

Śmierć zamiast aktywacji – badanie apoptozy limfocytów w węzłach chłonnych drenujących oraz w guzie nowotworowym

Death instead of activation – a study of lymphocyte apoptosis in the tumor draining lymph nodes and in the tumor tissue



Paweł Rybojad¹, Jacek Tabarkiewicz², Andrzej Jabłonka¹, Mariusz Kędra¹, Barbara Wilczyńska^{1,2}, Piotr Skoczylas¹, Marek Sawicki¹

¹Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

²Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2012; 3: 361–365

Streszczenie

Wstęp: Apoptoza, czyli indukowana śmierć komórki, wiąże się z wieloma stanami patologicznymi, w tym również rozwojem nowotworów. Z przeglądu piśmiennictwa na ten temat wynika, że komórki niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) wykazują ekspresję powierzchniową CD95L, który może stymulować apoptozę limfocytów mających kontakt z komórkami nowotworowymi.

Cel pracy: Ocena apoptozy limfocytów w tkankach pacjentów chorych na NDRP, potwierdzenie jej związku z ekspresją antygenu CD95(Fas) oraz znalezienie korelacji ocenianych parametrów z przeżyciem pacjentów.

Materiał i metody: Wyizolowano komórki mononuklearne z krwi obwodowej, tkanki nowotworowej i węzłów chłonnych pochodzących od 30 pacjentów chorych na NDRP. Oceny apoptozy, ekspresji CD95 i markerów limfocytów dokonano za pomocą cytometrii przepływowej.

Wyniki: W przeprowadzonych badaniach stwierdzono istotnie wyższy odsetek limfocytów apoptotycznych i martwych w tkance nowotworowej w porównaniu z krwią obwodową i węzłami chłonnymi. Zaobserwowano także pozytywną korelację pomiędzy liczbą apoptotycznych limfocytów a ekspresją antygenu CD95 na powierzchni komórek CD3+ i CD8+. Stwierdzono również korelację pomiędzy liczbą martwych limfocytów a ekspresją receptora Fas na komórkach CD3+, CD4+ i CD8+. Zależności te były najwyraźniejsze w węzłach chłonnych. Dodatkowo wieloletnia obserwacja badanych pacjentów pozwoliła na określenie zależności pomiędzy badanymi parametrami a czasem przeżycia pacjentów. Zależności te stwierdzono jednak wyłącznie w stosunku do środowiska guza.

Wnioski: Uzyskane wyniki sugerują, że aktywowane limfocyty mogą być eliminowane przez mikrośrodowisko guza. Zjawisko to jest szczególnie niekorzystne w przypadku limfocytów T cytotoksycznych, które stanowią populację mającą aktywnie

Abstract

Background: Apoptosis, or induced cell death, is associated with many pathological conditions, including development of cancer. Lung cancer cells are able to express CD95L, which can stimulate apoptosis of lymphocytes which were exposed to tumor cells.

Aim: To assess apoptosis of lymphocytes in the tissues of patients with NSCLC, to confirm its relationship with expression of CD95 antigen (Fas), and to determine the correlation between the estimated parameters and survival time of patients.

Material and methods: Mononuclear cells were isolated from blood, tumor and lymph nodes from 30 patients with NSCLC. Assessment of apoptosis, CD95 expression and lymphocyte markers was performed using flow cytometry.

Results: We found a significantly higher percentage of apoptotic and dead cells in tumor than in blood and lymph nodes. We observed a positive correlation between the number of apoptotic cells and expression of CD95 on the surface of CD3+ and CD8+. We also found a correlation between the number of dead cells and expression of Fas receptor on surfaces of CD3+, CD4+ and CD8+. The relationship between studied parameters and patients' survival time was found to be significant only in tumor.

Conclusions: Our results suggest that activated lymphocytes can be eliminated by the tumor microenvironment. This is disadvantageous in the case of cytotoxic T lymphocytes, which are prepared to eliminate cancer cells. Assessment of immunological parameters in tissues directly involved in the carcinogenesis process may be useful for evaluation of clinical predictions.

Key words: lung cancer, apoptosis, survival time.

Adres do korespondencji: dr n. med. Paweł Rybojad, Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej, Uniwersytet Medyczny, ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin, tel. +48 607 922 954, e-mail: rybojad@wp.pl

eliminować komórki rakowe. Ocena parametrów immunologicznych w tkankach bezpośrednio włączonych w proces nowotworzenia może być przydatna do oceny prognozy klinicznej.

Słowa kluczowe: rak płuca, apoptoza, czas przeżycia.

Wstęp

Apoptoza jest fizjologicznym procesem, który zachodzi zarówno podczas rozwoju embrionalnego, jak i u dorosłych osobników jako proces niezbędny do utrzymania homeostazy tkankowej. Jest to jedna z form śmierci komórki – dzięki temu mechanizmowi usuwane są zużyte lub uszkodzone komórki. W odróżnieniu od martwicy, w przypadku której dochodzi do uszkodzenia zewnętrznym czynnikiem, apoptoza jest zjawiskiem naturalnym w rozwoju i życiu organizmów. Charakteryzuje ją szereg specyficznych zmian morfologicznych i biochemicznych. Śmierć komórki w wyniku apoptozy trwa zwykle kilka do kilkunastu godzin, a ciała apoptotyczne powstałe w wyniku rozpadu są szybko fagocytozowane przez komórki żerne. Tego rodzaju śmierć komórki nie wywołuje stanu zapalnego, w odróżnieniu od innych rodzajów śmierci komórki, którym stan zapalny zawsze towarzyszy [1–5]. We wszystkich komórkach człowieka funkcjonuje podobny układ odpowiedzialny za ten rodzaj „kontrolowanej śmierci”. Składa on się z rodziny proteaz, które są aktywowane przez sygnały indukujące, dlatego też obecnie uważa się, że zamiast terminu **programowana** śmierć komórki powinno się w stosunku do apoptozy używać terminu **indukowana** śmierć komórki. Wiąże się ona z wieloma stanami patologicznymi, w tym również z rozwojem nowotworów oraz ich opornością na chemioterapię [2, 4–7].

Komórki ulegające przemianie nowotworowej nabierają w jej trakcie odrębnych od komórek prawidłowych cech antygenowych, stymulując w sposób ciągły układ immunologiczny.

Wydaje się, że w początkowej fazie rozwoju raka płuca mechanizmy nadzoru immunologicznego mogą odgrywać istotną rolę w eliminacji transformowanych komórek, których liczba nie przekracza krytycznej wielkości. Najistotniejszą rolę odgrywają tutaj komórki „naturalni zabójcy” (ang. *natural killer* – NK), makrofagi oraz niektóre limfocyty Tc [1, 8, 9].

Mimo że wg niektórych opinii aktywność limfocytów cytotoksycznych (Tc) zdolnych do zabicia komórek nowotworowych koreluje z dobrą prognozą i długim przeżyciem, to jednak zgodnie z większością obserwacji najważniejszymi komórkami odpowiedzi przeciwnowotworowej wydają się swoiste limfocyty pomocnicze (Th). To one odpowiedzialne są za rozpoznawanie antygenów nowotworowych prezentowanych im w połączeniu z cząsteczkami głównego układu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex* – MHC) klasy II. W wyniku aktywacji limfocyty Th wydzielają szereg cytokin, które wspomagają lub aktywują kolejne komórki układu immunologicznego albo bezpośrednio niszczą komórki nowotworowe [1, 8, 10, 11]. Rozwój raka oraz równoczesne niszczenie komórek i tkanek gospodarza prowadzi do reakcji obronnych. Ich efektywność

jest często nieskuteczna z powodu kontrreakcji komórek guza. Mechanizmy rządzące tym zjawiskiem wciąż są nie do końca poznane. Jasnym jest natomiast fakt, że komórki nowotworowe, chcąc zapobiec swojej eliminacji przez organizm gospodarza, wykształciły swoiste reakcje obronne. Jednym z najważniejszych mechanizmów ucieczki raka spod nadzoru immunologicznego jest ekspresja ligandu dla antygeny Fas (tzw. APO-1 lub CD95) i innych cząsteczek stymulujących apoptozę. Cząsteczka FasL (CD95L) obecna na niektórych typach komórek nowotworowych może stymulować apoptozę atakujących guz limfocytów, na których powierzchni obecny jest marker CD95. Taki mechanizm może pomóc komórkom nowotworowym uniknąć specyficznego nadzoru immunologicznego i wywoływać zjawisko immunosupresji u gospodarza.

Z przeglądu piśmiennictwa na ten temat wynika, że komórki niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) wykazują ekspresję powierzchniową *CD95L*, który może stymulować apoptozę limfocytów mających kontakt z komórkami nowotworowymi [9, 12–16].

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie wpływu procesu śmierci limfocytów, uzyskanych z krwi, drenujących węzłów chłonnych i guza pacjentów poddanych zabiegom operacyjnym z powodu NDRP oraz ekspresji antygeny CD95 znajdującego się na ich powierzchni na całkowity czas przeżycia pacjentów.

Materiał i metody

Badaniami objęto 30 chorych na NDRP w stopniu zaawansowania IB–IIIA, spełniających niżej wymienione kryteria, poddanych radykalnej resekcji zmian nowotworowych w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Warunkiem włączenia do grupy badanej było ustalenie typu histopatologicznego NDRP w okresie kwalifikacji do leczenia.

Chorzy zakwalifikowani do badań w okresie poprzedzającego miesiąca:

- nie wykazywali cech infekcji;
- nie przyjmowali leków mających wpływ na układ immunologiczny;
- nie mieli wykonywanej transfuzji krwi lub innych preparatów krwiopochodnych;
- nie chorowali na choroby alergiczne.

Krew z żyły odłokciowej, w ilości 20 ml, pobierano do heparynizowanych probówek, a następnie rozcieńczano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (ang. *Phosphate-Buffer Saline* – PBS; Biochrome KG, Niemcy) w proporcji 1 : 1.

Węzły chłonne i fragmenty guza nowotworowego pozyskiwano w trakcie zabiegu operacyjnego.

Materiał tkankowy homogenizowano następnie za pomocą MediMachine (Dako, Dania), a uzyskaną zawiesinę filtrowano w celu usunięcia fragmentów tkanek.

Rozcieńczoną krew oraz zawiesinę komórek z guza i węzła chłonnego nawarstwiano na preparat Gradisol L (Aqua Medica, Polska), a następnie wirowano w gradiencie gęstości przez 20 min przy przyspieszeniu $700 \times g$. Uzyskane komórki płukano dwukrotnie w roztworze PBS, po czym za pomocą diocetanu fluoresceiny (FDA) i jodku propidyny (PI) odróżniano komórki żywe od martwych i apoptotycznych.

Następnie przeprowadzono trójkolorowe testy immunofluorescencyjne przy użyciu kombinacji FITC, PE oraz PE-Cy5 powiązanych z przeciwciałami monoklonalnymi. Wykorzystano przeciwciała monoklonalne firm Pharmingen (USA) i Caltag (USA). Immunofenotypowanie przeprowadzono zgodnie z protokołem producentów.

Komórki zostały zebrane przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur wyposażonego w laser argonowy (Becton Dickinson) i analizowano przy użyciu oprogramowania Cell-Quest.

Do analizy statystycznej zastosowano program Statistica 10PL oraz GraphPad Prism. Dodatkowo, po wykazaniu, że rozkład zmiennych odbiegał od normalnego, przeprowadzono nieparametryczne testy:

- do porównania wyników uzyskanych z poszczególnych tkanek test ANOVA Friedmana i testy *post hoc*;
- dla oceny zależności pomiędzy badanymi parametrami – korelacje porządku rang Spearmana;
- dla wybrania optymalnego punktu odcięcia wykorzystano krzywe ROC (ang. *receiver operating characteristic*);
- do analizy przeżyć wykorzystano krzywe Kaplana-Meiera i test *log-rank* Mantela-Coxa.

Wyniki przedstawiono jako medianę i wartość rozstępu kwartylnego (ang. *interquartile range* – IQR). Za istotne przyjmowano różnice przy $p < 0,05$.

Wyniki

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono statystycznie istotnie wyższy odsetek limfocytów apoptotycznych (χ^2 ANOVA = 10,64 i $p < 0,01$) i martwych (χ^2 ANOVA = 14,90 i $p < 0,001$) w tkance nowotworowej w porównaniu z krwią obwodową i drenującymi węzłami chłonnymi. W najbliższych guzowi węzłach chłonnych zaobserwowano także pozytywną korelację pomiędzy liczbą apoptotycznych

limfocytów a ekspresją antygenu *CD95* na powierzchni komórek CD3+ ($R = 0,58$ i $p < 0,001$) i CD8+ ($R = 0,44$ i $p < 0,01$). Dodatkowo stwierdzono korelację pomiędzy liczbą martwych limfocytów a ekspresją receptora Fas na komórkach CD3+ ($R = 0,57$ i $p < 0,001$), CD4+ ($R = 0,39$ i $p < 0,05$) i CD8+ ($R = 0,42$ i $p < 0,05$). Dane dotyczące badanych parametrów zebrano w tabeli I. Uzyskane wyniki sugerują, że aktywowane limfocyty mogą być eliminowane przez mikrośrodowisko guza już na wczesnych etapach aktywacji w węzłach chłonnych. Zjawisko to jest szczególnie niekorzystne w przypadku limfocytów Tc, które stanowią populację mającą aktywnie eliminować komórki rakowe. Opisane wyniki potwierdzają jeden ze znanych mechanizmów umożliwiających „ucieczkę” nowotworu przed odpowiedzią immunologiczną.

W celu oceny wpływu badanych parametrów na całkowite przeżycie pacjentów za pomocą krzywych ROC wyliczono punkty odcięcia dla badanych parametrów przy założeniu hipotezy, że wykładniki apoptozy limfocytów są stymulantami zgonu pacjentów. Istotne różnice w przeżyciu grup pacjentów prezentujących wyniki powyżej i poniżej punktu odcięcia wykazano dla odsetków limfocytów CD3+CD95+ w guzie i limfocytów martwych w guzie. Punkty odcięcia wynosiły odpowiednio 14,96% i 17,50%. Mediana przeżycia pacjentów z wysokim odsetkiem limfocytów CD3+CD95+ w guzie wynosiła 13 miesięcy, podczas gdy dla pacjentów z niskimi odsetkami – 88 miesięcy, współczynnik ryzyka (ang. *hazard ratio* – HR) wyniósł 3,88 [95-procentowy przedział ufności (ang. *95 percentage confidence interval* – 95% CI) 1,10–13,62]. Podobne różnice wykazano dla pacjentów z wysokimi i niskimi odsetkami martwych limfocytów w guzie. Mediana przeżycia pacjentów z wysokim odsetkiem limfocytów martwych w guzie wynosiła 16,5 miesiąca, podczas gdy dla pacjentów z niskimi odsetkami mediana pozostawała nieokreślona, gdyż w czasie obserwacji nie odnotowano zgonów u min. 50% pacjentów, HR wyniósł 5,88 (95% CI = 1,02–33,98). Krzywe przeżycia przedstawiono na rycinie 1A–B.

Dyskusja

Zewnątrzpochodna droga apoptozy jest aktywowana stymulacją receptorów śmierci (ang. *death receptor* – DR) za pomocą ich ligandów: TNF, FasL, TRAIL [17]. Indukcja apoptozy przez ww. ligandy jest kluczowa dla eliminacji

Tab. I. Podsumowanie statystyk opisowych ocenianych parametrów. Wyniki przedstawiono jako medianę i wartość rozstępu kwartylnego

	Krew obwodowa	Węzły chłonne	Guz
odsetek limfocytów żywych	95,00% (15,80)	89,19% (12,51)	67,25% (32,25)
odsetek limfocytów apoptotycznych	3,36% (12,87)	8,27% (10,75)	20,19% (42,07)
odsetek limfocytów martwych	0,83% (0,90)	3,94% (3,59)	6,44% (13,42)
odsetek limfocytów CD3+CD95+	13,78% (12,58)	15,65% (14,73)	11,28% (10,88)
odsetek limfocytów CD19+CD95+	0,70% (0,93)	0,94% (1,32)	1,64% (1,94)
odsetek limfocytów CD4+CD95+	12,80% (10,67)	8,04% (12,36)	9,78% (9,10)
odsetek limfocytów CD8+CD95+	2,17% (3,60)	0,94% (1,81)	3,43% (3,66)

komórek nowotworowych przez układ immunologiczny. Dlatego też rola apoptozy i molekuł z nią związanych stanowi ważny obszar badań dotyczących nowotworzenia, czynników prognostycznych, jak i metod terapeutycznych. Niestety liczne badania pokazały, że w trakcie odpowiedzi przeciwnowotworowej dochodzi nie tylko do pożądanego zjawiska eliminacji komórek guza poprzez stymulację CD95 na ich powierzchni przez CD95L na powierzchni limfocytów cytotoksycznych, ale także obserwuje się zjawisko odwrotne [18]. Wiele nowotworów, w tym rak płuca, wykazuje ekspresję CD95L wykorzystywaną do eliminacji limfocytów naciekających guz. Dodatkowo komórki neoplastyczne produkują rozpuszczalną formę FasL, która może prowadzić do eliminacji limfocytów poza guzem [18]. Wykazano, że surowicze stężenie FasL koreluje negatywnie z czasem wolnym od wznowy i całkowitym czasem przeżycia pacjentów chorych na nowotwory [19]. Prace prowadzone przez zespoły kierowane przez Sung oraz Park wykazały, że w raku płuca czynnikiem prognostycznym może być nie tylko ekspresja FasL na komórkach rakowych, ale także rodzaj mutacji genu dla liganda Fas [20, 21]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wykazały wysoką ekspresję CD95 na limfocytach pacjentów z NDRP we wszystkich badanych tkankach, co czyni je potencjalnymi celami dla komórek nowotworowych z ekspresją CD95L, jak i jego rozpuszczalnej formy. Dodatkowo odnotowano znaczny odsetek martwych i apoptotycznych limfocytów w guzie i najbliższych węzłach chłonnych. Zwłaszcza to drugie zjawisko jest niepokojące, bowiem węzły chłonne są miejscem aktywacji limfocytów specyficznych wobec antygenów nowotworowych, co jest dopiero początkową fazą odpowiedzi immunologicznej. Uzyskane wyniki sugerują, że limfocyty T mogą być eliminowane już na początku swojej drogi do nowotworu, co czyni odpowiedź immunologiczną niewydajną i skutkuje niekontrolowanym wzrostem guza. Wpływ opisanych wyżej zjawisk na przebieg kliniczny choroby wydaje się potwierdzać analiza całkowitego czasu przeżycia pacjentów w zależności od liczby limfocytów T z ekspresją CD95, jak i liczby martwych

limfocytów. Pacjenci, którzy wykazywali wyższe odsetki ww. komórek w obrębie guza, przeżywali istotnie krócej. Indukcja apoptozy limfocytów naciekających guz może doprowadzać do „ucieczki” nowotworu spod nadzoru immunologicznego, a jej wykładniki laboratoryjne mogą być czynnikami prognostycznymi.

Wnioski

Uzyskane wyniki sugerują, że środowisko guza nowotworowego sprzyja eliminacji limfocytów T już w czasie ich aktywacji w węzłach chłonnych drenujących okolice guza. Wysoka ekspresja CD95 na komórkach CD3+ oraz wysoki odsetek martwych limfocytów w guzie wiążą się z krótszym całkowitym czasem przeżycia pacjentów i potencjalnie mogą być czynnikami negatywnymi prognostycznie.

Praca częściowo finansowana była z grantu MNSiW: N N403 199537 (nr umowy 1995/B/P01/2009/37).

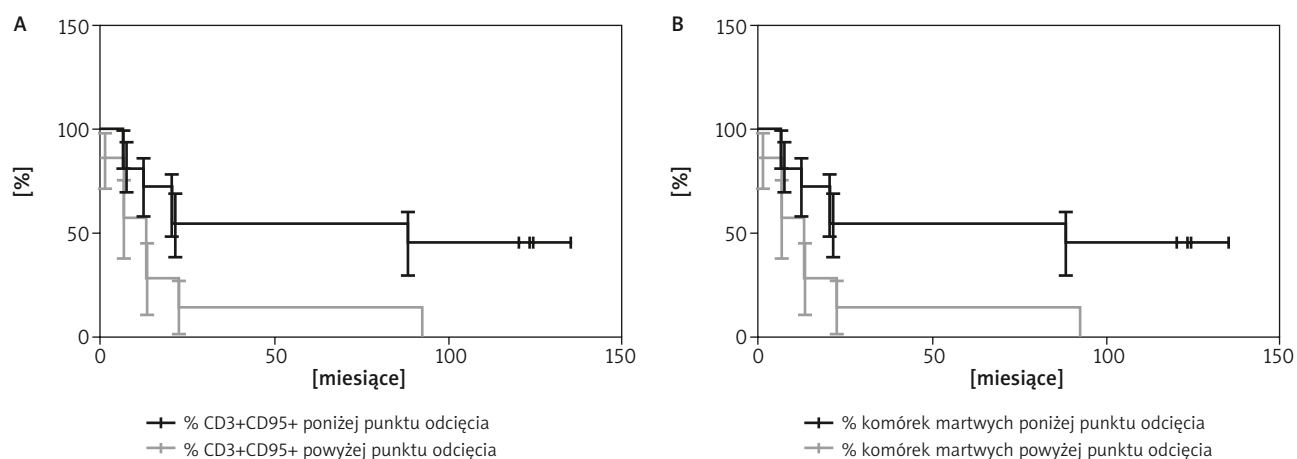
Praca była prezentowana na VI Kongresie Polskiego Towarzystwa Kardio-Torakochirurgów, w dniach 24–26 maja 2012 r. w Krakowie.

Podziękowania

Autorzy dziękują Pani Iwonie Baran-Grybie za wszelką pomoc udzieloną w trakcie powstawania niniejszej pracy.

Piśmiennictwo

1. Male D, Cooke A, Owen M. Advanced immunology. Mosby, 2002.
2. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2941-53.
3. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovskiy B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16: 3-11.
4. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6.
5. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92: 57-70.



Ryc. 1A–B. A. Porównanie przeżycia pacjentów z odsetkiem limfocytów CD3+CD95+ w guzie powyżej i poniżej wyliczonego punktu odcięcia. B. Porównanie przeżycia pacjentów z odsetkiem limfocytów martwych w guzie powyżej i poniżej wyliczonego punktu odcięcia

6. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2007; 14: 32-43.
7. Tiwari M. Apoptosis, Angiogenesis and Cancer Therapies. *J Cancer Ther Res* 2012; <http://www.hoajonline.com/journals/jctr/content/pdf/3.pdf>.
8. Mazzoccoli G, Grilli M, Carughi S, Puzzolante F, De Cata A, La Viola M, Giuliani A, Urbano N, Tarquini R, Perfetto F. Immune system alterations in lung cancer patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003; 16: 167-74.
9. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-48.
10. Whiteside TL. Immune responses to malignancies. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (2 Suppl 2): S272-S83.
11. Niklinski J, Hirsch FR. Molecular approaches to lung cancer evaluation. *Lung Cancer* 2002; 38 Suppl 3: S9-S17.
12. Górniewski G, Baran I, Tabarkiewicz J, Rybojad P, Gryba P, Wojas K, Furmanik F, Roliński J. Expression of Fas/Apo-1(CD95) on the lymphocytes in peripheral blood, metastatic lymph nodes and cancer tissue of patients with non-small cell lung cancer. *Ann Univ Marie Curie-Skłodowska Sectio D* 2002; 28: 197-203.
13. Rybojad P, Tabarkiewicz J, Koncewicz T, Górniewski G, Roliński J, Goździuk K. Ocena obecności antygenu CD25 na limfocytach pacjentów chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). *Kardiochir Torakochir Pol* 2006; 3: 285-289.
14. Finn OJ. Immunological weapons acquired early in life win battles with cancer late in life. *J Immunol* 2008; 181: 1589-1592.
15. Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 131-137.
16. Riccobon A, Gunelli R, Ridolfi R, De Paola F, Flamini E, Fiori M, Saltutti C, Petrini M, Fiammenghi L, Stefanelli M, Granato AM, Cuzzocrea DE, Amadori D. Immunosuppression in renal cancer: differential expression of signal transduction molecules in tumor-infiltrating, near-tumor tissue, and peripheral blood lymphocytes. *Cancer Invest* 2004; 22: 871-877.
17. Rufini A, Melino G. Cell death pathology: the war against cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414: 445-450.
18. Du C, Wang Y. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 12.
19. Hoogwater FJ, Snoeren N, Nijkamp MW, Gunning AC, VAN Houdt WJ, DE Bruijn MT, Voest EE, VAN Hillegersberg R, Kranenburg O, Rinkes IH. Circulating CD95-ligand as a potential prognostic marker for recurrence in patients with synchronous colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 2011; 31: 4507-4512.
20. Sung WW, Wang YC, Cheng YW, Lee MC, Yeh KT, Wang L, Wang J, Chen CY, Lee H. A polymorphic -844T/C in FasL promoter predicts survival and relapse in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 5991-5999.
21. Park JY, Lee WK, Jung DK, Choi JE, Park TI, Lee EB, Cho S, Park JY, Cha SI, Kim CH, Kam S, Jung TH, Jheon S. Polymorphisms in the FAS and FASL genes and survival of early stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1794-1800.