej literaturze rokownicze znaczenie WA u chorych na NDKRP pozostaje przedmiotem kontrowersji. W części prac zwiększony odsetek komórek apoptotycznych korelował z gorszym [23, 24, 34] lub lepszym rokowaniem [4, 25], podczas gdy w innych pracach nie wykazano jego wpływu na przeżycie [26, 27]. W jednym z badań gorsze rokowanie obserwowano u chorych z pośrednim wskaźnikiem apoptotycznym w porównaniu do chorych z najwyższym i najniższym WA [29] (tab. 1.). Rozbieżności w rokowniczym

znaczeniu WA wydają się być zaskakujące, ponieważ większość powyższych badań została przeprowadzona w podobnej populacji chorych na NDKRP, którzy zostali poddani radykalnemu zabiegowi chirurgicznemu w stopniu zaawansowania klinicznego poniżej III A [26, 27, 42].

Na podstawie obserwacji wielu autorów wysunięto hipotezę sugerującą, że wyższy WA, korelujący z gorszym rokowaniem w grupie chorych na NDKRP może być konsekwencją nie tylko aktywacji mechanizmów obronnych komórki, ale także wyrazem zwiększonej proliferacji komórek nowotworowych [23, 24, 27, 29, 31, 34]. Podczas łącznej oceny wartości rokowniczej WA i W PCNA, wykazano, że najgorzej rokowali chorzy, u których stwierdzono fenotyp o najniższym WA oraz najwyższym W PCNA [27]. Obserwacja ta potwierdza hipotezę o znaczeniu proporcji pomiędzy namnażaniem się komórek a ich obumieraniem, oraz o konieczności łącznej analizy wartości rokowniczej WA oraz W PCNA [27, 31].

Interesujące wyniki uzyskano w pracy Tanaki i wsp., gdzie po podziale chorych na cztery podgrupy, grupa z najniższym oraz najwyższym WA rokowała lepiej, podczas gdy grupa z pośrednim WA rokowała gorzej [29]. W pracy tej stwierdzono, że lepsze rokowanie w podgrupie chorych z najniższym wskaźnikiem apoptotycznym wynikało z faktu niskiej aktywności proliferacyjnej u tych chorych, natomiast w grupie z pośrednim WA gorsze rokowanie wiązało się ze zwiększoną proliferacją komórkową. W grupie chorych z najwyższym WA, którzy również mieli dłuższe przeżycie, dobre rokowanie wynikało z faktu, że apoptoza przewyższała namnażanie się komórek [29].

Podsumowując powyższe rozważania wydaje się, że kliniczne znaczenie odsetka komórek nowotworowych w guzie, które uległy apoptozie, pozostaje w niedrobnokomórkowym raku płuca zagadnieniem nierozstrzygniętym [4, 23–25, 27]. Apoptoza komórek nowotworowych może odgrywać istotne znaczenie w procesie terapeutycznym, ponieważ komórki nowotworowe poza apoptozą spontaniczną mogą ulegać apoptozie indukowanej przez leki przeciwnowotworowe. Z drugiej strony – zaburzenia procesu apoptozy mogą w niektórych przypadkach powodować oporność komórek nowotworowych na stosowane leczenie [1]. Ustalenie rokowniczego znaczenia wskaźnika apoptotycznego w raku płuca, który pozostaje najczęstszym nowotworem złośliwym, wydaje się być szczególnie istotne nie tylko z naukowego, ale również z klinicznego punktu widzenia.

Piśmiennictwo

- Gerl R, Vaux DL. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 263-70.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-31.
- Martin K, Trouche D, Hagemeyer C, Sorensen TS, La Thangue NB, Kouzarides T. Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature* 1995; 375: 691-4.
- Macluskey M, Baillie R, Chandrachud LM, Pendleton N, Schor AM. High levels of apoptosis are associated with improved survival in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 2123-8.
- Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3453-9.
- Momand J, Zambetti GP. Analysis of the proportion of p53 bound to mdm-2 in cells with defined growth characteristics. *Oncogene* 1996; 12: 2279-89.
- Momand J, Zambetti GP. Mdm-2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem* 1997; 64: 343-52.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69: 1237-45.
- Piette J, Neel H, Marechal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997; 15: 1001-10.
- Graziano SL. Non-small cell lung cancer: clinical value of new biological predictors. *Lung Cancer* 1997; 17 Suppl 1: S37-58.
- Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; 187: 112-26.
- Gorgoulis VG, Zoumpourlis V, Rassidakis GZ, Karameris A, Rassidakis AN, Spandidos DA, Kittas C. A molecular and immunohistochemical study of the MDM2 protein isoforms and p53 gene product in bronchogenic carcinoma. *J Pathol* 1996; 180: 129-37.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
- Yap DB, Hsieh JK, Chan FS, Lu X. mdm2: a bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene* 1999; 18: 7681-9.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-7.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
- Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21 (Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* 2002; 179: 1-14.
- Bell JE. The neuropathology of adult HIV infection. *Rev Neurol (Paris)* 1998; 154: 816-29.
- Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3: 614-20.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18: 44-51.
- Zabel M. *Immunocytochemia*. PWN, Warszawa 1999.
- Ito Y, Otsuki Y. Localization of apoptotic cells in the human epidermis by an in situ DNA nick end-labeling method using confocal reflectant laser microscopy. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 783-6.
- Tormanen U, Eerola AK, Rainio P, et al. Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 5595-602.
- Langendijk H, Thunnissen E, Arends JW, et al. Cell proliferation and apoptosis in stage III inoperable non-small cell lung carcinoma treated by radiotherapy. *Radiother Oncol* 2000; 56: 197-207.
- Matturri L, Colombo B, Lavezzi AM. Evidence for apoptosis in non-small cell lung carcinoma. Relationship with cell kinetics and prognosis. *Anal Quant Cytol Histol* 1999; 21: 240-4.
- Hanaoka T, Nakayama J, Haniuda M, Sato TA. Immunohistochemical demonstration of apoptosis-regulated proteins, Bcl-2 and Bax, in resected non-small-cell lung cancers. *Int J Clin Oncol* 2002; 7: 152-8.
- Puglisi F, Minisini AM, Aprile G, et al. Balance between cell division and cell death as predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology* 2002; 63: 76-83.
- Takata T, Tanaka F, Yamada T, et al. Clinical significance of caspase-3 expression in pathologic-stage I, non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2001; 96 Suppl: 54-60.
- Tanaka F, Kawano Y, Li M, et al. Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2728-36.
- Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Apoptosis and p53 status predict the efficacy of postoperative administration of UFT in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2001; 84: 263-9.
- Tanaka F, Takata T, Yamada T, et al. Apoptotic tumor-cell death in response to cell proliferation is influenced by p53 status in resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 36: 27-32.
- Pulkkanen KJ, Laukkanen MO, Naarala J, Yla-Herttuala S. False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis* 2000; 5: 329-33.

33. Davison FD, Groves M, Scaravilli F. The effects of formalin fixation on the detection of apoptosis in human brain by in situ end-labelling of DNA. *Histochem J* 1995; 27: 983-8.
34. Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, et al. Clinical significance of apoptotic index in non-small cell lung cancer: correlation with p53, mdm2, pRb and p21WAF1/CIP1 protein expression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; in press.
35. O'Neill AJ, Staunton MJ, Gaffney EF. Apoptosis occurs independently of bcl-2 and p53 over-expression in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 1996; 29: 45-50.
36. Kanavaros P, Bai M, Stefanaki K, Poussias G, Rontogianni D, Zioga E, Gorgoulis V, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of the p53, mdm2, p21/Waf-1, Rb, p16, Ki67, cyclin D1, cyclin A and cyclin B1 proteins and apoptotic index in T-cell lymphomas. *Histol Histopathol* 2001; 16: 377-86.
37. Tatebe S, Ishida M, Kasagi N, Tsujitani S, Kaibara N, Ito H. Apoptosis occurs more frequently in metastatic foci than in primary lesions of human colorectal carcinomas: analysis by terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Int J Cancer* 1996; 65: 173-7.
38. Vakkala M, Lahteenmaki K, Raunio H, Paakko P, Soini Y. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 319-24.
39. Shoji T, Tanaka F, Takata T, et al. Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3865-71.
40. Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 1995; 375: 694-8.
41. Hsieh JK, Chan FS, O'Connor DJ, Mitnacht S, Zhong S, Lu X. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* 1999; 3: 181-93.
42. Chen X, Bargonetti J, Prives C. p53, through p21 (WAF1/CIP1), induces cyclin D1 synthesis. *Cancer Res* 1995; 55: 4257-63.

Adres do korespondencji

dr med. **Dorota Dworakowska**
Klinika Chorób Wewnętrznych,
Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy
Akademia Medyczna
ul. Dębinki 7
80-211 Gdańsk
tel. +48 58 349 28 42
faks +48 58 349 29 41
e-mail: ddw@amg.gda.pl