

**ANNALES  
ACADEMIAE MEDICAE  
GEDANENSIS  
TOM XXXV  
2005  
SUPPLEMENT 8**



AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Dorota Dworakowska

**WSKAŹNIK APOPTOTYCZNY ORAZ WYBRANE  
REGULATORY CYKLU KOMÓRKOWEGO  
W NIEDROBNOKOMÓRKOWYM RAKU PŁUCA**

*Apoptotic index and selected cell cycle  
regulators in non-small cell lung cancer*

Rozprawa habilitacyjna

Klinika Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy

Instytut Chorób Wewnętrznych

Akademia Medyczna w Gdańsku

Kierownik: Prof. dr hab. med. Eugenia Częstochowska

Dr hab. med. Krzysztof Sworczak

GDAŃSK 2005

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY  
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD  
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY  
EDITORIAL BOARD  
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek  
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,  
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan,  
prof. nadzw. AMG mgr Józefa de Laval,  
prof. dr Jerzy Łukasiak, prof. dr Zbigniew Machaliński,  
prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI  
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE  
Annales Academiae Medicae Gedanensis  
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,  
80-210 Gdańsk, Poland  
e-mail: [annales@amg.gda.pl](mailto:annales@amg.gda.pl)

Artykuły opublikowane w Annales AMG  
są zamieszczane w bazie EMBASE  
Articles published In Annales AMG are covered  
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

W niniejszej rozprawie wykorzystano część wyników prezentowanych w publikacjach:

**D. Dworakowska, E. Jassem, J. Jassem, A. Karmoliński, R. Dworakowski, T. Wirth, M. Gruchala, A. Rynkiewicz, J. Skokowski, S. Ylä-Herttuala, K. Jaśkiewicz, E. Częstochowska.** *Clinical significance of apoptotic index in non-small cell lung cancer: correlation with p53, mdm2, pRb and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression.* **J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2005; 131: 617-623.**

**D. Dworakowska, E. Jassem, J. Jassem, C. Boltze, K. Wiedorn, R. Dworakowski, J. Skokowski, K. Jaśkiewicz, E. Częstochowska.** *Prognostic value of cyclin D1 overexpression in correlation with pRb and p53 status in non-small cell lung cancer (NSCLC).* **J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2005; 131: 479-85.**

**D. Dworakowska, E. Jassem, J. Jassem, C. Boltze, K. Wiedorn, R. Dworakowski, J. Skokowski, K. Jaśkiewicz, E. Częstochowska.** *Absence of prognostic significance of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression in non-small cell lung cancer.* **Acta Oncologica 2005; 44: 75-79.**

**D. Dworakowska, E. Jassem, J. Jassem, K. Wiedorn, C. Boltze, A. Karmoliński, R. Dworakowski, J. Skokowski, K. Jaśkiewicz, A. Bosse, E. Częstochowska.** *Prognostic relevance of altered pRb and p53 protein expression in surgically treated non-small cell lung cancer patients.* **Oncology 2004; 67: 60-66.**

Wszyscy współautorzy pisemnie oświadczyli, że wkład autorki niniejszej rozprawy w realizację powyższych prac zespołowych wynosił co najmniej 85%.

W przedstawionej pracy oceniono łącznie wszystkie dotychczas badane parametry w powiększonej grupie chorych.

## PODZIĘKOWANIA

W sposób szczególny pragnę podziękować Pani Profesor Eugenii Częstochowskiej, byłemu kierownikowi Kliniki Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy AMG, za nieocenioną i wszechstronną pomoc, za inspirację do pracy naukowej, serce, opiekę i nieustające wsparcie, bez którego realizacja tej pracy nie byłaby możliwa.

Następnie chciałabym podziękować Panu Doktorowi hab. med. Krzysztofowi Sworczakowi, obecnemu kierownikowi Kliniki Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy AMG za wyrozumiałość oraz pomoc w realizacji przedstawionej pracy.

Podziękować chciałabym również Pani Profesor Ewie Jassem, kierownikowi Kliniki Alergologii AMG oraz Panu Profesorowi Jackowi Jassemowi, kierownikowi Kliniki Onkologii i Radioterapii AMG za wprowadzenie mnie do fascynującego świata nauki, za możliwość skorzystania z ich ogromnego doświadczenia naukowego oraz głębokiej wiedzy dotyczącej biologii raka płuca.

Chciałabym także podziękować Panu Profesorowi Janowi Skokowskiemu, kierownikowi Kliniki Chirurgii Klatki Piersiowej AMG za umożliwienie kontaktu z chorymi operowanymi z powodu raka płuca oraz Panu Profesorowi Kazimierzowi Jaśkiewiczowi, kierownikowi Katedry i Zakładu Patomorfologii AMG za możliwość skorzystania z materiału biologicznego.

Słowa podziękowania pragnę skierować do Pana Profesora Seppo Ylä-Herttua (kierownika Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Kuopio, Finlandia), Pana Profesora Aleksandra Bosse (kierownika Instytutu Patomorfologii, Katharinenhospital w Stuttgarcie, Niemcy) oraz Pana Profesora Alberta Roessnera (kierownika Instytutu Patomorfologii, Uniwersytetu Otto-von-Guericke, w Magdeburgu, Niemcy) za możliwość wykonania pod ich kierownictwem laboratoryjnej części pracy.

Dziękuję moim Koleżankom i Kolegom z Kliniki Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy AMG, Kliniki Onkologii i Radioterapii AMG, Kliniki Chirurgii Klatki Piersiowej AMG oraz z Katedry i Zakładu Patomorfologii AMG, za pomoc i nieustającą życzliwość podczas realizacji tej pracy.

W końcu chciałabym podziękować mojemu Mężowi Rafałowi, Rodzicom, moim Siostrze Marcie i Ewie, wszystkim Przyjaciołom oraz innym bliskim mi Osobom, którzy obdarzyli mnie życzliwością podczas realizacji tej pracy.

## ACKNOWLEDGMENTS

First of all I would like to deeply thank Professor Eugenia Cześćochowska, the previous Head of the Department of Internal Medicine, Endocrinology and Haemostatic Disorders, Medical University of Gdańsk, Poland, for her invaluable and wide help, for inspiration to scientific work, heart and continuous support, instead of which it would not be possible to perform this work.

Next, I would like to thank Professor Krzysztof Sworczak, current Head of the Department of Internal Medicine, Endocrinology and Haemostatic Disorders, Medical University of Gdańsk, Poland, for understanding and help during realization of this work.

I remain deeply grateful to Professor Ewa Jassem, Head of the Department of Allergology, and Professor Jacek Jassem, Head of the Department of Oncology and Radiotherapy, Medical University of Gdańsk for introducing me to fascinating world of science, for possibility to benefit from their deep knowledge and large experience in the field of lung cancer biology.

I would like also to thank Professor Jan Skokowski, Head of the Department of Thoracic Surgery, for making possible to reach a contact with a large number of patients, who were operated because of lung cancer and Professor Kazimierz Jaśkiewicz, Head of the Department of Pathology, Medical University of Gdańsk for possibility to use the archival tissues.

Additionally, I would like to thank Profesor Seppo Ylä-Hertuala, Head of the Department of Molecular Medicine, University of Koupio, Finland, Professor Alexander Bosse, Head of the Department of Pathology, Katharinenhospital, Stuttgart, Germany and Professor Albert Roessner, Head of the Department of Pathology, Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany for their invaluable help in laboratory part of this work.

I would like to thank all my colleagues from the Department of Internal Medicine, Endocrinology and Haemostatic Disorders, the Department of Oncology and Radiotherapy, the Department of Thoracic Surgery and the Department of Pathology, Medical University of Gdansk, Poland for their very important help and big support during this work.

In the end, I would like to express my deep gratitude for my husband Rafał, my parents, my sisters Marta and Ewa, my friends and all kindly people, who gave me a lot acceptance and understanding during this work.





# SPIS TREŚCI

<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>13</b>
1.1. RAK PŁUCA .....	13
1.2. CYKL KOMÓRKOWY .....	14
1.3. APOPTOZA .....	14
1.4. ZABURZENIA GENETYCZNE W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH .....	16
1.5. BIAŁKO P53 .....	17
1.6. BIAŁKO PCNA .....	19
1.7. BIAŁKO PRB .....	19
1.8. BIAŁKO MDM2 .....	21
1.9. BIAŁKO p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> .....	22
1.10. CYKLINA D1 .....	24
1.11. PODSUMOWANIE .....	25
<b>2. CELE PODJĘTYCH BADAŃ</b> .....	<b>26</b>
<b>3. MATERIAŁ</b> .....	<b>27</b>
<b>4. METODY</b> .....	<b>30</b>
4.1. OCENA APOPTOZY .....	30
4.2. OCENA WYSTĘPOWANIA BIAŁEK P53, PCNA, PRB, MDM2, p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> ORAZ CYKLINY D1 .....	32
4.3. ANALIZA STATYSTYCZNA .....	36
<b>5. WYNIKI</b> .....	<b>38</b>
5.1. WSKAŹNIK APOPTOTYCZNY .....	38
5.2. WSKAŹNIK EKSPRESJI BIAŁKA PCNA .....	42
5.3. BIAŁKO P53 .....	47
5.4. BIAŁKO PRB .....	49
5.5. BIAŁKO MDM2 .....	52
5.6. BIAŁKO p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> .....	55
5.7. CYKLINA D1 .....	58
5.8. KORELACJE POMIĘDZY WSKAŹNIKIEM APOPTOTYCZNYM, WSKAŹNIKIEM EKSPRESJI PCNA A WYSTĘPOWANIEM BIAŁEK P53, PRB, MDM2, p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> I CYKLINY D1 .....	61
5.9. OCENA ROKOWNICZEGO ZNACZENIA WYBRANYCH FENOTYPÓW .....	67
5.10. ROKOWNICZE ZNACZENIE WSZYSTKICH OKREŚLONYCH PARAMETRÓW ANALIZOWANYCH ŁĄCZNIE .....	71
<b>6. OMÓWIENIE</b> .....	<b>73</b>
6.1. OCENA ZRÓŻNICOWANIA WSKAŹNIKA APOPTOTYCZNEGO, WSKAŹNIKA EKSPRESJI PCNA ORAZ OBECNOŚCI BIAŁEK P53, PRB, MDM2, p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> I CYKLINY D1 .....	73
6.2. OCENA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY WSKAŹNIKIEM APOPTOTYCZNYM, WSKAŹNIKIEM EKSPRESJI PCNA, BIAŁKIEM P53, PRB, MDM2, p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> ORAZ CYKLINĄ D1 .....	77

6.3.	OCENA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY WSKAŹNIKIEM APOPTOTYCZNYM, WSKAŹNIKIEM EKSPRESJI PCNA, EKSPRESJĄ BIAŁEK P53, PRB, MDM2, P21 <sup>WAF1/CIP1</sup> ORAZ CYKLINY D1 A CECHAMI KLINICZNYMI I DEMOGRAFICZNYMI.....	81
6.4.	OKREŚLENIE WARTOŚCI ROKOWNICZEJ ANALIZOWANYCH PARAMETRÓW, OCENIANYCH POJEDYNCZO LUB ŁĄCZNIE .....	82
<b>7.</b>	<b>WNIOSKI .....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>90</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>92</b>
<b>10.</b>	<b>PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>94</b>

## Wykaz najczęściej używanych skrótów:

APAAP	fosfataza zasadowa-antyfosfataza ( <i>alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase</i> )
<i>CCND1</i>	gen kodujący cyklinę D1 ( <i>cyclin D1 gene</i> )
DKRP	drobnokomórkowy rak płuca ( <i>SCLC - small cell lung cancer</i> )
DNA	kwas dezoksyrybonukleinowy ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<i>MDM2</i>	gen kodujący białko mdm2 ( <i>mouse double minute 2 gene</i> )
NDKRP	niedrobnokomórkowy rak płuca ( <i>NSCLC - non-small cell lung cancer</i> )
<i>P53</i>	gen kodujący białko p53 ( <i>P53 gene</i> )
PAP	peroksydaza-antyperoksydaza ( <i>peroxidase-antiperoxidase</i> )
PCNA	jądrowy antygen proliferacji komórkowej ( <i>proliferating cell nuclear antigen</i> )
<i>RB</i>	gen kodujący białko pRb ( <i>Retinoblastoma gene</i> )
RNA	kwas rybonukleinowy ( <i>ribonucleic acid</i> )
mRNA	informacyjny kwas rybonukleinowy ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
TdT	nukleotydylotransferaza DNA ( <i>terminal deoxynucleotidyltransferase</i> )
TUNEL	metoda wykrywania apoptozy ( <i>TdT-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxygenin nick end-labeling</i> )
WA	wskaźnik apoptotyczny ( <i>AI – apoptotic index</i> )
<i>WAF1/CIP1</i>	gen kodujący białko p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> ( <i>WAF1/CIP1 gene, WAF1 – wild-type p53-activated fragment 1; CIP1 – cdk interacting protein 1</i> )
W PCNA	wskaźnik ekspresji białka PCNA ( <i>PCNA LI – PCNA labeling index</i> )
<i>wt p53</i>	„dzikie” białko p53 ( <i>wild-type p53</i> )
<i>mt p53</i>	zmutowane białko p53 ( <i>mutant-type p53</i> )



# 1. WSTĘP

## 1.1. Rak płuca

Rak płuca, z uwagi na wysoką i stale rosnącą liczbę zachorowań oraz niezadowalające wyniki leczenia, stanowi istotny problem medyczny i społeczny. Rokowanie w tym nowotworze praktycznie nie uległo zmianie w ostatnich dziesięcioleciach. Guz ten w większości rozwiniętych krajów świata jest przyczyną najwyższej liczby zgonów spowodowanych nowotworami złośliwymi [145]. W ostatnich dziesięcioleciach notuje się prawdziwą epidemię zachorowań na raka płuca. Dzieje się tak zarówno w Polsce, jak i w większości rozwiniętych państw świata. Przyczyną tak dramatycznego wzrostu zachorowań jest obserwowana w ostatnich dekadach rosnąca liczba wypalanych papierosów, szczególnie przez ludzi młodych a zwłaszcza kobiety [144].

Podział wszystkich raków płuca na dwie duże grupy: raki drobno - i niedrobnokomórkowe, pozwala wyodrębnić chorych o istotnie różnym przebiegu klinicznym, rokowaniu i sposobach leczenia. Raki niedrobnokomórkowe (NDKRP) stanowią 75-80% wszystkich raków płuca i cechują się wolniejszym niż rak drobnokomórkowy (DKRP) wzrostem oraz niższą skłonnością do tworzenia przerzutów odległych. W efekcie, wyniki leczenia w tej grupie są nieco lepsze niż u chorych na DKRP - nowotworu o uogólnionym charakterze już od początku swojego rozwoju [65-67, 164].

Grupę NDKRP tworzą raki płaskonabłonkowe, gruczolakoraki, raki wielkomórkowe oraz guzy mieszane. Rak płaskonabłonkowy silniej niż rak gruczolowy związany jest z nałogiem palenia papierosów. Rak gruczolowy, klinicznie jest nieco bardziej agresywny niż rak płaskonabłonkowy. Cechami charakterystycznymi gruczolakoraka jest skłonność do naciekania naczyń oraz tworzenia odległych przerzutów. Pomimo wspomnianych różnic biologicznych pomiędzy poszczególnymi podtypami NDKRP, nowotwory te nie różnią się zasadniczo rokowaniem i są na ogół rozpatrywane łącznie [137, 170]. Z powodu różnorodności NDKRP przebieg kliniczny choroby u konkretnego chorego jest często trudny do przewidzenia [9]. Klasyczne czynniki rokownicze obejmują stopień zaawansowania klinicznego nowotworu (oparty na skali TNM), stan kliniczny chorego w momencie rozpoznania oraz utratę masy ciała. Podstawą leczenia NDKRP pozostaje resekcja mięszu płucnego, jednak kwalifikuje się do niego jedynie 15-25% spośród ogółu chorych. Wskazaniem do radykalnego zabiegu jest nowotwór o zaawansowaniu, który nie przekracza stopnia III A [144].

Pomimo postępów w terapii raka płuca, wyniki leczenia tego nowotworu poprawiają się względnie wolno. Wiele danych wskazuje, że lepsze poznanie cech biologicznych tej grupy nowotworów mogłoby stanowić element pomocny

w opracowaniu nowych strategii leczniczych [60, 107, 112, 156]. Wydaje się, że wyodrębnienie nowych czynników rokowniczych oraz predykcyjnych, określających wrażliwość nowotworu na poszczególne leki cytostatyczne lub napromienianie, pozwoliłoby wyodrębnić grupy chorych, u których metody te mogłyby przynieść najwyższą korzyść kliniczną. Do markerów biologicznych stwarzających największe nadzieje w tym zakresie należą zaburzenia molekularne genów, które kodują białka uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego [12, 77, 164].

## 1.2. Cykl komórkowy

Podstawowym warunkiem wzrostu tkanki jest zdolność komórek do dzielenia się. Cykl komórkowy komórki somatycznej składa się z kolejno następujących po sobie faz: M, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S oraz G<sub>2</sub>. Podczas fazy M – mitozy (*mitosis*), dochodzi do podziału i powstania dwóch komórek potomnych. Po podziale komórki macierzystej, nowo powstałe komórki przechodzą w fazę G<sub>0</sub> bądź G<sub>1</sub>. Wejście komórki w fazę G<sub>1</sub> umożliwia jej dalsze podziały związane z biosyntezą DNA. Komórki nie zaangażowane w biosyntezę DNA znajdują się w fazie G<sub>0</sub> [97]. Podczas fazy przerwy pomitotycznej G<sub>1</sub> (*gap*) komórka przygotowuje się do replikacji DNA, natomiast podczas fazy S (*synthesis*), dochodzi do syntezy DNA oraz podwojenia się jego ilości. Faza G<sub>2</sub> bezpośrednio poprzedza podział komórki. W przypadku uszkodzenia nici DNA faza G<sub>1</sub> cyklu komórkowego ulega wydłużeniu, stwarzając w przypadku niewielkiego defektu możliwość naprawy uszkodzonych fragmentów. Gdy uszkodzenie materiału genetycznego jest zbyt duże, dochodzi do aktywacji procesu programowanej śmierci komórki [158].

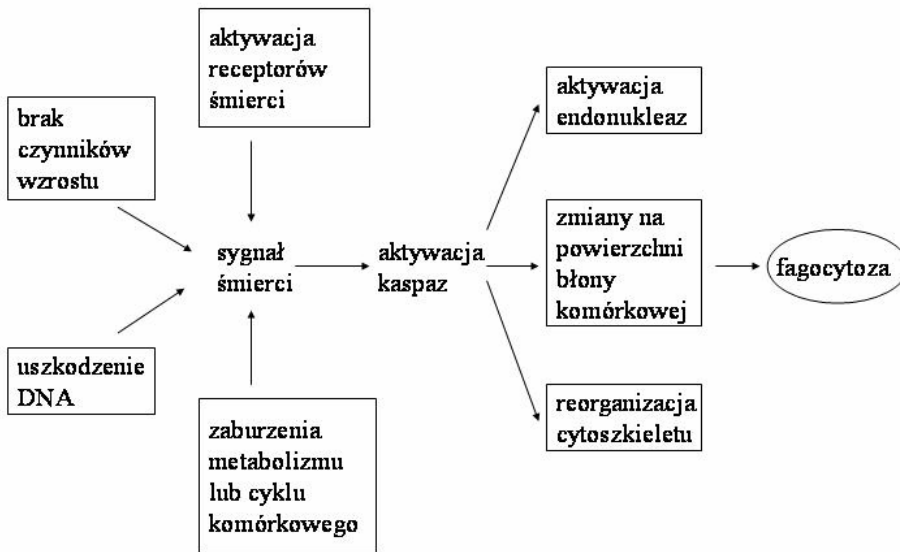
## 1.3. Apoptoza

Apoptoza jest fizjologiczną formą śmierci komórek, podczas której eliminowane są komórki zużyte lub uszkodzone. Proces ten, regulując liczbę komórek, jest niezwykle istotny w utrzymaniu homeostazy tkankowej oraz poprzez usuwanie komórek potencjalnie niebezpiecznych (w tym nowotworowych czy zakażonych przez wirusy) w zwalczaniu wielu chorób [51]. Apoptoza nazywana jest również programowaną śmiercią komórki, ponieważ jej wystąpienie jest ściśle uwarunkowane genetycznie.

W regulację apoptozy zaangażowanych jest wiele genów, szczególnie gen *P53*, *BCL2* oraz *BAX*. Białko p53 wraz z zależnym od niego białkiem bax aktywuje apoptozę, natomiast białko bcl-2 hamuje proces samobójczej śmierci komórki [51]. Aktywacja genów kontrolujących apoptozę może następować pod wpływem czynników wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych (m.in. hormonów, czynników wzrostu czy jonów) (rycina 1). Prawidłowa regulacja umożliwia utrzymanie równowagi pomiędzy namnażaniem się komórek oraz ich obumieraniem. Zaburzenia procesu apoptozy występują w wielu schorzeniach m.in.

w chorobie Alzheimera, Parkinsona, w zakażeniu wirusem HIV, chorobach autoimmunologicznych czy rozrostowych [8, 51].

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. W fazie efektorowej dochodzi m.in. do depolaryzacji błony mitochondrialnej a proces jest jeszcze odwracalny. W fazie degradacji, po osiągnięciu punktu bez odwrotu, komórka ulega zniszczeniu [95, 96] (ryc. 1).



Ryc. 1. Apoptoza.

Fig. 1. Apoptosis.

Drugą obok apoptozy formą śmierci komórki jest martwica - proces patologiczny i różniący się zasadniczo od apoptozy. Podstawowe rozbieżności dotyczą etiologii martwicy, ponieważ jest ona zawsze związana z poważnym chemicznym lub fizycznym uszkodzeniem komórek przez czynniki zewnętrzne takie, jak urazy, niedotlenienie czy zatrucia. Czynnikiem wywołującym proces apoptozy są natomiast cytokiny, bądź zaburzenia hormonalne (np. niedobór hormonu wzrostu). 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 [80, 195].

Podczas procesu apoptozy dochodzi do obkurczania się jądra komórkowego, zagęszczenia 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 apoptozy są wynikiem fragmentacji chromatyny w wyniku aktywacji endonukleaz. Enzymy te degradują nić DNA na fragmenty, początkowo o wielkości od 300 do 50 000 par zasad (które prawdopodobnie odpowiadają domenom chromatyny), a następnie na mniejsze fragmenty od 180 do 200 par zasad [195].

Morfologiczne cechy apoptozy (zmniejszenie objętości komórki, kondensację chromatyny jądrowej, fragmentację jądra, a nawet całej komórki na mniejsze ciała apoptotyczne) można rozpoznać w mikroskopie elektronowym. Większe fragmenty DNA (od 300 do 50 000 par zasad) można uwidocznic stosując elektroforezę pulsacyjną, natomiast mniejsze (od 180 do 200 par zasad) - 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 nick end-labeling*). Najczęściej stosuje się metodę polegającą na przyłączeniu znakowanych nukleotydów do końców 3'-OH fragmentów DNA (reakcja TUNEL - *TdT-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxygenin nick end-labeling*) [80, 195].

Komórki nowotworowe mogą ulegać apoptozie – zarówno spontanicznej, jak i indukowanej. Apoptoza komórek nowotworowych ma duże znaczenie terapeutyczne, bowiem wiele stosowanych leków przeciwnowotworowych ją aktywuje. Z drugiej strony zaburzenia procesu apoptozy mogą w niektórych przypadkach powodować oporność komórek nowotworowych na stosowane leczenie [51]. Rokownicze i predykcyjne znaczenie odsetka komórek nowotworowych w guzie, które uległy apoptozie, pozostaje w NDKRP zagadnieniem nierozstrzygniętym [29, 100, 110, 120, 150, 179].

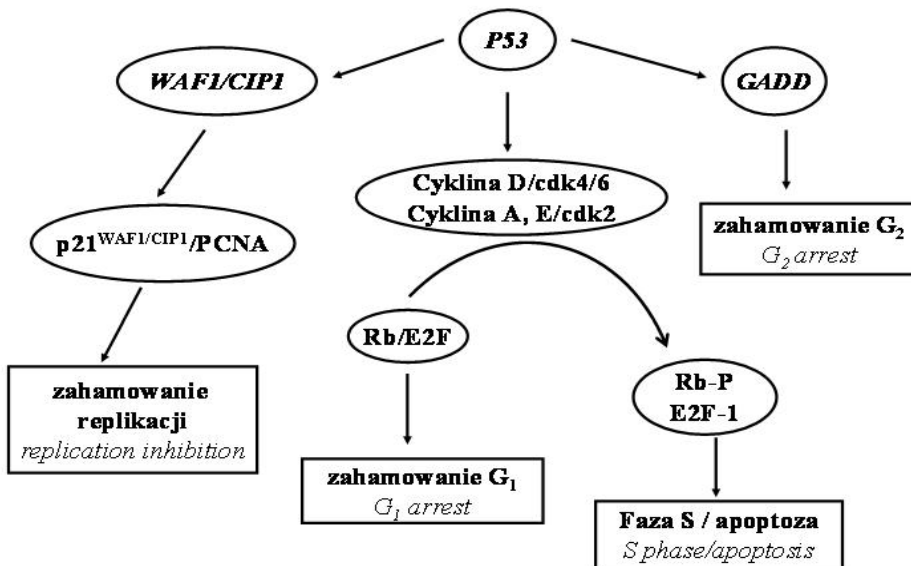
## 1.4. Zaburzenia genetyczne w komórkach nowotworowych

W dotychczasowych badaniach wykazano, że w komórkach nowotworowych występuje szereg zaburzeń molekularnych i cytogenetycznych [58]. Zaburzenia genetyczne prowadzące do powstania nowotworu dotyczą zasadniczo trzech podstawowych grup genów: protoonkogenów, genów supresorowych oraz genów mutatorowych. Protoonkogeny, zwane inaczej genami proliferacyjnymi, kodują białka uczestniczące w inicjowaniu i pobudzaniu podziału komórkowego. W prawidłowych komórkach kontrolują one procesy wzrostu i różnicowania. Geny supresorowe uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego. Ich rola polega przede wszystkim na zapobieganiu przekazywania zaburzeń genetycznych komórkom potomnym. Geny mutatorowe kodują białka zdolne do rozpoznawania, naprawy lub wycięcia uszkodzonego fragmentu nici DNA [97].



## 1.5. Białko p53

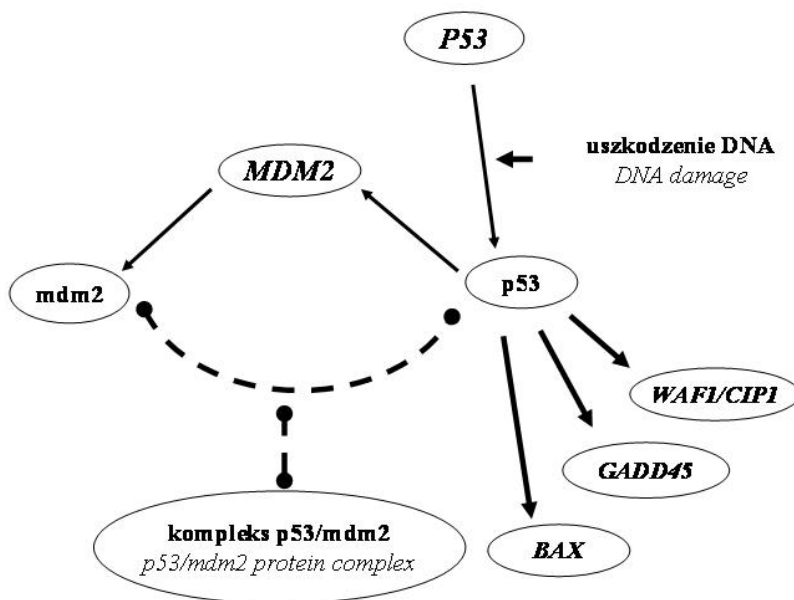
Jednym z najlepiej poznanych zaburzeń genetycznych w raku płuca są zaburzenia funkcji genu supresorowego *P53*. Gen ten, zlokalizowany na chromosomie 17p13.1, odpowiedzialny jest za utrzymanie integralności genomu i stąd nazywany jest jego „strażnikiem”. Zasadnicza funkcja *P53* wiąże się z zapobieganiem przekazywaniu zaburzeń genetycznych komórkom potomnym poprzez wydłużenie fazy  $G_1$  cyklu komórkowego, co umożliwi naprawę uszkodzonych fragmentów nici DNA (rycina 2). Jeżeli uszkodzenie materiału genetycznego jest zbyt duże, gen ten uruchamia proces apoptozy [165]. Mutacje genu *P53* mogą umożliwiać z jednej strony przekazywanie komórkom potomnym uszkodzonych fragmentów DNA oraz z drugiej - powstanie komórki „nieśmiertelnej” [117].



Ryc. 2. Funkcja genu *P53*.  
Fig. 2. *P53* gene function.

Produktem genu *P53* jest białko p53 o masie cząsteczkowej 53 kDa. Uczestniczy ono w regulacji transkrypcji genów oraz cyklu komórkowego, syntezie i naprawie nici DNA, procesie różnicowania się komórek, apoptozie a także angiogenezie [52, 54, 56, 120]. Ilość białka p53 zwiększa się w jądrze komórkowym w sytuacji szeroko rozumianego „stresu” komórkowego, spowodowanego m.in. uszkodzeniem nici DNA, szokiem termicznym, niedotlenieniem, uszkodzeniem oksydacyjnym, zmianami metabolicznymi lub aktywacją onkogenów [149].

Istnieją dwie formy białka p53. Pierwszą z nich jest białko prawidłowe, określane najczęściej jako „dzikie” (*wild-type* p53), a drugą – produkt zmutowanego genu *P53* (*mutant-type* p53), pozbawione swojej funkcji supresorowej. Poza mutacjami genu *P53*, przyczyną unieczynnienia białka p53 może być także tworzenie nieaktywnych kompleksów z innymi białkami np. z białkiem mdm2 (rycina 3) [110, 126-129, 147]. Do utraty funkcji supresorowej może dojść również w wyniku przeniesienia białka p53 z jądra komórkowego do cytoplazmy oraz wskutek jego degradacji pod wpływem niektórych wirusów [58, 128, 149].



Ryc. 3. Pętla sprzężenia zwrotnego pomiędzy białkiem mdm2 i p53.

Fig. 3. Auto-regulatory feedback loop between mdm2 and p53 protein.

Mutacje genu *P53* typu „*missense*” powodują stabilizację białka p53 i jego nagromadzenie się w jądrze komórkowym [57, 59]. „Dzikie” białko p53 (*wt* p53) charakteryzuje się bardzo krótkim okresem półtrwania i z tego powodu w badaniach immunohistochemicznych nie stwierdza się jego obecności. Z kolei białko zmutowane (*mt* p53), w związku z wydłużonym okresem półtrwania, jest wykrywane za pomocą tej metody [59].

Pomimo bogatego piśmiennictwa, rokownicze znaczenie obecności białka p53 w komórkach NDKRP nadal pozostaje przedmiotem kontrowersji [125, 164]. W poszczególnych badaniach zaburzenie to wiązało się z gorszym [19, 37, 40, 65] lub lepszym rokowaniem [102, 183], albo nie miało wpływu na czas przeżycia [7, 46, 53, 146, 189].

## 1.6. Białko PCNA

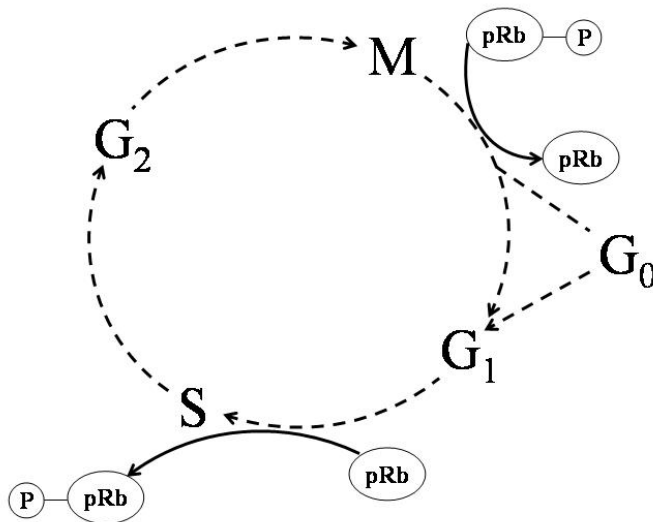
Znaczący udział białka p53 w regulacji cyklu komórkowego, spowodował rozpoczęcie poszukiwań innych białek zaangażowanych w proliferację komórkową, których funkcja wiązałaby się z białkiem p53. Jednym z nich jest białko PCNA (*proliferating cell nuclear antygen*) [37, 40, 42]. Częsteczką tą, nazywaną również cyklina lub białkiem pomocniczym dla DNA polimerazy  $\delta$  [14] oraz DNA polimerazy  $\epsilon$  [44, 131], jest proteiną o masie cząsteczkowej 36 kDa, ściśle związaną z replikacją DNA oraz proliferacją komórkową [14, 44]. Stężenie białka PCNA rośnie w końcowym okresie fazy  $G_1$  cyklu komórkowego, osiąga swoją maksymalną wartość w fazie S, a następnie obniża się podczas fazy  $G_2$ , całkowicie zanikając podczas mitozy lub w komórkach, które znajdują się w fazie  $G_0$  [9, 14, 44, 158]. Jądrową ekspresję białka PCNA stwierdzono w wielu guzach nowotworowych, w tym w NDKRP [44, 178]. Odkąd białko PCNA zostało uznane za wskaźnik proliferacji komórkowej, jego obecność wiązana jest z większą agresywnością guza nowotworowego [44, 140, 178]. W niektórych badaniach obejmujących różne typy nowotworów złośliwych, wykazano niekorzystny wpływ występowania białka PCNA w komórkach nowotworu na czas przeżycia chorych [9, 40, 44, 49, 140]. Sugeruje się, że „dzikie” białko p53 posiada zdolność wybiórczego obniżania stężenia mRNA dla PCNA oraz w konsekwencji białka PCNA, podczas gdy zmutowane białko p53 aktywuje bezpośrednio powstawanie PCNA [131]. Pomimo licznych doniesień dotyczących nagromadzenia białka PCNA w komórkach NDKRP, niektóre aspekty klinicznego znaczenia tego zjawiska nie zostały rozstrzygnięte. Dyskusyjny pozostaje związek pomiędzy ekspresją białka PCNA oraz p53, jak również znaczenie rokownicze obu białek, zwłaszcza analizowanych łącznie.

## 1.7. Białko pRb

Gen *RB* (*Retinoblastoma*) jest genem supresorowym, który pierwotnie został zidentyfikowany jako uczestniczący w rozwoju genetycznie uwarunkowanego nowotworu złośliwego – siatkówczaka. Knudson w teorii „dwóch uderzeń” (*two hits*) twierdził, że do rozwoju dziedzicznej formy siatkówczaka potrzebne są dwie, następujące po sobie mutacje („uderzenia”), unieczynnijające oba allele genu predysponującego do rozwoju tego nowotworu. Pierwsza mutacja genu *RB* następuje w komórkach rozrodczych (mutacja germinalna), druga natomiast dokonuje się w komórkach siatkówki podczas życia osobniczego (mutacja somatyczna) [88].

Najczęstszymi rodzajami mutacji genu *RB* są delecje lub mutacje typu *missense*, skutkujące powstaniem, bądź skróconego i niefunkcjonalnego białka pRb, bądź całkowitym jego brakiem [74]. Najbardziej czułą metodą oceniającą unieczynnienie genu *RB* pozostaje immunohistochemiczne oznaczenie obecności białka pRb [189].

Białko pRb występuje w komórce w dwóch postaciach. W fazie  $G_0$  oraz na początku fazy  $G_1$  białko pRb pozostaje nieufosforylowane. Na granicy faz  $G_1$  i S białko pRb ulega fosforylacji i pozostaje w takiej postaci poprzez fazę S aż do końca fazy  $G_2$  i początku mitozy, aby pod jej koniec ulec defosforylacji (ryc. 4) [159]. W sytuacji uszkodzenia materiału genetycznego, nieufosforylowane białko pRb powoduje zatrzymanie komórki w fazie  $G_1$ , umożliwiając naprawę uszkodzonych fragmentów nici DNA przed wejściem komórki w fazę S oraz zatrzymując replikację uszkodzonego fragmentu DNA [149]. Fosforylacja białka pRb odbywa się przy udziale zależnych od cyklin kinaz (cdk4/6). Ufosforylowana postać białka pRb nie posiada już zdolności zatrzymania cyklu komórkowego w fazie  $G_1$ , pozwala natomiast naprawionej komórce na przejście w kolejną fazę cyklu [23].



Ryc. 4. Fosforylacja białka pRb podczas cyklu komórkowego.

Fig. 4. *pRb protein phosphorylation during cell cycle.*

Istnieje ścisły związek pomiędzy funkcją genów *RB* i *P53*. W wyniku uszkodzenia nici DNA, białko p53 ulega stabilizacji i inicjuje transkrypcję genu *WAF1/CIP1* oraz translację białka  $p21^{WAF1/CIP1}$  [104]. Jedną z konsekwencji aktywacji białka  $p21^{WAF1/CIP1}$  jest zahamowanie kompleksu cdk4/6, inaktywacja fosforylacji białka pRb oraz nagromadzenie się jego nieufosforylowanej postaci. Modułacja genu *RB* przez gen *P53*, może odgrywać kluczową rolę w podejmowaniu przez komórkę wyboru pomiędzy kontynuacją lub zatrzymaniem cyklu komórkowego [134].

Utrata funkcji przez zmutowany gen *RB* może indukować samobójczą śmierć komórki [161]. Według niektórych autorów, indukcja apoptozy przez uszkodzony gen *RB* odbywa się niezależnie od tego, czy gen *P53* jest czynny, czy uszkodzony [161]. Jakkolwiek, w komórkach siatkówki transgenicznych myszy, które utraciły funkcjonalny gen *RB*, apoptoza była aktywowana, natomiast w tych samych komórkach przy równoczesnej inaktywacji genu *P53* dochodziło do zahamowania apoptozy i rozwoju siatkówczaka [75, 142].

Kliniczne znaczenie zaburzeń funkcji genu *RB* w NDKRP pozostaje nierozstrzygnięte [4, 83, 154, 157, 164]. Dodatkowo, nie ustalono jednoznacznie korelacji pomiędzy współwystępowaniem białek pRb i p53 w komórkach NDKRP [52, 72, 94, 102, 111, 125, 130, 189, 191], natomiast związek pomiędzy ekspresją p53/pRb a apoptozą nie był dotychczas badany w NDKRP.

## 1.8. Białko mdm2

Gen *MDM2* (*MDM2*- mouse double minute; *HMD2* – human double minute) zlokalizowany u człowieka na chromosomie 12q13-14 jest protoonkogenem. Jego pronowotworowy wpływ realizowany jest głównie poprzez zwiększone wytwarzanie kodowanego przez niego białka. Do nagromadzenia się białka mdm2 może dojść na drodze trzech zasadniczych mechanizmów: amplifikacji genu *MDM2*, jego zwiększonej transkrypcji (wzrostu *MDM2*mRNA) oraz zwiększonej translacji [185].

Amplifikację genu *MDM2* i zwiększoną ilość jego białkowego produktu stwierdzono w wielu nowotworach, m. in. w mięsakach tkanek miękkich [139], mięsakach kości [99], glejakach wielopostaciowych [153] i raku piersi [113]. W przypadku NDKRP doniesienia oceniające częstość amplifikacji genu *MDM2* są nieliczne [33, 70, 114]. Dotychczasowy stan wiedzy nie pozwala na jednoznaczne określenie wartości rokowniczej tego zjawiska u chorych na NDKRP. Wydaje się jednak, że amplifikacja genu *MDM2* może wiązać się z gorszym rokowaniem w tej grupie chorych [33].

Mdm2 jest onkoproteina o masie cząsteczkowej 90 kDa, odgrywającą zasadniczą rolę w procesie regulacji białka p53. W „zdrowych” komórkach białko mdm2 związane jest z białkiem p53, tworząc z nim „nieczynny” kompleks [104]. Oba białka w warunkach fizjologicznych występują w bardzo małych ilościach, i nie wpływają zasadniczo na przebieg cyklu komórkowego [147, 196]. W przypadku „braku zapotrzebowania” na białko p53 kompleks mdm2-p53 ulega degradacji. W sytuacji „stresu komórkowego” kompleks mdm2-p53 ulega rozpadowi, uwalniając aktywne białko p53, które uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego [47].

Gdy „zdrowa” komórka znajduje się w sytuacji „stresu”, a jej uszkodzenie nie jest duże i jest odwracalne, zwiększona ilość białka p53 powoduje z jednej

strony pobudzenie aktywności białek uczestniczących w ujemnej regulacji cyklu komórkowego (np. p21<sup>WAF1/CIP1</sup>), z drugiej - aktywację genu *MDM2* i powstawanie zwiększonej ilości białka mdm2. Białka regulatorowe powodują zatrzymanie cyklu komórkowego, co umożliwia naprawę nici DNA [63, 147]. Równocześnie, białko mdm2 w pętli sprzężenia zwrotnego hamuje czynność i reguluje ilość białka p53, prowadząc do powrotu komórki do cyklu podziałowego (ryc. 3) [47, 63, 128, 129, 147, 196]. Gdy uszkodzenie komórki jest nieodwracalne, gen *P53*, przy udziale białka bax kieruje ją na drogę samobójczej śmierci – apoptozy. W tej sytuacji komórka wymyka się z pętli sprzężenia zwrotnego p53-mdm2 i nawet wysoki wzrost stężenia białka mdm2 nie jest w stanie utrzymać jej w cyklu komórkowym [63, 196].

Zmutowane białko p53 nie posiada zdolności aktywacji białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, przez co traci funkcję białka supresorowego. Według niektórych autorów *mt* p53 traci również możliwość aktywacji genu *MDM2*, według innych natomiast nadal pobudza powstawanie białka mdm2, co powoduje przekazywanie uszkodzeń komórkom potomnym i może przyczyniać się do powstawania komórek nowotworowych [196]. Dodatkowo, zmutowane białko p53 może pobudzać proliferację komórkową poprzez aktywację transkrypcji białka PCNA [131]. Zjawisko to stanowi kolejną możliwość uczestniczenia *mt* p53 w procesie onkogenezy. Z drugiej strony, białko mdm2 posiada zdolność wiązania zarówno „dzikiej”, jak i zmutowanej formy białka p53 [110, 128, 129].

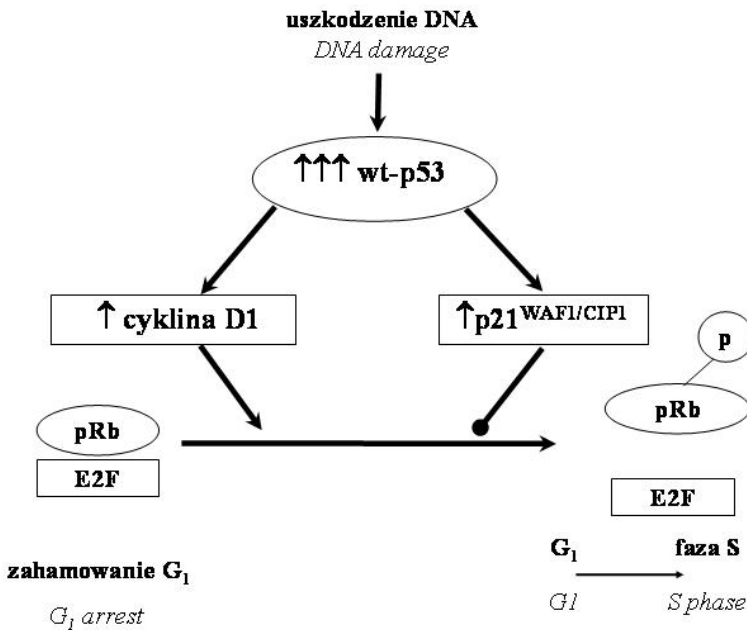
Wielu autorów wysuwa hipotezę o „współgrze” fenotypów (*the gain of function*) pomiędzy białkami mdm2 i p53. Identyfikacja interakcji pomiędzy białkiem mdm2 a pRb, ustaliła ścisły związek pomiędzy dwoma najlepiej poznanyymi genami supresorowymi *RB* oraz *P53* [187]. Badania potrójnego kompleksu białkowego pRb-mdm2-p53 potwierdziły, że oba geny supresorowe uczestniczą w regulacji apoptozy, indukowanej przez gen *P53* [194]. Białko pRb hamując białko mdm2, powoduje zwiększenie ilości białka p53 w komórce i przez to może powodować indukcję apoptozy [76, 194].

Niewiele wiadomo na temat oceny współwystępowania białka mdm2, p53 oraz pRb w komórkach NDKRP. W piśmiennictwie światowym prace na temat łącznej analizy apoptozy oraz białek p53, mdm2 i pRb w komórkach nowotworowych są nieliczne [35]. Rokownicze znaczenie występowania białka mdm2 w komórkach NDKRP, rozpatrywanego pojedynczo lub łącznie z białkiem p53 i pRb, pozostaje kwestią nierozstrzygniętą.

## 1.9. Białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

Gen *WAF1/CIP1* (*WAF1* – *wild-type p53-activated fragment 1*; *CIP1* – *cdk interacting protein 1*) zlokalizowany na chromosomie 6p21.2, koduje białko o masie cząsteczkowej 21 kDa. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> indukowane jest przez „dziką” formę białka p53 i uczestniczy w zahamowaniu cyklu komórkowego pomiędzy fazami

G<sub>1</sub>/S (rycina 5) [39]. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> inaktywując kinazy zależne od cyklin (cdk), powoduje zatrzymanie fosforylacji białka pRb [27]. Białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> zaangażowane jest w regulację naprawy DNA, natomiast poprzez wpływ na białko PCNA, blokuje replikację DNA [105]. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> uczestniczy dodatkowo w procesie regulacji różnicowania komórek [109] oraz w zahamowaniu apoptozy [148, 155]. Ze względu na zaangażowanie w zahamowanie apoptozy gen *WAF1/CIP1* może prawdopodobnie odgrywać rolę, zarówno genu supresorowego, jak i protoonkogenu [143, 155].



Ryc. 5. Rola białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 w regulacji cyklu komórkowego.  
Fig. 5. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 role in cell cycle regulation.

Po uszkodzeniu DNA, p53-zależna indukcja białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego [39]. W komórkach, które utraciły „dziką” formę białka p53 lub zawierają jego zmutowaną postać, ilość białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest bardzo niska albo jest ono całkowicie nieobecne. Brak białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, przy równoczesnym braku funkcjonalnego białka p53 może spowodować przejście komórki do fazy S, bez zatrzymania w fazie G<sub>1</sub>, pomimo uszkodzenia nici DNA. W konsekwencji może dojść do niestabilności genetycznej komórki oraz indukcji onkogenezy [118]. Z drugiej strony, białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> może w różnych sytuacjach działać niezależnie od p53 [123], np. podczas fizjologicznego rozwoju tkanek czy różnicowania komórek [109].

Kliniczne znaczenie występowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach NDKRP pozostaje tematem kontrowersji [91, 157, 163, 164]. Dodatkowo, niewiele jest prac dotyczących oceny współwystępowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> z pozostałymi białkami zaangażowanymi w regulację cyklu komórkowego (m.in. p53, pRb, mdm2, PCNA) oraz na temat łącznej analizy występowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i procesu apoptozy.

## 1.10. Cyklina D1

Gen *CCND1* (*cyclin D1*) zlokalizowany na chromosomie 11q13, jest proto-onkogenem kodującym cyklinę D1, białko o masie cząsteczkowej 45 kD. Cyklina D1 należy do rodziny cyklin G1 zaangażowanych w regulację fazy G<sub>1</sub>/S cyklu komórkowego (ryc. 5) [3]. Cyklina D1 pobudza proliferację komórkową poprzez tworzenie kompleksów z zależnymi od cyklin kinazami cdk4 i cdk6 oraz fosforylacją białka pRb [160]. W badaniach *in vivo* oraz *in vitro* wykazano, że cyklina D1 wiąże się z białkiem pRb [159]. Jej nagromadzenie występujące w komórkach z obecnością białka pRb, może gwałtownie pobudzać jego fosforylację oraz powodować skrócenie fazy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego. Z drugiej strony, brak cykliny D1 prowadzi do wydłużenia fazy G<sub>1</sub> poprzez ograniczenie fosforylacji białka pRb. Można zatem uznać, że rola cykliny D1 w regulacji cyklu komórkowego ściśle zależy od białka pRb [159].

Niektórzy autorzy uważają, że ocena występowania cykliny D1 w komórce może być pomocna w odróżnieniu czy znajduje się ona w fazie G<sub>0</sub> czy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego [158]. Cyklina ta jest zaangażowana w regulację prawidłowo przebiegającego cyklu komórkowego, natomiast poprzez amplifikację genu *CCND1* i/lub nadekspresję cykliny D1, może ona uczestniczyć w transformacji nowotworowej [25].

Zwiększona ekspresja cykliny D1, obserwowana w wielu typach nowotworów, może wynikać z amplifikacji genu *CCND1* kodującego to białko [87] oraz ze zwiększenia jej stabilności (wynikającej z klonalnej rearanzacji genu *CCND1*) [197]. Zwiększoną ekspresję cykliny D1 i/lub amplifikację genu *CCND1* stwierdzono m.in. w nowotworach przełyku, nowotworach okolicy głowy i szyi, raku piersi oraz pierwotnym raku wątroby [3, 87, 133, 136]. W NDKRP stwierdzono zależność pomiędzy amplifikacją genu kodującego cyklinę D1, a jej nagromadzeniem się w komórkach nowotworowych [116]. Dodatkowo, amplifikacja genu *CCND1* wiązała się z gorszym rokowaniem w grupie chorych z NDKRP [116]. Wydaje się, że nadekspresja cykliny D1 może również mieć udział w patogenezie NDKRP [11, 17, 98, 119].

Kliniczne znaczenie zaburzeń ekspresji cykliny D1 w komórkach NDKRP pozostaje nierozstrzygnięte. W części badań nadekspresja cykliny D1 wiązała się z gorszym [136], w innych - z lepszym rokowaniem [11] lub nie miała znaczenia rokowniczego [13, 116, 157]. Ponadto brak jest prac na temat łącznej oceny



ekspresji cykliny D1 oraz innych białek uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy w komórkach NDKRP.

## 1.11. Podsumowanie

Zaburzenia funkcji genów supresorowych (*P53*, *RB*, *WAF1/CIP1*) oraz aktywacja protoonkogenów (*MDM2*, *CCND1*), poprzez deregulację cyklu komórkowego oraz procesu apoptozy, może prowadzić do rozwoju nowotworu złośliwego [85, 167]. Białko p53 aktywuje apoptozę w odpowiedzi na uszkodzenie komórki [104]. Aktywność proapoptotyczna białka p53 może zostać inaktywowana przez białko mdm2 [127, 147, 149]. Interakcja białek mdm2-pRb (białko pRb hamuje białko mdm2) wskazuje na ścisłą zależność pomiędzy dwoma genami supresorowymi *P53* i *RB* w regulacji apoptozy indukowanej przez białko p53 [76, 194]. Część autorów sugeruje, że gen *RB* (poza rolą proapoptotyczną) może pełnić również funkcję genu antyapoptotycznego [161]. Z drugiej strony p53-zależne pobudzenie białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub> [39, 105], natomiast nie pobudza apoptozy [39]. W badaniach *in vitro* wykazano, że białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> hamuje apoptozę [155]. Zaburzenia dotyczące każdego z powyższych białek wpływają niezależnie na proces apoptozy, upośledzając w ten sposób naturalne mechanizmy ochronne organizmu.

W dostępnym piśmiennictwie światowym brak jest badań oceniających kompleksowo zaburzenia regulacji cyklu komórkowego oraz procesu apoptozy w komórkach NDKRP. Większość prac dotyczy oceny jedynie fragmentu złożonego procesu i obejmuje nieliczny materiał kliniczny. W konsekwencji wyniki tych prac są trudne do porównania. Z tego względu podjęcie badań kompleksowo obejmujących problem zaburzeń ekspresji białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego oraz procesu apoptozy w licznej i jednorodnej grupie chorych z NDKRP wydaje się uzasadnione. Według wiedzy autorki rozprawy, jest to jedna z pierwszych analiz obejmujących to zagadnienie kompleksowo na stosunkowo dużym materiale klinicznym. Praca ta stanowi uzupełnienie i logiczną kontynuację wcześniejszych badań autorki [30-35], stwarzając szansę poszerzenia wiedzy na temat biologii NDKRP oraz rozstrzygnięcia istotnego zagadnienia naukowego.

## 2. CELE PODJĘTYCH BADAŃ

Celem podjętych badań była:

1. ocena wskaźnika apoptotycznego, wskaźnika ekspresji PCNA oraz występowania białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca,
2. ocena zależności pomiędzy wskaźnikiem apoptotycznym, wskaźnikiem ekspresji PCNA oraz obecnością białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca,
3. określenie zależności pomiędzy analizowanymi parametrami (wskaźnikiem apoptotycznym, wskaźnikiem ekspresji PCNA, obecnością białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1) a cechami klinicznymi i demograficznymi badanej grupy chorych,
4. określenie wartości rokowniczej wskaźnika apoptotycznego, wskaźnika ekspresji PCNA oraz obecności białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1 (analizowanych pojedynczo oraz łącznie) u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca.

### 3. MATERIAŁ

Materiał do badań stanowiły próbki tkanek NDKRP uzyskane podczas resekcji mięszu płucnego od 203 chorych, operowanych w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej, Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1996-2005. W grupie tej w 170 przypadkach oceniono wskaźnik apoptotyczny, w 203 obecność białka p53 i pRb, w 125 obecność białka PCNA, w 197 białka mdm2, natomiast w 194 przypadkach obecność białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1. Z uwagi na fakt, że niniejsza rozprawa stanowi kontynuację kilku badań oraz ze względu na ograniczoną dostępność materiału biologicznego, wymienione grupy w części przypadków stanowiły odrębne populacje chorych. W 115 przypadkach dokonano łącznej oceny wszystkich badanych parametrów. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy AMG.

Ocenę wyżej wymienionych parametrów przeprowadzono w tkankach nowotworowych utrwalonych w formalinie, przechowywanych w postaci bloczków parafinowych. Żaden z operowanych chorych nie otrzymał leczenia przeciwnowotworowego przed zabiegiem operacyjnym. Po operacji 53 chorych (26%) leczonych było radioterapią, w tym 23 (11%) otrzymało radioterapię uzupełniającą, natomiast 30 chorych (15%) leczonych było z powodu nawrotu choroby. Baza danych obejmowała następujące informacje: imię i nazwisko chorego, datę urodzenia, płeć, wiek w chwili leczenia operacyjnego, obecność lub brak nałogu palenia papierosów, rozpoznanie histopatologiczne nowotworu, stopień jego zróżnicowania, ocenę stopnia zaawansowania klinicznego (w skali pTNM), datę i doszczętność zabiegu operacyjnego, czas do nawrotu choroby oraz rodzaj wznowy, datę ostatniej obserwacji lub datę zgonu, wartość wskaźnika apoptotycznego, wskaźnika ekspresji PCNA oraz ocenę występowania białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1.

Badana grupa obejmowała 203 chorych, 155 mężczyzn (76%) oraz 48 kobiet (24%). Średni wiek chorych w momencie zabiegu operacyjnego wynosił 60 lat (zakres od 39 do 78 lat). U 20 chorych po zabiegu operacyjnym stwierdzono cechę T1, u 128 cechę T2, u 48 cechę T3, zaś u 7 cechę T4. U 112 chorych stwierdzono cechę N0, u 36 cechę N1, u 55 zaś cechę N2. W chwili zabiegu u dwóch chorych obecne były przerzuty odległe (cecha M1). Po badaniu mikroskopowym guza pierwotnego oraz okolicznych węzłów chłonnych, stopień zaawansowania klinicznego (pTNM) określono na podstawie obecnych kryteriów UICC (*Union Internationale Contre le Cancer – International Union Against Cancer*) [166, 168], stwierdzając stopień I, II, IIIA i IIIB/IV odpowiednio u 89, 23, 82 i 9 badanych chorych z NDKRP. Doszczętność mikroskopową (R0) stwierdzono u 180 chorych, niedoszczętność mikroskopową (R1) u 15 chorych i niedoszczętność makroskopową (R2) u 8 chorych (tabela 1).

Badanie histopatologiczne skrawków barwionych hematoksyliną-eozyną przeprowadziło czterech niezależnych patologów (dr med. Grażyna Kobierska oraz dr med. Andrzej Karmoliński – Katedra i Zakład Patomorfologii Akademii Medycznej w Gdańsku, dr med. Klaus Wiedorn – Institut für Pathologie, Katharinenhospital, Stuttgart, Niemcy, dr med. Carsten Boltze – Institut für Pathologie, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg, Niemcy). W przypadku rozbieżności, ostateczne rozpoznanie ustalane było podczas konsultacji pomiędzy patologami.

Rozpoznano 119 przypadków raka płaskonabłonkowego, 52 przypadki gruczolakoraka, 16 przypadków raka wielkokomórkowego oraz 16 przypadków raka o mieszanym utkaniu gruczolowo-płaskonabłonkowym. Cechę G1 stwierdzono u 31 chorych, G2 u 115 chorych oraz G3 u 57 chorych.

W odniesieniu do wszystkich 203 chorych (100%) udało się ustalić informacje na temat nałogu palenia papierosów. W grupie tej 114 osób paliło papierosy w momencie zabiegu operacyjnego, spośród których 37 zaprzestało palenia w okresie dalszej obserwacji; 80 chorych zaprzestało palenia wcześniej (co najmniej pół roku przed zabiegiem operacyjnym), a 9 osób nigdy nie paliło papierosów (tabela 1).

U 203 chorych (100%) oceniono przebieg kliniczny nowotworu. Do chwili zamknięcia bazy danych 78 pacjentów żyło bez cech nawrotu choroby, u 119 wystąpił nawrót nowotworu, w tym u 29 pod postacią wznowy miejscowej, a u 82 przerzutów odległych, natomiast u 8 chorych wystąpiły równocześnie obie postaci nawrotu. 6 chorych zginęło w okresie krótszym niż miesiąc po zabiegu operacyjnym.

Podczas ostatniej analizy (czerwiec-lipiec 2005 roku) spośród ogółu 203 chorych, u których prześledzono przebieg choroby nowotworowej, u 59 żyjących osób nie stwierdzono nawrotu choroby nowotworowej (29%). Mediana okresu wolnego od nawrotu choroby dla całej grupy wynosiła 24 miesiące, a prawdopodobieństwo rocznego i pięcioletniego przeżycia bez nawrotu - odpowiednio 60% i 32%. W czerwcu 2005 roku, spośród ogółu 203 chorych żyło 65 pacjentów (32%). Mediana okresu przeżycia dla całej grupy wynosiła 33 miesiące, a prawdopodobieństwo rocznego i pięcioletniego przeżycia - odpowiednio 65% i 38%.

Tab. 1. Charakterystyka kliniczna badanej grupy 203 chorych na NDKRP.

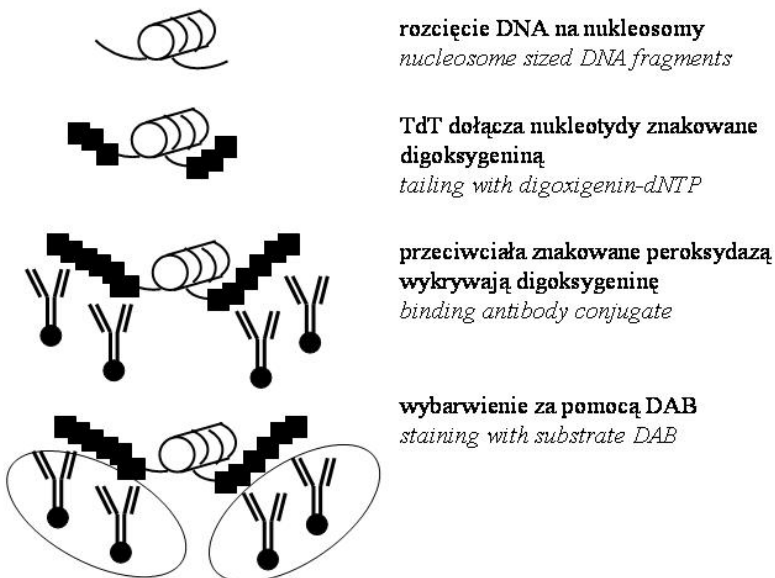
Tab. 1. *Clinical characteristics of 203 NSCLC patients.*

Cecha <i>Characteristics</i>	Liczba chorych (%) <i>No of patients (%)</i>
Wiek / <i>Age</i> ≤ 60 lat >60 lat	92 (45%) 111 (55%)
Płeć / <i>Sex</i> mężczyźni / <i>men</i> kobiety / <i>women</i>	155 (76%) 48 (24%)
T 1 2 3 4	20 (10%) 128 (63%) 48 (24%) 7 (3%)
N 0 1 2	112 (55%) 36 (18%) 55 (27%)
Stopień zaawansowania klinicznego / <i>Staging</i> I II IIIA IIIB + IV	89 (44%) 23 (11%) 82 (41%) 9 (4%)
Doszczędność zabiegu operacyjnego <i>Operation completeness</i> R0 R1 R2	180 (89%) 15 (7%) 8 (4%)
Postać histologiczna guza / <i>Histology</i> Rak płaskonabłonkowy / <i>Squamous</i> Gruczołakorak / <i>Adenous</i> Rak wielkokomórkowy / <i>Large cell</i> Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy / <i>Adeno-squamous</i>	119 (58%) 52 (26%) 16 (8%) 16 (8%)
Stopień zróżnicowania guza / <i>Grading</i> G1 G2 G3	31 (15%) 115 (57%) 57 (28%)
Nalóg palenia papierosów / <i>Smoking</i> Niepalący / <i>Never smokers</i> Palacze / <i>Smokers</i> Byli palacze / <i>Previous smokers</i>	9 (5%) 114 (56%) 80 (39%)

## 4. METODY

### 4.1. Ocena apoptozy

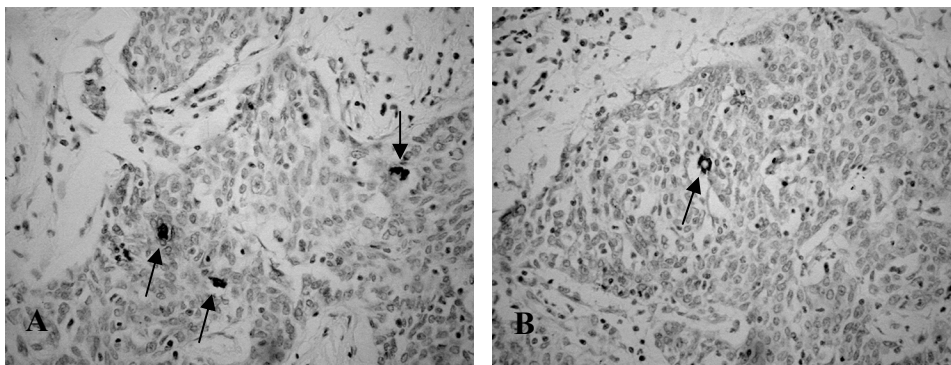
Oznaczenie apoptozy autorka pracy wykonała osobiście podczas stażu naukowego w Instytucie Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Kuopio, Finlandia (kierownik Instytutu Prof. Seppo Ylä-Herttua), za pomocą reakcji TUNEL (*TdT-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin nick end-labeling*). Reakcja ta pozwala na wykrycie małych fragmentów DNA, które mają wolne końce 3'-OH, poprzez przyłączenie do nich znakowanych nukleotydów. Reakcja katalizowana jest przez enzym nukleotydylotransferazę DNA (*TdT-terminal deoxynucleotidyl transferase*), a nukleotydy znakowane są za pomocą digoksygeniny. Zasadę wykrywania apoptozy metodą TUNEL przedstawiono na rycinie 6. Procedura obejmuje inkubację skrawka tkanki nowotworowej z roztworem enzymu w buforze zawierającym znakowane digoksygeniną nukleotydy. W następnym etapie stosuje się przeciwciała znakowane peroksydazą skierowane przeciw digoksygeninie. Przeciwciała to jest wykrywane za pomocą substratu (DAB - 3,3'-diaminobenzzydina). Ostatnim etapem reakcji jest kontrastowanie preparatu zielenią metylową. Jądra komórek apoptotycznych z powodu dużej liczby wolnych końców 3'-OH DNA barwią się na brązowo, natomiast jądra komórek niezmiennych barwią się na kolor zielony.



Ryc. 6. Reakcja TUNEL.

Fig. 6. TUNEL staining.

Do oznaczenia komórek apoptotycznych użyto komercyjnie dostępnego zestawu *ApoTag®Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* (Nr katalogowy S 7101, firmy Intergen Company, Oxford, Anglia). Oznaczenie zostało wykonane ściśle według protokołu zalecanego przez producenta (rycina 7 A, B).



Ryc. 7. Niedrobnokomórkowy rak płuca. A, B – dodatnie barwienie za pomocą reakcji TUNEL

Fig. 7. *Non-small cell lung cancer. A, B – positive TUNEL staining.*

Fragmenty guzów dostarczono do laboratorium w postaci bloczków parafinowych. Materiał skrajany był na preparaty o grubości od 3 do 5  $\mu\text{m}$ , umieszczany na szkiełkach podstawowych pokrytych 2% APTS (*3-aminopropyltriethoxy-silane*), a następnie suszony przez całą noc w temperaturze 50 °C. Preparaty zostały odparafinowane podczas 3-krotnego zanurzenia w ksylenie, nawodnione w kolejnych stężeniach alkoholu etylowego oraz wypłukane w roztworze PBS (roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami). Następnie na skrawki nałożono proteinazę K (stężenie 20  $\mu\text{g/ml}$ ) i inkubowano preparaty w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Po 4-krotnym płukaniu w roztworze PBS (4 x 2 minuty) zablokowano endogenną peroksydazę poprzez zanurzenie preparatów na 5 minut w 2%  $\text{H}_2\text{O}_2$  w temperaturze pokojowej. Kolejno po 2-krotnym płukaniu w roztworze PBS (2 x 5 minut) nałożono bufor preinkubacyjny na 15 – 30 sek. Następnie na skrawki nałożono płyn inkubacyjny zawierający nukleotydylotransferazę DNA i roztwór nukleotydów (w proporcji: TdT 32  $\mu\text{l}$  oraz 76  $\mu\text{l}$  buforu ze znakowanymi nukleotydami) i inkubowano w komorze wilgotnej w temperaturze 37 °C przez 60 minut. Po inkubacji, skrawki zanurzano w roztworze buforu płuczącego (rozcieńczonego wodą destylowaną w stosunku 1:35) i inkubowano przez kolejne 30 minut w temperaturze pokojowej. Preparaty płukano 3-krotnie w roztworze PBS (3 x 5 minut). Następnie na skrawki nakropiono przeciwciała przeciwko digoxigeninie znakowane peroksydazą i inkubowano w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po inkubacji, preparaty płukano 3-krotnie w roztworze PBS (3 x 5 minut).

Celem uzyskania reakcji barwnej na skrawki nałożono świeżo przygotowany substrat (DAB - 3,3'-diaminobenzzydina) i inkubowano w temperaturze pokojowej. Długość czasu inkubacji z substratem uzależniona była od intensywności barwienia w mikroskopie świetlnym, którą oceniano każdorazowo podczas wykonywania badań. Średni czas inkubacji, przy którym uzyskiwano zadawalające barwienia wynosił 3 - 6 minut. Kolejno skrawki płukano 3-krotnie w wodzie destylowanej (3 x 1 minuta) a podczas ostatniego płukania skrawki pozostawiono w wodzie destylowanej na 5 minut. Barwienie kontrastowe podłoża uzyskano poprzez nałożenie na skrawki 0,5% roztworu zieleni metylowej na 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty płukano kolejno w wodzie destylowanej (3 x 30 sekund) oraz 100% butanolu (3 x 30 sekund). Na koniec preparaty odwodniono poprzez 3-krotne zanurzenie w ksylenie (3 x 2 minuty), zakrapiano preparatem *Aquatex* (firmy Merck, Sp. z o.o) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Po osuszeniu preparatów barwienie oceniano w mikroskopie świetlnym. Jako dodatknej kontroli używano skrawków dołączonych przez producenta zestawu do oznaczenia apoptozy, w których stwierdzono dodatnią reakcję TUNEL. Dla ujemnej kontroli używano skrawków, które poddano powyższej procedurze z ominięciem dodania TdT do reakcji. Kontrole ujemne i dodatnie wykonywano przy każdej partii kolejno oznaczanych preparatów. Wyniki kontroli były zadowalające.

Występowanie komórek apoptotycznych oceniali trzech niezależnych obserwatorów – dr med. Andrzej Karmoliński z Katedry i Zakładu Patomorfologii AMG, dr med. Thomas Wirth z Instytutu Virtanena z Kuopio oraz autorka niniejszej rozprawy. W przypadku każdego chorego, analizie poddano skrawek guza wybarwiony za pomocą reakcji TUNEL oraz skrawek wybarwiony hematoksyliną-eozyną. Łączna analiza obu skrawków tego samego fragmentu guza umożliwiła wykluczenie miejsc objętych martwicą. Ilość komórek apoptotycznych oceniano w 10 polach obejmujących łącznie około 1000 komórek nowotworowych. Liczbę komórek apoptotycznych z każdego z 10 pól widzenia sumowano, uzyskując w ten sposób wartość wskaźnika apoptotycznego – WA (*AI* – *Apoptotic Index*). W przypadku rozbieżności w wartości wskaźnika apoptotycznego pomiędzy obserwatorami, wyliczano średnią wartość uzyskanych wyników.

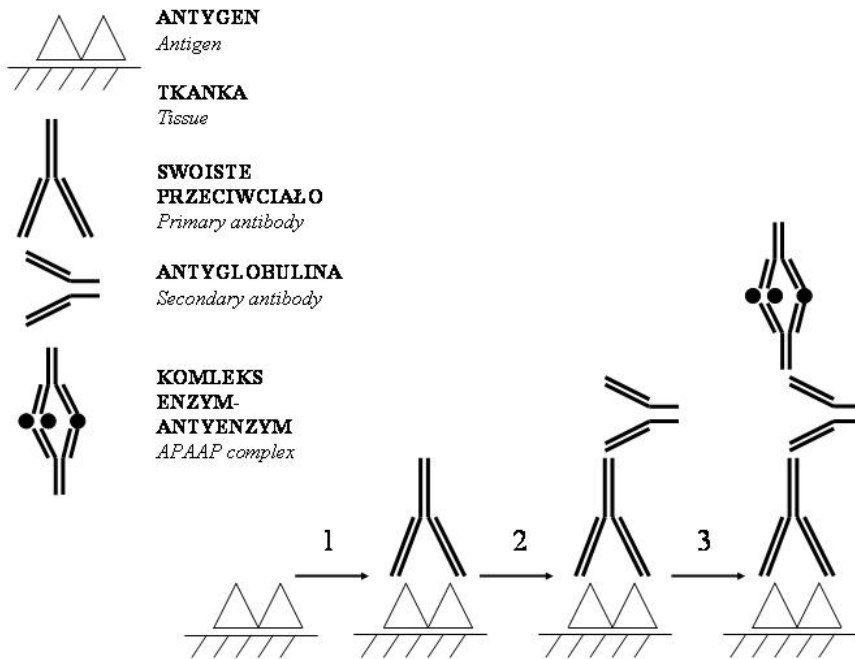
#### **4.2. Ocena występowania białek p53, PCNA, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1**

Oznaczenia występowania białek p53, PCNA, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 autorka rozprawy wykonała osobiście w Instytucie Patomorfologii w Katharinenhospital w Stuttgarcie, Niemcy (białko p53, pRb, mdm2) oraz w Instytucie Patomorfologii Uniwersytetu Otto-von-Guericke w Magdeburgu, Niemcy (białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, cyklina D1 oraz białko PCNA), początkowo w ramach Stypendium Zagranicznego dla Młodych Naukowców im. Stefana Batorego,



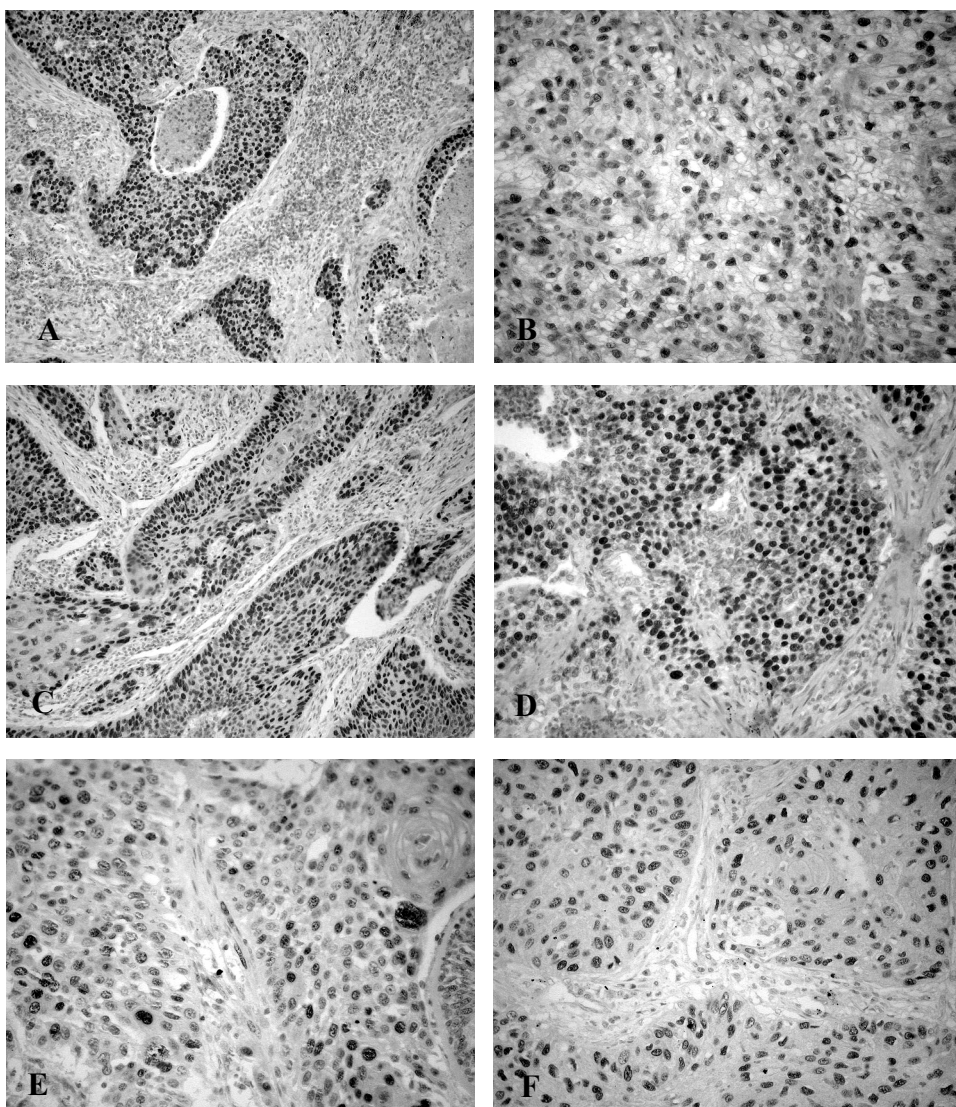
a następnie w ramach kontynuacji współpracy. Występowanie wszystkich analizowanych białek oceniano immunohistochemicznie.

Reakcja ta polega na wykrywaniu i lokalizacji składników komórek (na zasadzie antygen-przeciwciała) oraz wizualizacji zachodzącej reakcji (reakcja z kompleksem enzym-antyenzym). W reakcji immunohistochemicznej antygeny wykrywane są za pomocą nieznakowanych, swoistych przeciwciał monoklonalnych, które wiążą się z określonym fragmentem antygeny. Następnie dodaje się nieznakowaną antyglobulinę oraz kompleks enzym znacznikowy-przeciwciało przeciwko temu enzymowi (antyenzym). Antyglobulina mająca dwa wiążące fragmenty Fab spełnia rolę mostka łączącego przeciwciało pierwotne z kompleksem enzym-antyenzym. Zasadę tej techniki przedstawia rycina 8.



Ryc. 8. Barwienie immunohistochemiczne.

Fig. 8. Immunohistochemistry.



Ryc. 9. Niedrobnokomórkowy rak płuca. A – dodatnie barwienie dla p53, B – dodatnie barwienie dla PCNA, C – dodatnie barwienie dla pRb, D – dodatnie barwienie dla mdm2, E – dodatnie barwienie dla p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, F – dodatnie barwienie dla cykliny D1.

Fig. 9. Non-small cell lung cancer. A – positive p53 protein staining, B – positive PCNA protein staining, C – positive pRb protein staining, D – positive mdm2 protein staining, E – positive p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein staining, F – positive cyclin D1 staining.

Obecność białek p53, PCNA, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 badano przy użyciu odpowiednich przeciwciał monoklonalnych PAb1801, PC 10, LM 95.1, IF2, SX 118 oraz DCS-6 (rycina 9). Przeciwciała przeciwko białku p53, mdm2, pRb zakupiono w firmie Oncogene Science, Merck Sp. z o. o., Warszawa, natomiast przeciwko PCNA, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cyklinie D1 w firmie DakoCytomation Sp.z o.o., Gdynia. Rozcieńczenie przeciwciała monoklonalnego użytego podczas reakcji, przy których uzyskano najlepsze barwienia wynosiły dla białka p53 i PCNA 1:100, dla białka pRb 1:300, natomiast dla białka mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 1:50. Wszystkie skrawki poddawane były tej samej procedurze. Podczas każdego barwienia wykonywano odpowiednią dodatnią i ujemną kontrolę. Jednorazowo oznaczano 20 preparatów – 2 kontrole oraz 18 kolejnych guzów płuca. Kontrolę dodatnią stanowiły skrawki raka piersi, które w poprzednich barwieniach wykazywały dodatnią, jądrową ekspresję badanych białek. Kontrolę ujemną stanowił fragment tego samego guza, który był używany jako kontrola dodatnia, natomiast podczas procedury barwienia omijano dodawanie przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko odpowiedniemu białku. Barwienia w preparatach kontrolnych podczas wszystkich oznaczeń były zadowalające. Jako kompleksu enzym-antyenzym stosowano kompleks fosfataza zasadowa-antyfosfataza (APAAP - *alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase*). Aktywność fosfatazy zasadowej została uwidoczniła poprzez sprzężenie z pochodnymi naftolu. Barwienie kontrastowe podłoża uzyskano za pomocą hematoksyliny. Jądra komórkowe zawierające poszukiwany antygen barwiły się na czerwono, natomiast pozostałe jądra oraz podłoże na niebiesko.

Fragmenty guzów dostarczono do laboratoriów w postaci bloczków parafinowych. Materiał skrajany był na preparaty o grubości od 3 do 5  $\mu\text{m}$ , umieszczany na szkiełkach podstawowych pokrytych 2% APTS (*3-aminopropyltriethoxy-silane*), a następnie suszony przez całą noc w temperaturze 50°C. Preparaty pozbawiano parafiny poprzez kolejne zanurzanie w ksylenie (3 x 5 min) oraz ponownie nawadniano poprzez zanurzanie w kolejnych rozcieńczeniach alkoholu etylowego. Następnie szkiełka przepłukiwano w wodzie destylowanej i umieszczano na 5 minut w roztworze PBS. Kolejnym etapem było umieszczenie preparatów w łaźni wodnej z buforem cytrynianowym podgrzany do temperatury 95°C, gdzie gotowano je przez 40 minut. Następnie wyjmowano z naczynia i studzono przez 20 minut w temperaturze pokojowej po czym umieszczano kolejno w wodzie destylowanej i roztworze PBS. Po takim przygotowaniu preparaty zakraplano na 10 minut roztworem antyglobuliny *Power Block* (firmy DakoCytomation, Sp. z o.o., Gdynia) w rozcieńczeniu 1:10. W tym czasie odpowiednio rozcieńczano przeciwciała przeciwko białkom p53, PCNA, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cyklinie D1. Po 10 minutach, rozcieńczone przeciwciała nakrapiano na skrawki guza i inkubowano przez całą noc w lodówce w temperaturze 4°C. Następnego dnia preparaty przemywano roztworem PBS (przez 5 minut), nakrapiano przeciwmysie, królicze przeciwciała - *rabbit-anti-mouse-antibody*

(firmy DakoCytomation, Sp. z o.o., Gdynia) w rozcieńczeniu 1:50 i inkubowano preparaty przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, preparaty ponownie przepłukiwano roztworem PBS przez 5 minut, zakraplano kompleksem APAAP w rozcieńczeniu 1:300 na 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym przemywano wodą destylowaną. Reakcję barwną uzyskiwano za pomocą roztworu chromogenu - substratów fosfatazy zasadowej (*alkaline phosphatase substrate*), zawierających: *naphthol AS-BI Phosphat Na-Salz* (firmy Sigma-Aldrich, Sp. z o.o., Poznań), *N-N Dimethylformamid* (Merck, Sp. z o.o., Warszawa) i *Levamisol* (Sigma-Aldrich, Sp. z o.o., Poznań). W roztworach tych inkubowano preparaty przez 30 minut w temperaturze pokojowej, pod wyciągiem. Po wyjęciu z roztworu, szkiełka starannie płukano bieżącą wodą, a następnie wodą destylowaną z dodatkiem amoniaku. Celem uzyskania kontrastu w barwieniu, w kolejnym etapie zanurzano preparaty w roztworze hematoksyliny. Na koniec preparat zakraplano preparatem *Aquatex* (Merck, Sp. z o.o., Warszawa) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym.

Ocenę obecności wszystkich badanych białek przeprowadziło trzech niezależnych patomorfologów (dr med. Andrzej Karmoliński – Katedra i Zakład Patomorfologii Akademii Medycznej w Gdańsku, dr med. Klaus Hermann Wiedorn – Instytut Patomorfologii, Katharinenhospital, Stuttgart, Niemcy oraz dr med. Carsten Boltze – Instytut Patomorfologii, Uniwersytetu Otto-von-Guericke, Magdeburg, Niemcy). Ekspresja i intensywność barwienia w odniesieniu do każdego analizowanego białka, w każdej serii 18 preparatów guzów płuca, była porównywana z wykonaną równocześnie dodatnią i ujemną kontrolą.

Obecność białka PCNA wyrażono pod postacią wskaźnika ekspresji PCNA – W PCNA (*PCNA labeling index – PCNA LI*). Wskaźnik ten wyrażał średnią liczbę komórek nowotworowych wykazujących jądrową ekspresję białka PCNA, ocenianą w 10 polach widzenia, obejmujących łącznie co najmniej 1000 komórek nowotworowych. W przypadku rozbieżności pomiędzy obserwatorami do ostatecznej analizy wyliczano średnią wartość W PCNA.

Obecność białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 wyrażano pod postacią odsetka (%) dodatnich komórek nowotworowych w danym preparacie. Ostatecznie wynik barwienia uznano za dodatni, jeżeli jakkolwiek z komórek nowotworowych wykazywała dodatnie barwienie ( $\geq 1\%$ ), zaś ujemny, gdy żadna z badanych komórek nie wykazywała ekspresji badanego białka.

### 4.3. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana przy użyciu programu komputerowego STATISTICA 6.0. Baza danych zawierała następujące informacje: wiek i płeć chorych, obecność lub brak nałogu palenia tytoniu, postać histologiczną guza i stopień jego zróżnicowania, stopień zaawansowania klinicznego choroby (z uwzględnieniem skali pTNM), datę i doszczętność zabiegu operacyjnego, datę

i rodzaj nawrotu choroby, datę ostatniej obserwacji chorego lub datę zgonu, ocenę wskaźnika apoptotycznego, wskaźnika ekspresji białka PCNA oraz obecności białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1.

Analizę jednoczynnikową przeprowadzono przy użyciu testu chi-kwadrat ( $\chi^2$ ). Podczas tej analizy określono zależność pomiędzy wskaźnikiem apoptotycznym, wskaźnikiem ekspresji PCNA oraz występowaniem białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1. Test ten został użyty również do oceny zależności pomiędzy wszystkimi ocenionymi parametrami a cechami klinicznymi chorych. Nałóg palenia papierosów nie został włączony do analizy, ponieważ w badanej grupie jedynie 9 chorych (4%) nigdy nie paliło papierosów.

Czas przeżycia chorych liczono od daty zabiegu operacyjnego do daty ostatniej obserwacji lub daty zgonu. Czas do nawrotu choroby liczono od daty zabiegu operacyjnego do chwili, w której pojawił się nawrót choroby, bądź do daty ostatniej obserwacji, gdy nie doszło do wznowy. Zarówno czas przeżycia jak i czas do nawrotu choroby wyrażano w miesiącach. Krzywe przeżycia sporządzono metodą Kaplana-Meyera i porównano za pomocą testu log-rank. Dodatkowo wykonano analizę wieloczynnikową z zastosowaniem modelu regresji Cox'a. Próg znamienności statystycznej ustalono na poziomie 0.05.

## 5. WYNIKI

### 5.1. Wskaźnik apoptotyczny

Wskaźnik apoptotyczny (WA) został określony w 170 przypadkach NDKRP. Brak jakiegokolwiek komórki apoptotycznej stwierdzono zaledwie w 2 przypadkach (1%). Średnia wartość WA dla pozostałych 168 guzów wynosiła  $12 \pm 10$ . Wartość WA nie miała rozkładu normalnego. Mediana WA wynosiła 8, natomiast dolny i górny kwartył WA wynosił odpowiednio 5 i 14. W zależności od wartości mediany oraz dolnego i górnego kwartyła badana grupa została podzielona na cztery podgrupy: A - z bardzo niskim WA ( $WA < 5$ ), B - z niskim WA ( $5 \leq WA < 8$ ), C - z wysokim WA ( $8 \leq WA < 14$ ) oraz D - z bardzo wysokim WA ( $WA \geq 14$ ). Bardzo niski, niski, wysoki oraz bardzo wysoki WA stwierdzono odpowiednio w 40 (23%), 35 (21%), 52 (31%) oraz 43 przypadkach (25%). Analizę statystyczną wykonano dla różnych punktów odcięcia obejmujących wartość średnią, medianę, dolny i górny kwartył, jakkolwiek różne punkty odcięcia nie miały wpływu na uzyskanie wyników znamiennej statystycznie.

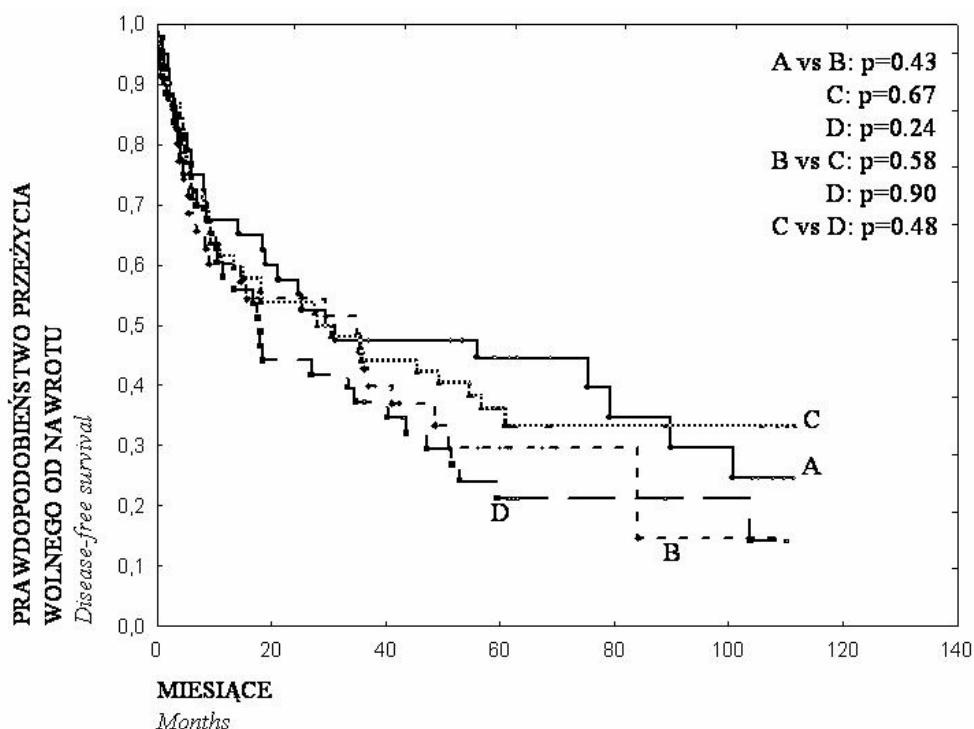
W badanej grupie chorych w analizie  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy WA a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby (z uwzględnieniem skali pTNM), postać histologiczną guza oraz stopień jego zróżnicowania (tabela 2).

Mediana czasu przeżycia do nawrotu choroby dla chorych z bardzo niskim, niskim, wysokim oraz bardzo wysokim WA wynosiła odpowiednio 30, 35, 30 i 19 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby - odpowiednio 45%, 30%, 36% i 21% ( $p=0.69$ , rycina 10).

Tab. 2. Wskaźnik apoptotyczny (WA) w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=170, test  $\chi^2$ ).

Tab. 2. *Apoptotic Index (AI) according to patients clinical characteristics (N=170,  $\chi^2$  analysis).*

	bardzo niski WA <i>very low AI</i>	niski WA <i>low AI</i>	wysoki WA <i>high AI</i>	bardzo wysoki WA <i>very high AI</i>	<i>P</i>
Wiek / <i>Age</i> ≤60 lat >60 lat	17 23	19 16	22 30	21 22	0.84
Płeć / <i>Sex</i> Kobiety / <i>Female</i> Mężczyźni / <i>Male</i>	7 33	6 29	11 41	11 32	0.32
Stopień zaawansowania nowotworu / <i>Stage</i> I II IIIA IIIB + IV	16 7 15 2	21 0 13 1	22 5 23 2	18 8 15 2	0.99
Typ histologiczny <i>Histology</i> Rak płaskonabłonkowy <i>Squamous</i> Gruczołakorak <i>Adenous</i> Rak wielkokomórkowy <i>Large cell</i> Rak gruczołowo- płaskonabłonkowy <i>Adeno-squamous</i>	29 9 1 1	20 8 3 4	29 15 4 4	23 11 6 3	0.11
Stopień zróżnicowania nowotworu / <i>Grade</i> G1 G2 G3	9 21 10	7 19 9	6 33 13	5 24 14	0.16



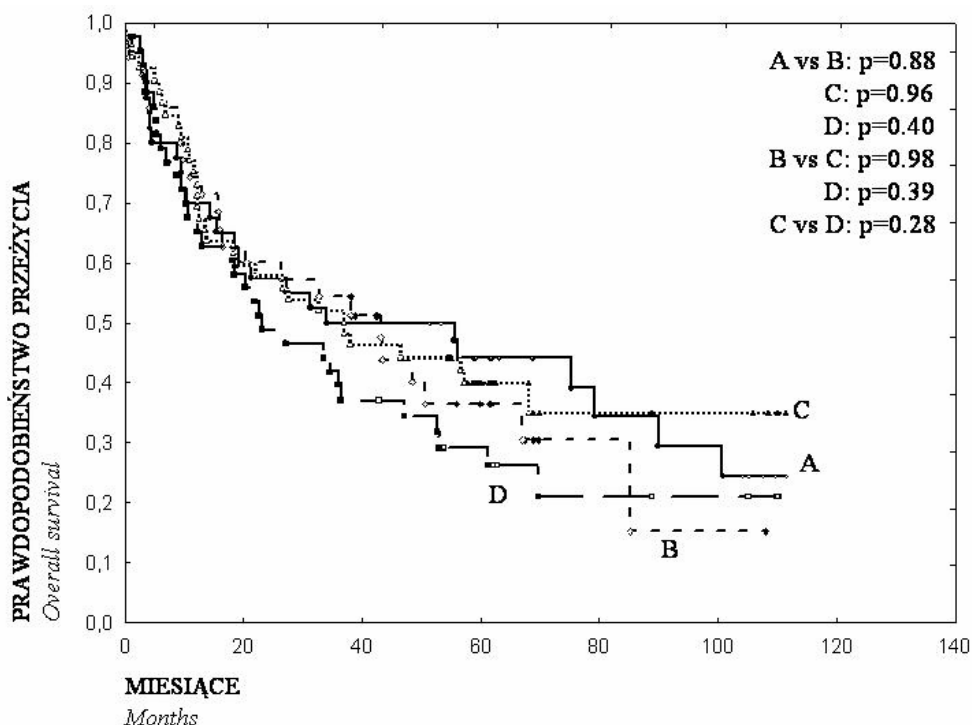
Ryc.10. Krzywa przeżycia do nawrotu Kaplana-Meier'a u chorych z bardzo niskim (grupa A, N=40), niskim (grupa B, N=35), wysokim (grupa C, N=52) oraz bardzo wysokim wskaźnikiem apoptotycznym (grupa D, N=43) ( $p=0.69$ ).

Fig.10. Kaplan-Meier disease-free survival curve for patients with very low (group A, N=40), low (group B, N=35), high (group C, N=52) and very high apoptotic index (group D, N=43) ( $p=0.69$ ).

Mediana czasu przeżycia dla chorych z bardzo niskim, niskim, wysokim oraz bardzo wysokim WA wynosiła odpowiednio 33, 42, 36 i 24 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia – odpowiednio 45%, 37%, 40% i 29% ( $p=0.71$ , rycina 11).

Nie stwierdzono różnicy w czasie przeżycia do nawrotu choroby oraz całkowitym czasie przeżycia pomiędzy poszczególnymi czterema podgrupami chorych. Nie stwierdzono również różnic, gdy przy podziale chorych na podgrupy zastosowano inne punkty odcięcia.





Ryc.11. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer'a u chorych z bardzo niskim (grupa A, N=40), niskim (grupa B, N=35), wysokim (grupa C, N=52) oraz bardzo wysokim wskaźnikiem apoptotycznym (grupa D, N=43) ( $p=0.71$ ).

*Fig.11. Kaplan-Meier overall survival curve for patients with very low (group A, N=40), low (group B, N=35), high (group C, N=52) and very high apoptotic index (group D, 43) ( $p=0.71$ ).*

W analizie wieloczynnikowej, spośród wszystkich analizowanych cech (z oceną WA włącznie), jedynie stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz stopień zróżnicowania guza nowotworowego miały znaczenie rokownicze w odniesieniu do czasu do nawrotu choroby jak i całkowitego czasu przeżycia (tabela 3).

Tab. 3. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz WA na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=170).

Tab. 3. *Multivariate Cox proportional hazard model analysis concerning the impact of all patients characteristics and AI on disease-free and overall survival (N=170).*

	Przeżycie wolne od nawrotu <i>Disease-free survival</i>		Ogólne przeżycie <i>Overall survival</i>	
	p	WR*(95% ZU**) <i>HR* (95% CI**)</i>	P	WR*(95% ZU**) <i>HR* (95% CI**)</i>
Płeć <i>Sex</i>	0.96	0.99 (0.52-1.45)	0.75	1.07 (0.60-1.55)
Wiek <i>Age</i>	0.15	1.32 (0.93-1.70)	0.11	1.37 (0.97-1.77)
Typ histologiczny nowotworu <i>Histology</i>	0.49	1.05 (0.89-1.22)	0.59	1.05 (0.87-1.21)
Stopień zaawansowania klinicznego <i>Stage of disease</i>	<0.001	1.55 (1.38-1.73)	<0.001	1.62 (1.43-1.80)
Stopień zróżnicowania nowotworu <i>Grade</i>	0.04	1.44 (1.03-1.65)	0.02	1.46 (1.13-1.78)
Wskaźnik apoptotyczny <i>Apoptotic index</i>	0.36	1.07 (0.91-1.24)	0.65	1.04 (0.87-1.22)

WR\*– współczynnik ryzyka, 95% ZU\*\* - 95% zakres ufności

HR\* – hazard ratio, 95% CI\*\* - 95% confidence interval

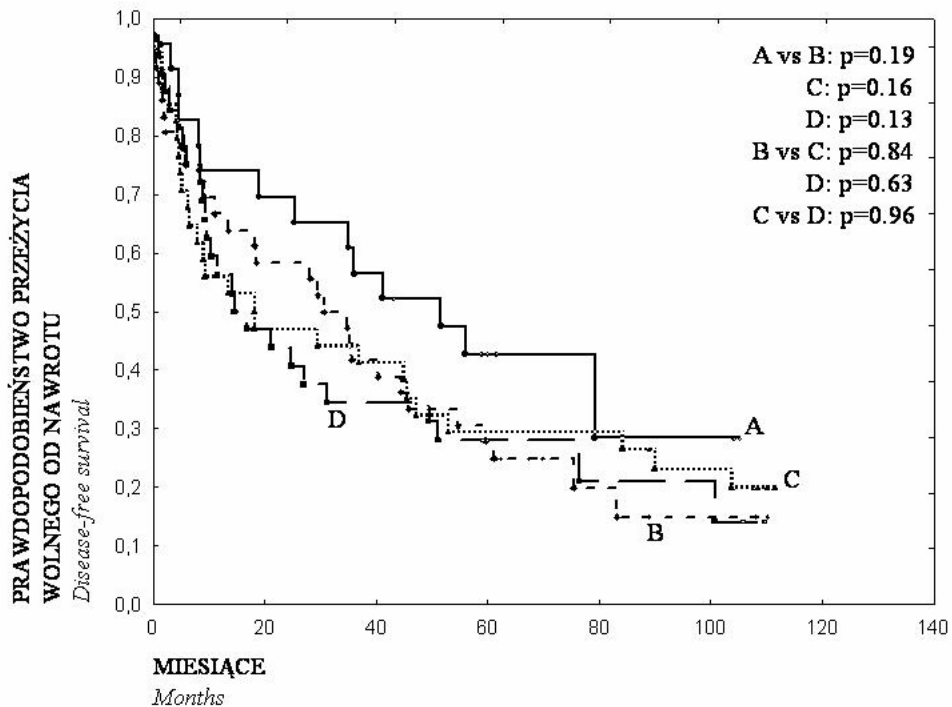
## 5.2. Wskaźnik ekspresji białka PCNA

Wskaźnik ekspresji PCNA (W PCNA) został określony w 125 przypadkach NDKRP. Brak jakiegokolwiek obecności białka PCNA stwierdzono zaledwie w 4 guzach (3%). Średnia wartość W PCNA dla wszystkich pozostałych 121 chorych wynosiła 34±24. Wartość W PCNA nie miała rozkładu normalnego. Mediana W PCNA wynosiła 35, natomiast dolny i górny kwartył W PCNA wynosił odpowiednio 20 i 50. W zależności od wartości mediany oraz dolnego i górnego kwartyła badana grupa chorych została podzielona na cztery podgrupy: A – z bardzo niskim W PCNA (W PCNA<20), B – z niskim W PCNA (20≤W PCNA<35), C – z wysokim W PCNA (35≤W PCNA<50) oraz D – z bardzo wysokim W PCNA (W PCNA≥50). Bardzo niski, niski, wysoki oraz bardzo wysoki wskaźnik ekspresji PCNA stwierdzono odpowiednio w 23 (18%), 36 (29%), 34 (27%) oraz 32 przypadkach (26%). Analiza statystyczna została wykonana dla różnych punktów odcięcia obejmujących wartość średnią, medianę, dolny

i górny kwartyl, jakkolwiek różne punkty odcięcia nie miały wpływu na uzyskanie wyników znamienych statystycznie.

W badanej grupie w analizie  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy W PCNA a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby (z uwzględnieniem skali pTNM) oraz postacią histologiczną guza. Stwierdzono natomiast dodatnią korelację pomiędzy W PCNA a stopniem zróżnicowania guza nowotworowego ( $p=0.03$ ) (tabela 4).

Mediana czasu przeżycia do nawrotu choroby dla chorych z bardzo niskim, niskim, wysokim oraz bardzo wysokim W PCNA wynosiła odpowiednio 52, 30, 19 i 18 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby - odpowiednio 42%, 31%, 30% i 29% ( $p=0.42$ , rycina 12).



Ryc.12. Krzywa przeżycia do nawrotu Kaplana-Meyer'a u chorych z bardzo niskim (grupa A, N=23), niskim (grupa B, N=36), wysokim (grupa C, N=34) oraz bardzo wysokim wskaźnikiem ekspresji PCNA (grupa D, N=32) ( $p=0.42$ ).

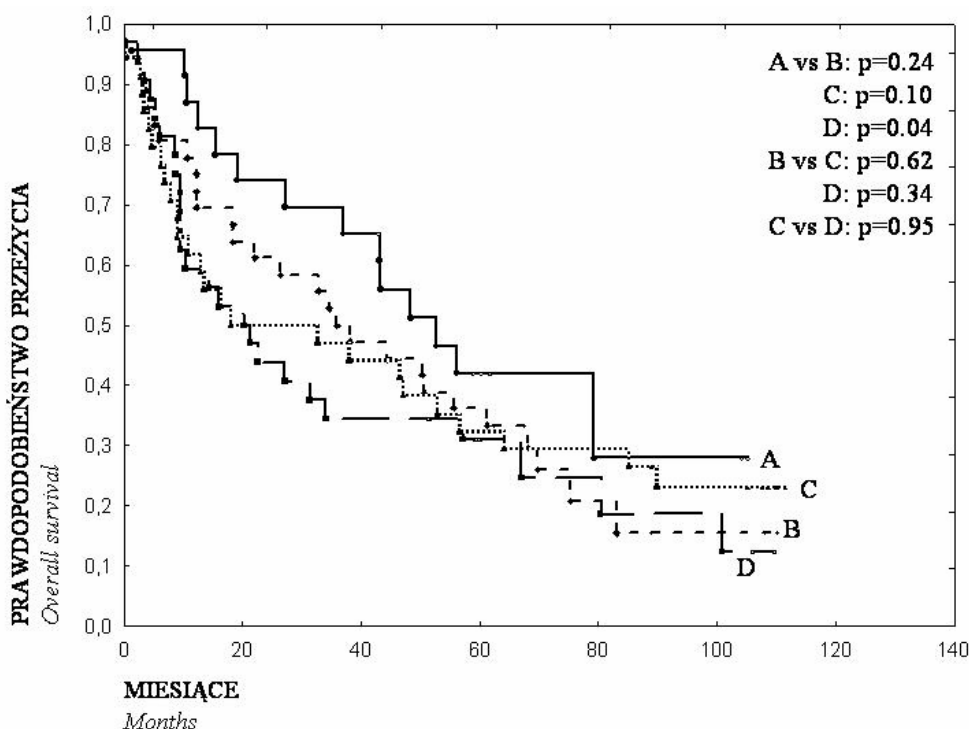
Fig.12. Kaplan-Meier disease-free survival curve for patients with very low (group A, N=23), low (group B, N=36), high (group C, N=34) and very high PCNA labeling index (group D, N=32) ( $p=0.42$ ).

Tab. 4. Wskaźnik ekspresji PCNA w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=125, test  $\chi^2$ ).

Tab. 4. PCNA labeling index according to patients clinical characteristics (N=125,  $\chi^2$  analysis).

	bardzo niski W PCNA <i>very low PCNA LI</i>	niski W PCNA <i>low PCNA LI</i>	wysoki W PCNA <i>high PCNA LI</i>	bardzo wysoki W PCNA <i>very high PCNA LI</i>	<i>p</i>
Wiek / <i>Age</i>					
≤60 lat	10	14	20	13	0.89
>60 lat	13	22	14	19	
Płeć / <i>Sex</i>					
Kobiety / <i>Female</i>	18	28	26	22	0.23
Mężczyźni / <i>Male</i>	5	8	8	10	
Stopień zaawansowania nowotworu / <i>Stage</i>					
I	9	18	17	13	0.88
II	3	3	2	4	
IIIA	10	15	13	14	
IIIB + IV	1	0	2	1	
Typ histologiczny <i>Histology</i>					
Rak płaskonabłonkowy <i>Squamous</i>	12	18	16	19	0.97
Gruczolakorak <i>Adenous</i>	8	11	11	7	
Rak wielkokomórkowy <i>Large cell</i>	1	3	5	3	
Rak gruczolowo-płaskonabłonkowy <i>Adeno-squamous</i>	2	4	2	3	
Stopień zróżnicowania nowotworu / <i>Grade</i>					
G1	5	6	6	4	0.03
G2	17	23	15	19	
G3	1	7	13	9	

Mediana całkowitego czasu przeżycia dla chorych z bardzo niskim, niskim, wysokim oraz bardzo wysokim W PCNA wynosiła odpowiednio 54, 36, 19 i 20 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia - odpowiednio 42%, 36%, 32% i 31% ( $p=0.23$ , rycina 13).

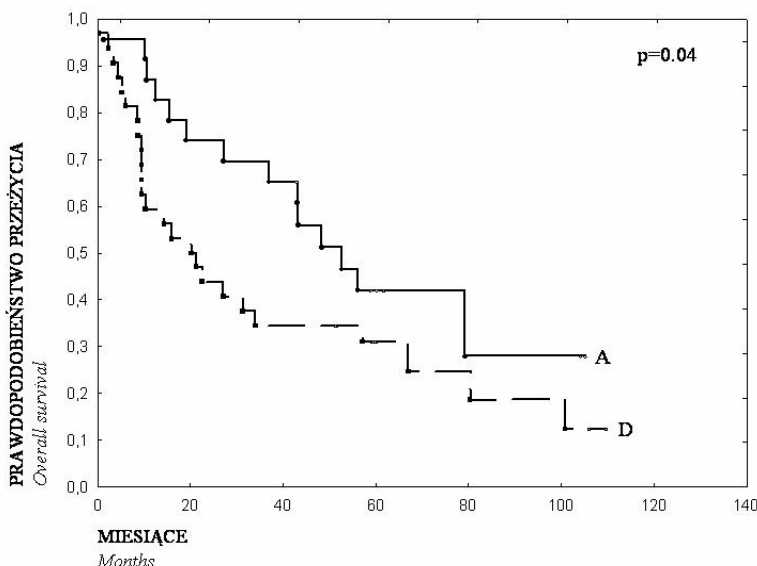


Ryc.13. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer'a u chorych z bardzo niskim (grupa A, N=23), niskim (grupa B, N=36), wysokim (grupa C, N=34) oraz bardzo wysokim wskaźnikiem ekspresji PCNA (grupa D, N=32) ( $p=0.23$ ).

Fig.13. Kaplan-Meier overall survival curve for patients with very low (group A, N=23), low (group B, N=36), high (group C, N=34) and very high PCNA labeling index (group D, N=32) ( $p=0.23$ ).

Pomiędzy poszczególnymi czterema podgrupami chorych z NDKRP nie stwierdzono różnic w czasie przeżycia do nawrotu choroby. Stwierdzono natomiast statystycznie znaczącą różnicę w czasie przeżycia całkowitego pomiędzy podgrupą o bardzo niskim (A) w stosunku do podgrupy o bardzo wysokim W PCNA (D). Mediana całkowitego czasu przeżycia dla chorych z bardzo niskim W PCNA (A) oraz bardzo wysokim W PCNA (D) wynosiła odpowiednio 58 i 20 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia - odpowiednio 42% i 31% ( $p=0.04$ , rycina 14).

W analizie wieloczynnikowej, spośród wszystkich analizowanych cech (z oceną W PCNA włącznie), jedynie stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz stopień zróżnicowania guza nowotworowego miały znaczenie rokownicze w odniesieniu do czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby, jak i do całkowitego czasu przeżycia (tabela 5).



Ryc.14. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer'a u chorych z bardzo niskim (grupa A, N=23) w stosunku do chorych z bardzo wysokim wskaźnikiem ekspresji PCNA (grupa D, N=32) ( $p=0.04$ ).

Fig. 14. Kaplan-Meier overall survival curve for patients with very low (group A, N=23) vs very high PCNA labeling index (group D, N=32) ( $p=0.04$ ).

Tab. 5. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz W PCNA na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=125).

Tab. 5. Multivariate Cox proportional hazard model analysis concerning the impact of all patients characteristics and PCNA LI on disease-free and overall survival (N=125).

	Przeżycie wolne od nawrotu <i>Disease-free survival</i>		Ogólne przeżycie <i>Overall survival</i>	
	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)
Płeć <i>Sex</i>	0.48	1.20 (0.68-1.72)	0.34	1.28 (0.76-1.81)
Wiek <i>Age</i>	0.34	1.24 (0.79-1.69)	0.28	1.28 (0.82-1.74)
Typ histologiczny nowotworu <i>Histology</i>	0.85	1.01 (0.83-1.20)	0.80	1.02 (0.83-1.21)
Stopień zaawansowania klinicznego / <i>Stage of disease</i>	<0.001	1.62 (1.43-1.82)	<0.001	1.69 (1.48-1.90)
Stopień zróżnicowania nowotworu / <i>Grade</i>	0.03	1.50 (1.12-1.88)	0.01	1.63 (1.24-2.02)
Wskaźnik ekspresji PCNA / <i>PCNA labeling index</i>	0.19	1.13 (0.94-1.34)	0.11	1.18 (0.97-1.37)

WR\* - współczynnik ryzyka, 95% ZU\*\* - 95% zakres ufności

HR\* - hazard ratio, 95% CI\*\* - 95% confidence interval

### 5.3. Białko p53

Obecność białka p53 stwierdzono w 96 spośród 203 badanych guzów (47%). Średni odsetek wybarwionych jąder komórkowych w dodatnich preparatach wynosił 54±36%. Całkowity brak barwienia stwierdzono w 107 przypadkach (53%). Analiza statystyczna została wykonana dla różnych punktów odcięcia, ale żaden z nich nie wpłynął na uzyskanie wyników znamiennych statystycznie. Ostatecznie za wynik dodatni barwienia przyjęto jakąkolwiek jądrową ekspresję białka p53 ( $\geq 1\%$ ).

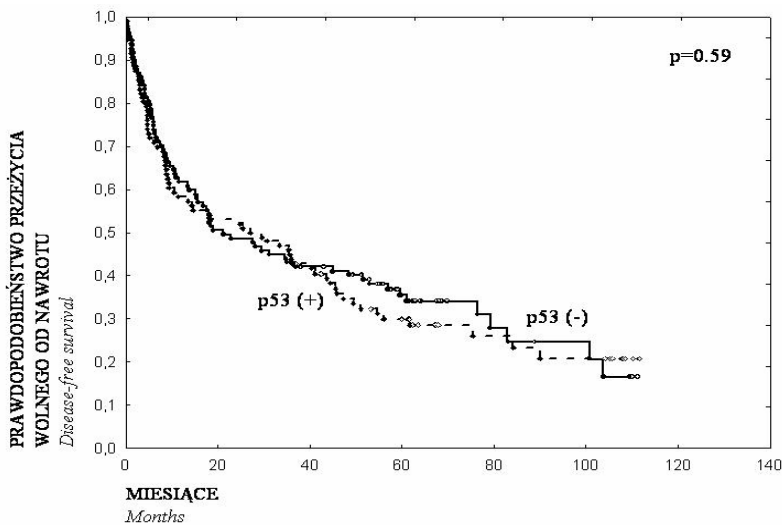
W badanej grupie chorych w analizie  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością białka p53 a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby (z uwzględnieniem skali pTNM), postać histologiczną guza oraz stopień jego zróżnicowania (tabela 6).

Tab. 6. Ekspresja białka p53 w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=203, test  $\chi^2$ ).

Tab. 6. *p53 protein expression according to patients clinical characteristics (N=203,  $\chi^2$  analysis).*

	p53 (-)	p53 (+)	p
Wiek / Age			
≤60 lat	48	44	0.89
>60 lat	59	52	
Płeć / Sex			
Meżczyźni / Male	83	72	0.67
Kobiety / Female	24	24	
Stopień zaawansowania nowotworu / Stage			
I	47	42	0.70
II	12	11	
IIIA	45	37	
IIIB + IV	3	6	
Typ histologiczny / Histology			
Rak płaskonabłonkowy / Squamous	59	60	0.07
Gruzołakorak / Adenous	27	25	
Rak wielokomórkowy / Large cell	9	7	
Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy / Adeno-squamous	12	4	
Stopień zróżnicowania nowotworu / Grade			
G1	15	16	0.88
G2	64	51	
G3	28	29	

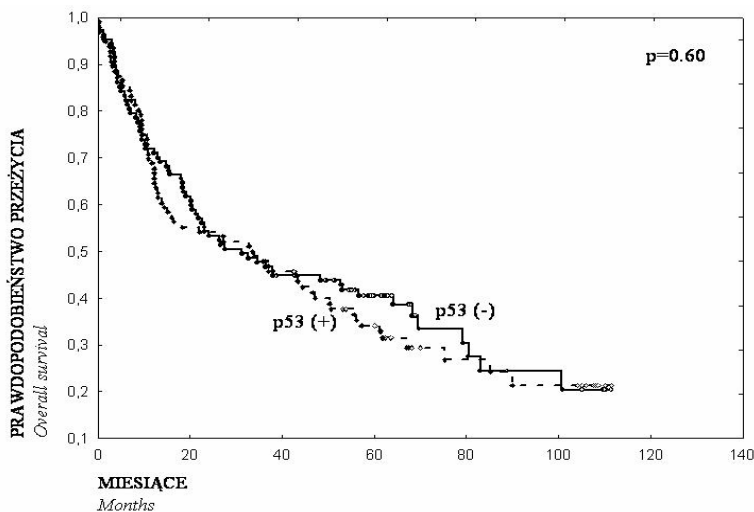
Mediana czasu przeżycia do nawrotu choroby dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją białka p53 wynosiła odpowiednio 19 i 23 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby - odpowiednio 35% i 30% ( $p=0.59$ , rycina 15).



Ryc.15. Krzywa przeżycia do nawrotu Kaplana-Meyer’a u chorych z ujemną ekspresją białka p53 (N=107) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją białka p53 (N=96).

Fig. 15. Kaplan-Meier disease-free survival curve for patients without p53 protein expression (N=107) vs patients with positive p53 protein expression (N=96).

Mediana całkowitego czasu przeżycia dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją białka p53 wynosiła odpowiednio 28 i 34 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia – odpowiednio 40% i 34% (p=0.60, rycina 16).



Ryc.16. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer’a u chorych z ujemną ekspresją białka p53 (N=107) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją białka p53 (N=96).

Fig. 16. Kaplan-Meier overall survival curve for patients without p53 protein expression (N=107) vs patients with positive p53 protein expression (N=96).



W analizie wieloczynnikowej, spośród wszystkich analizowanych cech (z obecnością białka p53 włącznie), jedynie stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz stopień zróżnicowania guza miały znaczenie rokownicze w odniesieniu do czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby, jak i do całkowitego czasu przeżycia (tabela 7).

Tab. 7. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz ekspresję białka p53 na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=203).

Tab. 7. *Multivariate Cox proportional hazard model analysis concerning the impact of all patients characteristics and p53 protein expression on disease-free and overall survival (N=203).*

	Przeżycie wolne od nawrotu <i>Disease-free survival</i>		Ogólne przeżycie <i>Overall survival</i>	
	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)
Płeć <i>Sex</i>	0.70	0.92 (0.52-1.32)	0.97	0.99 (0.59-1.39)
Wiek <i>Age</i>	0.23	1.24 (0.88-1.59)	0.18	1.27 (0.91-1.63)
Typ histologiczny nowotworu <i>Histology</i>	0.25	1.08 (0.94-1.21)	0.33	1.07 (0.93-1.21)
Stopień zaawansowania klinicznego <i>Stage of disease</i>	<0.001	1.51 (1.35-1.67)	<0.001	1.57 (1.40-1.73)
Stopień zróżnicowania nowotworu <i>Grade</i>	0.02	1.38 (1.10-1.67)	0.01	1.50 (1.21-1.80)
Ekspresja białka p53 <i>p53 protein expression</i>	0.89	0.97 (0.64-1.31)	0.91	0.98 (0.64-1.32)

WR\* - współczynnik ryzyka, 95% ZU\*\* - 95% zakres ufności

HR\* - hazard ratio, 95% CI\*\* - 95% confidence interval

## 5.4. Białko pRb

Obecność białka pRb stwierdzono w 144 spośród 203 badanych guzów (71%). Średni odsetek wybarwionych jąder komórkowych w dodatnich preparatach wynosił  $56 \pm 34\%$ . Brak jakiegokolwiek barwienia stwierdzono w 59 przypadkach (29%). Analiza statystyczna została wykonana dla różnych punktów odcięcia, jakkolwiek różne punkty odcięcia nie wpłynęły na uzyskanie wyników znamiennej statystycznie. Ostatecznie za wynik dodatni barwienia przyjęto jakąkolwiek jądrową ekspresję białka pRb ( $\geq 1\%$ ), natomiast za ujemny całkowity brak obecności białka pRb.

W badanej grupie chorych w analizie  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością białka pRb a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby (z uwzględnieniem skali pTNM), postać histologiczną guza oraz stopień jego zróżnicowania (tabela 8).

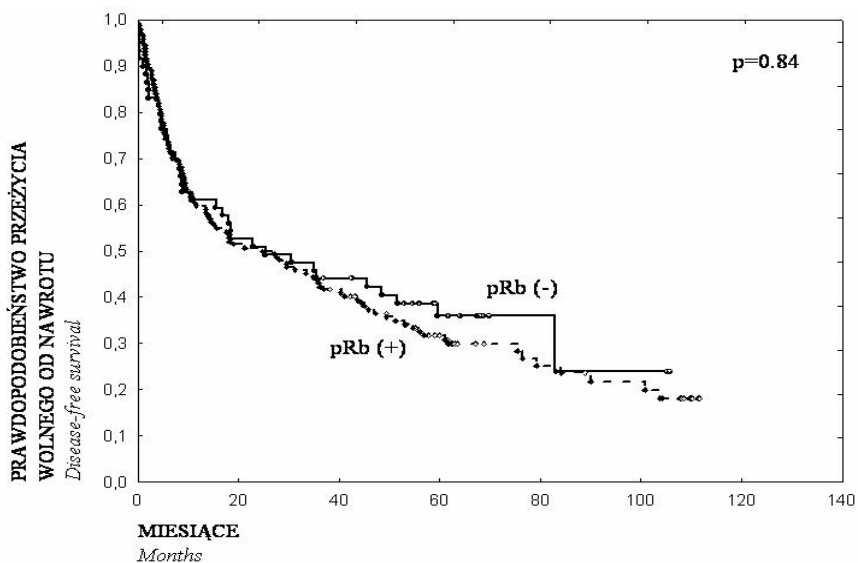
Tab. 8. Ekspresja białka pRb w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=203, test  $\chi^2$ ).

Tab. 8. pRb protein expression according to patients clinical characteristics (N=203,  $\chi^2$  analysis).

	pRb (-)	pRb (+)	<i>p</i>
Wiek / Age			
≤60 lat	26	66	0.82
>60 lat	33	78	
Płeć / Sex			
Mężczyźni / Male	42	113	0.27
Kobiety / Female	17	31	
Stopień zaawansowania nowotworu / Stage			
I	26	63	0.93
II	6	17	
IIIA	24	58	
IIIB + IV	3	6	
Typ histologiczny / Histology			
Rak płaskonabłonkowy / Squamous	32	87	0.99
Gruzołakorak / Adenous	17	35	
Rak wielokomórkowy / Large cell	7	9	
Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy / Adeno-squamous	3	13	
Stopień zróżnicowania nowotworu / Grade			
G1	4	27	0.08
G2	36	79	
G3	19	38	

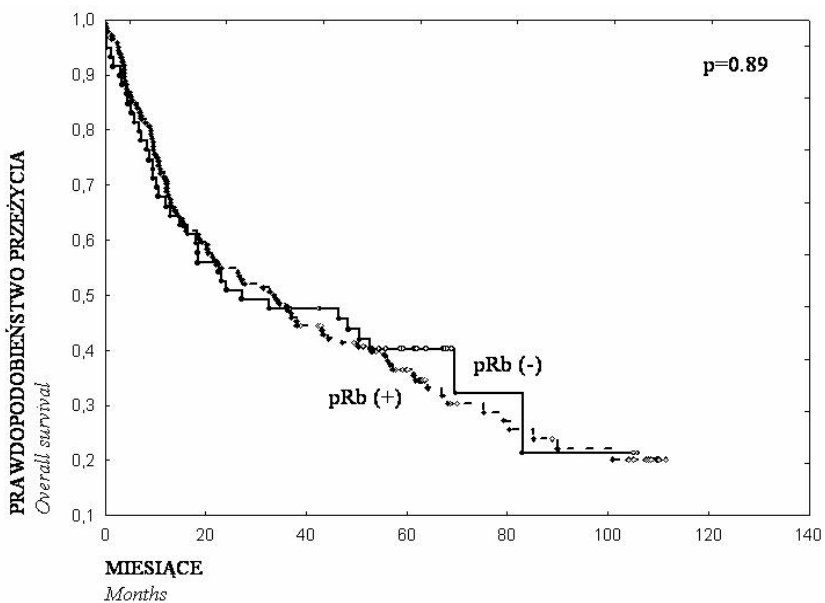
Mediana czasu przeżycia do nawrotu choroby dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją białka pRb wynosiła odpowiednio 22 i 20 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby - odpowiednio 36% i 32% ( $p=0.84$ , rycina 17).

Mediana całkowitego czasu przeżycia dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją białka pRb wynosiła odpowiednio 26 i 32 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia – odpowiednio 40% i 36% ( $p=0.89$ , rycina 18).



Ryc. 17. Krzywa przeżycia do nawrotu Kaplana-Meyer'a u chorych z ujemną ekspresją białka pRb (N=59) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją białka pRb (N=144).

Fig. 17. Kaplan-Meier disease-free survival curve for patients without pRb protein expression (N=59) vs patients with positive pRb protein expression (N=144).



Ryc. 18. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer'a u chorych z ujemną ekspresją białka pRb (N=59) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją białka pRb (N=144).

Fig. 18. Kaplan-Meier overall survival curve for patients without pRb protein expression (N=59) vs patients with positive pRb protein expression (N=144).

W analizie wieloczynnikowej, spośród wszystkich analizowanych cech (z obecnością białka pRb włącznie), jedynie stopień zaawansowania klinicznego nowotworu oraz stopień jego zróżnicowania miały znaczenie rokownicze w odniesieniu do czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby i do całkowitego czasu przeżycia (tabela 9).

Tab. 9. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz ekspresji białka pRb na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=203).

Tab. 9. *Multivariate Cox proportional hazard model analysis concerning the impact of all patients characteristics and pRb protein expression on disease-free and overall survival (N=203).*

	Przeżycie wolne od nawrotu <i>Disease-free survival</i>		Ogólne przeżycie <i>Overall survival</i>	
	p	WR*(95% ZU**) <i>HR* (95% CI**)</i>	p	WR*(95% ZU**) <i>HR* (95% CI**)</i>
Płeć <i>Sex</i>	0.74	0.93 (0.53-1.33)	0.99	0.99 (0.59-1.40)
Wiek <i>Age</i>	0.23	1.23 (0.89-1.59)	0.18	1.27 (0.91-1.63)
Typ histologiczny nowotworu <i>Histology</i>	0.24	1.08 (0.94-1.21)	0.32	1.07 (0.93-1.21)
Stopień zaawansowania klinicznego <i>Stage of disease</i>	<0.001	1.51 (1.35-1.67)	<0.001	1.56 (1.40-1.73)
Stopień zróżnicowania nowotworu <i>Grade</i>	0.02	1.39 (1.11-1.68)	0.01	1.50 (1.21-1.78)
Ekspresja białka pRb <i>pRb protein expression</i>	0.42	1.16 (0.79-1.54)	0.67	1.08 (0.71-1.46)

WR\* - współczynnik ryzyka, 95% ZU\*\* - 95% zakres ufności  
*HR\* - hazard ratio, 95% CI\*\* - 95% confidence interval*

## 5.5. Białko mdm2

Obecność białka mdm2 stwierdzono w 72 spośród 197 badanych guzów (37%). Średni odsetek wybarwionych jąder komórkowych w dodatnich preparatach wynosił 48±44%. Całkowity brak barwienia stwierdzono w 125 przypadkach (63%). Analiza statystyczna została wykonana dla różnych punktów odcięcia, ale żaden z nich nie wpłynął na uzyskanie wyników znamienych statystycznie. Ostatecznie za wynik dodatni barwienia przyjęto jakkolwiek jądro wykazujące ekspresję białka mdm2 (≥1%).

W badanej grupie chorych w analizie  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością białka mdm2 a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby (z uwzględnieniem skali pTNM), rodzaj histopatologiczny guza oraz stopień jego zróżnicowania (tabela 10).

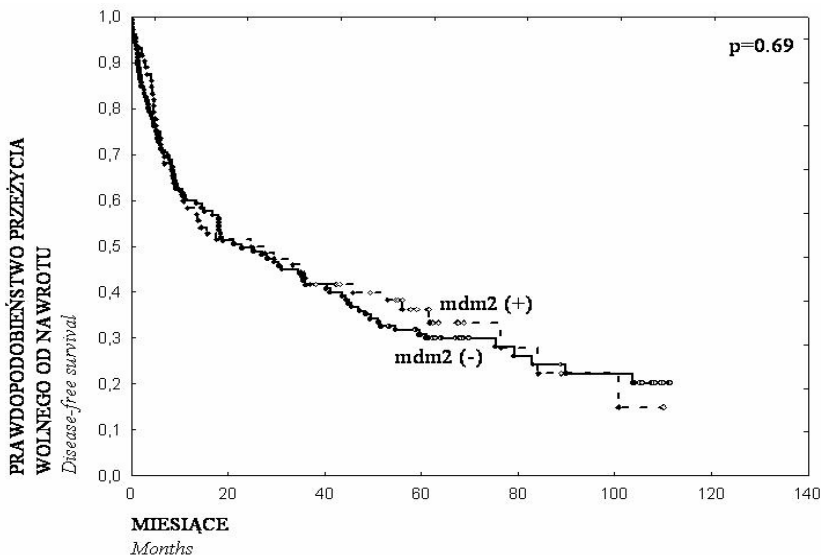
Tab. 10. Ekspresja białka mdm2 w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=197, test  $\chi^2$ ).

Tab. 10. *mdm2 protein expression according to patients clinical characteristics (N=197,  $\chi^2$  analysis).*

	mdm2 (-)	mdm2 (+)	<i>p</i>
Wiek / <i>Age</i>			
≤60 lat	60	30	0.39
>60 lat	65	42	
Płeć / <i>Sex</i>			
Mężczyźni / <i>Male</i>	98	51	0.24
Kobiety / <i>Female</i>	27	21	
Stopień zaawansowania nowotworu / <i>Stage</i>			
I	54	33	0.50
II	10	12	
IIIA	57	23	
IIIB + IV	4	4	
Typ histologiczny / <i>Histology</i>			
Rak płaskonabłonkowy / <i>Squamous</i>	66	48	0.08
Gruczolakorak / <i>Adenous</i>	35	17	
Rak wielokomórkowy / <i>Large cell</i>	12	4	
Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy / <i>Adeno-squamous</i>	12	3	
Stopień zróżnicowania nowotworu / <i>Grade</i>			
G1	21	8	0.63
G2	68	44	
G3	36	20	

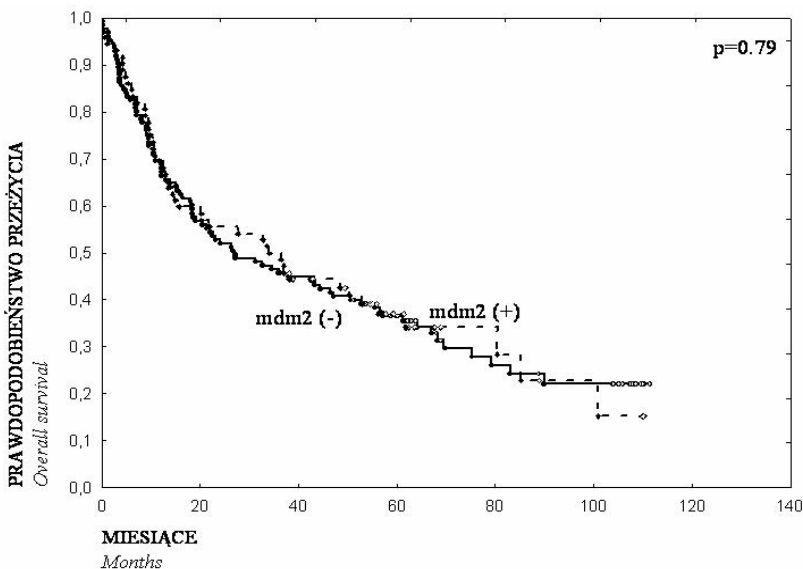
Mediana czasu przeżycia do nawrotu choroby dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją białka mdm2 wynosiła odpowiednio 20 i 24 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby - odpowiednio 30% i 36% ( $p=0.69$ , rycina 19).

Mediana całkowitego czasu przeżycia dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją białka mdm2 wynosiła odpowiednio 27 i 33 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia – odpowiednio 36% i 37% ( $p=0.79$ , rycina 20).



Ryc. 19. Krzywa przeżycia do nawrotu Kaplana-Meyer'a u chorych z ujemną ekspresją białka mdm2 (N=125) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją białka mdm2 (N=72).

Fig. 19. Kaplan-Meier disease-free survival curve for patients without mdm2 protein expression (N=125) vs patients with positive mdm2 protein expression (N=72).



Ryc. 20. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer'a u chorych z ujemną ekspresją białka mdm2 (N=125) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją białka mdm2 (N=72).

Fig. 20. Kaplan-Meier overall survival curve for patients without mdm2 protein expression (N=125) vs patients with positive mdm2 protein expression (N=72).

W analizie wieloczynnikowej, spośród wszystkich analizowanych cech (z obecnością białka mdm2 włącznie), jedynie stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz stopień zróżnicowania guza miały znaczenie rokownicze w odniesieniu do czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby, jak i do całkowitego czasu przeżycia (tabela 11).

Tab. 11. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz ekspresji białka mdm2 na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=197).

Tab.11. *Multivariate Cox proportional hazard model analysis concerning the impact of all patients characteristics and mdm2 protein expression on disease-free and overall survival (N=197).*

	Przeżycie wolne od nawrotu <i>Disease-free survival</i>		Ogólne przeżycie <i>Overall survival</i>	
	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)
Płeć <i>Sex</i>	0.64	0.91 (0.51-1.31)	0.85	0.96(0.54-1.37)
Wiek <i>Age</i>	0.19	1.26 (0.92-1.62)	0.14	1.31 (0.94-1.68)
Typ histologiczny nowotworu <i>Histology</i>	0.29	1.08 (0.93-1.22)	0.33	1.07 (0.92-1.22)
Stopień zaawansowania klinicznego <i>Stage of disease</i>	<0.001	1.51 (1.36-1.68)	<0.001	1.56 (1.40-1.73)
Stopień zróżnicowania nowotworu <i>Grade</i>	0.03	1.37 (1.08-1.66)	0.009	1.48 (1.19-1.78)
Ekspresja białka mdm2 <i>mdm2 protein expression</i>	0.77	0.94 (0.57-1.31)	0.90	0.98 (0.60-1.35)

## 5.6. Białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

Występowanie białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> zostało określone w 194 przypadkach NDKRP. Jądrową ekspresję białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> stwierdzono w 126 guzach (65%). Średni odsetek ekspresji białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w dodatnich przypadkach wynosił 22%±21%. Analiza statystyczna została wykonana dla różnych punktów odcięcia, ale żaden z nich nie wpłynął na uzyskanie wyników znamienych statystycznie. Ostatecznie za dodatni wynik barwienia przyjęto jakkolwiek jądrową ekspresję białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (≥1%).

W badanej grupie chorych w analizie chi<sup>2</sup> nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby (z uwzględnieniem skali pTNM), postać histologiczną guza oraz stopień jego zróżnicowania (tabela 12).

Tab. 12. Ekspresja białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=194, test  $\chi^2$ ).

Tab. 12. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression according to patients clinical characteristics (N=194,  $\chi^2$  analysis).

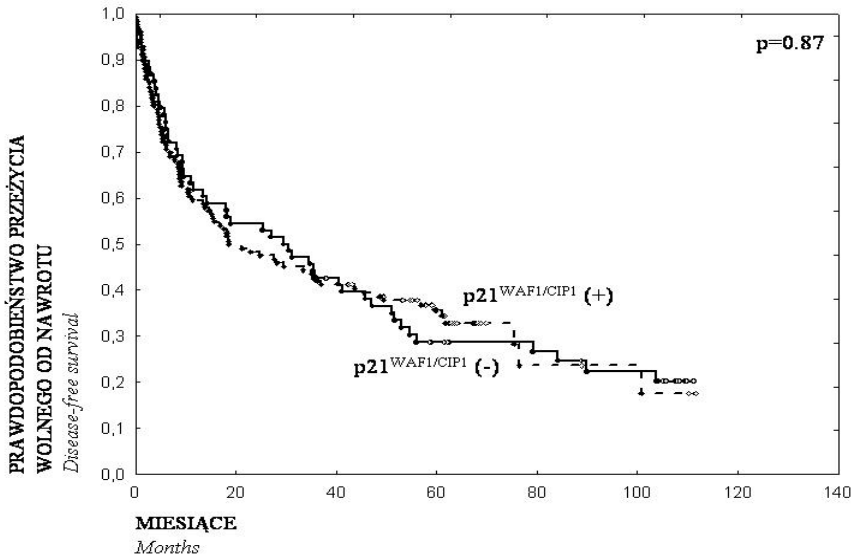
	p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (-)	p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (+)	<i>p</i>
Wiek / Age			
≤60 lat	38	51	0.08
>60 lat	30	75	
Płeć /Sex			
Mężczyźni / Male	54	96	0.61
Kobiety / Female	14	30	
Stopień zaawansowania nowotworu / Stage			
I	28	57	0.15
II	4	17	
IIIA	32	48	
IIIB + IV	4	4	
Typ histologiczny / Histology			
Rak płaskonabłonkowy / Squamous	36	80	0.46
Gruzołakorak / Adenous	20	28	
Rak wielokomórkowy / Large cell	7	8	
Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy / Adeno-squamous	5	10	
Stopień zróżnicowania nowotworu / Grade			
G1	10	20	0.65
G2	38	73	
G3	20	33	

Mediana czasu przeżycia do nawrotu choroby dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wynosiła odpowiednio 30 i 20 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby - odpowiednio 29% i 36% ( $p=0.87$ , rycina 21).

Mediana całkowitego czasu przeżycia dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wynosiła odpowiednio 32 i 28 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia – odpowiednio 32% i 40% ( $p=0.81$ , rycina 22).

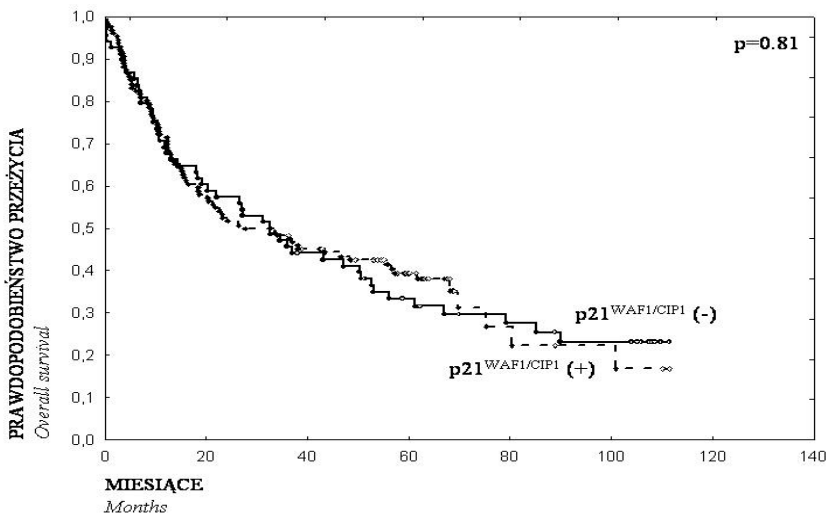
Nie stwierdzono różnicy w czasie przeżycia do nawrotu choroby oraz całkowitym czasie przeżycia pomiędzy analizowanymi podgrupami chorych.





Ryc. 21. Krzywa przeżycia do nawrotu Kaplana-Meyer'a u chorych z ujemną ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (N=68) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (N=126).

Fig. 21. Kaplan-Meier disease-free survival curve for patients without p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression (N=68) vs patients with positive p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression (N=126).



Ryc. 22. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer'a u chorych z ujemną ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (N=68) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (N=126).

Fig. 22. Kaplan-Meier overall survival curve for patients without p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression (N=68) vs patients with positive p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression (N=126).

W analizie wieloczynnikowej, obejmującej wszystkie analizowane cechy (z obecnością białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> włącznie), jedynie stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz stopień zróżnicowania guza nowotworowego miały znaczenie rokownicze zarówno co do czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby jak i do całkowitego czasu przeżycia (tabela 13).

Tab. 13. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz ekspresji białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=194).

Tab.13. *Multivariate Cox proportional hazard model analysis concerning the impact of all patients characteristics and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression on disease-free and overall survival (N=194).*

	Przeżycie wolne od nawrotu <i>Disease-free survival</i>		Ogólne przeżycie <i>Overall survival</i>	
	p	WR*(95% ZU**) <i>HR* (95% CI**)</i>	p	WR*(95% ZU**) <i>HR* (95% CI**)</i>
Płeć <i>Sex</i>	0.76	0.94 (0.52-1.35)	0.99	1.00 (0.58-1.42)
Wiek <i>Age</i>	0.42	1.16 (0.79-1.53)	0.33	1.19 (0.82-1.57)
Typ histologiczny nowotworu <i>Histology</i>	0.15	1.10 (0.96-1.24)	0.15	1.11 (0.96-1.25)
Stopień zaawansowania klinicznego <i>Stage of disease</i>	0.001	1.50 (1.25-1.75)	<0.001	1.54 (1.29-1.80)
Stopień zróżnicowania nowotworu <i>Grade</i>	0.007	1.47 (1.19-1.75)	0.001	1.59 (1.29-1.88)
Ekspresja białka p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> <i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression</i>	0.71	1.06 (0.71-1.42)	0.76	1.05 (0.69-1.42)

WR\* - współczynnik ryzyka, 95% ZU\*\* - 95% zakres ufności

HR\* - hazard ratio, 95% CI\*\* - 95% confidence interval

## 5.7. Cyklina D1

Występowanie cykliny D1 zostało określone w 194 przypadkach NDKRP. Jądrową ekspresję cykliny D1 stwierdzono w 77 guzach (40%). Średni odsetek ekspresji cykliny D1 w dodatnich przypadkach wynosił 18%±16%. Analiza statystyczna została wykonana dla różnych punktów odcięcia, ale żaden z nich nie wpłynął na uzyskanie wyników znamiennej statystycznie. Ostatecznie za dodatni wynik barwienia przyjęto jakąkolwiek jądrową ekspresję cykliny D1 (≥1%).

W badanej grupie chorych w analizie  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością cykliny D1 a cechami klinicznymi i demograficznymi obejmującymi wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby (z uwzględnieniem skali pTNM), postać histologiczną guza oraz stopień jego zróżnicowania (tabela 14).

Tab. 14. Ekspresja cykliny D1 w odniesieniu do cech klinicznych chorych (N=194, test  $\chi^2$ ).

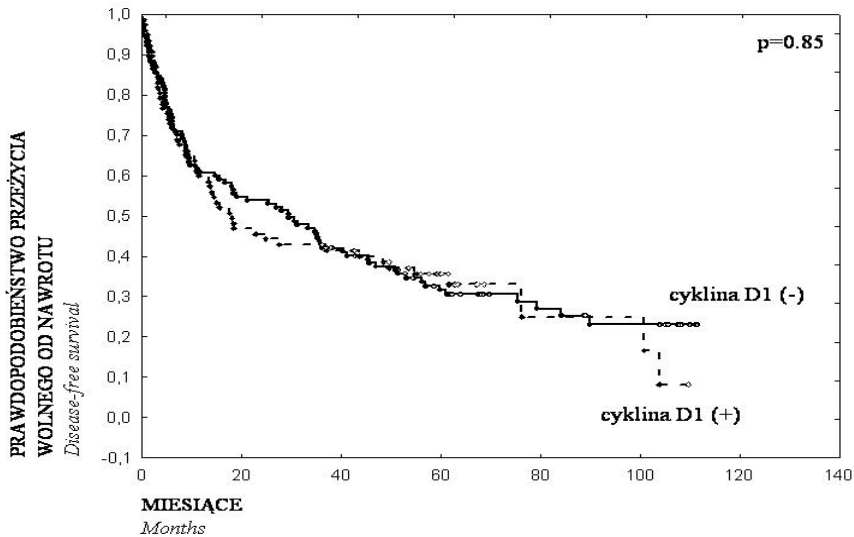
Tab. 14. *Cyclin D1 expression according to patients clinical characteristics (N=194,  $\chi^2$  analysis).*

	Cyklina D1 (-) <i>Cyclin D1 (-)</i>	Cyklina D1 (+) <i>Cyclin D1 (+)</i>	<i>p</i>
Wiek / <i>Age</i>			
≤60 lat	60	29	0.06
>60 lat	57	48	
Płeć / <i>Sex</i>			
Mężczyźni / <i>Male</i>	93	57	0.38
Kobiety / <i>Female</i>	24	20	
Stopień zaawansowania nowotworu / <i>Stage</i>			
I	54	32	0.45
II	15	6	
IIIA	42	37	
IIIB + IV	6	2	
Typ histologiczny / <i>Histology</i>			
Rak płaskonabłonkowy / <i>Squamous</i>	72	44	0.50
Gruczolakorak / <i>Adenous</i>	28	20	
Rak wielokomórkowy / <i>Large cell</i>	9	6	
Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy / <i>Adeno-squamous</i>	8	7	
Stopień zróżnicowania nowotworu / <i>Grade</i>			
G1	16	15	0.79
G2	70	41	
G3	31	21	

Mediana czasu przeżycia do nawrotu choroby dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją cykliny D1 wynosiła odpowiednio 30 i 19 miesięcy, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez nawrotu choroby - odpowiednio 31% i 36% ( $p=0.85$ , rycina 23).

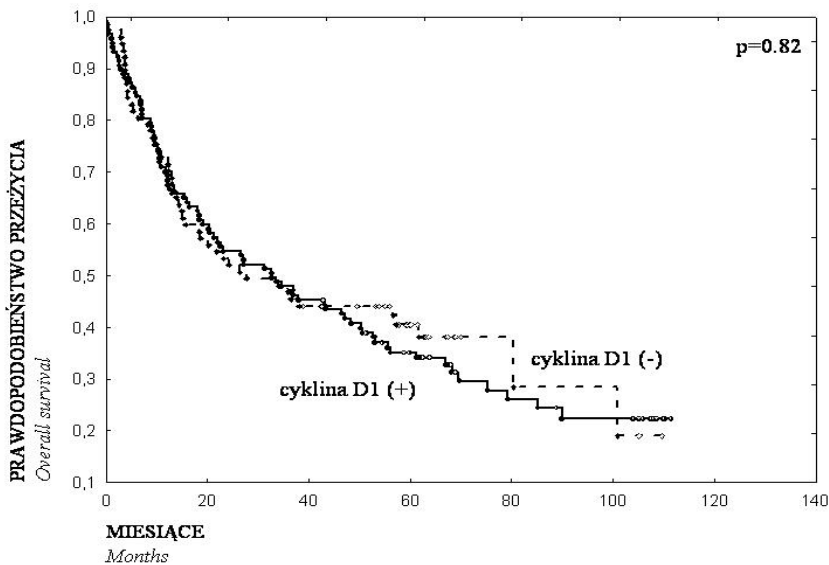
Mediana całkowitego czasu przeżycia dla chorych z ujemną i dodatnią ekspresją cykliny D1 wynosiła odpowiednio 32 i 28 miesiące, a prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia – odpowiednio 32% i 40% ( $p=0.82$ , rycina 24).

Nie stwierdzono różnicy w czasie przeżycia do nawrotu choroby oraz całkowitym czasie przeżycia pomiędzy analizowanymi podgrupami chorych.



Ryc. 23. Krzywa przeżycia wolnego do nawrotu Kaplana-Meyer'a u chorych z ujemną ekspresją cykliny D1 (N=117) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją cykliny D1 (N=77).

Fig. 23. Kaplan-Meier disease-free survival curve for patients without cyclin D1 expression (N=117) vs patients with positive cyclin D1 expression (N=77).



Ryc. 24. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer'a u chorych z ujemną ekspresją cykliny D1 (N=117) w stosunku do chorych z dodatnią ekspresją cykliny D1 (N=77).

Fig. 24. Kaplan-Meier overall survival curve for patients without cyclin D1 expression (N=117) vs patients with positive cyclin D1 expression (N=77).

W analizie wieloczynnikowej, spośród wszystkich analizowanych cech (z obecnością cykliny D1 włącznie), jedynie stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz stopień zróżnicowania guza nowotworowego miały znaczenie rokownicze zarówno co do czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby jak i do całkowitego czasu przeżycia (tabela 15).

Tab. 15. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz ekspresji cykliny D1 na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=194).

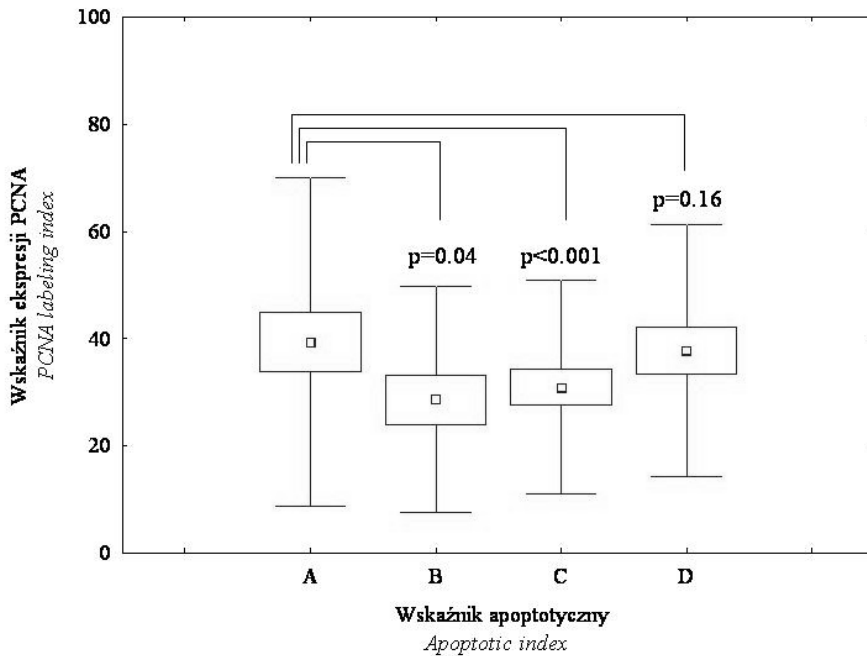
Tab. 15. *Multivariate Cox proportional hazard model analysis concerning the impact of all patients characteristics and cyclin D1 expression on disease-free and overall survival (N=194).*

	Przeżycie wolne od nawrotu <i>Disease-free survival</i>		Ogólne przeżycie <i>Overall survival</i>	
	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)
Płeć <i>Sex</i>	0.72	0.92 (0.51-1.34)	0.97	1.00 (0.58-1.42)
Wiek <i>Age</i>	0.32	1.21 (0.83-1.57)	9.23	1.25 (0.88-1.63)
Typ histologiczny nowotworu <i>Histology</i>	0.30	1.07 (0.93-1.21)	0.36	1.06 (0.92-1.21)
Stopień zaawansowania klinicznego <i>Stage of disease</i>	<0.001	1.50 (1.33-1.66)	<0.001	1.54 (1.37-1.72)
Stopień zróżnicowania nowotworu <i>Grade</i>	0.03	1.37 (1.08-1.67)	0.01	1.48(1.18-1.79)
Ekspresja cykliny D1 <i>Cyclin D1 expression</i>	0.95	0.99 (0.63-1.43)	0.50	0.88 (0.51-1.25)

## 5.8. Korelacje pomiędzy wskaźnikiem apoptotycznym, wskaźnikiem ekspresji PCNA a występowaniem białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1

### WA a W PCNA

W grupie 118 chorych z NDKRP określono łącznie wskaźnik apoptotyczny oraz wskaźnik ekspresji PCNA. Średnia wartość W PCNA w podgrupie chorych z bardzo niskim, niskim, wysokim oraz bardzo wysokim WA wynosiła odpowiednio 39±30, 27±19, 30±18 oraz 38±23. Średnia wartość W PCNA była znacznie wyższa w podgrupie chorych z bardzo niskim WA w porównaniu do podgrupy z niskim (p=0.04) lub wysokim WA (p<0.001). Nie stwierdzono różnicy w średniej wartości wskaźnika ekspresji PCNA pomiędzy podgrupami chorych z bardzo niskim i bardzo wysokim WA (p=0.16) (rycina 25).



Ryc. 25. Średnia wartość wskaźnika ekspresji PCNA w poszczególnych podgrupach chorych z bardzo niskim (grupa A, N=32), niskim (grupa B, N=21), wysokim (grupa C, N=36) oraz bardzo wysokim wskaźnikiem apoptotycznym (grupa D, N=29).

Fig. 25. Mean value of PCNA labeling index in patients subgroup with very low (group A, N=32), low (group B, N=21), high (group C, N=36) and very high apoptotic index (group D, N=29).

W teście  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy W PCNA oraz WA, gdy chorych w odniesieniu do obu parametrów podzielono w zależności od mediany, dolnego oraz górnego kwartyla na 4 podgrupy ( $p=0.54$ ) (tabela 16).

#### **WA a obecność białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1**

W grupie 170 chorych określono łącznie wskaźnik apoptotyczny oraz obecność białka p53 i pRb. W teście  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy WA, a ekspresją białka p53 ( $p=0.83$ ) lub ekspresją białka pRb ( $p=0.28$ ) (tabela 16).

W grupie 166 chorych określono łącznie wskaźnik apoptotyczny oraz obecność białka mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1. W teście  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy WA a ekspresją białka mdm2 ( $p=0.69$ ), białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ( $p=0.81$ ) oraz cykliny D1 ( $p=0.53$ ) (tabela 16).

Tab. 16. Korelacja pomiędzy WA a W PCNA, ekspresją białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliną D1 (test chi<sup>2</sup>).

Tab. 16. Correlation between AI and PCNA LI, p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 expression (chi<sup>2</sup> analysis).

	bardzo niski WA <i>very low AI</i>	niski WA <i>low AI</i>	wysoki WA <i>high AI</i>	bardzo wysoki WA <i>very high AI</i>	<i>p</i>
Wskaźnik ekspresji PCNA <i>PCNA labeling index</i> N=118					
bardzo niski W PCNA <i>very low PCNA LI</i>	9	4	6	3	0.54
niski W PCNA <i>low PCNA LI</i>	5	9	12	7	
wysoki W PCNA <i>high PCNA LI</i>	5	5	12	10	
bardzo wysoki W PCNA <i>very high PCNA LI</i>	13	3	6	9	
Ekspresja białka p53 <i>p53 protein expression</i> N=170					0.83
p53 (-)	23	16	27	25	
p53 (+)	17	19	25	18	
Ekspresja białka pRb <i>pRb protein expression</i> N=170					0.28
pRb (-)	13	8	13	9	
pRb (+)	27	27	39	34	
Ekspresja białka mdm2 <i>mdm2 protein expression</i> N=166					0.69
mdm2 (-)	28	17	32	30	
mdm2 (+)	12	17	17	13	
Ekspresja białka p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> <i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression</i> N=166					0.81
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (-)	16	10	19	19	
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (+)	20	25	33	24	
Ekspresja cykliny D1 <i>cyklin D1 expression</i> N=166					0.53
cyklina D1 (-)	22	19	33	28	
cyklina D1 (+)	14	16	19	15	

### **W PCNA a obecność białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1**

W badanej grupie u 125 chorych oceniano łącznie W PCNA oraz występowanie białka p53, pRb oraz białka mdm2. W teście chi<sup>2</sup> nie stwierdzono zależności pomiędzy W PCNA a ekspresją białka p53 (p=0.17), białka pRb (p=0.37)

oraz białka mdm2 ( $p=0.11$ ) (tabela 17). Natomiast u 118 chorych oceniono łącznie W PCNA oraz ekspresję białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1. W teście  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy W PCNA a ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ( $p=0.19$ ), stwierdzono natomiast dodatnią korelację pomiędzy W PCNA a obecnością cykliny D1 ( $p=0.017$ ) (tabela 17).

Tab. 17. Korelacja pomiędzy W PCNA a ekspresją białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliną D1 (test  $\chi^2$ ).

Tab. 17. Correlation between PCNA LI and p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 expression ( $\chi^2$  analysis).

	bardzo niski W PCNA very low PCNA LI	niski W PCNA low PCNA LI	wysoki W PCNA high PCNA LI	bardzo wysoki W PCNA very high PCNA LI	<i>p</i>
Ekspresja białka p53 <i>p53 protein expression</i> N=125					0.17
p53 (-)	10	18	21	19	
p53 (+)	13	18	13	13	
Ekspresja białka pRb <i>pRb protein expression</i> N=125					0.37
pRb (-)	8	8	8	7	
pRb (+)	15	28	26	25	
Ekspresja białka mdm2 <i>mdm2 protein expression</i> N=125					0.11
mdm2 (-)	16	29	24	18	
mdm2 (+)	7	7	10	14	
Ekspresja białka p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> <i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression</i> N=118					0.19
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (-)	14	15	20	11	
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (+)	8	19	12	19	
Ekspresja cykliny D1 <i>cyclin D1 expression</i> N=118					0.017
cyklina D1 (-)	20	23	22	17	
cyklina D1 (+)	2	11	10	13	

### ***Współwystępowanie białka p53 oraz białka pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1***

W badanej grupie u 203 chorych oceniano łącznie ekspresję białka p53 oraz pRb. W teście  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją białka p53 a ekspresją białka pRb ( $p=0.37$ ). U 197 chorych oceniono łącznie ekspresję



białka p53 oraz białka mdm2. W teście  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresjami białka p53 i białka mdm2 ( $p=0.19$ ). Natomiast u 194 chorych oceniono łącznie ekspresję białka p53 oraz białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1. W teście  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją białka p53 a białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ( $p=0.41$ ), stwierdzono natomiast ujemną korelację pomiędzy ekspresją białka p53 oraz obecnością cykliny D1 ( $p=0.03$ ) (tabela 18).

Tab. 18. Korelacja pomiędzy ekspresją białka p53 a ekspresją białka pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 (test  $\chi^2$ ).

Tab. 18. Correlation between p53 protein expression and expression of pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 ( $\chi^2$  analysis).

	p53 (-)	p53 (+)	<i>p</i>
Ekspresja białka pRb <i>pRb protein expression</i> N=203 pRb (-) pRb (+)	34 73	25 71	0.37
Ekspresja białka mdm2 <i>mdm2 protein expression</i> N=197 mdm2 (-) mdm2 (+)	61 42	64 30	0.19
Ekspresja białka p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> <i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression</i> N=194 p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (-) p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (+)	33 69	35 57	0.41
Ekspresja cykliny D1 <i>cyklin D expression</i> N=194 cyklina D1 (-) cyklina D1 (+)	54 48	63 29	0.03

### **Współwystępowanie białka pRb oraz białka mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1**

W badanej grupie u 197 chorych oceniono łącznie ekspresję białka pRb oraz białka mdm2. W teście  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją białka pRb a białka mdm2 ( $p=0.36$ ). Natomiast u 194 chorych oceniono łącznie ekspresję białka pRb oraz białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1. W teście  $\chi^2$  nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją białka pRb a białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ( $p=0.52$ ), stwierdzono natomiast dodatnią korelację pomiędzy ekspresją białka pRb oraz obecnością cykliny D1 ( $p=0.01$ ) (tabela 19).

Tab. 19. Korelacja pomiędzy ekspresją białka pRb a ekspresją białka mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 (test  $\chi^2$ ).

Tab. 19. Correlation between pRb protein expression and expression of mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 ( $\chi^2$  analysis).

	pRb (-)	pRb (+)	<i>p</i>
Ekspresja białka mdm2 <i>mdm2</i> protein expression N=197			0.36
mdm2 (-)	39	86	
mdm2 (+)	18	54	
Ekspresja białka p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> <i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup></i> protein expression N=194			0.52
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (-)	17	51	
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (+)	37	89	
Ekspresja cykliny D1 <i>cyclin D1</i> expression N=194			0.01
cyklina D1 (-)	41	76	
cyklina D1 (+)	13	64	

Tab. 20. Korelacja pomiędzy ekspresją białka mdm2 a ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 (test  $\chi^2$ ).

Tab. 20. Correlation between mdm2 protein expression and expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 ( $\chi^2$  analysis).

	mdm2 (-)	mdm2 (+)	<i>p</i>
Ekspresja białka p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> <i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup></i> protein expression N=188			0.01
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (-)	51	17	
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (+)	67	53	
Ekspresja cykliny D1 <i>cyclin D1</i> expression N=188			0.03
cyklina D1 (-)	78	35	
cyklina D1 (+)	40	35	
	p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (-)	p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> (+)	<i>p</i>
Ekspresja cykliny D1 <i>cyclin D1</i> expression N=194			<0.001
cyklina D1 (-)	57	60	
cyklina D1 (+)	11	66	

### ***Współwystępowanie białka mdm2 oraz białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1***

W grupie 188 chorych oceniono łącznie ekspresję białka mdm2 oraz białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1. W teście  $\chi^2$  stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją białka mdm2 a ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ( $p=0.01$ ), oraz pomiędzy ekspresją białka mdm2 oraz obecnością cykliny D1 ( $p=0.03$ ). W grupie 194 chorych oceniono łącznie ekspresję białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1. W teście  $\chi^2$  stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz obecnością cykliny D1 ( $p<0.001$ ) (tabela 20).

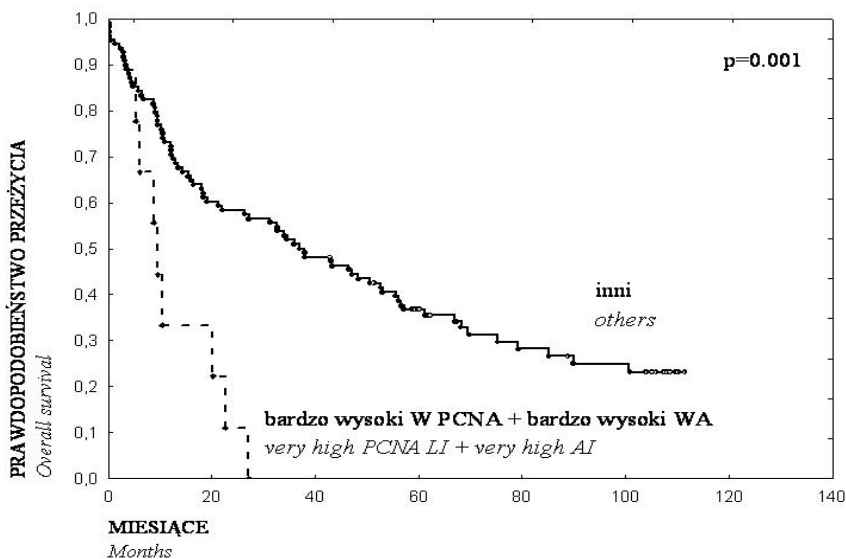
## **5.9. Ocena rokowniczego znaczenia wybranych fenotypów**

W analizie złożonych fenotypów oceniano łącznie dwa parametry. W jednym przypadku (ze względu na najwyższą liczebność grupy, w której określono łącznie występowanie białka p53, pRb oraz mdm2,  $N=197$ ), wykonano ocenę wartości rokowniczej trzech parametrów łącznie. Poza powyższą analizą, badano jednocześnie maksymalnie dwa parametry, aby uniknąć fałszywie dodatniego błędu typu alfa, wynikającego z wielokrotnego porównywania i złożoności analizy, a nie z prawdziwej korelacji pomiędzy parametrami.

### ***Wskaźnik apoptotyczny***

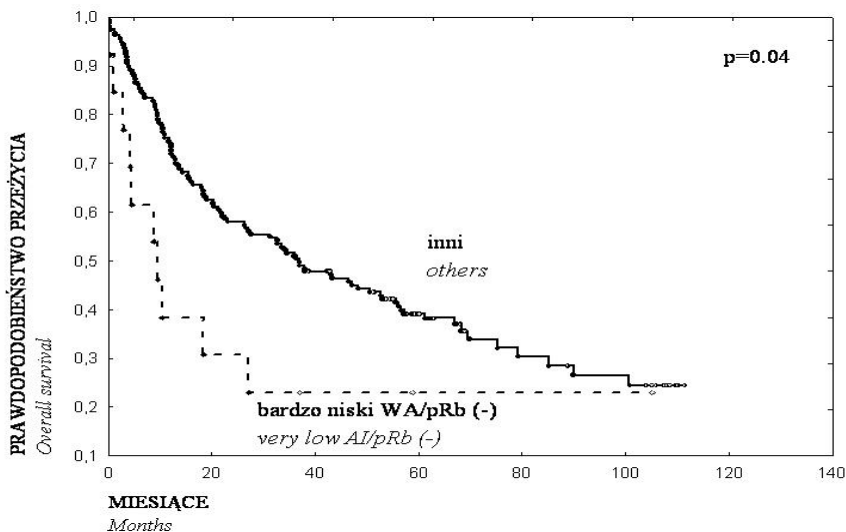
W analizie złożonych fenotypów składających się z kombinacji WA oraz W PCNA (analiza wybrany fenotyp vs inni), spośród wszystkich możliwych kombinacji jedyną znamienność statystyczną stwierdzono dla podgrupy o fenotypie o bardzo wysokim WA oraz o bardzo wysokim W PCNA. Chorzy o tym fenotypie mieli znamienne krótszy czas wolny do nawrotu choroby ( $p=0.003$ , współczynnik ryzyka (WR) 2.90, 95% zakres ufności (95% ZU) 2.18-3.62) oraz czas całkowitego przeżycia w stosunku do pozostałych chorych ( $p=0.001$ , WR 3.27, 95% ZU 2.55-3.99) (rycina 26).

W analizie złożonych fenotypów składających się z kombinacji WA oraz białka pRb (analiza wybrany fenotyp vs inni), spośród wszystkich możliwych kombinacji znamienność stwierdzono jedynie dla podgrupy o fenotypie o bardzo niskim WA oraz braku obecności białka pRb. Chorzy o tym fenotypie mieli znamienne skrócony czas wolny do nawrotu choroby ( $p=0.04$ , WR 1.66, 95% ZU 0.99-2.29) oraz czas całkowitego przeżycia w stosunku do pozostałych chorych ( $p=0.04$ , WR 1.96, 95% ZU 1.31-2.61) (rycina 27).



Ryc. 26. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer'a u chorych z fenotypem o bardzo wysokim W PCNA oraz bardzo wysokim WA (N=9) w stosunku do pozostałych chorych (N=109).

Fig. 26. Kaplan-Meier overall survival curve for patients with very high PCNA LI and very high AI (N=9) vs other patients (N=109).



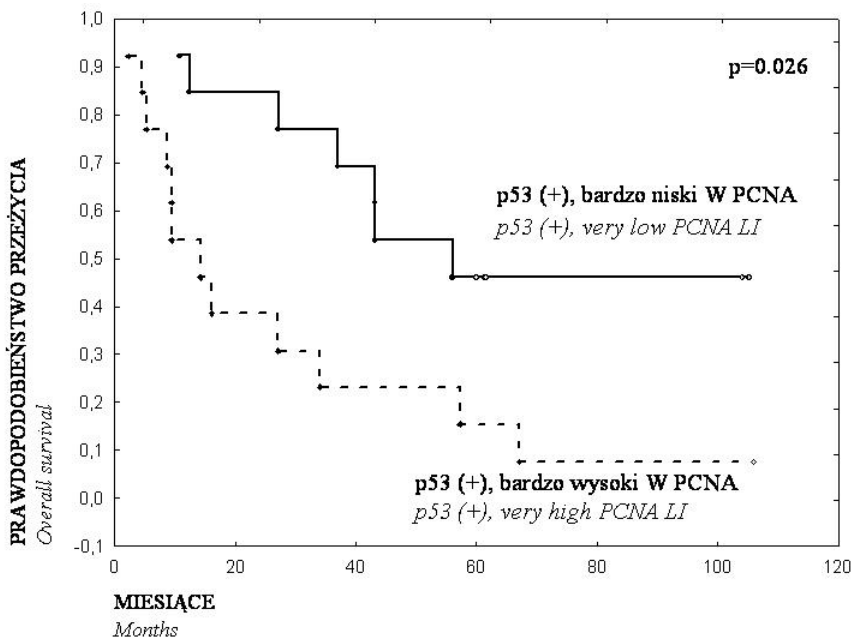
Ryc. 27. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meyer'a u chorych z fenotypem o bardzo niskim WA oraz ujemną ekspresją białka pRb (N=13) w stosunku do pozostałych chorych (N=157).

Fig. 27. Kaplan-Meier overall survival curve for patients with very low AI and negative pRb protein expression (N=13) vs other patients (N=157).

Podczas analizy innych złożonych fenotypów (analiza wybrany fenotyp vs inni), składających się ze WA oraz białek p53, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1, nie stwierdzono różnic w czasie wolnym do nawrotu choroby oraz w całkowitym czasie przeżycia.

### Wskaźnik ekspresji PCNA

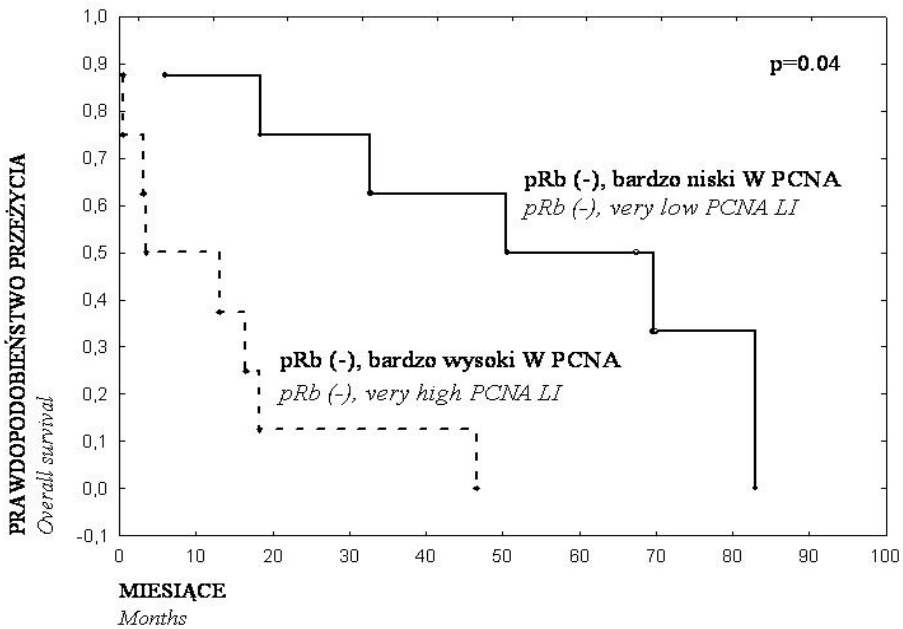
Spośród wszystkich możliwych kombinacji fenotypów W PCNA oraz ekspresji białka p53 (analiza wybrany fenotyp vs inni), nie stwierdzono różnicy w czasie do nawrotu choroby ani w czasie całkowitego przeżycia. Natomiast w podgrupie chorych z obecnością białka p53 (p53+), chorzy z dodatkowo bardzo wysokim W PCNA mieli znamienne krótszy czas do nawrotu choroby ( $p=0.03$ , WR 1.36, 95% ZU 1.07-1.64) oraz krótszy całkowity czas przeżycia ( $p=0.026$ , WR 1.39, 95% ZU 1.10-1.67) w stosunku do chorych z fenotypem p53+/ bardzo niski W PCNA (rycina 28).



Ryc. 28. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meier'a w podgrupie chorych z fenotypem o dodatniej ekspresji białka p53, o bardzo niskim W PCNA (N=13) w stosunku do chorych o bardzo wysokim W PCNA (N=13).

Fig. 28. Kaplan-Meier overall survival curve for subgroup of patients with p53 positive protein expression, with very low PCNA LI (N=13) vs patients with very high PCNA LI (N=13).

Spośród wszystkich możliwych kombinacji fenotypów W PCNA oraz ekspresji białka pRb (analiza wybrany fenotyp vs inni), nie stwierdzono różnicy w czasie do nawrotu choroby ani w czasie całkowitego przeżycia. Natomiast w podgrupie chorych z brakiem ekspresji białka pRb (pRb-), chorzy z bardzo wysokim W PCNA mieli znamienne krótszy czas do nawrotu choroby ( $p=0.04$ , WR 1.45, 95% ZU 1.09-1.81) oraz całkowity czas przeżycia ( $p=0.04$ , WR 1.47, 95% ZU 1.09-1.82) w porównaniu do chorych z brakiem ekspresji białka pRb (pRb-) oraz z bardzo niskim W PCNA (rycina 29).



Ryc. 29. Krzywa przeżycia całkowitego Kaplana-Meier'a w podgrupie chorych z fenotypem o ujemnej ekspresji białka pRb, o bardzo niskim W PCNA (N=8) w stosunku do chorych o bardzo wysokim W PCNA (N=7).

Fig. 29. Kaplan-Meier overall survival curve for subgroup of patients without pRb protein expression, with very low PCNA LI (N=8) vs patients with very high PCNA LI (N=7).

Spośród pozostałych fenotypów W PCNA oraz ekspresji białka mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1 (analiza wybrany fenotyp vs inni), żaden nie wpływał na czas wolny od nawrotu oraz na czas całkowitego przeżycia.

### **Białko p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, cyklina D1**

Pomiędzy wszystkimi możliwymi fenotypami p53/pRb, p53/mdm2, mdm2/pRb, p53/p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p53/cyklina D1, pRb/p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, pRb/cyklina D1, mdm2/p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, mdm2/cyklina D1, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>/cyklina D1 nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w czasie do nawrotu choroby oraz czasie

całkowitego przeżycia. W tabeli 21 przedstawiono przykładowe wyniki dotyczące kombinacji fenotypów białek p53, pRb oraz mdm2. Zawiera ona również wyniki dla fenotypu złożonego łącznie z trzech analizowanych parametrów.

Tab. 21. Wpływ złożonych fenotypów p53/pRb/mdm2 na czas do nawrotu choroby oraz na czas całkowitego przeżycia (N=197, analiza jednoczynnikowa).

Tab. 21. *The impact of p53/pRb/mdm2 combined phenotypes on disease-free and overall survival (N=197, univariate analysis).*

Podgrupy chorych <i>Patient subgroups</i>	No. (%)	Czas do nawrotu choroby <i>Disease-free survival</i>		Całkowity czas przeżycia <i>Overall survival</i>	
		<i>P</i>	WR*(95% ZU**) <i>HR* (95% CI**)</i>	<i>P</i>	WR*(95% ZU**) <i>HR* (95% CI**)</i>
mdm2+/p53+ vs inni ( <i>others</i> )	30 (15%)	0.93	1.02 (0.55-1.49)	0.61	1.16 (0.59-1.73)
mdm2+/p53- vs inni ( <i>others</i> )	42 (21%)	0.60	0.89 (0.48-1.31)	0.69	0.92 (0.49-1.34)
mdm2-/p53+ vs inni ( <i>others</i> )	64 (33%)	0.85	1.03 (0.68-1.38)	0.72	1.09 (0.61-1.56)
mdm2-/p53- vs inni ( <i>others</i> )	61 (31%)	0.83	1.04 (0.68-1.39)	0.81	1.06 (0.57-1.54)
<hr/>					
mdm2+/pRb+ vs inni ( <i>others</i> )	30 (15%)	0.97	0.99 (0.46-1.52)	0.74	1.09 (0.57-1.62)
mdm2+/pRb- vs inni ( <i>others</i> )	42 (21%)	0.64	0.89 (0.42-1.37)	0.81	0.94 (0.46-1.43)
mdm2-/pRb+ vs inni ( <i>others</i> )	64 (33%)	0.98	0.99 (0.58-1.40)	0.90	1.03 (0.61-1.45)
mdm2-/pRb- vs inni ( <i>others</i> )	61 (31%)	0.83	1.04 (0.68-1.39)	0.94	0.98 (0.62-1.35)
<hr/>					
mdm2+/p53+/pRb+ vs inni ( <i>others</i> )	24 (12%)	0.32	1.28 (0.78-1.78)	0.22	1.36 (0.87-1.85)
mdm2+/p53+/pRb- vs inni ( <i>others</i> )	6 (3%)	0.09	0.19 (-1.78-2.15)	0.12	0.21 (-1.76-2.20)
mdm2+/p53-/pRb+ vs inni ( <i>others</i> )	32 (16%)	0.98	0.99 (0.54-1.45)	0.94	1.01 (0.54-1.48)
mdm2+/p53-/pRb- vs inni ( <i>others</i> )	10 (5%)	0.29	0.61 (-0.28-1.51)	0.42	0.69 (-0.21-1.59)
mdm2-/p53+/pRb+ vs inni ( <i>others</i> )	46 (23%)	0.98	0.99 (0.55-1.43)	0.80	0.94 (0.49-1.39)
mdm2-/p53+/pRb- vs inni ( <i>others</i> )	18 (10%)	0.38	1.30 (0.70-1.90)	0.43	1.27 (0.68-1.87)
mdm2-/p53-/pRb+ vs inni ( <i>others</i> )	41 (21%)	0.64	1.11 (0.65-1.57)	0.92	1.02 (0.56-1.48)
mdm2-/p53-/pRb- vs inni ( <i>others</i> )	20 (10%)	0.98	0.99 (0.39-1.59)	0.85	0.94 (0.33-1.56)
<hr/>					
mdm2+/p53+/pRb- vs mdm2-/p53-/pRb+	6 (13%) 41 (87%)	0.10	5.33 (3.34-7.33)	0.12	4.83 (2.83-6.83)

WR\* - współczynnik ryzyka, 95% ZU\*\* - 95% zakres ufności

HR\* - hazard ratio, 95% CI\*\* - 95% confidence interval

## 5.10. Rokownicze znaczenie wszystkich określonych parametrów analizowanych łącznie

W grupie 115 chorych dokonano oceny wpływu wszystkich analizowanych cech na czas do nawrotu choroby oraz na czas całkowitego przeżycia. W analizie wieloczynnikowej spośród wszystkich analizowanych cech klinicznych, demograficznych i parametrów biologicznych obejmujących wiek i płeć chorych, stopień zaawansowania klinicznego choroby, rodzaj histopatologiczny guza oraz stopień jego zróżnicowania, WA, W PCNA, ekspresję białka p53, pRb, mdm2,

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1, jedynie stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz stopień zróżnicowania guza nowotworowego miały wpływ na czas do nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (tabela 22).

Tab. 22. Analiza wieloczynnikowa oparta na modelu Cox'a obejmująca wpływ cech klinicznych chorych oraz wszystkich określonych parametrów na czas przeżycia wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia (N=115).

Tab. 22. *Multivariate Cox proportional hazard model analysis concerning the impact of all patients characteristics and all analyzed parameters on disease-free and overall survival (N=115).*

	Przeżycie wolne od nawrotu <i>Disease-free survival</i>		Ogólne przeżycie <i>Overall survival</i>	
	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)	p	WR*(95% ZU**) HR* (95% CI**)
Wskaźnik apoptotyczny <i>Apoptotic index</i>	0.61	1.05 (0.85-1.24)	0.98	1.00 (0.81-1.20)
Ekspresja białka mdm2 <i>mdm2 protein expression</i>	0.73	1.09 (0.55-1.64)	0.54	1.17 (0.65-1.70)
Ekspresja białka pRb <i>pRb protein expression</i>	0.45	0.82 (0.31-1.33)	0.25	0.73 (0.22-1.25)
Ekspresja białka p53 <i>p53 protein expression</i>	0.84	0.95 (0.48-1.4)	0.65	0.89 (0.43-1.36)
Wskaźnik ekspresji PCNA <i>PCNA labeling index</i>	0.35	1.11 (0.89-1.32)	0.20	1.15 (0.93-1.36)
Ekspresja białka p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> <i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression</i>	0.15	1.39 (0.93-1.86)	0.09	1.49 (1.02-1.96)
Ekspresja cykliny D1 <i>cyclin D1 expression</i>	0.98	0.99 (0.44-1.54)	0.45	0.82 (0.26-1.38)
Płeć <i>Sex</i>	0.46	1.21 (0.69-1.74)	0.36	1.28 (0.74-1.82)
Wiek <i>Age</i>	0.61	1.13 (0.63-1.64)	0.44	1.22 (0.71-1.75)
Typ histologiczny nowotworu <i>Histology</i>	0.88	1.01 (0.81-1.21)	0.77	1.02 (0.82-1.22)
Stopień zaawansowania klinicznego <i>Stage of disease</i>	<0.001	1.67 (1.45-1.89)	<0.001	1.81 (1.58-2.04)
Stopień zróżnicowania nowotworu <i>Grade</i>	0.04	1.48 (1.07-1.89)	0.03	1.58 (1.16-2.01)



## 6. OMÓWIENIE

W niniejszej rozprawie podjęto próbę oceny klinicznego znaczenia wskaźnika apoptotycznego w powiązaniu z wybranymi parametrami uczestniczącymi w regulacji cyklu komórkowego u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. Pośród wielu białek uczestniczących w tej regulacji oceniono ekspresję białka p53, PCNA, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 w komórkach NDKRP. Wszystkie analizowane parametry oceniono łącznie w dużej grupie chorych, określając zależność pomiędzy nimi a wybranymi cechami klinicznymi. Badano również wartość rokowniczą wszystkich analizowanych czynników, rozpatrywanych pojedynczo lub łącznie. Część aspektów poruszonych w niniejszej rozprawie nie była dotychczas badana w odniesieniu do NDKRP. Dlatego w dyskusji niektóre uzyskane wyniki odnoszono do prac dotyczących innych nowotworów złośliwych.

### 6.1. Ocena zróżnicowania wskaźnika apoptotycznego, wskaźnika ekspresji PCNA oraz obecności białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1

#### *Wskaźnik apoptotyczny*

W przedstawionej analizie, podobnie do innych autorów, apoptoza komórek nowotworowych zastała oznaczona przy użyciu techniki TUNEL [64, 100, 110, 120, 150, 171, 174, 175, 179]. 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 [176]. Z uwagi na możliwość reakcji fałszywie dodatnich, związanych z obecnością komórek martwiczych, badanie apoptozy za pomocą techniki TUNEL nie jest pozbawione ograniczeń [151]. Aby wykluczyć martwicę, w niniejszej pracy (podobnie jak w pracach innych autorów) ocenę apoptozy przeprowadzono z równoczesnym badaniem tego samego skrawka guza barwionego hematoksyliną-eozyną [64, 171, 174-176]. Z drugiej strony przedłużony okres utrwalania tkanek w formalinie może powodować fałszywie ujemny wynik reakcji TUNEL [24], dlatego też część autorów wykluczyła z analizy przypadki, w których nie stwierdzono ani jednej komórki apoptotycznej [150]. W niniejszej rozprawie całkowity brak obecności komórek apoptotycznych stwierdzono jedynie w 2 przypadkach (1%). Ze względu na małą liczebność, chorych tych nie wykluczono z analizy.

W większości opracowań (włączając niniejszą analizę), występowanie komórek apoptotycznych wyrażano pod postacią wskaźnika apoptotycznego (WA, *Apoptotic Index - AI*), określającego łączną liczbę komórek apoptotycznych

występujących wśród 1000 komórek nowotworowych [64, 100, 110, 120, 150, 171, 174-176, 179]. W przedstawionej pracy średnia wartość WA dla całej grupy 170 chorych wynosiła 12 (mediana 8), oba wyniki były porównywalne z wynikami przedstawionymi przez innych autorów, w których średnia wartość WA w komórkach NDKRP kształtowała się w zakresie od 11 - 23 (mediana 8-15) [64, 120, 150, 174-176, 179]. W poprzedniej pracy naszego zespołu [35], w niewielkiej grupie 50 chorych z NDKRP średnia wartość oraz mediana WA były podobne i wynosiły odpowiednio 14 i 9.

Trudności w porównywaniu wyników WA w komórkach NDKRP prezentowanych przez różnych autorów wynikają z faktu różnego podziału chorych na podgrupy podczas analizy statystycznej. Część autorów (włączając niniejszą rozprawę) [150, 174, 176] posługiwała się podziałem opartym na medianie oraz dolnym i górnym kwartylu, inni natomiast dzielili badaną grupę na dwie podgrupy, opierając podział jedynie na średniej wartości WA [64, 138]. W poprzedniej pracy naszej grupy [35] zastosowano podział na dwie podgrupy. Podział taki wynikał z faktu niskiej liczebności przedstawianych wówczas przypadków (N=50), podczas gdy obecna analiza dotyczy 170 chorych na NDKRP. Wydaje się, że podział chorych na cztery podgrupy (z uwzględnieniem mediany, dolnego i górnego kwartyła) jest lepszy, bowiem umożliwia dokładniejszą analizę, choć wymaga również większej liczebnie grupy.

### ***Wskaźnik ekspresji PCNA***

W przedstawionej analizie, jądrową ekspresję białka PCNA stwierdzono w przeważającej części przypadków (97%). Wyniki te potwierdzają poprzednie doniesienia o bardzo wysokiej częstości występowania białka PCNA w NDKRP [20, 37, 40, 44, 45, 49].

Aby ułatwić porównanie otrzymanych wyników z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, ekspresję PCNA wyrażono w niniejszej rozprawie pod postacią wskaźnika ekspresji PCNA (W PCNA, *PCNA labeling index* - *PCNA LI*) [44, 50, 92, 101, 121, 140, 176, 178]. Część autorów, nagromadzenie PCNA prezentowała w postaci odsetka wybarwionych jąder w polu widzenia [9, 30, 37, 40, 79, 173]. Procentowy sposób wyrażania nagromadzenia PCNA zastosowano również we wcześniejszej pracy naszego zespołu, dotyczącej chorych na NDKRP pochodzących z Pomorza Gdańskiego [30].

Wskaźnik ekspresji PCNA (definiowany jako średni procent wybarwionych komórek na 1000 komórek nowotworowych) określa dokładniej odsetek wybarwionych jąder komórkowych. Wskaźnik PCNA wymaga przejrzania większej liczby komórek nowotworowych, ponieważ do jego oceny konieczne jest obejrzenie średnio 10 pól widzenia. Ocena wielu pól widzenia jest szczególnie ważna w odniesieniu do guzów z nierównomiernym rozmieszczeniem dodatnio wybarwionych jąder komórkowych. Białko PCNA charakteryzuje się dużą różnorodnością pomiędzy różnymi fragmentami tego samego guza, sprawiając, że ostateczna ocena

odsetka wybarwionych jąder komórkowych ściśle zależy od wielkości ocenianego preparatu oraz od liczby obejrzanych pól widzenia [40, 178].

Z uwagi na wysoką częstość (ponad 90% przypadków) występowania białka PCNA w NDKRP, wielu autorów podobnie jak w niniejszej pracy, analizuje wyniki barwienia dla PCNA jako zmienną ciągłą a następnie kategoryzuje zmienną (dzieląc badaną grupę na podstawie mediany oraz dolnego i górnego kwartyła). Analiza taka daje lepszą możliwość oceny klinicznego znaczenia wskaźnika ekspresji PCNA niż podział badanej grupy jedynie na podgrupy o dodatnim lub ujemnym barwieniu [30, 37, 40, 79, 173].

Dodatkowych trudności w porównywaniu wyników prac pomiędzy sobą przysparza fakt, że autorzy dzielący chorych jedynie na podgrupę dodatnią i ujemną, używali różnych punktów odcięcia obejmujących próg 0% [9, 37, 44], 1% [40, 173], 5% [79] lub 10% [30, 140]. Z tego powodu, przykładowo w pracy Ebiny i wsp. [37], przy punkcie odcięcia 0% obecność białka PCNA stwierdzono w 98% guzów, natomiast tylko w 80%, gdy za dodatnie uznano guzy wykazujące >10% dodatnich komórek w preparacie. Rozbieżności dotyczące techniki liczenia odsetka dodatnich komórek w guzie oraz sposobu podziału grupy jasno pokazują konieczność standaryzacji oceny występowania białka PCNA w przyszłych badaniach.

### ***Ekspresja białek p53, mdm2, pRb, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1***

W przeprowadzonym badaniu obecność białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 stwierdzono odpowiednio w 47%, 71%, 37%, 65% i 40% przypadków NDKRP.

W odniesieniu do NDKRP istnieje bogate piśmiennictwo dotyczące oceny występowania białka p53. W pracach tych ekspresja białka p53 kształtuje się na poziomie od 42 do 72%, tak więc wynik uzyskany w niniejszej rozprawie (47%) znajduje się w dolnym przedziale wyników opublikowanych przez innych autorów [7, 19, 37, 40, 46, 53, 54, 68, 102, 122, 146, 183, 189]. W przedstawionej pracy białko pRb występowało w 71%, w 29% przypadków stwierdzono całkowity brak obecności białka pRb. W pracach innych autorów nad występowaniem białka pRb w NDKRP, odsetek przypadków, u których w komórkach guza doszło do utraty funkcjonalnego białka pRb wahał się w przedziale od 6 do 32% [4, 11, 13, 26, 34, 72, 94, 102, 116, 136, 154, 187, 189, 191]. W niniejszej rozprawie, obecność białka mdm2 stwierdzono w 37% przypadków NDKRP. Odsetek ten znajduje się w szerokim zakresie wyników opublikowanych przez innych autorów, kształtującym się w przedziale od 6 do 78% [2, 43, 53, 57, 70, 89, 90, 114, 192, 193]. W piśmiennictwie odsetek guzów z obecnością białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach NDKRP wahał się pomiędzy 27% a 80% [2, 5, 18, 31, 42, 61, 91, 115, 163, 172, 184, 192, 193], natomiast w niniejszej analizie wynosił on 65%. W badanym materiale NDKRP, obecność cykliny D1 stwierdzono w 40% przypadków. W pracach innych autorów dotyczących tego nowotworu

cyklinę D1 obserwowano w 12 - 57% przypadków [6, 11, 13, 17, 32, 78, 83, 86, 98, 116, 119, 124, 135, 136, 157, 182].

Tak duża rozpiętość w występowaniu poszczególnych białek w NDKRP obserwowana w piśmiennictwie, zwłaszcza białka mdm2, może wynikać z wielu przyczyn. Jedną z nich wydają się być różnice metodologiczne dotyczące użyciego przeciwciała pierwotnego, skierowanego przeciwko odpowiedniemu białku oraz czułość systemu detekcyjnego. Kolejnym czynnikiem utrudniającym porównywanie wyników różnych autorów jest fakt, że niektórzy z nich za ekspresję dodatnią uznają nagromadzenie produktu białkowego również w cytoplazmie [6, 11]. W niniejszej pracy, podobnie jak w innych opracowaniach [13, 116, 136], barwienia znajdujące się poza jądrem komórkowym uznano za niespecyficzne [13, 32]. Następną istotną kwestią są niejednolite punkty odcięcia, przy których preparaty zostały zakwalifikowane jako dodatnie. Przykładowo dla białka p53 stosowano progi odcięcia na poziomie 1% [102], 5% [189], 10% [72] lub nawet 50% [113], dla białka pRb punkt odcięcia od 0% [72, 189, 191], przez 1% [102], 5% [11] do 20% [154], dla białka mdm2 od 0% [54, 185], przez 5% [169] do 10% [53, 70] a dla białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> od 0% [10], przez 1% [5], 5% [91, 163] do 10% [2, 192, 193].

Wysokość progu odcięcia pozostaje kwestią nierozstrzygniętą. W odniesieniu do pRb, wydaje się, że utratę funkcji genu *RB* stwierdza się tylko w przypadku guzów z całkowitym brakiem ekspresji tego białka [72, 189, 191]. Założenie to potwierdza fakt, że ilość białka pRb zależy od fazy cyklu komórkowego, w której znajduje się dana komórka [190]. Zatem niska ekspresja lub nawet jej brak w części guza, nie dowodzi jeszcze całkowitej utraty funkcji genu *RB*. Po wyższego toku rozumowania nie można jednak odnieść do pozostałych analizowanych białek, w odniesieniu do których o zaburzeniu funkcji genu świadczy nagromadzenie się produktu białkowego, kodowanego przez dany gen.

W przeprowadzonym badaniu, podobnie do innych autorów [10, 56, 72, 185, 189], celem ujednoczenia analizy i ułatwienia interpretacji wyników, za dodatnie uznano tkanki nowotworowe, które wykazywały jakąkolwiek, jądrową ekspresję badanych białek ( $\geq 1\%$ ) (jakkolwiek analizę statystyczną przeprowadzono dla różnych punktów odcięcia).

Pomimo wyżej wymienionych trudności w interpretacji wyników różnych autorów, należy podkreślić, że zarówno reakcja TUNEL jak i metoda immunohistochemiczna charakteryzują się wysoką powtarzalnością oraz prostotą wykonania. Cechuje je również, w porównaniu np. do badań molekularnych, relatywnie niski koszt analiz [195]. Dodatkowym atutem tego typu badań jest fakt, że materiał biologiczny wykorzystywany do oznaczeń nie wymaga skomplikowanej obróbki, ponieważ skrawki utrwalone są w zbuforowanej formalinie i przechowywane w postaci bloków parafinowych. Oznaczenie może zostać wykonane nawet po wielu latach od momentu pobrania tkanki guza. Do badania wystarczy

niewielka ilości materiału, co pozwala na wykonanie wielu oznaczeń u tego samego chorego. Podsumowując, metody użyte w niniejszej pracy stwarzają szansę zastosowania powyższych barwień w codziennej praktyce [195].

## 6.2. Ocena zależności pomiędzy wskaźnikiem apoptotycznym, wskaźnikiem ekspresji PCNA, białkiem p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliną D1

Dzięki analizie wielu parametrów, biorących udział w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy, można w kompleksowy sposób ocenić szereg zaburzeń obserwowanych w komórkach NDKRP. Wspólne rozpatrywanie wszystkich analizowanych cech pozwala przybliżyć zrozumienie patomechanizmów prowadzących do powstania i rozwoju komórek nowotworowych. Jak dotąd w odniesieniu do wielu białek komercyjnie dostępne przeciwciała nie pozwalają w pełni ustalić typu zaburzeń, do których doszło podczas onkogenezy. Dotyczy to przede wszystkim białek p53 oraz pRb, kluczowych w regulacji cyklu komórkowego. Ocena współwystępowania czynników, których ekspresja podlega regulacji przez białka p53 i pRb, może w znacznym stopniu poszerzyć nasze rozumienie, jakie funkcje danego genu zostały zaburzone w komórce nowotworowej. I tak np. obecność białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w pełniejszy sposób ocenia stan funkcjonalny genu *P53* niż sama ocena występowania białka p53. Dzieje się tak, ponieważ białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ulega akumulacji w przypadku pobudzenia genu *P53* [39]. Jak już wspomniano wcześniej czas półtrwania niezmutowanego białka p53 jest na tyle krótki, że nie pozwala na wykrycie jego obecności za pomocą technik immunohistochemicznych [69]. Natomiast w komórkach nowotworowych, które utraciły zdrowe – „dzikie” białko p53 lub zawierają jego zmutowaną formę, praktycznie nie obserwuje się obecności białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> lub jego ekspresja jest bardzo niska. Z tego względu ekspresja białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> może dokładniej niż samo nagromadzenie białka p53, oceniać funkcję genu *P53* [38].

Równowaga pomiędzy proliferacją komórkową a apoptozą oceniana była w wielu nowotworach złośliwych [150, 176, 179]. Sugeruje się, że rozrost guza nowotworowego może wynikać ze zwiększonej proliferacji, zahamowania apoptozy lub z obu przyczyn łącznie [150]. W pracach dotyczących chłoniaków złośliwych, nowotworów złośliwych jelita grubego czy piersi, stwierdzano silny związek pomiędzy nasileniem apoptozy a wzrostem różnych wskaźników proliferacji komórkowej [84, 177, 180]. W NDKRP stwierdzono również zależność pomiędzy WA a wskaźnikiem mitotycznym [120, 138] oraz ekspresją białka PCNA [120, 176].

W jednej z najciekawszych prac oceniających łącznie WA oraz W PCNA w komórkach NDKRP (N=236) [174], podobnie jak w niniejszej rozprawie, chorych podzielono na cztery podgrupy (na podstawie mediany oraz dolnego

i górnego kwartyla) o bardzo niskim, niskim, wysokim i bardzo wysokim WA. Autorzy tej pracy sugerowali ścisły związek pomiędzy apoptozą a proliferacją komórek NDKRP, ponieważ wzrostowi WA towarzyszyło podwyższenie średniego wskaźnika proliferacji [174]. W kolejnej pracy tych samych autorów sugerowano, że zwiększony odsetek komórek apoptotycznych jest skutkiem aktywacji proliferacji komórkowej, ale tylko przy zachowanych prawidłowo działających mechanizmach pobudzających apoptozę tj. w przypadku obecności „dzikiego” białka p53 [176]. Przedstawiona analiza, podobnie do prac Puglisiego i wsp. [150] oraz Tormanena i wsp. [179], pozostaje w sprzeczności do obserwacji Tanaki i wsp. [174] o zależności pomiędzy markerami proliferacji i apoptozy w komórkach NDKRP.

W niniejszej rozprawie stwierdzono brak zależności pomiędzy wysokością WA a obecnością innych analizowanych białek uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego (tj. p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cyklina D1). Brak zależności pomiędzy WA a akumulacją białka p53 [138, 150, 174, 179] oraz WA a nagromadzeniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [163] w komórkach NDKRP potwierdzają także inni autorzy. W dostępnym piśmiennictwie nie ma prac oceniających związków pomiędzy WA a cyklina D1 w przypadkach NDKRP, natomiast w nowotworach okolicy głowy i szyi podwyższona liczba komórek apoptotycznych wiązała się z nagromadzeniem cykliny D1 [93].

W poprzednim badaniu naszego zespołu obserwowano zależność pomiędzy niskim WA a obecnością białka mdm2 [35]. Obserwacja ta mogłaby mieć podstawy teoretyczne, ponieważ białko mdm2 jest inhibitorem apoptozy [128, 147]. Przedstawione badanie wykonane na znacznie większej liczbie przypadków nie potwierdziło poprzedniej obserwacji.

W przedstawionej pracy analizowano związek pomiędzy W PCNA a występowaniem innych białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. W badaniach na liniach komórkowych wykazano, że białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jako inhibitor PCNA, blokuje replikację DNA oraz proliferację komórkową [105, 106]. W przedstawionej analizie, podobnie do innych autorów [61, 163], nie stwierdzono jednak zależności pomiędzy występowaniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a W PCNA w komórkach NDKRP. Stwierdzono natomiast silny związek pomiędzy zwiększoną proliferacją komórkową a nagromadzeniem cykliny D1. W raku pęcherza moczowego wyższy wskaźnik proliferacji komórek nowotworowych wiązał się również z obecnością cykliny D1 [106]. Przeciwnie inni autorzy w grupie chorych na NDKRP [119] czy w nowotworach okolicy głowy i szyi [93] nie obserwowali związku pomiędzy podziałem komórkowym a obecnością cykliny D1.

W dostępnym piśmiennictwie istnieje zaledwie kilka publikacji, w których analizowano łączne występowanie białek p53 i mdm2 w raku płuca. W obecnej analizie nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem tych białek. Po-

dobnie, w pracach innych autorów dotyczących raka płuca [53, 55, 70, 152] nie stwierdzano powyższej zależności, nawet w przypadku, gdy analizowano jedynie podgrupę guzów z bardzo silną ekspresją białka p53 [152]. Z tego powodu sugeruje się ostatnio, że funkcja mdm2 nie ogranicza się tylko do regulacji ilości białka p53 [53]. Obserwacje te mogą potwierdzać hipotezę, że mdm2 odgrywa również istotną rolę w procesie nowotworzenia, bez powiązania z p53 [185]. W przeciwieństwie do tej hipotezy pozostają wyniki Marchetti'ego i wsp. [114], gdzie dodatnia ekspresja białka mdm2 wiązała się z wysoką, dodatnią ekspresją białka p53 w komórkach NDKRP.

W niniejszej analizie, podobnie jak w innych pracach nad NDKRP [163] oraz rakiem pęcherza moczowego [106], nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem białka p53 oraz podlegającego jego kontroli białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Z kolei w nowotworach jelita grubego zaobserwowano, że nagromadzeniu białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> towarzyszy brak ekspresji białka p53 [15].

Interesującym spostrzeżeniem zawartym w niniejszej rozprawie była zależność pomiędzy akumulacją produktu białkowego protoonkogenu *MDM2* oraz białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Podobny związek stwierdzano już w komórkach NDKRP [2]. W chwili obecnej trudno jest wyjaśnić bezpośredni związek pomiędzy funkcjonowaniem białek mdm2 oraz p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Do zwiększenia produkcji białka mdm2 może dojść w wyniku amplifikacji genu *MDM2*, jego zwiększonej transkrypcji lub translacji [185]. Białko p53 pobudza powstawanie białka mdm2, które w pętli sprzężenia zwrotnego, hamuje białko p53 [186]. Z drugiej strony do nagromadzenia się białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> może dojść poprzez pobudzenie jego produkcji również przez zdrowe białko p53 [38, 39]. Być może wspólne nagromadzenie się obu białek jest konsekwencją tego samego procesu – aktywacji genu *P53*. Możliwe jest także, że białka mdm2 i p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wiążą się ze sobą w sposób niezależny od białka p53 [2, 115]. Ostatnia hipoteza znajduje potwierdzenie w niniejszej rozprawie oraz w pracy Aikawy i wsp., w której wykazano istnienie związku pomiędzy białkiem mdm2 i p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, czemu nie towarzyszył związek pomiędzy występowaniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a p53 oraz p53 a mdm2 [2].

W przedstawionym materiale najwięcej zależności stwierdzono w stosunku do cykliny D1. Obserwowano zależność pomiędzy nagromadzeniem cykliny D1 a obecnością białka pRb, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz białka mdm2. Ekspresja cykliny D1 wiązała się również z brakiem obecności białka p53. Nagromadzenie białka pRb świadczy o tym, że komórka nowotworowa zachowała zdolność do wytwarzania zdrowego białka pRb. W badaniach *in vivo* wykazano, że nagromadzenie się cykliny D1 w komórkach z obecnością białka pRb może gwałtownie pobudzać fosforylację białka pRb oraz skracać fazę G<sub>1</sub> cyklu komórkowego [159]. Metoda immunohistochemiczna z użyciem komercyjnie dostępnych przeciwciał nie pozwala na dokładne określenie, czy w danej komórce doszło do akumulacji czynnej (nieufosforylowanej) czy też nieczynnej (ufosforylowanej) formy białka pRb. Korelację pomiędzy obecnością cykliny D1 oraz występowaniem białka pRb

stwierdzono w innych pracach dotyczących NDKRP [13, 116], jakkolwiek istnieją doniesienia, które nie potwierdzają tej zależności [136]. Z uwagi na fakt, że cyklina D1 uczestniczy w procesie przemiany białka pRb z formy aktywnej w formę nieaktywną, poznanie tego zjawiska byłoby szczególnie cenne.

Kolejne spostrzeżenie w przedstawionym materiale dotyczyło współwystępowania cykliny D1 oraz białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Taką zależność obserwowali również inni autorzy w przypadkach NDKRP [13], raka pęcherza moczowego [106] oraz nowotworów jelita grubego [71]. Do tej pory podkreślano jedynie wspólne uczestnictwo cykliny D1 oraz białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w regulacji procesu fosforylacji białka pRb [38, 39]. Coraz więcej danych sugeruje jednak, że pomiędzy tymi białkami istnieje dodatkowo inny związek. Jego ustalenie wydaje się być szczególnie istotne, zwłaszcza, że oba białka uczestniczą w regulacji tej samej fazy cyklu komórkowego oraz z uwagi na postulowaną ostatnio rolę genu *WAF1/CIP1* nie tylko jako genu supresorowego ale również jako protoonkogenu [155].

Silny związek pomiędzy nagromadzeniem cykliny D1 a występowaniem białka mdm2, obserwowany w niniejszej pracy, może podkreślać rolę cyklin D1 w procesie onkogenezy. Wydaje się, że oba protoonkogeny (*CCND1* oraz *MDM2*) aktywowane są niezależnie od siebie, ale równoczesna ich aktywacja prawdopodobnie znacznie zwiększa możliwość rozwoju nowotworu.

W przedstawionej analizie stwierdzono ujemną zależność pomiędzy nagromadzeniem cykliny D1 a występowaniem białka p53 w komórkach NDKRP. W badaniach *in vitro*, gen *P53* zaangażowany był w podwyższenie stężenia cykliny D1 [108, 132]. W niniejszej analizie nie można jednoznacznie określić potencjalnego związku pomiędzy występowaniem cykliny D1 oraz brakiem ekspresji białka p53. Wynika to z faktu, że brak ekspresji białka p53 może być spowodowany zarówno obecnością „dzikiego” białka p53 (które z powodu krótkiego czasu półtrwania nie jest wykrywalne za pomocą metody immunohistochemicznej), jak i brakiem produkcji białka p53. Z drugiej strony ekspresja białka p53 może wynikać z nagromadzenia się zmutowanego białka p53 (które posiadając dłuższy czas półtrwania jest wykrywane immunohistochemicznie), lub z faktu stabilizacji białka p53 po połączeniu z innymi białkami. Komercyjnie dostępne przeciwciała przeciwko białku p53 nie pozwalają na odróżnienie tych form białek. Nie można więc jednoznacznie wypowiedzieć się na temat związku pomiędzy gromadzeniem produktu białkowego protoonkogenu *CCND1* oraz brakiem ekspresji białka p53.

W badaniach na liniach komórkowych wykazano, że cyklina D1 uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego poprzez interakcję z białkiem pRb [28], PCNA i p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [188]. Natomiast białko p53 poprzez białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, powoduje wzrost ilości cykliny D1 [22]. W sytuacji gdy w komórce dochodzi do nagromadzenia się białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, dołącza się ono do kompleksu składającego się



cykliny D1 oraz zależnych od cyklin kinaz. Połączenie p21<sup>WAF1/CIP1</sup> z powyższym kompleksem uniemożliwia fosforylację białka pRb oraz kontynuację cyklu komórkowego [22]. W jednej z prac nad NDKRP podobnie jak w przedstawionej rozprawie, obecność białek p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, pRb oraz cykliny D1 były ze sobą ściśle powiązane [184]. Istnieją również prace, w których nie stwierdzono korelacji pomiędzy występowaniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, cykliny D1 i pRb [157].

Podsumowując, wydaje się, że wspólna ocena wielu parametrów uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy pozwala w szerszy sposób uwidocznić złożoność mechanizmów zaangażowanych w proces onkogenezy oraz wskazać na nowe możliwości i kierunki ich badania.

### **6.3. Ocena zależności pomiędzy wskaźnikiem apoptotycznym, wskaźnikiem ekspresji PCNA, ekspresją białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 a cechami klinicznymi i demograficznymi**

W przedstawionej analizie badano zależność pomiędzy WA, W PCNA, białkiem p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliną D1 a cechami klinicznymi i demograficznymi chorych z NDKRP. Obejmowały one płeć, wiek w momencie przeprowadzenia zabiegu operacyjnego, stopień zaawansowania klinicznego choroby, rodzaj histopatologiczny guza oraz stopień jego zróżnicowania.

W badanej grupie chorych nie wykazano związku pomiędzy wysokością WA a poszczególnymi cechami klinicznymi. Inni autorzy wykazali natomiast, że w NDKRP wyższy wskaźnik apoptotyczny występował częściej w raku płaskonabłonkowym [64, 150], lub że wyższy WA wiązał się z podtypem gruczolakoraka [179]. W jednej z prac komórki NDKRP o średnim lub niskim stopniu zróżnicowania charakteryzowały się wyższym WA [176]. Podobne obserwacje opisano w odniesieniu do raka pęcherza moczowego, chłoniaków, raków piersi, trzonu macicy, gruczołu krokowego czy tarczycy [103, 162, 167, 181].

W przedstawionej analizie wykazano, że w guzach o niskim stopniu zróżnicowania nowotworu W PCNA był szczególnie wysoki. Podobną zależność pomiędzy stopniem zróżnicowania NDKRP a występowaniem białka PCNA zaobserwowano w pracy Tormanena i wsp. [179], gdzie wyższa ekspresja PCNA korelowała z gorszym zróżnicowaniem guza nowotworowego.

W niniejszej pracy, nie stwierdzono zależności pomiędzy W PCNA, a wiekiem i płcią chorych, stopniem zaawansowania klinicznego choroby oraz typem histopatologicznym guza. W pracach innych autorów wykazano związek pomiędzy W PCNA a typem histopatologicznym nowotworu oraz stopniem zaawansowania klinicznego choroby. W pracach tych wyższe wartości W PCNA występowały w rakach płaskonabłonkowych [174, 175, 179] oraz u chorych z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego choroby [44, 140, 141, 173].

W niniejszej rozprawie nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością białka p53, mdm2 oraz pRb a analizowanymi cechami klinicznymi chorych, nie potwierdzając obserwacji Marchettiiego i wsp. [114] oraz Higashiyamy i wsp. [70] o częstszej ekspresji białka mdm2 w gruczolakorakach. Nie potwierdzono również opisywanej przez Rasidakisa i wsp. [152] oraz Higashiyamę i wsp. [70] zależności pomiędzy występowaniem białka mdm2 i/lub p53 a stopniem zróżnicowania komórek NDKRP. W pracy Aikawy i wsp. [2] obecność białka mdm2 w komórkach NDKRP wiązała się z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego choroby, czego również nie potwierdziła niniejsza analiza.

Dane na temat zależności pomiędzy białkiem p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a cechami klinicznymi chorych na NDKRP są rozbieżne. W jednej z prac białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> występowało częściej u chorych z niższym stopniem zaawansowania klinicznego [91], natomiast w innej uzyskano przeciwne wyniki, ponieważ białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> występowało częściej u chorych z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego choroby [2]. W niektórych pracach białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> występowało częściej w gruczolakorakach niż raku płaskonabłonkowym [2, 192]. W przedstawionej analizie, podobnie do innych autorów [10, 18, 61, 163] nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a cechami klinicznymi chorych na NDKRP.

W obecnej analizie podobnie do innych prac [135, 157] nie stwierdzono również związku pomiędzy występowaniem cykliny D1 a analizowanymi cechami klinicznymi chorych. W niektórych badaniach raki płaskonabłonkowe płuc oraz guzy o niskim stopniu zróżnicowania histopatologicznego, częściej wykazywały obecność cykliny D1 niż gruczolakoraki lub guzy o wysokim i średnim stopniu zróżnicowania [11, 83].

## 6.4. Określenie wartości rokowniczej analizowanych parametrów, ocenianych pojedynczo lub łącznie

### *Wskaźnik apoptotyczny*

Rokownicze znaczenie WA u chorych na NDKRP pozostaje przedmiotem kontrowersji [29]. W części prac zwiększony odsetek komórek apoptotycznych korelował z gorszym [100, 179] lub lepszym rokowaniem [110, 120], podczas gdy w innych pracach nie obserwowano jego związku z przeżyciem [64, 150]. W jednej z prac gorsze rokowanie obserwowano u chorych z pośrednim wskaźnikiem apoptotycznym w porównaniu do chorych z najwyższym i najniższym WA [174].

We wcześniejszej pracy naszego zespołu wykazano gorsze rokowanie u chorych z wysokim wskaźnikiem apoptotycznym w stosunku do grupy chorych z niskim WA [35]. Badanie to przeprowadzone było w grupie 50 chorych na NDKRP, których ze względu na niską liczebność grupy podzielono jedynie na

dwie podgrupy z wysokim i niskim WA. W niniejszej rozprawie obejmującej 170 chorych, podzielonych na cztery podgrupy z bardzo niskim, niskim, wysokim oraz bardzo wysokim WA, nie potwierdzono jednak poprzednio uzyskanych wyników [35]. Zwiększenie liczebności grupy z 50 do 170 przypadków NDKRP poprawia niewątpliwie wiarygodność uzyskanych wyników.

Na podstawie obserwacji innych autorów [100, 174, 179], w poprzedniej analizie naszego zespołu [35] wysunięto hipotezę sugerującą, że wyższy WA korelował z gorszym rokowaniem, ponieważ mógł być konsekwencją zwiększonej proliferacji komórek nowotworowych [150, 176]. Dlatego też w obecnej rozprawie ocenę wartości rokowniczej WA poszerzono o ocenę wskaźnika ekspresji PCNA. Łączna analiza wartości rokowniczej WA i W PCNA pokazała, że najgorzej rokowali chorzy, u których stwierdzono fenotyp o najwyższym WA oraz najwyższym W PCNA. Obserwacja ta potwierdza hipotezę wysuniętą przez innych autorów, o znaczeniu proporcji pomiędzy namnażaniem się komórek, a ich obumieraniem oraz o konieczności łącznej analizy wartości rokowniczej WA oraz W PCNA [150, 176]. W odróżnieniu od przedstawionych wyników, w pracy Puglisiego i wsp. [150], chorzy z fenotypem o niskim WA oraz wysokim wskaźniku proliferacji żyli krócej.

Interesujące wyniki uzyskano w pracy Tanaki i wsp. [174], gdzie po podziale chorych na cztery podgrupy, grupa z najniższym oraz najwyższym WA rokowała lepiej, podczas gdy grupa z pośrednim WA rokowała gorzej. W pracy tej sugerowano, 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. Natomiast w grupie chorych z najwyższym WA (którzy również mieli dłuższe przeżycie), dobre rokowanie wynikało z faktu, że apoptoza przewyższała namnażanie się komórek [174].

W obecnym badaniu gorsze rokowanie stwierdzono u chorych o łącznym fenotypie z bardzo niskim WA oraz brakiem ekspresji białka pRb w porównaniu do pozostałych chorych (fenotyp bardzo niski WA/pRb- vs inni). W piśmiennictwie brak jest prac, do których można byłoby odnieść uzyskane wyniki. Gen *RB* traktowany jest przez część badaczy jako gen anty-apoptotyczny, jakkolwiek w komórkach, które utraciły jego funkcję, do aktywacji apoptozy może dochodzić poprzez aktywację zdrowego genu p53 [161]. Jednakże w niniejszym materiale, wszyscy chorzy z fenotypem o najniższym wskaźniku apoptotycznym oraz brakiem ekspresji białka pRb, wykazywali również brak ekspresji białka p53. Gdyby brak ekspresji białka p53 wynikał z obecności zdrowego, „dzikiego” białka p53, apoptoza powinna być pobudzona. Być może więc w tych przypadkach brak ekspresji białka p53 wynikał z mutacji genu *P53* typu *null* i całkowitej utraty białka p53. Powyższa obserwacja podkreśla konieczność dalszych badań dotyczących oceny wartości rokowniczej WA rozpatrywanej łącznie z obecnością białka pRb oraz białka p53.

### **Wskaźnik ekspresji PCNA**

Rokownicze znaczenie wskaźnika ekspresji PCNA także pozostaje przedmiotem kontrowersji. Wśród wielu prac dotyczących NDKRP, ekspresja białka PCNA wiązała się z gorszym rokowaniem [9, 44, 49, 50, 101, 140, 141, 182], bądź nie miała wpływu na przeżycie [30, 37, 45, 48, 92, 120, 179]. Brak wpływu ekspresji białka PCNA na przeżycie obserwowano również u chorych pochodzących z Pomorza Gdańskiego [30]. W obecnej analizie obejmującej nową oraz większą grupę chorych (poprzednia grupa liczyła 83, obecna zaś 125 chorych), stwierdzono różnicę w przeżyciu pomiędzy chorymi z bardzo niskim i z bardzo wysokim W PCNA. Warto podkreślić, że gdyby obecna analiza wykonana została tylko przy podziale chorych na 2 podgrupy (z dodatnią oraz ujemną ekspresją PCNA) różnica w przeżyciu pomiędzy przedstawionymi podgrupami zostałaby przeoczona.

### **Ekspresja białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1**

W niniejszej pracy, podobnie do naszych poprzednich wyników [30, 34] nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością białka p53 w komórkach NDKRP a czasem przeżycia. Rokownicze znaczenie występowania białka p53 w komórkach raka płuca pozostaje nierozstrzygnięte. W poszczególnych badaniach akumulacja białka p53 wiązała się z gorszym [19, 37, 40, 67, 176, 179] lub lepszym rokowaniem [102, 183], albo nie miała wpływu na czas przeżycia [7, 30, 46, 53, 122, 138, 146, 189]. Brak rokowniczego znaczenia występowania białka p53 stwierdzony w niniejszej rozprawie potwierdza wcześniej prezentowane wyniki [30], pomimo faktu, że w obecnej analizie zwiększono badaną grupę chorych oraz użyto innego przeciwciała monoklonalnego przeciwko białku p53.

Podobna sytuacja co do znaczenia rokowniczego występuje w odniesieniu do mutacji genu *P53*. Przykładowo niektórzy autorzy obserwowali krótszy czas przeżycia związany z obecnością mutacji genu *P53* [73], podczas gdy inni nie wykazali takiej zależności [19]. Część badań wskazuje, że rokownicze znaczenie mutacji genu *P53* może być zależne od ich typu i umiejscowienia. W materiale polskim niekorzystny wpływ na czas przeżycia stwierdzono w odniesieniu do mutacji typu *null* i transwersji, podczas gdy mutacje typu *missense* i tranzycje nie miały znaczenia rokowniczego [81]. Dane z ostatnich lat, w tym także prace z ośrodka gdańskiego wskazują, że niekorzystny wpływ mutacji genu *P53* dotyczy szczególnie chorych na gruczolakoraka płuca [82, 125].

W niniejszej rozprawie, podobnie do prac innych autorów [21, 26, 72, 83, 94, 102, 136, 154, 189] nie stwierdzono rokowniczego znaczenia ekspresji białka pRb u chorych na NDKRP [34]. Xu i wsp. [191], początkowo zauważyli, że chorzy z brakiem ekspresji białka pRb żyli krócej, ale kolejna praca tych samych autorów nie potwierdziła już tej obserwacji [189]. W pracy Bettichera i wsp. [11] brak obecności białka pRb wiązał się z większym prawdopodobieństwem wystąpienia nawrotu choroby oraz skróceniem czasu wolnego do nawrotu.

W innych pracach utrata obecności pRb wiązała się z gorszym rokowaniem, ale tylko w odniesieniu do raka płaskonabłonkowego [4], bądź tylko do gruczolaka [13].

W przedstawionej pracy wpływ obecności białka pRb na przeżycie u chorych na NDKRP oceniano łącznie z ekspresją białka p53. Tak jak w poprzedniej pracy naszego zespołu, nie stwierdzono wpływu na przeżycie, gdy występowanie obu białek rozpatrywano łącznie [34]. W dostępnym piśmiennictwie opublikowano zaledwie kilka prac dotyczących łącznej oceny białka pRb oraz p53 w NDKRP [26, 72, 102, 136, 189, 191]. W niektórych z nich obecność białka pRb/p53 nie miała znaczenia rokowniczego [72, 102, 136]. Jakkolwiek w grupie chorych z wczesnym stopniem zaawansowania klinicznego NDKRP [191] oraz w grupie chorych z różnymi stopniami zaawansowania [189], obecność fenotypu pRb-/p53+ wiązała się z gorszym rokowaniem [189, 191]. W innym badaniu ten sam fenotyp wiązał się z gorszym rokowaniem w grupie chorych z gruczolakorakiem [26].

Interesującą obserwacją przedstawioną w niniejszej rozprawie jest stwierdzenie różnic w przeżyciu w podgrupach chorych z obecnością białka p53 (p53+) lub z brakiem funkcjonalnego białka pRb (pRb-). Różnice w powyższych podgrupach obserwowane były pomiędzy chorymi z bardzo niskim i bardzo wysokim W PCNA. Chorzy z fenotypem p53+/bardzo wysoki W PCNA, żyli znacznie krócej w porównaniu z chorymi o fenotypie p53+/bardzo niski W PCNA. Podobnie chorzy z fenotypem pRb-/bardzo wysoki W PCNA, mieli gorsze rokowanie, niż chorzy z fenotypem pRb-/bardzo niski W PCNA. Podobne wyniki uzyskano w pracy Tanaki i wsp. [176]. Wskazuje to, że w podgrupie chorych z nagromadzeniem białka p53 oraz wysokim W PCNA rokowanie jest znacznie gorsze. Jak dotychczas nie ma jednak prac dotyczących łącznej oceny rokowniczego znaczenia W PCNA oraz białka pRb. W badaniach *in vitro* wykazano, że utrata funkcjonalnego białka pRb wiąże się z aktywacją proliferacji jedynie przy równoczesnej inaktywacji białka p53 [159]. Na podstawie niniejszej analizy wydaje się jednak, że utrata funkcji obu białek może niezależnie wiązać się z aktywacją proliferacji i powodować szybszą progresję NDKRP.

W przedstawionej pracy nie stwierdzono wpływu na przeżycie, gdy obecność białka pRb rozpatrywano łącznie z białkiem p53 oraz mdm2. W dostępnym piśmiennictwie nie ma podobnego opracowania. Zaledwie w dwóch publikacjach oceniano łącznie występowanie białka pRb, p53 oraz mdm2, jednak w pracach tych wpływ każdego z parametrów na przeżycie chorych z NDKRP rozpatrywano pojedynczo [54, 55]. Obecne wyniki sugerują, że pomimo ważnej roli, jaką pełni białko mdm2 w regulacji funkcji dwóch najbardziej znanych genów supresorowych [55, 76], kliniczne znaczenie łącznego występowania zaburzeń dotyczących p53/mdm2/pRb jest niewielkie.

Istnieje niewiele prac dotyczących rokowniczego znaczenia występowania białka mdm2 w komórkach NDKRP [2, 54, 55, 70, 89], a ich wyniki są sprzeczne. W obecnym badaniu, podobnie do innych prac [2, 54, 55, 89], nagromadzenie się białka mdm2 nie miało związku z czasem przeżycia w badanej grupie chorych, jakkolwiek w jednej z nich [2] obecność białka mdm2 była częstsza u chorych z zaawansowanym nowotworem. Z drugiej strony Higashiyama i wsp. [70] zaobserwowali, że chorzy z obecnością białka mdm2 żyli dłużej. Natomiast w pracy Ko i wsp. [89] lepsze rokowanie wiązało się z obecnością MDM2 mRNA.

W obecnej pracy, podobnie do pracy Aikawy i wsp. nie stwierdzono również różnicy w przeżyciu pomiędzy złożonymi fenotypami mdm2/p53 [2]. Higashiyama i wsp. sugerowali natomiast, że obecność białka mdm2 rozpatrywanego pojedynczo w całej grupie chorych, nie miała wpływu na rokowanie, natomiast w podgrupie chorych z dodatkowym brakiem ekspresji białka p53 (fenotypowo: mdm2+/p53-) wiązała się ze znamienne lepszym rokowaniem [70]. Z drugiej strony Gorgoulis i wsp. [53] sugerowali gorsze rokowanie w grupie chorych z ekspresją mdm2 oraz w podgrupie o fenotypie mdm2+/p53+.

Rozpatrując rokownicze znaczenie amplifikacji genu *MDM2* wydaje się, że obecność zwiększonej liczby kopii tego genu może w NDKRP wiązać się z gorszym rokowaniem [33]. Kwestia, dlaczego amplifikacja genu *MDM2*, a nie występowanie jego białkowego produktu, wiąże się z gorszym rokowaniem w NDKRP pozostaje nierozstrzygnięta. Jedną z możliwych hipotez jest brak zależności pomiędzy występowaniem białka mdm2 a amplifikacją genu *MDM2* w komórkach NDKRP [36]. Hipotezę tą może także potwierdzać obserwacja, że zwiększone występowanie białka mdm2, oprócz zwiększonej liczby kopii genu *MDM2*, ma także inne przyczyny [47].

W dostępnym piśmiennictwie istnieje wiele prac dotyczących obecności białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach NDKRP [2, 5, 10, 18, 31, 42, 61, 91, 115, 163, 172, 184, 192, 193]. Natomiast zaledwie kilka z nich omawia rokownicze znaczenie tego parametru [10, 18, 31, 42, 91, 163]. Wyniki tych prac są rozbieżne. W przedstawionej analizie, podobnie jak w poprzedniej pracy naszego zespołu [31], nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a rokowaniem u chorych na NDKRP. Uzyskany wynik był identyczny pomimo znacznego zwiększenia liczby analizowanych przypadków ze 117 do 194 chorych [31]. Niektórzy autorzy obserwowali brak rokowniczego znaczenia ekspresji białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w NDKRP [2, 10, 91], jakkolwiek inni sugerowali, że obecność p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wiązała się z lepszym rokowaniem w tym nowotworze [18, 42, 163]. Lepsze rokowanie obserwowano także w podgrupie chorych z fenotypem p21<sup>WAF1/CIP1</sup>+/p53-, w porównaniu z fenotypem p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-/p53+ [163]. W niniejszej analizie, podobnie do innych prac [10, 18, 91] nie potwierdzono wpływu na przeżycie żadnego ze złożonych fenotypów p21<sup>WAF1/CIP1</sup>/p53. Przeciwnie w nowotworach złośliwych jelita grubego [15] oraz prostaty [1] obecność białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wiązała się z gorszym rokowaniem. Ocena wartości rokowniczej

występowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wymaga wyjaśnienia. Gen *WAF1/CIP1* z jednej strony uważany jest za gen supresorowy, jednak z uwagi na jego udział w hamowaniu apoptozy, część autorów sądzi, że może on również pełnić rolę protoonkogenu [155].

W niniejszej rozprawie, podobnie do poprzedniej pracy naszego zespołu [32], nie stwierdzono wpływu obecności cykliny D1 na przeżycie nawet, gdy analizowano znacznie liczniejszą grupę chorych (111 vs 194 przypadki). Podobne wyniki uzyskano również w innych pracach dotyczących NDKRP [6, 11, 13, 116, 135, 157, 182]. W kilku z nich obecność cykliny D1 wiązała się paradoksalnie z dłuższym całkowitym czasem przeżycia [124, 136], dłuższym czasem wolnym od nawrotu choroby [62] lub mniejszym ryzykiem nawrotu miejscowego choroby [11]. W jednej z prac lepsze rokowanie dotyczyło zwłaszcza podgrupy chorych z gruczolakorakiem [136], w innej raków płaskonabłonkowych [6]. W niektórych doniesieniach, obecność cykliny D1 w komórkach NDKRP wiązała się ze skróceniem czasu przeżycia, zarówno u chorych we wczesnym stopniu zaawansowania klinicznego [83], jak i w grupie chorych z różnymi stopniami zaawansowania choroby [17, 86].

W przedstawionej analizie, żaden spośród wszystkich możliwych fenotypów (cyklina D1/p53, cyklina D1/pRb oraz cyklina D1/p53/pRb) nie wpływał na rokowanie u chorych na NDKRP. Jakkolwiek we wcześniejszej naszej publikacji, chorzy o fenotypie cyklina D1-/p53+ charakteryzowali się gorszym rokowaniem [32], obecna analiza oparta na większej liczbie badanych, nie potwierdziła tej obserwacji. Dodatkowo, podobnie do wyników Brambilla i wsp. [13], pomimo stwierdzonego w niniejszej rozprawie związku pomiędzy występowaniem białka pRb i cykliny D1 w komórkach NDKRP, chorzy o mieszanym fenotypie (pRb+/cyklina D1+) nie różnili się czasem przeżycia od pozostałych chorych.

#### ***Łączna ocena wartości rokowniczej wszystkich analizowanych parametrów***

W piśmiennictwie światowym brak jest pracy dotyczącej łącznej oceny wpływu wszystkich analizowanych w obecnym materiale parametrów (WA, W PCNA, występowania białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1) na rokowanie u chorych na NDKRP. Dostępne jest natomiast dość bogate piśmiennictwo dotyczące znaczenia każdego z tych parametrów rozpatrywanych oddzielnie lub w podwójnej, potrójnej czy poczwórnej kombinacji [41, 42, 164]. W niniejszej rozprawie, łączną ocenę wszystkich parametrów przeprowadzono w grupie chorych liczącej 115 chorych na NDKRP. W analizie wieloczynnikowej, jedynie stopień zaawansowania klinicznego nowotworu oraz stopień jego zróżnicowania wiązały się z krótszym okresem przeżycia oraz szybszym nawrotem choroby. Natomiast WA, W PCNA, występowanie białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 analizowane łącznie nie dostarczyły istotnych klinicznie informacji. Z drugiej strony, wiele złożonych fenotypów, składających

się z dwóch parametrów, miało istotny wpływ na czas wolny od nawrotu choroby oraz na całkowity czas przeżycia.

Jak do tej pory nie znaleziono idealnego biologicznego wskaźnika rokowniczego w NDKRP [16, 42, 164]. Analiza powyższych parametrów w komórkach NDKRP stanowi ważny aspekt poznawczy. Jakkolwiek większość z analizowanych parametrów nie wpływała na rokowanie w badanej grupie chorych, to jednak wyniki tej pracy mogą być pomocne w zrozumieniu niektórych mechanizmów zachodzących w komórkach nowotworowych. Niewielkie rokownicze znaczenie ekspresji białek regulujących apoptozę oraz cykl komórkowy analizowanych pojedynczo, nie jest zaskakujące. Prawie we wszystkich przypadkach NDKRP dochodzi do deregulacji fazy  $G_1$  cyklu komórkowego oraz apoptozy [42]. Nie jest zatem możliwe, aby pojedynczy marker mógł wskazać podgrupy chorych o gorszym rokowaniu. Więcej informacji na ten temat dostarcza w tej sytuacji łączna analiza wielu parametrów [16, 41, 164].

Wyniki dotyczące złożonych fenotypów należy interpretować ostrożnie z uwagi na możliwość wystąpienia fałszywie dodatnich korelacji, będących wynikiem wielokrotnego porównywania. W większości opracowań, złożone fenotypy dotyczyły niewielkich podgrup chorych. Przykładowo, w pracy Puglisiego i wsp. [150], gorsze rokowanie u chorych z fenotypem „niski WA/wysoki wskaźnik proliferacji”, jakkolwiek wyraźny, to jednak odnosił się zaledwie do 6 na 96 przypadków z badanej grupy chorych. W takiej sytuacji stwierdzenie fałszywie dodatniej korelacji wynikającej z wielokrotnego porównywania znacznie wzrasta. Nie umniejsza to jednak wartości poznawczej stwierdzanych zaburzeń. W przyszłości być może informacje uzyskane z tego typu badań pomogą w wyodrębnieniu chorych o szczególnie złym rokowaniu oraz w wyborze odpowiedniej dla nich terapii.



## 7. WNIOSKI

1. U chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca obserwuje się dużą zmienność wskaźnika apoptotycznego oraz wskaźnika ekspresji PCNA. W większości przypadków występują zaburzenia co najmniej jednego z analizowanych parametrów: białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1.
2. W niedrobnokomórkowym raku płuca brak jest zależności pomiędzy wysokością wskaźnika apoptotycznego a nasileniem rozplemu komórkowego oraz obecnością analizowanych regulatorów cyklu komórkowego. Istnieje natomiast szereg zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych białek zaangażowanych w regulację fazy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego.
3. W niedrobnokomórkowym raku płuca wskaźnik PCNA jest ściśle związany ze stopniem zróżnicowania nowotworu, natomiast wskaźnik apoptotyczny oraz obecność białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1 są niezależne od cech klinicznych i demograficznych.
4. Wartość kliniczna każdego z parametrów rozpatrywanego pojedynczo jest ograniczona, natomiast ich wspólna ocena może być przydatna jako dodatkowy czynnik rokowniczy.

## 8. Streszczenie

Rozprawa obejmuje cykl prac dotyczących klinicznego znaczenia wskaźnika apoptotycznego w powiązaniu z wybranymi regulatorami cyklu komórkowego w grupie chorych operowanych z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca (NDKRP). Badania przeprowadzono łącznie u 203 osób, spośród których u 170 oceniono wskaźnik apoptotyczny (WA), u 125 wskaźnik ekspresji białka PCNA (W PCNA), u 203 obecność białka p53 i pRb, u 197 obecność białka mdm2, zaś u 194 – obecność białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1. U 115 chorych przeprowadzono łączną analizę wszystkich powyższych parametrów.

Baza danych zawierała informacje dotyczące wieku i płci chorych, palenia papierosów, datę i doszczętność zabiegu operacyjnego, postać histopatologiczną guza i stopień jego zróżnicowania, stopień zaawansowania klinicznego choroby (z uwzględnieniem pTNM), datę i rodzaj nawrotu choroby, datę ostatniej obserwacji chorego lub datę zgonu, ocenę WA, W PCNA oraz obecności białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1. Obecność komórek apoptotycznych w guzie nowotworowym oceniono przy użyciu metody TUNEL (*TdT-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin nick end-labeling*), natomiast ekspresję białka PCNA, p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 – immunohistochemicznie, używając przeciwciał monoklonalnych (odpowiednio klonu PC 10, PAb1801, LM 95.1, IF2, SX 118 oraz DCS-6). Liczbę komórek apoptotycznych wyrażono pod postacią WA, zdefiniowanego jako liczbę komórek wybarwionych za pomocą reakcji TUNEL spośród 1000 komórek nowotworowych. Obecność białka PCNA wyrażono pod postacią W PCNA, oznaczającego średnią liczbę komórek z jądrową ekspresją białka PCNA spośród 1000 komórek NDKRP. W odniesieniu do białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 za dodatnie uznano te guzy, które wykazywały jakąkolwiek obecność białek w jądrach komórkowych nowotworu ( $\geq 1\%$ ).

Średnia wartość WA wynosiła  $12 \pm 10$ , natomiast mediana, dolny i górny kwartył WA wynosiły odpowiednio 8, 5 i 14. Badana grupa chorych została podzielona na cztery podgrupy o bardzo niskim WA ( $WA < 5$ ), niskim WA ( $5 \leq WA < 8$ ), wysokim WA ( $8 \leq WA < 14$ ) oraz bardzo wysokim WA ( $WA \geq 14$ ). Bardzo niski, niski, wysoki oraz bardzo wysoki WA stwierdzono odpowiednio w 40 (23%), 35 (21%), 52 (31%) oraz 43 przypadkach (25%).

Średnia wartość W PCNA wynosiła  $34 \pm 24$ , natomiast mediana, dolny i górny kwartył W PCNA wynosiły odpowiednio 35, 20 i 50. Badana grupa chorych została podzielona na cztery podgrupy o bardzo niskim W PCNA ( $W PCNA < 20$ ), niskim W PCNA ( $20 \leq W PCNA < 35$ ), wysokim W PCNA ( $35 \leq W PCNA < 50$ ) oraz bardzo wysokim W PCNA ( $W PCNA \geq 50$ ). Bardzo niski, niski,

wysoki oraz bardzo wysoki wskaźnik ekspresji PCNA stwierdzono odpowiednio w 23 (18%), 36 (29%), 34 (27%) oraz 32 przypadkach (26%).

Obecność białka p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 stwierdzono odpowiednio u 47%, 71%, 37%, 65% i 40% chorych.

Nie wykazano zależności pomiędzy wysokością WA a stopniem nasilenia proliferacji komórkowej oraz obecnością białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1. W analizie korelacji wskaźnika ekspresji PCNA z innymi parametrami biologicznymi, jedyny związek dotyczył cykliny D1 ( $p=0.017$ ). Dodatkowo stwierdzono zależność pomiędzy ekspresją białka mdm2 oraz białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ( $p=0.01$ ), natomiast nagromadzenie cykliny D1 wiązało się z obecnością białka mdm2 ( $p=0.03$ ), pRb ( $p=0.01$ ), p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ( $p<0.001$ ) oraz z brakiem ekspresji białka p53 ( $p=0.03$ ).

Wykazano zależność pomiędzy wysokością wskaźnika PCNA a stopniem zróżnicowania NDKRP. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy wysokością WA, obecnością białek p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i cykliny D1 a cechami demograficznymi i klinicznymi chorych.

W analizie jedno- i wieloczynnikowej nie stwierdzono zależności pomiędzy żadnym z badanych parametrów (WA, W PCNA, białkiem p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, cykliną D1), analizowanych pojedynczo lub łącznie, a czasem do nawrotu choroby oraz całkowitym czasem przeżycia. Silne niekorzystne znaczenie rokownicze wykazywały jedynie stopień zaawansowania klinicznego nowotworu oraz stopień jego zróżnicowania. Podczas analizy złożonych fenotypów, współistnienie bardzo wysokiego WA z bardzo wysokim W PCNA oraz bardzo niskiego WA z brakiem ekspresji pRb, wiązały się z gorszym rokowaniem (odpowiednio  $p=0.001$  i  $p=0.04$ ). Dodatkowo obecność najwyższego wskaźnika proliferacji wiązała się ze skróceniem całkowitego czasu przeżycia w porównaniu do najniższego W PCNA ( $p=0.04$ ), szczególnie przy równoczesnym nagromadzeniu się białka p53 ( $p=0.026$ ) lub braku ekspresji białka pRb ( $p=0.04$ ).

Przedstawiona praca jest pierwszym tak obszernym opracowaniem dotyczącym klinicznego znaczenia WA w powiązaniu z wybranymi regulatorami cyklu komórkowego u chorych na NDKRP. Wyniki badania wskazują na niewielkie kliniczne znaczenie każdego z parametrów rozpatrywanego pojedynczo, jakkolwiek podkreślają wartość wspólnej oceny wielu parametrów. Rokownicze znaczenie złożonych fenotypów powinno zostać ocenione ponownie na większym materiale ze względu na małą liczebność badanych podgrup.

## 9. Summary

This thesis includes a series of studies addressing the clinical significance of apoptotic index in correlation with selected parameters involved in cell cycle regulation in non-small cell lung cancer (NSCLC). In total, the studies were performed in the group of 203 NSCLC patients. Apoptotic index (AI) was assessed in 170 cases, PCNA labeling index (PCNA LI) in 125, p53 and pRb proteins in 203, mdm2 protein in 197, and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 in 194. Joint analysis of all above parameters was performed in the group of 115 NSCLC patients.

The data base included patients sex and age, smoking, the date of surgery and its completeness, tumor histology and grade, stage of disease (pTNM destination), time and site of recurrence, survival status, AI, PCNA LI, p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 expression. Apoptosis of tumor cells was assessed with the use of TUNEL technique (TdT-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin nick end-labeling), whereas expression of PCNA, p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 - immunohistochemically, with the use of monoclonal antibodies (PC 10, PAb1801, LM 95.1, IF2, SX 118 and DCS-6 clone, respectively). The amount of apoptotic cells was expressed as AI (the number of apoptotic cells between 1000 tumor cells). The presence of PCNA protein was expressed as PCNA LI (the mean amount of positive, nuclear staining of PCNA between 1000 tumor cells). According to p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 expression, tumor showing any positive staining of above proteins was assessed positive (the cut-off value  $\geq 1\%$ ).

The mean AI was  $12 \pm 10$ , whereas median, 25 and 75 percentile of AI was 8, 5 and 14, respectively. The study group was divided into four groups with the lowest AI (AI < 5), low AI ( $5 \leq \text{AI} < 8$ ), high AI ( $8 \leq \text{AI} < 14$ ) and the highest AI (AI  $\geq 14$ ). The lowest, low, high and the highest AI was found in 40 (23%), 35 (21%), 52 (31%) and 43 cases (25%), respectively.

The mean PCNA LI was  $34 \pm 24$ , whereas median, 25 and 75 percentile of PCNA LI was 35, 20 and 50, respectively. The study group was divided into four groups with the lowest PCNA LI (PCNA LI < 20), low PCNA LI ( $20 \leq \text{PCNA LI} < 35$ ), high PCNA LI ( $35 \leq \text{PCNA LI} < 50$ ) and the highest PCNA LI (PCNA LI  $\geq 50$ ). The lowest, low, high and the highest PCNA LI was found in 23 (18%), 36 (29%), 34 (27%) and 32 cases (26%), respectively.

Expression of p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 was found in 47%, 71%, 37%, 65% and 40% cases, respectively.

There was no correlation between AI and PCNA LI, p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> or cyclin D1 expression. A strong correlation was found between PCNA LI and cyclin D1 expression ( $p=0.017$ ). Additionally, a correlation

---

between the presence of mdm2 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> was established ( $p=0.01$ ), then between cyclin D1 and mdm2 ( $p=0.03$ ), pRb ( $p=0.01$ ), p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ( $p<0.001$ ) and the lack of p53 protein expression ( $p=0.03$ ).

In NSCLC patients PCNA LI was positively correlated with tumor grade, whereas there was no correlation between AI, p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> or cyclin D1 expression and patients characteristics.

In uni- and multivariate analysis there was no influence of AI, PCNA LI, p53, pRb, mdm2, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and cyclin D1 (analyzed separately or jointly) on disease-free (DFS) and over-all survival (OS). The only variables related to prognosis were stage of disease and tumor grade. Analysis of combined phenotypes showed that phenotypes with the highest AI accompanied by the highest PCNA LI and the lowest AI accompanied by negative pRb expression were correlated with impaired OS ( $p=0.001$  and  $p=0.04$ , respectively). Additionally, patients with the presence of the highest PCNA LI had shortened survival compared to patients with the lowest PCNA LI ( $p=0.04$ ), especially in the group with positive p53 protein expression ( $p=0.026$ ) or the lack of pRb protein ( $p=0.04$ ).

This study for the first time presents the clinical significance of AI in correlation to selected cell cycle regulators in NSCLC patients. Evaluation of single parameter has limited prognostic value; however joint analysis of several factors involved in apoptosis and cell cycle regulation seems to provide additional prognostic information. The impact on survival of combined phenotypes should be verified due to limited number of patients included to this study.

## 10. Piśmiennictwo

1. Aaltomaa S., Lipponen P., Eskelinen M., Ala-Opas M., Kosma V. M. Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate*. 1999, 39: 8-15.
2. Aikawa H., Sato M., Fujimura S., Takahashi H., Endo C., Sakurada A., Chen Y., Kondo T., Tanita T., Matsumura Y., Saito Y., Sagawa M. MDM2 expression is associated with progress of disease and WAF1 expression in resected lung cancer. *Int J Mol Med*. 2000, 5: 631-3.
3. Akervall J. A., Michalides R. J., Mineta H., Balm A., Borg A., Dictor M. R., Jin Y., Loftus B., Mertens F., Wennerberg J. P. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer*. 1997, 79: 380-9.
4. Akin H., Yilmazbayhan D., Kilicaslan Z., Dilege S., Dogan O., Toker A., Kalayci G. Clinical significance of P16INK4A and retinoblastoma proteins in non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2002, 38: 253-60.
5. Akita K., Inagaki H., Sato S., Niimi T., Maeda H., Ninomiya S., Achiwa H., Kawaguchi H., Yamakawa Y., Fujii Y., Shimizu S., Eimoto T., Ueda R. p185(HER-2/neu) and p21(CIP1/WAF1) expression in primary tumors and lymph node metastases in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res*. 2002, 93: 1007-11.
6. Anton R. C., Coffey D. M., Gondo M. M., Stephenson M. A., Brown R. W., Cagle P. T. The expression of cyclins D1 and E in predicting short-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol*. 2000, 13: 1167-72.
7. Apolinario R. M., van der Valk P., de Jong J. S., Deville W., van Ark-Otte J., Dingemans A. M., van Mourik J. C., Postmus P. E., Pinedo H. M., Giaccone G. Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1997, 15: 2456-66.
8. Bell J. E. The neuropathology of adult HIV infection. *Rev Neurol (Paris)*. 1998, 154: 816-29.
9. Bellotti M., Elsner B., Paez De Lima A., Esteva H., Marchevsky A. M. Neural networks as a prognostic tool for patients with non-small cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol*. 1997, 10: 1221-7.

10. Bennett W. P., el-Deiry W. S., Rush W. L., Guinee D. G., Jr., Freedman A. N., Caporaso N. E., Welsh J. A., Jones R. T., Borkowski A., Travis W. D., Fleming M. V., Trastek V., Pairolero P. C., Tazelaar H. D., Midthun D., Jett J. R., Liotta L. A., Harris C. C. p21waf1/cip1 and transforming growth factor beta 1 protein expression correlate with survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1998, 4: 1499-506.
11. Betticher D. C., White G. R., Vonlanthen S., Liu X., Kappeler A., Altermatt H. J., Thatcher N., Heighway J. G1 control gene status is frequently altered in resectable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 1997, 74: 556-62.
12. Boulay J. L., Perruchoud A. P., Reuter J., Bolliger C., Herrmann R., Rochlitz C. P21 gene expression as an indicator for the activity of adenovirus-p53 gene therapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Gene Ther.* 2000, 7: 1215-9.
13. Brambilla E., Moro D., Gazzeri S., Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol.* 1999, 188: 351-60.
14. Bravo R., Frank R., Blundell P. A., Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature.* 1987, 326: 515-7.
15. Bukholm I. K., Nesland J. M. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch.* 2000, 436: 224-8.
16. Burke L., Flieder D. B., Guinee D. G., Brambilla E., Freedman A. N., Bennett W. P., Jones R. T., Borkowski A., Caporaso N. A., Fleming M., Trastek V., Pairolero P., Tazelaar H., Midthun D., Jett J. R., Liotta L. A., Travis W. D., Harris C. C. Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005, 11: 232-41.
17. Caputi M., De Luca L., Papaccio G., D'Aponte A., Cavallotti I., Scala P., Scarano F., Manna M., Gualdiero L., De Luca B. Prognostic role of cyclin D1 in non small cell lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Eur J Histochem.* 1997, 41: 133-8.
18. Caputi M., Esposito V., Baldi A., De Luca A., Dean C., Signoriello G., Baldi F., Giordano A. p21waf1/cip1mda-6 expression in non-small-cell lung cancer: relationship to survival. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998, 18: 213-7.

19. Carbone D. P., Mitsudomi T., Chiba I., Piantadosi S., Rusch V., Nowak J. A., McIntire D., Slamon D., Gazdar A., Minna J. p53 immunostaining positivity is associated with reduced survival and is imperfectly correlated with gene mutations in resected non-small cell lung cancer. A preliminary report of LCSG 871. *Chest*. 1994, 106: 377S-381S.
20. Carey F. A., Fabbroni G., Lamb D. Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: a systematic study and correlation with DNA ploidy. *Histopathology*. 1992, 20: 499-503.
21. Chen J. T., Chen Y. C., Chen C. Y., Wang Y. C. Loss of p16 and/or pRb protein expression in NSCLC. An immunohistochemical and prognostic study. *Lung Cancer*. 2001, 31: 163-70.
22. Chen X., Bargonetti J., Prives C. p53, through p21 (WAF1/CIP1), induces cyclin D1 synthesis. *Cancer Res*. 1995, 55: 4257-63.
23. Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol*. 1995, 147: 545-60.
24. Davison F. D., 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.
25. Donnellan R., Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol*. 1998, 51: 1-7.
26. Dosaka-Akita H., Hu S. X., Fujino M., Harada M., Kinoshita I., Xu H. J., Kuzumaki N., Kawakami Y., Benedict W. F. Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. *Cancer*. 1997, 79: 1329-37.
27. Dotto G. P. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*. 2000, 1471: M43-56.
28. Dowdy S. F., Hinds P. W., Louie K., Reed S. I., Arnold A., Weinberg R. A. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*. 1993, 73: 499-511.
29. Dworakowska D. Kliniczne znaczenie wskaźnika apoptotycznego w niedrobnokomórkowym raku płuca. Clinical significance of apoptotic index in non-small cell lung cancer. *Współ Onkol*. 2005, 9: 380-385.
30. Dworakowska D., Gozdz S., Jassem E., Badzio A., Kobierska G., Urbaniak A., Skokowski J., Damps I., Jassem J. Prognostic relevance of proliferating cell nuclear antigen and p53 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002, 35: 35-41.



31. Dworakowska D., Jassem E., Jassem J., Boltze C., Wiedorn K. H., Dworakowski R., Skokowski J., Jaskiewicz K., Czestochowska E. Absence of prognostic significance of p21(WAF1/CIP1) protein expression in non-small cell lung cancer. *Acta Oncol.* 2005, 44: 75-9.
32. Dworakowska D., Jassem E., Jassem J., Boltze C., Wiedorn K. H., Dworakowski R., Skokowski J., Jaskiewicz K., Czestochowska E. Prognostic value of cyclin D1 overexpression in correlation with pRb and p53 status in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005, 131: 479-85.
33. Dworakowska D., Jassem E., Jassem J., Peters B., Dziadziuszko R., Zylisz M., Jakobkiewicz-Banecka J., Kobierska-Gulida G., Szymanowska A., Skokowski J., Roessner A., Schneider-Stock R. MDM2 gene amplification: a new independent factor of adverse prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer.* 2004, 43: 285-95.
34. Dworakowska D., Jassem E., Jassem J., Wiedorn K. H., Boltze C., Karmoliński A., Dworakowski R., Skokowski J., Jaskiewicz K., Bosse A., Czestochowska E. Prognostic relevance of altered pRb and p53 protein expression in surgically treated non-small cell lung cancer patients. *Oncology.* 2004, 67: 60-6.
35. Dworakowska D., Jassem E., Jassem J., Karmoliński A., Dworakowski R., Wirth T., Gruchała M., Rynkiewicz A., Skokowski J., Yla-Herttuala S., Jaśkiewicz K., Czestochowska E. 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, 131: 617-23.
36. Dworakowska D., Jassem E., Jassem J., Schneider-Stock R., Boltze C., Wiedorn K., Skokowski J., Jaśkiewicz K., Czestochowska E. MDM2 gene amplification and expression in NSCLC cells: biological and clinical implication. *Lung Cancer.* 2005, 49, Suppl. 2: S123.
37. Ebina M., Steinberg S. M., Mulshine J. L., Linnoila R. I. Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1994, 54: 2496-503.
38. el-Deiry W. S., Harper J. W., O'Connor P. M., Velculescu V. E., Canman C. E., Jackman J., Pietenpol J. A., Burrell M., Hill D. E., Wang Y., et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1994, 54: 1169-74.

39. el-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W., Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993, 75: 817-25.
40. Esposito V., Baldi A., De Luca A., Micheli P., Mazzarella G., Baldi F., Caputi M., Giordano A. Prognostic value of p53 in non-small cell lung cancer: relationship with proliferating cell nuclear antigen and cigarette smoking. *Hum Pathol*. 1997, 28: 233-7.
41. Esposito V., Baldi A., de Luca A., Tonini G., Vincenzi B., Santini D., Persichetti P., Mancini A., Citro G., Baldi F., Groeger A. M., Caputi M. Cell cycle related proteins as prognostic parameters in radically resected non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2005, 58: 734-39.
42. Esposito V., Baldi A., Tonini G., Vincenzi B., Santini M., Ambrogi V., Mineo T. C., Persichetti P., Liuzzi G., Montesarchio V., Wolner E., Baldi F., Groeger A. M. Analysis of cell cycle regulator proteins in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2004, 57: 58-63.
43. Eymin B., Gazzeri S., Brambilla C., Brambilla E. Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors. *Oncogene*. 2002, 21: 2750-61.
44. Fontanini G., Macchiarini P., Pepe S., Ruggiero A., Hardin M., Bigini D., Vignati S., Pingitore R., Angeletti C. A. The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer*. 1992, 70: 1520-7.
45. Fontanini G., Vignati S., Bigini D., Mussi A., Lucchi M., Chine S., Angeletti C. A., Bevilacqua G. Recurrence and death in non-small cell lung carcinomas: a prognostic model using pathological parameters, microvessel count, and gene protein products. *Clin Cancer Res*. 1996, 2: 1067-75.
46. Fontanini G., Vignati S., Lucchi M., Mussi A., Calcinai A., Boldrini L., Chine S., Silvestri V., Angeletti C. A., Basolo F., Bevilacqua G. Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Br J Cancer*. 1997, 75: 1295-301.
47. Freedman D. A., Wu L., Levine A. J. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*. 1999, 55: 96-107.
48. Fu X. L., Zhu X. Z., Shi D. R., Xiu L. Z., Wang L. J., Zhao S., Qian H., Lu H. F., Xiang Y. B., Jiang G. L. Study of prognostic predictors for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 1999, 23: 143-52.

49. Fujii M., Motoi M., Saeki H., Aoe K., Moriwaki S. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-small cell lung cancer. *Acta Med Okayama*. 1993, 47: 103-8.
50. Fukuse T., Hirata T., Naiki H., Hitomi S., Wada H. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant isoforms in the primary and metastatic sites of non-small cell lung carcinoma with intrapulmonary metastases. *Cancer*. 1999, 86: 1174-81.
51. Gerl R., Vaux D. L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*. 2005, 26: 263-70.
52. Giaccia A. J., Kastan M. B. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*. 1998, 12: 2973-83.
53. Gorgoulis V. G., Rassidakis G. Z., Karameris A. M., Papastamatiou H., Trigidou R., Veslemes M., Rassidakis A. N., Kittas C. Immunohistochemical and molecular evaluation of the mdm-2 gene product in bronchogenic carcinoma. *Mod Pathol*. 1996, 9: 544-54.
54. Gorgoulis V. G., Zacharatos P., Kotsinas A., Liloglou T., Kyroudi A., Veslemes M., Rassidakis A., Halazonetis T. D., Field J. K., Kittas C. Alterations of the p16-pRb pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small-cell lung carcinomas: relationship with p53 and MDM2 protein expression. *Am J Pathol*. 1998, 153: 1749-65.
55. Gorgoulis V. G., Zacharatos P., Kotsinas A., Mariatos G., Liloglou T., Vogiatzi T., Foukas P., Rassidakis G., Garinis G., Ioannides T., Zoumpourlis V., Bramis J., Michail P. O., Asimacopoulos P. J., Field J. K., Kittas C. Altered expression of the cell cycle regulatory molecules pRb, p53 and MDM2 exert a synergetic effect on tumor growth and chromosomal instability in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs). *Mol Med*. 2000, 6: 208-37.
56. Gorgoulis V. G., Zacharatos P. V., Manolis E., Ikonomopoulos J. A., Damalas A., Lamprinopoulos C., Rassidakis G. Z., Zoumpourlis V., Kotsinas A., Rassidakis A. N., Halazonetis T. D., Kittas C. Effects of p53 mutants derived from lung carcinomas on the p53-responsive element (p53RE) of the MDM2 gene. *Br J Cancer*. 1998, 77: 374-84.
57. Gorgoulis V. G., Zoumpourlis V., Rassidakis G. Z., Karameris A., Rassidakis A. N., Spandidos D. A., 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.
58. Graziano S. L. Non-small cell lung cancer: clinical value of new biological predictors. *Lung Cancer*. 1997, 17 Suppl 1: S37-58.

59. Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M., Harris C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994, 54: 4855-78.
60. Gregorc V., Ludovini V., Pistola L., Darwish S., Floriani I., Bellezza G., Sidoni A., Cavaliere A., Scheibel M., De Angelis V., Bucciarelli E., Tonato M. Relevance of p53, bcl-2 and pRb expression on resistance to cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2003, 39: 41-8.
61. Groeger A. M., Caputi M., Esposito V., Baldi A., Rossiello R., Santini D., Mancini A., Kaiser H. E., Baldi F. Expression of p21 in non small cell lung cancer relationship with PCNA. *Anticancer Res.* 2000, 20: 3301-5.
62. Gugger M., Kappeler A., Vonlanthen S., Altermatt H. J., Ris H. B., Lardinois D., Borner M. M., Heighway J., Betticher D. C. Alterations of cell cycle regulators are less frequent in advanced non-small cell lung cancer than in resectable tumours. *Lung Cancer.* 2001, 33: 229-39.
63. Haines D. S., Landers J. E., Engle L. J., George D. L. Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol Cell Biol.* 1994, 14: 1171-8.
64. Hanaoka T., Nakayama J., Haniuda M., Sato T. A. 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.
65. Harpole D. H., Jr. Prognostic issues in non-small cell lung cancer. *Chest.* 1995, 107: 267S-269S.
66. Harpole D. H., Jr., Herndon J. E., 2nd, Wolfe W. G., Iglehart J. D., Marks J. R. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res.* 1995, 55: 51-6.
67. Harpole D. H., Jr., Herndon J. E., 2nd, Young W. G., Jr., Wolfe W. G., Sabiston D. C., Jr. Stage I nonsmall cell lung cancer. A multivariate analysis of treatment methods and patterns of recurrence. *Cancer.* 1995, 76: 787-96.
68. Harpole D. H., Jr., Marks J. R., Richards W. G., Herndon J. E., 2nd, Sugarbaker D. J. Localized adenocarcinoma of the lung: oncogene expression of erbB-2 and p53 in 150 patients. *Clin Cancer Res.* 1995, 1: 659-64.

69. Harris C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*. 1996, 17: 1187-98.
70. Higashiyama M., Doi O., Kodama K., Yokouchi H., Kasugai T., Ishiguro S., Takami K., Nakayama T., Nishisho I. MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br J Cancer*. 1997, 75: 1302-8.
71. Holland T. A., Elder J., McCloud J. M., Hall C., Deakin M., Fryer A. A., Elder J. B., Hoban P. R. Subcellular localisation of cyclin D1 protein in colorectal tumours is associated with p21(WAF1/CIP1) expression and correlates with patient survival. *Int J Cancer*. 2001, 95: 302-6.
72. Hommura F., Dosaka-Akita H., Kinoshita I., Mishina T., Hiroumi H., Ogura S., Katoh H., Kawakami Y. Predictive value of expression of p16INK4A, retinoblastoma and p53 proteins for the prognosis of non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer*. 1999, 81: 696-701.
73. Horio Y., Takahashi T., Kuroishi T., Hibi K., Suyama M., Niimi T., Shimokata K., Yamakawa K., Nakamura Y., Ueda R., et al. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1993, 53: 1-4.
74. Horsthemke B., Brandt B., Albrecht B., Passarge E. Deletion in one allele and a rare neutral DNA alteration in the other allele of the RB1 gene in a patient with bilateral retinoblastoma. *Am J Med Genet*. 1992, 44: 255.
75. Howes K. A., Ransom N., Papermaster D. S., Lasudry J. G., Albert D. M., Windle J. J. Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes Dev*. 1994, 8: 1300-10.
76. Hsieh J. K., Chan F. S., O'Connor D. J., Mitnacht S., Zhong S., Lu X. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell*. 1999, 3: 181-93.
77. Huang P., Oliff A. Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol*. 2001, 11: 343-8.
78. Ikehara M., Oshita F., Ito H., Ohgane N., Suzuki R., Saito H., Yamada K., Noda K., Mitsuda A., Kameda Y. Expression of cyclin D1 but not of cyclin E is an indicator of poor prognosis in small adenocarcinomas of the lung. *Oncol Rep*. 2003, 10: 137-9.

79. Ishida T., Kaneko S., Akazawa K., Tateishi M., Sugio K., Sugimachi K. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Res.* 1993, 53: 5000-3.
80. 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.
81. Jassem E. Kliniczne znaczenie mutacji oraz zaburzeń ekspresji genu P53 u chorych na raka płuca. Praca habilitacyjna. Gdańsk, AMG. 1998.
82. Jassem E., Rosell R., Jassem J., Monzo M., Kobierska G., Badzio A., Roszkiewicz A., Skokowski J., Szulc A. [Evaluation of the prognostic significance of P53 mutation in patients with non-small cell lung cancer]. *Pneumonol Alergol Pol.* 1998, 66: 290-6.
83. Jin M., Inoue S., Umemura T., Moriya J., Arakawa M., Nagashima K., Kato H. Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II. *Lung Cancer.* 2001, 34: 207-18.
84. Kanavaros P., Bai M., Stefanaki K., Poussias G., Rontogianni D., Zioga E., Gorgoulis V., Agnantis N. J. 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.
85. Kerr J. F., Winterford C. M., Harmon B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994, 73: 2013-26.
86. Keum J. S., Kong G., Yang S. C., Shin D. H., Park S. S., Lee J. H., Lee J. D. Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 1999, 81: 127-32.
87. Keyomarsi K., Pardee A. B. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, 90: 1112-6.
88. Knudson A. G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971, 68: 820-3.
89. Ko J. L., Cheng Y. W., Chang S. L., Su J. M., Chen C. Y., Lee H. MDM2 mRNA expression is a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2000, 89: 265-70.
90. Koga T., Hashimoto S., Sugio K., Yoshino I., Nakagawa K., Yonemitsu Y., Sugimachi K., Sueishi K. Heterogeneous distribution of P53 immunoreactivity in human lung adenocarcinoma correlates with MDM2 protein expression, rather than with P53 gene mutation. *Int J Cancer.* 2001, 95: 232-9.

91. Komiya T., Hosono Y., Hirashima T., Masuda N., Yasumitsu T., Nakagawa K., Kikui M., Ohno A., Fukuoka M., Kawase I. p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res.* 1997, 3: 1831-5.
92. Korkolopoulou P., Oates J., Crocker J., Edwards C. p53 expression in oat and non-oat small cell lung carcinomas: correlations with proliferating cell nuclear antigen. *J Clin Pathol.* 1993, 46: 1093-6.
93. Kotelnikov V. M., Coon J. S. t., Mundle S., Kelanic S., LaFollette S., Taylor S. I., Hutchinson J., Panje W., Caldarelli D. D., Preisler H. D. Cyclin D1 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck and in oral mucosa in relation to proliferation and apoptosis. *Clin Cancer Res.* 1997, 3: 95-101.
94. Kratzke R. A., Greatens T. M., Rubins J. B., Maddaus M. A., Niewoehner D. E., Niehans G. A., Geradts J. Rb and p16INK4 a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res.* 1996, 56: 3415-20.
95. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med.* 1997, 3: 614-20.
96. Kroemer G., Zamzami N., Susin S. A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today.* 1997, 18: 44-51.
97. Krzakowski M. *Onkologia Kliniczna.* Wydawnictwo Medyczne Borgis, Warszawa. 2001.
98. Kwa H. B., Michalides R. J., Dijkman J. H., Mooi W. J. The prognostic value of NCAM, p53 and cyclin D1 in resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 1996, 14: 207-17.
99. Ladanyi M., Cha C., Lewis R., Jhanwar S. C., Huvos A. G., Healey J. H. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res.* 1993, 53: 16-8.
100. Langendijk H., Thunnissen E., Arends J. W., de Jong J., ten Velde G., Lamers R., Guinee D., Holden J., Wouters M. Cell proliferation and apoptosis in stage III inoperable non-small cell lung carcinoma treated by radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2000, 56: 197-207.
101. Lavezzi A. M., Santambrogio L., Bellaviti N., Biondo B., Nosotti M., Radice F., Maturri L. Prognostic significance of different biomarkers in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 1999, 6: 819-25.
102. Lee Y. C., Chang Y. L., Luh S. P., Lee J. M., Chen J. S. Significance of P53 and Rb protein expression in surgically treated non-small cell lung cancers. *Ann Thorac Surg.* 1999, 68: 343-7.

103. Leoncini L., Del Vecchio M. T., Megha T., Barbini P., Galieni P., Pileri S., Sabattini E., Gherlinzoni F., Tosi P., Kraft R., et al. Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol.* 1993, 142: 755-63.
104. Levine A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997, 88: 323-31.
105. Li R., Waga S., Hannon G. J., Beach D., Stillman B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature.* 1994, 371: 534-7.
106. Liukkonen T., Lipponen P., Raitanen M., Kaasinen E., Ala-Opas M., Rajala P., Kosma V. M. Evaluation of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer. *Finbladder Group. Urol Res.* 2000, 28: 285-92.
107. Ludovini V., Gregorc V., Pistola L., Mihaylova Z., Floriani I., Darwish S., Stracci F., Tofanetti F. R., Ferraldeschi M., Di Carlo L., Ragusa M., Daddi G., Tonato M. Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2004, 46: 77-85.
108. Lukas J., Muller H., Bartkova J., Spitkovsky D., Kjerulff A. A., Jansen-Durr P., Strauss M., Bartek J. DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol.* 1994, 125: 625-38.
109. Macleod K. F., Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* 1995, 9: 935-44.
110. Macluskey M., Baillie R., Chandrachud L. M., Pendleton N., Schor A. M. High levels of apoptosis are associated with improved survival in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2000, 20: 2123-8.
111. Maheswaran S., Englert C., Bennett P., Heinrich G., Haber D. A. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev.* 1995, 9: 2143-56.
112. Mandziuk S., Dudzisz-Sledz M., Korszen-Pilecka I., Milanowski J., Wojcierowski J., Korobowicz E. Expression of p21 and bcl-2 proteins in paraffin-embedded preparations of non-small cell lung cancer in stage IIIA after Etoposide and Cisplatin induced chemotherapy. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med].* 2003, 58: 149-53.



113. Marchetti A., Buttitta F., Girlando S., Dalla Palma P., Pellegrini S., Fina P., Doglioni C., Bevilacqua G., Barbareschi M. *mdm2* gene alterations and *mdm2* protein expression in breast carcinomas. *J Pathol.* 1995, 175: 31-8.
114. Marchetti A., Buttitta F., Pellegrini S., Merlo G., Chella A., Angeletti C. A., Bevilacqua G. *mdm2* gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations. *Diagn Mol Pathol.* 1995, 4: 93-7.
115. Marchetti A., Doglioni C., Barbareschi M., Buttitta F., Pellegrini S., Bertacca G., Chella A., Merlo G., Angeletti C. A., Dalla Palma P., Bevilacqua G. p21 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas: evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. *Oncogene.* 1996, 12: 1319-24.
116. Marchetti A., Doglioni C., Barbareschi M., Buttitta F., Pellegrini S., Gaeta P., La Rocca R., Merlo G., Chella A., Angeletti C. A., Dalla Palma P., Bevilacqua G. Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 1998, 75: 187-92.
117. Martin K., Trouche D., Hagemeyer C., Sorensen T. S., La Thangue N. B., Kouzarides T. Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature.* 1995, 375: 691-4.
118. Marx J. New link found between p53 and DNA repair. *Science.* 1994, 266: 1321-2.
119. Mate J. L., Ariza A., Aracil C., Lopez D., Isamat M., Perez-Piteira J., Navas-Palacios J. J. Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol.* 1996, 180: 395-9.
120. Maturri L., Colombo B., Lavezzi A. M. Evidence for apoptosis in non-small cell lung carcinoma. Relationship with cell kinetics and prognosis. *Anal Quant Cytol Histol.* 1999, 21: 240-4.
121. Maturri L., Lavezzi A. M., Grignani F., Salomoni G., Roviato G. C. The prognostic value of cell proliferation in non-small cell lung cancer assessed with tritiated thymidine and anti-PCNA antibodies. *Eur. J. Cancer.* 1994, 30A: 1397-8.
122. McLaren R., Kuzu I., Dunnill M., Harris A., Lane D., Gatter K. C. The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer.* 1992, 66: 735-8.

123. Michieli P., Chetid M., Lin D., Pierce J. H., Mercer W. E., Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* 1994, 54: 3391-5.
124. Mishina T., Dosaka-Akita H., Kinoshita I., Hommura F., Morikawa T., Katoh H., Kawakami Y. Cyclin D1 expression in non-small-cell lung cancers: its association with altered p53 expression, cell proliferation and clinical outcome. *Br J Cancer.* 1999, 80: 1289-95.
125. Mitsudomi T., Hamajima N., Ogawa M., Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2000, 6: 4055-63.
126. Momand J., Jung D., Wilczynski S., Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26: 3453-9.
127. Momand J., Zambetti G. P. Analysis of the proportion of p53 bound to mdm-2 in cells with defined growth characteristics. *Oncogene.* 1996, 12: 2279-89.
128. Momand J., Zambetti G. P. Mdm-2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem.* 1997, 64: 343-52.
129. Momand J., Zambetti G. P., Olson D. C., George D., Levine A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992, 69: 1237-45.
130. Morgenbesser S. D., Williams B. O., Jacks T., DePinho R. A. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature.* 1994, 371: 72-4.
131. Morris G. F., Bischoff J. R., Mathews M. B. Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93: 895-9.
132. Muller H., Lukas J., Schneider A., Warthoe P., Bartek J., Eilers M., Strauss M. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994, 91: 2945-9.
133. Naitoh H., Shibata J., Kawaguchi A., Kodama M., Hattori T. Overexpression and localization of cyclin D1 mRNA and antigen in esophageal cancer. *Am J Pathol.* 1995, 146: 1161-9.
134. Nataraj A. J., Trent J. C., 2nd, Ananthaswamy H. N. p53 gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 1995, 62: 218-30.
135. Nguyen V. N., Mirejovsky P., Mirejovsky T., Melinova L., Mandys V. Expression of cyclin D1, Ki-67 and PCNA in non-small cell lung cancer:

- prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2. *Acta Histochem.* 2000, 102: 323-38.
136. Nishio M., Koshikawa T., Yatabe Y., Kuroishi T., Suyama M., Nagatake M., Sugiura T., Ariyoshi Y., Mitsudomi T., Takahashi T. Prognostic significance of cyclin D1 and retinoblastoma expression in combination with p53 abnormalities in primary, resected non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 1997, 3: 1051-8.
  137. Noguchi M., Morikawa A., Kawasaki M., Matsuno Y., Yamada T., Hirohashi S., Kondo H., Shimosato Y. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer.* 1995, 75: 2844-52.
  138. O'Neill A. J., Staunton M. J., Gaffney E. F. Apoptosis occurs independently of bcl-2 and p53 over-expression in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology.* 1996, 29: 45-50.
  139. Oliner J. D., Kinzler K. W., Meltzer P. S., George D. L., Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature.* 1992, 358: 80-3.
  140. Oyama T., Mitsudomi T., Mizoue T., Ohgami A., Osaki T., Nakanishi R., Yasumoto K. Proliferating cell nuclear antigen may be superior to argyrophilic nucleolar organizer regions in predicting shortened survival of patients with non-small cell lung cancer. *Surg Oncol.* 1995, 4: 83-9.
  141. Oyama T., Osaki T., Nose N., Ichiki Y., Inoue M., Imoto H., Yoshimatsu T., Kodate M., Uramoto H., Mizoue T., Yano K., Yasumoto K. Evaluations of p53 immunoreactivity, nucleolar organizer regions, and proliferating cell nuclear antigen in non-small cell lung carcinoma. *Anti-cancer Res.* 2000, 20: 505-10.
  142. Pan H., Griep A. E. Altered cell cycle regulation in the lens of HPV-16 E6 or E7 transgenic mice: implications for tumor suppressor gene function in development. *Genes Dev.* 1994, 8: 1285-99.
  143. Papandreou C. N., Bogenrieder T., Loganzo F., Albino A. P., Nanus D. M. Expression and sequence analysis of the p21(WAF1/CIP1) gene in renal cancers. *Urology.* 1997, 49: 481-6.
  144. Papliński Z., Jassem J. *Rak płuca. PZWL. Warszawa* 1994.
  145. Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005, 55: 74-108.
  146. Pastorino U., Andreola S., Tagliabue E., Pezzella F., Incarbone M., Sozzi G., Buyse M., Menard S., Pierotti M., Rilke F. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol.* 1997, 15: 2858-65.

147. Piette J., Neel H., Marechal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*. 1997, 15: 1001-10.
148. Polyak K., Waldman T., He T. C., Kinzler K. W., Vogelstein B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev*. 1996, 10: 1945-52.
149. Prives C., Hall P. A. The p53 pathway. *J Pathol*. 1999, 187: 112-26.
150. Puglisi F., Minisini A. M., Aprile G., Barbone F., Cataldi P., Artico D., Damante G., Beltrami C. A., Di Loreto C. Balance between cell division and cell death as predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology*. 2002, 63: 76-83.
151. Pulkkanen K. J., Laukkanen M. O., Naarala J., Yla-Herttuala S. False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis*. 2000, 5: 329-33.
152. Rasidakis A., Orphanidou D., Kalomenidis J., Papamichalis G., Toumbis M., Lambaditis J., Sacharidou A., Papastamatiou H., Jordanoglou J. Expression of mdm-2 protein in neoplastic, preneoplastic, and normal bronchial mucosa specimens: comparative study with p53 expression. *Hybridoma*. 1998, 17: 339-45.
153. Reifenberger G., Liu L., Ichimura K., Schmidt E. E., Collins V. P. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res*. 1993, 53: 2736-9.
154. Reissmann P. T., Koga H., Takahashi R., Figlin R. A., Holmes E. C., Piantadosi S., Cordon-Cardo C., Slamon D. J. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene*. 1993, 8: 1913-9.
155. Roninson I. B. 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.
156. Rubio L., Vera-Sempere F. J., Lopez-Guerrero J. A., Padilla J., Moreno-Baylach M. J. A risk model for non-small cell lung cancer using clinicopathological variables, angiogenesis and oncoprotein expression. *Anti-cancer Res*. 2005, 25: 497-504.
157. Saitoh G., Sugio K., Ishida T., Sugimachi K. Prognostic significance of p21waf1, cyclin D1 and retinoblastoma expression detected by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2001, 8: 737-43.
158. Schafer K. A. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*. 1998, 35: 461-78.

159. Sellers W. R., Kaelin W. G., Jr. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 1997, 15: 3301-12.
160. Serrano M., Hannon G. J., Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993, 366: 704-7.
161. Sherr C. J. Cancer cell cycles. *Science.* 1996, 274: 1672-7.
162. Shiina H., Igawa M., Shigeno K., Yamasaki Y., Urakami S., Yoneda T., Wada Y., Honda S., Nagasaki M. Clinical significance of mdm2 and p53 expression in bladder cancer. A comparison with cell proliferation and apoptosis. *Oncology.* 1999, 56: 239-47.
163. Shoji T., Tanaka F., Takata T., Yanagihara K., Otake Y., Hanaoka N., Miyahara R., Nakagawa T., Kawano Y., Ishikawa S., Katakura H., Wada H. Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2002, 20: 3865-71.
164. Singhal S., Vachani A., Antin-Ozerkis D., Kaiser L. R., Albelda S. M. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res.* 2005, 11: 3974-86.
165. Sionov R. V., Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene.* 1999, 18: 6145-57.
166. Sobin L. H., Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer, Wiley-Liss. 1997.
167. Soini Y., Paakko P., Lehto V. P. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol.* 1998, 153: 1041-53.
168. Spiessl B., Beahrs O. H., Hermanek P., Hutter R. V. P., Scheibe O., Sobin L. H., Wagner G. Atlas TNM. Ilustrowany przewodnik po klasyfikacji TNM/pTNM nowotworów złośliwych. Sanmedica. Warszawa 1994.
169. Stefanaki K., Rontogiannis D., Vamvouka C., Bolioti S., Chaniotis V., Sotsiou F., Vlychou M., Delidis G., Kakolyris S., Georgoulas V., Kanavarios P. Immunohistochemical detection of bcl2, p53, mdm2 and p21/waf1 proteins in small-cell lung carcinomas. *Anticancer Res.* 1998, 18: 1167-73.
170. Strauss G. M., Kwiatkowski D. J., Harpole D. H., Lynch T. J., Skarin A. T., Sugarbaker D. J. Molecular and pathologic markers in stage I non-small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol.* 1995, 13: 1265-79.
171. Takata T., Tanaka F., Yamada T., Yanagihara K., Otake Y., Kawano Y., Nakagawa T., Miyahara R., Oyanagi H., Inui K., Wada H. Clinical significance of caspase-3 expression in pathologic-stage I, nonsmall-cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2001, 96 Suppl: 54-60.

172. Takeshima Y., Yamasaki M., Nishisaka T., Kitaguchi S., Inai K. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in primary lung adenocarcinomas: heterogeneous expression in tumor tissues and correlation with p53 expression and proliferative activities. *Carcinogenesis*. 1998, 19: 1755-61.
173. Tamura A., Hebisawa A., Komatsu H., Yotsumoto H., Mori M. Relationship of p53 oncoprotein and proliferating cell nuclear antigen expression between primary and relapsing non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 1997, 18: 253-7.
174. Tanaka F., Kawano Y., Li M., Takata T., Miyahara R., Yanagihara K., Ohtake Y., Fukuse T., Wada H. Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999, 17: 2728-36.
175. Tanaka F., Otake Y., Yanagihara K., Yamada T., Miyahara R., Kawano Y., Li M., Inui K., Wada H. 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.
176. Tanaka F., Takata T., Yamada T., Yanagihara K., Otake Y., Miyahara R., Nakagawa T., Kawano Y., Ishikawa S., Inui K., Wada H. 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.
177. 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.
178. Theunissen P. H., Leers M. P., Bollen E. C. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in formalin-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology*. 1992, 20: 251-5.
179. Tormanen U., Eerola A. K., Rainio P., Vahakangas K., Soini Y., Sormunen R., Bloigu R., Lehto V. P., Paakko P. Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*. 1995, 55: 5595-602.
180. Vakkala M., Lahteenmaki K., Raunio H., Paakko P., Soini Y. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*. 1999, 5: 319-24.
181. Vesalainen S., Lipponen P., Talja M., Syrjanen K. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 1994, 30A: 1797-803.

- 
182. Volm M., Koomagi R. Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small-cell lung cancer for patient survival. *Br J Cancer*. 2000, 82: 1747-54.
  183. Volm M., Mattern J. Immunohistochemical detection of p53 in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1994, 86: 1249.
  184. Vonlanthen S., Heighway J., Kappeler A., Altermatt H. J., Borner M. M., Betticher D. C. p21 is associated with cyclin D1, p16INK4a and pRb expression in resectable non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*. 2000, 16: 951-7.
  185. Wiethage T., Voss B., Muller K. M. Detection of MDM2-protooncogene in paraffin embedded human bronchial epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1994, 120: 252-5.
  186. Wu X., Bayle J. H., Olson D., Levine A. J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*. 1993, 7: 1126-32.
  187. Xiao Z. X., Chen J., Levine A. J., Modjtahedi N., Xing J., Sellers W. R., Livingston D. M. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*. 1995, 375: 694-8.
  188. Xiong Y., Zhang H., Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*. 1992, 71: 505-14.
  189. Xu H. J., Cagle P. T., Hu S. X., Li J., Benedict W. F. Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis. *Clin Cancer Res*. 1996, 2: 1169-76.
  190. Xu H. J., Hu S. X., Benedict W. F. Lack of nuclear RB protein staining in G0/middle G1 cells: correlation to changes in total RB protein level. *Oncogene*. 1991, 6: 1139-46.
  191. Xu H. J., Quinlan D. C., Davidson A. G., Hu S. X., Summers C. L., Li J., Benedict W. F. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1994, 86: 695-9.
  192. Xue Q., Sano T., Kashiwabara K., Oyama T., Nakajima T. Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in squamous cell carcinomas of lung. *Jpn J Cancer Res*. 2001, 92: 285-92.
  193. Xue Q., Sano T., Kashiwabara K., Saito M., Oyama T., Nakajima T. Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in stage I adenocarcinomas of the lung. *Pathol Int*. 2002, 52: 103-9.

194. Yap D. B., Hsieh J. K., Chan F. S., Lu X. mdm2: a bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene*. 1999, 18: 7681-9.
195. Zabel M. *Immunocytochemia*. PWN. Warszawa 1999.
196. Zacharatos P. V., Gorgoulis V. G., Kotsinas A., Manolis E. N., Liloglou T., Rassidakis A. N., Kanavaros P., Field J. D., Halazonetis T., Kittas C. Modulation of wild-type p53 activity by mutant p53 R273H depends on the p53 responsive element (p53RE). A comparative study between the p53REs of the MDM2, WAF1/Cip1 and Bax genes in the lung cancer environment. *WAF1/Cip1 = WAF1/Cip1. Anticancer Res.* 1999, 19: 579-87.
197. Zukerberg L. R., Yang W. I., Arnold A., Harris N. L. Cyclin D1 expression in non-Hodgkin's lymphomas. Detection by immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol.* 1995, 103: 756-60.