

Wybrane aspekty apoptozy i proliferacji komórkowej raka krtani

The selected aspects of apoptosis and cell proliferation of laryngeal cancer

MACIEJ GRZYCZYŃSKI, WIOLETTA PIETRUSZEWSKA

Katedra Otolaryngologii i Klinika Laryngologii Uniwersytetu Medycznego, ul. Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź

Mimo rozwoju metod diagnostycznych i leczniczych rak krtani nadal pozostaje istotnym problemem onkologicznym. Do czynników o uznanym znaczeniu rokowniczym u chorych na raka krtani należą m.in. klasyfikacja TNM i stopień zróżnicowania histologicznego nowotworu. Wskaźniki te często nie są wystarczające w diagnozowaniu, monitorowaniu przebiegu choroby, prognozowaniu czasu przeżycia chorych i zawodzą przy podejmowaniu decyzji o rozległości zabiegu chirurgicznego (zwłaszcza węzłów chłonnych szyi), jak również dodatkowego napromieniania lub chemioterapii. Badania ostatnich lat podnoszą prognostyczne znaczenie oceny biologii nowotworów i związanych z nią procesów proliferacji komórkowej i apoptozy. Aktywność proliferacyjna nowotworu związana jest z szybkością jego wzrostu, a określenie wielkości frakcji wzrostowej jest uznanym wskaźnikiem w prognozowaniu czasu przeżycia chorych na różne nowotwory. Apoptoza jest ciągiem zdarzeń morfologicznych, biochemicznych i molekularnych prowadzących do śmierci komórki, a kluczową rolę w jej regulacji odgrywiają białka P53 i Bcl2. W pracy omówiono podstawowe pojęcia dotyczące apoptozy i proliferacji komórkowej, opisano morfologiczne i biochemiczne cechy komórki apoptotycznej oraz geny i białka P53, Bcl2 i Ki67. W oparciu o własne doświadczenie wskazano na prognostyczną wartość oceny ekspresji powyższych genów i białek u chorych na raka krtani. Podkreślono również zależności między procesami apoptozy i proliferacji w raku krtani a możliwością wykorzystania oceny tych procesów w diagnozowaniu, leczeniu i monitorowaniu chorych na raka krtani oraz na inne złośliwe nowotwory lite. *Otolaryngologia, 2002, 1(3), 151-160*

Słowa kluczowe: rak krtani, apoptoza, proliferacja komórkowa, czynnik rokowniczy

Despite of constant progress of diagnostic and treatment methods laryngeal cancer is still essential oncological problem. TNM classification and histological grading are the recognised prognostic factors in patients with laryngeal cancer. They are often not satisfactory in diagnosing, monitoring and prognosis of survival in individual patient. They also mislead in making decision on the range of the operation (particularly type of lymphadenectomy) and additional treatment (radiotherapy and chemotherapy). The recent research studies are focused on the prognostic value of some biological features and processes in tumours cells and the relation to proliferation and apoptosis. As the tumour proliferation seems to be associated with tumour growth, the evaluation of the growth fraction is recognised as prognostic factor in patients with various cancers. The apoptosis is another chain of morphological, biochemical and molecular reactions leading to the cell death with current key role of p53 and Bcl2 proteins. The authors indicated prognostic value of these protein expression in patients with laryngeal cancer and also emphasized relations between discussed processes of apoptosis and proliferation and their application in diagnosing, treatment and follow-up of the patients with laryngeal cancer and other solid tumours. *Otolaryngologia, 2002, 1(3), 151-160*

Key words: laryngeal cancer, apoptosis, cell proliferation, prognostic factor

Mimo ciągłego udoskonalania metod diagnostycznych i leczniczych rak krtani nadal pozostaje istotnym problemem onkologicznym. Do czynników o uznanym znaczeniu rokowniczym u chorych na raka krtani należą m.in. klasyfikacja TNM zaakceptowana przez Komitet Międzynarodowej Unii do Walki z Rakiem [1] i oparte na niej stopnie zaawansowania choroby oraz stopień zróżnicowania histologicznego nowotworu [2]. Wskaźniki te często nie są wystarczające w diagnozowaniu, monitorowaniu przebiegu choroby i prognozowaniu czasu przeżycia chorych. Klasyczne czynniki rokownicze często również zawodzą w podejmowaniu decyzji o rozległości za-

biegu chirurgicznego, a zwłaszcza operacji węzłów chłonnych szyi i konieczności podjęcia dodatkowego napromieniania lub chemioterapii. Uzasadnione są więc poszukiwania niezależnych wskaźników prognostycznych, które ułatwiałyby wybór tego postępowania. W ostatnich latach w badaniach nad nowotworami wzrosło zainteresowanie apoptozą oraz zaburzeniami przebiegu cyklu komórkowego jako istotnymi czynnikami przyczyniającymi się do powstawania i rozwoju nowotworów. Uważa się, że pojawienie się i rozprzestrzenianie nowotworu to nie tylko nagromadzenie w komórkach zmian genetycznych powstałych w konsekwencji nadekspresji, względnie

mutacji, protoonkogenów lub utraty, bądź zmian, genów supresorowych transformacji nowotworowej. Równie istotnym czynnikiem w procesie nowotworowym jest obniżenie zdolności komórek do prawidłowego umiarnienia, tj. apoptozy, jako odpowiedzi na bodźce pochodzące ze środowiska otaczającego komórkę. Doprowadzić to może do nieprawidłowego zwiększenia żywotności i wydłużenia życia komórek oraz utrwalania już zaistniałych mutacji, a także do wystąpienia zaburzeń cyklu komórkowego. Z drugiej strony wady w kontroli cyklu komórkowego są jedną z najważniejszych przyczyn procesu nowotworzenia. Przywracanie sprawnego nadzoru nad cyklem komórkowym może przyczynić się do pozytywnych rezultatów w leczeniu nowotworów.

Apoptoza – zaprogramowana śmierć komórki

Wyróżnia się dwa główne mechanizmy śmierci komórek, tj. martwicę i apoptozę, które istotnie różnią się biochemicznie i morfologicznie. Martwica jest procesem biernym i przypadkowym, wywoływanym przez zmiany w otoczeniu komórki, takie jak niedokrwienie, gwałtowne zmiany temperatury lub uraz mechaniczny, które powodują nieodwracalne uszkodzenia uporządkowanej struktury komórkowej. W samych komórkach występują wczesne zaburzenia w funkcji mitochondriów i błon komórkowych, co prowadzi do zmian regulacji ciśnienia osmotycznego, zwiększenia objętości komórek, a w końcowym etapie – ich rozpadu i śmierci. W wyniku martwicy zawartość umierających komórek (np.: enzymy proteolityczne) zostaje uwolniona do przestrzeni pozakomórkowej, co wywołuje lub zwiększa miejscowy stan zapalny przyczyniając się do uszkodzenia sąsiednich komórek i tkanek [3,4].

Określenie apoptoza zostało wprowadzone w 1972 r. [5] i pochodzi z języka greckiego, a oznacza opadanie płatków z kielicha kwiatów lub liści z drzew. Synonimy apoptozy to „samobójcza”, aktywna, fizjologiczna lub nieprzypadkowa śmierć komórki, martwica „obkurzeniowa”, a także programowana śmierć komórki (ang. *programmed cell death*). Jest ona procesem czynnym, warunkowanym genetycznie, przeciwstawnym mitozie i różnym od martwicy. Stanowi ciąg zdarzeń morfologicznych, biochemicznych i molekularnych, które w konsekwencji prowadzą do śmierci komórki. Zapoczątkowanie apoptozy wymaga aktywacji wielu genów m.in. p-53, mdm2, bcl-xS, bax i hamowania ekspresji innych np. bcl-2, bcl-xL [3,4,6-8]. Ma ona podstawowe znaczenie w embriogenezie (np. obumieranie przewodu Müllera u embrionów płci męskiej), w przebiegu inwolucji narządów (obumieranie tymocytów w okresie rozwoju osobniczego), w procesach odnowy i regeneracji tkanek oraz w zakończeniu życia komórek zróżnicowanych (apoptoza leukocytów, komórek nabłonka skóry lub jelit, komórek endometrium w okresie poprzedzającym menstruację, eli-

minacja niedojrzałych limfocytów T i B). Tego rodzaju proces warunkuje prawidłowy rozwój i funkcjonowanie organizmu, a taką apoptozę nazywa się zaprogramowaną rozwojowo.

Kolejny rodzaj to zaprogramowana śmierć komórki w odpowiedzi na bezpośrednie działanie czynników biochemicznych lub fizycznych (promieniowanie jonizujące) i stanowi obecnie przedmiot badań naukowych [9,10,11,12].

Zbliżony do powyższego rodzaj apoptozy towarzyszy obumieraniu komórek w rozwoju nowotworów lub w okresie regresji hiperplastycznych organów lub tkanek. Wówczas jest ona wywołana samym procesem patologicznym, a nie odpowiedzią na czynnik powodujący dany stan. Mówiąc inaczej nowotwór, a nie karcynogen stymuluje rozwój tego procesu. Rola apoptozy w powstawaniu nowotworów nie jest do końca określona. Występowanie tego zjawiska w obrębie guza może powodować utratę nieśmiertelności komórek raka, a tym samym unie możliwiać rozwój nowotworu. Apoptoza może zarówno hamować rozwój komórek nowotworowych, jak również stymulować ich klonowy rozwój poprzez eliminację sąsiadujących komórek.

Cechy morfologiczne i biochemiczne komórki apoptotycznej

Morfologia komórki ginącej z powodu apoptozy znacznie się różni od obrazu komórki nekrotycznej. Proces programowanej śmierci rozpoczyna się w jądrze komórkowym, w którym dochodzi do kondensacji i agregacji chromatyny, a tym samym do zmniejszenia objętości jądra. Sprawia ono wrażenie zapadniętego i skurczonego, przy zachowanej integralności błon i czynności organelli. W następnym etapie, z powodu utraty wody, dochodzi do zmniejszenia objętości całej komórki, nawet do ok. 30-50%. W końcowej fazie apoptozy ulega ona fragmentacji i powstają otoczone błoną komórkową kwasochłonne cząsteczki zwane ciałkami apoptotycznymi (ang. *apoptotic body*) zbudowane z części zagęszczonej chromatyny, organelli i cytozolu. [4,13]. Komórki i ciałka apoptotyczne są usuwane z tkanek w procesie fagocytozy, w którym istotną rolę odgrywa obecność receptora witronektynowego na błonie komórkowej makrofagów [3,14]. Apoptotyczna śmierć komórek oraz ich fagocytoza nie powodują uwolnienia enzymów proteolitycznych, nie towarzyszy więc jej reakcja zapalna, a śmierć poszczególnych komórek nie wywołuje rozległej destrukcji tkanek.

Programowana śmierć komórki jako proces aktywny wymaga dostarczenia energii i charakteryzuje się wzmożoną syntezą RNA i białek, jak również pobudzeniem czynności enzymów komórkowych. W wyniku pobudzenia endonukleaz (NUC 18, DNAzy I, DNAzy II) katalizujących rozerwanie wiązań wewnątrz nukleosomalnych, dochodzi do fragmentacji DNA na odcinki będące

wielokrotnością nukleosomów (180-200 par zasad), stanowiącej prawdopodobnie pierwszy, nieodwracalny etap apoptozy. W procesie apoptozy stwierdzono także wzrost aktywności topoizomeraz (topo I i topo II – generują jedno- lub dwuniciowe pęknięcia w helisie DNA), enzymów proteolitycznych (umożliwiają przemianę nieczynnych form prekursorowych endonukleaz w aktywne), transglutaminaz tkankowych (powodują powstawanie wiązań między białkami cytoplazmatycznymi, co prowadzi do kurczenia się komórek i zmiany ich kształtu) oraz enzymów: gamma-glutamyl-transpeptydazy, rybonukleazy i aktywatora plazminogenu. Cechą charakterystyczną w większości komórek indukowanych do apoptozy jest także wzrost stężenia jonów wapniowych w cytozolu komórkowym, będących aktywatorami zarówno endonukleaz jak i transglutaminaz tkankowych niezbędnych podczas tworzenia ciałek apoptotycznych [3,8,14-16].

Do wykrywania apoptozy stosuje się m.in.: obserwację mikroskopową zmian morfologii komórek, znakowanie komórek barwnikami (w tym fluorochromami), test przepuszczalności błony komórkowej, rejestrację zmian w budowie błony komórkowej (translokacja fosfatydylseryny), pomiar aktywności kaspazy 3, wykrywanie *in situ* fragmentacji DNA (ISEL – ang. *in situ end labeling*), cytofotometrię przepływową; technikę ISNT (ang. *in situ nick translation*, wykorzystująca DNA polimerazę I) lub technikę TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick endlabelling*, wykorzystująca terminalną transferazę) [13,15,17,18]. Najlepszą metodą jest jakościowa ocena ultrastruktury komórki [13]. Pośrednią oceną apoptozy jest analiza ekspresji genów i ich produktów biorących udział w jej regulacji.

Proces apoptozy może być m.in. wywołany przez: hormony tarczycy i glikokortykosteroidy, cytokiny (TNF – czynnik martwicy nowotworu), deficyt czynników wzrostowych i troficznych, czynniki cytotoksyczne (granzymy A i B, etopozyd, mitoksantron, difluorometyloornityna, antracykliny) i czynniki fizyczne (promieniowanie jonizujące, hipertermia, ciśnienie hydrodynamiczne).

Mechanizmy apoptozy i jej znaczenie w regulacji szeregu fizjologicznych i patologicznych procesów komórkowych znajdują się w obszarze zainteresowania współczesnej nauki. Badania te mają bardzo istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia biologii komórki oraz rozwoju i przebiegu wielu stanów chorobowych [19,20]. Genowa regulacja stanu dynamicznej równowagi między podatnością i opornością na apoptozę ma zasadnicze znaczenie dla wyjaśnienia dynamiki wzrostu zarówno komórek prawidłowych jak i nowotworowych. Apoptoza zapewnia usuwanie z organizmu komórek z defektami genetycznymi, zatem następstwem jej zahamowania może być proliferacja klonu komórek nieprawidłowych. Przyczyną wzrostu nowotworu może być nie tylko zwiększona proliferacja komórek, ale również wydłużenie czasu ich przeżycia na skutek upośledzenia procesów apoptozy. Za istot-

nym znaczeniem tego zjawiska przemawia obserwacja, że wiele genów regulujących apoptozę wykazuje zaburzenia ekspresji w procesach nowotworowych, a kluczową rolę w regulacji apoptozy odgrywają produkty białkowe genu P53 i Bcl2 [8,19-22,24,25].

Gen i białko P53

Gen P53 należy do genów supresorowych transformacji nowotworowej (antyonkogenów), czyli tych, których białkowe produkty hamują powstawanie fenotypu nowotworowego [26]. Jest on zlokalizowany w chromosomie 17p13.1 i składa się z 11 eksonów [22,27]. W genomie występuje w pojedynczej kopii. Produktem genu jest białko o masie 53 kD (stąd nazwa genu i białka), które składa się z 393 aminokwasów. Prawidłowe białko P53 jest kluczowym negatywnym regulatorem cyklu komórkowego, a jego rola sprowadza się przede wszystkim do kontroli integralności genomu, stąd często stosowane jest dla niego określenie „strażnik genomu”. Udział białka P53 w transkrypcji genów, w regulacji cyklu komórkowego, kontroli naprawy DNA, inicjacji apoptozy i najprawdopodobniej angiogenezy powoduje, że jest ono niezbędne dla zachowania prawidłowych czynności komórki [14,24,27-30]. Aktywność biologiczna białka P53 zależy od stopnia jego fosforylacji, a jego aktywną formą jest ufosforylowany homotetramer, tzw. „dzikie białko” (białko niezmutowane). Rozpoznaje ono ściśle określone sekwencje DNA, działając jak czynnik transkrypcyjny dla niektórych genów jak: WAF1, gadd45 (ang. *growth arrest DNA damage inducible*), RB1 (gen siatkowczaka złośliwego), cykliny G oraz TSP-1 (trombospondyna 1) [25,31]. Obecność uszkodzeń DNA (indukowanych m.in. przez czynniki fizyczne, chemiczne lub genotoksyczne czynniki środowiskowe) powoduje akumulację prawidłowego białka P53 w jądrze komórkowym i zablokowanie cyklu komórkowego w fazie G1, wydłużając tym samym czas na ich reperację przed wejściem w fazę S [24, 28]. Zatrzymanie cyklu w tej fazie odbywa się na drodze aktywacji transkrypcji genu WAF1/CIP1, który koduje białko o ciężarze cząsteczkowym 21 kD (tzw. białko P21). Ma ono zdolność hamowania aktywności grupy kinaz fosforylujących cykliny (cdk, ang. *cyclin dependent kinase*), niezbędnych do przejścia komórki w fazę replikacji DNA (faza S). Ponadto białko P21, łącząc się z podjednostką polimerazy DNA o nazwie PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) hamuje jej działanie, wpływając bezpośrednio na replikację [32]. Białko P53 pobudza mechanizm reperacji uszkodzonego DNA. Z jednej strony przypuszcza się, że działa ono jako czynnik transkrypcyjny z DNA, aktywując nie tylko gen kodujący białko P21, ale także gen gadd45, którego produktem jest białko blokujące wejście komórek w fazę S i jednocześnie stymulujące szybkość naprawy DNA (wycinanie uszkodzonych fragmentów DNA) [32]. Z dru-

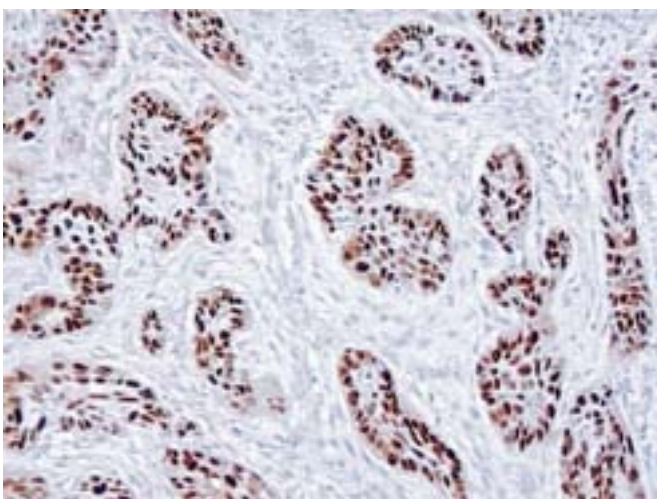
giej strony białko P53 oddziałuje jako represor transkrypcji genów niezbędnych do przebiegu cyklu komórkowego. To dwukierunkowe działanie powoduje odwracalne zablokowanie tego cyklu, co ułatwia naprawę DNA, wydłużając czas, jaki komórki mają na usunięcie uszkodzeń, zanim nastąpi powielenie i podział materiału genetycznego. Udział białka P53 w kontroli naprawy DNA polega na modulowaniu aktywności helikaz (enzymy usuwające uszkodzenia DNA), a w przypadku, gdy replacja DNA zawodzi, białko P53 uruchamia proces programowanej śmierci komórki (dlatego gen P53 określane jest często jako gen „ku śmierci”) [8,22-25]. Białko P53 uczestnicząc w mechanizmach reparacji DNA oraz indukcji apoptozy, może istotnie wpływać na wrażliwość komórek na chemioterapeutyki i promieniowanie jonizujące [33,34].

Mechanizmy indukcji apoptozy przez białko P53 nadal nie są do końca wyjaśnione. Uważa się, że w odpowiedzi na sygnał apoptotyczny białko P53 aktywuje transkrypcję wielu genów kodujących, m.in. białka Bax, PIG3, Fas (Apo1), DR5 (Apo2) i IGF-BP3. Białko P53 indukuje apoptozę również poprzez hamowanie ekspresji genu bcl2 (inhibitor apoptozy) lub w sposób niezależny od transkrypcji genów [8,21,24,34].

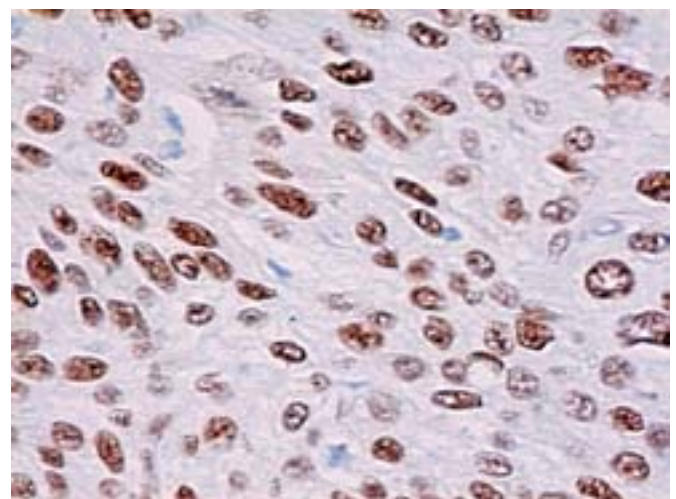
Prawidłowe białko P53 ma okres półtrwania 10-20 minut, natomiast białko zmutowane przebywa w komórce do 12 godzin i dzięki temu może być wykrywane metodami IHC. Mutacje w genie p53 są najczęstszym defektem genetycznym stwierdzanym w nowotworach wszystkich typów u ludzi, a do tej pory opisano ich ponad tysiąc [11,35]. Głównie są to mutacje punktowe zmian sensu (powodujące redukcję funkcjonalnych tetramerów białka), insercje i mutacje nonsensowe lub delekcja niezmutowanego allelu p53, a różnice w aktywności biologicznej zmienionych form białka zależą od rodzaju i miejsca mutacji [35,36]. Zmutowane białko nie traci zdolności

do tworzenia tetramery z prawidłowym białkiem P53, ale nie ma już możliwości specyficznego wiązania się z DNA, przez co nie pełni roli regulatora transkrypcji. Stwierdzono, że nowotwory różnią się spektrum mutacyjnym genu p53, co może wynikać z ekspozycji na odmienne karcynogeny [35].

Do zmiany aktywności funkcjonalnej „dzikiego białka” P53 może także dochodzić na skutek jego wiązania się z produktami wirusów onkogennych (powstały heterodimer również nie jest aktywny jako regulator transkrypcji), a także w wyniku wzmocnionej ekspresji genu mdm2, którego produkt jest inhibitorem białka P53. Konsekwencją braku prawidłowo funkcjonującego białka P53 jest zniesienie jego wpływu na proces apoptozy, utrata kontroli nad podziałami komórki i naprawą uszkodzeń DNA, prowadząca do gromadzenia się mutacji oraz aberracji chromosomowych i w następstwie – szybka selekcja komórek o fenotypie nowotworowym, czyli transformacja nowotworowa [8,28,37]. Mimo, że rola białka P53 w procesie apoptozy nie jest do końca poznana, obecność prawidłowej jego formy jest niezbędna dla przebiegu programowanej śmierci komórki wywołanej czynnikami uszkadzającymi DNA. Stwierdzono również wpływ genu P53 i jego białka na proces angiogenezy nowotworowej. Pojawienie się fenotypu angiogennego w komórkach nowotworowych ma być związane z wystąpieniem mutacji w genie P53. Znoszą one wielokierunkową aktywność supresyjną genu P53 i prowadzą m.in. do uaktywnienia genu VEGF, który uważany jest za jeden z najsilniejszych mitogenów komórek śródbłonna [38-40]. Czynniki te z kolei aktywuje również szereg innych genów biorących udział w neowaskularyzacji, co sprzyja utrwalaniu się fenotypu angiogennego w komórkach nowotworowych i ciągłej, niepohamowanej stymulacji angiogenezy w guzie. W badaniach doświadczalnych stwierdzono, że wprowadzenie do komórek nowotworowych



Ryc. 1. Ekspresja białka P53 widoczna w większości komórek raka krtani (odczyn immunoperoxydazowy; pow. 100x)



Ryc. 2. Ekspresja białka P53 widoczna w większości komórek raka krtani pod postacią drobnych ziaren w jądrach (odczyn immunoperoxydazowy, powiększenie 400x)

prawidłowego genu P53 znosi aktywność genu VEGF, ponieważ prawidłowe białko P53 jest represorem transkrypcji tego genu [41]. Proces angiogenezy jest w organizmie stale hamowany przez trombospodynę-1, wielofunkcyjną glikoproteinę występującą w macierzy pozakomórkowej i hamującą proliferację i migrację komórek śródbłonna naczyń. Wydaje się, że jej synteza jest regulowana przez białko P53. W przypadku, gdy stężenie białka P53 zmniejsza się, ilość trombospodyny również maleje, co stymuluje podziały komórek śródbłonna naczyń krwionośnych sąsiadujących z nowotworem i pobudza ekspresję genów, których produkty (np.: hormony, czynniki wzrostu i interferony) ułatwiają komórkom guza szybki wzrost i tworzenie nacieków inwazyjnych [40].

W badaniach własnych (praca w druku) ekspresję białka P53 stwierdzono u 117 chorych na raka krtani (77,48%) (ryc. 1, ryc. 2).

Zaobserwowano znamienne zależności między zwiększoną ekspresją tego białka a wielkością guza pierwotnego ($p=0,01$) i występowaniem wznowy miejscowej ($p=0,003$), a zależność z obecnymi przerzutami w węzłach chłonnych była bliska istotności ($p=0,05$). Zarówno całkowity, jak i wolny od choroby, czas przeżycia był znamienne krótszy u chorych z wysoką ekspresją białka P53.

Gen i białko Bcl2

Gen Bcl2 należy do protoonkogenów, których uszkodzenie objawia się niekontrolowanym wzrostem ich aktywności lub ekspresji, co prowadzi do powstania nowotworu. Został on wykryty w wyniku translokacji chromosomowej t [14,18] stwierdzonej w chłoniaku limfocytów B (ang. *B Cell Lymphoma*) [42]. Gen Bcl2 należy do rodziny Bcl2, do której zalicza się geny pobudzające apoptozę (jak Bax, Bad, Bcl-Xs, Bak) i hamujące ją (m.in. Bcl-2, Bcl-X, Bcl-w, Bcl-1, Mcl-1). Wszystkie one mają dwie konserwatywne ewolucyjnie domeny: BH1 i BH2 uczestniczące w oddziaływaniach między poszczególnymi członkami rodziny. Ich białkowe produkty łączą się w homo- lub heterodimery (np. Bcl2-Bcl2, Bax-Bcl2, Bax-Bax). Stwierdzono, że przewaga homodimerów Bcl2 decyduje o przeżyciu, podczas gdy przewaga Bax – o śmierci komórki [4,20]. Prawidłowy gen Bcl2 umiejscowiony jest na chromosomie 18q21, jednak w wyniku translokacji zostaje przeniesiony, co prowadzi do zwiększonej ekspresji i nadprodukcji jego białkowego produktu. Białko Bcl2 o masie 26 kD, zbudowane jest z 239 aminokwasów [43]. Jest ono zakotwiczone w błonach mitochondrium, jądra i siateczki śródplazmatycznej. W warunkach prawidłowych białko to występuje m.in. w niezróżnicowanych tkankach zarodkowych na określonych etapach rozwoju i w komórkach stref proliferujących (np. komórki macierzyste układu krwiotwórczego, warstwy podstawnej naskórka, przewody wyprowadzające gruczołów wydzielania wewnętrznego, komórki

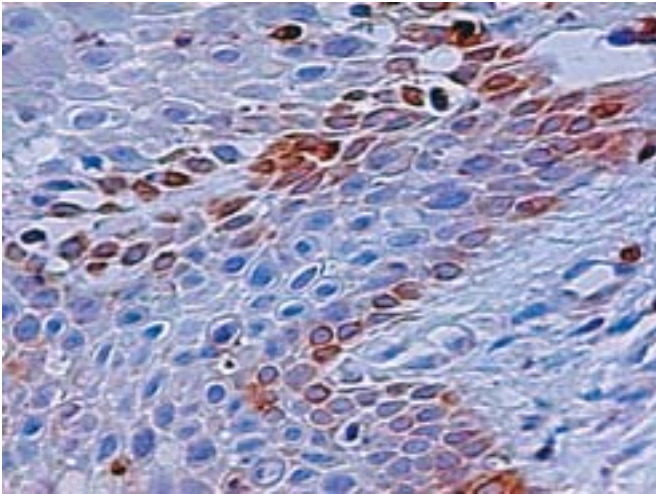
nabłonkowe wrażliwe na bodźce hormonalne) [20,44,45]. Fizjologiczna rola tego białka polega na hamowaniu apoptozy, co w komórkach niezróżnicowanych umożliwia prawidłowy przebieg morfogenezy oraz procesów różnicowania, natomiast w komórkach już zróżnicowanych pozwala na ich odpowiednio długie przeżycie [20]. Białko Bcl2 uczestniczy w hamowaniu apoptozy towarzyszącej zarówno procesom fizjologicznym jak i nowotworowym [19,20]. Zwiększoną ekspresję tego białka wykrywa się zarówno w niektórych procesach rozrostowych układu chłonnego, jak i w innych nowotworach [10,12]. Mechanizmy działania białka Bcl2 nie są do końca wyjaśnione. Udowodniono, że może ono podejmować działanie w dowolnej fazie cyklu komórkowego i nie posiada wpływu na proliferację [20]. Sugeruje się możliwość ingerencji tego białka w rozmieszczenie i zmianę stężenia jonów wapnia, wpływ na aktywność i dystrybucję endonukleaz lub kinaz fosforylujących cykliny [20,43], a efekt antyapoptotyczny osiąga ono najprawdopodobniej poprzez hamowanie produkcji wolnych rodników i/lub wpływ na redystrybucję jonów wapniowych w komórce lub na zachowanie integralności błony mitochondrialnej i zapobieganie uwalnianiu cytochromu c. Stwierdzono, że białko P53 reguluje ekspresję genów Bcl2 i Bax, a apoptoza indukowana przez prawidłowe białko P53 jest przynajmniej częściowo związana z hamowaniem ekspresji genu Bcl2 i pobudzaniem ekspresji genu Bax [20]. Wydaje się, że zmutowana forma białka P53 może zachować hamujący wpływ na ekspresję Bcl2, ale jednocześnie sama może działać jako supresor programowanej śmierci komórki [20,45]. Białko Bcl2 może jednak oddziaływać na apoptozę także na drodze niezależnej od P53.

Uważa się, że spośród wszystkich znanych białek, Bcl2 jest najsilniejszym inhibitorem apoptozy wywołanej przez różne czynniki (glikokortykosteroidy, chemioterapeutyki, hipertermia, deficyt czynników wzrostowych lub promieniowanie jonizujące) [4,10,12].

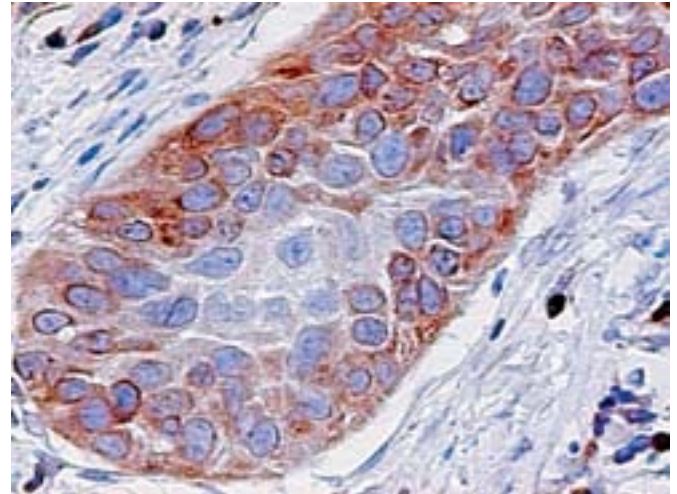
W procesach nowotworowych nadekspresja białka Bcl2 może powodować oporność nowotworów na chemio- i radioterapię przez hamowanie procesu apoptozy w komórkach guza [10,12].

W badaniach własnych (praca w druku) ekspresję białka Bcl2 stwierdzono u 68 chorych (45,0%) na raka krtani (ryc. 3, ryc. 4).

Nie zaobserwowano istotnych zależności między ekspresją tego białka a cechami klinicznymi i histologicznymi nowotworu oraz czasem przeżycia chorych ($p>0,05$), poza wysoce znamiennej zależnością między dodatnią ekspresją białka Bcl2 a obecnością wznów miejscowych ($p<0,001$). Należy zastanowić się nad przydatnością badania ekspresji białka Bcl2 w raku krtani. Wykazano bowiem, że białko Bcl2 ma hamujący wpływ na proces apoptozy będącej wynikiem chemioterapii lub napromieniania [46,47]. Ocena ekspresji tego białka może pomóc w selekcji tych nowotworów, które są potencjalnie oporne



Ryc. 3. Ekspresja białka Bcl2 obecna w nielicznych komórkach raka krtani pod postacią odczynu cytoplazmatycznego z nasileniem w okolicy okołojądrowej (odczyn immunoperoxydazowy, pow. 200x)



Ryc. 4. Obraz mikroskopowy raka krtani z ekspresją białka Bcl2 w większości komórek nowotworowych widoczną pod postacią rozlanej reakcji cytoplazmatycznej (odczyn immunoperoxydazowy, pow. 400x)

na leczenie chemiczne lub radioterapię. Sprawdzenie, czy można to odnieść również do raka krtani, wymaga jednak dalszych badań.

Aktywność proliferacyjna komórek raka

Komórki nowotworowe, podobnie jak i prawidłowe, znajdują się w jednej z pięciu faz cyklu komórkowego (czyli okresu między mitozami): G1, S, G2, M (faza wzrostowa) lub w G0 (faza spoczynkowa). Cykl komórkowy pozostaje pod kontrolą kilkudziesięciu genów: *cdc* (ang. *cell division cycle*) kodujących cyklinozależne kinazy białkowe – *cdk* (ang. *cyclin dependent kinase*) oraz genów kodujących cykliny i białka histonowe. Połączenie cząsteczki *cdk* i cyklina pozwala komórce wejść w fazę S, natomiast połączenie *cdk* z cyklinami mitotycznymi umożliwia powstanie czynnika promującego fazę M, niezbędnego dla osiągnięcia mitozy. Przechodzenie do kolejnych faz cyklu komórkowego zależy również od zewnątrzkomórkowych czynników wzrostu, które oddziałują jednak tylko do punktu kontrolnego fazy G1 (ang. *check point*). Po jego przekroczeniu komórka realizuje następne etapy cyklu, wyłącznie w oparciu o informację zawartą w jej genomie i nie reaguje już na czynniki zewnętrzne.

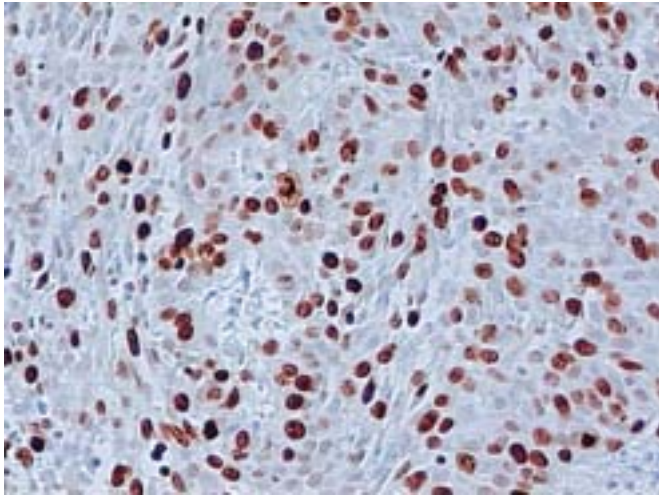
Aktywność proliferacyjna nowotworów jest przedmiotem wielu badań ze względu na jej związek z szybkością wzrostu guza. Określenie wielkości frakcji wzrostowej guza jest uznanym wskaźnikiem w prognozowaniu czasu przeżycia dla chłoniaków, raków sutka, płuca oraz czerniaka [48-50]. Jednak znaczenie markerów proliferacyjnych w przewidywaniu przebiegu choroby nowotworowej jest niejednoznaczne. Nylander i wsp. [51] negują znaczenie indeksu Ki67 dla przewidywania przebiegu raków płaskonabłonkowych głowy i szyi, a Spafford i wsp. [52] – w raku krtani. Jednak według Welkoborskyego

i wsp. [53] w raku krtani indeks antygenu Ki67 (tj. stosunek liczby komórek z reakcją barwną z przeciwciałem anti-Ki67, czyli będących w cyklu podziałowym, do liczby wszystkich komórek nowotworu) ma znaczenie prognostyczne dla przeżycia wolnego od nowotworu, a ekspresja kolejnego badanego wskaźnika proliferacji – antygenu PCNA – dla czasu całkowitego przeżycia. Ponadto autorzy ci podkreślają, na podstawie wieloczynnikowej analizy regresji Cox'a, że antygeny te okazały się czynnikami rokowniczymi bardziej znaczącymi niż rozpatrywane parametry kliniczne i histologiczne u chorych na raka krtani.

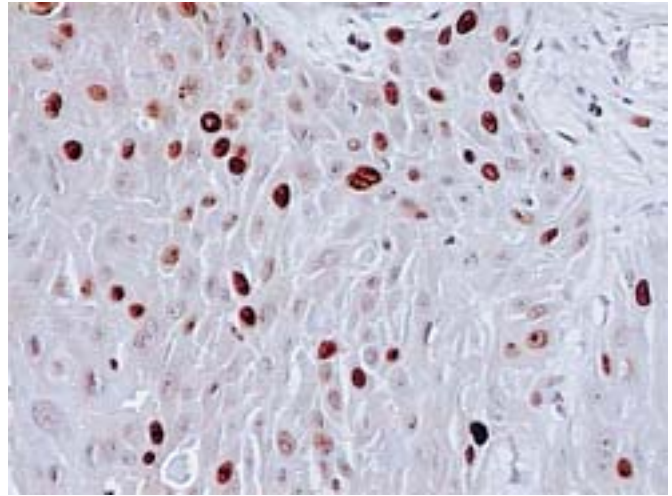
Aktywność proliferacyjną nowotworu określa się za pomocą m.in.: cytometrii przepływowej, indeksu mitotycznego, metod autoradiograficznych (znakowaną tymidyną lub bromodeoksyurydyną i oznaczanie ich technikami IHC), oceny regionu organizatorów jąderkowych (AgNOR), metod immunohistochemicznych (IHC) wykrywających antygeny charakterystyczne dla cyklu komórkowego (Ki67, PCNA) [54,55]. Ocena proliferacji przy zastosowaniu metod IHC opiera się na założeniu, że podczas cyklu komórkowego w komórce dochodzi do ilościowych zmian antygenów związanych z proliferacją, które są rozpoznawane przez zastosowane specyficzne przeciwciała monoklonalne.

Antygen proliferacji komórkowej Ki67

Antygen Ki-67 – niehistonowe białko jądrowe o masie 35-40 kD, poza fazą G0 występuje we wszystkich fazach cyklu komórkowego. Stanowi on część kompleksu białkowo-rybonukleinowego stabilizującego komórkę podczas kondensacji chromosomów. Gen kodujący powstanie tego antygenu znajduje się na długim ramieniu chromosomu 10 (10q25) [56]. Wykrycie białka Ki67



Ryc. 5. Ekspresja antygenu Ki67 uwidoczniiona pod postacią ziaren w jądrach większości komórek raka krtani (odczyn immunoperoxydazowy, pow. 100x)



Ryc. 6. Obraz mikroskopowy raka krtani z ekspresją antygenu Ki67 w jądrach nielicznych komórek nowotworowych (odczyn immunoperoxydazowy, pow. 200x)

w jądrze oznacza, że komórka znajduje się w trakcie cyklu podziałowego, tak więc Ki67 obecny jest jedynie w komórkach proliferujących, a nie w spoczynkowych [57]. Umieszczenie Ki67 zmienia się podczas cyklu: w interfazie znajduje się w jąderku; w profazie i metafazie pojawia się wokół chromosomów, osiągając największą gęstość w anafazie; po czym w telofazie występuje rozsiany w nukleoplazmie. Indeks Ki67 określa wielkość frakcji wzrostu guza i jest uznanym czynnikiem prognostycznym czasu przeżycia chorych na chłoniaki, raka sutka i czerniaka [48]. W badaniach własnych (praca w druku) ekspresję antygenu Ki67 w komórkach raka krtani stwierdzono w 143 (94,7%) przypadkach (ryc. 5, ryc. 6).

Stwierdzono, że jedynie obecność wznowy miejscowej procesu nowotworowego była znamienne związane z dodatnią ekspresją antygenu Ki67 ($p=0,042$). Zarówno całkowity, jak i wolny od choroby czas przeżycia był znamienne krótszy u chorych z wysoką ekspresją białka Ki67.

Zależności między procesami apoptozy i proliferacji

Niepohamowany wzrost związany z dużą niestabilnością genetyczną, utrata zdolności do różnicowania i nabycie zdolności do naciekania (inwazji) oraz zajmowania obszarów zasiedlonych w warunkach prawidłowych przez inne komórki (przerzut) to cechy komórek, które nabyły fenotyp nowotworowy. Na etapie pre-inicjacji komórka narażona jest na działanie pre-karcynogenów i karcynogenów. Proces inicjacji wiąże się z pojawieniem się pierwszej mutacji. Gromadzeniu tych mutacji sprzyja stała ekspozycja na działanie karcynogenów i obecność zaburzeń w systemach naprawy DNA w komórce, a jedną z najważniejszych ról odgrywa tutaj gen P53 oraz inne – stymulujące naprawę DNA. Sprawność tego systemu decyduje bowiem o eliminacji zmian w materiale gene-

tycznym, powstałych zarówno na skutek błędnego działania enzymów syntetyzujących DNA, jak i w wyniku uszkodzeń wywołanych przez czynniki mutagenne. Zaburzenia naprawy powstałych uszkodzeń w przyspieszonym tempie prowadzą do gromadzenia się w genomie mutacji, jednak taka komórka może być jeszcze usunięta na drodze apoptozy lub przez układ immunologiczny [4]. W przypadku kiedy również te mechanizmy zawodzą, komórka ulega przekształceniu w nowotworową i zaczyna się dzielić, tworząc rozrost nowotworowy. Do przejścia w etap progresji transformacji nowotworowej guz potrzebuje naczyń krwionośnych, dzięki którym docierają do niego substancje odżywcze i podziały komórek zaczynają dominować nad procesami ich eliminacji, a struktura całego guza ulega rozluźnieniu. Dodatkowo, do podziałów komórkowych pobudzają czynniki wzrostu wydzielane przez powstające naczynia. W miarę postępu choroby nowotworowej genom komórki ulega dalszej destabilizacji, a coraz większa liczba genów ulega mutacjom i dochodzi również do zmian na poziomie chromosomalnym (translokacje między chromosomami) oraz zmian samej liczby chromosomów (aneuploidia). W klonach komórek nowotworowych, które uzyskały przewagę, dochodzi do pobudzenia głównie genów związanych z szybkim wzrostem i inwazyjnością, a komórki nowotworowe charakteryzują się m.in. zaburzeniami w kontroli proliferacji i apoptozy oraz adhezji do siebie i do macierzy pozakomórkowej.

Zarówno programowana śmierć komórki, jak i cykl podziałowy na pewnym etapie mają te same, wspólne mechanizmy regulacji, w których uczestniczą geny wczesnej odpowiedzi komórkowej (c-myc, c-fos, c-jun), geny cyklin i kinaz cyklinozależnych oraz geny supresorowe transformacji nowotworowej (P53 i Rb). Rola genów i ich białkowych produktów biorących udział w programowa-

nej śmierci komórki nie ogranicza się jedynie do jej kontroli, ale wiele dowodów wskazuje, że c-myc i P53 mogą stymulować zarówno apoptozę, jak i proliferację komórek. Procesy te są modyfikowane w zależności od działania innych czynników, m.in. czynników wzrostu. Ponadto, jeżeli gen P53 nie może spełniać swych fizjologicznych funkcji i uszkodzone DNA nie zostanie naprawione, wówczas rozpoczyna się seria replikacji uszkodzonego DNA, co w konsekwencji doprowadzi do powstania mutacji. Jednocześnie nie następuje zmniejszenie ekspresji genu Bcl2 (z powodu braku hamującego działania P53) i komórka z uszkodzonym DNA nie zostanie wyeliminowana na drodze programowanej śmierci, gdyż proces ten będzie hamować gen Bcl2. Efektem tych mechanizmów będzie gromadzenie się komórek z różnymi mutacjami i aberracjami chromosomowymi i w następstwie szybka selekcja komórek o fenotypie nowotworowym [4,27]. Regulacja programowanej śmierci komórkowej jest więc ściśle związana z proliferacją, różnicowaniem i transformacją nowotworową komórek, dlatego badania mechanizmów apoptozy powinny być prowadzone równoległe z oceną aktywności proliferacyjnej komórki.

Uważa się, że działanie leków przeciwnowotworowych i promieniowania jonizującego polega na indukcji apoptozy w komórkach guza. Stwierdzono jednak, że skuteczność tego leczenia zależy od obecności w komórkach nowotworowych prawidłowego genu P53 [34]. Chorzy z obecną mutacją genu P53, leczeni tylko napromienianiem, mogą więc wykazywać złą odpowiedź na zastosowaną terapię [11,58]. Jest to związane z fizjologiczną rolą białka P53, które u chorych z prawidłową formą białka („dziki typ” P53) rozpoznaje komórki nowotworowe z uszkodzeniami DNA spowodowanymi działaniem promieniowania i uznając za nienaprawialne, skierowuje na drogę apoptozy. Mutacje genu P53 powodują, że zmienione białko traci swe właściwości hamujące proliferację uszkodzonych komórek (w tym wypadku na skutek promieniowania) i nie zapobiega dalszemu ich rozrostowi [11]. Wykrycie więc zmutowanej formy białka P53 w komórkach raka krtani może być istotnym w wyborze odpowiedniego sposobu leczenia. Ustalenie ewentualnej odpowiedzi indywidualnego chorego na napromienianie, już na podstawie cech biologicznych guza pierwotnego miałyby duże znaczenie w wyborze odpowiedniej metody leczenia. W większości prac poświęconych temu zagadnieniu nie potwierdzono jednak przydatności nadekspresji białka P53 w przewidywaniu odpowiedzi na zastosowane napromienianie

w raku krtani [59,60]. Kontynuacja tych badań zapewne przyniesie ostateczne rozwiązanie tego zagadnienia.

Wydaje się, że białko P53 jest elementem łączącym procesy angiogenezy, proliferacji i apoptozy, a zestawienie informacji dotyczących ekspresji białek P53 i Bcl2, indeksu proliferacyjnego i intensywności angiogenezy w nowotworze pozwala na bardziej wiarygodną ocenę aktywności biologicznej komórki raka krtani. Analiza tych procesów może również posłużyć do stworzenia profilu markerów nowotworowych, którego badanie w każdym nowym przypadku ułatwi monitorowanie i prognozowanie. Istotną zaletą badań powyższych procesów jest możliwość rokowania co do wystąpienia wznowy, przerzutów lub czasu przeżycia, już na podstawie oceny guza pierwotnego. Dalsze badania z zastosowaniem technik molekularnych mogą przyczynić się do wyjaśnienia tych bardzo złożonych zjawisk. Przeprowadzone badania własne wskazują na udział produktów badanych genów w regulacji procesów proliferacji i apoptozy, a także na znaczenie intensywności angiogenezy w progresji raka krtani (praca w druku). Aby uwiarygodnić znaczenie analizowanych procesów wymagane jest zaangażowanie patomorfologów, genetyków, immunologów, laryngologów i innych specjalistów, których współpraca może przynieść ostatecznie korzyści aplikacyjne, nie tylko dla uzyskania samej wartości poznawczych, ale przede wszystkim dla chorych na raka krtani.

W ostatnich latach wskazuje się na możliwość wykorzystania białek swoiście indukujących apoptozę w komórkach nowotworowych. Wprowadza się je do komórki w postaci kodujących je genów, wykorzystując nośniki wirusowe lub liposomy (terapia genowa), lub w postaci tzw. białek fuzyjnych, w których białko proapoptotyczne jest kowalencyjnie związane z ligandem. Przykładem mogą być białka proapoptotyczne pochodzenia wirusowego, jak apoptyna lub białko E4orf4. Pokłada się nadzieje, że te i inne białka staną się lekami nowej generacji w leczeniu nowotworów [34]. Podobnie, badanie zaburzeń cyklu komórkowego i mechanizmów regulacji apoptozy w chorobach nowotworowych powinno przynieść korzyści aplikacyjne, również w raku krtani, co ułatwi monitorowanie przebiegu choroby i prognozowanie całkowitego i wolnego od nowotworu czasu przeżycia chorych. Badania nad programowaną śmiercią komórki powinny więc być kontynuowane w celu poznania agresywności procesu nowotworowego, albowiem możliwe, iż przez przywrócenie komórkom nowotworowym zdolności do umierrania ich nieśmiertelność przestanie być groźna.

Piśmiennictwo

1. Spiessl B, Beahrs OH, Hermanek P i wsp. Atlas TNM. Sanmedica, Warszawa 1994.
2. Shanmugaratnam K, Sobin LH. Histological typing of tumours of the upper respiratory tract and ear. Springer – Verlag 1991.
3. Góra-Tybor E, Robak T. Apoptoza – zaprogramowana śmierć komórki. Postepy Hig Med Dosw 1994; 48, 3: 209-221.
4. Motyl T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. Postepy Biol Komorki 1998; 25: 315-334.
5. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-257.
6. Grzegorzczak J. Apoptoza (PCD) – współczesne poglądy. Med Biol 1999; 1: 2-7.
7. Jassem E, Gózdź St, Jassem J i wsp. Występowanie białka p-53 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca. Nowotwory 1999; 1: 25-29.
8. Sikora E. Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki. Postepy Biochem 1996; 42(2): 108-112.
9. Gallo O, Chiarelli I, Boddi V i wsp. Cumulative prognostic value of p53 mutations and bcl-2 protein expression in head-and-neck cancer treated by radiotherapy. Int J Cancer (Pred Oncol) 1999; 84: 573-579.
10. Pezzella F, Gatter K. What is value of bcl-2 protein detection for histopathologists? Histopathology 1995; 26: 89-93.
11. Saunders ME, MacKenzie R, Shipman R i wsp. Patterns of p53 gene mutations in head and neck cancer: full-length gene sequencing and results of primary radiotherapy. Histol Histopathol 1999; 14 (4): 1113-1118.
12. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl2 family and cell death. Blood 1996; 88(2): 386-401.
13. Sulejczak D. Apoptoza i metody jej identyfikacji. Postepy Biol Komorki 2000; 4: 527-568.
14. Sikora E. Mechanizmy śmierci programowanej komórki (apoptozy). Postepy Biochem 1993; 39(4): 212-220.
15. Jendryczko A. Apoptoza – kontrolowana śmierć komórki. Postepy Nauk Med 1995; 8(6): 267-270.
16. Stewart B. Mechanisms of apoptosis: integration of generic, biochemical and cellular indicators. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 1286-1296.
17. Darżynkiewicz Z, Gorczyca W, Ardelt B i wsp. Cytometria apoptozy i martwicy. Centr Europ J Immunol 1996; 21, supl. 2: 156-170.
18. Labat-Moleur F, Guillermet Ch, Lorimier P i wsp. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. J. Histochem Cytochem 1998; 46(3): 327-334.
19. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. Nat Med 1997; 3: 614-620.
20. Lu QL, Abel P, Foster CS. Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. Hum Pathol 1996; 27: 102-110.
21. Harris CC. Structure and function of the p53 tumour suppressor gene: clue for rational cancer therapeutic strategies. J Natl Cancer Inst 1996; 88: 1442-1455.
22. Lane DP. On the overexpression of the p53 protein in human cancer. Mol Biol Rep 1994; 19: 23-29.
23. Rożynkowska D. Apoptoza doświadczalne: modele indukcji in vivo i zastosowania. Postepy Biol Komorki 1996; 23(3): 421-444.
24. Wiśnik P. Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego. Postepy Biochem 1997; 43(2): 85-90.
25. Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissue. Cancer Metastasis Rev 1992; 11: 95.
26. Ruley HE. P53 and response to chemotherapy and radiotherapy. Princ Pract Oncol 1997; 11: 1-19.
27. Limon J, Siedlecki JA. Choroby nowotworowe. (w:) Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. J. Bala (red.) Springer PWN, Warszawa 1998.
28. Berbec H. Gen p53 człowieka. Postepy Biochem 1994; 40 (1): 6-11.
29. Horst A. Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego. Postepy Biol Komorki 1993; 20(3): 311-329.
30. Siedlecki JA. Molekularne aspekty transformacji nowotworowej. Nowa Med 1996; 3(6): 7-9.
31. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM. WAF/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res 1994; 54: 1169-1174.
32. Shimamura A, Fisher DE. p53 in life and death. Clin Cancer Res 1996; 2: 435-440.
33. Hickman JA. Apoptosis and chemotherapy resistance. Eur J Cancer 1996; 43A: 921-926.
34. Szala S. Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. Nowotwory 2000; 50, 2: 111-121.
35. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clue to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994; 54: 4855-4878.
36. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. Nature 1997; 389: 191-194.
37. Cinatl J Jr, Cinatl J, Vogel JU i wsp. Persistent human cytomegalovirus infection induced drug resistance and alteration of programmed cell death in human neuroblastoma cells. Cancer Res 1998; 58: 367-372.
38. Eisma RJ, Spiro JD, Kreuzer DL. Role of angiogenic factors: coexpression of interleukin-8 and vascular endothelium growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. Laryngoscope 1999; 109: 687-693.
39. Szala S, Radzikowski Cz. Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. Nowotwory 1997; 47: 1-19.
40. Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y i wsp. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. Eur J Cancer 1996; 32A, 14: 2513-2519.
41. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. Cancer Res 1995; 55: 6161-6165.
42. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E i wsp. Involvement of bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science 1985; 228: 1440-1443.
43. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. Cancer Res 1993; 53: 4701-4714.
44. Bronner MP, Culin C, Reed JC. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. Am J Pathol 1995; 146: 20-26.
45. Sinicrope FA, Ruan S, Cleary KR. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. Cancer Res 1995; 55: 237-241.

46. Kernohan NM, Cox LS. Regulation of apoptosis by bcl-2 and its related proteins: immunochemical challenges and therapeutic implications. *J Pathol* 1996; 179: 1-3.
47. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32: 223-254.
48. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489-503.
49. Pence J, Kerns B, Dodge R i wsp. Prognostic significance of the proliferation index in surgically resected non-small cell lung cancer. *Arch Surg* 1993; 128: 1382-1390.
50. Tungekar MF, Gatter KC, Dunnill MS i wsp. Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology* 1991; 19: 545-550.
51. Nylander K, Stenling R, Gustafsson R i wsp. p53 expression and cell proliferation in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1995; 75: 87-93.
52. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z i wsp. Correlation of tumour markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6 and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122 (6): 644-648.
53. Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP i wsp. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumour front grading, and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 503-510.
54. Linden MD, Torres FX, Kubus J i wsp. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessment of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97 suppl. 1: 4-13.
55. Woosley JT. Measuring cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 555-557.
56. Fonatsch C, Dirchow M, Reider H i wsp. Assignment of the human Ki-67 gene (MKI67) to 10q25-qter. *Genomics* 1991; 11: 476-477.
57. Ramshaw AL, Parums DV. Combined immunohistochemical and immunofluorescence method to determine the phenotype of proliferating cell populations. *J Clin Pathol* 1992; 45: 591-593.
58. Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999; 187: 127-137.
59. Lera J, Lara PC, Perez S i wsp. Tumour proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma: relation to the results of radiotherapy. *Cancer* 1999; 83(12): 2493-2501.
60. Pai HH, Rochon L, Clark B i wsp. Overexpression of p53 protein does not predict local-regional control or survival in patients with early-stage squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 1, 41(1): 37-42.