

Stężenie sHLA-G i sRCAS1 w osoczu kobiet leczonych operacyjnie z powodu raka sromu jako wskaźnik stanu mikrośrodowiska raka

Possible usage of the blood serum concentration measurements of sHLA-G and sRCAS1 in women treated surgically for vulvar cancer as an indicator of the status of the tumor microenvironment

Концентрация sHLA-G и sRCAS1 в плазме женщин во время хирургического лечения по поводу рака вульвы в качестве индикатора микросреды рака

¹ Centrum Onkologii, Klinika Onkologii Ginekologicznej, Instytut im. Marii Curie-Skłodowskiej, Kraków

² Klinika Położnictwa i Ginekologii, Szpital Wojewódzki, Rzeszów

³ Klinika Ginekologii i Onkologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁴ Klinika Ginekologii i Onkologii, Centrum Onkologii im. Łukaszczyka, Bydgoszcz; Katedra Ginekologii, Onkologii i Pielęgniarstwa Ginekologicznego, Kolegium Medyczne im. L. Rydygiera, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz

Correspondence to: Dr n. med. Łukasz Wicherek, Klinika Ginekologii i Onkologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Kopernika 23, 31-501 Kraków, tel.: 012 424 85 84, faks: 012 424 85 84, e-mail: mowicher@cyf-kr.edu.pl

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować Profesorowi A. Baście za rady, konstruktywną dyskusję i przyjazne wsparcie, a także Krystynie Maisto i Doktorom Pawłowi Makowi i Pawłowi Machowi za pomoc. Niniejsza praca była finansowana przez Ministerstwo Nauki (grant nr 0888/B/P01/2008/35).

Acknowledgments

We wish to thank Professor A. Basta for their advice, helpful discussions, and friendly words of support. I would also like to thank Christine Maisto and Drs. Pawel Mak, and Pawel Mach for their assistance. This work was funded by the Polish Ministry of Science, Grant Number: Nr 0888/B/P01/2008/35.

Streszczenie

Wstęp: Supresja układu odpornościowego stanowi kluczowe zjawisko w rozwoju nowotworu złośliwego. Stężenie sRCAS1 i sHLA-G w osoczu odzwierciedla stopień supresji układu odpornościowego przez komórki rakowe, ponieważ białka te pośredniczą w mechanizmie chroniącym komórki rakowe przed wykryciem przez układ odpornościowy. W niektórych przypadkach zabieg chirurgiczny może przywrócić prawidłową aktywność układu odpornościowego, dlatego celem autorów niniejszej pracy była ocena stężenia obu tych białek w trakcie leczenia. **Material i metody:** Mierzono stężenie sRCAS1 i sHLA-G w osoczu 19 pacjentek leczonych operacyjnie z powodu raka sromu. Poziom tych białek oceniano za pomocą serii pomiarów dokonanych przed i po zabiegu operacyjnym. Pomiarów dokonywano za pomocą zestawu wykorzystującego technikę ELISA. **Wyniki:** Stwierdzono statystycznie znamienne spadki stężenia osoczkowego zarówno sRCAS1, jak i sHLA-G po radykalnym usunięciu raka sromu. **Wnioski:** Poziom ww. białek w osoczu może stanowić przydatny wskaźnik stanu mikrośrodowiska guza i może pomóc ocenić stopień normalizacji aktywności układu odpornościowego po radykalnej operacji sromu.

Słowa kluczowe: rak sromu, sRCAS1, radykalna operacja sromu, sHLA-G, mikrośrodowisko raka

Summary

Introduction: The suppression of the immune system constitutes a crucial event in the development of malignancy. Assessment of the blood serum concentration levels of sRCAS1 and sHLA-G may demonstrate the suppressive influence of cancer cells on the immune system as these proteins are involved in the evasion of immune system surveillance by cancer cells. Since, in some cases, surgery may restore proper immune system activity, we aimed to measure the blood

serum concentration levels of both these proteins over the course of the applied therapy. **Material and methods:** We measured the sRCAS1 and sHLA-G blood serum concentration levels in a group of 19 patients treated surgically for vulvar carcinoma. We assessed the levels of these proteins by a series of measurements taken before and after the surgical intervention. The concentration levels of sRCAS1 and sHLA-G were established by means of ELISA kit. **Results:** In our study we observed that a statistically significant decrease in both sHLA-G and sRCAS1 blood serum concentration levels followed radical surgical intervention due to vulvar cancer. **Conclusions:** The detected levels of the blood serum concentration of these proteins may be a useful indicator of the status of the tumor microenvironment and may help to assess the degree of restoration of immune system activity following radical surgical vulvectomy.

Key words: vulvar cancer, sRCAS1, radical vulvectomy, sHLA-G, tumor microenvironment

Содержание

Введение: Подавление иммунной системы является ключевым в развитии злокачественных опухолей. Концентрация sRCAS1 и sHLA-G в плазме крови отражает степень подавления иммунной системы раковыми клетками, поскольку эти белки являются посредниками в механизме, который защищает раковые клетки от обнаружения иммунной системой. В некоторых случаях хирургия может восстановить правильную деятельность иммунной системы, поэтому наша цель заключалась в оценке уровня этих белков в ходе лечения. **Материал и методы:** Измерено концентрацию sRCAS1 и HLA-G в плазме крови у 19 больных после хирургического лечения по поводу рака вульвы. Уровень этих белков был analyzed с помощью серии измерений до и после операции. Измерения проводились с применением набора использующего метод ELISA. **Результаты:** Подтверждено статистически значимое снижение концентрации в плазме крови как sRCAS1, так и sHLA-G после радикального удаления рака вульвы. **Выводы:** Уровень sRCAS1 и sHLA-G в плазме может быть полезным индикатором микроокружения опухоли и может помочь оценить степень стандартизации активности иммунной системы после радикальной операции вульвы.

Ключевые слова: рак вульвы, sRCAS1, sHLA-G, радикальная операция вульвы, микросреда рака

WSTĘP

Obecność ludzkiego antygenu leukocytarnego HLA-G obserwuje się w komórkach układu odpornościowego, a także w innych narządach, takich jak macica, grasicca, jajnik i łożysko⁽¹⁻⁸⁾. Regulacyjna funkcja antygenu HLA-G w ramach układu odpornościowego jest dobrze udokumentowana⁽³⁾. Rozpuszczalna postać HLA-G pochodzi głównie z makrofagów i limfocytów, ale także z komórek nowotworowych. Pewne jest, że HLA-G należy do białek biorących udział w regulacji interakcji między nowotworem i układem odpornościowym, jakie zachodzą w mikrośrodoisku rosnącego guza^(2,3,9). HLA-G uczestniczy również w myleniu nadzoru immunologicznego przez komórki rakowe⁽⁵⁾. Można więc spekulować, że rozpuszczalna postać sHLA-G może być wykorzystana do monitorowania hamującego wpływu komórek nowotworowych na układ odpornościowy gospodarza. Hamujące działanie nowotworu wynika nie tylko z rosnącego stężenia sHLA-G, ale także jest spowodowane przez inne białka wydzielane do macierzy zewnątrzkomórkowej mikrośrodoiska raka, takich jak Fas-L^(10,11), interleukina (np. IL-10)^(11,12) i sRCAS1⁽¹³⁻¹⁷⁾, a także z obecności komórek regulacyjnych (np. Treg) naciekających mikrośrodoisko nowotworu⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Białko RCAS1 zostało opisane przez Sonodę w roku 1996 jako białko błonowe, którego ekspresję stwierdza się na komórkach różnego rodzaju raków, i odpowiedzialne za hamowanie aktywności cytotoksycznych limfocytów i komórek NK, a także za apoptozę tych komórek układu odpornościowego^(21,22). Białko RCAS1 pomaga oszukać układ odpornościowy przez komórki raka⁽²²⁻³⁸⁾. Jego ekspresja

INTRODUCTION

The presence of the human leukocyte antigen G (HLA-G) has been observed in immune cells as well as in different organs, such as the uterus, thymus, ovary, and placenta⁽¹⁻⁸⁾. HLA-G is an antigen whose participation in the regulation of the immune system has been well documented⁽³⁾. The soluble form of HLA-G may derive chiefly from macrophages and lymphocytes, but also from neoplastic cells; for certain, HLA-G is one of the proteins involved in the regulation of the interaction of tumor and immune cells that takes place in the microenvironment of a growing tumor^(2,3,9). HLA-G also participates in the evasion of immune system surveillance by cancer cells⁽⁵⁾. We can therefore speculate that the soluble form of sHLA-G could be used to demonstrate how the suppressive environment of the tumor may favor an increase in the suppressive influence of cancer cells on the immune system. The suppressive environment of the tumor is not only the result of the increasing concentration of sHLA-G, but is also caused by other proteins secreted to the extracellular matrix of the cancer microenvironment, such as Fas-L^(10,11), interleukins (e.g., IL-10)^(11,12), and sRCAS1⁽¹³⁻¹⁷⁾ as well as by immune regulatory cells (e.g. Treg) infiltrating the cancer microenvironment itself⁽¹⁸⁻²⁰⁾. RCAS1 has been described by Sonoda in 1996 as a membrane protein expressing on various cancer cells and responsible for the inhibition of the activity of cytotoxic lymphocytes and NK cells and for the apoptosis of these immune cells^(21,22). RCAS1 is linked with the evasion of immune surveillance by cancer cells⁽²²⁻³⁸⁾. Its expression was

ma miejsce w nowotworach złośliwych wywodzących się z żeńskich narządów płciowych^(13-15,24,26) i koreluje z wyższym ryzykiem wznowy nowotworu i ze złym rokowaniem^(13,15,29,38). Ponieważ dotychczas nie opisano ekspresji RCAS1 i HLA-G w raku sromu, autorzy badania wybrali ten rodzaj raka, aby zbadać potencjalny wpływ interwencji chirurgicznej na stężenie obu tych białek w osoczu. Celem niniejszej pracy jest ocena stężenia sRCAS1 i sHLA-G w osoczu przed i po zastosowanym leczeniu.

MATERIAŁ I METODY

PACJENCI

W obecnym badaniu analizowano próbki osocza pobrane od 19 pacjentek leczonych chirurgicznie z powodu raka sromu (50% pacjentek zakwalifikowano do grupy FIGO II/T2N0M0, 30% – do grupy FIGO III/T3N0M0, a 20% – do grupy FIGO III/T1N1M0). U wszystkich pacjentek przeprowadzono radykalną wulwektomię z obustronną limfadenektomią. Średnia wieku pacjentek wynosiła 65 ± 5 lat. Pacjentki poddano leczeniu operacyjnemu w Klinice Onkologii Ginekologicznej Instytutu Onkologii im. Marii Curie-Skłodowskiej w Krakowie i w Klinice Ginekologii i Onkologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w okresie od stycznia 2007 do września 2008 roku. We wszystkich przypadkach uzyskano świadomą zgodę pacjentki na udział w badaniu. Przed jego rozpoczęciem projekt badań został przyjęty przez Komitet Etyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego (KBET/135/B/2007).

ELISA

Krew pobierano do próbek na osocze bezpośrednio przed operacją i 4. dnia po zabiegu. Pozwalano na utworzenie się skrzepu w temperaturze pokojowej (przez 30-60 minut). Probówki wkładano do lodu na 30 minut, aby spowodować obkurczenie się skrzepu, następnie próbki osocza wirowano, uzyskując przyspieszenie 3000 g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Pobierano 1-2 ml supernatantu i przechowywano w temperaturze -80°C . Badanie stężenia RCAS1 w próbkach osocza przeprowadzano na Wydziale Biochemii Analitycznej Instytutu Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Do badań zastosowano dostępny na rynku zestaw ELISA do wykrywania RCAS1 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Nagoya, Japonia). Po rozpuszczeniu próbki osocza traktowano neuraminidazą, a następnie inkubowano w zagłębieniach płytek pokrytych przeciwciałem monoklonalnym anti-RCAS1 (typ 22-1-1). Po opłukaniu zagłębienia inkubowano z białyną sprzężoną z przeciwciałami anti-RCAS1, a następnie płukano ponownie i inkubowano zagłębienia z koniugatem streptawidyna-peroksydaza. Po trzecim płukaniu przeprowadzano reakcję barwną z zastosowaniem substratu tetrametylobenzydyna/nadtlenek wodoru. Reakcję zatrzymywano poprzez zakwaszenie zawartości zagłębienia i odczytywano płytki w świetle 450 nm w automatycznym czytniku płytek. Płytki

found in malignancies derived from women's reproductive organs^(13-15,24,26). This expression correlates with a higher risk of cancer relapse and with poor prognosis^(13,15,29,38). The expression of RCAS1 and HLA-G in vulvar cancer, however, has not yet been described. We have therefore chosen this cancer to consider the possible influence of surgical intervention on the concentration levels of these two proteins sRCAS1 and sHLA-G in blood sera. The aim of the present study was to evaluate the sRCAS1 and sHLA-G blood serum concentration levels before and after the applied therapy.

MATERIAL AND METHODS

HUMAN SUBJECT

In this study, we analyzed the blood serum samples obtained from 19 patients treated surgically because of vulvar cancer (50% of patients were classified as FIGO II/T2N0M0, 30% of patients as FIGO III/T3N0M0, and 20% as FIGO III/T1N1M0). We performed radical vulvectomy with bilateral inguinal lymphadenectomy on all of these patients. The mean age of the patients included was $65 (\pm 5)$ years. The patients had undergone surgical treatment in the Gynecologic Oncology Department of the M. Skłodowska-Curie Memorial Institute and in the Gynecology and Oncology Department of the Jagiellonian University, both in Krakow, between January 2007 and September 2008. The patient's consent was obtained in each case. Prior to the study, the approval of the Jagiellonian University Ethical Committee (KBET/135/B/2007) was also obtained.

ELISA

The blood was collected in a serum collection tube both directly prior to surgery and on the fourth day following the surgery. A clot was allowed to form at room temperature for 30-60 minutes. The tube was placed on ice for 30 minutes in order to contract a clot. The serum samples were then centrifuged at 3000xg for 10 minutes at room temperature. The supernatants 1.0-2.0 ml were collected and stored at -80°C . The analysis of RCAS1 concentration in the serum samples was performed in the Department of Analytical Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology, Jagiellonian University. For the assay, a commercial ELISA kit for RCAS1 detection (Medical & Biological Laboratories Co. Ltd, Nagoya, Japan) was used. Briefly stated, the diluted serum samples, pretreated with neuraminidase, were incubated in the wells of the plates coated with anti-human RCAS1 monoclonal antibodies (type 22-1-1). After washing, the wells were incubated with biotin conjugated anti-RCAS1 antibodies, and this procedure was followed by a second washing and incubation of the wells with a streptavidin-peroxidase conjugate. Following a third washing, the color reaction was developed using the tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide substrate. The reaction was stopped by the acidification of the contents of the wells and the plates were read at 450 nm on a microplate reader. The plates were individually calibrated by a quantitative RCAS1

kalibrowano indywidualnie przy użyciu ilościowego standardu referencyjnego dla RCAS1 dostarczonego przez producenta zestawu, a stężenia wyrażano w arbitralnych jednostkach na mililitr (U/ml). Otrzymany współczynnik korelacji krzywych zależnych od dawki był wyższy niż 0,99. Rozpuszczalny ludzki antygen leukocytarny G (sHLA-G) wykrywano przy użyciu zestawu ELISA typu „sandwich” do wykrywania sHLA-G (BioVendor-Exibo, Czechy). Próbki z osoczem krwi rozpuszczano dwukrotnie i inkubowano przez 1 godzinę na płycie 96-zagłębieniowej, uprzednio pokrytej przeciwciałem monoklonalnym anti-sHLA-G. Po inkubacji zagłębienia płukano i wypełniano przeciwciałami monoklonalnymi przeciw mikroglobulinie ludzkiej beta-2 znakowanymi peroksydazą chrzanową. Po upływie dodatkowej godziny inkubacji zagłębienia płukano ponownie i przeprowadzano reakcję barwną z użyciem substratu tetrametylobenzydyny (TMB). Wartość absorbancji mierzono światłem o długości fali 450 nm w czytniku płytek, a następnie obliczano stężenia sHLA-G. Do kalibracji wykorzystano zestaw standardów sHLA-G dostarczony przez producenta.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Rozkład zmiennych w populacji badanych kobiet oceniano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Znamienność statystyczną różnic między poszczególnymi podgrupami oceniano przy pomocy analizy wariancji Kruskala-Wallisa i testem ANOVA.

WYNIKI

Pacjentki leczone operacyjnie z powodu raka sromu wykazywały różnice w zakresie stężenia sHLA-G w osoczu przed i po radykalnej wulwektomii. Co więcej, zabieg operacyjny wiązał się ze znacznym spadkiem stężenia sRCAS1 w osoczu. Nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie stężenia sHLA-G i sRCAS1 w osoczu w zależności od stadium klinicznego choroby przed i po operacji. Podobnie nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu obu tych białek w osoczu w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego raka.

OMÓWIENIE

W badaniu zaobserwowano statystycznie znamienny spadek stężenia sHLA-G i sRCAS1 w osoczu po radykalnej resekcji chirurgicznej raka sromu.

reference standard provided by the manufacturer of the set and expressed in arbitrary units (U/ml). The obtained correlation coefficient of the dose-response curves was above 0.99. The soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) was detected using the sHLA-G sandwich ELISA kit (BioVendor-Exibo, Czech Republic). Briefly stated, the blood plasma samples were diluted twice and incubated for 1 hour in the 96-well microplate precoated with the monoclonal anti-sHLA-G antibodies. Following incubation, the wells were washed and then filled with the monoclonal anti-human beta-2-microglobulin antibodies labeled with horseradish peroxidase. After an additional 1 hour of incubation, the wells were again washed, and the color reaction was developed using tetramethyl benzidine (TMB) substrate. The absorbance values were measured at 450 nm on a microplate reader followed by calculation of the sHLA-G concentrations. The assay was calibrated using a set of sHLA-G standards provided by the producer of the kit.

STATISTICAL ANALYSIS

The distribution of variables in the study groups of women checked with the use of the Shapiro-Wilk test. The statistical significance between the groups was determined by the Kruskal-Wallis analysis of variance and ANOVA test.

RESULTS

The patients who underwent surgical treatment due to vulvar cancer exhibited differences in sHLA-G blood serum concentration levels before and after the radical vulvectomy. Furthermore, surgical intervention in these patients was linked with a significant decrease in the sRCAS1 concentration level in blood sera. We did not observe significant differences in the blood serum concentration levels of sHLA-G and sRCAS1 with respect to the clinical stage of the disease before and after the operations. We also did not find any significant differences in the concentration levels of these proteins in the blood sera and the grading of cancer lesions.

DISCUSSION

In our study we observed a statistically significant decrease in sHLA-G and sRCAS1 blood serum concentration levels following radical surgical intervention due to vulvar cancer.

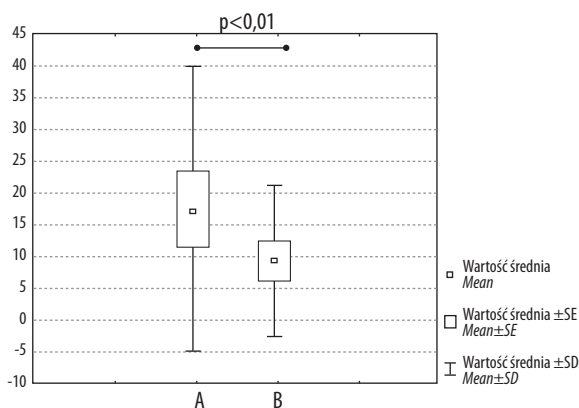
	Stężenie sRCAS1 (U/ml) (wartość średnia ±SD) sRCAS1 (U/ml) (average ±SD)	Stężenie sHLA-G Mediana (IQR) sHLA-G median (IQR)
Przed operacją Before surgery	18,8 (±19,9)	8,47 (4,7)
4 dni po zabiegu 4 days after surgery	9,23 (±12,4)	5,77 (3,4)

SD – odchylenie standardowe; IQR – zakres w obrębie kwartyła
SD – standard deviation; IQR – intraquartile range

Tabela 1. Stężenie sRCAS1 i sHLA-G w osoczu pacjentek leczonych z powodu raka sromu

Table 1. Presents the concentration levels of sRCAS1 and sHLA-G in the blood sera of patients treated for vulvar cancer

sRCAS1



Rys. 1. Stężenie sRCAS1 w osoczu pacjentek leczonych z powodu raka sromu. A) przed operacją; B) 4 dni po operacji

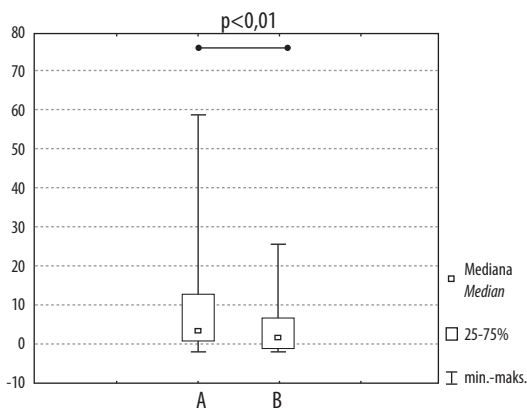
Fig. 1. Presents the concentration levels of sRCAS1 in the blood sera of patients treated for vulvar cancer. A) before surgery; B) 4 days after surgery

Według wiedzy autorów jest to pierwsze badanie oceniające zmiany stężenia sRCAS1 i sHLA-G w osoczu pacjentek z rakiem sromu w trakcie leczenia.

RCAS1 i sHLA-G to białka obecne w mikrośrodowisku guza, a później także w osoczu pacjentek z różnymi nowotworami żeńskich narządów płciowych^(6,13,15,16). Przykładowo u kobiet z rakiem jajnika wzrost poziomu tych białek w osoczu wiąże się z progresją raka i złym rokowaniem^(6,7,15,16). Stwierdzono spadek stężenia RCAS1 w osoczu po leczeniu różnych rodzajów gruczolakoraka i raka płaskonabłonkowego, po którym następował wyraźny wzrost stężenia w przypadku wznowy⁽¹⁶⁾.

Błonowe postaci zarówno RCAS1, jak i HLA-G stwierdzano w tkance rakowej pobranej od pacjentek z nowotworami żeńskich narządów płciowych^(6,13,22,24,26). Ich obecność jest związana z rozwojem raka, ale wykryto ją także w stanach fizjologicznych w miejscach osłabienia aktywności układu odpornościowego, np. w błonie śluzowej macicy, w trofoblastie, w szpiku kostnym i innych^(21,26,39-45). Ponieważ funkcje kontrolne układu odpornościowego stanowią ważne zjawisko fizjologiczne, białka uczestniczące w tym procesie mogą być przydatnym wskaźnikiem jakości nadzoru immunologicznego w stanach fizjologicznych, m.in. w przebiegu ciąży⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. W swoich poprzednich pracach autorzy niniejszego badania opisali możliwość uzyskania podobnych informacji nt. stopnia zablokowania komórek odpornościowych poprzez pomiar stężenia w osoczu sRCAS1 i sHLA-G w różnych fazach porodu^(46,48). Porównanie zmian molekularnych w układzie matka – płód oraz interakcji między nowotworem i układem immunologicznym stanowi obecnie temat szeroko dyskutowany w piśmiennictwie⁽⁴⁹⁾. Wyjaśnienie molekularnego podłoża tych procesów może pomóc nam zrozumieć sposób, w jaki komórki rakowe unikają wykrycia przez układ odpornościowy. Zablokowanie układu immunologicznego stanowi kluczowe zdarzenie w rozwoju nowotworu⁽⁵⁰⁾, a zwłaszcza w jego nawrocie^(16,50). Operacja, chemio- i radioterapia w różny sposób wpływają na interakcje między

sHLA-G



Rys. 2. Stężenie sHLA-G w osoczu pacjentek leczonych z powodu raka sromu. A) przed operacją; B) 4 dni po operacji

Fig. 2. Presents the concentration levels of sHLA-G in the blood sera of patients treated for vulvar cancer. A) before surgery; B) 4 days after surgery

To our knowledge, this is the first investigation to assess the concentration levels of sRCAS1 and sHLA-G in blood sera of patients with vulvar cancer.

RCAS1 and sHLA-G are proteins present in the tumor microenvironment and later in the blood sera of patients with different types of gynecological malignancies^(6,13,15,16). In patients with ovarian cancer, for example, the increase in the blood serum concentration levels of both RCAS1 and HLA-G is associated with cancer progression and poor prognosis^(6,7,15,16). There was found to be a decrease in sRCAS1 blood serum concentration levels after different types of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma therapy; this was followed by a definite increase during cancer relapse⁽¹⁶⁾.

Membrane forms of both RCAS1 and HLA-G were present in the cancer lesions derived from the women's reproductive organs^(6,13,22,24,26). Not only is the presence of these proteins related to cancer development, but their expression was also found in physiological condition – at sites where the immune system activity is restricted, such as the endometrium, trophoblast, bone marrow, and others^(21,26,39-45). Since immune system surveillance is an important physiological phenomenon, the protein participating in the creation of this phenomenon may likely be a useful indicator of this physiological process as it has been observed during pregnancy development⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. In our previous studies we described the possibility of taking the same information concerning the changes in immune cell suppression by measuring the blood serum concentration levels of both sRCAS1 and sHLA-G during the different stages of labor^(46,48). The comparison of the molecular changes at the fetomaternal interface and on tumor and immune cell interaction is now widely discussed in the literature⁽⁴⁹⁾, and clarifying the molecular background of these processes may help us to understand how cancer cells are able to avoid immune system surveillance. The suppression of the immune system constitutes a crucial event in the development of malignancy⁽⁵⁰⁾, especially cancer relapse^(16,50). Surgery

nowotworem i układem odpornościowym⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾. Z jednej strony układ odpornościowy może wykazywać działanie przeciwnowotworowe, z drugiej może sprzyjać wzrostowi guza, dlatego od stopnia hamującego oddziaływania komórek rakowych na układ immunologiczny może zależeć sukces terapeutyczny i ryzyko wznowy⁽⁵⁴⁻⁵⁸⁾. Przywrócenie prawidłowej aktywności komórek immunologicznie kompetentnych jest celem nowych metod leczenia, przypuszcza się, że w ten właśnie sposób będzie można pomóc pacjentom cierpiącym na różne nowotwory żeńskich narządów płciowych. Mimo to wciąż nie jest powszechną praktyką ocena hamującego wpływu komórek rakowych na układ odpornościowy. Trudno jest też określić najwłaściwszy sposób realizacji tej idei, taki, jaki można by zalecać w codziennej praktyce klinicznej. Pomiar tego parametru mógłby pomóc w monitorowaniu skutków leczenia chirurgicznego w zakresie redukcji masy guza, a także wpływu tego leczenia na przywrócenie prawidłowej funkcji układu odpornościowego. W niniejszym badaniu wykazano, że badanie stężenia sRCAS1 i sHLA-G w osoczu może być przydatne w warunkach klinicznych.

WNIOSEK

Pomiar stężenia sRCAS1 i sHLA-G w osoczu może stanowić przydatny wskaźnik stanu mikrośrodowiska nowotworu i pomóc w ocenie stopnia normalizacji aktywności układu odpornościowego po radykalnym chirurgicznym wycięciu sromu.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Kovats S., Main E.K., Librach C. i wsp.: A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990; 248: 220-223.
2. Pistoia V., Morandi F., Wang X., Ferrone S.: Soluble HLA-G: are they clinically relevant? *Semin. Cancer Biol.* 2007; 17: 469-479.
3. Rebmann V., Regel J., Stolke D., Grosse-Wilde H.: Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin. Cancer Biol.* 2003; 13: 371-377.
4. Rebmann V., Wagner S., Grosse-Wilde H.: HLA-G expression in malignant melanoma. *Semin. Cancer Biol.* 2007; 17: 422-429.
5. Urošević M., Kurrer M.O., Kamarashev J. i wsp.: Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 817-824.
6. Davidson B., Elstrand M.B., McMaster M.T. i wsp.: HLA-G expression in effusions is a possible marker of tumor susceptibility to chemotherapy in ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2005; 96: 42-47.
7. 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.
8. Lindaman A., Dowden A., Zavazava N.: Soluble HLA-G molecules induce apoptosis in natural killer cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2006; 56: 68-76.
9. Lila N., Rouas-Freiss N., Dausset J. i wsp.: Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4⁺ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4⁺ T cell regulatory mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001; 98: 12150-12155.

and chemo- and radiotherapy have different effects on tumor and immune cell interaction⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾. Since the immune system can, on the one hand, demonstrate anti-tumor activity, and can, on the other hand, promote tumor growth, the degree of the suppressive influence of cancer cells on the immune system may determine the success of the treatment for a cancer relapse⁽⁵⁴⁻⁵⁸⁾. The restoration of the proper activity of immune cells is the goal of novel therapies, and most likely through the realization of this idea, it will be possible to help patients suffering from different types of gynecological malignancies. Nevertheless, it is not common practice to evaluate the suppressive influence of cancer cells on the immune system. It is also difficult to find the proper test to realize this idea, one that could be recommended for usage in clinical practice. This detection could be helpful in monitoring surgical treatment, such as the treatment for tumor mass reduction, and in the influence of this treatment on the restoration of proper immune system activity. In our study it has been demonstrated that the detection of sRCAS1 and sHLA-G can be used as a possible clinically available test.

CONCLUSION

The detected levels of the blood serum concentration of these proteins may constitute a useful indicator of the status of the tumor microenvironment and may help to assess the degree of restoration of immune system activity following radical surgical vulvectomy.

10. Fournel S., Aguerre-Girr M., Huc X. i wsp.: Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8⁺ cells by interacting with CD8. *J. Immunol.* 2000; 164: 6100-6104.
11. Sheu B.C., Chiou S.H., Lin H.H. i wsp.: Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes in human cervical carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65: 2921-2929.
12. Sheu B.C., Lin R.H., Lien H.C. i wsp.: Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J. Immunol.* 2001; 167: 2972-2978.
13. Sonoda K., Miyamoto S., Hirakawa T. i wsp.: Association between RCAS1 expression and microenvironmental immune cell death in uterine cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2005; 97: 772-779.
14. Sonoda K., Miyamoto S., Hirakawa T. i wsp.: Invasive potency related to RCAS1 expression in uterine cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2005; 99: 189-198.
15. Sonoda K., Miyamoto S., Hirakawa T. i wsp.: Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of uterine cancer. *Gynecol. Oncol.* 2006; 103: 924-931.
16. Dutsch-Wicherek M., Wicherek L.: The association of RCAS1 serum concentration with the reversibility or irreversibility of the process of immune cytotoxic activity restriction during normal menstrual cycle, cancer relapse, and surgical treatment for various types of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008; 59: 266-275.
17. Wicherek L.: Alterations in RCAS1 serum concentration levels during the normal menstrual cycle and the lack of analogical changes in ovarian endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008; 59: 535-544.

18. Arruvito L., Sanz M., Banham A.H., Fainboim L.: Expansion of CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J. Immunol.* 2007; 178: 2572-2578.
19. Wilczynski J.R., Kalinka J., Radwan M.: The role of T-regulatory cells in pregnancy and cancer. *Front. Biosci.* 2008; 13: 2275-2289.
20. Wilczynski J.R., Radwan M., Kalinka J.: The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front. Biosci.* 2008; 13: 2266-2274.
21. Matsushima T., Nakashima M., Oshima K. i wsp.: Receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells, a novel regulator of apoptosis of erythroid progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 313-321.
22. Sonoda K., Kaku T., Hirakawa T. i wsp.: The clinical significance of tumor-associated antigen RCAS1 expression in the normal, hyperplastic, and malignant uterine endometrium. *Gynecol. Oncol.* 2000; 79: 424-429.
23. Nakashima M., Sonoda K., Watanabe T.: Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat. Med.* 1999; 5: 938-942.
24. Akahira J.I., Aoki M., Suzuki T. i wsp.: Expression of EBAG9/RCAS1 is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 2004; 90: 2197-2202.
25. Ito Y., Yoshida H., Nakano K. i wsp.: Overexpression of human tumor-associated antigen, RCAS1, is significantly linked to dedifferentiation of thyroid carcinoma. *Oncology* 2003; 64: 83-89.
26. Wicherek L., Popiela T.J., Galazka K. i wsp.: Metallothionein and RCAS1 expression in comparison to immunological cells activity in endometriosis, endometrial adenocarcinoma and endometrium according to menstrual cycle changes. *Gynecol. Oncol.* 2005; 99: 622-630.
27. Aoki T., Inoue S., Imamura H. i wsp.: EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur. J. Cancer* 2003; 39: 1552-1561.
28. Özkan H., Akar T., Köklü S., Çoban Ş.: Significance of serum receptor-binding cancer antigen (RCAS1) in pancreatic cancer and benign pancreatobiliary diseases. *Pancreatol.* 2006; 6: 268-272.
29. Nakakubo Y., Hida Y., Miyamoto M. i wsp.: The prognostic significance of RCAS1 expression in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Cancer Lett.* 2002; 177: 101-105.
30. Rousseau J., Têtu B., Caron D. i wsp.: RCAS1 is associated with ductal breast cancer progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 293: 1544-1549.
31. Leelawat K., Watanabe T., Nakajima M. i wsp.: Upregulation of tumour associated antigen RCAS1 is implicated in high stages of colorectal cancer. *J. Clin. Pathol.* 2003; 56: 764-768.
32. Nakamura Y., Yamazaki K., Oizumi S. i wsp.: Expression of RCAS1 in human gastric carcinoma: a potential mechanism of immune escape. *Cancer Sci.* 2004; 95: 260-265.
33. Enjoji M., Nakashima M., Yamaguchi K. i wsp.: Significance of RCAS1 antigen in hepatocellular, cholangiocellular and pancreatic carcinomas. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2005; 20: 1143-1148.
34. Kato H., Nakajima M., Masuda N. i wsp.: Expression of RCAS1 in esophageal squamous cell carcinoma is associated with a poor prognosis. *J. Surg. Oncol.* 2005; 90: 89-94.
35. Akashi T., Oimomi H., Nishiyama K. i wsp.: Expression and diagnostic evaluation of the human tumor-associated antigen RCAS1 in pancreatic cancer. *Pancreas* 2003; 26: 49-55.
36. Yamaguchi K., Enjoji M., Nakashima M. i wsp.: Novel serum tumor marker, RCAS1, in pancreatic diseases. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 5199-5202.
37. Enjoji M., Yamaguchi K., Nakashima M. i wsp.: Serum levels of soluble molecules associated with evasion of immune surveillance: a study in biliary disease. *Liver Int.* 2004; 24: 330-334.
38. Dutsch-Wicherek M., Popiela T.J., Wicherek L. i wsp.: RCAS1 expression in laryngeal and pharyngeal cancer with local lymph node metastasis. W: Papispyrou S. (red.): 5th European Congress of Oto-Rhino-Laryngology Head and Neck Surgery. Rodos (Greece), September 11-16, 2004. Medimond S.r.l., Bologna 2004: 345-348.
39. Eidukaite A., Tamosiunas V.: Soluble HLA-G in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 2008; 89: 465-467.
40. Kawashima M., Maeda N., Adachi Y. i wsp.: Human leukocyte antigen-G, a ligand for the natural killer receptor KIR2DL4, is expressed by eutopic endometrium only in the menstrual phase. *Fertil. Steril.* 2009; 91: 343-349.
41. Barrier B.F., Kendall B.S., Ryan C.E., Sharpe-Timms K.L.: HLA-G is expressed by the glandular epithelium of peritoneal endometriosis but not in eutopic endometrium. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 864-869.
42. Wang F., Wen Z., Li H. i wsp.: Human leukocyte antigen-G is expressed by the eutopic and ectopic endometrium of adenomyosis. *Fertil. Steril.* 2008; 90: 1599-1604.
43. Carosella E.D., Moreau P., Le Maout J. i wsp.: HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv. Immunol.* 2003; 81: 199-252.
44. Rouas-Freiss N., Naji A., Durrbach A., Carosella E.D.: Tolerogenic functions of human leukocyte antigen G: from pregnancy to organ and cell transplantation. *Transplantation* 2007; 84 (supl.): S21-S25.
45. Wicherek L.: The role of the endometrium in the regulation of immune cell activity. *Front. Biosci.* 2008; 13: 1018-1035.
46. Knafel A., Basta P., Pitynski K. i wsp.: Soluble HLA-G changes in maternal blood serum during the progression of labor. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2009; 30: 67-73.
47. Wicherek L., Basta P., Pitynski K. i wsp.: The characterization of the subpopulation of suppressive B7H4⁺ macrophages and the subpopulation of CD25⁺ CD4⁺ and FOXP3⁺ regulatory T-cells in decidua during the secretory cycle phase, Arias Stella reaction, and spontaneous abortion – a preliminary report. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2009; 61: 303-312.
48. Wicherek L., Basta P., Galazka K. i wsp.: RCAS1 decidual immunoreactivity and RCAS1 serum level during cesarean section with respect to the progression of labor. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008; 59: 152-158.
49. Wilczyński J.R.: Cancer and pregnancy share similar mechanisms of immunological escape. *Chemotherapy* 2006; 52: 107-110.
50. Siedlar M.: Areaktywność monocytów człowieka indukowana przez bakteryjne czynniki prozapalne i komórki nowotworowe. Rozprawa habilitacyjna UJCM. JB Lakmal, Bytom 2006.
51. Chen R., Alvero A.B., Silasi D.A., Mor G.: Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the Toll-like receptor signaling pathway. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 57: 93-107.
52. Emens L.A.: Chemotherapy and tumor immunity: an unexpected collaboration. *Front. Biosci.* 2008; 13: 249-257.
53. Salvadori S., Martinelli G., Zier K.: Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity. *J. Immunol.* 2000; 164: 2214-2220.
54. Côté A.L., Usherwood E.J., Turk M.I.: Tumor-specific T-cell memory: clearing the regulatory T-cell hurdle. *Cancer Res.* 2008; 68: 1614-1617.
55. Pollard J.W.: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 71-78.
56. Lin E.Y., Pollard J.W.: Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 5064-5066.
57. Condeelis J., Pollard J.W.: Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124: 263-266.
58. Lin E.Y., Pollard J.W.: Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br. J. Cancer* 2004; 90: 2053-2058.