View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Via Medica Journals

VIA MEDICA

PRACA ORYGINALNA

Irena Porębska[1], Monika Kosacka[1], Ewa Wyrodek[2], Renata Jankowska[1]

[1]Klinika Pulmonologii i Nowotworów Płuc Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. med. R. Jankowska
[2]Katedra Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. med. A. Harłozińska-Szmyrka

Ekspresja białek p53, bcl-2 i nm23 w płaskonabłonkowym raku płuca

Expression of p53, bcl-2 and nm23 proteins in squamous cell lung cancer

Praca sfinansowana z projektu badań własnych AM im. Piastów Śląskich we Wrocławiu nr 1079 i 378

Abstract

Introduction: The evaluation of lung cancer molecular profiles is an essential element of the therapeutic process in that type of neoplasm. The analysis of apoptotic and metastasis-linked proteins is an important goal because of the key role of those processes in carcinogenesis. The aim of this study was to evaluate apoptosis regulatory proteins p53 and bcl-2 and antimetastatic marker nm23 expression in squamous cell lung cancer, taking into account the clinical and pathological data.
Material and methods: Thirty tissue specimens from patients undergoing therapeutic or diagnostic thoracic surgery were included in the study. All markers were assessed with immunohistochemistry method on paraffin-embedded tissue.
Results: Nm23 expression was observed less frequently in specimens with cancer cell emboli in blood vessels or lymph nodes metastasis. In cancers with lymph nodes metastasis, the coexpression of p53 and bcl-2 was found statistically more often than in lymph nodes negative cases. There was no correlation between p53, bcl-2 and nm23 expression and 2-years survival time.
Conclusions: Our study indicates a marked heterogeneity of p53, bcl-2 and nm23 expression in squamous cell lung cancer and the potentially unfavorable influence of p53 and bcl-2 coexpression. Less frequent nm23 expression seems to be connected with morphological signs of metastatic process.

Key words: p53, bcl-2, nm23, immunohistochemistry, lung cancer

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 131–137

Streszczenie

Wstęp: Poznanie profilu molekularnego raka płuca jest niezbędnym elementem postępu w terapii tej choroby. Szczególnie istotna jest charakterystyka markerów apoptozy i zjawiska tworzenia przerzutów ze względu na kluczową rolę tych procesów w rozwoju nowotworu. Celem pracy była ocena ekspresji białek: p53 i bcl-2, produktów genów regulujących proces apoptozy oraz antymetastatycznego białka nm23 w płaskonabłonkowym raku płuca wraz z określeniem związku badanych markerów z podstawowymi parametrami klinicznymi i patologicznymi.
Materiał i metody: Do badań zakwalifikowano 30 preparatów tkankowych raka płuca pochodzących od pacjentów poddanych resekcji miąższu płuca. Oznaczenia badanych białek wykonano metodą immunohistochemiczną w preparatach parafinowych.
Wyniki: Ekspresja antymetastatycznego białka nm23 występowała rzadziej w przypadkach cechujących się obecnością zatorów z komórek raka w naczyniach krwionośnych oraz przerzutami w węzłach chłonnych. W guzach z przerzutami do węzłów chłonnych znamiennie częściej stwierdzono fenotyp p53+/bcl-2+ niż w przypadkach bez przerzutów. Ekspresja badanych białek nie wykazała związku z przeżyciem w dwuletniej obserwacji.
Wnioski: Rezultaty badań wskazują na znaczną heterogenność ekspresji badanych markerów w obrębie raka płaskonabłonkowego płuca oraz potencjalnie niekorzystny wpływ koekspresji p53 i bcl-2. W płaskonabłonkowym raku płuca zmniejszenie ekspresji nm23 wykazuje wyraźny związek z morfologicznymi wykładnikami procesu przerzutowania.

Słowa kluczowe: p53, bcl-2, nm23, immunohistochemia, rak płuca

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 131–137

Adres do korespondencji: dr med. Irena Porębska, Katedra i Klinika Pulmonologii i Nowotworów Płuc, ul. Grabiszyńska 105, 53–439 Wrocław, tel.: (071) 334 95 59, faks: (071) 334 95 96, e-mail: iporebsk@poczta.onet.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.06.2008 r.
Copyright © 2009 Via Medica
ISSN 0867–7077

Wstęp

Rak płuca to najczęściej występujący na świecie nowotwór złośliwy. Rokowanie w raku płuca pozostaje niekorzystne. Zgodnie z danymi epidemiologicznymi 5-letnie przeżycie uzyskuje się zaledwie u 10–15% pacjentów [1]. Postęp onkologii klinicznej, który znacząco poprawił rokowanie w nowotworach o innej lokalizacji narządowej, nie przyniósł oczekiwanego zwiększenia skuteczności leczenia raka płuca, dlatego wciąż trwają wielokierunkowe badania dotyczące biologii tego nowotworu. Szczególnie ważne jest poznanie molekularnego profilu raka płuca, co wobec postępu biotechnologii umożliwi racjonalne wykorzystanie już istniejących oraz zaprojektowanie i zastosowanie nowych metod terapii celowanej odpowiedniej dla raka płuca. Do realizacji tej koncepcji leczenia jest niezbędne scharakteryzowanie markerów związanych z podstawowymi procesami komórki nowotworowej, szczególnie apoptozą i przerzutowaniem.

Centralną rolę w regulacji apoptozy pełni supresorowy gen *p53* nazywany strażnikiem integralności genomu, a mutacje w tym genie stanowią jedną z najobszerniej opisanych zmian molekularnych w nowotworach złośliwych. Konsekwencją mutacji jest synteza funkcjonalnie nieprawidłowego białka p53, co poważnie upośledza zdolność komórek do naprawy DNA oraz inicjacji apoptozy w razie braku naprawy defektu genetycznego [2]. Mitochondrialne białko bcl-2 jest zaangażowane w późną, sygnałową fazę apoptozy zainicjowanej przez białko p53, co stanowi ostatni etap umożliwiający ochronę przed wykonawczą fazą wyroku śmierci komórki, za którą odpowiedzialne są kaspazy [3]. Nadmierna ekspresja onkoproteiny bcl-2 przyczynia się do powstrzymania zainicjowanego procesu apoptozy, co tłumaczy proonkogenną funkcję tego białka [3]. Zmniejszenie zdolności komórek do programowanej śmierci w reakcji na czynniki uszkadzające, czego konsekwencją może być przetrwanie klonów komórek ze zmienionym kodem genetycznym, jest obecnie uważane za kluczowy element w powstawaniu nowotworów złośliwych.

Gen *nm23* i jego białkowy produkt nm23 pełnią funkcję ograniczającą powstawanie przerzutów. Szczegółowy mechanizm antymetastatycznego działania nm23 nie jest poznany. Wyniki badań wskazują na możliwość interakcji białka nm23 szczególnie w zakresie kinaz centrosomalnych, regulacji działania GTP-az oraz bezpośredniego działania na kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA). Konsekwencją tych mechanizmów może być pośredni wpływ na wzbudzenie i zwiększenie zdolności do apoptozy oraz zmniejszenie ruchliwości komórek [4].

Rozpowszechnienie występowania białek regulatorowych apoptozy w rakach płuca było tematem wielu badań, jednak dane dotyczące wyników reakcji immunohistochemicznych w odniesieniu do parametrów klinicznych i patologicznych przeprowadzone odrębnie dla raka płaskonabłonkowego płuca są nieliczne [5]. Kontrowersyjna pozostaje również rola nm23 w raku płuca, szczególnie wobec faktu, że znaczenie nm23 może być odmienne w nowotworach wywodzących się z różnych narządów, a nawet z tego samego narządu, ale o odmiennym utkaniu histologicznym [4].

Biorąc pod uwagę biologiczne znaczenie p53, bcl-2 i nm23 w powstawaniu i progresji raka płuca, a szczególnie niedostatek danych dotyczących typu płaskonabłonkowego, za cel pracy przyjęliśmy próbę oceny immunohistochemicznej ekspresji powyższych białek w płaskonabłonkowym raku płuca w relacji do podstawowych parametrów klinicznych i patologicznych, jak: stopień klinicznego zaawansowania, wielkość guza, obecność przerzutów w węzłach chłonnych oraz zatorów z komórek nowotworowych w naczyniach krwionośnych. Przeprowadzono ponadto wstępną analizę wpływu obecności p53, bcl-2 i nm23 w komórkach guza na rokowanie. Porównano 2-letnie przeżycie z ekspresją każdego z trzech badanych białek z osobna. Następnie oceniono przeżycie w grupie chorych z obecną jednoczesną ekspresją bcl-2 i p53 w odniesieniu do pozostałych chorych.

Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano 30 chorych na płaskonabłonkowego raka płuca hospitalizowanych w Dolnośląskim Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu. Materiał tkankowy pobrano w trakcie zabiegu radykalnej resekcji miąższu płuca (lobektomia lub pulmonektomia, uzupełniona o neoadiuwantową chemioterapię lub uzupełniająca radioterapię w przypadkach przerzutów do węzłów chłonnych śródpiersia) lub diagnostycznej torakotomii. Chorzy w stadium IIIB byli poddani chemioterapii opartej na cisplatynie wraz z radioterapią, pacjenci w stadium IV — chemioterapii paliatywnej opartej na cisplatynie. Rozpoznanie histopatologiczne raka oparto na kryteriach *World Health Organization* (WHO) [6], a stopień zaawansowania określono według aktualnej klasyfikacji TNM [7]. Charakterystykę badanej grupy przedstawiono w tabeli 1.

Ekspresję badanych markerów molekularnych w porównaniu ze stadium zaawansowania według klasyfikacji TNM przeprowadzono odrębnie dla

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna 30 chorych na płaskonabłonkowego raka płuca

Table 1. Characteristic of 30 patients with squamous cell lung cancer

Cecha *Feature*	Liczba przypadków *Number of cases*	Odsetek (%) *Percentage*
Płeć/*Gender*		
Mężczyźni/*Men*	24	80
Kobiety/*Women*	6	20
Wiek/*Age*		
≤ 60 rż./*year*	12	40
> 60 rż./*year*	18	60
Guz/*Tumor*		
T1	6	20
T2	18	60
T3	2	7
T4	4	13
Węzły chłonne/*Lymph nodes*		
N0	13	43
N1	7	23
N2	10	34
Przerzuty odległe/*Metastases*		
M0	28	93
M1	2	7
Stadium choroby/*Stage*		
I (A i B)	9	30
II (A i B)	9	30
III A	6	20
III B i IV	6	20
Zatory w naczyniach krwionośnych *Carcinomatous emboli*		
Nieobecne/*Absent*	16	53
Obecne/*Present*	14	47

stadiów I, II i IIIA, stadia IIIB i IV analizowano łącznie ze względu na małą liczbę przypadków. Przeprowadzono odrębną analizę ekspresji p53, bcl-2 i nm23 uwzględniającą wyłącznie cechę N (NO v/s N1+ N2), wielkość guza – cecha T1 v/s T2 (wyłączono przypadki T3 i T4 ze względu na małą liczebność grup). Uwzględniając doniesienia o nowych histologicznych czynnikach rokowniczych [8], przeanalizowano występowanie badanych białek w odniesieniu do obecności zatorów w naczyniach krwionośnych guza. Oceniano czas przeżycia chorych w czasie 2-letniej obserwacji.

Badania immunohistochemiczne wykonano na materiale utrwalonym w parafinie metodą ABC (awidyna/biotyna) z użyciem przeciwciał monoklonalnych dla p53 i bcl-2 (odpowiednio klon DO7 i bcl-2/100/D5, oba z firmy Novocastra Laboratories Ltd, UK) i streptawidyna/peroksydaza z użyciem poliklonalnego anty-nm23 (Polyclonal Rabbit Anti Human nm23 Protein DAKO A 0096). Preparaty o grubości 5 μm odparafinowywano w ksylenie, następnie poddawano działaniu serii alkoholi o malejącym stężeniu i przepłukiwano wodą destylowaną. W następnym etapie wykonano procedurę odsłonięcia antygenu p53 i bcl-2 w kuchence mikrofalowej (800 W, 2 × 15 min) z użyciem buforu cytrynianowego (pH 6,0), a białka nm23 — w łaźni wodnej (96°C, 30 min). Następnie blokowano aktywność endogennej peroksydazy w celu immunobarwienia p53 i bcl-2 kwasem nadjodowym (2,28%, 30 s) oraz borowodorkiem sodu (0,02%, 2 min), a dla nm23 — nadtlenkiem wodoru (3%, 10 min). Dalsze procedury wykonano zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Preparaty inkubowano z przeciwciałem pierwotnym w temperaturze pokojowej (p53 i bcl-2 — 30 min, nm23 — 60 min), a wizualizacji reakcji dokonano z użyciem 3-3'-dwuaminobenzydyny (DAB) i podbarwieniu preparatów hematoksyliną. Kontrolę negatywną stanowiła procedura z pominięciem pierwotnego przeciwciała. Efekt reakcji immunohistochemicznej oceniano w mikroskopie świetlnym. Jako p53 dodatnią uznano jądrową akumulację w co najmniej 10% komórek, ekspresję białka bcl-2 i nm23 oceniono pozytywnie w przypadku reakcji cytoplazmatycznej obejmującej co najmniej 20% komórek.

Wyniki pracy opracowano statystycznie z użyciem CSS Statistica for Windows (v. 5,0, Sta-Soft Inc. Tulusa OK). Zależności między badanymi parametrami analizowano z użyciem testu χ^2 uzupełnionym w niezbędnych przypadkach o poprawkę Yatesa. Różnice między próbkami uważano za znaczące dla $p < 0,05$. Krzywe przeżycia wykreślono według metody Kaplana-Meiera.

Wyniki

Ekspresja p53, bcl-2 i nm23 w raku płaskonabłonkowym

Obecność białka p53 stwierdzono w obrębie jąder komórkowych w przypadku 20 (66%) raków płaskonabłonkowych. W żadnym z analizowanych preparatów nie stwierdzono podbarwienia cytoplazmy komórek. Zwracała jednak uwagę wyraźna heterogenność reakcji barwnej zarówno w zakresie odsetka dodatnich komórek (od 10 do 100%), jak i intensywności odczynu, choć przeważały przypadki o wysokim (> 50%) odsetku dodatnich komórek.

Ekspresję białka bcl-2 wykazano w 17 (57%) przypadkach. Białko bcl-2 wykryto w obrębie cytoplazmy, a odsetek dodatnich komórek — podobnie jak dla p53 — wykazywał dużą zmienność i mieścił się w przedziale od 20 do 100%. W większości analizowanych preparatów stwierdzano dodatkowo obecność bcl-2 dodatnich limfocytów,

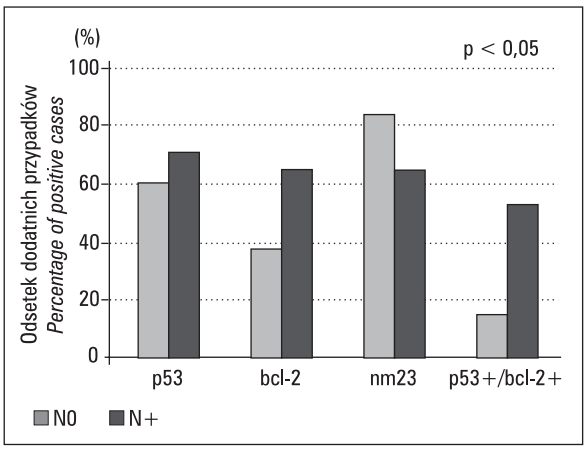
co zakwalifikowano jako kontrolę dodatnią testu immunohistochemicznego.

Ekspresję nm23 wykryto w cytoplazmie komórek w 22 (73%) przypadkach raka i podobnie do immunoreaktywności regulatorów apoptozy stwierdzono znaczne zróżnicowanie reakcji barwnej. Odrębnie przeanalizowano częstość występowania niekorzystnej koekspresji, w której nieprawidłowemu białku p53 towarzyszy jednoczesna ekspresja bcl-2 (p53+/bcl-2+) — tak scharakteryzowany fenotyp guza stwierdzono u 12 (38%) pacjentów.

Porównanie ekspresji p53, bcl-2 i nm23 z parametrami kliniczno-patologicznymi

W komórkach guzów, którym towarzyszyły zatory z komórek nowotworowych w naczyniach krwionośnych, statystycznie istotnie rzadziej wykrywano ekspresję nm23 w porównaniu z rakami niewykazującymi tej cechy (54 *vs.* 88%, p = 0,034). Tego typu zależności nie wykryto dla p53 i bcl-2.

Na rycinie 1 przedstawiono ekspresję badanych markerów w zależności od stanu węzłów chłonnych. W grupie raków z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych (N+) w porównaniu z grupą raków bez przerzutów (N0) guzy pierwotne znamiennie częściej cechowały się jednoczesną obecnością białek p53 i bcl-2 (fenotyp p53+/bcl-2+, odpowiednio 53 *vs.* 15%, p = 0,042). Analiza pojedynczych markerów wskazała na niemal dwukrotnie wyższy odsetek bcl-2 dodatnich przypadków w grupie N+ aniżeli NO i różnica ta zbliżała się do poziomu istotności statystycznej (odpowiednio 65 i 38%, p = 0,078). Natomiast w przypadkach raka z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych białko nm23 wykrywano wyraźnie, choć nieznamiennie statystycznie rzadziej niż u chorych bez przerzutów (65 *vs.* 84%, p = 0,05). Ekspresja białka p53 była porównywalna w grupie N+ i N0 (odpowiednio 61 i 71%; ryc. 1).



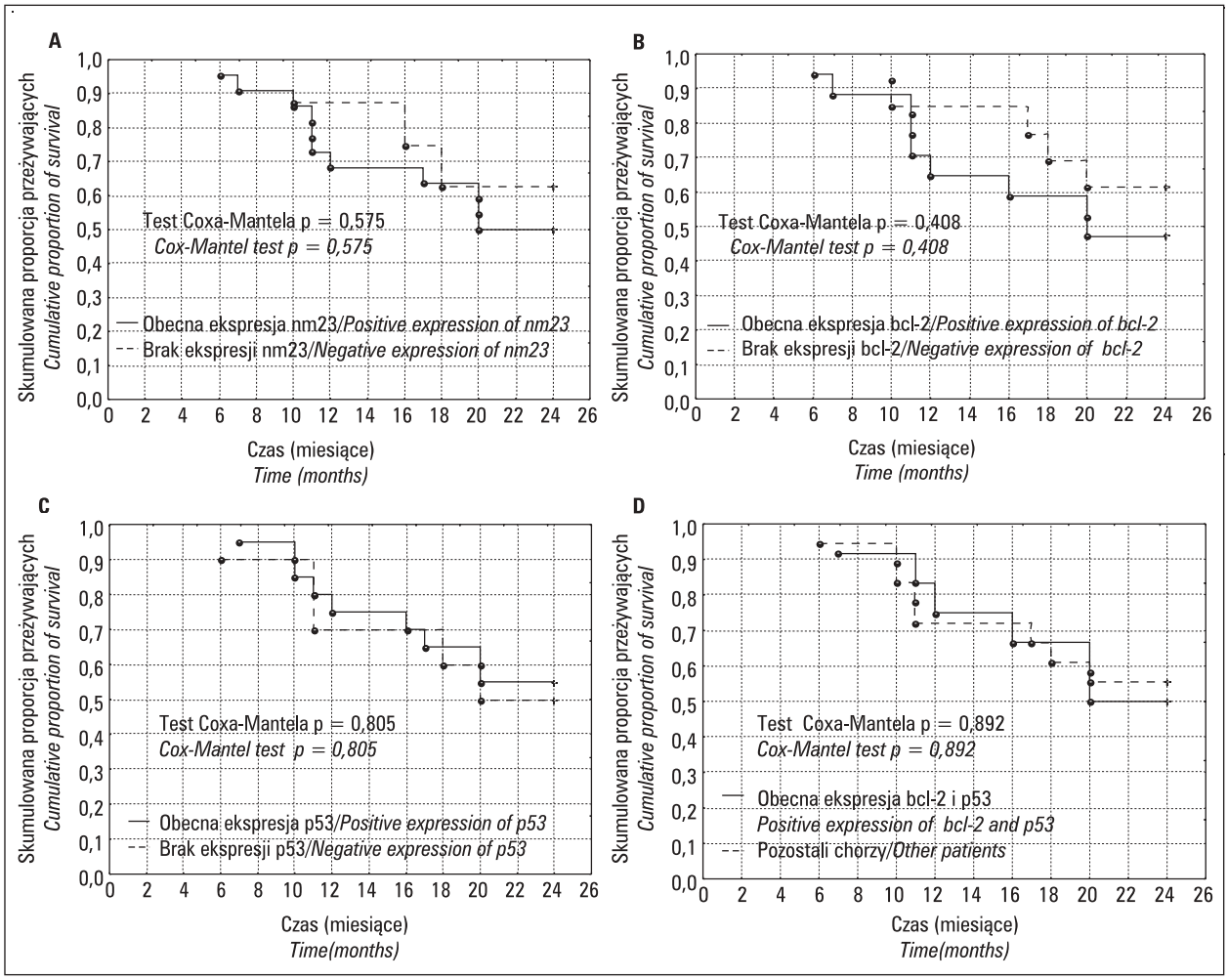
Rycina 1. Odsetek p53, bcl-2 i nm23 dodatnich przypadków w zależności od cechy N raka płaskonabłonkowego płuca

Figure 1. Percentage of p53, bcl-2 and nm23 positive cases in relation to N status of squamous cell lung cancer

Nie wykazano korelacji ekspresji p53, bcl-2 i nm23 oraz fenotypu p53+/bcl-2+ z cechą T1 lub T2. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji pojedynczych markerów w zależności od stopnia zaawansowania w klasyfikacji TNM, z wyjątkiem białka bcl-2, którego obecność wykrywano częściej w rakach o stopniach zawansowania III i IV w porównaniu ze stadiami I i II (odpowiednio 33% dla stadium I, 44% — dla II, 100% — dla IIIA i 60% — dla IIIB i IV), jednak obserwowane różnice nie były istotne statystycznie. W badanej grupie 2 lata przeżyło 16 chorych (7 w stadium I, 5 w II, 2 w IIIA i 2 w grupie IIIB i IV), co stanowi 53%. W żadnym z analizowanych przypadków nie stwierdzono związku ekspresji p53, bcl-2 i nm23 z przeżyciem (ryc. 2).

Omówienie

Patologiczne białko p53 ma wydłużony okres półtrwania, wskutek czego ulega akumulacji w jądrze komórki i może być wykrywalne metodami immunohistochemicznymi, a tak scharakteryzowana immunoreaktywność z komercjalnie dostępnymi przeciwciałami wykazuje wysoką zgodność z obecnością mutacji typu zmiany sensu (*missense mutation)* w genie *p53* [9]. Wyniki naszych badań wskazujące na wysoki, bo wynoszący 66% odsetek p53 dodatnich raków płaskonabłonkowych są zgodne z obserwacjami innych autorów [10, 11]. Co więcej, wydaje się, że w tym typie histologicznym raka płuca ekspresja białka p53 występuje częściej niż w całej grupie niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) oraz gruczolakorakach [11––13]. Znaczenie tego faktu pozostaje niejasne, nie można wykluczyć, że patologiczne białko p53 pełni szczególnie istotną rolę w powstawaniu raka płaskonabłonkowego, będąc molekularnym wykładnikiem karcinogennego działania dymu tytoniowego. Udowodniono bowiem, że benzopiren obecny w dymie tytoniowym tworzy selektywne addukty genu *p53*, implikując powstanie i utrwalenie na przykład mutacji punktowej T→G [14]. Nieco większe rozbieżności stwierdzono w odniesieniu do białka bcl-2. Większość autorów wskazuje na niższy odsetek bcl-2 dodatnich NDRP w porównaniu z naszymi danymi, ale niewiele publikacji dotyczy odrębnie raka płaskonabłonkowego. Zbliżoną częstość występowania bcl-2 w tym typie nowotworu wykryli Yaren i wsp. [15]. Zaob-



Rycina 2. Skumulowana proporcja przeżywających wg Kaplana-Meiera, uwzględniająca ekspresję białek: nm23 (**A**), bcl-2 (**B**), p53 (**C**) i koekspresję p53 oraz bcl-2 (**D**)

Figure 2. Cumulative Kaplan-Meier proportion of survival according to nm23 (**A**), bcl-2 (**B**), p53 (**C**) proteins expression and coexpression of p53 and bcl-2 (**D**)

serwowany przez nas wysoki odsetek bcl-2 dodatnich guzów może świadczyć o znaczącym udziale tego białka w powstaniu raka płaskonabłonkowego. Zatory z komórek raka, powstające w wyniku przenikania komórek guza do naczyń krwionośnych, są morfologicznym wykładnikiem jednej z najważniejszych cech nowotworu złośliwego — zdolności do tworzenia przerzutów odległych. Zgodnie z ostatnio opublikowanymi danymi wykrycie inwazji naczyń krwionośnych różnicuje pacjentów w obrębie dotąd istniejących stadiów TNM i może stanowić dodatkowy czynnik rokowniczy [8]. Negatywny związek między ekspresją nm23 i obecnością zatorów z komórek raka w naczyniach krwionośnych wynikający z naszych badań, może potwierdzać hamującą rolę tej proteiny w tworzeniu przerzutów. Znaczenie nm23 w procesie przerzutowania podkreślają inni autorzy, szczególnie cenne są obserwacje Ohta i wsp. [16] wskazujące, że utrata ekspresji nm23 może być czynnikiem predykcyjnym mikroprzerzutów w NDRP.

W dostępnej literaturze istnieje wiele publikacji analizujących związek p53, bcl-2 i nm23 z parametrami TNM NDRP, podczas gdy zaledwie pojedyncze prace analizują ten związek odrębnie dla podtypu płaskonabłonkowego. W naszej pracy nie stwierdziliśmy związku ekspresji białka p53 z cechą N, co potwierdzają obserwacje innych autorów zarówno w odniesieniu do całej grupy NDRP [13, 17], jak i raka płaskonabłonkowego [5]. Relacje immunorektywności białka bcl-2 z cechą N pozostają niejasne. Przeważa pogląd o braku zależności bądź negatywnej korelacji ekspresji proteiny bcl-2 z obecnością przerzutów raka płuca do węzłów chłonnych [13, 15], a jedynie nieliczni autorzy wskazują na dodatnią korelację ekspresji tej onkoproteiny z obecnością przerzutów NDRP do węzłów chłonnych [18]. Niestety, w wyżej cytowa-

nych publikacjach autorzy badający związek bcl-2 z cechami TNM raka płuca nie przedstawiali odrębnej analizy dla podtypów histologicznych NDRP.

Wykryty przez nas znacząco wyższy odsetek fenotypu p53+/bcl-2+ w grupie guzów z przerzutami w węzłach chłonnych sugeruje, że wzmożona ekspresja białka bcl-2 przy jednoczesnym zahamowaniu proapoptotyczej roli p53 może charakteryzować komórki o szczególnie dużej zdolności do rozprzestrzeniania w organizmie. Zmniejszenie zdolności do apoptozy zwiększa możliwość przeżycia komórek w warunkach potencjalnego narażenia na czynniki uszkadzające w złożonym procesie tworzenia przerzutów.

Brak istotnego wpływu ekspresji p53 i bcl-2 na cechę T w NDRP potwierdzają inni autorzy, przy czym szczególnie cenne są dane Piyathilake i wsp. [5], którzy przedstawili wyniki dotyczące białka p53 w raku płaskonabłonkowym. W cytowanej pracy opisano, podobnie jak w naszej analizie, że w grupie chorych przeważały przypadki NDRP o wczesnym stopniu zaawansowania z cechą T1 lub T2, co wpływa na fakt, że ocena zmniejszenia zdolności do apoptozy na cechę T pozostaje trudna do wyjaśnienia.

Związek ekspresji białka nm23 z zaawansowaniem choroby nowotworowej budzi wiele wątpliwości zarówno w całej grupie NDRP, jak i w poszczególnych typach histologicznych. W odniesieniu do raka płaskonabłonkowego Bosnar i wsp. nie wykazali związku białka nm23 z wielkością guza ani ze stopniem zaawansowania [19], a Lai i wsp. stwierdzili, że wyższa ekspresja nm23 występuje u chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych śródpiersia [20]. Ponadto wiele doniesień wskazuje na korzystny wpływ połączenia dwóch lub więcej oznaczeń na wyłonienie grupy chorych obciążonych szczególnie dużym ryzykiem rozsiewu choroby nowotworowej. Chen i wsp. stwierdzili, że mniejsza ekspresja proteiny nm23 i kadheryny E koreluje z wyższym stadium zaawansowania i obecnością przerzutów do węzłów chłonnych [21]. Do bardzo podobnych wniosków doszli rok wcześniej Kogan i wsp. [22].

Ocena rokowania w raku płaskonabłonkowym opiera się przede wszystkim na klasyfikacji TNM, podczas gdy rola markerów molekularnych pozostaje niewyjaśniona. Doniosła rola oporności na apoptozę w procesie transformacji nowotworowej implikuje potencjalnie negatywny wpływ ekspresji p53 i bcl-2 na czas przeżycia. W naszym materiale nie potwierdziliśmy negatywnego wpływu ekspresji p53 i bcl-2 na czas przeżycia chorych na płaskonabłonkowego raka płuca. Obszerna metaanaliza dokonana przez Mitsuami i wsp. potwierdza brak wpływu nieprawidłowości w zakresie genu i białka p53 na rokowanie w płaskonabłonkowym raku płuca, ale jednocześnie autorzy wykazali tego typu negatywne znaczenie rokownicze w odniesieniu do gruczolakoraka płuca. Wskazuje to na fakt, że znaczenie białek regulatorowych apoptozy może być odmienne w różnych histologicznie rakach płuca [9]. Rokownicza wartość białka bcl-2 w raku płuca pozostaje bardzo niejasna. Pomimo hamującego działania białka bcl-2 na proces apoptozy, przeważa opinia o braku oddziaływania lub pozytywnym wpływie obecności tej proteiny na rokowanie w raku płuca [23] i ten pogląd jest zgodny z naszymi wynikami.

Związek ekspresji białka nm23 z rokowaniem w raku płuca pozostaje dyskusyjny. Większość prac opiera się na badaniach chorych na NDRP, bez podziału na raka płaskonabłonkowego i gruczolakoraka. Część badaczy wskazuje na odwrotną korelację między stopniem ekspresji białka nm23 a rokowaniem [24], jednak inni autorzy podają w wątpliwość tę zależność [25]. Nadzieje budzi jednoczesne oznaczenie ekspresji proteiny nm23 i innych markerów białkowych. Hsu i wsp. wykazali, że u chorych na raka płuca zdecydowanie dłuższe przeżycie obserwuje się w grupie, w której współistnieje ekspresja nm23 z brakiem ekspresji FAK (*focal adhesion kinase*) w komórkach guza [26]. Stosunkowo nieliczne doniesienia wskazują raczej na brak związku ekspresji białka nm23 z rokowaniem w raku płaskonabłonkowym [19], co potwierdzają nasze obserwacje.

Wydaje się, że związek immunohistochemicznej oceny ekspresji p53, bcl-2 i nm23 z cechami TNM oraz rokowaniem w płaskonabłonkowym raku płuca jest obecnie daleki od wyjaśnienia. W badaniach nabłonka oskrzelowego wykazującego zmiany przednowotworowe wykazano częstą nadekspresję białka bcl-2, co więcej, nawet w nabłonku bez zmian dysplastycznych komórki warstwy podstawnej wykazywały ekspresję bcl-2 [27, 28]. Fakty te wskazują na to, że ujawnienie się wykrywalnej immunohistochemicznie obecności bcl-2 występuje wcześnie w karcinogenezie raka płuca, w tym szczególnie płaskonabłonkowego. Interesującą hipotezę dotyczącą tego faktu przedstawili Ohmura i wsp., wskazując, że nadekspresja bcl-2 pojawia się na skutek narażenia na czynniki uszkadzające jako bezpośrednia konsekwencja niestabilności genetycznej powodowanej przez te czynniki, przy jednoczesnej aktywacji mechanizmów przywracających stabilność, na przykład aktywacji telomeraz [13]. Także pojawienie się nieprawidłowego białka p53 opisywano w zmianach poprzedzających powstanie raka płaskonabłonkowe-

go [5]. W związku z powyższym wydaje się, że wczesne pojawienie się nadekspresji bcl-2 i obecność nieprawidłowego białka p53 ma znaczenie przede wszystkim dla promocji procesu nowotworowego, a mniejszą rolę odgrywa w progresji, co dodatkowo tłumaczy tak duże rozbieżności w ocenie wpływu tych markerów na rokowanie. Subiektywność oceny wyniku reakcji immunohistochemicznej oraz niepełna reprezentacja wszystkich stadiów zaawansowania w grupach badanych, w tym szczególnie mały udział przypadków o wysokim stopniu zaawansowania, stanowią dodatkowe aspekty utrudniające interpretację ekspresji markerów molekularnych.

Wnioski

Na podstawie osiągniętych wyników badań wykazano związek jednoczesnej obecności białka p53 i bcl-2 w guzie pierwotnym z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Stwierdzono ponadto, że brak obecności proteiny nm23 w guzie pierwotnym koreluje z istnieniem przerzutów w węzłach chłonnych oraz zatorów z komórek raka w naczyniach krwionośnych, co może stanowić potwierdzenie hamującego wpływu tego białka na tworzenie przerzutów w odniesieniu do płaskonabłonkowego raka płuca. Obiecujące wyniki niniejszej analizy implikują potrzebę dalszych pogłębionych badań nad wyodrębnieniem dodatkowych czynników molekularnych charakteryzujących guz pierwotny, mających potencjalny wpływ na jego biologiczne cechy. Może to być pomocne w przyszłości w projektowaniu indywidualnych schematów terapeutycznych w celu podniesienia efektywności leczenia raka płuca.

Piśmiennictwo

1. Szczuka I., Roszkowski-Śliż K. Rak płuca w Polsce w latach 1970–2004. Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 19–28.
2. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. Ann NY Acad. Sci 2000; 910: 121—137.
3. Cory S., Huang C.S.D., Adams M.J. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene 2003; 22: 8590–8607.
4. Steeg P.S. Perspectives on classic article: metastasis suppressor genes. J. Natl. Cancer Inst. 2004; 96: E4.
5. Piyathilake J.Ch., Frost A.R., Manne U., Weis H., Heimburger D.C., Grizzle W.E. Nuclear Accumulation of p53 is a potential marker for the development of squamous cell lung cancer in smokers. Chest 2003; 123: 181–186.
6. Brambilla E., Travis W.D., Colby T.V., Corrin B., Shimosato Y. The new World Health Organization classificantion of lung tumors. Eur. Respir. J. 2001; 18: 1059–1068.
7. Mountain C.F. Revisions in the international system for staging lung cancer. Chest 1997; 111: 1710–1717.
8. Tsuchiya T., Hashizume S., Akamine S. i wsp. Upstaging by vessel invasion improves the pathology staging system of non-small cell lung cancer. Chest 2007; 132: 170–177.
9. Mitsudomi T., Oyama T., Nishida K. i wsp. P53 nuclear immunostaining and gene mutations in non-small-cell lung cancer and their effect on patients survival. Ann. Oncol. 1995; 6: 9–13.
10. Moldvay J., Scheid P., Wild P. i wsp. Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. Clin Cancer Res. 2000; 6: 1125–1134.
11. Lai R.S., Wang J.S., Hsu H.K., Chang H.C., Lin C.H., Lin M.H. Prognostic evaluation of the expression of p53 and bcl-2 oncoproteins in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. Jpn. J. Clin Oncol. 2002; 32: 393–397.
12. 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: 4055–4063.
13. Ohmura Y., Aoe M., Andou A., Shimizu N. Telomerase activity and bcl-2 expression in non-small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. 2000; 6: 2980–2987
14. Hainaut P., Pfeifer G.P. Patterns of p53 G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. Carcinogenesis 2001; 22: 367–374.
15. Yaren A., Oztop I., Kargi A. i wsp. Bax, bcl-2 and c-kit expression in non-small-cell lung cancer and their effects on prognosis. Int. J. Clin Pract. 2006; 60: 674–682.
16. Ohta Y., Nozaki Z., Nozawa H. i wsp. The predictive value of vascular endothelial growth factor and nm23 for the diagnosis of occult metastasis in non-small cell lung cancer Jpn. J. Cancer Res. 2001; 92: 361–366.
17. Pollán M., Varela G., Torres A. i wsp. Clinical value of p53, c-erbB-2, CEA and CA125 regarding relapse, metastasis and death in resectable non-small cell lung cancer. Int. J. Cancer 2003; 10: 781–790.
18. Groeger A.M., Esposito V., De Luca A. i wsp. Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-x in resected non-small cell lung cancers. Histopathology 2004; 44: 54–63.
19. Bosnar M.H., Pavelic K., Krizanac S., Slobodnjak Z., Pavelic J. Squamous cell lung carcinomas: the role of nm23-H1 gene. J. Moll Med. 1997; 75: 609–613.
20. Lai W.W., Wu M.H., Yan J.J., Chen F.F. Immunohistochemical analysis of nm23-H1 in stage I non-small cell lung cancer: a useful marker in prediction of metastasis. Ann. Thorac. Surg. 1996; 62: 1500–1504.
21. Chen X.F., Zhang H.T., Qi Q.Y., Sun M.M., Tao L.Y. Expression of E-cadherin and nm23 is associated with the clinicopathological factors of human non-small cell lung cancer in China. Lung Cancer 2005; 48: 69–76.
22. Kogan E.A., Shvets S.I., Kovalenko V.L., Soboleva Iu.V. Correlation of proliferation, apoptosis, angiogenesis and metastasing in various histogenetic types of pulmonary cancer (an immunohistochemical investigation). Arkh. Patol. 2004; 66: 33–38.
23. Faran G., Dworakowska D., Jassem E. Kliniczne znaczenie immunohistochemicznej ekspresji białek p53, Bcl-2 i Bax u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. Współczesna Onkologia 2004; 8: 328–337.
24. Tang X.J., Zhou Q.H., Zhang S.F., Liu L.X. Expressions of nm23, E-cadherin, and beta-catenin in non-small cell lung cancer and their correlations with metastasis and prognosis. Ai Zheng 2005; 24: 616–621.
25. Tomita M., Ayabe T., Matsuzaki Y., Onitsuka T. Immunohistochemical analysis of nm23-H1 gene produkt in node-positive lung cancer and lymph nodes. Lung Cancer 1999; 24: 11—16.
26. Hsu N.Y., Chen C.Y., Hsu C.P. i wsp. Prognostic significance of expression of nm23-H1 and focal adhesion kinase in non-small lung cancer. Oncol. Rep. 2007; 18: 81–85.
27. Walker C., Robertson L., Myskow M.W., Dixon G.R. Expression of the BCL-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. Br. J. Cancer 1995; 72: 164–169.
28. Porębska I., Wyrodek E., Jankowska R., Kosacka M., Harłozińska-Szmyrka A. Apoptotic markers: p53, bcl-2 and bax in primary lung cancer. In Vivo 2006; 20: 599–604.