

*Originalni rad*

## **Ekspresija Bcl-2 anti- apoptotskog proteina u kolorektalnom adenokarcinomu**

Danijela Batinić Škipina<sup>1</sup>, Slavica Knežević Ušaj<sup>2</sup>, Dragana Zec<sup>3</sup>,  
Mirjana Ćuk<sup>1</sup>, Snežana Božanić<sup>4</sup>, Nenad Lalović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinike i bolničke službe u Foči, Klinički centar Istočno Sarajevo, Foča, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup>Institut za onkologiju, Sremska Kamenica, Srbija

<sup>3</sup>Institut za plućne bolesti, Sremska Kamenica, Srbija

<sup>4</sup>Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

---

### **Kratak sadržaj**

**Uvod.** Bcl-2 gen kodira onkoprotein, blokira programiranu ćelijsku smrt – apoptozu i ima važnu ulogu u kolorektalnoj kancerogenezi. Cilj studije je ispitivanje ekspresije Bcl-2 u odnosu na stadijum bolesti, histološke karakteristike tumora, lokalizaciju i makroskopski oblik rasta.

**Metode.** Pacijenti su podijeljeni u tri grupe prema nivou ekspresije Bcl-2 u tumoru: grupa 0 - nije bilo ćelija sa pozitivnom imunohistohemijskom reakcijom; grupa 1 - do 20% pozitivnih ćelija i grupa 2 - preko 20% pozitivnih ćelija. Grupe su upoređivane u odnosu na stadijum bolesti, T stadijum lokalne proširenosti bolesti, histološki tip tumora, lokalizaciju i makroskopski oblik rasta.

**Rezultati.** Kod 58% pacijenata koji su se nalazili u II stadijumu bolesti nije bilo ekspresije Bcl-2. Veći procenat (61%) oboljelih sa metastazama (stadijum III i IV) su imali visok nivo ekspresije Bcl-2. Karcinomi polipoidnog oblika rasta imaju veću ekspresiju Bcl-2.

**Zaključak.** Postoji statistički značajna razlika u ekspresiji Bcl-2 proteina kod pacijenata operativno liječenih u II i III stadijumu bolesti, stadijumu T3a/b i T3c/d lokalne uznapredovalosti bolesti i tumora polipoidnog u odnosu na infiltrativni način rasta.

**Ključne riječi:** kolorektalni karcinom, apoptoza, Bcl-2, stadijum bolesti

---

### **Adresa autora:**

Asist. dr Danijela Batinić Škipina, Mr sc.

Odjeljenje za patologiju

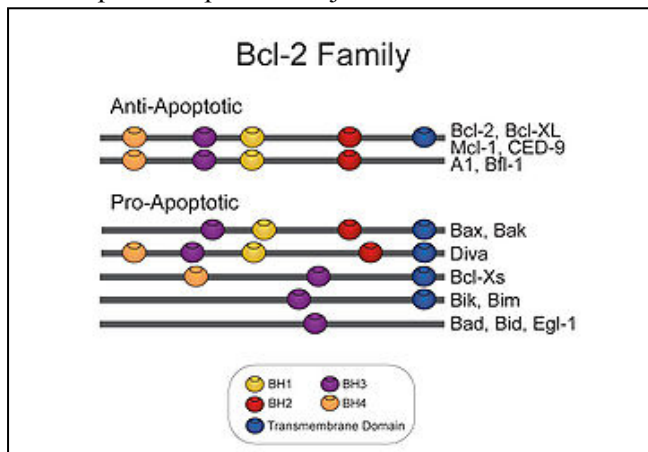
Studentska 5

73300 Foča

danijela@zona.ba

## Uvod

Kolorektalni karcinom je treći najučestaliji karcinom kod oba pola i drugi najčešći uzrok smrtnosti od maligniteta u razvijenim zemljama [1]. Od svih malignih tumora kolona i rektuma 90% su adenokarcinomi [2]. Oni nastaju malignom transformacijom epitelnih ćelija sluznice debelog crijeva. Rast tumora je rezultat nesklada između stepena diobe ćelija i njihove programirane smrti - apoptoze [3]. Apoptoza je oblik ćelijske smrti u kome dolazi do aktivacije endogenog genskog programa i samouništenja ostarjele, oštećene i genetski izmijenjene ćelije [4]. Bitnu ulogu u kontroli apoptoze ima Bcl-2 familija gena, koja je smještena na dugom kraku 18. hromozoma. Spada u klasu velikih gena sa tri egzona i kodira oko dvadeset proteina koji djeluju pro- i anti-apoptotski [5]. Ovi proteini su homologni u jednom ili sva četiri BH domena proteinskog lanca i balansirajući međusobno određuju opstanak ili eliminaciju ćelije. Familija proapoptotskih i antiapoptotskih proteina prikazana je šemom 1.



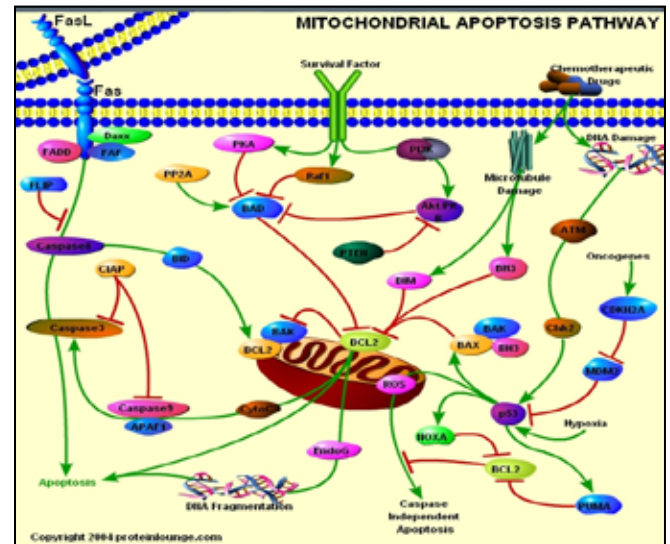
Šema 1. Familija proapoptotskih i antiapoptotskih proteina

Bcl-2 antiapoptotski protein molekulske mase 25-kDa je zaštićen u toku evolucije i prisutan je kod brojnih nižih vrsta. Ekspirira se u progenitornim ćelijama svih hematopoetskih linija, epitelnim matičnim ćelijama (crijevo i koža), epitelu koji odgovara na hormonske podražaje (dojka, prostata, štitasta žlijezda) i pojedinim postmitotskim tipovima nervnih i krvnih ćelija. U embrionalnom razvoju, Bcl-2 genska ekspresija je rezervisana za nediferentne matične ćelije i ćelije u ranom stadijumu diferencijacije ka matičnim ćelijama za pojedina tkiva [6-8].

Bcl-2 gen reguliše ćelijski ciklus u fiziološkim uslovima, hiperplastičnom i neoplastičnom tkivu. Mutacija Bcl-2 gena registruje se u različitim neoplazmama, uključujući limfome, karcinome i sarkome.

U epitelu debelog crijeva normalno se Bcl-2 gen

ekspirira u kompleksu ćelija lokalizovanom u bazi kriptе. Njegovi anti-apoptotski proteinski produkti štite matične ćelije od eliminacije i utiču na program diferencijacije. Terminalno diferentovani enterociti gube ekspresiju Bcl-2 i pod uticajem pro-apoptotskih pripadnika familije ulaze u program samouništenja. Gradijent u ekspresiji Bcl-2 familije gena u bazi i vrhu kriptе bitan je za održavanje odgovarajućeg broja kolonocita [3]. Mehanizam pokretanja apoptotskog puta u ćeliji prikazan je šemom broj 2.



Šema 2. Apoptotski putevi u ćeliji

Povećana ekspresija Bcl-2 gena se registruje u fazi ranog adenoma uključujući i Aberantni kriptni fokus. Aktivacijom c-myc gena u početnoj fazi nastanka adenoma raste proliferativna aktivnost ćelija. Istovremeno zbog nedostatka nutritijenata, konkurentnosti za faktore rasta i hipoksiju može biti aktiviran i/ili blokiran program uništenja Bcl-2 genom [9]. Poremećaj u programu eliminacije stvara dugoživeće ćelije čija kumulacija inicira nastanak tumora i omogućava njegovu ekspanziju. Tumorske ćelije sa defektom u mitohondrijalnoj propustljivosti (gubitak Bax i Bcl-2 overekspresija) izbjegavaju odgovor imunskog sistema tokom tumorske progresije i limitiraju efikasnost hemio- i zračne terapije. Neosjetljivost na apoptotske signale omogućava preživljavanje tumorske ćelije nakon odvajanja od ekstracelularnog matriksa, opstanak u vaskulaturi i stvaranje metastatskog depozita. Dakle, Bcl-2 gen je multifunkcionalni protein čija overekspresija kod pojedinih maligniteta remeti ćelijski ciklus stvarajući dugoživeće ćelije, čime raste rizik od sekundarnih genetskih alteracija [10-12].

Danas, postoji posebno interesovanje za sve faktore uključene u programiranu ćelijsku smrt, jer predstavljaju potencijalnu metu u hemoprevenciji i liječenju

kolorektalnih karcinoma [13]. Postoje pokušaji da se prekid u programiranoj eliminaciji tumorskih ćelija premosti preko malih sintetskih molekula lijeka, koje oponašaju BH3 domen i koji se vezuju za Bcl-2 anti-apoptotski protein. Time se povećava nivo proapoptotskih homodimera u ćeliji i aktivacijom kaspaza maligna ćelija uvodi u apoptozu [14-17].

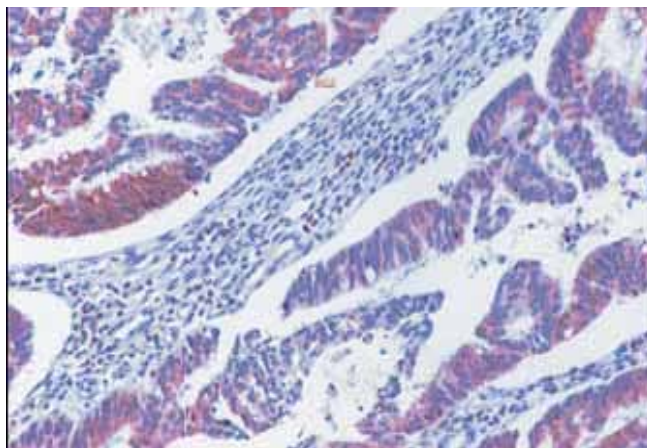
U dostupnoj literaturi ne postoje usaglašeni stavovi o prognostičkom značaju i ulozi proteinskih produkata Bcl-2 gena u kolorektalnom karcinomu. U nekim radovima uočena je povećana ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2 gena u ranim fazama razvoja kolorektalnog karcinoma [18].

Cilj istraživanja je analiza ekspresije anti-apoptotskog proteina Bcl-2 u kolorektalnom karcinomu u koleraciji sa stadijumom bolesti, patohistološkim karakteristikama tumora, anatomskom lokalizacijom i makroskopskim oblikom rasta.

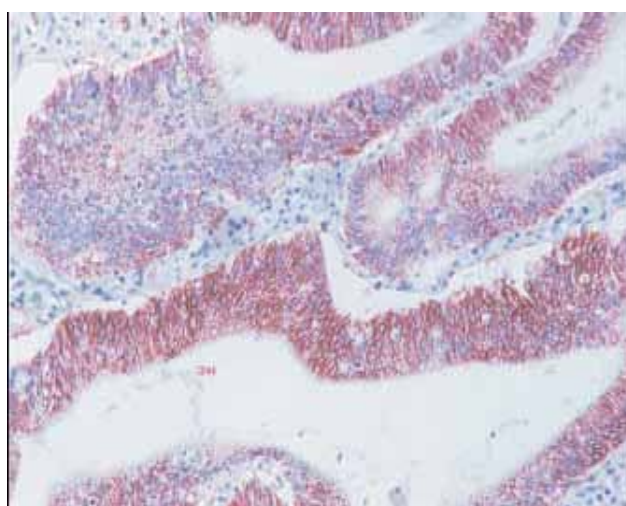
### Metode rada

Studijom je obuhvaćeno 90 bolesnika sa sporadičnim oblikom kolorektalnog karcinoma kod kojih je izvršena radikalna hiruška intervencija na Odjeljenju hirurgije Kliničkog centra Istočno Sarajevo bolnice Foča. Pacijenti nisu preoperativno primali hemio ili radioterapiju. U studiju su uključeni svi pacijenti bez obzira na stadijum bolesti, pol ili starosnu dob. Reprezentativni uzorci tumorskog tkiva, koji nisu pokazivali znakove nekroze, su fiksirani u 10% formalinu i ukalupljeni u parafinske blokove. Deparafinisani tkivni presjeci debljine 3-5 µm su bojeni hematoksilin-eozinom. Patoanatomskom i patohistološkom analizom su određeni: stadijum bolesti po TNM klasifikaciji, histološki tip kolorektalnog karcinoma, makroskopski oblik rasta i lokalizacija kolorektalnog karcinoma. Bolesnici su podijeljeni u tri grupe u skladu sa TNM klasifikacijom: A grupa - bolesnici sa kolorektalnim karcinomom u stadijumu 0 i I; B grupa - bolesnici u II stadijumu tumorske bolesti i grupa C - bolesnici u stadijumu bolesti III i IV.

Detekcija ekspresije Bcl-2 anti-apoptotskog proteina vršena je Streptavidin- biotin peroksidaza tehnikom, po standardnoj LSAB+ proceduri (DAKO). Na osnovu stepena tumorskih ćelija, koji su pokazivali pozitivnu imunohistohemijsku reakciju sa Bcl-2 monoklonalnim antitijelom, pacijenti su podijeljeni u sljedeće grupe: grupa 0 – nije bilo pozitivne imunohistohemijske reakcije u tumoru, grupa 1 - do 20 % tumorskih ćelija pokazuje pozitivnu imunohistohemijsku reakciju (Slika 1) i grupa 2 - preko 20% tumorskih ćelija pokazuje pozitivnu imunohistohemijsku reakciju (Slika 2).



**Slika 1.** Bcl-2 pozitivnost do 20% ćelija kolorektalnog karcinoma, 400X



**Slika 2.** Bcl-2 pozitivnost u više od 20% ćelija kolorektalnog karcinoma, 400X

### Rezultati

Pozitivno citoplazmatsko bojenje Bcl-2 (grupe 1 i 2) registrovana je kod 71 bolesnika (78,9%), dok kod 19 bolesnika (21,1%) nije bilo ekspresije ovog markera (grupa 0). U grupi pacijenata koji su pokazivali pozitivnu imunohistohemijsku reakciju Bcl-2 u kolorektalnom karcinomu visok nivo ekspresije (grupa 2) registrovan je kod 44 (49%) bolesnika, dok su umjeren stepen ekspresije (grupa 1) imali 27 bolesnika (30%). Ekspresija Bcl-2 u odnosu na broj bolesnika i stadijume bolesti prikazana je u tabelama 1, 2 i 3.

**Tabela 1.** Distribucija stepena ekspresije Bcl-2 u ispitanjoj grupi bolesnika

Bcl2-0	Bcl2-1	Bcl2-2
19	27	44

**Tabela 2.** Distribucija stepena ekspresije Bcl-2 u odnosu na stadijum bolesti

Stadijum	Bcl-2 0	Bcl-2 1	Bcl-2 2
IIA	15	4	7
IIB	3	12	3
III	1	21	32
IV	0	0	2

U II stadijumu bolesti kod 41% bolesnika nije bilo ekspresije Bcl-2, 36,3% je imalo umjeren stepen imunokoloracije tumora (grupa 1) i 22,7% bolesnika je imalo visok stepen ekspresije Bcl-2 (grupa 2). Kod bolesnika koji su se nalazili u III i IV stadijumu bolesti kod 14,3% bolesnika nije bilo ekspresije, 37,5% je imalo umjeren stepen ekspresije (grupa 1) i 60,7% visok nivo ekspresije Bcl-2 (grupa 2). Postoji statistički visoko značajna razlika ( $t_e=5,44$ ,  $p=0,00000048$ ;  $p<0,01$ ) u ekspresiji Bcl-2 kod bolesnika koji su se nalazili u II i III stadijumu bolesti.

**Tabela 3.** Distribucija stepena ekspresije Bcl-2 u odnosu na T stadijum bolesti

T-stadijum	Bcl-2 0	Bcl-2 1	Bcl-2 2
T2	2	0	1
T3a/b	15	4	1
T3c/d	1	20	31
T4	1	3	11

Analiza stepena ekspresije Bcl-2 u odnosu na lokalnu proširenost bolesti T-stadijum pokazuje da kod većine pacijenata (67%) u T2 stadijumu nije bilo ekspresije Bcl-2, dok je kod većine pacijenata (73%) u T4 stadijumu ta ekspresija bila visoka. Nema statistički značajne razlike u ekspresiji Bcl-2 u odnosu na T2 i T3 lokalni stadijum bolesti ( $p=0,185$ ;  $p>0,05$ ). Postoji statistički značajna razlika u ekspresiji Bcl-2 ( $p=0,00009$ ;  $p<0,05$ ) unutar T3 stadijuma bolesti (T3a/b i T3c/d).

Analiza ekspresije Bcl-2 u odnosu na pol, anatomsku lokalizaciju, makroskopski oblik rasta tumora i histološki tip tumora je prikazan tabelom 4.

**Tabela 4.** Analiza ekspresije Bcl-2 u odnosu na pol i anatomske karakteristike tumora

Ekspresija Bcl-2 u odnosu na pol pacijenata			
VAR	Vel. uzorka	Srednja vrijednost	Varijansa
žene	46	1,615385	0,326154
muškarci	44	1,12	0,86
Stepen slobode	88	$t_{0,05}$	1,98729
	88	$t_{0,01}$	2,6329
T-empirijsko ( $t_e$ )	1,1363	$p>0,05$	$p=0,3424$
Ekspresija Bcl-2 u odnosu na anatomsku lokalizaciju tumora			
VAR	Vel. uzorka	Srednja vrijednost	Varijansa
proksimalni	24	1,492308	0,230769
distalni	66	1,363158	0,739687
T-empirijsko ( $t_e$ )	1,673063	$p>0,05$	$p=0,091125$
Ekspresija Bcl-2 u odnosu na makroskopski oblik rasta tumora			
VAR	Vel. uzorka	Srednja vrijednost	Varijansa
infiltrativan	52	0,761176	0,617647
polipoidan	38	1,885294	0,691176
T-empirijsko ( $t_e$ )	2,33526	$0,01<p<0,05$	$p=0,0267853$
Ekspresija Bcl-2 u odnosu na histološki tip tumora			
VAR	Vel. uzorka	Srednja vrijednost	Varijansa
ne-mucinozni	82	1,480769	0,56825
mucinozni	8	1,210526	0,657183
T-empirijsko ( $t_e$ )	1,627115	$p>0,05$	$p=0,107288$

Poređenjem ekspresije Bcl-2 u odnosu na makroskopski oblik rasta ( $p=0,026$ ;  $0,01<p<0,05$ ) zaključujemo da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji ovog proteina između polipoidnog i infiltrativnog rasta tumora. Polipoidni način rasta je udružen sa većom ekspresijom Bcl-2. Nema statistički značajne razlike u ekspresiji Bcl-2 u odnosu na pol, histološki tip i lokalizaciju tumora u debelom crijevu.

## Diskusija

Određivanje ekspresije Bcl-2 onkoproteina može imati prognostički značaj kod pojedinih tipova tumora [19-21]. Međutim, uloga i funkcija proteinskih pripadnika Bcl-2 familije još uvijek nije kompletno razjašnjena. Pojedini autori pretpostavljaju da pojačana apoptoza usporava tumorski rast i da je time znak dobre prognoze. Nasuprot tome, slaba apoptotska aktivnost je znak loše prognoze, jer stvara veću tumorsku masu i omogućava nastanak sekundarnih genskih mutacija. Povećana Bel-2 genska ekspresija je u nekim radovima u korelaciji sa nižom stopom preživljavanja kod neuroendokrinih tumora pluća (atipičnog karcinoida i krupnoćelijskog karcinoma) [22]. Veliki procenat sitnoćelijskih neuroendokrinih karcinoma pluća pokazuje visok nivo ekspresije Bel-2 proteina. Proteinski pripadnici Bel-2 familije se u nekim radovima dovode u vezu sa neuroendokrinom diferencijacijom i prognozom kod karcinoma pluća [23,24].

Bcl-2 ekspresija u sluznici debelog crijeva se nalazi u bazi kripti u odjeljku umnožavanja ćelija. Nije primijećena povećana ekspresija u kriptnom epitelu izvan odjeljka matičnih ćelija kod inflamatornih stanja debelog crijeva. Povećanu ekspresiju cijelom osovinom kripe nalazimo kod adenoma i u sluznici u okolini karcinoma. Sugerise se da alteracije u ekspresiji Bcl-2 gena prethode razvoju morfološki prepoznate displazije. Progresija adenoma u karcinom može nastati upravo u ćelijama koje pokazuju povećanu ekspresiju Bel-2 proteina, jer su zaštićene od eliminacije [24].

Postoji određeni broj studija o odnosu apoptoze i njenom značaju kod kolorektalnog karcinoma, od kojih su neke međusobno kontradiktorne.

Neki autori navode da je Bel-2 overekspresija udružena sa većim stadijumom bolesti i histološkim gradusom, što rezultuje mnogo agresivnijim tumorskim ponašanjem [25].

Drugi navode da Bcl-2 pozitivni kolorektalni karcinomi imaju mnogo bolji klinički tok bolesti [26], dok određeni broj istraživača zaključuje da ekspresija Bel-2 proteina nema nikavu prognostičku važnost kod kolorektalnog karcinoma. Ipak, većina autora tvrdi da je pozitivno bojenje sa Bcl-2 u korelaciji sa povećanim rizikom od nastanka limfnih i udaljenih, posebno jetrinih metastaza. Visoke vrijednosti Bcl-2 ekspresije i odnosa Bcl-2/ Bax, u ovim radovima se dovode u vezu sa mutiranim p53 fenotipom, koji se često nalazi u kolorektalnom karcinomu [27-29].

Krajewska i saradnici [30] navode da se Bel-2 overekspresija vezuje za duže preživljavanje oboljelih od kolorektalnog karcinoma, dok je Bax ekspresija u II stadijumu bolesti udružena sa povećanim rizikom od lokalnog relapsa bolesti. Moguće objašnjenje ovog neobičnog fenomena je da ekspresija Bcl-2 gena za-

ustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi i smanjuje proliferativnu aktivnost tumorskih ćelija. Drugo objašnjenje je da se pripadnici Bel-2 familije konvertuju iz protektora u promotore apoptoze u toku interakcije sa drugim faktorima povezanim sa apoptozom [31].

Merritt Anita i saradnici [32] su ispitivali kolorektalne karcinome u Dukes C i D stadijumu sa jetrinim metastazama. U njihovoj studiji je postojala intenzivna korelacija Bcl-2 proteina u citoplazmi i p53 u jedrima tumorskih ćelija. Ekspresije Bel-2 i p53 je bila u pozitivnoj korelaciji sa stadijumom bolesti i prisustvom metastaza u jetri.

Prema literaturnim podacima ekspresija Bcl-2 proteina u kolorektalnom karcinomu kreće se između 45% i 78%. U ispitivanoj grupi, 70% karcinoma je pokazivalo pozitivnu imunohistohemijsku reakciju. Komparirajući ekspresiju Bcl-2 proteina u odnosu na grupe bolesnika po stadijumima bolesti, nađena je statistički značajna razlika u ekspresiji između II i III stadijuma bolesti. U III i IV stadijumu bolesti samo jedan ispitanik nije imao pozitivnu imunohistohemijsku reakciju sa Bcl-2 antitijelom.

Postojala je pozitivna korelacija između ekspresije Bcl-2 i dubine infiltracije zida crijeva, odnosno lokalne proširenosti bolesti, što je podudarno istraživanju Mannea i saradnika [33]. Statistički značajna razlika u ekspresiji Bcl-2 anti-apoptotskog proteina postoji kod tumora sa infiltracijom većom od 5 mm u perikolično masno tkivo u odnosu na tumore, koje infiltrišu tuniku muskularis i u perikolno masno tkivo do 5 mm.

Bcl-2 ekspresija je bila statistički značajno veća kod karcinoma sa polipoidnim načinom rasta. Difuzna ekspresija Bcl-2 antiapoptotskog proteina se prema istraživanjima Bosarija i saradnika [34] nalazi kod hiperplastičnih polipa i adenoma. Prema ovima autorima, povećana ekspresija Bcl-2 antiapoptotskog proteina je ključna u ranoj fazi kolorektalne kancerogeneze nastanka karcinoma iz adenoma [35].

Nije bilo povezanosti Bcl-2 ekspresije sa anatomskim karakteristikama tumora (veličina i lokalizacija) i drugim histološkim parametrima loše prognoze (histološki, nuklearni gradus i histološki tip tumora).

## Zaključak

Bcl-2 gen kodirajući proapoptotske i antiapoptotske proteine nesumnjivo ima ulogu u kolorektalnoj kancerogenezi, naročito u početnom stadijumu adenoma sa lakom displazijom. U našoj studiji, kolorektalni karcinomi koji nastaju iz polipoidnih adenoma imaju statistički značajno veću ekspresiju Bcl-2 antiapoptotskog proteina. Komparirajući ekspresiju Bcl-2 antiapoptotskog proteina sa stadijumom bolesti, u ispitivanoj grupi postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji Bcl-2 kod pacijenata operativno liječenih u II

i III stadijumu bolesti i stadijumu T3a/b i T3c/d. Inhibišući apoptozu Bcl-2 antiapoptotski protein promoviše stalan tumorski rast, utiče na stadijum bolesti i preživljavanje oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Većina istraživača se slaže da ekspresija Bcl-2 antiapoptotskog proteina i mutiranog p53 u kolorektalnom karcinomu izaziva rezistenciju na antikancersku tera-

piju, uključujući 5-fluorouracil. Visok stepen korelacije analiziranog imunohistohemijskog markera sa standardnim patohistološkim parametrima loše prognoze govore u prilog pretpostavke da Bcl-2 anti-apoptotski protein može imati prediktivnu važnost u kolorektalnom karcinomu i može doprinijeti optimalnom izboru postoperativne terapije.

## Literatura

1. Ferlay J et al. GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, IARC cancer base no. 5, version 2.0. Lyon: IARC Press; 2004.
2. Jamal A et al. Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 2004;54:8-29.
3. Watson AJM. Apoptosis and colorectal cancer. *Gut* 2004;3:1701-1709.
4. Potter DJ. Colorectal Cancer. Molecules and Populations. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91:916-928.
5. Goldstein SN, Silverman JF. Immunohistochemistry of the gastrointestinal tract. In: Dabbs D. ed. *Diagnostic Immunohistochemistry*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002; 359.
6. Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D. Guardians of cell death: The Bcl-2 Family proteins. *Esseys Biochem* 2003;39:73-88.
7. Hockenbery DM, Zutter WM, Hickey M, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961-6965.
8. Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ. BCL-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 1994;120:301-311.
9. Hashimoto S, koji T, Kahara, Kanematsu T, Nakane P. K. Frequency of apoptosis relates inversely to invasiveness and metastatic activity in human colorectal cancer. *Virchows Arch* 1997;431:241-248.
10. Silverman GA, Green ED, Young RL, Jockel JI, Domer PH, Korsmeyer SJ. Meiotic recombination between yeast artificial chromosomes yields a single clone containing the entire Bcl-2 protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9913-9917.
11. Wang JL, Lui D, Zhang ZJ, et al. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induced apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(13):7124-7129.
12. Cory S, Adams JM. The BCL-2 family: Regulators of the cell life or death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2(9):647-656.
13. Bissonnette RP, Exheverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by Bcl-2. *Nature* 1992;359:552-554.
14. Shen YJ, DeLong CJ, Tercé F, Kute T, Willingham MC, Pettenati MJ, Cui Z. Polyploid Formation via Chromosome Duplication Induced by CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase Deficiency and Bcl-2 Overexpression: Identification of Two Novel Endogenous Factors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2005;53(6): 725-733.
15. Schandi CA, Lis, Re GG, Fan W, Willingham MC. Mitotic chromosomal Bcl-2, localisation to interphase nuclei. *J Histochem Cytochem* 1999;47:151-158.
16. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies of cancer. *Cancer Cell* 2003;3:17-22.
17. Hicks DJ, Hasan F, Smartt H, Cohen GM, Paraskeva C, MacFarlane M. Increased sensitivity to TRAIL-induced apoptosis occurs during the adenoma to carcinoma transition of colorectal cancerogenesis. *Br J Cancer* 2005;92:736-742.
18. Mandal M, Wu X, Kumar R. Bcl-2 deregulation leads to inhibition of sodium butyrate induced apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 1997; 18(1): 229-232.
19. Vakkala M, Latheenmaki K, Raunio H et al. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 1995;5:319-324.
20. Aihara M, Truong LD, Dunn Jk, Wheeler TM, Scardio PT, Thompson TC. Frequency of apoptotic bodies positively correlates with Gleason grade in prostate cancer. *Hum Pathol* 1994;25:797-801.
21. Kaur P, Bhaskar V, Kallakury S et al. Surviving and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab* 2004;128:39-43.
22. Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S et al. Apoptosis-related factors p53, Bcl-2, and bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol* 1996;149:1941-1952.
23. Eerola AK, Tormanen U, Rainio P, et al. Apoptosis in operated small lung carcinoma is inversely related to tumor necrosis and p53 immunoreactivity. *J Pathol* 1997;181:172-177.
24. Wang Dg, Johnston CF, Sloan JM, et al. Expression of Bcl-2 in lung neuroendocrine tumor: cooperation with p53. *J Pathol* 1998;184:247-251.
25. Bhatavdekar JM, Patel DD, Ghosh N et al. Coexpression of Bcl-2 and p53 oncoproteins as prognostic discriminants in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1997;40:785-90.
26. Baretton BG, Diebckl J, Christoforis G et al. Apoptosis and Bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspect of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996;77:255-64.
27. Mosnier JF, Perret AG, Vindirnanian M, et al. An immunohistochemical study of the simultaneous expression of Bcl-2 and p53 oncoproteins in epithelial tumours of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:654-9.
28. Dursun A, Poyraz A, Suer O, Sezer C, Akyol G.

- Expression of Bcl-2 and c-erbB2 in colorectal neoplasia. *Pathol Oncol Res* 2001;7:24-7.
29. Ušaj Knežević S. Prognostički značaj prisutva mutacije K-Ras onkogeni i p-53 tumor supresorskog gena u kolorektalnom karcinomu. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu. 2001.
30. Krajewska M, Kim H, Kim C, et al. Analysis of Apoptosis Protein Expression in Early- Stage Colorectal Cancer Suggests Opportunities for New Prognostic Biomarkers. *Clin Cancer Res* 2005;11(15):5451-5462.
31. Lin B, Kolluri SK, Lin F et al. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor TR3/NGFI-B/NUR//. *Cell* 2004;116:527-40.
32. Merritt JA, Potten SC, Watson JMA et al. Differential expression of Bcl-2 in intestinal epithelia. Corellation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and incidence of colonic neoplasia. *J Cell Science*1995;108:2261-2271.
33. Manne U, Myers BR, Moron C et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1997;74:346-358.
34. Bosari S, Honeghini L, Graziani S et al. Bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1995;26(5):534-540.
35. Sincrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens c, Lee J. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal cancerogenesis. *Cancer Res*1995;55:237-241.
- 

## The expression of Bcl-2 anti- apoptotic protein in colorectal adenocarcinoma

Danijela Batinić Škipina<sup>1</sup>, Slavica Knežević Ušaj<sup>2</sup>, Dragana Zec<sup>3</sup>,  
Mirjana Ćuk<sup>1</sup>, Snežana Božanić<sup>4</sup>, Nenad Lalović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Center East Sarajevo, Clinics and Hospital Services, Foča, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

<sup>2</sup>Institute of Oncology, Sremska Kamenica, Serbia

<sup>3</sup>Institute of Lung Diseases, Sremska Kamenica, Serbia

<sup>4</sup>Medical Faculty, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

**Introduction.** The Bcl-2 gene codes an oncoprotein, inhibits a programmed cell death or apoptosis and it plays a very important role in colorectal cancerogenesis. The aim of our study is to determine Bcl-2 expression in colorectal carcinomas in relation with the stage of disease, histology of tumor type, localization and macroscopic growth pattern.

**Methods.** Immunohistochemical detection of Bcl-2 protein expression was carried out on 90 resected colorectal carcinomas. The patients were divided into three groups according to the degree of Bcl-2 expression in a tumor: group 0 - there were no cells with positive immunohistochemical reaction; group I- up to 20 % of positive cells, and group II- above 20% of positive cells. The groups were compared in relation to the stage of disease, T stage of local spread of disease, histology of tumor type, localization and macroscopic growth pattern.

**Results.** 58% of patients at the second stage of disease had no expression of Bcl-2. Higher percentage (61%) of the patients with metastases ( stages III and IV) had high level of Bcl-2 expression. Tumors with polipoid growth pattern have higher level of Bcl-2 expression.

**Conclusion.** There is a statistically significant difference in Bcl-2 protein expression in patients surgically treated at the II and III stage of disease, stage T3a/b, T3c/d of local spread of disease and tumors which polipoid growth pattern in relation to infiltrative growth pattern.

**Key words:** colorectal carcinoma, apoptosis, Bcl-2, stage of disease