

Paweł Basta^{1,2}, Krystyna Gałązka², Elżbieta Stasienko²,
Magdalena Dutsch-Wicherek², Łukasz Wicherek²

Received: 10.03.2011

Accepted: 24.03.2011

Published: 29.04.2011

Analiza immunoreaktywności antygenów B7H4 i HLA-G w ognisku wznowy raka jajnika i jego mikrośrodowisku

Analysis of B7H4 and HLA-G immunoreactivity within ovarian cancer relapse and its microenvironment according to the preceding applied chemotherapy

Анализ иммунореактивности антигенов B7H4 и ХЛА-Г в очаге рецидива рака яичника и в его микроокружении

¹ Klinika Ginekologii i Onkologii UJCM

² Oddział Kliniczny Ginekologii i Onkologii Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy. Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Pielęgniarstwa Ginekologicznego Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK

Correspondence to: Dr hab. n. med. Łukasz Wicherek, prof. UMK, Oddział Kliniczny Ginekologii i Onkologii Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka, ul. Romanowskiej 2, 85-796 Bydgoszcz, tel.: 523 743 399, 523 743 874, e-mail: mowicher@cyf-kr.edu.pl

Podziękowanie

Składamy serdeczne podziękowania Profesorowi Jerzemu Stelmachowowi za okazaną pomoc. Słowa podziękowania kierujemy również do Dra Zbigniewa Pawłowicza za stworzenie warunków do pracy naukowej w Centrum Onkologii im. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy i wsparcie okazywane młodym naukowcom. Ponadto chcielibyśmy podziękować Christine Maisto za pomoc w przygotowaniu manuskryptu.

Acknowledgments

We wish to thank Professor Jerzy Stelmachow for his advice, helpful discussions, and friendly words of support. We would also like to thank Dr. Zbigniew Pawłowicz for generating the conditions advantageous for research. Moreover, we would like to thank Christine Maisto for her assistance. Praca sfinansowana przez Ministerstwo Nauki, numer grantu (5921/B/P01/2010/38)

This work was funded by the Polish Ministry of Science and Higher Education, grant number 5921/B/P01/2010/38

Streszczenie

Ekspresja antygeny B7H4 i antygeny HLA-G jest związana z ucieczką komórek raka spod nadzoru immunologicznego, ponieważ antygeny te odpowiadają za ograniczenia aktywności limfocytów cytotoksycznych T i komórek NK. Ich ekspresję wykazano zarówno w komórkach raka jajnika, jak i w obrębie błony komórkowej makrofagów znajdujących się w mikrośrodowisku raka jajnika. Ponieważ odpowiedź na zastosowane leczenie chirurgiczne i chemioterapię może zależeć od stopnia zahamowania aktywności układu odpornościowego gospodarza, postanowiliśmy zbadać immunoreaktywność tych antygenów w tkance wznowy raka jajnika u 17 chorych w zależności od odpowiedzi na zastosowane wcześniej leczenie. **Metody:** Oceniliśmy immunoreaktywność antygenów B7H4 oraz HLA-G w komórkach raka jajnika i w obrębie makrofagów naciekających mikrośrodowisko raka jajnika w próbkach tkankowych pochodzących od 17 chorych. Następnie przeprowadziliśmy analizę zmian ekspresji badanych antygenów w zależności od odpowiedzi na zastosowane leczenie chirurgiczne i chemioterapię. **Wyniki:** W naszej pracy zaobserwowaliśmy statystycznie znamienne więcej makrofagów B7H4-dodatnich w mikrośrodowisku wznowy raka jajnika w przypadkach, w których wznowa występowała po wcześniejszym leczeniu chirurgicznym i chemioterapii I i II rzutu, w porównaniu z przypadkami wznowy po leczeniu chirurgicznym i chemioterapii I rzutu. Podobnie w pierwszej grupie obserwowano wyższą immunoreaktywność antygeny HLA-G. **Wnioski:** Obecność w mikrośrodowisku raka jajnika makrofagów o działaniu hamującym układ odpornościowy jest związana z powstaniem hamującego mikrośrodowiska guza i może mieć związek z odpowiedzią na leczenie.

Słowa kluczowe: HLA-G, B7H4, wznowa raka jajnika, makrofagi, chemioterapia

Summary

Introduction: We decided to examine the immunoreactivity of two antigens, B7H4 and HLA-G, within ovarian cancer cells and the macrophages that infiltrate the ovarian cancer microenvironment. It is well known that these two antigens are responsible for the inhibition of both cytotoxic T lymphocytes and NK cells. It has also been suggested that the response of the patient to applied therapy (surgery and chemotherapy) may be related to the status of the tumor microenvironment. Certainly, both B7H4 and HLA-G have been found in the ovarian cancer nest. **Methods:** We analyzed the immunoreactivity levels of both B7H4 and HLA-G on ovarian cancer cells with respect to the number of different chemotherapy regimens the patient underwent between the first- and second-line surgeries. Additionally, we detected the immunoreactivity of these two antigens on the macrophages present in the ovarian cancer microenvironment. The immunoreactivity analysis was performed on tissue samples derived from 17 patients. **Result:** In our study, we observed a statistically significantly higher amount of infiltration of B7H4-positive macrophages into the ovarian cancer relapse microenvironment in those patients who had had more than one type of chemotherapy regimen between surgical procedures compared to those who had had only one. Likewise, the HLA-G immunoreactivity level was higher in the first than in the second group. **Conclusion:** An immunosuppressive ovarian cancer relapse microenvironment, as indicated by the presence of suppressive macrophages, may be related to the need to supplement the primary chemotherapy.

Key words: HLA-G, B7H4, ovarian cancer relapse, chemotherapy, macrophages

Содержание

Экспрессия антигена B7H4 и антигена ХЛА-Г связана с выходом клеток рака с поля иммунологического наблюдения, так как упомянутые антигены отвечают за уменьшение активности цитологических лимфоцитов Т и клеток НК. Их выразительность была показана как в клетках рака яичника, так и в пределах клеточной оболочки макрофагов находящихся в микроокружении рака яичника. Так как ответ на применение хирургической терапии и химиотерапии может зависеть от степени уменьшения активности иммунологической системы „хозяина”, мы постановили исследовать иммунореактивность упомянутых антигенов в ткани рецидива рака яичника у 17 больных в зависимости от ответа на применяемое раньше лечение. **Методы:** Мы оценили иммунореактивность антигенов B7H4 и ХЛА-Г в клетках рака яичника и в пределах макрофагов инфильтрирующих микроокружение рака яичника в клеточных пробах, которые брались у 17 больных. После этого мы анализировали изменения выразительности исследуемых антигенов в зависимости от ответа на применяемое хирургическое лечение и химиотерапию. **Результаты:** В нашей работе мы могли наблюдать статистически знаменательно большее количество макрофагов B7H4-положительных в микроокружении рецидива рака яичника в тех случаях, когда рецидив появлялся после раннего хирургического лечения и химиотерапии 1 и 2 проекции в сравнении со случаями рецидива после хирургического лечения и химиотерапии 1 проекции. Аналогично в первой группе была отмечена более высокая иммунореактивность антигена ХЛА-Г. **Выводы:** Наличие в микроокружении рака яичника макрофагов, которые влияют тормозяще на иммунологическую систему, связано с образованием процесса тормозящего развитие в микроокружении опухоли и может иметь связь с ответом организма на применяемое лечение.

Ключевые слова: ХЛА-Г, B7H4, рецидив рака яичника, макрофаги, химиотерапия

WPROWADZENIE

W leczeniu raka jajnika coraz częściej stosuje się immunoterapię⁽¹⁾. Klasyczne metody leczenia przeciwnowotworowego, których podstawą w raku jajnika są leczenie chirurgiczne i chemioterapia, nie we wszystkich przypadkach dają zadowalające rezultaty. Rak jajnika nadal należy do nowotworów o najgorszym rokowaniu, gdyż z jednej strony 75% chorych jest zdiagnozowanych w zaawansowanym stadium (FIGO III, IV), a z drugiej u 40-50% pacjentek pomimo uzyskania kompletnej remisji po leczeniu chirurgicznym i chemioterapii I rzutu pojawia się wznowa^(2,3). Jednym z procesów warunkujących powstanie wznowy raka jajnika jest zahamowanie odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza skierowanej przeciw komórkom raka – ucieczka komórek raka spod nadzoru immunologicznego. Wydaje się więc zrozumiałe, że standardowa terapia składająca się jedynie z leczenia

INTRODUCTION

Ovarian cancer is a type of neoplasm for which the role of adjuvant immunotherapy has now been clearly established⁽¹⁾. Classic types of anticancer therapy based on surgery and chemotherapy seem to be insufficient in the treatment of ovarian cancer. Furthermore, ovarian cancer still remains one of the most fatal types of neoplasms because, on the one hand, 75% of patients are not diagnosed until advanced FIGO stage III or IV, and, on the other hand, 40 to 50% of patients who achieve complete remission following cytoreductive surgery and standard adjuvant chemotherapy will eventually relapse and develop a chemotherapy-resistant form of the disease^(2,3). As the appearance of ovarian cancer relapse is directly linked with the suppression of the host immune system, we believe that the standard therapy consisting only of surgery and chemotherapy should be supplemented by the application

chirurgicznego i chemioterapii powinna zostać uzupełniona o elementy terapii molekularnej (np. immunoterapii). Chociaż wiedza na temat sposobu, w jaki komórki raka unikają odpowiedzi układu odpornościowego, jest szeroka, wciąż nie ma wykładników stopnia zahamowania układu odpornościowego gospodarza, które można by wykorzystać do diagnostyki oraz do wykazania konieczności immunoterapii. Nieznany jest też test diagnostyczny, którego wynik pomógłby wybrać optymalny moment rozpoczęcia tego rodzaju leczenia. Ostatnio coraz większe zainteresowanie wzbudza nie tylko sam guz i zachodzące w nim zmiany, lecz także mikrośrodowisko rozwijającego się raka. W jego obrębie gromadzą się komórki, np. makrofagi czy też fibroblasty, które rozpoczynają współpracę z rozwijającym się guzem. Mogą one brać udział w zahamowaniu odpowiedzi cytotoksycznej układu odpornościowego skierowanej przeciw guzowi zamiast wspomagać tę odpowiedź⁽⁴⁾. Dlatego w naszej pracy, badając mechanizmy związane z niepowodzeniem leczenia, skoncentrowaliśmy się na makrofagach znajdujących się w mikrośrodowisku raka jajnika. Powstanie hamującego profilu mikrośrodowiska guza jest związane z nagromadzeniem wokół guza białek i komórek, które charakteryzują się zdolnością do hamowania odpowiedzi układu odpornościowego. Do tych komórek należą przede wszystkim limfocyty regulatorowe T (Treg)^(4,5). Kryczek i wsp. wykazali, że do takich komórek można zaliczyć także makrofagi, w których błonie komórkowej znajduje się antygen B7H4⁽⁶⁾. Ten antygen jest obecny na komórkach raka, a jego rozpuszczalna postać została zidentyfikowana zarówno w mikrośrodowisku guza, jak i w surowicy krwi chorych na różne nowotwory złośliwe⁽⁷⁻⁹⁾. Do białek tworzących hamujący profil mikrośrodowiska raka zalicza się również nieklasyczny antygen zgodności tkankowej HLA-G. Wykazano jego obecność zarówno w obrębie błony komórkowej komórek raka, jak i znajdujących się w ich sąsiedztwie makrofagów^(10,11). HLA-G dodatnie makrofagi zostały znalezione w raku jajnika, ale nie badano dotychczas związku pomiędzy ich obecnością a niepowodzeniem leczenia^(10,12-14). Obydwa antygeny: B7H4 i HLA-G, biorą udział w hamowaniu komórek cytotoksycznych układu odpornościowego i są odpowiedzialne za ucieczkę guza spod nadzoru immunologicznego^(10,14-17). Na przykładzie różnych nowotworów wykazano, że rodzaj nacieku z komórek układu odpornościowego do mikrośrodowiska tych guzów i stopień aktywności tych komórek układu odpornościowego może mieć wpływ na odpowiedź na zastosowane leczenie⁽¹⁸⁻²⁴⁾. Ostatnio Garnett i wsp. wykazali, że wyniki leczenia wydają się lepsze, kiedy chemioterapię połączymy z modulacją odpowiedzi immunologicznej⁽²⁵⁾. Dlatego też zdecydowaliśmy się zbadać immunoreaktywność antygeny B7H4 i antygeny HLA-G w ognisku raka jajnika i jego mikrośrodowisku w zależności od odpowiedzi na zastosowane leczenie.

MATERIAŁY I METODY

PACJENCI

W naszej pracy zgromadziliśmy próbki tkankowe pochodzące od 17 chorych leczonych chirurgicznie z powodu wznowy raka

of molecular therapy (e.g. immunotherapy) as this type of therapy modifies the activity of immune cells and hence can prove more effective⁽¹⁾. The cancer microenvironment is dominated by a suppressive profile; it consists of suppressive cells and other factors (e.g. cytokines) responsible for the selective suppression of host cytotoxic immune cells. The growing tumor thus modifies its own microenvironment⁽⁴⁾, and for this reason, we have decided to focus on the ovarian cancer microenvironment in order to try to control the immune cells that infiltrate it. For one thing, the recruitment of Treg cells to the microenvironment allows tumor cells to evade immune surveillance⁽⁵⁾. The development of this phenomenon, however, requires more than just the recruitment of T regulatory cells. Indeed, Kryczek et al. have recently described the presence of suppressive macrophages in the ovarian cancer tumor microenvironment⁽⁶⁾. Such cells are characterized by the expression of the B7H4 antigen, and these molecules in turn are a crucial factor in the process of suppressing immune cytotoxic cells. The B7H4 antigen is present on cancer cells⁽⁷⁾, and the soluble form has been identified in both the tumor microenvironment and in the blood sera of patients suffering from various types of cancers, including ovarian carcinoma^(8,9). In order to form, the suppressive profile of the cancer microenvironment also needs HLA-G-positive macrophages. These have been identified in cases of neuroblastoma tumor, and Menier has observed HLA-G-positive immune cells infiltrating the ovarian cancer microenvironment^(10,11), but so far HLA-G-positive macrophages have not been found within the ovarian cancer relapse microenvironment. Moreover, HLA-G antigens were identified on ovarian cancer cells^(10,12-14) while the soluble forms of HLA-G were discovered in the peritoneal fluid and blood sera of patients suffering from ovarian cancer⁽¹²⁾. Both B7H4 and HLA-G antigens participate in the suppression of cytotoxic immune cells and are responsible for the evasion of immune surveillance by cancer cells^(10,14-17). In ovarian carcinomas and in other types of cancerous tumors, such as breast, prostate, pancreatic, and cervical cancers, it has been demonstrated that both immune cell infiltration and the degree of activity of these cells (which is a result of the intensity of the suppressive profile of the tumor) tend to be linked to treatment results⁽¹⁸⁻²⁴⁾. Furthermore, Garnett et al. have recently shown that the outcome tends to be better when chemotherapy treatment is accompanied by the modulation of the immune response⁽²⁵⁾. Based on this result, we may speculate that the status of the microenvironment influences the success of the cancer treatment, and we have therefore decided to evaluate the immunoreactivity of B7H4 and HLA-G in its microenvironment with respect to the type of chemotherapy undergone most recently by the patient.

MATERIALS AND METHODS

PATIENTS

In our study, we collected tissue samples from 17 patients during surgery for ovarian cancer relapse. Those patients were then divided into 2 groups according to the number of different

jajnika. Pacjentki te zostały wtórnie podzielone na dwie grupy w zależności od wcześniejszego przebiegu chemioterapii. Pierwsza grupa składała się z 9 pacjentek, u których wznowa pojawiła się po wcześniejszym uzyskaniu pełnej remisji, do której doprowadzono po zastosowaniu całkowitej cytoredukcji chirurgicznej i chemioterapii I rzutu (paklitaksel i cisplatyna). Do drugiej grupy zakwalifikowano 8 chorych, u których do osiągnięcia remisji konieczne było zastosowanie dodatkowo chemioterapii II rzutu (gemcytabina albo pegylowana liposomalna doxorubicyna). Średnio wznowa została zdiagnozowana 24 miesiące (± 20) po pierwotnym leczeniu chirurgicznym. Leczenie chirurgiczne i chemioterapię przeprowadzono w Klinice Ginekologii Onkologicznej UJCM w Krakowie, w latach 2000-2008. Na przeprowadzenie programu badawczego uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UJ (DK/KB/CM/0031/4472010). Charakterystyka chorych została przedstawiona w tabeli 1.

BARWIENIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE

Barwienia immunohistochemiczne zostały wykonane ręcznie w Zakładzie Patomorfologii UJCM, przy zastosowaniu Ultravision LPValue Detection System (Thermo Scientific, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA). W celu uwidocznienia produktów reakcji został użyty DAB+chromogen (DAKO, Carpinteria, CA, USA), z inkubacją preparatów przez 10 min w temperaturze pokojowej; uzyskano żółcisto-brązowe zabarwienie przy pozytywnej reakcji. W końcowym etapie wybarwiono skrawki hematoksyliną Meyera i nakryto przy użyciu glicerożelu. Jako pozytywna kontrola posłużyły wycinki z raka przewodowego piersi dla B7H4, łożyska dla HLA-G. W celu uzyskania kontroli negatywnej wykonano barwienia immunohistochemiczne dla obu antygenów, według tej samej procedury co dla badanych skrawków, ale z pominięciem pierwotnego przeciwciała. Wycinki tkankowe (pojedynczy w każdym przypadku) do barwień immunohistochemicznych wyselekcjonowano po ocenie wszystkich preparatów (rutynowo barwionych hematoksyliną i eozyną) sporządzonych z chirurgicznego materiału, utrwalonego w 10-procentowym roztworze buforowanej formaliny. Kryterium doboru wycinków stanowiły ich odpowiednia jakość i obecność utkania obu komponentów – raka i podścieliska. W 4-mikrometrowych skrawkach sporządzonych z każdego wybranego wycinka wykonano barwienia immunohistochemiczne antygenów B7H4 i HLA-G w różnych komponentach utkania (łatwo identyfikowalnych ze względu na ich typową morfologię): fibroblastach podścieliska, komórkach raka, komórkach odczynowego nacieku zapalnego – limfocytach, plazmocytach, makrofagach. Skrawki, skrojone na silanizowane szkiełka, po przygotowaniu i odmaskowaniu antygeny (prześwietlenie w EDTA przez 30 min), inkubowano z pierwotnym mysim przeciwciałem monoklonalnym – Anti-HLA-G (Clone MEM-G/1; MBL Medical & Biological Laboratories CO., LTD., Naka-ku Nagoya, Japan), w rozcieńczeniu 1:50, w wilgotnej komorze, w temperaturze pokojowej przez 30 min. Skrawki do barwienia B7H4, przygotowane podobnie jak do barwienia HLA-G (m.in. trzykrotna inkubacja po 15 min w mieszaninie nadtlenu wodoru z absolutnym metanolem w celu zablokowania

	Leczenie chirurgiczne i chemioterapia I rzutu <i>Chemotherapy after primary debulking <2</i>	Leczenie chirurgiczne i chemioterapia I i II rzutu <i>Chemotherapy after primary debulking >2</i>
Liczba chorych <i>No. of patients</i>	9	8
Wiek, mediana (IQR) <i>Age, median (IQR)</i>	63 (9)	54 (15)
Stopień złośliwości histologicznej <i>Tumor grade</i>		
1	-	3 (37,5%)
2	5 (44%)	3 (37,5%)
3	4 (55%)	2 (25%)
Typ histologiczny <i>Histology</i>		
Surowiczy <i>Serosus</i>	6 (66%)	4 (50%)
Endometrioidalny <i>Endometrioid</i>	-	1 (12,5%)
Śluzowy <i>Adenocarcinoma</i>	2 (22%)	1 (12,5%)
Nieźródnicowany <i>Mixed</i>	1 (11%)	2 (25%)
FIGO <i>FIGO stage</i>		
I-II	2 (22%)	3 (37,5%)
III-IV	7 (77%)	5 (62,5%)
CA-125, średnia U/ml (SD) <i>CA-125, mean U/mL (SD)</i>	231,8 (245,5)	313,3 (386,6)
IQR – rozstęp kwartylowy; SD – odchylenie standardowe. <i>IQR – interquartile range; SD – standard deviation.</i>		

Tabela 1. Kliniczna charakterystyka chorych
Table 1. Clinical characteristics of patients

chemotherapy programs undergone prior to the second surgery. The first group consisted of 9 patients who were given only one intravenous taxane and platinum chemotherapy whereas 8 patients from the second group underwent more than one type of chemotherapy regimen (taxane and platinum constitutes a first-line chemotherapy while gemcitabine or pegylated liposomal doxorubicin would represent a second-line treatment). The mean time interval between the primary debulking and the secondary surgery was 24.5 (SD 20.0) months. Both the surgery and the chemotherapy treatment were administered in the Department of Gynecology, Obstetrics and Oncology of the Jagiellonian University Medical College between 2000 and 2008. The patients' characteristics are detailed in table 1. There were no statistically significant differences in age or in clinicopathological features between the two groups of patients. The patient's consent was obtained in each case. Prior to the present study we also obtained the approval of the Jagiellonian University Ethical Committee for our research program (DK/KB/CM/0031/4472010).

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Immunohistochemical analysis was performed manually in the Pathomorphology Department of the Jagiellonian University

endogennej peroksydazy), poddano odmaskowaniu antygeny, stosując 10 mM bufor cytrynianowy, pH 6,2, a następnie inkubacji z pierwotnym przeciwciałem – B7-H4 Antibody, rabbit polyclonal, Abbiotec, LLC, San Diego, CA, USA, Catalog No. 259473 (for research only), w rozcieńczeniu 1:100, w wilgotnej komorze, w temperaturze pokojowej przez 1 godz. Wyniki reakcji zostały ocenione półilościowo przez doświadczonego patologa (K.G.) jako procent pozytywnych komórek raka i przeciętna liczba pozytywnych makrofagów na 1 hpf (duże pole widzenia – *high power field*; powiększenie obiektywu $\times 40$, mikroskop Nikon Eclipse 50i) dla każdego antygeny. W każdym przypadku oceniano cały skrawek (co najmniej 10 dużych pól widzenia – hpf). Zastosowano następujące skale do oceny wyników reakcji immunohistochemicznych dla obu antygenów:

- dla makrofagów: 0 (brak ekspresji) – brak lub tylko pojedyncze makrofagi (poniżej 1/1 hpf) w całym wycinku; +1 (słaba) – 1-2 makrofagi/1 hpf, +2 (umiarkowana) – 3-5 makrofagów/1 hpf, +3 (silna) – powyżej 5 makrofagów/1 hpf;
- dla komórek raka: 0 (brak ekspresji) – reakcja pozytywna w mniej niż 1% komórek raka, +1 – 1-10% komórek raka pozytywnych, +2 – ekspresja w 11-30% komórek raka, +3 – 31-60%, +4 – powyżej 60% komórek raka z ekspresją antygeny.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Do analizy statystycznej zastosowano test Manna-Whitneya, po wcześniejszym sprawdzeniu rozkładu badanych zmiennych i stwierdzeniu braku rozkładu normalnego analizowanych zmiennych.

WYNIKI

IMMUNOREAKTYWNOŚĆ B7H4

Immunoreaktywność B7H4 została potwierdzona w 90% przypadków wznowy raka jajnika w grupie I oraz w 91% przypadków w grupie II. Znamienne wyższą immunoreaktywność B7H4 stwierdzono w komórkach raka pochodzących z grupy II (rys. 1A).

B7H4-pozytywne makrofagi zostały znalezione we wszystkich przypadkach wznowy raka niezależnie od wcześniejszego przebiegu leczenia. Statystycznie znamienne więcej makrofagów z potwierdzoną immunoreaktywnością B7H4 znaleziono w tkankach wznowy raka jajnika z grupy II (rys. 1B).

IMMUNOREAKTYWNOŚĆ HLA-G

Obecność antygeny HLA-G została potwierdzona we wszystkich przypadkach z grupy I i II. Poziom immunoreaktywności HLA-G w komórkach raka jajnika z grupy I był znacząco niższy niż wśród pacjentek z grupy II, jakkolwiek różnice te nie były istotne statystycznie (rys. 2A).

Antygen HLA-G obserwowano na powierzchni makrofagów we wszystkich przypadkach wznowy raka jajnika z grupy I i grupy II. Naciek zawierający HLA-G-dodatnie makrofagi

with the application of the Ultravision LPValue Detection System (Thermo Scientific, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA). For visualization of reaction products DAB+ chromogen (DAKO, Carpinteria, CA, USA) (gold-brown color of the final product) was used for 10 min at room temperature. Sections were then counterstained with Meyer's hematoxylin and mounted in glycerogel.

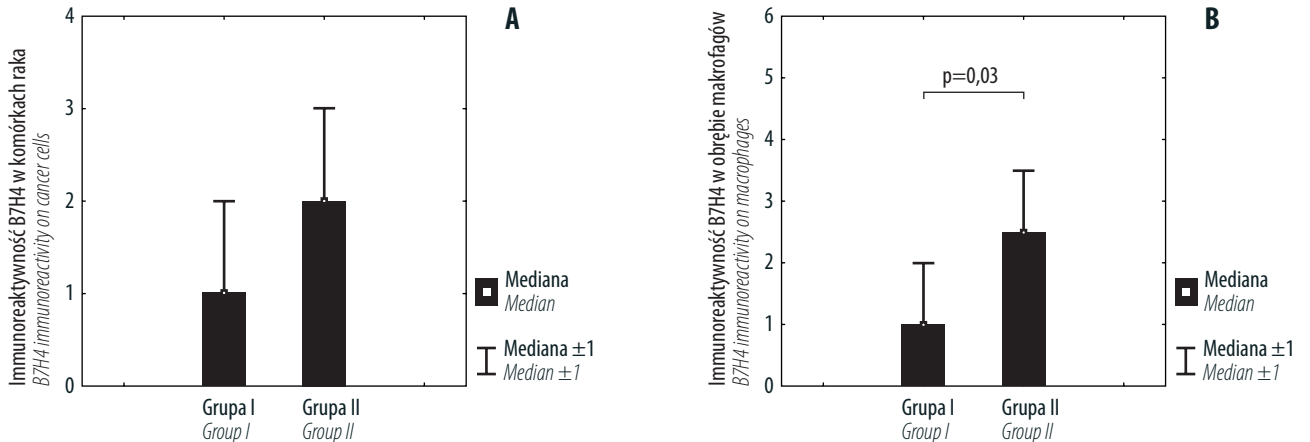
As a positive control for B7H4, a ductal breast cancer specimen was used; for HLA-G immunostaining, a section from the placenta was used. Both stainings were performed with the same procedures but without the primary antibodies as negative controls.

Adequate paraffin blocks for immunohistochemical stainings were selected after microscopically analyzing the entire surgical material routinely stained by hematoxylin-eosin (formerly fixed in 10%-solution of buffered formalin and routinely processed to paraffin blocks) in each case. Both the carcinoma infiltrates and the stroma were present in the blocks selected. Four-micrometer slides from each case were stained to visualize the expression of B7H4 and HLA-G in various components including cancer cells, stromal cells (fibroblasts), and the cells of the inflammatory infiltrate reactive to cancer infiltration, such as lymphocytes, plasma cells, and macrophages (the different cell lines of the inflammatory infiltrate were easily identified by morphology).

The sections cut and placed on organosilane-pretreated slides were submitted to immunohistochemical assay for the Anti-HLA-G (Clone MEM-G/1; MBL Medical & Biological laboratories CO., LTD., Naka-ku Nagoya, Japan) mouse monoclonal antibody, in dilution 1:50. For antigen retrieval, the sections were immersed in EDTA for 30 min. The slides were then incubated with the primary monoclonal antibody for HLA-G in a humidified chamber for 1 hour at room temperature.

The slides for B7H4 staining were prepared as above (also using 3 successive incubations of 15 min each in hydrogen peroxide plus absolute methanol to block endogenous peroxidase and an application of 3% low-fat dried milk diluted 1:100 in PBS to perform nonspecific binding), but for antigen retrieval the sections were immersed in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.2. The B7-H4 Antibody, rabbit polyclonal – Abbiotec, LLC, San Diego, CA, USA, Catalog No. 259473 (for research only) was applied in dilution 1:100. Finally, the slides were incubated with the primary monoclonal antibody in a humidified chamber for 1 hour at room temperature.

A semi-quantitative interpretation of the immunohistochemical results was carried out by an experienced pathologist. An average number of B7H4- and HLA-G-positive macrophages (identified morphologically) per one hpf (high power field – objective magnification $\times 40$, Nikon Eclipse 50i Microscope) and percentage of immunopositive carcinoma cells were calculated. The macrophages and cancer cells were evaluated in entire slides (at least ten hpf in each case). The reaction was classified according to the number of positive macrophages as follows: none (0) – no or single macrophages in the entire specimen (below one per one hpf), weak (+1) – 1-2 macrophages per one hpf, moderate (+2) – 3-5 macrophages per one hpf, strong (+3) – more than 5 macrophages per one hpf.



Rys. 1. Porównanie immunoreaktywności antygenu B7H4 w komórkach wznowy raka jajnika (A) oraz w obrębie makrofagów naciekających mikrośrodowisko raka jajnika (B) w następujących grupach chorych: i) grupa I – chore, u których obserwowano pełną remisję po leczeniu chirurgicznym i chemioterapii I rzutu; ii) grupa II – chore, u których do wywołania remisji niezbędne było włączenie chemioterapii II rzutu

Fig. 1. The comparison of the B7H4 immunoreactivity on ovarian cancer cells (A) and on macrophages infiltrating the ovarian cancer relapse microenvironment (B) derived from those patients who were given first-line chemotherapy only (group I) and from those in the second group (group II) who underwent more than one type of chemotherapy regimen as a second-line treatment

był znacząco większy w próbkach tkanek pochodzących od chorych z grupy II, jednak ta różnica nie była statystycznie (rys. 2B).

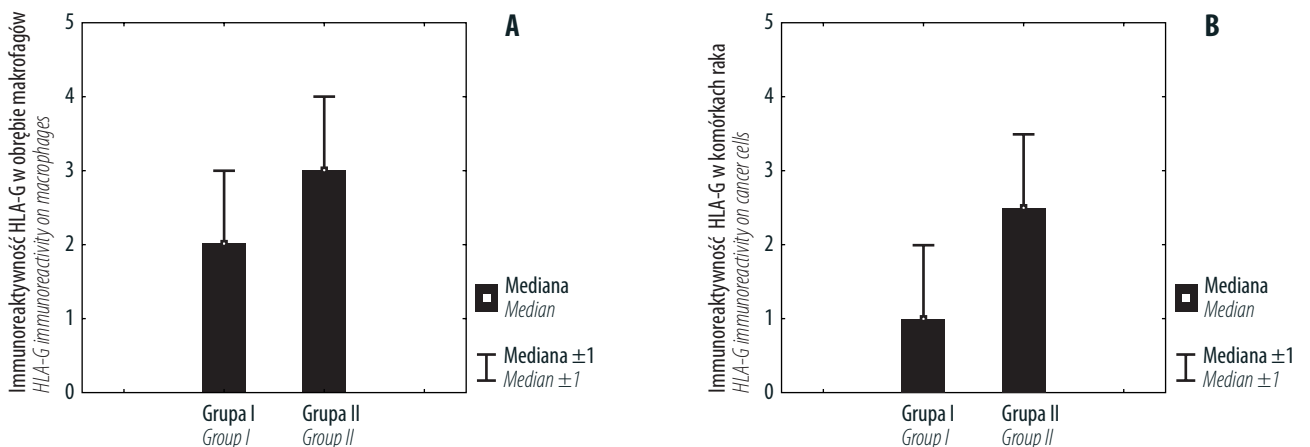
OMÓWIENIE

W naszej pracy zaobserwowaliśmy statystycznie znacznie więcej makrofagów B7H4-dodatnich w mikrośrodowisku wznowy raka jajnika u chorych, u których wcześniejszy przebieg leczenia wymagał zastosowania chemioterapii II rzutu

The immune-expression of B7H4 and HLA-G in carcinoma cells was graded according to the following scale: 0 – positivity in <1% of the neoplastic cells, +1 – 1-10%, +2 – 11-30%, +3 – 31-60%, +4 – >60%.

STATISTICAL ANALYSIS

The distribution of variables in the study groups of women checked with the use of the Shapiro-Wilk test showed that each of the women was different from normal. The statistical significance



Rys. 2. Porównanie immunoreaktywności HLA-G w komórkach wznowy raka jajnika (A) oraz w obrębie makrofagów naciekających mikrośrodowisko raka jajnika (B) w następujących grupach chorych: i) grupa I – chore, u których obserwowano pełną remisję po leczeniu chirurgicznym i chemioterapii I rzutu; ii) grupa II – chore, u których do wywołania remisji niezbędne było włączenie chemioterapii II rzutu

Fig. 2. The comparison of the HLA-G immunoreactivity on ovarian cancer cells (A) and on macrophages infiltrating the ovarian cancer relapse microenvironment (B) derived from those patients who were given first-line chemotherapy only (group I) and from those in the second group (group II) who underwent more than one type of chemotherapy regimen as a second-line treatment

do uzyskania remisji, w porównaniu z tymi chorymi, u których całkowitą remisję uzyskano po chirurgicznej cytoredukcji i chemioterapii I rzutu.

Oznaczenie stężenia B7H4 w surowicy krwi zostało zaproponowane jako jedno z badań prawdopodobnie przydatnych w monitorowaniu progresji raka jajnika⁽⁹⁾. Wykazano, że B7H4 może znaleźć zastosowanie do rozróżnienia złośliwych i łagodnych guzów jajnika. Może również odzwierciedlać stopień cytoredukcji chirurgicznej^(8,9). Jednak dotychczas nie zaproponowano, by B7H4 mógł samodzielnie stanowić czynnik predykcji odpowiedzi na chemioterapię⁽²³⁾. W naszej pracy ekspresja antygenu B7H4 była obserwowana nie tylko na komórkach guza, ale także w jego mikrośrodowisku, a w szczególności na naciekających go makrofagach. Już w 2006 roku Kryczek i wsp. stwierdzili, że B7H4-pozytywne makrofagi są obecne w mikrośrodowisku raka jajnika i mogą być odpowiedzialne za ich ucieczkę spod nadzoru immunologicznego⁽⁶⁾. Dodatkowo wykazano, że ekspresja B7H4 na komórkach raka wiąże się ze zwiększoną apoptozą naciekających podścielisko guza komórek cytotoksycznych układu odpornościowego⁽²⁴⁾. Najprawdopodobniej B7H4-dodatnie makrofagi w mikrośrodowisku raka jajnika mogą wpływać hamująco na komórki cytotoksyczne tam się znajdujące, co może mieć odzwierciedlenie w odpowiedzi na leczenie. Garnett i wsp. dowiedli, że gdy leczenie chemioterapeutykami zostanie połączone z modulacją odpowiedzi układu odpornościowego, to wynik takiej terapii jest lepszy⁽²⁵⁾. W naszej pracy wykazaliśmy, że pacjentki, które lepiej odpowiedziały na chemioterapię, w przypadku wznowy miały znacznie mniej B7H4-dodatnich makrofagów. Nasze wyniki wydają się potwierdzać obserwację Chenga i wsp., którzy wykazali, iż antygen B7H4 nie tylko wiąże się ze złośliwą przemianą komórek nabłonkowych jajnika, lecz także odpowiada za supresję komórek cytotoksycznych układu odpornościowego⁽²⁶⁾. Ochrona komórek nowotworowych przed atakiem komórek układu immunologicznego jest realizowana nie tylko przez ekspresję B7H4, lecz także przez ekspresję antygenu HLA-G, który chroni komórki raka przed liżą ze strony komórek NK⁽¹⁴⁾. Wykazano, że wraz z progresją raka jajnika rośnie ekspresja HLA-G w obrębie guza⁽¹²⁾ i jest związana ze złym rokowaniem⁽¹³⁾. Stężenia sHLA-G w płynie otrzewnowym kobiet chorujących na raka jajnika były statystycznie znacznie wyższe niż w guzach niezłośliwych jajnika⁽¹²⁾. W przypadkach złośliwych guzów jajnika Menier i wsp. zaobserwowali HLA-G-pozytywne komórki układu immunologicznego⁽¹⁰⁾. Z kolei Pistoia zasugerował, że ekspresja HLA-G na makrofagach w mikrośrodowisku nowotworów złośliwych to cecha charakterystyczna dla fenotypu M2 tych komórek⁽¹¹⁾, a jest to fenotyp charakterystyczny dla komórek wspomagających rozwój guza. Dodatkowo Menier i wsp. wykazali, że terapia bazująca na modulacji ekspresji HLA-G może polepszyć wyniki leczenia raka jajnika. Podobnie w naszej pracy zaobserwowaliśmy, że mniejszy naciek HLA-G-dodatnich makrofagów do mikrośrodowiska wznowy raka jajnika występował u chorych, które wcześniej lepiej odpowiedziały na zastosowane leczenie.

between the two groups was determined by the Kruskal-Wallis test, one-way analysis of variance by ranks. The Mann-Whitney U test was then used as applicable. All statistical analyses were carried out with the Statistica 8.0 software program. A p value <0.05 was considered indicative of statistical significance.

RESULTS

B7H4 IMMUNOREACTIVITY

B7H4-immunopositive ovarian cancer cells were revealed in 90% of the cases of patients who obtained first-line chemotherapy (group I) and in 91% of the cases that required more than one type of chemotherapy regiment (group II). More significantly, these B7H4-positive cells were observed within the cancer lesions derived from the patients in group II (fig. 1A). B7H4-immunopositive macrophages were found in all of the cases of cancer relapse that followed first-line chemotherapy and in all the cases of cancer relapse that followed more than one type of chemotherapy regiment. More significantly, a higher number of these macrophages were observed in the tissue samples derived from patients from group II than in those from group I, and the differences were statistically significant (fig. 1B).

HLA-G IMMUNOREACTIVITY

HLA-G immunopositive ovarian cancer cells were observed in 90% of the cases of patients who obtained first-line chemotherapy. HLA-G-positive ovarian cancer cells were also found in all the cases consisting of patients who had undergone more than one type of chemotherapy. Moreover, the immunoreactivity level of HLA-G in the ovarian cancer cells from group I was significantly lower than that from group II; however, these differences were not statistically significant.

HLA-G-immunopositive macrophages were observed in all of the cases of cancer relapse that followed first-line chemotherapy and in all of the cases of cancer relapse that followed more than one type of chemotherapy regiment. The infiltration of HLA-G positive macrophages into the ovarian cancer relapse microenvironment was more significant in the tissue samples derived from the patients treated with more than one type of chemotherapy regiment (fig. 2B).

DISCUSSION

In our study, we observed a statistically significantly higher infiltration of B7H4-positive macrophages into the ovarian cancer microenvironment in the patients who had had more than one type of chemotherapy regiment between surgical procedures.

To our knowledge, this is the first investigation to focus on B7H4- and HLA-G-positive macrophages within the ovarian cancer relapse microenvironment.

The detection of B7H4 concentration in blood sera is probably clinically applicable as a possible serologic diagnostic marker for ovarian cancer⁽⁹⁾. Simon et al. have shown that B7H4 may be used to discriminate malignant from benign ovarian tumors⁽⁹⁾ as the

WNIOSKI

Obecność w mikrośrodowisku raka jajnika makrofagów o działaniu hamującym układ odpornościowy może mieć związek z odpowiedzią na leczenie.

PIŚMIENNICTWO:
BIBLIOGRAPHY:

1. Chu C.S., Kim S.H., June C.H., Coukos G.: Immunotherapy opportunities in ovarian cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2008; 8: 243-257.
2. Holschneider C.H., Berek J.S.: Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Sem. Surg. Oncol.* 2000; 19: 3-10.
3. Lage H.: ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2003; 22: 188-199.
4. Gajewski T.F., Meng Y., Harlin H.: Immune suppression in the tumor microenvironment. *J. Immunother.* 2006; 29: 233-240.
5. Yigit R., Massuger L.F., Figdor C.G., Torensma R.: Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecol. Oncol.* 2010; 117: 366-372.
6. Kryczek I., Zou L., Rodriguez P. i wsp.: B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 871-881.
7. Salceda S., Tang T., Kmet M. i wsp.: The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation. *Exp. Cell Res.* 2005; 306: 128-141.
8. Zheng Y., Katsaros D., Shan S.J. i wsp.: A multiparametric panel for ovarian cancer diagnosis, prognosis, and response to chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 6984-6992.
9. Simon I., Zhuo S., Corral L. i wsp.: B7-H4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res.* 2006; 66: 1570-1575.
10. Menier C., Prevot S., Carosella E.D., Rouas-Freiss N.: Human leukocyte antigen-G is expressed in advanced-stage ovarian carcinoma of high-grade histology. *Hum. Immunol.* 2009; 70: 1006-1009.
11. Pistoia V., Morandi F., Wang X., Ferrone S.: Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin. Cancer Biol.* 2007; 17: 469-479.
12. Singer G., Rebmann V., Chen Y.C. i wsp.: HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 4460-4464.
13. Jung Y.W., Kim Y.T., Kim S.W. i wsp.: Correlation of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression and disease progression in epithelial ovarian cancer. *Reprod. Sci.* 2009; 16: 1103-1111.
14. Lin A., Yan W.H., Xu H.H. i wsp.: HLA-G expression in human ovarian carcinoma counteracts NK cell function. *Ann. Oncol.* 2007; 18: 1804-1809.
15. Wang S., Chen L.: Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect.* 2004; 6: 759-766.
16. Carreno B.M., Collins M.: BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand. *Trends Immunol.* 2003; 24: 524-527.
17. Urošević M., Kempf W., Zagrodnik B. i wsp.: HLA-G expression in basal cell carcinomas of the skin recurring after radiotherapy. *Clin. Exp. Dermatol.* 2005; 30: 422-425.
18. Lewis C.E., Pollard J.W.: Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006; 66: 605-612.

B7H4 level corresponds to the debulking success, grading, and stage of the ovarian cancer case^(8,9). Additionally, Zheng et al. have proposed that B7H4, along with hK6, hK7 and hK11, may, as an effective predictor of cancer progression at 5 years, be a candidate for a panel biomarker⁽⁸⁾. Although in that study, B7H4 alone was not sufficient to predict the response to chemotherapy⁽⁸⁾, in our present study the expression of B7H4 in ovarian cancer cells was lower in the group of patients who responded more positively to chemotherapy. Moreover, it has recently been postulated that the B7H4 gene may be useful as a diagnostic therapeutic marker⁽²³⁾. This is because B7H4 has been observed not only on tumor cells, but also in the tumor microenvironment and, particularly, on infiltrating immune cells. Kryczek et al. have furthermore demonstrated that B7H4-positive macrophages are present in the microenvironment of ovarian cancer and are responsible for their evasion from immune surveillance⁽⁶⁾. Additionally, Miyatake et al. have shown that the presence of B7H4 expression on cancer cells is related to the increased apoptosis of infiltrating tumor stroma immune cells such as CD3 and CD8 positive cells⁽²⁴⁾. Most likely, B7H4-positive macrophages are responsible for the suppression of immune cytotoxic cells in the ovarian cancer microenvironment that may be linked with the appearance of cancer relapse. Although there is a lack of direct evidence in the literature that the response to chemotherapy is related to the degree of suppression of the immune cells in the tumor microenvironment, Garnett et al. have found that when chemotherapy treatment is accompanied by the modulation of the immune response, the outcome tends to be better⁽²⁵⁾. In our study, the patients who responded better to chemotherapy later in ovarian cancer relapse had lower infiltration levels of B7H4-positive suppressive macrophages. Our results would seem to support the observation of Cheg et al. who have demonstrated that B7H4 is not only associated with the malignant transformation of ovarian epithelial cells, but is also responsible for the suppression of cytotoxic immune cells⁽²⁶⁾. The protection of cancer cells from immune attack is realized not just by B7H4 expression, but by HLA-G tumor expression as well. Lin et al. have shown that ovarian cancer cells that are HLA-G-positive are protected from NK cytotoxicity⁽¹⁴⁾. Moreover, a higher level of HLA-G immunoreactivity in ovarian tumors is linked with a higher tumor grade and stage⁽¹⁰⁾, and HLA-G has not been identified in the normal ovary⁽¹²⁾. More generally, HLA-G immunoreactivity in ovarian cancer is related to a poorer prognosis for the case⁽¹³⁾. The concentration levels of sHLA-G in the peritoneal fluid of women suffering from ovarian tumors were statistically significantly higher when the tumors were malignant compared to the levels found when the tumors were benign⁽¹²⁾. In cases of malignant ovarian tumors, Menier et al. have observed HLA-G-positive immune cells⁽¹⁰⁾ while Pistoia et al. have posited that HLA-G expression on macrophages is related to the development of suppressive macrophages among TAM (tumor-associated macrophages)⁽¹¹⁾. In our study, the presence of HLA-G-positive macrophages observed in the cases of ovarian cancer relapse would therefore seem to be linked with both these phenomena. Additionally, Menier has posited that therapy based on the modulation of HLA-G expression may improve the outcome of ovarian cancer treatment⁽¹⁰⁾, and this would seem to accord with our own results

19. Steidl C., Lee T., Shah S.P. i wsp.: Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362: 875-885.
20. Tzagolis P., Eriksson F., Pisa P.: Zoledronic acid modulates antitumoral responses of prostate cancer-tumor associated macrophages. *Cancer Immunol. Immunother.* 2008; 57: 1451-1459.
21. Daisuke N., Komohara Y., Murazama T.: Ratio of M2 macrophage expression is closely associated with poor prognosis for angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). *Pathol. International* 2010; 60: 278-283.
22. Takayama H., Nishimura K., Tsujimura A. i wsp.: Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation. *J. Urol.* 2009; 181: 1894-1900.
23. Bignotti E., Tassi R.A., Calza S. i wsp.: Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. *Gynecol. Oncol.* 2006; 103: 405-416.
24. Miyatake T., Tringler B., Liu W. i wsp.: B7-H4 (DD-O110) is overexpressed in high risk uterine endometrioid adenocarcinomas and inversely correlated with tumor T-cell infiltration. *Gynecol. Oncol.* 2007; 106: 119-127.

as we have observed a lower infiltration of HLA-G positive macrophages into the ovarian cancer relapse microenvironment in those patients who responded more positively to chemotherapy.

CONCLUSION

The immune-suppressive ovarian cancer relapse microenvironment as represented by suppressive macrophages may be related to the need to supplement primary chemotherapy.

-
25. Garnett C.T., Schlom J., Hodge J.W.: Combination of docetaxel and recombinant vaccine enhances T-cell responses and antitumor activity: effects of docetaxel on immune enhancement. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 3536-3544.
 26. Cheng L., Jiang J., Gao R. i wsp.: B7-H4 expression promotes tumorigenesis in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2009; 19: 1481-1486.

Informacja dla Autorów!

Chcąc zapewnić naszemu czasopismu „Current Gynecologic Oncology” wyższą indeksację MNiSW i Index Copernicus, zwracamy się do Państwa o dopełnienie poniższych warunków podczas przygotowywania pracy do publikacji:

- Publikację należy opatrzyć **afiliacją** – z podaną nazwą ośrodka/ów, adresem do korespondencji, numerem telefonu, faksu, adresem e-mail.
- Praca powinna być poprzedzona **streszczeniem** zawierającym **200-250 słów**. Streszczeniu pracy oryginalnej należy nadać budowę strukturalną: Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Wnioski.
- Liczba **słów kluczowych** nie może być mniejsza niż 5. Słowa kluczowe nie powinny być powtórzeniem tytułu. Najlepiej stosować słowa kluczowe z katalogu MeSH.
- **Praca oryginalna** winna zawierać elementy: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Omówienie, Wnioski, Piśmiennictwo.
- **Piśmiennictwo** należy ułożyć w **kolejności cytowania**.

Information for Contributors!

In order to ensure a higher MNiSW and Index Copernicus score for our journal “Current Gynecologic Oncology”, we ask you to comply with the following conditions when preparing your manuscripts for publication:

- Authors’ **affiliation** should be clearly stated, providing the name of centre, address for correspondence, phone and fax number and e-mail address.
- Paper should be preceded by an **abstract** counting **200-250 words**. Abstract of original paper should be structured, i.e. should be subdivided into the following sections: Aim of paper, Material and methods, Results and Conclusions.
- The number of **key words** should not be less than 5. Key words should not be a repetition of the title. At best, use key words from the MeSH catalogue.
- **Original paper** should include the following sections: Introduction, Aim of paper, Material and methods, Results, Discussion, Conclusions, References.
- **References** should be listed in the **order of appearance**.