

## Immunohistochemical assessment of lymphocytic infiltrate and selected markers of activation of the immune system (Fas, HLA-DR) in lichen sclerosus associated with vulvar cancer

Immunohistochemiczna ocena nacieku limfocytarnego i wybranych markerów aktywacji układu immunologicznego (Fas, HLA-DR)

w liszaju twardzinowym z towarzyszącym rakiem sromu

Иммуногистохимическая оценка лимфоцитарного инфильтрата и избранных маркеров активации иммунологической системы

(Фас, ХЛА-ДР) при склеродемном лишае с сопутствующим раком вульвы

<sup>1</sup> Dział Ginekologii Onkologicznej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii, Kielce. Kierownik: dr hab. n. med. J. Starzewski

<sup>2</sup> Zakład Patologii Nowotworów, Świętokrzyskie Centrum Onkologii, Kielce. Kierownik: dr n. med. J. Sygut

<sup>3</sup> Instytut Kształcenia Medycznego, Akademia Świętokrzyska, Kielce. Kierownik: prof. dr hab. W. Dutkiewicz

<sup>4</sup> Dział Chemioterapii, Świętokrzyskie Centrum Onkologii, Kielce. Kierownik: dr n. med. S. Góźdz

Correspondence to: Arkadiusz Chil, Świętokrzyskie Centrum Onkologii, Dział Ginekologii Onkologicznej, ul. Artwińskiego 3, 25-734 Kielce, e-mail: archil@poczta.fm

Source of financing: Department own sources

### Summary

**Introduction:** Factors causing malignant transformation of vulvar lichen sclerosus are not fully elucidated. In view of available evidence, malignant transformation of keratinocytes in lichen sclerosus is limited to the basal and the peribasal epidermal layers, being the starting point for further stromal invasion. This contradicts the classic theory of vulvar carcinogenesis on the basis of VIN, assuming that cancer develops by gradual replacement of all epidermal layers by atypical keratinocytes. In general opinion, lichen sclerosus may result from prolonged stimulation by antigens (e.g. viral infection). It is supported by observed changes of expression of antigens associated with activation of the immune system (CD3, CD8, CD57, HLA-DR and others). **Aim of paper:** Evaluation of correlation between change of expression of selected markers of activation of the immune system in vulvar lichen sclerosus (CD4, CD8, HLA-DR, Apo-1/Fas) and the presence of squamous cell cancer of the vulva. **Material and methods:** Comparison of expression of antigens CD4, CD8, HLA-DR, CD95 (Apo-1/Fas) in vulvar skin preparations obtained from 12 patients with lichen sclerosus (group 1) with those obtained from 14 patients with lichen sclerosus coexisting with squamous cell vulvar cancer (group 2). Expression of selected antigens was assessed quantitatively using digital image analyzer. The number of cells expressing above mentioned antigens was determined in the basal and peribasal epithelial layers. Statistical analysis of the intergroup difference was performed using the Mann-Whitney U test. **Results:** Statistically significant ( $p < 0.05$ ) increase of CD8(+) lymphocytes and decrease of the number of cells expressing HLA-DR antigens was noticed in the group of women with lichen sclerosus associated with vulvar squamous cell carcinoma. Cells expressing CD4 and CD95 were scarcely represented in epithelial layers of samples studied and their numbers were not significantly different in both groups. **Conclusion:** An increase in the number of cytotoxic lymphocytes and a decrease in the number of cells expressing HLA-DR antigens and those associated with presentation of antigens to T lymphocytes suggest, that immune factors may play a role in the development of vulvar cancer on the base of lichen sclerosus.

**Key words:** lichen sclerosus, vulvar cancer, immunohistochemistry, lymphocytes, HLA-DR, CD95

## Streszczenie

**Wstęp:** Czynniki, które powodują transformację nowotworową w liszaju twardziny sromu, nie zostały poznane do końca. Istnieją dowody, że transformacja nowotworowa keratynocytów w liszaju twardziny jest ograniczona wyłącznie do warstwy podstawnej i przypodstawnej nabłonka, skąd następuje inwazja podścieliska. Pozostaje to w sprzeczności z klasyczną teorią rozwoju raka sromu na podłożu VIN, według której rak rozwija się poprzez stopniowe zastępowanie wszystkich warstw nabłonka przez atypowe keratynocyty. Uważa się, że liszaj twardziny może być wynikiem przewlekłej stymulacji antygenowej (np. zakażenie wirusowe), o czym mogą świadczyć obserwowane zmiany ekspresji antygenów związanych z aktywacją układu immunologicznego (między innymi CD3, CD8, CD57, HLA-DR). **Cel pracy:** Ocena związku pomiędzy zmianami ekspresji wybranych markerów aktywacji układu immunologicznego w liszaju twardziny sromu (CD4, CD8, HLA-DR, Apo-1/Fas) a obecnością płaskonabłonkowego raka sromu. **Materiał i metody:** Ekspresję antygenów CD4, CD8, HLA-DR, CD95 (Apo-1/Fas) porównano, zestawiając preparaty ze skóry sromu pobrane od 12 pacjentek z liszajem twardziny (grupa 1.) z preparatami pobranymi od 14 pacjentek z liszajem twardziny współwystępującym z płaskonabłonkowym rakiem sromu (grupa 2.). Ekspresję wybranych antygenów porównano metodą ilościową przy użyciu cyfrowego analizatora obrazu. Liczbę komórek wykazujących ekspresję badanych antygenów określano w warstwie podstawnej i przypodstawnej nabłonka. Do oceny różnic w badanych grupach zastosowano test U Manna-Whitneya. **Wyniki:** Stwierdzono statystycznie znamienne ( $p < 0,05$ ) wzrost liczby limfocytów CD8 oraz spadek liczby komórek wykazujących ekspresję antygenów HLA-DR w grupie kobiet z liszajem twardziny współwystępującym z rakiem płaskonabłonkowym sromu. Komórki wykazujące ekspresję CD4 i CD95 były bardzo skąpo reprezentowane w ocenianych warstwach nabłonka, a ich liczba nie wykazywała znamienych różnic w porównywanych grupach. **Wnioski:** Wzrost liczby limfocytów cytotoksycznych oraz spadek liczby komórek wykazujących ekspresję HLA-DR i związanych z prezentacją antygenów limfocytom T może świadczyć o roli czynnika immunologicznego w historii rozwoju raka sromu na podłożu liszaja twardziny.

**Słowa kluczowe:** liszaj twardziny, rak sromu, immunohistochemia, limfocyty, HLA-DR, CD95

## Содержание

**Введение:** Факторы вызывающие трансформацию новообразований в склеродедном лишае вульвы до сих пор до конца не выяснены. Существует доказательство, что трансформация новообразований кератиноцитов в склеродедном лишае ограничивается только основным и околобазальным слоем эпителия и оттуда происходит вторжение в остов. Это противоречит классической теории развития рака вульвы на основе ВИН, согласно которой рак развивается посредством постоянного замещения всех слоев эпителия нетипичными кератиноцитами. Считается, что склеродедный лишай может быть следствием продолжительного антигенного стимулирования (например вирусного заражения), о чем могут свидетельствовать наблюдаемые изменения экспрессии антигенов связанных с активацией иммунологической системы (в частности КД3, КД8, КД57, ХЛА-ДР). **Цель работы:** Оценка связи между изменениями экспрессии избранных маркеров активации иммунологической системы при склеродедном лишае вульвы (КД4, КД8, ХЛА-ДР, Апо-1/Фас) и наличием плоскоэпителиального рака вульвы. **Материал и методы:** Экспрессия антигенов КД4, КД8, ХЛА-ДР, КД95 (Апо-1/Фас) сравнивалась в препаратах из кожи вульвы взятой у 12 пациенток страдающих склеродедным лишаем (группа 1) с препаратами взятыми у 14 пациенток, у которых появился склеродедный лишай и плоскоэпителиальный рак вульвы (группа 2). Экспрессия избранных антигенов сравнивалась при помощи количественного метода при использовании цифрового анализатора изображения. Количество клеток проявляющих экспрессию исследуемых антигенов определялось в основном и околобазальном слое эпителия. Для оценки разницы в исследуемых группах использовался тест У Манна-Уитни. **Результаты:** Констатировано статистически значимое увеличение ( $p < 0,05$ ) количества лимфоцитов КД8 и уменьшение количества клеток, которые проявляли экспрессию антигенов ХЛА-ДР в группе женщин с наблюдаемым одновременно склеродедным лишаем и плоскоэпителиальным раком вульвы. Клетки проявляющие экспрессию КД4 и КД95 были очень скудно представлены в оцениваемых слоях эпителия, а их количество не показывало значимой разницы в сравниваемых группах. **Выводы:** Увеличение количества цитотоксических лимфоцитов и уменьшение количества клеток проявляющих экспрессию ХЛА-ДР и связанных с представлением антигена лимфоцитам Т может свидетельствовать о роли иммунологического фактора в истории развития рака вульвы на основе склеродедного лишая.

**Ключевые слова:** лишай склеродедный, рак вульвы, иммуногистохимия, лимфоциты, ХЛА-ДР, КД95

## INTRODUCTION

Lichen sclerosis (LS) is common inflammatory dermatosis, accompanying vulvar cancer. Though lichen sclerosis is not recognized as the precancerous condition, in 1-4% of cases, forms base for vulvar cancer. Years lasting observations show, that 40% of patients, who developed carcinoma, suffered from lichen sclerosis<sup>(1)</sup>. In the study of Vilmer, who analyzed 67 cases of vulvar epithelial cancer, in 76% of cases, lichen sclerosis was next to the neoplastic epithelium<sup>(2)</sup>. Factors leading to neoplastic transformation and its mechanism are still unrevealed. Intensive studies about the antigen's expression changes in lichen sclerosis, connected with immune response, and cell differentiation, are still performing, in hope to help in its pathogenesis and transformation mechanisms explanation. When compared to the normal skin, growth of HLA-DR<sup>(3,4)</sup>, CD1a+ (Langerhans cells)<sup>(5)</sup>, p53 protein<sup>(6,7)</sup> expression, and the decrease of CD44 antigens<sup>(8)</sup> expression was ascertained. The data about the lymphocyte infiltration are not unambiguous. The growth of number of CD4 and CD8<sup>(3,9)</sup> lymphocytes, and also decrease<sup>(10)</sup> was noted. Elevation of p53<sup>(11)</sup>, Ki-67, lymphocytes CD4+, CD8+, and Fas+<sup>(12,13)</sup> expression accompanied the beginning of neoplastic transformation, on the basis of lichen sclerosis. There are evidences, that neoplastic transformation of keratinocytes in lichen sclerosis is restricted only to basal and peribasal epithelial layers, from where stromal invasion is initiated<sup>(14,15)</sup>. This is opposite to classic theory of vulvar cancer development, which takes place on the base of VIN, where atypical keratinocytes gradually replace all normal epithelial layers. In this aspect, observation of deeper epithelial layers in lichen sclerosis, and the immune processes understanding is getting significant. It is believed, that they may create the favorable cancer development environment<sup>(12)</sup>.

Using the immunohistochemical method, we took up the experiment to determine the connection between the expression of selected activation markers of immune system in deeper layers of lichen sclerosis vulvar epithelium (CD4, CD8, HLA-DR, Apo-1/Fas) changes and the presence of squamous cell cancer of vulva.

## MATERIAL AND METHODS

### BIOLOGICAL MATERIAL

The study covered routine histopathological samples, taken from Department of Pathology at Holy Cross Cancer Center in Kielce, made of vulvar tissues from 12 patients with lichen sclerosis (group 1), and from 14 patients with lichen sclerosis coexistent with squamous cell vulvar cancer (group 2).

## WSTĘP

Stosunkowo częstym zjawiskiem u pacjentek z rakiem sromu jest towarzyszący liszaj twardzinowy (*lichen sclerosis*, LS). Jakkolwiek liszaj twardzinowy nie jest uznawany za stan przednowotworowy, to jednak w 1-4% przypadków na jego podłożu rozwija się rak. Dane retrospektywne pokazują, że aż u 40% chorych z płaskonabłonkowym rakiem sromu występował w przeszłości liszaj twardzinowy<sup>(1)</sup>. W badaniu Vilmera, który analizował 67 przypadków nabłonkowego raka sromu, aż w 76% w sąsiedztwie nabłonka neoplastycznego występował liszaj twardzinowy<sup>(2)</sup>. Nie są znane przyczyny i mechanizm transformacji liszaja w raka. Prowadzi się intensywne badania nad zmianami ekspresji antygenów w liszaju twardzinowym związanych z odpowiedzią immunologiczną i różnicowaniem komórek w nadziei, że pomoże to wyjaśnić jego patogenezę i mechanizmy transformacji. W liszaju twardzinowym, w porównaniu ze skórą normalną, stwierdzono między innymi wzrost ekspresji antygenów HLA-DR<sup>(3,4)</sup>, CD1a+ (komórek Langerhansa)<sup>(5)</sup>, białka p53<sup>(6,7)</sup> oraz spadek ekspresji antygenów CD44<sup>(8)</sup>. Dane dotyczące obecności nacieku limfocytarnego nie są jednoznaczne. Stwierdzano zarówno wzrost<sup>(3,9)</sup>, jak i spadek liczby limfocytów CD4 oraz CD8<sup>(10)</sup>. Początkowi transformacji nowotworowej na podłożu liszaja twardzinowego towarzyszył wzrost ekspresji białka p53<sup>(11)</sup>, antygeny Ki-67 oraz limfocytów CD4+, CD8+ i Fas+<sup>(12,13)</sup>. Istnieją dowody, że transformacja nowotworowa keratynocytów w liszaju twardzinowym ograniczona jest tylko do warstwy podstawnej i przypodstawnej nabłonka, skąd następuje inwazja podścieliska<sup>(14,15)</sup>. Pozostaje to w sprzeczności z klasyczną teorią rozwoju raka sromu na podłożu VIN, według której rak rozwija się poprzez stopniowe zastępowanie wszystkich warstw nabłonka przez atypowe keratynocyty. W tym aspekcie znaczenia nabierają obserwacja głębszych warstw nabłonka w liszaju twardzinowym i zrozumienie przebiegających tam procesów immunologicznych. Uważa się, że mogą one tworzyć środowisko sprzyjające rozwojowi raka<sup>(12)</sup>.

Posługując się metodą immunohistochemiczną, podjęliśmy próbę określenia związku pomiędzy zmianami ekspresji wybranych markerów aktywacji układu immunologicznego w głębszych warstwach nabłonka liszaja twardzinowego sromu (CD4, CD8, HLA-DR, Apo-1/Fas) a obecnością płaskonabłonkowego raka sromu.

## MATERIAŁ I METODY

### MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Materiał badawczy stanowiły rutynowe preparaty histopatologiczne z archiwum Zakładu Patologii Nowotworów Świętokrzyskiego Centrum Onkologii wykonane

## METHODS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES

In each group, CD4, CD8, HLA-DR, Fas (CD95) expression was determined. All immunohistochemical assays were performed on the basis of three-step indirect peroxidase reaction, using, for evaluation of specific antigens, monoclonal original antibodies and multiclonal secondary antibodies (Novocastra): CD4 (T helpers/inducers), CD8 (T cytotoxic/suppressor), HLA class II (DR) antigen, Fas (CD95).

The representative tissue samples were achieved through guillotine cut of paraffin blocks, deriving from each examined group. The thickness of each section averaged 4 µm. Such prepared sections were located on silanated basic glasses and coagulated in the temperature of 37 degrees Celsius for 24 hours, to avoid the unsticking of preparations during the subsequent immunohistochemical reactions. Afterwards, slides after the xylene deparaffination were treated with the alcoholic file bathing, for tissue hydration. The activity of endogenous peroxidase was blocked for 3% hydrogen peroxide reaction, ongoing 5 minutes. Such prepared sections were incubated with the origin antibody. The negative control was reached through the incubation of cut sections, coming from the same preparations with buffered IgG2 solution. The next step was the incubation of cut sections with secondary antibody, and the last step was the incubation of cut sections, prepared as above, with avidin-biotin complex, signed with peroxidase (Novostain Super ABC Kit, Novocastra). The positive control was obtained through the assay of tonsil tissue performance, and the epithelial stromal antigen expression evaluation was the positive internal control. After each step termination, cut sections were three times washed out in 0.05 M TRIS-HCL buffer. For visualization of peroxidase action effects, DAB (3,3'-diaminobenzidine hydrochloride) with 0.8% hydrogen peroxide was used. Additionally, cut sections were colored with Harris hematoxylin. Whole procedure was performed in the room temperature. The final estimation of preparations was performed in conventional light microscope in 100 times magnification. Because of marking performed on the preparations previously fixed in the formalin solution, and then inundated with paraffin, after the routine deparaffination and plugging of endogen peroxidase, for sensitivity rising, cut sections were treated with TUF (Target Unmasking Fluid, KREATECH).

## QUANTITATIVE EVALUATION OF ANTIGENS EXPRESSION

To perform the quantitative evaluation of the examined antigens expression, the computer image analysis system was used (analySIS pro 3.1 – Soft Imaging System). The number of cells expressing immunoassayed antigens was counted in 5 fields of examined slides, each containing

z tkanek sromu pobranych od 12 pacjentek z liszajem twardzinowym (grupa 1.) oraz od 14 pacjentek z liszajem twardzinowym współwystępującym z płaskonabłonkowym rakiem sromu (grupa 2.).

## METODYKA BADAŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH

W preparatach badanych grup oznaczano ekspresję antygenów CD4, CD8, HLA-DR, Fas (CD95). Wszystkie oznaczenia immunohistochemiczne przeprowadzono w oparciu o trójstopniową pośrednią reakcję peroksydazy, używając w celu identyfikacji badanych antygenów swoistych monoklonalnych przeciwciał pierwotnych oraz poliklonalnych przeciwciał wtórnych (Novocastra): CD4 (*T helpers/inducers*), CD8 (*T cytotoxic/suppressor*), HLA class II (*DR*) antigen, Fas (CD95).

Reprezentatywne fragmenty tkanek uzyskiwane były poprzez gilotynowe cięcie bloczków parafinowych pochodzących z obu badanych grup. Grubość skrawków wynosiła 4 µm. Tak przygotowane skrawki umieszczano na silanowanych szkiełkach podstawowych i koagulowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 24 godziny, celem uniknięcia odklejania się preparatów podczas przeprowadzania dalszych reakcji immunohistochemicznych. Następnie skrawki po deparafinizacji w ksylenie przeprowadzono przez kąpiele w szeregu alkoholowym w celu uwodnienia tkanek. Aktywność endogennej peroksydazy blokowana była poprzez trwającą 5 minut reakcję z 3% nadtlakiem wodoru. Tak przygotowane skrawki poddawano inkubacji z przeciwciałem pierwotnym. Kontrola negatywna była uzyskiwana poprzez inkubację skrawków pochodzących z tych samych preparatów ze zbuforowanym roztworem IgG2. Kolejny etap stanowiła inkubacja skrawków z przeciwciałem wtórnym, natomiast ostatni – inkubacja skrawków przygotowanych jw. z kompleksem awidyna – biotyna znakowanym peroksydazą (Novostain Super ABC Kit, Novocastra). Kontrolę pozytywną uzyskano, wykonując oznaczenia w tkance migdałka, z kolei ocena ekspresji antygenów w podścielisku nabłonka posłużyła jako pozytywna kontrola wewnętrzna. Po każdym zakończonym etapie skrawki trzykrotnie przemywano w 0,05 M buforze TRIS-HCL. W celu wizualizacji efektów działania peroksydazy używano DAB (3,3'-chlorowodorek dwuaminobenzydyny) z dodatkiem 0,8% nadtlaku wodoru. Skrawki były dodatkowo poddawane podbarwieniu hematoksyliną Harris. Całość procedury przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Do oceny końcowej preparatów posłużył konwencjonalny mikroskop świetlny (powiększenie 100x). Ze względu na przeprowadzanie oznaczeń w preparatach utrwalanych uprzednio w roztworze formaliny i zatapiających w parafinie, po wykonaniu rutynowej deparafinizacji i zablokowaniu aktywności endogennej peroksydazy, celem podniesienia czułości metody, skrawki poddawano działaniu TUF (Target Unmasking Fluid, KREATECH).

200 epithelial cells from basal and peribasal epithelial layer and expressed as average percentage of cells positive for the studied antigen. In patients with carcinoma, image analysis was carried out in epithelium with lichen, adjacent to neoplastic epithelium.

### STATISTICAL ANALYSIS

To estimate differences between studied groups, U Mann-Whitney test was used.

### RESULTS

There was observed statistically significant ( $p < 0.05$ ) increase in CD8 lymphocytes number, and decrease in cells expressing HLA-DR antigens number in women with coincident lichen sclerosis and vulvar squamous cell carcinoma, when compared to the group with lichen sclerosis alone (figs. 1-4). Cells with positive expression of CD4 and CD95 were rare in examined epithelial layers, and their number revealed no significant differences in compared groups (table 1).

### DISCUSSION

Lichen sclerosis is the dermatosis of unknown etiology. Among risk factors of this disease, the following are postulated: immunological, environmental, genetic, infectious and metabolic. More often concerns women than men (6:1) and in 83% of cases is located in genital area<sup>(16)</sup>.

### IŁOŚCIOWA OCENA EKSPRESJI ANTYGENÓW

W celu przeprowadzenia ilościowej oceny ekspresji badanych antygenów posłużono się cyfrowym systemem analizy obrazu z oprogramowaniem do analizy obrazu analySIS pro 3.1 (Soft Imaging System). Liczba komórek wykazujących ekspresję antygenów była określana w 5 polach widzenia badanych preparatów, obejmujących po 200 komórek nabłonkowych warstwy podstawnej i przypodstawnej nabłonka, i wyrażana jako średni odsetek komórek wykazujących ekspresję badanego antygeny. U chorych z rakiem akwizycją obrazu prowadzono w nabłonku z liszajem przylegającym do zmienione go nowotworowego nabłonka.

### ANALIZA STATYSTYCZNA

Do oceny różnic w badanych grupach, ze względu na niewielką liczbę preparatów i trudności w weryfikacji normalności rozkładu, posłużył test U Manna-Whitneya.

### WYNIKI

Stwierdzono statystycznie znamienne ( $p < 0,05$ ) wzrost liczby limfocytów CD8 oraz spadek liczby komórek wykazujących ekspresję antygenów HLA-DR w grupie kobiet, w której liszaj twardzinowy współlistniał z rakiem płaskonabłonkowym sromu, w porównaniu z grupą pacjentek, w której obserwowany był jedynie liszaj twar-

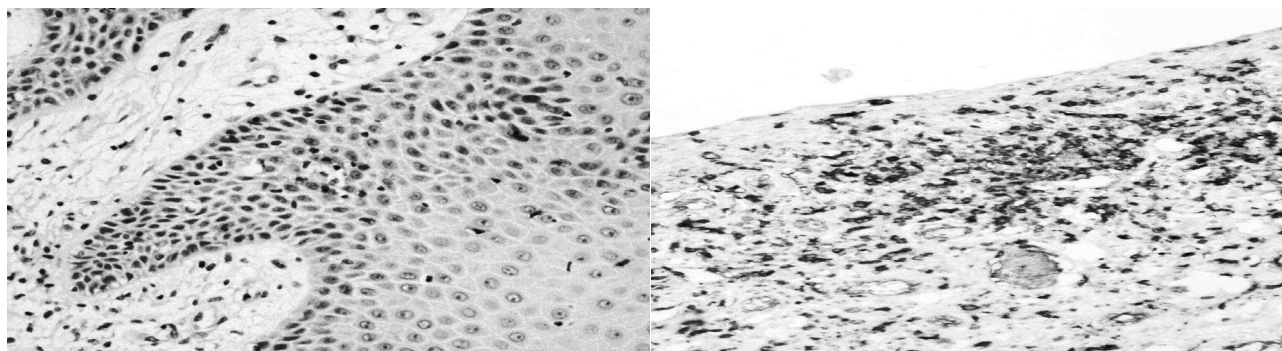
Lichen sclerosis (group 1: 12 preparations) Lichen sclerosis (grupa 1.: 12 preparatów)			Lichen sclerosis/Squamous cell cancer (group 2: 14 preparations) Lichen sclerosis/Carcinoma planoepitheliale (grupa 2.: 14 preparatów)			Statistical significance of the difference in expression ( $p < 0.05$ ) Istotność statystyczna różnicy ekspresji ( $p < 0,05$ )
Antigen	Medium percentage of cells, demonstrating the expression of the examined antigen (on 200 epithelial cells) Średni odsetek komórek wykazujących ekspresję badanego antygeny (na 200 komórek nabłonkowych)	Standard deviation Odchylenie standardowe	Antigen	Medium percentage of cells, demonstrating the expression of the examined antigen (on 200 epithelial cells) Średni odsetek komórek wykazujących ekspresję badanego antygeny (na 200 komórek nabłonkowych)	Standard deviation Odchylenie standardowe	
CD4	3.15	0.88	CD4	3.81	0.96	NS
CD8	42.8	7.82	CD8	135.28	11.32	IS ( $p=0.00001$ )
CD95	3.51	0.76	CD95	2.87	1.03	NS
HLA-DR	47.86	10.64	HLA-DR	14.34	5.95	IS ( $p=0.00001$ )

NS – not significant; IS – statistically significant  
NS – nieistotne statystycznie; IS – istotne statystycznie

Table 1. The assessment results of percentage participation of the epithelial cells, demonstrating the examined antigens expression (on 200 cells of basal and peribasal layer)

Tabela 1. Wyniki oceny odsetkowego udziału komórek nabłonkowych wykazujących ekspresję badanych antygenów (na 200 komórek warstwy podstawnej i przypodstawnej)

Таблица 1. Результаты процентной оценки участия эпителиальных клеток, которые свидетельствуют об экспрессии исследуемых антигенов (на 200 клеток основного и околобазального слоя)



Figs. 1 and 2. The lymphocyte infiltration – CD8 lymphocytes – in lichen sclerosus epithelium (fig. 1), and significant growth of its count in lichen sclerosus next to the squamous cell vulvar cancer (fig. 2)

Rys. 1 i 2. Naciek limfocytny – limfocyty CD8 – w nabłonku liszaja twardziny (rys. 1) i znaczny wzrost ich liczby w liszaju sąsiadującym z płaskonabłonkowym rakiem sromu (rys. 2)

Рис. 1 и 2. Лимфоцитарный инфильтрат – лимфоциты КД8 – в эпителие склеродезного лишая (рис. 1) и значительное увеличение их количества в лишае находящимся по соседству с плоскоэпителиальным раком вульвы (рис. 2)

The characteristic histological features of lichen sclerosus are: loss of skin warts, lymphocyte infiltration and vacuolar degeneration in basal epithelial layer, and development of the homogeneous layer of proper skin of different thickness<sup>(17)</sup>. Also autoimmune-based dermatoses, where autoimmune reactions against intracellular antigens of superficial keratinocytes, or, as the result of inflammatory process, extracellular antigens, as: scleroderma or albinism, are also characterized with these features<sup>(18)</sup>. In our analysis, significant differences in antigens expression in the group of patients with lichen sclerosus and squamous cell cancer, appeared in cases of CD8 and HLA-DR antigens presence. First of them is the differentiation complex (cluster of differentiation) of cytotoxic and suppressing lymphocytes, and its task is to combine with the main histocompatibility antigens

dziny (rys. 1-4). Komórki wykazujące ekspresję CD4 i CD95 były bardzo skąpo reprezentowane w ocenianych warstwach nabłonka, a ich liczba nie wykazywała znaczących różnic w porównywanych grupach (tabela 1).

## OMÓWIENIE

Liszaj twardziny jest dermatozą o nieznannej etiologii. Poszukując czynników ją wywołujących, wskazywano na przyczyny autoimmunologiczne, środowiskowe, genetyczne, zakaźne i metaboliczne. Występuje częściej u kobiet niż u mężczyzn (6:1) i w 83% umiejscawia się w okolicy narządów płciowych<sup>(16)</sup>. Charakterystycznymi cechami histologicznymi liszaja są: utrata brodawek skórnych, nacieki limfocytarne i zwyrodnienie wodniczkowe w warstwie podstawnej nabłonka oraz rozwój jed-



Figs. 3 and 4. Expression of the HLA-DR antigens in lichen sclerosus epithelium (fig. 4), and decrease of their expression in lichen sclerosus next to the squamous cell cancer (fig. 3). HLA-DR expression in the stroma was treated as positive internal control

Rys. 3 i 4. Ekspresja antygenów HLA-DR w nabłonku liszaja twardziny (rys. 4) i spadek ekspresji w liszaju sąsiadującym z rakiem (rys. 3). Ekspresję HLA-DR w podścielisku potraktowano jako pozytywną kontrolę wewnętrzną

Рис. 3 и 4. Экспрессия антигенов ХЛА-DR в эпителие склеродезного лишая (рис. 4) и уменьшение экспрессии в лишае, который находится по соседству с раком (рис. 3). Экспрессия ХЛА-DR в остове (субстрате) рассматривалась в качестве положительного внутреннего контроля

complex system (HLA) of class I, during the antigen's presentation. In normal epithelium, the presence of diffuse, single CD8 lymphocytes is ascertained<sup>(19)</sup>. Most of studies performed point at the growth of CD8 lymphocytes number, getting together in the stroma and the border of basal epithelial layer, in case of lichen sclerosis<sup>(4)</sup>. Their task is probably the answer to so far not identified antigen, appearing in lichen sclerosis, confirmation for what is differentiation and expansion of selected CD3 (precursors of CD4 and CD8 lymphocytes)<sup>(20)</sup> lymphocytes clones. Suppression of the immune answer in these cases may be significant in restriction of degenerative epithelial alterations. In lichen sclerosis, coexistent with squamous cell vulvar cancer, the growth of CD8 lymphocytes number was ascertained, what has been earlier demonstrated by Ben-Hur et al.<sup>(13)</sup> In our study, very miserly expression of activated helpers lymphocytes T and B (CD4+, HLA-DR+, CD95+) is noticed. Lichen sclerosis, coexistent with cancer, was characterized with significantly smaller number of epithelial cells, demonstrating the HLA-DR antigens expression. The presentation of the antigen, connected with the HLA-II molecules, mainly concerns antigens, with extracellular origin, which may be phagocytosed. The professional cells, presenting the antigen in HLA-II context, for example: Langerhans cells, transform the phagocytosed antigen. Endocytosed peptides go to the endosomes, where are connected with MHC-II molecule. Presented connected with MHC-II, are recognized for CD4 expressing lymphocytes subpopulation, which play a helpers role through the immune modulating cytokines secretion. HLA class II molecules are mainly located on B lymphocytes, macrophages, dendrite cells, Langerhans cells and at the epithelial cells of the thymus. However, as the results of activation, or on the cytokines (for example: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13) influence, may appear on a lot of other cells, as: excited T lymphocytes, keratinocytes, fibroblasts, and others. Appearance of HLA-DR molecules (MHC-II) on not synthesizing in normal conditions cells was ascertained in many of different dermatoses, for example: lichen sclerosis, scleroderma, albinism, lichen planus, allergic contact dermatitis, and erythema nodosum<sup>(21)</sup>.

For expression of main histocompatibility complex system, class II (HLA-DR), with moderate presence of B lymphocytes and macrophages, the presence of HLA-DR antigens on keratinocytes and Langerhans cells is responsible. The decrease of HLA-DR, expressing cells number in lichen sclerosis next to cancer lesion, may indicate the antigen presentation disorder in case of neoplastic transformation.

However, this is still not explained, if HLA class II molecules, located on the surface of not immune system cells, may take part in antigens presentation, activating T lymphocytes, or only call for a status of anergy. Expression of HLA class II molecules for keratinocytes, under the cytokines stimulation influence, suggests their role in the

norodnej warstwy skóry właściwej o różnej grubości<sup>(17)</sup>. Cechami takimi charakteryzują się także dermatozy o podłożu autoimmunologicznym, np. twardzina lub bielactwo, w których dochodzi do reakcji autoimmunologicznej przeciw prezentowanym na powierzchni keratynocytów antygenom wewnątrzkomórkowym lub zmienionym na skutek reakcji zapalnej antygenom zewnątrzkomórkowym<sup>(18)</sup>. W naszej analizie istotne różnice w ekspresji antygenów w grupie pacjentek z liszajem i rakiem wystąpiły w przypadku antygenów CD8 i HLA-DR. Pierwszy z nich to kompleks różnicowania (*cluster of differentiation*) limfocytów cytotoksycznych i supresorowych, a jego zadaniem jest połączenie się z fragmentem kompleksu antygenów głównego układu zgodności tkankowej (HLA) klasy I w trakcie prezentowania antygeny. W prawidłowym nabłonku stwierdza się obecność rozproszonych, pojedynczych limfocytów CD8<sup>(19)</sup>. Większość przeprowadzonych badań wskazuje na wzrost liczby limfocytów CD8 w przypadku rozwoju liszaja, które gromadzą się wówczas w podścielisku i na granicy warstwy podstawnej nabłonka<sup>(4)</sup>. Ich zadaniem jest prawdopodobnie odpowiedź na, niezidentyfikowany jak dotąd, antygen pojawiający się w liszaju twardzinowym, czego potwierdzeniem są różnicowanie i ekspansja wyselekcjonowanych klonów limfocytów CD3 (prekursorów limfocytów CD4 i CD8)<sup>(20)</sup>. Supresja odpowiedzi immunologicznej w tych stanach może mieć znaczenie w ograniczeniu zmian degeneracyjnych nabłonka. W liszaju twardzinowym współwystępującym z rakiem sromu stwierdziliśmy zwiększenie liczby limfocytów CD8, co wykazali wcześniej także Ben-Hur i wsp.<sup>(13)</sup> W naszym badaniu zwraca uwagę bardzo skąpa ekspresja aktywowanych limfocytów pomocniczych T i B (CD4+, HLA-DR+, CD95+). Liszaj występujący w sąsiedztwie raka charakteryzował się znacząco mniejszą liczbą komórek nabłonkowych wykazujących ekspresję antygenów HLA-DR. Prezentacja antygeny w połączeniu z cząsteczkami HLA-II dotyczy głównie tych antygenów, które mają pierwotnie pochodzenie pozakomórkowe i ulegają fagocytozie. Profesjonalne komórki prezentujące antygen w kontekście HLA-II, np. komórki Langerhansa, przetwarzają sfagocytowany antygen. Peptydy, które uległy endocytozie, trafiają do endosomów, gdzie dochodzi do ich połączenia z cząsteczką MHC-II. Prezentowane w połączeniu z MHC-II są rozpoznawane przez subpopulację limfocytów wykazujących ekspresję CD4, które spełniają funkcje pomocnicze poprzez wydzielanie immunomodulujących cytokin. Cząsteczki HLA klasy II występują głównie na limfocytach B, makrofagach, komórkach dendrytycznych, komórkach Langerhansa i komórkach nabłonka grasicy. Niemniej jednak w wyniku aktywacji lub pod wpływem działania cytokin (np. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13) mogą pojawić się na wielu innych komórkach, np. pobudzonych limfocytach T, keratynocytach, fibroblastach i innych. Pojawienie się cząsteczek HLA-DR (MHC-II) na komór-

antigen presentation. It is a well-known fact that keratinocytes may be functioning as the antigen presenting cells, eliciting the lymphocytes Th activation<sup>(22)</sup>. It is also well-known fact, that the antigen presentation for keratinocytes may evoke the lymphocytes T, towards to the presented antigens tolerance<sup>(23,24)</sup>. It has been proved, that the presented antigen is not a signal, which, acting alone, may activate lymphocytes T. The critical meaning for activation intensity and kind of activated lymphocytes T have the superficial B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) molecules, located on the antigen presenting cells, and cytokines produced for keratinocytes and Langerhans cells. So, the tolerance may be the result of the CD28 lymphocyte receptors for B7 molecules<sup>(25)</sup> costimulation lack. However, keratinocytes demonstrate expression of BB1 molecules, whose costimulative activity may be modulated<sup>(26)</sup>. This kind of influence may probably call the cytokines (for example IFN- $\gamma$ )<sup>(27)</sup>.

In our study, in contrast to Ben-Hur et al.<sup>(13)</sup>, we did not ascertain any significant difference in antigen CD95 expression between the compared groups of preparations. The reason for this is the most probably fact, that the lymphocytes B, demonstrating the CD95 antigen expression, accumulate mainly in the deeper epithelial layers, but in epithelium, which was examined, their appearance is occasional.

The presence of Fas molecules in the target cell membrane makes possible its lysis through the effector cells (among others: CD8 lymphocytes, CD4 lymphocytes, NK cells) after binding with ligand for Fas (FasL) present on the effector cell membrane<sup>(28)</sup>. In the proper conditions, Apo-1/Fas molecules constitute important mechanism for autoimmune answer regulation, not allowing, among others, for autoreactive lymphocytes T development. However, thanks to the ligand for Fas appearing on the surface of neoplastic cells, they gain the ability for the attacking T lymphocytes apoptosis, in which cellular membrane APO-1/Fas protein is present. The studies about the cervical cancer development demonstrated, that directed against antigens of the tumor cytotoxic lymphocytes T disappear before the total tumor elimination<sup>(29)</sup>. This fact suggests that the change of the cellular phenotype makes possible escape of the tumor from the immune organism's response. We did not observe CD95 antigens expression on the keratinocytes, also we did not confirm them on the adjacent cells of the tumor. It does not seem then, that this mechanism of the tumor cells development facility plays a role in the cancer development, based on the lichen sclerosis.

For hypothesis about the antigen presentation disorder calls ascertained in this study reduction of HLA-DR molecules in neoplastic epithelium expression. So far, the antigen, responsible for the lichen sclerosis development, the autoimmune response modification and promoting the growth of cancer, is not known. It has been suggested, that it might be the human papillo-

kach niesyntetyzujących ich w normalnych warunkach stwierdzono w wielu różnych dermatozach, m.in. toczniu rumieniowatym, twardzinie, bielactwie, liszaju płaskim, alergicznym kontaktowym zapaleniu skóry, rumieniu guzowatym<sup>(21)</sup>.

Za ekspresję antygenów głównego układu zgodności tkankowej klasy II (HLA-DR) przy skąpej obecności limfocytów B i makrofagów odpowiedzialna jest więc raczej obecność antygenów HLA-DR na keratynocytach i komórkach Langerhansa. Spadek liczby komórek wykazujących ekspresję HLA-DR w liszaju twardzinowym w sąsiedztwie raka może wskazywać na zaburzenia prezentacji antygeny w przypadku transformacji nowotworowej.

Nie jest jednak ostatecznie wyjaśnione, czy cząsteczki HLA klasy II na powierzchni komórek nienależących do układu odpornościowego mogą brać udział w prezentacji antygeny prowadzącej do aktywacji limfocytów T, czy tylko wywołują stan anergii. Ekspresja cząsteczek HLA klasy II przez keratynocyty pod wpływem stymulacji cytokinami sugeruje ich rolę w prezentacji antygeny. Wiadomo, że keratynocyty mogą funkcjonować jako komórki prezentujące antygen, wywołując aktywację limfocytów Th<sup>(22)</sup>. Wiadomo też, że prezentacja antygeny przez keratynocyty może wywoływać także tolerancję limfocytów T wobec prezentowanych antygenów<sup>(23,24)</sup>.

Udowodniono, że prezentowany antygen nie jest sygnałem, który działając samodzielnie, może aktywować limfocyty T. Znaczenie krytyczne dla intensywności aktywacji i rodzaju aktywowanych limfocytów T mają cząsteczki powierzchniowe B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86) występujące na komórkach prezentujących antygen oraz cytokiny wytwarzane przez keratynocyty i komórki Langerhansa. Tolerancja może zatem stanowić efekt braku kostymulacji receptorów CD28 limfocytu przez cząsteczki B7<sup>(25)</sup>. Keratynocyty wykazują jednak ekspresję molekuł BB1, której aktywność kostymulująca może być indukowana<sup>(26)</sup>. Wpływ taki mogą prawdopodobnie wykazywać cytokiny (np. IFN- $\gamma$ )<sup>(27)</sup>.

W naszym badaniu, w przeciwieństwie do Ben-Hura i wsp.<sup>(13)</sup>, nie stwierdziliśmy znaczącej różnicy w ekspresji antygeny CD95 w porównywanych grupach preparatów. Przyczyną tego jest najprawdopodobniej fakt, że limfocyty B wykazujące ekspresję antygeny CD95 gromadzą się głównie w głębszych warstwach podścieliska, natomiast w samym nabłonku, na którym się skupiliśmy, występują sporadycznie.

Obecność cząsteczek Fas w błonie komórki docelowej umożliwia jej lizę przez komórki efektorowe (m.in. limfocyty CD8, limfocyty CD4, komórki NK) po połączeniu się z ligandem dla Fas (FasL) obecnym na błonie komórki efektorowej<sup>(28)</sup>. W warunkach prawidłowych cząsteczki Apo-1/Fas stanowią ważny mechanizm regulacji odpowiedzi autoimmunologicznej, nie dopuszczając m.in. do rozwoju autoreaktywnych limfocytów T. Jednak dzięki pojawieniu się liganda dla Fas na swojej powierzch-



mavirus – HPV. But most of authors did not ascertain the presence of DNA HPV in cases of cancer developing on the base of lichen sclerosus, in contrast to cancer growing on the base of VIN, where such infection is quite frequent<sup>(14,30-33)</sup>.

## CONCLUSIONS

Increase in number of cytotoxic lymphocytes and decrease in expression of HLA-DR particles, which are normally related to presentation of extrinsic antigens to T lymphocytes, might point to a role of immune factor in evolution of lichen sclerosus, and disorder of cellular immune response in squamous cell vulvar cancer development, on the base of lichen sclerosus, facilitation. It seems, that the explanation of lichen sclerosus etiopathogenesis would bring the definition of hypothetic antigen, connected with its growth. Further investigations, concerning the pathogenesis of vulvar squamous cell carcinoma on the base of lichen sclerosus, not connected with VIN, are required.

## BIBLIOGRAPHY: PIŚMIENNICTWO:

- Zaki I., Dalziel K.L., Solomonsz F.A., Stevens A.: The under-reporting of skin disease in association with squamous cell carcinoma of the vulva. *Clin. Exp. Dermatol.* 1996; 21: 334-337.
- Vilmer C., Cavelier-Balloy B., Nogues C. i wsp.: Analysis of alterations adjacent to invasive vulvar carcinoma and their relationship with the associated carcinoma: a study of 67 cases. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 1998; 19: 25-31.
- Carlson J.A., Grabowski R., Chichester P. i wsp.: Comparative immunophenotypic study of lichen sclerosus: epidermotropic CD57+ lymphocytes are numerous – implications for pathogenesis. *Am. J. Dermatopathol.* 2000; 22: 7-16.
- Farrell A.M., Marren P., Dean D., Wojnarowska F.: Lichen sclerosus: evidence that immunological changes occur at all levels of the skin. *Br. J. Dermatol.* 1999; 140: 1087-1092.
- Carli P., Cattaneo A., Pimpinelli N. i wsp.: Immunohistochemical evidence of skin immune system involvement in vulvar lichen sclerosus et atrophicus. *Dermatologica* 1991; 182: 18-22.
- Kagie M.J., Kenter G.G., Tollenaar R.A. i wsp.: p53 protein overexpression, a frequent observation in squamous cell carcinoma of the vulva and in various synchronous vulvar epithelia, has no value as a prognostic parameter. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1997; 16: 124-130.
- Tan S.H., Derrick E., McKee P.H. i wsp.: Altered p53 expression and epidermal cell proliferation is seen in vulval lichen sclerosus. *J. Cutan. Pathol.* 1994; 21: 316-323.
- Kaya G., Augsburg E., Stamenkovic I., Saurat J.H.: Decrease in epidermal CD44 expression as a potential mechanism for abnormal hyaluronate accumulation in superficial dermis in lichen sclerosus et atrophicus. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 115: 1054-1058.
- Gross T., Wagner A., Ugurel S. i wsp.: Identification of TIA-1+ and granzyme B+ cytotoxic T cells in lichen sclerosus et atrophicus. *Dermatology* 2001; 202: 198-202.
- ni komórki nowotworowe nabywają zdolność indukcji apoptozy atakujących je limfocytów T, w których błonie komórkowej obecne jest białko APO-1/Fas. Badania nad rozwojem raka szyjki macicy wykazały, że skierowane przeciwko antygenom nowotworu cytotoksyczne limfocyty T zanikają przed całkowitą eliminacją guza<sup>(29)</sup>. Sugeruje to, że zmiana fenotypu komórek umożliwia ucieczkę nowotworu przed odpowiedzią immunologiczną ustroju. Nie zaobserwowaliśmy ekspresji antygenów CD95 na keratynocytach, nie stwierdzaliśmy ich też na sąsiadujących komórkach raka. Nie wydaje się więc, by ten mechanizm ułatwienia rozwoju nowotworu odgrywał rolę w rozwoju raka na podłożu liszaja twardzinowego. Za przyjęciem hipotezy o zaburzeniu prezentacji antygeny przemawia stwierdzony przez nas spadek ekspresji cząsteczek HLA-DR w nabłonku nowotworowym. Jak dotąd nie jest znany antygen, który miałby odpowiadać za rozwój liszaja twardzinowego, modyfikować odpowiedź immunologiczną w tych przypadkach i promować rozwój nowotworu. Sugerowano, że może nim być wirus brodawczaka ludzkiego (*human papillomavirus*, HPV), niemniej jednak większość badaczy nie stwierdziła obecności DNA HPV w przypadkach raka rozwijającego się na podłożu liszaja twardzinowego (w przeciwieństwie do rozwoju raka na podłożu VIN, gdzie takie zakażenie jest dosyć częste)<sup>(14,30-33)</sup>.

## WNIOSKI

Wzrost liczby limfocytów cytotoksycznych oraz spadek liczby komórek wykazujących ekspresję HLA-DR i związanych z prezentacją antygeny limfocytom T może świadczyć o roli czynnika immunologicznego w historii rozwoju liszaja twardzinowego i zaburzeniach komórkowej odpowiedzi immunologicznej w ułatwianiu rozwoju raka płaskonabłonkowego sromu na podłożu liszaja. Wydaje się, że dla wyjaśnienia etiopatogenezy liszaja twardzinowego istotne byłoby określenie hipotetycznego antygeny związanego z jego rozwojem. Potrzebne są dalsze badania nad mechanizmem rozwoju raka płaskonabłonkowego sromu na podłożu liszaja i niezwiązanego z VIN.

- Scrimin F., Rustja S., Radillo O. i wsp.: Vulvar lichen sclerosus: an immunologic study. *Obstet. Gynecol.* 2000; 95: 147-150.
- Rolfe K.J., Eva L.J., MacLean A.B. i wsp.: Cell cycle proteins as molecular markers of malignant change in vulvar lichen sclerosus. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2001; 11: 113-118.
- Regauer S., Reich O., Beham-Schmid C.: Monoclonal gamma-T-cell receptor rearrangement in vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* 2002; 160: 1035-1045.
- Ben-Hur H., Ashkenazi M., Huszar M. i wsp.: Lymphoid elements and apoptosis-related proteins (Fas, Fas ligand, p53 and bcl-2) in lichen sclerosus and carcinoma of the vulva. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2001; 22: 104-109.

14. Scurry J.P., Vanin K.: Vulvar squamous cell carcinoma and lichen sclerosus. *Australas. J. Dermatol.* 1997; 38 supl. 1: S20-S25.
15. Carlson J.A., Ambros R., Malfetano J. i wsp.: Vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma: a cohort, case control, and investigational study with historical perspective; implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia. *Hum. Pathol.* 1998; 29: 932-948.
16. Meffert J.J., Davis B.M., Grimwood R.E.: Lichen sclerosus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995; 32: 393-416; quiz 417-418.
17. Wilkinson E.J., Friedrich E.G. Jr: Diseases of the vulva. W: Kurman R.J. (red.): *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.* Springer-Verlag, New York 1987.
18. Carlson J.A., Mihm M.C.: Vulvar nevi, lichen sclerosus et atrophicus, and vitiligo. *Arch. Dermatol.* 1997; 133: 1314-1316.
19. Bos J.D., Zonneveld I., Das P.K. i wsp.: The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 88: 569-573.
20. Lukowsky A., Muhe J.M., Sterry W., Audring H.: Detection of expanded T cell clones in skin biopsy samples of patients with lichen sclerosus et atrophicus by T cell receptor-gamma polymerase chain reaction assays. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 115: 254-259.
21. Aubock J., Romani N., Grubauer G., Fritsch P.: HLA-DR expression on keratinocytes is a common feature of diseased skin. *Br. J. Dermatol.* 1986; 114: 465-472.
22. Nickoloff B.J., Mitra R.S., Green J. i wsp.: Accessory cell function of keratinocytes for superantigens. Dependence on lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. *J. Immunol.* 1993; 150: 2148-2159.
23. Cairns B.A., deSerres S., Kilpatrick K. i wsp.: Cultured keratinocyte allografts fail to induce sensitization *in vivo*. *Surgery* 1993; 114: 416-422.
24. Bal V., McIndoe A., Denton G. i wsp.: Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. *Eur. J. Immunol.* 1990; 20: 1893-1897.
25. Harding F.A., McArthur J.G., Gross J.A. i wsp.: CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; 356: 607-609.
26. Fleming T.E., Mirando W.S., Trefzer U. i wsp.: *In situ* expression of a B7-like adhesion molecule on keratinocytes from human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 101: 754-758.
27. Augustin M., Dietrich A., Niedner R. i wsp.: Phorbol-12-myristate-13-acetate-treated human keratinocytes express B7-like molecules that serve a costimulatory role in T-cell activation. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 100: 275-281.
28. Jakóbsiak M., Lasek W.: *Immunologia nowotworów.* W: Jakóbsiak M. (red.): *Immunologia.* PWN, Warszawa 2000: 635.
29. Contreras D.N., Krammer P.H., Potkul R.K. i wsp.: Cervical cancer cells induce apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunother.* 2000; 23: 67-74.
30. Al-Ghamdi A., Freedman D., Miller D. i wsp.: Vulvar squamous cell carcinoma in young women: a clinicopathologic study of 21 cases. *Gynecol. Oncol.* 2002; 84: 94-101.
31. Lerma E., Matias-Guiu X., Lee S.J., Prat J.: Squamous cell carcinoma of the vulva: study of ploidy, HPV, p53, and pRb. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1999; 18: 191-197.
32. Ueda Y., Enomoto T., Miyatake T. i wsp.: Analysis of clonality and HPV infection in benign, hyperplastic, premalignant, and malignant lesions of the vulvar mucosa. *Am. J. Clin. Pathol.* 2004; 122: 266-274.
33. Santos M., Montagut C., Mellado B. i wsp.: Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2004; 23: 206-214.

## NOWOCZESNA CYTOLOGIA

### Cervex-Brush®

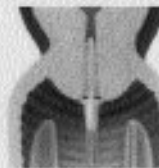


Cervex-Brush  
Bezpieczne pobranie  
materiału ectocercywalnego,  
endocercywalnego i ze strefy  
transformacji

#### Zalety szczoteczki Cervex-Brush®

- ◊ Rozmazy bogatokomórkowe wysokiej jakości
- ◊ Najwyższy odsetek rozmazów nie wymagających ponownego pobrania
- ◊ Najniższy odsetek rozmazów fałszywie ujemnych
- ◊ Łatwość pobierania materiału i oceny
- ◊ Preferowany w standaryzacji badań profilaktycznych na raka szyjki macicy

### EndoCervex-Brush®



EndoCervex-Brush  
Bezpieczne pobranie  
materiału cytologicznego  
z kanału szyjki macicy

#### Zalety szczoteczki EndoCervex-Brush®

- ◊ Przyjazna pacjentce szczoteczka z tworzywa sztucznego bez tradycyjnego drucika w kombinacji z nylonem
- ◊ Dzięki miękkim zakończeniom włosków przyrząd nie powoduje zniszczenia komórek
- ◊ Elastyczna szczoteczka zaopatrzona w specjalną końcówkę zmniejszającą ryzyko uszkodzenia tkanki oraz obrączkę zabezpieczającą przed wniknięciem przyrządu do endometrium

PRODUKT UCZESTNICZY W PROGRAMIE MODELOWEGO SKRYNINGU RAKA SZYJKI MACICY W POLSCE

PRODUKT POWSZECHNIE UŻYWANY W CYTOLOGII KONWENCJONALNEJ I NOWOCZESNEJ METODZIE JEDNOWARSTWOWEGO BADANIA CYTOLOGICZNEGO



**ROVERS POLSKA Sp. z o.o.** 05-500 Piaseczno ul. Świętojańska 9

Tel. [+48 22] 737 11 95 Fax [+48 22] 737 11 96 e-mail: info@rovers.com.pl http://www.rovers.com.pl