

**RAKULISED MUUTUSED LÜMFISÕLMES MELANOOMI METASTAASI
KORRAL**

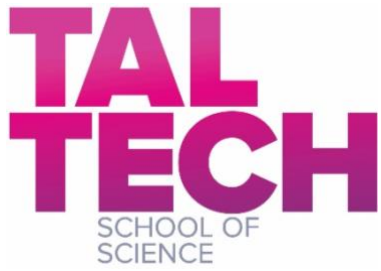
Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Helinda-Eliise Saapar

Juhendaja: Sirje Rüütel Boudinot,
Keemia- ja biotehnoloogia instituut, dotsent

Kaasjuhendaja: Airi Rump,
Keemia- ja biotehnoloogia instituut, doktorant

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia



**CELLULAR CHANGES IN THE LYMPH NODE IN MELANOMA
METASTASIS**

Bachelor thesis

Student: Helinda-Eliise Saapar

Supervisor: Sirje Rütel Boudinot, Associate Professor

Co-supervisor: Airi Rump, PhD student

Study program: Applied Chemistry, Food and Gene Technology

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Helinda-Eliise Saapar
(allkirjastatud digitaalselt)

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Sirje Rüütel Boudinot
(allkirjastatud digitaalselt)

Töö on lubatud kaitsmisele.
Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel
[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Annotatsioon	6
Abstract.....	7
Lühendite loetelu.....	8
Sissejuhatus	9
1. Kirjanduse ülevaade.....	10
1.1. Vähk	10
1.2. Melanoom	10
1.3. Melanogenees	11
1.4. Metastaasid	11
1.5. Sünnimärgid ehk neevused	11
1.6. Riskitegurid	11
1.7. Mutatsioonid	12
1.7.1. BRAF mutatsioon	12
1.7.2. RAS mutatsioon	12
1.7.3. P53 mutatsioon.....	13
1.7.4. PI3K/AKT ja PTEN rada	13
1.8. Diagnoos	13
1.9. Ravi	14
1.10. Immuunsüsteem.....	14
1.11. Immuunsüsteem ja melanoom.....	15
1.12. Lümfisõlmed	15
1.13. Metastaasid	15
1.14. Eosinofiilid.....	16
1.14.1. Eosinofiilide vereloome	16
1.14.2. Eosinofiilid ja melanoom	16
1.15. P2X4	16
1.16. Siglec-8.....	17
2. Töö eesmärk.....	18
3. Materjalid ja meetodid	19
3.1. Inimese lümfisõlmede kogumise eetilised aspektid	19
3.2. Rakkude eraldamine inimese lümfisõlmedest.....	19
3.3. Lümfisõlmest eraldatud rakkude loendamine	19
3.4. Rakkude värvimine ja voolutsütomeetria analüüs	20
3.5. Konfokaalne mikroskoopia ja pildianalüüs	20

3.6.	Kasutatud statistilised meetodid	21
4.	Tulemused.....	22
4.1.	Metastaasita lümfisõlmedes on oluliselt rohkem T-abistajarakke võrreldes metastaasiga lümfisõlmedega	22
4.2.	Metastaasita ja metastaasiga lümfisõlmede võrdlemisel olulist erinevust T-tsütotoksiliste rakkude populatsioonides ei leitud.....	23
4.3.	Metastaasita ja metastaasiga lümfisõlmedes olulisi erinevust NK- ja NK-T-rakkude osas ei leitud	23
4.4.	Metastaasita lümfisõlmedes on oluliselt vähem P2X4 positiivseid eosinofiile võrreldes metastaasiga lümfisõlmedega	25
5.	Arutelu	28
5.1.	Järeldused	30
	Kokkuvõte	31
	Tänuavaldused	32
	Kirjanduse loetelu.....	33

Annotatsioon

Melanoom on melaniini tootvate rakkude pahaloomuline kasvaja, mille vastases võitluses mängivad leukotsüüdid olulist rolli. Hiljutised uuringud on näidanud, et sõltuvalt vähi tüübist võib eosinofiilia patsientidel olla nii hea kui ka halva prognoosi näitaja.

Lõputöö teoreetilises osas keskenduti melanoomi omaduste kirjeldamisele ning selle seosele immuunsüsteemi ja eosinofiilidega. Töö eesmärgiks oli uurida immuunrakkude kompositsiooni ja arvu metastaatilistes lümfisõlmedes melanoomiga patientidel ning võrrelda neid tulemusi ilma metastaasita lümfisõlmedega. Lisaks uuriti P2X4 retseptori ekspressiooni eosinofiilidel normaalsetes lümfisõlmedes ja metastaatilistes lümfisõlmedes. Kasutati läbivoolutsütomeetriat, et määrata erinevate immuunrakkude hulka lümfisõlmedes kaheksal melanoomiga patsiendil.

Uuringus leiti, et metastaatilistes lümfisõlmedes esines oluliselt vähem T-abistajarakke võrreldes ilma metastaasita lümfisõlmedega. Lisaks leiti, et metastaasidega lümfisõlmedes ekspresseerivad eosinofiilid märkimisväärselt rohkem P2X4 retseptorit võrreldes ilma metastaasita lümfisõlmedega.

On oluline hinnata immuunrakkude rolli ja inflammatoorset/regulatoorset suunitlust valvurlümfisõlmes, kuna see annab olulist teavet vähivastase immuunvastuse kohta.

Saab järeldada, et melanoomi metastaasiga lümfisõlmedes esineb muutusi immuunrakkude koostises, sealhulgas vähenenud T-abistajarakkude arv ja suurenenud eosinofiilide osakaal, millel on seos P2X4 retseptori ekspressiooniga. Need tulemused viitavad immuunvastuse aktiveerumisele metastaatilistes lümfisõlmedes melanoomi korral.

Abstract

Melanoma is a malignant tumour of cells that produce the skin pigment melanin. The incidence of melanoma has increased significantly in recent decades. Melanoma has a multifactorial aetiology due to the interaction of genes and environment. The immune system, in particular leukocytes, plays an important role in the fight against melanoma, as tumours are more frequent in immunodeficient organisms.

Activation of the immune system via the purinergic receptor is a key mechanism in the regulation of the immune response and the anti-inflammatory process. Eosinophils are leukocytes whose increased abundance in the blood has been associated with the pathogenesis of asthma, allergic reactions and parasitic diseases. Eosinophilia is rare in healthy individuals but may occur in association with some inflammatory conditions. The role of eosinophils in other infections (Ueki et al., 2016) or tumours has been little studied, although elevated eosinophil counts have been observed in some tumours for more than 100 years (Simon et al., 2020).

Recent studies have shown that, depending on the type of cancer, eosinophilia in patients can have both good and poor prognosis for cancer (Carretero et al., 2015; Minton, 2015). In melanoma (Moreira et al., 2017), colorectal cancer (Prizment et al., 2016), liver and biliary tract cancer (Steel et al., 2010), the number of eosinophils in patients' blood is associated with a good prognosis, but in cervical cancer, for example, eosinophilia is associated with a poor prognosis (Oliveira et al., 2012; van Driel et al., 1996).

The theoretical part of the thesis focused on describing the characteristics of melanoma and its relationship with the immune system and eosinophils. In the experimental part, the amount and changes of T helper cells, T cytotoxic cells, NK and NK-T cells and eosinophils in lymph nodes with and without metastasis were investigated. Flow cytometry was used to determine the amount of these cells in the lymph nodes of eight patients with melanoma. The study found significantly higher P2X4 expression in lymph node eosinophils with metastasis than in lymph nodes without metastasis. In addition, a significantly lower percentage of T helper cells was found in lymph nodes with metastasis compared to lymph nodes without metastasis.

Lühendite loetelu

AKT – proteiinkinaas B (ingl *protein kinase B*)

BRAF – seriin/treoniin proteiinkinaas B-Raf inhibiitor (ingl *serine/threonine protein kinase B-Raf inhibitor*)

CTLA-4 – tsütotoksilise T-lümfotsüüdiga seotud antigeen 4 (ingl *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*)

DNA – desoksüribonukleiinhape (ingl *deoxyribonucleic acid*)

FACS – läbivoolutsütomeetria (ingl *flow cytometry*)

FITC – fluorestseiniisotiotsüanaat (ingl *fluorescein-5-isothiocyanate*)

ICI – immuunkontrollpunkti inhibiitorid (ingl *immune checkpoint inhibitors*)

LN – lümfisõlm (ingl *lymph nodes*)

mAb – monoklonaalne antikeha (ingl *monoclonal antibody*)

MAP-K – mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas (ingl *mitogen-activated protein kinase*)

NF1 – neurofibromiin 1 (ingl *neurofibromin 1*)

NK – loomulikud tapjarakud (ingl *natural killer cells*)

NK-T – loomulikud T-tapjarakud (ingl *natural killer T cells*)

NRAS – neuroblastoomi RAS-viiruse (v-RAS) onkogeeni homoloog (ingl *neuroblastoma ras viral oncogene homolog*)

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (ingl *phosphate-buffered saline*)

PDL1 – programmeeritud rakusurma-ligand 1 (ingl *programmed death-ligand 1*)

PE – fükoerütriin (ingl *phycoerythrin*)

PTEN – fosfataasi ja tensiini homoloog (ingl *phosphatase and tensin homolog*)

Siglec – sialihapet siduvad immunoglobuliini tüüpi lektiinid (ingl *sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*)

SLN – valvurlümfisõlm (ingl *sentinel lymph node*)

TBS – tris-puhverdatud soolalahus (ingl *tris-buffered saline*)

Tc – tsütotoksiline T-rakk (ingl *cytotoxic T cell*)

Th – T-abistajarakk (ingl *T helper cell*)

TME – kasvaja mikrokeskkond (ingl *tumour microenvironment*)

Treg – reguloorne T-rakk (ingl *regulatory T cell*)

UV – ultraviolettkiirgus (ingl *ultraviolet radiation*)

Sissejuhatus

Melanoom on nahapigmenti, melaniini, tootvate rakkude pahaloomuline kasvaja, millesse haigestumine on viimastel aastakümnetel märkimisväärselt suurenenud. Melanoomil on multifaktoriline etioloogia, tulenevalt geenide ja keskkonna koostoimest. Immuunsüsteemil, eriti leukotsüütidel, on melanoomi vastu võitlemisel oluline roll, kuna kasvajaid tekib sagedamini immuunpuudulikes organismides.

Immuunsüsteemi aktiveerimine puriinergilise retseptori kaudu on võtmemehhanism immuunvastuse ja põletikuvastase protsessi reguleerimisel. Eosinofiilid on leukotsüüdid, mille arvukuse tõusu veres on seostatud nii astma patogeneesi, allergiliste reaktsioonide kui ka parasitaarsete haigustega. Eosinofilia on tervetel inimestel haruldane, kuid võib esineda koos mõne põletikulise seisundiga. Eosinofiilide osa muude infektsioonide (Ueki et al., 2016) või kasvajate puhul on vähe uuritud, kuigi kõrgeenenud eosinofiilide arvu on täheldatud mõnede kasvajate puhul juba enam kui 100 aastat tagasi (Simon et al., 2020).

Hiljutised uuringud on näidanud, et olenevalt vähi tüübist võib patsientidel esinev eosinofiilia olla vähi osas nii hea kui halva prognoosiga (Carretero et al., 2015; Minton, 2015). Melanoomi (Moreira et al., 2017), pärasoole vähi (Prizment et al., 2016), maksa ja sapiteede vähi (Steel et al., 2010) puhul on eosinofiilide arv patsientide veres seotud hea prognoosiga, kuid näiteks emakakaela vähi puhul on eosinofiilia seotud halva prognoosiga (Oliveira et al., 2012; van Driel et al., 1996).

Bakalaureusetöö teoreetilises osas keskenduti melanoomi omaduste kirjeldamisele ning selle seosele immuunsüsteemi ja eosinofiilidega. Eksperimentaalses osas uuriti T-abistajarakkude (Th), T-tsütotoksiliste rakkude (Tc), loomulike tapjarakkude (NK) ning loomulike T-tapjarakkude (NK-T) ja eosinofiilide hulka ja muutusi metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmedes. Kasutades läbivoolutsütomeetriat (FACS) määrati nende rakkude kogus lümfisõlmedes kaheksal melanoomiga patsiendil. Töös tuvastati metastaasiga lümfisõlmede eosinofiilidel märkimisväärselt suurem P2X4 ekspressioon kui ilma metastaasita lümfisõlmedes. Lisaks leiti metastaasiga lümfisõlmedes oluliselt väiksem protsentuaalne kogus T-abistajarakke võrreldes metastaasita lümfisõlmeaga.

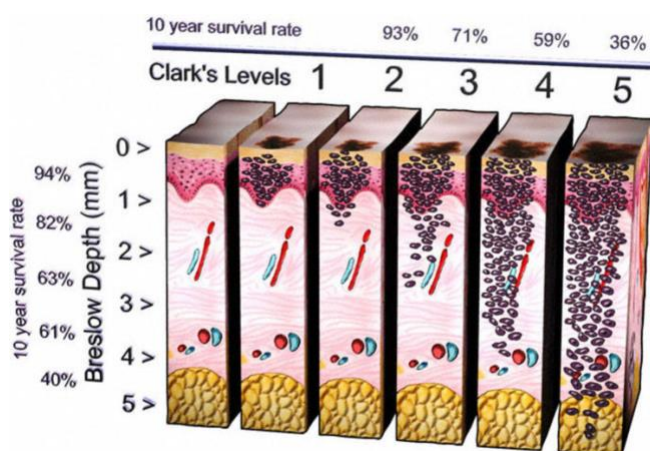
1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Vähk

Vähk on keeruline patoloogiline seisund, mis võib tekkida mitmesuguste geneetiliste ja keskkonnategurite mõjul. See on peamine haigestumuse ja suremuse põhjus kogu maailmas. Vähktõve esinemissagedus ja suremus varieeruvad vanuse, soo, geograafilise asukoha ja sotsiaalmajandusliku staatuse järgi. Suurt rolli mängivad erinevad desoksüribonukleiinhappe (DNA) kahjustused ja mutatsioonid ning on teada, et päikese ultraviolettkiirgus (UV) ja teised kantserogeenid, nagu röntgenikiirgus, tubakas ning akrüülamiidid soodustavad vähirakkude teket. Muude riskitegurite hulka kuuluvad kokkupuude keskkonnasaasteainete ja viirustega, nagu inimese papilloomiviirus, eriti emakakaelavähi tekkel (Sadozai et al., 2017). Iga inimene võib olla selliste vähki tekitavate mutatsioonide kandja, mis võivad elu jooksul kantserogeensete ainetega kokkupuutel avalduda või siis, kui rakkude paljunemist ja rakusurma reguleerivad mehhanismid alt veavad (Aktipis et al., 2015).

1.2. Melanoom

Melanoom on melanotsüütide pahaloomuline kasvaja epidermise basaalkihis. Seda saab jagada mitmeks kliiniliselt ja patoloogiliselt eristatavaks alatüübiks. Kuna melanotsüüdid on neuraalse päritoluga ehk pärinevad närviharja rakkudest (Vandamme & Berx, 2019), ekspresseerivad nad ka pärast pahaloomuliseks muundumist metastaasi teket soodustavaid signaalmolekule ning soodustavad seega edasist migratsiooni. Melanoom moodustab maailmas ligi 2% kõikidest vähidiagnoosidest ning üle 80% nahavähi põhjustatud surmadest. Melanoomi esinemissagedus kasvab peamiselt arenenud, heledama nahatooniga elanikega riikides, enamasti meeste seas. 10%-l haigestunudel võib seda seostada geneetiliste muutustega, milles mängib suurt rolli UV-kiirgus (Saginala et al., 2021). Melanoom kuulub kõige suurema mutatsioonikoormusega kasvajate hulka. Nad toodavad mitmesuguseid kasvajate antigeene ja arendavad kiiresti välja mehhanisme organismi immuunvastuse vältimiseks. Melanoomi on teoreetiliselt võimalik varakult tuvastada, kuid praktikas diagnoositakse seda sageli liiga hilja. Selle õigeaegne avastamine on otsustava tähtsusega, sest prognoos ja ravi sõltub selle sügavusest nahas (Joonis 1) (Curti & Faries, 2021). Melanoomi liigitatakse kolde sügavuse põhjal. Selle kiire diagnoosimine ja ravi määramine võivad oluliselt parandada patsiendi elulemust ning võimalusi taastumiseks (Davis et al., 2019).



Joonis 1. Clarki tasemete ja Breslow' sügavuse skemaatiline visualiseerimine. Mõlemad näitavad melanotsüüte naha erinevates kihtides, sõltuvalt kasvaja kasvamise staadiumist. (Angelotti, s.a.)

1.3. Melanogenees

Melanogenees on melaniini tootmise protsess, mis on inimese naha pigmentatsiooni peamine põhjus. Pruunid ja mustad melaniinipigmendid kaitsevad inimese nahka kahjuliku UV-kiirguse eest ning annavad nahale ja juustele värvuse. Melaniinipigmente toodetakse melanotsüütides, mis asuvad epidermise basaalkihis ning juuksefollikulite maatriksis ja ulatuvad sealt epidermise pealmistesse kihtidesse. Küpsed melanosoomid kantakse melanotsüütidest üle kõrvalolevatele keratinotsüütidele, mis moodustavad inimese naha rakkude põhiosa. Melanosoomid ladestuvad ning muudavad naha tumedamaks. Imetajate keha toodab kahte tüüpi melaniini. Nendeks on lahustumatu must eumelaniin ja lahustuv kollakas-punane feomelaniin. Inimeste nahk sisaldab nende kahe segu ning seetõttu on nahavärv nende kahe kogusest ja omavahelisest suhtest (Ohbayashi & Fukuda, 2020).

1.4. Metastaasid

Metastaas kujutab endast mitmeastmelist protsessi, mis algab kasvajakrakkude väljumisega primaarsest kasvajakoldest ning lõpeb sekundaarsete kasvajakogumike koloniseerimisega kaugemates paikades. Nende etappide käigus tungivad vähirakud lähedalasuvatesse kudedesse, sageli ka vereringesse või lümfisüsteemi. Mitogeenne juhtmutatsioon on tavaliselt vähktõve tekke esimene samm, mis stimuleerib normaalset rakku paljunema. Edasist paljunemist soodustavad vähirakkude enda poolt toodetud kasvufaktorid, nagu näiteks vaskulaarne endoteeli kasvufaktor ja transformeeriv kasvufaktor-beeta, mis aitavad kaasa veresoonte kasvule ehk angiogeneesile. Vähi kasvu ja leviku seisukohalt on see protsess kriitilise tähtsusega. Kuna kasvajakud levivad ja arenevad kiiresti, vajavad nad pidevat toitainete ja hapnikuga varustamist, mida veresoone pakuvad. Angiogeneesi soodustavaid kasvufaktoreid tootes võivad kasvajakud luua veresoonte võrgustiku, mis varustab kasvajat metastaseerumiseks vajalike toitainetega (Majidpoor & Mortezaee, 2021).

1.5. Sünnimärgid ehk neevused

Melanotsüütidest põhjustatud vähkkasvajate esinemissagedus kasvab üldiselt koos vanusega. Sünnimärkide ehk neevuserakkude kuju ja välimus muutuvad samuti vananedes ning nende mitteproliferatiivsed melanotsüüdid näitavad rakkude vananemise märke. Huvitaval kombel on kolmandik melanoomidest pärit just neevuserakkudest (Eckhart et al., 2019). Neevused on tavaliselt lamedad või veidi kõrgenenud ning tavaliselt sfäärilise kuju ja ühtlase värvusega. Need paiknevad kas täielikult epidermise sees (junktsionaalne), nii epidermise kui dermise sees (liitunud) või täielikult dermise sees (intradermiline). Osad geneetilised ja keskkonnast tulenevad riskitegurid võivad põhjustada olemasolevate neevuste suurenemist või nende juurde tekkimist. Suurt rolli mängib UV-kiirgus, eriti perioodiline, mis suurendab neevuste hulka kehal. See omakorda aga suurendab melanoomi tekkimise riski (Yeh, 2020).

1.6. Riskitegurid

Nahamelanoomi iseloomustab suur heterogeensus, mis teeb sellest väga keerulise ja raske haiguse. Sellel on multifaktoriline etioloogia, mis tuleneb geenide ja keskkonna vahelisest koostoimest. UV-kiirgusega kokkupuutel tekivad DNA mutatsioonid, mis pikapeale tekitavad vähki (Coricovac et al., 2018). UVB-kiirgust (lainepikkus 280-320 nm) peetakse lausa 1000 korda genotoksilisemaks kui UVA-kiirgust (lainepikkusel 320-400 nm), olenemata tegelikult suuremast kokkupuutest just UVA-ga. Üldjuhul kuuluvad muteerivate valkude hulka mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasi (MAP-K) liikmed, mis on vastutavad rakkude diferentseerumise ja kasvu eest. Seriin/treoniini proteiinkinaasi

B-RAF inhibiitori (BRAF) mutatsioonid esinevad sagedamini noortel patsientidel, kellel on väiksem kokkupuude päikesekiirgusega ning enamasti esineb pindmine melanoom. Lisaks võib UVB põhjustada T- ja NK-rakkude mitteaktiveerumist ning oluliselt vähendada Langerhansi rakkude hulka kehas (Saginala et al., 2021). Feomelaniini tootmisega kaasneb ka kantserogeenide tootmine ja on leitud, et mida suurem hulk feomelaniini on kehas, seda suurem on ka UV-kiirguse mõjul tekkivate DNA kahjustuste hulk. Melanoomi risk on ka tihedalt seotud juuste- ja nahatooniga. Suurem risk haigestuda on heledama naha ja näiteks punaste või blondide juustega inimestel. Kõik melanoomi variandid ei ole samasuguse mutatsioonisagedusega, kuid enamasti esineb korduvaid somaatilisi mutatsioone, mis esinevad kõikides melanoomitüüpides. Juhtivad melanoomimutatsioonid on enamasti signaaliradades, mis reguleerivad proliferatsiooni (BRAF, neuroblastoomi RAS-viiruse (v-RAS) onkogeeni homolog (NRAS)), ainevahetust ja kasvu (fosfataasi ja tensiini homolog (PTEN)) ning resistentsust apoptoosile (TP53) (Davis et al., 2019).

1.7. Mutatsioonid

Nagu vähkkasvajate puhul tavaliselt täheldatakse, on melanoomi puhul peamised mutatsioonid näiteks BRAF, KIT, NF, NRAS ja PTEN geenides. Üldjuhul mõjutavad need geene, mis kodeerivad BRAF-i või NRAS-i ja põhjustavad MAP-K raja aktiveerimise. See lõppeb rakkude suurenenud proliferatsiooni, migratsiooni ja ellujäämisega (Ito et al., 2021).

1.7.1. BRAF mutatsioon

Enamikul melanoomiga patsientidest esineb BRAF-mutatsioon, sest see tekib melanoomi arengu varases staadiumis ja toimib juhtgeeni mutatsioonina. BRAF-i mutatsioonilist aktiveerumist on melanoomi puhul täheldatud suure sagedusega, umbes 50%-l juhtudest. Mitmete BRAF-mutatsioonitüüpide hulgas moodustab BRAF V600E (Valiini (V) asendamine glutamiinhappega (E) aminohappe positsioonis 600) mutatsioon üle 90%, millele järgnevad teised vähem levinud mutatsioonid (V600K, V600D, V600R). Need mutatsioonid aktiveerivad MAP-K rada, käivitades edasi rakkude ebakorrektselt kontrollimatut proliferatsiooni, inhibeerides apoptoosi ja soodustades lõpuks kasvaja progresseerumist (Ito et al., 2021). BRAF mutatsioon esineb tavaliselt noorematel patsientidel ja seda iseloomustab pindmiselt leviv või nodulaarne kasvaja piirkondades, kus ei ole kroonilist päikesekiirgust. Võrreldes selle mutatsiooniga melanoomi ilma BRAF mutatsioonita melanoomiga, on sellel suurem tõenäosus metastaseeruda ajju, põhjustades ka lühemat elulemust (Patel et al., 2020).

1.7.2. RAS mutatsioon

RAS on veel üks oluline geen, mis mängib rolli melanoomi arengus. Melanoomi puhul on kõige levinum KRAS-mutatsioon, mis põhjustab geeni aktiivseks jäämist. KRASi mutatsioonid on teadaolevalt kolme kõige surmavama vähi (kopsuvähk, kolorektaalvähk ja kõhunäärmevähk) põhjustajad. Muude molekulide mutatsioonid, näiteks neurofibromiin 1 (NF1) funktsiooni kadumise muutused võivad samuti põhjustada RASi ülestimuleerimist. Melanoomidel, kus NF1 on muutunud, on sageli funktsioonikaotuse mutatsioon, mis takistab neurofibromiini inaktiveerimist RAS-i ja soodustab selle asemel RAF-i ja selle allavoolu sihtmärkide stimuleerimist. See MAP-K raja stimuleerimine aktiveerib rakkude proliferatsiooni ja ellujäämisradu, mis lõpuks viib RAS raja funktsiooni kadumiseni (Moore et al., 2020).

1.7.3. P53 mutatsioon

p53 peetakse organismis kasvajasupressoriks, kuna ta roll on rakkude paljunemise piiramine, rakutsükli peatamine, DNA parandamine ja apoptoosi esilekutsumine rikutud genoomi korral (Hsieh & Shen, 2019). Melanoomi puhul on p53 geen harva muteerunud, vaid ~20%-l juhtudest ning hiljutised andmed näitavad, et kui p53 mutatsioonid esinevad, ei ole need seotud teiste levinud mutatsioonidega (BRAF, RAS, NF1). Siiski säilitab üle 80% melanoomi kasvajatest p53 mutatsiooni organismis inaktiveerituna (Webster et al., 2020). Normaalse või suure hulga p53 valgu ekspressioon melanoomirakkudes on üllatav, arvestades, et melanoomirakud on väga resistentsed apoptoosile ja see näitab, et melanoomi puhul on p53 rada talitlushäirega. Hiljuti on näidatud, et p53 on vajalik interferooni poolt indutseeritud programmeeritud rakusurma-ligand 1 (PDL1) jaoks, mis muudab selle pahaloomulise haiguse vastuvõtlikuks ravile immuunkontrollpunkti inhibiitoritega (ICI) (Thiem et al., 2019).

1.7.4. PI3K/AKT ja PTEN rada

PI3K (fosfatidüülinoositol-3-kinase)/AKT rada on melanoomi puhul sageli aktiivne PTEN kasvajasupressorgeeni muutuste või AKT aktiveerumise tõttu. Seriin/treoniinkinaas AKT/proteiinkinaas B on selle raja oluline komponent ja see aktiveerub Ser473/474 ja Thr308/309 fosforüleerimise teel. AKT aktiveerumist on täheldatud 60%-l melanoomidest.

PTEN kodeerib fosfataasi, mis reguleerib lipiidide fosfatidüülinoositol-3,4,5-trifosfaadi (PIP3) taset rakkudes. PTENi funktsiooni kadumine vähirakkudes viib AKT aktiivsuse suurenemiseni ja apoptoosi vähenemiseni. Funktsionaalse PTEN-geeni kadumist täheldatakse 10-35%-l melanoomi juhtudest ja see on üks levinumaid BRAF-inhibiitorite vastase resistentsuse põhjuseid (Czarnecka et al., 2020).

1.8. Diagnoos

Melanoomi on teoreetiliselt võimalik varakult tuvastada, kuid praktikas diagnoositakse see sageli juba liiga hilja. Traditsiooniline melanoomi diagnoosimine algab tavaliselt patsiendi visuaalse vaatlusega. Hiljem võivad sellele vajadusel järgneda biopsia ja histopatoloogiline hindamine. Visuaalne kontroll põhineb ABCDE-kriteeriumitel, mis tähistavad struktuurilist asümmeetriat (A), piiride ebakorrapärasust (B), värvi muutusi (C), üle 6 mm läbimõõtu (D) ja ajas toimuvaid muutusi, st evolutsiooni (E). Kuna tegemist on aga kahjustuse subjektiivse hindamisega, mis suuresti sõltub arsti kogemusest, siis pea kolmandik melanoomidest jääb silmaga vaadates siiski tähelepanuta. Tavaliselt jäävad märkamata varajases staadiumis melanoomid, sest need on sageli väikesed ning neil puuduvad tüüpilised tunnused. Melanoomi hindamiseks kasutatakse ka dermoskoopiat, mis on kõige levinum mitteinvasiivne pildistamismeetod. On näidatud, et selle kasutamine suurendab pahaloomulise melanoomi tuvastamise täpsust 49% võrreldes palja silmaga vaatamisega. Võimalusel välditakse patsientidelt biopsiate võtmist ning kirurgilist lähenemist. Üha rohkem on ka kasutusele võetud tehisintellekti poolt automatiseeritud dermoskoopilist hindamist, mis on osutunud vägagi tõhusaks. Kahjuks ei suuda veel dermoskoopia siiski täielikult histopatoloogiat asendada, kuna selle jaoks ei ole kättesaadavad vertikaalsed koelõigud (Meng et al., 2021).



Joonis 2. ABCDE kriteeriumite järgi määratud melanoom: Melanoom on asümmeetriline "A", tal on ebakorrapärsed piirid "B", ta on värvivariatsiooniga, mis ulatub pruunist kuni mustani ja sisaldab vihjet sinisele "C", tema läbimõõt on üle 6 mm "D" ja ta areneb aja jooksul "E". Foto: Dr. Marina Terase isiklik kollektsioon, PERH, Tallinn, Eesti.

1.9. Ravi

Olenevalt melanoomi asukohast ja staadiumist on palju erinevaid ravivõimalusi, sealhulgas kirurgia, keemiaravi, immunoteeraapia ja kiiritusravi. Enam kui 90%-l patsientidest on esmaseks raviks lokaalne kirurgiline melanoomi eemaldamine. Praegused kirurgilised meetodid on vähem invasiivsed ja tulemused on väiksema suremusprotsendiga, seega on see väga tõhus ja täpne meetod (Curti & Faries, 2021). Metastaatilise haigusega patsientidel ei piisa ainult kirurgilisest ravist ning kasutatakse lisaks ka keemiaravi. See aga on organismile väga kurnav ning toksiline, seega on melanoomi varajane dignoosimine patsientidele prognoosi panemiseks hädavajalik. Keemiaravi asemel on hakatud kasutama näiteks immunoteeraapiat ja rohkem sihipäraseid ravimeid, mis ei ole inimesele nii mürgised. Siiani kõige edukamad ravimeetodid metastaatilise melanoomi puhul on ICI, mis on kasutusel alates 2011. aastast. Anti-PD-1, anti-PD-L1/2 ja tsütotoksiliste T-lümfotsüütidega seotud antigeeni 4 (CTLA-4) antikehadega ravi blokeerib vastavate ligandidega seondumise ja signaali, mis põhjustab tolerantsust. See võimaldab esile kutsuda normaalse immuunvastuse. Kuigi sellised inhibiitorid on paljulubavad, ei reageeri suur hulk patsiente nendele ravimitele või neil tekib hoopis sekundaarne resistentsus. Samuti on ravimitel paratamatult tõsiseid kõrvaltoimeid, mida osad patsiendid ei talu ning ravi tuleb lõpetada (Davis et al., 2019).

1.10. Immuunsüsteem

Inimese immuunsüsteem on vastutav iseenda ja kõige võõra eristamise eest, kaitstes seeläbi organismi eksogeense ja endogeense päritoluga haiguste eest. Immuunsüsteem koosneb valgetest vererakkudest ning lümfisüsteemi organitest ja kudedest, sealhulgas tüümus, põrn, mandlid, lümfisõlmed, lümfisooned ja luuüdi, ning tuvastab arvukaid ohte ja kõrvaldab need homöostaasi hoidmiseks. Immuunsüsteem jaguneb üldiselt kahte ossa, kaasasündinud ja omandatud ehk adaptiivne immuunsüsteem, mis koos teostavad immuunsüsteemi järelevalvet. Kaasasündinud immuunsus on alati olemas ja koheselt valmis haigustekitajaid või mürke kahjutuks muutma. See koosneb füüsilistest ja füsioloogilistest barjääridest ning fagotsüütidest, mis on organismi esimene kaitseliin. Adaptatiivne ehk omandatud immuunsus on spetsiifiline, suudab kohaneda erinevate stiimulitega ja areneb aja jooksul ning põhineb B- ja T-rakkudel. B-lümfotsüütide peamine ülesanne

on toota antikehi, samas kui Th-rakkude peamine ülesanne on toota tsütokiine ja Tc-rakkude ülesanne on vahendada tsütotoksilisust vastuseks infektsioonidele või muudele antigeensetele stimulatsioonidele. Teatud tsütokiinide tootmisega, mis kas stimuleerivad või pärsvivad Tc- ja/või B-rakke, kontrollivad Th-rakud immuunvastuse olemust ja kulgu. Th-rakkude poolt toodetud tsütokiinid stimuleerivad ka B-rakke, aidates kaasa õige antikeha isotüübi tootmisele (Abbott & Ustoyev, 2019).

1.11. Immuunsüsteem ja melanoom

Pahaloomulised vähirakud kasutavad mitmeid mehhanisme (immunosupressiooni, geneetilisi mutatsioone), et vältida immuunsüsteemi rünnakut. Üks selline mehhanism on võime ekspresseerida vähirakkude pinnal immuunsüsteemi kontrollpunktimolekule, mida leidub normaalsetel rakkudel. Selle tulemusena pärsvivad nad T-rakkude toimimist immuunsüsteemi kontrollpunktides ja suudavad seeläbi vältida immuunsüsteemi rünnakut (Abbott & Ustoyev, 2019).

Vähirakud kaitsevad end immuunsüsteemi rünnakute eest ekspresseerides nii programmeeritud surma (PD) retseptorit PD1 kui ka selle ligande PDL1 ja PDL2. Kasutades neid (või ka teisi) supressiooniretseptoreid võivad vähirakud immuunrakke täiesti välja lülitada. Supressioonisignaale vahendatavate retseptorite vastased antikehad käivitavad taas vähivastase immuunsuse. Kuna need ravimid on väga kallid ja ei anna kõigil patsientidel soovitud efekti, on vajalik eelnevalt leida markerid, mis aitaksid ravimi sobivust antud patsientidele hinnata. Melanoomi rakud ekspresseerivad nii PD1 retseptorit kui ka selle ligandi PDL1 (Kleffel et al., 2015). Kuna inimese eosinofiilid ekspresseerivad ka surmaretseptorit, PD-1 ja selle ligand PD-L1 (Pesce et al., 2017) ja samas on neil endil ka võime melanoomi rakke hävitada, tuleks edasiste uuringutega täpsemalt tuvastada, kuidas PD1 vastane ravi eosinofiile mõjutab.

Melanoomirakkude teistesse kudedesse levimise tõenäosust ja immuunrakkude tõhusust seostatakse kasvaja mikrokeskkonna (TME) rakkudega. TME ei ole püsiv ja efektiivne kasvjavastane immunoteraapia sõltub tugevast adaptiivsest immuunsusest (Tucci et al., 2019).

1.12. Lümfisõlmed

Lümfisüsteemi peamine ülesanne on säilitada keha vedelikutasakaalu, tagastades liigset vedelikku ringlusse. Lisaks sellele on lümfisüsteem ka immuunsüsteemi rakkudele kanaliks, et aktiveerida adaptiivne immuunsüsteem. Lümfisüsteemi läbivat vedelikku nimetatakse lümfiks ja see voolab kapillaaride, arterite, lümfisõlmede (LN), lümfisoonte ja kanalite võrgustikus. Kõik lümfisooned koonduvad lümfisoonte tüvedeks pärast vähemalt ühe LN läbimist. Seejärel koguvad lümfikanalid lümfi ja suunavad selle tagasi vereringesse (Suami & Scaglioni, 2018). LN-d on strateegiliselt paigutatud organid, et soodustada immuunvastust patogeenide vastu, tagades naiivsete B- ja T-lümfotsüütide kokkupuutumise nii üksteisega kui ka antigeeni esitavate rakkudega (Gago da Graça et al., 2021).

1.13. Metastaasid

Melanoom on ainulaadne kasvaja, kuna võib anda metastaase kõikidesse võimalikesse kudedesse ja kehapiirkondadesse. Kuigi piirkondlikud lümfisõlmed on esimene koht, kus melanoomi metastaasid ilmnevad, võivad sekundaarsed kohad olla tüüpiliselt nahaalune pehme kude, kopsud, aju, luud, süda, põrn, sapipõis jne (Zbytek et al., 2008). Sellise paiknemisega metastaaside diagnoosimine on keerukas ning nõuab kliiniliselt ja radioloogiliselt kalleid meetodeid, nagu kogu

keha positronemissioontomograafia või muud sarnased skaneeringud. Seetõttu on eriti oluline melanoom varakult avastada ja eemaldada enne, kui kasvaja on sügavale nahka migreerunud. Kui melanoomi algkolle on kirurgiliselt eemaldatud on oluliselt väiksem risk lokaalseks taaskasvamiseks või metastaaside tekkeks (Teras, 2020).

1.14. Eosinofiilid

1.14.1. Eosinofiilide vereloome

Eosinofiilid on suhteliselt lühiealised rakud, mis peale luuüdis valmimist ringlevad veres ja seejärel migreeruvad tagasi luuüdise, maksa või põrna, kus nad eemaldatakse. Põletikulistesse kudedesse ja vähikolletesse migratsiooniks vajaliku kompetentsi omandavad eosinofiilid paljude kemokiinide signaalide peale (eotaxin-1/CCL11, eotaxin-2/CCL24, eotaxin-3/CCL26 ja RANTES), mis aktiveerivad eosinofiilide pinnal CCR3 retseptori. Vähi mikrokeskkonnas ja põletikukoldes pikeneb eosinofiilide eluiga oluliselt (Varricchi et al., 2018).

1.14.2. Eosinofiilid ja melanoom

Carretero et al. on näidanud, et aktiveeritud eosinofiilid osalevad melanoomi äratõuke reaktsioonis CCL5, CXCL9 ja CXCL10 tootmise kaudu, mis on Tc-lümfotsüütide võimsad kemoatraktandid. Lisaks toodavad kasvajate keskkonnas asuvad eosinofiilid suures koguses TNF-i, CCL5 ja indutseeritavat lämmastikoksiidi süntaasi. Seega on eosinofiilid ja nende poolt toodetud tsütokiinid tugevalt seotud Tc-rakkude värbamisega kasvaja keskkonda, soodustades kasvaja äratõukereaktsiooni. Eosinofiilide arvu kunstlik vähenemine pidurdab CD8+ tsütotoksiliste T-lümfotsüütide migratsiooni kasvaja keskkonda (Minton, 2015).

Kasvajaga seotud makrofaagid ekspresseerivad normoksilistes kasvajakudedes M1-markereid, samas kui hüpoksilistes kudedes ekspresseerivad M2-markereid (Movahedi et al., 2010). Hiljuti on välja pakutud sarnane eosinofiilide alampopulatsioon, mis ekspresseerivad vastavalt Th1 või Th2 tsütokiini (Lingblom et al., 2017). Nende eosinofiilide kasvaja suhtes pro- või anti-tuumorigeenne roll on tõenäoliselt vähispetsiifiline ja võib erinevat tüüpi kasvajate puhul olla isegi vastupidine. Seepärast on oluline uurida eosinofiilide PD-1/PD-L1 telje rolli kasvaja mikrokeskkonnas ja P2X4 ekspressiooni osa eosinofiilide pro- või anti tuumorigeensuses.

1.15. P2X4

P2X4 on puriinergilise retseptori tüüp, mis osaleb rakusignalisatsioonis rakuvälise adenosinotriposfaadi sidumise kaudu. P2X4 retseptorid on rakumembraanide valgud, mis ekspresseeruvad peamiselt immuunrakkudel, nagu makrofaagid, mikroglia ja T-rakud, sealhulgas ka eosinofiilides. P2X4 retseptoritel on oluline roll mitmesugustes immuunvastustes, sealhulgas immuunsüsteemi aktiveerimises ja põletikureaktsioonide reguleerimises. P2X4 retseptorite aktiveerimine adenosinotriposfaadi abil võib vallandada põletikupõhiste tsütokiinide, nagu interleukiin-1 β ja tuumornekroosifaktor-alfa, vabanemise, mis viib põletiku tekkeni. P2X4 retseptorid võivad mõjutada ka immuunrakkude migratsiooni, fagotsütoosi ja antigeeni esitlusvõimet, reguleerides seeläbi immuunvastust.

Lisaks on P2X4 retseptorid seotud erinevate patoloogiliste seisunditega, sealhulgas neuroinflammatsiooni, autoimmuunhaiguste ja vähiga. P2X4 retseptorid on seotud kasvajate kasvu ja metastaaside tekkimise reguleerimisega teatud tüüpi vähktõvede puhul. Melanoomi korral on

eosinofiilide P2X4 retseptorite ekspresseerimine suurenenud, mis võib viidata nende rakkude rollile melanoomivastases immuunvastuses.

P2X4 retseptori aktiivsuse moduleerimist võiks potentsiaalselt kasutada immuunvastuse ja põletiku reguleerimiseks, mis muudab selle paljulubavaks ravimite arendamise sihtmärgiks immunoteraapia valdkonnas (Antonioli et al., 2019).

Inimestel ja hiirtel ekspresseerivad P2X4 retseptorit ka monotsüüdid ja neutrofiilid ning vähesel määral ka B-lümfotsüüdid. Põletik on vähi arengu ja kasvajakavastase immuunsuse jaoks kriitiline. P2X4 retseptorid on üles reguleeritud ka kasvajaga seotud makrofaagides hüpoksia tingimustes. Lisaks võib P2X4 olla oluline ka selle kõrge ekspressiooni tõttu eosinofiilides (Paalme et al., 2019).

1.16. Siglec-8

Siglekid (sialihapet siduvad immunoglobuliini tüüpi lektiinid) on ühe läbipääsuga rakupinna retseptorid, millel on immuunrakke pärssiv toime. Neist Siglec-8 ekspresseerub selektiivselt inimese nuumrakkudel ja eosinofiilidel ning vähesel määral basofiilidel, mis on allergilistes ja põletikulistes reaktsioonides osalevad immuunsüsteemi rakkude tüübid. Need mängivad rolli immuunvastuse reguleerimisel ja osalevad erinevates füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides, vabastades mediaatoreid, mis meelitavad ligi või aktiveerivad teisi rakke. Siglec-8 osaleb ka rakkude adhesiivsuse, migratsiooni ja ellujäämise reguleerimises, mis on olulised immuunrakkude liikumisel ja koepõletikul. On leitud, et Siglec-8 sidumine monoklonaalsete antikehadega (mAb) või selektiivsete polüvalentsete sialoglükaanide ligandidega indutseerib eosinofiilide rakusurma ja inhibeerib nuumrakkude degranulatsiooni (Youngblood et al., 2021).

2. Töö eesmärk

Töö eesmärkideks on

1. iseloomustada lümfisõlmedes toimuvaid abistaja- ja tsütotoksiliste T-rakkude, NK- ja NK-T-rakkude ning eosinofiilide populatsioonide muutusi melanoomi metastaasi esinemise korral kasutades läbivoolutsütomeetriat.
2. võrrelda P2X4 ekspressiooni melanoomi metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmede eosinofiilidel, kasutades läbivoolutsütomeetriat ja konfokaalmikroskoopia analüüsi.

3. Materjalid ja meetodid

3.1. Inimese lümfisõlmede kogumise eetilised aspektid

Kliinilised andmed koguti Põhja-Eesti Regionaalhaiglas dr Teras poolt melanoomiga patsientidelt, kellel alustati tavapärasest ravi. Koguti kasvaja- ja vereproovid. Patsientide andmed on toodud Tabelis 1. Patsiente teavitati personaalselt projekti eesmärkidest regulaarse arstivisiidi ajal. Patsientide teavitamine toimus nii suuliselt kui ka kirjalikult, kooskõlastatult Tallinna Meditsiiniuuringute Eetikakomiteega (litsents nr 2855, väljastatud TTÜ Sirje Rüütel Boudinot 07/05/2019). Kui patsient otsustas uuringus osaleda, allkirjastas ta teadliku nõusoleku vormi. Nõusolekuleht sisaldas teavet uuringu eesmärkide, ülesehituse ja kavandatud protseduuride kohta. Samuti kaasnevate riskide ning isikuandmete kaitseks tehtavate meetmete kohta. Arstid säilitavad isikuandmeid ametlike suuniste kohaselt haiguslugude osana.

Tabel 1. Patsientide isikustamata andmed.

Patsient	Sugu	Sünniaasta	MTS operatsiooni aeg	Algkolde suurus (Breslow, mm)	Algkolde eemaldamine
1	Naine	1961	17.01.2022	40	17.01.2022
2	Mees	1950	08.03.2022	12	24.01.2022
3	Mees	1967	28.03.2022	1,4	01.03.2022
4	Mees	1963	09.05.2022	3,8	23.03.2022
5	Naine	1981	30.05.2022	-	2011
6	Naine	1937	03.06.2022	9	27.08.2022
7	Mees	1976	05.07.2022	13	11.05.2022
8	Naine	1964	06.07.2022	7	13.04.2022

3.2. Rakkude eraldamine inimese lümfisõlmedest

Fosfaadiga puhverdatud soolalahuses (PBS) ja +4 kraadi juures hoitud lümfisõlmed toodi PERHist TTÜ immunoloogia laborisse 2 kuni 3 tundi peale nende kirurgilist eemaldamist. Lümfisõlm tõsteti PBSist välja aseptilisi meetodeid kasutades pintsettide abil Petri tassile ja lisati 3-5 ml steriilset PBS-i. Seejärel asetati rakufilter Petri tassile ja lümfisõlm tõsteti ettevaatlikult rakufiltrisse. Kasutades süstla kolvi, purustati lümfisõlm läbi filtri ringjate liigutustega. Kui kude oli täielikult purustatud ja läbi filtri pressitud, pesti rakufilter üle väikese koguse PBS-iga, et saada võimalikult palju rakke, ja seejärel resuspendeeriti rakkude ja PBS-i suspensioon Petri tassil mitu korda üherakulise suspensiooni saamiseks. Seejärel kanti rakususpensioon 15 ml tuubi ja maht tasakaalustati 10 ml-ni. Tuubi tsentrifuugiti 10 minutit kiirusel 1100 p/min. Seejärel eemaldati supernatant, jättes rakusademe tuubi põhja. Rakud resuspendeeriti 2 ml PBS-s. Sama protseduuri järgiti iga lümfisõlme puhul.

3.3. Lümfisõlmest eraldatud rakkude loendamine

U-kujulise põhjaga 96 süvendiga mikrotestiplaadi kahte süvendisse lisati 90 µl Trypan Blue 0,025% lahust. Seejärel lisati esimesse süvendisse trüpaansinisega 10 µl rakususpensiooni ja segati värvainega suspendeerimise teel. Esimene süvend sisaldas nüüd 10 korda lahjendatud lahust. Seejärel võeti esimesest süvendist 10 µl ja segati teise süvendi värviga, mis lahjendas seda veel 10 korda. Pärast värviga lahjendamist loendati rakud Bürkeri kambris. Kõigepealt pandi kokku Bürkeri kamber: loendusala peale asetati kattedklaas. Seejärel täideti Bürkeri kamber 10 µl rakuproovi 100 korda lahjendatud seguga. Elusrakud (heledad rakud) loendati mikroskoobi all (3 erinevas ruudus,

millel ei olnud samad äärised) ja arvutati rakkude kogus 1 ml-s. Sama protseduuri korrati kõikidest lümfisõlmedest eraldatud rakkudega.

3.4. Rakkude värvimine ja voolutsütomeetria analüüs

Lümfisõlme rakud jaotati eppendorfi tuubidesse, nii et 1 tuub sisaldas 1 miljonit raku ja oli mõeldud värvimiseks ühe antikehade paariga. Seejärel lisati igasse tuubi antikeha lahus ja PBS, nii et lõplik ruumala oleks 50 µl. Rakud resuspendeeriti ja inkubeeriti üks tund pimedas. Pärast inkubeerimist tsentrifugeeriti värvitud rakke kiirusel 4000 p/min 5 minutit ja supernatant eemaldati. Eppendorfi tuubidesse jäänud rakud resuspendeeriti 400 µl PBS-is ja viidi FACS analüüsi jaoks spetsiaalsetesse tuubidesse.

Rakud värviti inimese retseptorite vastaste FITC (fluorestseiniisotiotsüanaat) või PE (fükoerütriin) konjugeeritud antikehadega ühe tunni jooksul toatemperatuuril. Kasutati järgmisi antikehi: anti-h(human)CD4-FITC, anti-hCD8-PE, anti-hCD3-FITC, anti-hCD45-FITC, anti-hsiglec-8-PE, anti-hCD56-PE, anti-hP2X4-FITC.

Th-rakkude tuvastamiseks kasutati markerit CD4-FITC (Biolegend, USA) ja CD3-PE (BD Biosciences, USA). Tc-rakkude tuvastamiseks CD8-PE-d (Biolegend, USA) ja CD3-FITC (BD Biosciences, USA). NK- ja NK-T-rakkude tuvastamiseks kasutati CD56-PE (BD Biosciences, USA) ja CD3-FITC värvingut. Eosinofiilid identifitseeriti esmalt CD45-FITC (Biolegend, USA) ja Siglec-8-PE-ga (Biolegend, USA), seejärel P2X4-FITC (TTÜ Immunoloogia labor) ja Siglec-8-PE-ga.

Värvunud rakkude tuvastamiseks ja analüüsimiseks kasutati läbivoolutsütomeetrit (FACSCalibur™). Värvitud lümfisõlmerakkude proove analüüsiti FACS-seadmega vahetult pärast värvimist, et saada usaldusväärseid tulemusi. Igast lümfisõlmest analüüsiti 30 000 raku. Kõik saadud tulemused salvestati edasiseks analüüsiks CellQuest™ andmeanalüüsi tarkvaraga.

3.5. Konfokaalne mikroskoopia ja pildianalüüs

Eosinofiilide ja P2X4 retseptori ekspressiooni visualiseerimiseks inimese lümfisõlmedes, mis pärinesid metastaatilise melanoomiga patsientidelt, eemaldati igalt patsiendilt operatsiooni käigus üks metastaasiga ja üks kontroll lümfisõlm, mis kohe külmutati ja säilitati -25°C juures kuni külmutuslõikude (5µm) valmistamiseni. Lümfisõlmedest tehtud koelõigud kuivatati õhu käes, pesti kolm korda Tris-puhverdatud soolalahusega (TBS) ja blokeerimiseks inkubeeriti TBS + 0,2% veise seerumi albumiinis. Seejärel värviti koelõigud mAb-ga anti-hP2X4 mAb27-FITC (1:800; IgG2b) või hiire anti-h-Siglec-8-PE mAb (1:10; IgG1; BioLegend kloon 7C9). Rakkude tuumad värviti kasutades Hoechst33342 (2 µg/ml, Sigma). Positiivseks kontrolliks kasutati hiire anti-human CD3-FITC mAb (1:10; kloon HIT3a RUO, isotüüp IgG2a/, BD Pharmingen) ja negatiivseks kontrolliks FITC märgistatud roti IgG2a/k isotüübi kontroll (eBR2a), mis pärines eBioscience'ist (cat 11-4321-42). Värvimiseks inkubeeriti koelõike koos antikehadega TBS-s toatemperatuuril 30 minutit, pesti kaks korda, inkubeeriti Hoechstiga 10 minutit, seejärel pesti kolm korda TBS-is. Pildistamiseks kasutati mikroskoopi Zeiss Axioskop2 (10Å~ või 20Å~ objektiiv) või Zeiss LSM780 tagurpidi konfokalmikroskoopi 63Å~ juures jooniste jaoks. Pildianalüüs viidi läbi kasutades ImageJ (NIH) programmi.

Koelõigud valmistati PERHi patoloogia osakonna töötaja Birgit Truumehe poolt. Värvimine, pildistamine ja pildianalüüs toimus TTÜs.

3.6. Kasutatud statistilised meetodid

Kõik arvutused ja graafikud tehti andmetöötluse programmis MS Excel ning kasutati karpdiagrammi graafiku tüüpi.

Populatsioonide võrdlus hinnati t-testi või Mann-Whitney U testi tulemuste põhjal statistiliselt erinevaks kui p-väärtus oli alla 0,05 ning eriti statistiliselt erinevaks, kui p-väärtus oli alla 0,01. T-test viidi läbi andmetega, mis olid ligikaudu normaaljaotusega (*Social Science Statistics, s.a.-a*). Mann-Whitney U testi kasutati andmerühmadega, millel polnud normaaljaotus (*Social Science Statistics, s.a.-b*). Andmerühmade normaaljaotuse kontrollimiseks kasutati Shapiro-Wilk testi (*Statistics Kingdom, s.a.*).

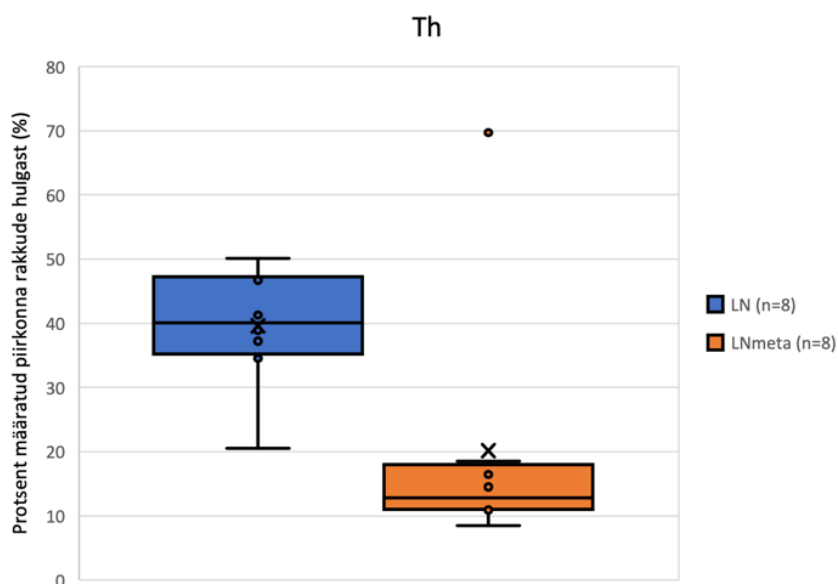
4. Tulemused

Rakuliste muutuste esinemise uurimiseks ja kvantifitseerimiseks metastaasidega ja ilma metastaasideta lümfisõlmedes analüüsiti kaheksa metastaatilise melanoomiga patsiendi (4 meest ja 4 naist) lümfisõlmi. Rakuliste muutuste olemasolu tuvastamiseks ja analüüsiks kasutati leukotsüütide suuruse ja granuleerituse hindamist kombinatsioonis leukotsüütide liinispetsiifiliste markeritega.

Metastaasiga lümfisõlmest eraldatud rakkude hulk oli kõigil kaheksal patsiendil umbes kaks korda suurem võrreldes tavalise lümfisõlmega. See järeldus tehti visuaalselt, lümfisõlmedest eraldatud rakkude sademe suuruse ja seejärel rakkude loendamise tulemuste põhjal.

4.1. Metastaasita lümfisõlmedes on oluliselt rohkem T-abistajarakke võrreldes metastaasiga lümfisõlmedega

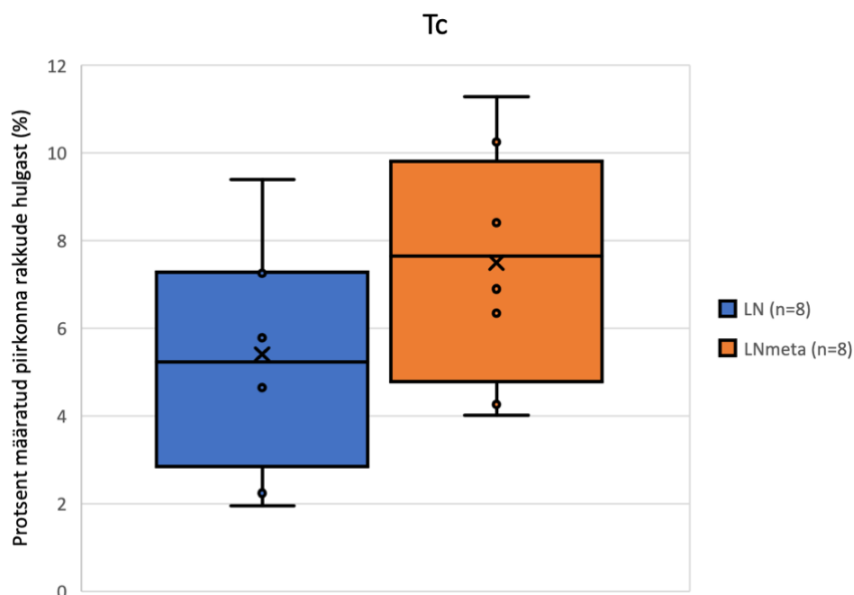
Th-rakkude olemasolu nii normaalses kui metastaasiga lümfisõlmes määrati CD3 ja CD4 pinnaantigeenide ekspressiooni järgi protsentuaalselt selles proovis värvitud ja analüüsitud rakkude hulgast (30 000 raku). Saadud tulemustes hinnati normaaljaotuse esinemist ja tulemused esitati karpdiagrammina (Joonis 3). Normaalses LN-s on oluliselt rohkem Th-rakke kui metastaasiga LN-s (Joonis 3). Rühmade erinevusele viitab ka mõlema grupi mediaanväärtus, mis on ilma metastaasita rühmal üle kolme korra suurem, kui metastaasiga rühmal.



Joonis 3. T-abistajarakkude kogused LN-s ja metastaasiga LN-s. Joonis näitab läbivoolotsütomeetria tulemusi. On märgata oluline erinevus Th-rakkude vahel ($p=0.01352$). Märk „X“ kastidel tähistab antud patsientide rühma keskmist tulemust, must horisontaalne joon tähistab mediaani. Diagrammil kujutatud väikesed ringid on üksikud andmepunktid, kus iga punkt tähistab Th protsendilist kogust iga üksiku patsiendi vastavas lümfisõlmes. Värvilise kasti all ja üleval olevad jooned tähistavad üksikute väärtuste normaalset miinimumi ja maksimumi. Joontest kaugemale jäävad väärtused loetakse eranditeks. Värviline kast ise tähistab ala, kus on 50% andmepunktidest.

4.2. Metastaasita ja metastaasiga lümfisõlmede võrdlemisel olulist erinevust T-tsütotoksiliste rakkude populatsioonides ei leitud

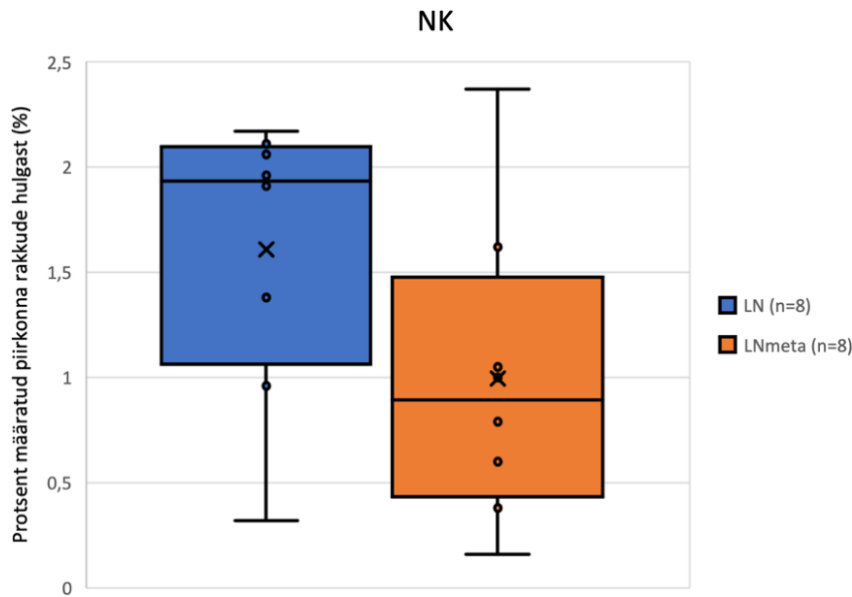
T-tsütotoksiliste rakkude olemasolu nii normaalses kui metastaasiga lümfisõlmes määrati CD3 ja CD8 pinnaantigeenide ekspressiooni järgi protsentuaalselt selles proovis värvitud ja analüüsitud rakkude hulgast (30 000 rakku). Saadud tulemustes hinnati normaaljaotuse esinemist ja tulemused esitati karpdiagrammina (Joonis 4). Tc-rakkude populatsioonides olulist erinevust metastaasita ja metastaasiga lümfisõlmede võrdlemisel ei tekkinud.



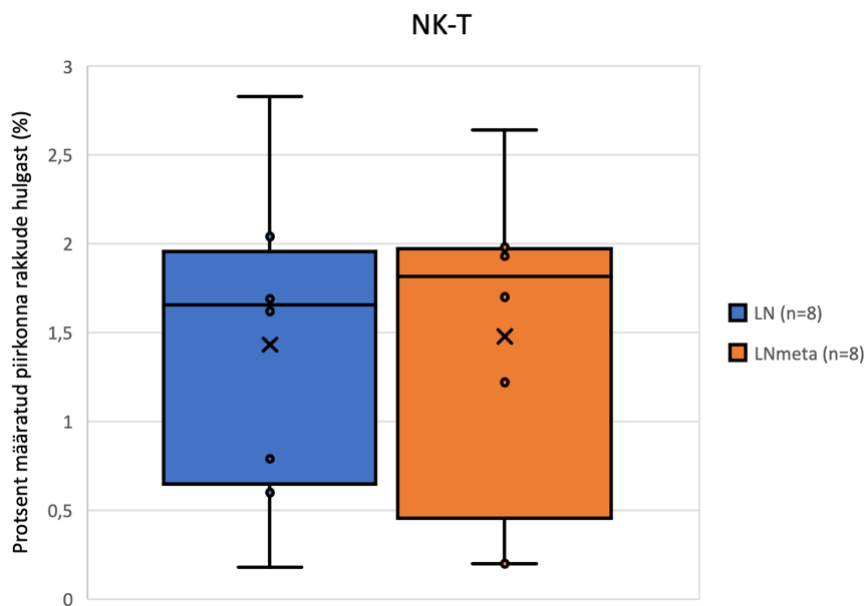
Joonis 4. T-tsütotoksiliste rakkude kogused metastaasita (sinine; LN) ja metastaasiga (oranž) lümfisõlmedes. Joonis näitab läbivoolotsütomeetria tulemusi. Olulist erinevust ei tekkinud. Märk „X“ kastidel tähistab antud patsientide rühma keskmist tulemust, must horisontaalne joon tähistab mediaani. Diagrammil kujutatud väikesed ringid on üksikud andmepunktid, kus iga punkt tähistab Th protsendilist kogust iga üksiku patsiendi vastavas lümfisõlmes. Värvilise kasti all ja üleval olevad jooned tähistavad üksikute väärtuste normaalset miinimumi ja maksimumi. Värviline kast ise tähistab ala, kus on 50% andmepunktidest.

4.3. Metastaasita ja metastaasiga lümfisõlmedes olulisi erinevust NK- ja NK-T-rakkude osas ei leitud

NK- ja NK-T-rakkude olemasolu nii normaalses kui metastaasiga lümfisõlmes määrati CD56 ja CD3 pinnaantigeenide ekspressiooni järgi protsentuaalselt selles proovis värvitud ja analüüsitud rakkude hulgast (30 000 rakku). Saadud tulemustes hinnati normaaljaotuse esinemist ja tulemused esitati karpdiagrammina (Joonised 5 ja 6). Nii NK- kui NK-T-rakkude populatsioonides olulist erinevust metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmede võrdlemisel ei tekkinud. Vaatamata sellele, et ilma metastaasita rühma mediaanväärtus on metastaasiga grupi mediaanväärtusest ligikaudu kaks korda suurem, siiski olulist erinevust ei ole.



Joonis 5. NK-rakkude kogused LN-s (sinine) ja metastaasiga (oranž) LN-s. Joonis näitab läbivoolotsütomeetria tulemusi. Olulist erinevust ei tekkinud. Märk „X“ kastidel tähistab antud patsientide rühma keskmist tulemust, must horisontaalne joon tähistab mediaani. Diagrammil kujutatud väikesed ringid on üksikud andmepunktid, kus iga punkt tähistab Th protsendilist kogust iga üksiku patsiendi vastavas lümfisõlmes. Värvilise kasti all ja üleval olevad jooned tähistavad üksikute väärtuste normaalset miinimumi ja maksimumi. Värviline kast ise tähistab ala, kus on 50% andmepunktidest.



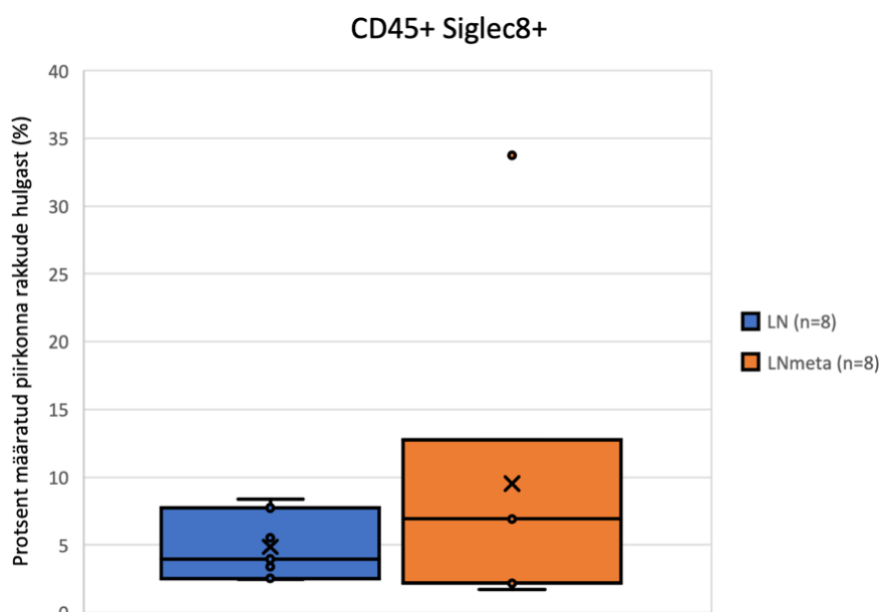
Joonis 6. NK-T-rakkude kogused LN-s (sinine) ja metastaasiga (oranž) LN-s. Joonis näitab läbivoolotsütomeetria tulemusi. Olulist erinevust ei tekkinud. Märk „X“ kastidel tähistab antud patsientide rühma keskmist tulemust, must horisontaalne joon tähistab mediaani. Diagrammil kujutatud väikesed ringid on üksikud andmepunktid, kus iga punkt tähistab Th protsendilist kogust iga üksiku patsiendi vastavas lümfisõlmes. Värvilise kasti all ja üleval olevad jooned tähistavad üksikute väärtuste normaalset miinimumi ja maksimumi. Värviline kast ise tähistab ala, kus on 50% andmepunktidest.

4.4. Metastaasita lümfisõlmedes on oluliselt vähem P2X4 positiivseid eosinofiile võrreldes metastaasiga lümfisõlmedega

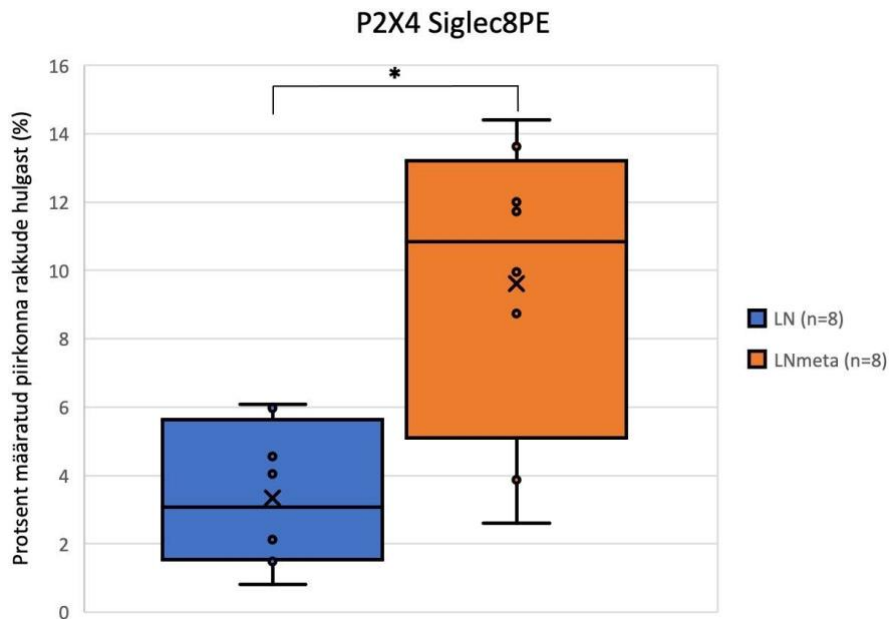
Eosinofiilide olemasolu ja inflammatoorsuse/regulatoorsuse hindamiseks kasutati kolme erinevat meetodit. Immuunfluorestsents-värvimine (P2X4-FITC ja Siglec-8 PE topeltvärvimine) viidi läbi lümfisõlmedest ja metastaatilistest lümfisõlmedest isoleeritud rakkudel ja hinnati läbivoolutsütomeetria abil (Joonised 7 ja 8). P2X4-FITC, Siglec-8 PE ja rakutuumade värvimine Hoechst 33258-ga viidi läbi mõlemat tüüpi lümfisõlmedest tehtud külmutuslõikudel (5µm) ja visualiseeriti konfokaalmikroskoopiaga (Joonised 9 ja 10). Läbivoolutsütomeetria tulemuste illustreerimiseks P2X4-FITC ja Siglec-8 PE topeltvärvingu puhul on esitatud patsiendi nr 3 tulemused võrdlevalt metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlme rakkudest. Patsient 3 ilma metastaasita lümfisõlmes on Siglec-8 ja P2X4 topeltpositiivseid rakke 1,63% (Joonis 11, vasak paneel, UR), kuid metastaasiga lümfisõlmes 3,35% (Joonis 11, parem paneel, UR).

Tuvastasime eosinofiilide olemasolu CD45 ja Siglec-8-ga ja neid oli LN-s umbes 5-10% (Joonis 7).

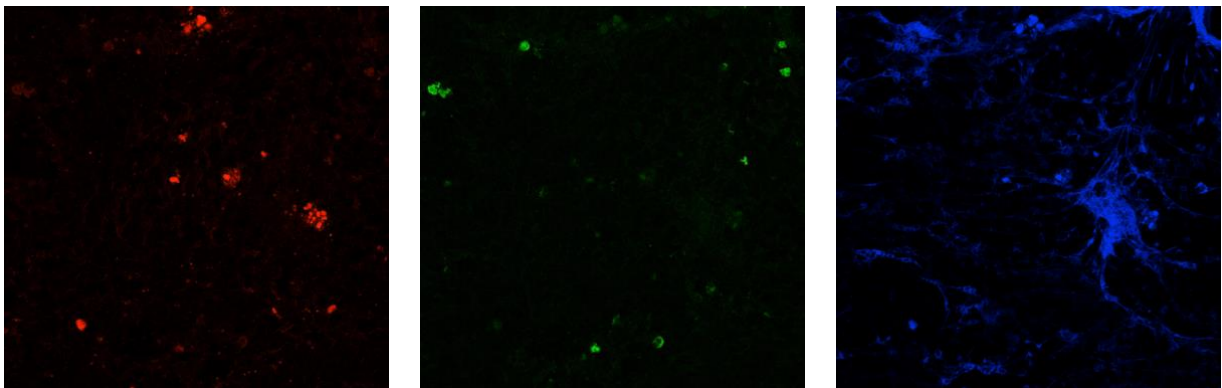
Suur erinevus tekkis P2X4 ekspressiooni vahel, kuna oluliselt väiksem osa normaalse lümfisõlme eosinofiilidest ekspresseerib koos liinimarkeri Siglec-8-ga ka puriinergilist retseptorit P2X4, samas kui metastaasi olemasolul P2X4 ekspressioon eosinofiilidel oluliselt suureneb ($p=0.0025$) (Joonis 8). Erinevusele viitab ka mõlema grupi aritmeetilise keskmise väärtus, mis on metastaasiga LN-s ligikaudu kolm korda suurem, kui ilma metastaasiga LN-s.



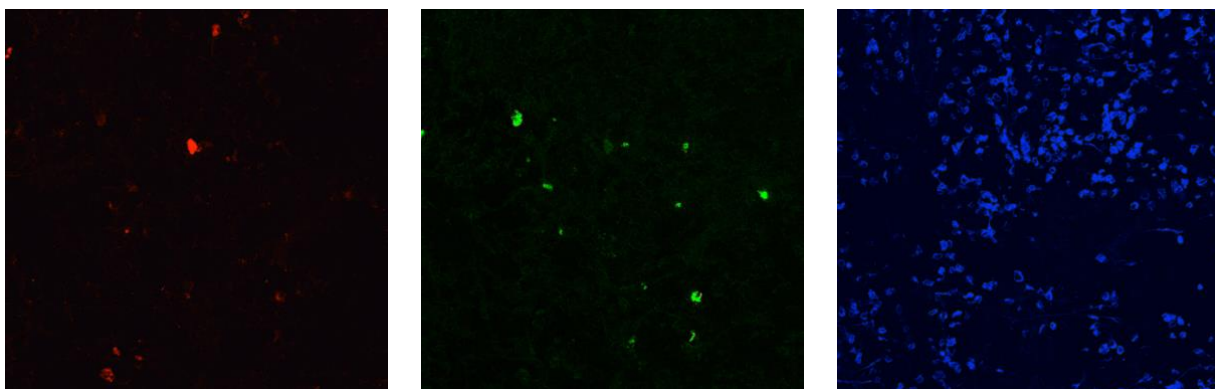
Joonis 7. CD45+ ja Siglec-8 tugevalt positiivsete rakkude (eosinofiilide) kogused LN-s (sinine) ja metastaasiga (oranž) LN-s. Joonis näitab läbivoolutsütomeetria tulemusi. Olulist erinevust ei tekkinud. Märk „X“ kastidel tähistab antud patsientide rühma keskmist tulemust, must horisontaalne joon tähistab mediaani. Diagrammil kujutatud väikesed ringid on üksikud andmepunktid, kus iga punkt tähistab eosinofiilide protsendilist kogust iga üksiku patsiendi vastavas lümfisõlmes. Värvilise kasti all ja üleval olevad jooned tähistavad üksikute väärtuste normaalset miinimumi ja maksimumi. Joontest kaugemale jäävad väärtused loetakse erinditeks. Värviline kast ise tähistab ala, kus on 50% andmepunktidest.



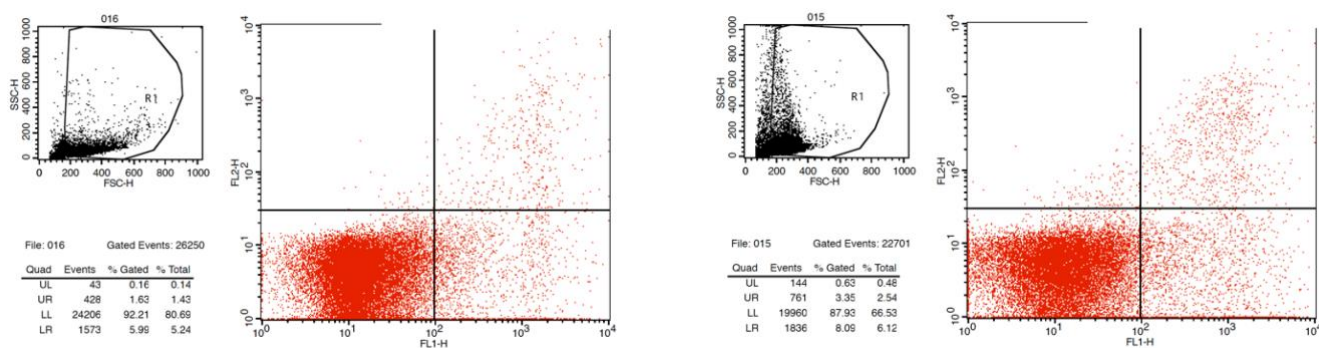
Joonis 8. P2X4 ja Siglec-8 koekspressioon rakkudes, mis on võetud metastaasiga (oranž) ja ilma metastaasita (sinine) LN-dest. Joonis näitab läbivoolotsütomeetria tulemusi. Märk „X“ kastidel tähistab antud patsientide rühma keskmist tulemust, must horisontaalne joon tähistab mediaani. Diagrammil kujutatud väikesed ringid on üksikud andmepunktid, kus iga punkt tähistab Th protsendilist kogust iga üksiku patsiendi vastavas lümfisõlmes. Värvilise kasti all ja üleval olevad jooned tähistavad üksikute väärtuste normaalset miinimumi ja maksimumi. Värviline kast ise tähistab ala, kus on 50% andmepunktidest.



Joonis 9. Eosinofiilide olemasolu tuvastati ka konfokaalmikroskoobiga. Punane värv tähistab Siglec-8 ekspressiooni, roheline värv P2X4 retseptori ekspressiooni ning sinisega on värvitud kõik LN-s olevate rakkude tuumad. Pildil on toodud patsient 4 ilma metastaasita lümfisõlmed, kus suurt silmaga nähtavat erinevust Siglec-8 ja P2X4 retseptori ekspressiooni vahel ei ole näha.



Joonis 10. Eosinofiilide olemasolu tuvastamine konfokaalmikroskoobiga. Punane värv tähistab Siglec-8 ekspressiooni, roheline värv P2X4 retseptori ekspressiooni ning sinisega on värvitud kõik LN-s olevate rakkude tuumad. Pildil on toodud patsient 4 metastaasiga lümfisõlmed. Suurem P2X4 retseptorit ekspresseerivate rakkude osakaal on märgatav metastaasiga LN-des.



Joonis 11. Voolutsütomeetria analüüsi tulemus LN-s ja metastaasiga LN rakkudes. Graafik näitab P2X4-FITC Siglec-8-PE värvingut patsiendi 3 puhul. Vasakpoolsel joonise paneelil on näidatud normaalse LN rakke. Parempoolsel joonise paneelil on metastaasiga LN rakkude värving. Topeltpositiivsete rakkude P2X4 ja Siglec-8 topelt värvingut on näha ülemistes parempoolsetes ruutudes.

5. Arutelu

Pahaloomuline melanoom on kõige metastaatilisem ja agressiivsem nahavähi vorm ning sellega kaasneb suur surmarisk. Hiljutised uuringud on näidanud, et ~20% patsientidest ei allu ICI (anti-CTLA-4 + anti-PD1 mAb) ravile. Madal ravivastuse määr ja ravimiresistentsus on tihedalt seotud TME-ga. TME alla kuuluvad kasvaja strooma, fibroblastid, keratinotsüütid, immuunrakud, tsütokiinid ja ekstratsellulaarne maatriks. Dünaamiline interaktsioon TME ja kasvajakude vahel on kasvajakude kasvu, lokaalse invasiooni ja metastaatilise leviku alus. TME ja kasvaja immuunrakkude interaktsioonil on ülioluline roll kasvaja proliferatsioonis, ravimiresistentsuse kujunemises ja immuunsüsteemi vältimises (Wu & Dai, 2017).

Miks on oluline uurida metastaasiga lümfisõlmi?

Immuunrakud on vähi mikrokeskkonna põhikomponendid. Samas mõjutab TME otseselt ka immuunsüsteemi - nii kasvaja koldes olevaid immuunrakke kui ka nende arengut luuüdis ja diferentseerumist kasvajast kaugemal, kaasa arvatud lümfisõlmedes.

Melanoomirakud migreeruvad sageli piirkondlikult lümfisüsteemi kaudu, enne kui metastaaseeruvad süsteemselt läbi vere (Alitalo & Detmar, 2012). Uuringud on näidanud, et piirkondlikud lümfisõlmede metastaasid põhjustavad mõnikord kaugeid metastaase (Sanborn et al., 2015). Lümfisõlmede metastaase on melanoomiga patsientidel peetud seni halva prognoosi näitajaks.

Valvurlümfisõlm (SLN) on esimene lümfisõlm, kuhu metastaatiline vähirakk saabub ja seega toimib valvurlümfisõlm olulise immuunvastuse kohana, mis kujundab järgnevaid kasvajakudeid kaasasündinud ja adaptiivseid immuunvastuseid (Cochran et al., 2006). SLN eemaldamise efektiivsus edasise elulemuse osas on vastuoluline ning on ebaselge, kas see parandab pikaajalist ellujäämist või on lümfisõlmede kaasamine vaid agressiivse haiguse marker. Samuti võib olla valvurlümfisõlme ära lõikamine organismile lisastress ning hoopis negatiivselt mõjuda. Kuid kuna just SLN-s algatatakse ka kasvajakude immuunsus, on väga oluline uurida, kas paljunevad rakud on reguloorse või inflamatoorse orientatsiooniga (Zhou et al., 2023). Varasemad uuringud on näidanud, et SLN adaptiivne immuunsus on vastusena primaarsele melanoomile kaldunud tolerantsuse poole (Cochran et al., 2006), sest suurenenud reguloorsete T-rakkude (Treg) infiltratsioon SLN-s pärsib efektor T-rakkude aktiivsust (Viguier et al., 2004). Seega võivad metastaatilised SLN-d muutuda mittefunktsionaalsete T-rakkude kogunemise kohaks. Samas võib SLN eemaldamise potentsiaalne kliiniline mõju olla märkimisväärne, kuna on leitud, et metastaasiga SLN-de Treg osakaalu suurenemine halvendab üldist elulemust (Cochran et al., 2006; Mohos et al., 2013).

On näidatud, et eosinofiilid mõjutavad kasvaja taandumist, aktiveerides kasvaja spetsiifilisi CD8+ T-lümfotsüüte (Varricchi et al., 2018). Eosinofiilide suurenenud arv perifeerses veres on melanoomi immunoteraapia prognostiline marker (Simon et al., 2020). Eosinofiilide rolli kasvajakude immuunvastuses on küll vähe uuritud, kuid on teada, et need võivad ise melanoomirakke hävitada kas otsese tsütotoksilise ataki kaudu või tsütokiinide kaudu, aktiveerides teisi immuunrakke (Wendlinger et al., 2022).

Käesolevas töös hinnati immuunrakkude kompositsiooni ja arvu pahaloomulise melanoomiga patsientide metastaatilises lümfisõlmes ja võrreldi saadud tulemusi samalt patsiendilt pärit lümfisõlmega, kus metastaasi ei leitud.

Kasutades läbivoolutsütomeetriat ning NK, NK-T, eosinofiilide, Th-ja Tc-rakkude liinimarkereid, võrreldi nende rakkude arvu metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmedes. Leiti oluline erinevus T-abistajarakkude protsentuaalses koguses. Ilma metastaasita lümfisõlmedes on oluliselt rohkem T-abistajarakke võrreldes metastaatilise lümfisõlmega (Joonis 3). Kahjuks ei olnud kasutatud vahenditega võimalik määrata, milline osa T-abistajarakkudest olid Treg. Seda peaks tulevikus määrama iga üksiku patsiendi osas, kuna Treg arvu kasv on otseselt seotud elulemusega (Mohos et al., 2013). Suurem osa Treg tekib tuumuses negatiivse selektsiooni käigus MHCII ja autoloogse peptiidi suhtes suure afiinsusega autoreaktiivsetest T-rakkudest. Perifeersed Treg rakud aga arenevad tolerogeensetes tingimustes antigeense stimulatsiooniga kokkupuutel naiivsetest T-rakkude prekursoritest. Täpsemalt, tugev T-raku retseptori signaaliülekanne, suboptimaalne kostimulatsioon ning mikrokeskkonna suured kogused transformeerivad kasvufaktor-beetat ja retinoehapet soodustavad Foxp3 indutseerimist perifeersetes naiivsetes CD4+ T-rakkudes (Yi et al., 2019). Tuumusest pärinevate ja perifeersete Treg rakkude suhteline panus erinevate vähitüüpide progresseerumisse tuleb veel kindlaks teha.

NK- ja NK-T-rakkude osas olulisi muutusi metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmede võrdlemisel ei täheldatud (Joonised 5 ja 6), kuigi on teada, et mõlemad osalevad melanoomi vastases immuunvastuses. NK-rakkude protsent uuritud lümfisõlmedes oli väiksem (1-1,5%) kui tavaliselt on leitud veres (ca 10%), samas kui NK-T-rakkude protsent (mis on individuaalselt ja haigusseisundist olenevalt väga muutuv suurus) oli suurem (1,5%) kui tavaliselt veres (0,01-1%).

Kasvaja arengu varases staadiumis on nii NK- kui ka NK-T-rakkudel efektorrakkude omadused, mis hilisemates vähistaadiumides oluliselt halvenevad. Siiski on ebaselge, kas kasvaja mikrokeskkond suunab ka NK- ja NK-T-rakke muutuma tuumori progresseerumise ajal vananevateks rakkudeks (Liu et al., 2021).

Bakalaureusetöö teiseks eesmärgiks oli võrrelda P2X4 retseptori ekspressiooni eosinofiilidel normaalses lümfisõlmes ja metastaasiga lümfisõlmedes. Eosinofiilid on teadaolevalt kriitilise tähtsusega immuunvastuse käivitamisel mitmete vähivormide, eriti melanoomi korral. Kasvaja mikrokeskkonnas toodavad eosinofiilid suures koguses TNF-i, CCL5 ja indutseeritavat lämmastikoksiidi süntaasi. Seega soodustavad eosinofiilid ja nende poolt toodetavad tsütokiinid Tc-rakkude migreerumist kasvajakeskonda ja kasvaja hävitamist (Carretero et al., 2015). Eosinofiilide toime ei piirdu ainult Tc-rakkude värbamisega, vaid nad normaliseerivad ka kasvaja veresoonkonda ja indutseerivad makrofaagide M1-polarisatsiooni (Varricchi et al., 2018).

Kasutades läbivoolutsütomeetriat ja konfokaalmikroskoopiat hinnati P2X4 retseptori ekspressiooni eosinofiilidel nii metastaasiga kui metastaasita lümfisõlmedes. Nagu on näidatud Joonisel 8, on P2X4 ja Siglec-8 topeltpositiivsete rakkude ekspressiooni vahel metastaasiga ja ilma metastaasita LN-des suur erinevus. Oluliselt suurem osa metastaasiga lümfisõlme eosinofiilidest ekspresseerib koos liinimarkeri Siglec-8-ga ka purinergilist retseptorit P2X4, samas kui metastaasi puudumisel lümfisõlmes P2X4 ekspressioon eosinofiilidel on oluliselt väiksem (Joonis 8).

Eosinofiilide olemasolu tuvastamisel metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmede koelõikudel võib näha, et metastaasiga lümfisõlmedes on P2X4 ekspressioon tugevam kui ilma metastaasita lümfisõlmedes (Joonised 9, 10 ja 11; patsient 4 lümfisõlmed).

Inimestel ja hiirtel ekspresseerub P2X4 retseptor immuunrakkudest kõige rohkem eosinofiilidel, olles inflammatoorsetel eosinofiilidel rohkem ja reguloorsetel vähem ekspresseeritud. Samuti on P2X4 retseptorid hüpoksilistes tingimustes ülesreguleeritud (Paalme et al., 2019). Eosinofiilid ekspresseerivad tavaliselt suurel määral P2X4 retseptoreid ning nende rakupinnal oleva ekspressiooni järgi saab hinnata eosinofiilide pro- või anti-inflamatoorset suunitlust ja täpsemalt määrata melanoomivastase immuunvastuse olemust. Seepärast on tekkinud huvi täpsemalt aru saada eosinofiilide rollist melanoomi vastases immuunvastuses. Seega võiks kasvaja puhul eosinofiilide fenotüübi ja arvukuse uurimine nii verest kui lümfisõlmedest aidata kindlaks teha nende prognostilist rolli kui markerit haiguse varaseks avastamiseks või haiguse arengu hindamiseks.

See uuring näitab esialgse analüüsina eosinofiilide seotust melanoomiga ja nende suuremat esinemist lümfisõlmedes võrreldes vereringega, isegi kui nende roll lümfisõlmedes pole täielikult selge. Võimalus suurendada uuringus osalevate patsientide arvu võiks aidata kaasa eosinofiilide funktsiooni täpsemale hindamisele melanoomivastases immuunvastuses.

Oleks huvitav teada, kas suurema eosinofiilide protsendiga patsientidel on suurem elulemus, kas ravi on tõhusam või kas kasvaja suurus taandareneb. Tulevased uuringud peaksid analüüsima eosinofiilide erinevaid rolle metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmedes, et juhtida tähelepanu kasvaja progresseerumisele või regressioonile eosinofiilide olemasolul.

5.1. Järeldused

1. Metastaasiga lümfisõlmedes leiti oluliselt vähem T-abistajarakke võrreldes ilma metastaasita lümfisõlmedega, samas kui Tc, NK- ja NK-T-rakkude osas metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmedes olulisi muutusi ei täheldatud.
2. P2X4 ja Siglec-8 retseptorite ekspressiooni vahel metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmedes esines suur erinevus. Oluliselt suurem osa metastaasiga lümfisõlme eosinofiilidest ekspresseerib koos liinimarkeri Siglec-8-ga ka puriinergilist retseptorit P2X4, samas kui metastaasi puudumisel lümfisõlmes P2X4 ekspressioon eosinofiilidel on oluliselt väiksem.

Kokkuvõte

Melanoom on nahapigmenti, melaniini, tootvate rakkude pahaloomuline kasvaja, millesse haigestumine on viimastel aastakümnetel märkimisväärselt suurenenud. Melanoomil on multifaktoriline etioloogia, tulenevalt geenide ja keskkonna koostoimest. Immuunsüsteemil, eriti leukotsüütidel, on melanoomi vastu võitlemisel oluline roll, kuna kasvajaid tekib sagedamini immuunpuudulikes organismides.

Käesolevas bakalaureusetöös hinnati immuunrakkude kompositsiooni ja arvu pahaloomulise melanoomiga patsientide metastaatilises lümfisõlmes ning võrreldi saadud tulemusi samalt patsiendilt pärit ilma metastaasita lümfisõlmega. Samuti võrreldi ka P2X4 retseptori ekspressiooni eosinofiilidel normaalses lümfisõlmes ja metastaasiga lümfisõlmes.

Lümfisõlmed on osa immuunsüsteemist ja neis paiknevad immuunrakud mängivad olulist rolli vähi vastu võitlemisel. Melanoomi korral suurenevad tavaliselt kõigepealt vähi koldele lähimad lümfisõlmed, mis näitab, et immuunvastus on seal aktiveerunud. Eosinofiilide ja P2X4 retseptorite roll lümfisõlmede melanoomivastases immuunvastuses on aga veel uurimata ning selle teema edasine uurimine võib aidata täpsemalt mõista melanoomi patogeneesi ja leida selle ravimiseks uusi võimalusi.

On oluline hinnata immuunrakkude rolli ja inflamatoorset/regulaatorset suunitlust valvurlümfisõlmes, kuna erinevatest diagnostilistest markeritest on silmatorkav puudus ja igasugune lisainformatsioon võib osutada väärtuslikuks puudevaks lüliks.

Eosinofiilide rolli parem mõistmine vähi progresseerumisel aitab neid diagnostiliste ja ennustavate markeritena kasutusele võtta ning eosinofiilide määramise strateegiaid välja töötada. Asjaolu, et eosinofiilid võivad kasvajatega võidelda, avab uued võimalused vähi raviks indutseerides eosinofiile vallandama oma kasvajavastast reaktsiooni (e-toos, graanulid jne) või eosinofiilide immunoregulaatorse funktsiooni kaudu. Nii P2X4 kui ka eosinofiilide rolli on vähis uuritud eraldi, kuid neid pole kunagi seostatud.

P2X4 ja Siglec-8 retseptorite ekspressiooni vahel metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmedes esines suur erinevus. Oluliselt suurem osa metastaasiga lümfisõlme eosinofiilidest ekspresseerib koos liinimarkeri Siglec-8-ga ka puriinergilist retseptorit P2X4, samas kui metastaasi puudumisel lümfisõlmes on P2X4 ekspressioon eosinofiilidel oluliselt väiksem.

Eosinofiilide olemasolu tuvastamisel metastaasiga ja ilma metastaasita lümfisõlmede koelõikudel leiti, et metastaasiga lümfisõlmedes on P2X4 ekspressioon tugevam kui ilma metastaasita lümfisõlmedes.

Tänuavaldused

Soovin ennekõike tänada oma juhendajaid Sirje Rüütel Boudinot'd ja Airi Rumpi väga meeldiva koostöö, heade nõuannete ja kannatlikkuse eest kogu lõputöö vältel. Samuti soovin tänada Põhja-Eesti Regionaalhaiglat, kust pärinesid kõik töös kasutatud uurimismaterjalid.

Kirjanduse loetelu

- Abbott, M., & Ustoyev, Y. (2019). Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Seminars in Oncology Nursing*, 35(5), 150923. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.002>
- Aktipis, C. A., Boddy, A. M., Jansen, G., Hibner, U., Hochberg, M. E., Maley, C. C., & Wilkinson, G. S. (2015). Cancer across the tree of life: Cooperation and cheating in multicellularity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1673), 20140219. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0219>
- Alitalo, A., & Detmar, M. (2012). Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene*, 31(42), Article 42. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.602>
- Angelotti, N. (s.a.). *Clark's level*. II Melanoma. Salvestatud 26. märts 2023, <https://www.ilmelanoma.com/en/melanoma/staging-of-melanoma/clarks-level/>
- Antonoli, L., Blandizzi, C., Fornai, M., Pacher, P., Lee, H. T., & Haskó, G. (2019). P2X4 receptors, immunity, and sepsis. *Current opinion in pharmacology*, 47, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.02.011>
- Carretero, R., Sektioglu, I. M., Garbi, N., Salgado, O. C., Beckhove, P., & Hämmerling, G. J. (2015). Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8(+) T cells. *Nature Immunology*, 16(6), 609–617. <https://doi.org/10.1038/ni.3159>
- Cochran, A. J., Huang, R.-R., Lee, J., Itakura, E., Leong, S. P. L., & Essner, R. (2006). Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nature Reviews Immunology*, 6(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nri1919>
- Coricovac, D., Dehelean, C., Moaca, E.-A., Pinzaru, I., Bratu, T., Navolan, D., & Boruga, O. (2018). Cutaneous Melanoma—A Long Road from Experimental Models to Clinical Outcome: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms19061566>
- Czarnecka, A. M., Bartnik, E., Fiedorowicz, M., & Rutkowski, P. (2020). Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijms21134576>
- Curti, B. D., & Faries, M. B. (2021). Recent Advances in the Treatment of Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 384(23), 2229–2240. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2034861>
- Davis, L. E., Shalin, S. C., & Tackett, A. J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 20(11), 1366–1379. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>
- Eckhart, L., Tschachler, E., & Gruber, F. (2019). Autophagic Control of Skin Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00143>
- Gago da Graça, C., van Baarsen, L. G. M., & Mebius, R. E. (2021). Tertiary Lymphoid Structures: Diversity in Their Development, Composition, and Role. *The Journal of Immunology*, 206(2), 273–281. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000873>
- Hsieh, C.-C., & Shen, C.-H. (2019). The Potential of Targeting P53 and HSP90 Overcoming Acquired MAPKi-Resistant Melanoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(3), 22. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0622-9>

- Ito, T., Tanaka, Y., Murata, M., Kaku-Ito, Y., Furue, K., & Furue, M. (2021). BRAF Heterogeneity in Melanoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 22(3), 20. <https://doi.org/10.1007/s11864-021-00818-3>
- Kleffel, S., Posch, C., Barthel, S. R., Mueller, H., Schlapbach, C., Guenova, E., Elco, C. P., Lee, N., Juneja, V. R., Zhan, Q., Lian, C. G., Thomi, R., Hoetzenecker, W., Cozzio, A., Dummer, R., Mihm, M. C., Flaherty, K. T., Frank, M. H., Murphy, G. F., ... Schatton, T. (2015). Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell*, 162(6), 1242–1256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.052>
- Lingblom, C., Andersson, J., Andersson, K., & Wennerås, C. (2017). Regulatory Eosinophils Suppress T Cells Partly through Galectin-10. *The Journal of Immunology*, 198(12), 4672–4681. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601005>
- Liu, X., Li, L., Si, F., Huang, L., Zhao, Y., Zhang, C., Hoft, D. F., & Peng, G. (2021). NK and NKT cells have distinct properties and functions in cancer. *Oncogene*, 40(27), Article 27. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01880-9>
- Majidpoor, J., & Mortezaee, K. (2021). Steps in metastasis: An updated review. *Medical Oncology*, 38(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01447-w>
- Meng, X., Chen, J., Zhang, Z., Li, K., Li, J., Yu, Z., & Zhang, Y. (2021). Non-invasive optical methods for melanoma diagnosis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 34, 102266. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102266>
- Minton, K. (2015). Eosinophils enable the antitumour T cell response. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nri3861>
- Mohos, A., Sebestyén, T., Liskay, G., Plótár, V., Horváth, S., Gaudi, I., & Ladányi, A. (2013). Immune cell profile of sentinel lymph nodes in patients with malignant melanoma – FOXP3+ cell density in cases with positive sentinel node status is associated with unfavorable clinical outcome. *Journal of Translational Medicine*, 11, 43. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-43>
- Moore, A. R., Rosenberg, S. C., McCormick, F., & Malek, S. (2020). RAS-targeted therapies: Is the undruggable drugged? *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0068-6>
- Moreira, A., Leisgang, W., Schuler, G., & Heinzerling, L. (2017). Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immunotherapy. *Immunotherapy*, 9, 115–121. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0138>
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., & Van Ginderachter, J. A. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Research*, 70(14), 5728–5739. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4672>
- Ohbayashi, N., & Fukuda, M. (2020). Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-608. <https://doi.org/10.12688/f1000research.24625.1>
- Oliveira, D. T., Biassi, T. P., Faustino, S. E. S., Carvalho, A. L., Landman, G., & Kowalski, L. P. (2012). Eosinophils may predict occult lymph node metastasis in early oral cancer. *Clinical Oral Investigations*, 16(6), 1523–1528. <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0651-7>
- Paalme, V., Rump, A., Mädo, K., Teras, M., Truumees, B., Aitai, H., Ratas, K., Bourge, M., Chiang, C.-S., Ghalali, A., Tordjmann, T., Teras, J., Boudinot, P., Kanellopoulos, J. M., & Rüütel Boudinot,

- S. (2019). Human Peripheral Blood Eosinophils Express High Levels of the Purinergic Receptor P2X4. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02074>
- Patel, H., Yacoub, N., Mishra, R., White, A., Yuan, L., Alanazi, S., & Garrett, J. T. (2020). Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. *Cancers*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/cancers12020482>
- Pesce, S., Thoren, F. B., Cantoni, C., Prato, C., Moretta, L., Moretta, A., & Marcenaro, E. (2017). The Innate Immune Cross Talk between NK Cells and Eosinophils Is Regulated by the Interaction of Natural Cytotoxicity Receptors with Eosinophil Surface Ligands. *Frontiers in Immunology*, 8, 510. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00510>
- Prizment, A. E., Vierkant, R. A., Smyrk, T. C., Tillmans, L. S., Lee, J. J., Sriramarao, P., Nelson, H. H., Lynch, C. F., Thibodeau, S. N., Church, T. R., Cerhan, J. R., Anderson, K. E., & Limburg, P. J. (2016). Tumor eosinophil infiltration and improved survival of colorectal cancer patients: Iowa Women's Health Study. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 29(5), 516–527. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.42>
- Sadozai, H., Gruber, T., Hunger, R. E., & Schenk, M. (2017). Recent Successes and Future Directions in Immunotherapy of Cutaneous Melanoma. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01617>
- Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of Melanoma. *Medical Sciences*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/medsci9040063>
- Sanborn, J. Z., Chung, J., Purdom, E., Wang, N. J., Kakavand, H., Wilmott, J. S., Butler, T., Thompson, J. F., Mann, G. J., Haydu, L. E., Saw, R. P. M., Busam, K. J., Lo, R. S., Collisson, E. A., Hur, J. S., Spellman, P. T., Cleaver, J. E., Gray, J. W., Huh, N., ... Cho, R. J. (2015). Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), 10995–11000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508074112>
- Simon, S. C. S., Hu, X., Panten, J., Grees, M., Renders, S., Thomas, D., Weber, R., Schulze, T. J., Utikal, J., & Umansky, V. (2020). Eosinophil accumulation predicts response to melanoma treatment with immune checkpoint inhibitors. *Oncolmmunology*, 9(1), 1727116. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1727116>
- Social Science Statistics*. (s.a.-a). T-Test Calculator for 2 Independent Means. Salvestatud 26. aprill 2023, <https://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/default2.aspx>
- Social Science Statistics*. (s.a.-b). Mann-Whitney U Test Calculator. Salvestatud 26. aprill 2023, <https://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/default2.aspx>
- Statistics Kingdom*. (s.a.). Shapiro-Wilk Test Calculator. Salvestatud 26. aprill 2023, <https://www.statskingdom.com/shapiro-wilk-test-calculator.html>
- Steel, J. L., Kim, K. H., Dew, M. A., Unruh, M. L., Antoni, M. H., Olek, M. C., Geller, D. A., Carr, B. I., Butterfield, L. H., & Gamblin, T. C. (2010). Cancer-related symptom clusters, eosinophils, and survival in hepatobiliary cancer: An exploratory study. *Journal of Pain and Symptom Management*, 39(5), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2009.09.019>
- Suami, H., & Scaglioni, M. F. (2018). Anatomy of the Lymphatic System and the Lymphosome Concept with Reference to Lymphedema. *Seminars in Plastic Surgery*, 32(1), 5–11. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1635118>

- Zbytek, B., Carlson, J. A., Granese, J., Ross, J., Mihm, M. C., & Slominski, A. (2008). Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert review of dermatology*, 3(5), 569–585. <https://doi.org/10.1586/17469872.3.5.569>
- Zhou, S., Lu, J., Liu, S., Shao, J., Liu, Z., Li, J., & Xiao, W. (2023). Role of the tumor microenvironment in malignant melanoma organoids during the development and metastasis of tumors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2023.1166916>
- Teras, M. (2020). *Melanoma Markers and New Treatment Perspectives*.
- Thiem, A., Hesbacher, S., Kneitz, H., di Primio, T., Heppt, M. V., Hermanns, H. M., Goebeler, M., Meierjohann, S., Houben, R., & Schrama, D. (2019). IFN-gamma-induced PD-L1 expression in melanoma depends on p53 expression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 397. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1403-9>
- Tucci, M., Passarelli, A., Mannavola, F., Felici, C., Stucci, L. S., Cives, M., & Silvestris, F. (2019). Immune System Evasion as Hallmark of Melanoma Progression: The Role of Dendritic Cells. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.01148>
- Ueki, S., Konno, Y., Takeda, M., Moritoki, Y., Hirokawa, M., Matsuwaki, Y., Honda, K., Ohta, N., Yamamoto, S., Takagi, Y., Wada, A., & Weller, P. F. (2016). Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(1), 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.041>
- van Driel, W. J., Hogendoorn, P. C., Jansen, F. W., Zwinderman, A. H., Trimbos, J. B., & Fleuren, G. J. (1996). Tumor-associated eosinophilic infiltrate of cervical cancer is indicative for a less effective immune response. *Human Pathology*, 27(9), 904–911. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(96\)90216-6](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(96)90216-6)
- Vandamme, N., & Berx, G. (2019). From neural crest cells to melanocytes: Cellular plasticity during development and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 76(10), 1919–1934. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03049-w>
- Varricchi, G., Galdiero, M. R., Loffredo, S., Lucarini, V., Marone, G., Mattei, F., Marone, G., & Schiavoni, G. (2018). Eosinophils: The unsung heroes in cancer? *Oncology*, 7(2), e1393134. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1393134>
- Viguier, M., Lemaître, F., Verola, O., Cho, M.-S., Gorochov, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P., & Ferradini, L. (2004). Foxp3 Expressing CD4+CD25high Regulatory T Cells Are Overrepresented in Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes and Inhibit the Function of Infiltrating T Cells1. *The Journal of Immunology*, 173(2), 1444–1453. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1444>
- Webster, M. R., Fane, M. E., Alicea, G. M., Basu, S., Kossenkov, A. V., Marino, G. E., Douglass, S. M., Kaur, A., Ecker, B. L., Gnanapradeepan, K., Ndoye, A., Kugel, C., Valiga, A., Palmer, J., Liu, Q., Xu, X., Morris, J., Yin, X., Wu, H., ... Weeraratna, A. T. (2020). Paradoxical Role for Wild-Type p53 in Driving Therapy Resistance in Melanoma. *Molecular Cell*, 77(3), 633–644.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.009>
- Wendlinger, S., Wohlfarth, J., Kreft, S., Siedel, C., Kilian, T., Dischinger, U., Heppt, M. V., Wistuba-Hamprecht, K., Meier, F., Goebeler, M., Schadendorf, D., Gesierich, A., Kosnopfel, C., & Schilling, B. (2022). Blood Eosinophils Are Associated with Efficacy of Targeted Therapy in Patients with Advanced Melanoma. *Cancers*, 14(9), 2294. <https://doi.org/10.3390/cancers14092294>

- Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters*, *387*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>
- Yeh, I. (2020). New and evolving concepts of melanocytic nevi and melanocytomas. *Modern Pathology*, *33*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0390-x>
- Yi, J., Jung, J., Hong, S.-W., Lee, J. Y., Han, D., Kim, K. S., Sprent, J., & Surh, C. D. (2019). Unregulated antigen-presenting cell activation by T cells breaks self tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(3), 1007–1016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818624116>
- Youngblood, B. A., Leung, J., Falahati, R., Williams, J., Schanin, J., Brock, E. C., Singh, B., Chang, A. T., O’Sullivan, J. A., Schleimer, R. P., Tomasevic, N., Bebbington, C. R., & Bochner, B. S. (2021). Discovery, Function, and Therapeutic Targeting of Siglec-8. *Cells*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/cells10010019>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Helinda-Eliise Saapar (*autori nimi*)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
RAKULISED MUUTUSED LÜMFISÕLMES MELANOOMI METASTAASI KORRAL
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on Sirje Rüütel Boudinot ja Airi Rump
(*juhendaja nimi*)

- 1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

31.05.2023 (kuupäev)

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtjaja jooksul ei kehti.