

**MAKROFAGIT IHON BENIGNEISSÄ JA
MALIGNEISSA MELANOSYYTTISISSÄ
TUUMOREISSA SEKÄ
IMUSOLMUKEMETASTAASEISSA**

Emmi Liukkonen

Syventävät opinnot

Lääketieteen koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos/ Biolääketiede

Toukokuu/2019

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma

EMMI LIUKKONEN: Makrofagit ihon benigneissä ja maligneissa melanosyyttisissä tuumoreissa sekä imusolmukemetastaasessa

Syventävien opintojen opinnäytetyö

Ohjaaja: Dosentti Sanna Pasonen-Seppänen

Toukokuu 2019

Avainsanat: melanooma, makrofagit, CD68, CD163

TIIVISTELMÄ

Melanooma on yksi Suomessa ja muissa länsimaissa jatkuvasti yleistyvistä syöpäsairauksista. Melanooman tärkeimpiin riskitekijöihin kuuluu auringon UV-säteily ja sen aiheuttamat vauriot ihossa. Iho on immunologinen elin ja ihon immunologisilla mekanismeilla pystytään korjaamaan esimerkiksi UV-säteilyn aiheuttamia vaurioita. Kun ihon omat korjausmekanismit eivät riitä, voi kehittyä maligniteetti.

Ihon immuunipuolustuksessa keskeisessä asemassa ovat makrofagit. Niillä on todettu olevan sekä immunitettä vahvistavia että sitä vaimentavia vaikutuksia. Monista syöpäsairauksista on löydetty makrofageja tuumoreiden ympäristöstä ja makrofagien määrä vaikuttaisi liittyvän useimmin aggressiivisempaan ja invasoivampaan tautiin. Myös melanoomissa on todettu löytyvän makrofageja.

Melanooma voidaan hoitaa varhaisen taudin vaiheessa kirurgisesti, mutta levinneen taudin hoitoon ei vielä ole riittävän tehokkaita lääkehoitoja, jotta voitaisiin tavoitella myös näissä tapauksissa kuratiivista hoitoa. Uusia immunologisiin mekanismeihin perustuvia lääkkeitä kuitenkin kehitetään.

Tässä työssä selvitettiin immunohistokemiallisten värjäysten avulla makrofagien esiintymistä näytteissä, joihin kuului erilaisia benignejä neevuksia, dysplastisia neevuksia, in situ -melanomia, pinnallisia melanomia (Breslow <1mm) ja syviä melanomia (Breslow >4mm) sekä imusolmukemetastaaseja. Näytteistä laskettiin visuaalisesti melanosyyttejä. Kustakin näytteestä pyrittiin löytämään viisi kohtaa (hot spot), joissa makrofageja esiintyy eniten ja makrofagit laskettiin näiltä alueilta.

Näytteistä löydettiin analysoitaviksi sopivia alueita. Tutkitussa aineistossa oli vaihteleva määrä makrofageja, mutta pääasiassa vaikuttaisi siltä, että benigneissä neevuksissa makrofagien määrä oli kaikista vähäisin ja eniten makrofageja löytyi syvistä melanoomista.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of health sciences

School of medicine

Medicine

EMMI LIUKKONEN: Macrophages in benign and malign melanocytic tumors of the skin and lymph node metastasis

Thesis

Tutor: Sanna Pasonen-Seppänen, Docent

May 2019

Keywords: melanoma, macrophages, CD68, CD163

ABSTRACT

Melanoma is one of the most rapidly increasing cancer diseases in Finland as well as other western societies. Perhaps the most important risk factor for melanoma is UV radiation, which causes damage to the skin. The skin is an immunologic organ and its normal function can to some extent repair the damage that UV radiation causes. When these mechanisms fail, can malignancies occur.

Macrophages play a significant role in skin immune defense. Macrophages have both tumor promoting and tumor suppressing abilities. They can be immunogenic or immunosuppressive. Macrophages have been found in the microenvironment of several cancers as well as melanomas. Often the presence of macrophages has related to more invasive and aggressive tumors.

In the early stages melanoma can be cured operatively. In more advanced stages the therapies are limited and a curative result is rarely possible.

In this study macrophages were counted from samples containing benign nevi, dysplastic nevi, in situ melanomas, superficial melanomas (Breslow <1mm), deep melanomas (Breslow >4mm) and lymph node metastasis. The samples were stained with two different antibodies, anti-CD68 and anti-CD163, and the number of macrophages in was analyzed using a hot spot method. There was a varying amount of macrophages in the analyzed samples but mainly the lowest amounts were found in the benign nevi and the highest on the deep melanomas.

SISÄLLYS

Tiivistelmä.....	2
Abstract	3
JOHDANTO.....	5
KIRJALLISUUSKATSAUS	6
Melanooma yleisesti	6
Melanooman genetiikka ja immunologia.....	7
Luokittelu	8
Etiologia	10
Diagnostiikka.....	11
Lääkehoito	12
Kasvaimen mikroympäristö.....	14
Makrofagit	14
Sytokiinit	16
Makrofagit ja syöpä.....	16
Makrofagit ja melanooma.....	19
TYÖN TARKOITUS	21
AINEISTO JA MENETELMÄT	22
Näytteet.....	22
Immunohistokemialliset värjäykset	23
Näytteiden analysointi	24
TULOKSET	24
POHDINTA.....	27
LÄHTEET	30

JOHDANTO

Melanooma on yksi nopeimmin lisääntyvistä syöpäsairauksista sekä Suomessa että muissa länsimaissa. (4). Melanooma on ihon pahanlaatuisin syöpä ja levinneen melanooman ennuste on heikko.

Pinnallinen melanooma voidaan helposti hoitaa leikkauksella mutta jotta tämä hoito olisi riittävä, tulee melanooma todeta riittävän varhaisessa vaiheessa. Jos diagnostiikka viivästyy, pääsee melanooma usein kasvamaan, jolloin hoito voi olla monimutkaisempaa. Melanooma leviää imuteitse ja usein ensimmäiset etäpesäkkeet löytyvät niin kutsutuista vartijaimusolmukkeista. Levinneessä taudissa etäpesäkkeitä voi löytyä myös muista elimistä, kuten keuhkoista, maksasta ja aivoista. Metastaasit ovat melanoomassa huonon ennusteen merkki ja usein metastasoitunut tauti etenee aggressiivisesti.

Levinneen taudin hoidossa kyseeseen tulee myös lääkehoito. Käytössä on tällä hetkellä Suomessa solunsalpaajahoido, biologiset lääkkeet (interferoni alfa) sekä ipilimumabi, joka vaikuttaa T-solujen toimintaan ja vemurafenibi, jota käytetään BRAF-mutaatiopositiivisten potilaiden hoidossa. Lisäksi uusia immunologiisiin mekansimeihin perustuvia lääkkeitä ovat nivolumabi ja pembrolitsumabi, jotka niin ikään vaikuttavat tuumorin aiheuttamaan immuunivasteeseen. Tehokasta vakiintunutta hoitokäytäntöä levinneen taudin hoitoon ei vielä ole ja melanooman lääkehoito on aktiivinen tutkimuskohde maailmanlaajuisesti.

Melanoomassa on todettu olevan immunologisia ja geneettisiä ominaisuuksia, jotka ovat mielenkiintoisia taudin etenemisen ja hoitojen tehon kannalta. Nämä ominaisuudet ja mekanismit eivät kuitenkaan ole vielä täysin selvillä ja tutkimalla tarkemmin taudin etenemistä on mahdollista saada uutta tietoa näistä mekanismeista.

Tässä työssä perehdytään kirjallisuuskatsausosiossa yleisesti melanoomaan sairautena ja melanooman geneettisiin ja immunologisiin ominaisuuksiin, keskittyen erityisesti makrofageihin. Lisäksi työssä on tutkimusosio, jossa on tarkasteltu eriasteisia melanoomakasvaimia ja näissä esiintyviä makrofageja.

KIRJALLISUUSKATSAUS

Melanooma yleisesti

Melanooma on ihon melanosyytien syöpä. Melanosyytit ovat ihon pigmenttiä, melaniinia, tuottavia soluja. Niitä esiintyy tavallisesti ihon epidermoksen tyvisolukerroksessa, mutta myös dermiksessä tai epidermoksen muissa kerroksissa voi normaalisti esiintyä melanosyyttejä.

Melanooma on pahanlaatuisin ihon kasvaimista, 80 % ihosyöpään kuolleista kuolevat melanoomaan (7). Melanooma on länsimaissa ja valkoihoisen väestön keskuudessa yksi nopeimmin yleistyviä syöpiä. Sen yleistymisen syynä pidetään lisääntyntä altistumista auringon ultravioletisäteilylle.(1). Vuonna 2016 Suomessa todettiin 1947 uutta ihomelanoomatapausta, nämä jakaantuivat lähes tasaisesti sekä miehille että naisille, sairastuneita miehiä oli 975 ja naisia 972. Melanooma oli kyseisenä tarkasteluvuonna Suomen 6. yleisin syöpätauti. (4).

Melanooma voi esiintyä missä tahansa kohtaa ihossa ja se näyttää lähes normaalilta luomelta. Yleensä melanooma on kuitenkin suurempi kuin tavallinen luomi, sen rajat voivat olla epätarkat ja väri epätasainen, joskus siinä voi olla jopa haavaumia, eli ulseraatiota. Joskus melanooma kehittyy jo olemassa olevaan luomeen, tällöin luomi voi alkaa kasvaa tai tummentua ja sen rajat tai pinta voivat muuttua epäsäännöllisiksi. Luomi voi myös alkaa kutista ja sen ympäristö punoittaa, joskus luomi voi jopa alkaa vuotaa verta. (3).

Melanooma todetaan ihosta tai luomesta otetusta koepalasta. Näyte otetaan yleensä perusterveydenhuollossa joko veneviillolla tai stanssibiopsialla riippuen muutoksen laadusta ja sijainnista. Näyte lähetetään formaliinifikoituna patologian laboratorioon, jossa näyte valmistellaan mikroskooppitutkimusta varten. Melanoomassa nähdään mikroskoopilla maligneja soluja, josta merkinä on lisääntynyt solujen atypia, mitoosikuviot ja muodon vaihtelu. Pigmenttiä voi olla vaihtelevasti. Kasvainalueella voi näkyä myös tulehdussolukkoa. Diagnoosi voidaan tarvittaessa varmistaa histologisen tutkimuksen jälkeen immunohistokemiallisilla tutkimuksilla.

Melanooman genetiikka ja immunologia

Ihomelanoomissa on todettu esiintyvän tiettyjä geenivirheitä, jotka lisäävät kasvaimen kasvupotentiaalia. Tunnetuimmat mutaatiot ovat BRAF- (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) ja NRAS (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) - mutaatiot. Nämä mutaatiot vaikuttavat liittyvän myös huonompaan ennusteeseen levinnyttä tautia sairastavilla potilailla. (5)

Noin 50 % ihomelanoomissa todetaan BRAF-mutaatio. BRAF-mutaatio voidaan todeta kasvaimesta PCR-menetelmillä. Markkinoilla on myös spesifejä BRAF-estäjiä kuten vemurafenibi ja dabrafenibi, jotka toimivat mutaatioposiitivisten potilaiden hoidossa. (6)

Melanooma on yksi niistä syöpäsairauksista, joilla on todettu olevan immunologisia mekanismeja. Melanoomatuumoreissa on usein merkittävä määrä raskaasti mutatoituneita soluja. Mutaatioita sisältävät solut voivat tuottaa molekyyliä, joita solut eivät normaalisti tuota. Immuunipuolustuksen solut voivat tunnistaa näiden molekyylien perusteella mutatoituneet solut elimistölle vieraisiksi ja immuunipuolustusmekanismit aktivoituvat. Makrofagit toimivat tässä puolustusmekanismeissa antigeenejä esittelevinä soluina ja ne aktivoivat soluvälitteisiä puolustusmekanismeja. Jotta tuumori voi kasvaa, sen täytyy onnistua välttämään elimistön puolustusmekanismit, jotka pyrkivät tuhoamaan poikkeavia soluja. (38)

Tuumorissa on usein mukana huomattava määrä soluja, jotka voivat aiheuttaa immunologisen vasteen. Tämä vaste voi vaihdella yksilön ominaisuuksien mukaan. Tuumorin aiheuttamalla tulehdusreaktiolla voi olla sekä tuumorin kasvua ja leviämistä edistäviä että sitä ehkäiseviä ominaisuuksia. (10)

Vaikka melanooman tuumorisolut saavat aikaan voimakkaan immunologisen vasteen, yleensä immuunipuolustus ei kykene hävittämään tuumorisoluja, vaan soluilla on useita mekanismeja, joilla ne väistävät immuunipuolustuksen mekanismeja. Tuumorisolukko voi kehittyä immuunivasteen myötä enemmän sellaiseen suuntaan, jota immuunipuolustuksen solut eivät tunnista, kun puolustusjärjestelmän tunnistaneet solut tuhoutuvat. Melanooman tuumorisoluilla on lisäksi mekanismeja, joilla ne suoraan vaikuttavat tuumorin aiheuttamaan immuunivasteeseen.(39)

Immuunipuolustuksen säätelyyn perustuvia hoitoja melanoomassa ovat mm. Interferonihoidot, sekä T-soluvasteeseen vaikuttavat ipilimumabi, nivolumabi ja pembrolitsumabi.

Luokittelu

Melanoomat voidaan luokitella kliinisten ominaisuuksien ja histopatologian perusteella neljään luokkaan: pinnallisesti leviävä, kyhmyinen (nodulaarinen), lentigo maligna ja raajojen kärkiosien lentigomainen melanooma (3). Pinnallisesti leviävä melanooma kehittyy usein auringolta suojattuun ihoon ja on hyväennusteinen, kyhmyinen melanooma puolestaan on hiukan huonoennusteisempi, koska se kasvaa syvyyssuunnassa ja lähettää todennäköisemmin etäpesäkkeitä. Lentigo maligna- melanooma kehittyy usein vanhalle ihmiselle paljon auringolle altistuneelle alueelle, kuten kasvoihin, se on usein hyvänlaatuinen ja harvoin lähettää etäpesäkkeitä. Raajojen kärkiosien lentigomainen melanooma esiintyy kämmenissä tai jalkapohjissa, kynsien alla ja joskus harvoin suun limakalvoilla.

Melanosyyttiset tuumorit jaotellaan histologian perusteella Clarkin luokituksen mukaan tyyppeihin I-V tuumorin kudosisvaasion perusteella. Clarkin luokituksessa I = in situ, II = invaasio papillaariseen dermikseen, III = täyttää papillaarisen dermiksen, IV = invaasio retikulaariseen dermikseen ja V = invaasio subkutikseen.

Melanooman pahan-/hyvänlaatuisuutta voidaan arvioida melanoomatyypin lisäksi sen syvyyskasvun perusteella. Breslow'n luokituksen mukaan syvyyskasvu mitataan epidermiksen jyväissolukerroksesta (granulaarikerroksesta) millimetreinä. Muita ennustekijöitä ovat haavautuminen (ulseraatio) ja imusolmukemetastaasien esiintyminen.

(3)

Lisäksi melanooman luokittelussa on käytössä yleisesti syöpätautien levinneisyyden arvioinnissa käytetty TNM-luokitus. Siinä syöpä luokitellaan primaarikasvaimen (T), imusolmukestatuksen (N) ja metastaasien perusteella levinneisyysluokkiin. T-luokka jakaantuu alaluokkiin 1-4 sen perusteella miten paksu kasvain on kyseessä, alle 1 mm paksuinen kasvain kuuluu luokkaan T1, 1-2 mm luokkaan T2, 2-4 mm luokkaan T3 ja yli 4 mm luokkaan T4. Kukin näistä alaluokista jaetaan vielä alaluokkaan a tai b sen mukaan onko kasvaimessa nähtävissä ulseraatiota vai ei. T-luokassa on myös Tis-ryhmä, johon kuuluvat melanoma in situ -löydökset. N-luokka jaetaan niin ikään alaluokkiin käyttäen kriteereinä metastaattisten imusolmukkeiden määrää. N0 tarkoittaa että ei ole todettavissa imusolmukemetastaaseja, N1-luokassa todetaan metastaasi yhdessä imusolmukkeessa, N2-luokassa todetaan imusolmukemetastaaseja 2-3 imusolmukkeessa ja N3-luokassa metastaaseja todetaan 4 tai useammassa imusolmukkeessa. M-luokka jakaantuu vain kahteen pääluokkaan, M0 jossa ei todeta metastaaseja sekä M1 jossa todetaan metastaaseja. TNM-luokituksen avulla voidaan määrittää siis kasvaimen levinneisyysaste, jonka avulla voidaan arvioida potilaan ennustetta.

Vaikka melanooma ei aina ole lähtöisin hyvänlaatuisesta luomesta, kun taudin etenemisen syytä tutkitaan, sen voidaan ajatella alkavan luomesta, joka kehittyy dysplastiseksi neevukseksi ja edelleen maligniksi melanoomaksi. Tällöin taudissa on viisi

eri vaihetta: benigni neevus, eli hyvänlaatunen luomi, dysplastinen neevus, radiaalisen kasvun vaihe, vertikaalisen kasvun vaihe ja metastoittava melanooma. (7)

Etiologia

Melanooma on yhtä yleinen naisilla ja miehillä. Miehillä muutoksia tavataan useammin vartalossa kun taas naisilla raajoissa. Naisilla on tyypillisesti parempi ennuste, tähän vaikuttaa se että naisilla on enemmän parempiennusteisia melanoomia ja tyypillisesti naiset hakeutuvat hoitoon taudin aikaisemmassa vaiheessa. Melanooman sairastuvuus on suurimmillaan noin 60 ikävuoden tienoilla, lapsilla melanoomat ovat harvinaisia.

Melanooman tärkein riskitekijä on auringon ultraviolettisäteilylle altistuminen. Erityisesti tarkoituksellinen auringonotto vapaa-ajalla, solariumin säännöllinen käyttö sekä lapsuudessa ihon palaminen ovat tunnettuja riskitekijöitä.

Suurin osa auringon säteilystä on UVA-säteilyä, joka saa ihossa aikaan oman pigmentin tummumista ja pieni osa säteilystä on UVB-säteilyä, joka lisää ihon pigmenttiä. UV-säteily voi myös saada aikaan ihossa DNA-vaurioita. Näiden vaurioiden kehittyminen on keskeinen mekanismi ihosyöpien kehittymisessä. Sekä UVA-, että UVB-säteily voivat saada aikaan DNA-vaurioita, mutta mekanismit ovat erilaiset. UVA-säteilyn aiheuttamat vauriot perustuvat pääasiassa säteilyn muodostamien happiradikaalien reaktioihin. UVB-säteily voi saada aikaan soluissa mutaatioita muodostamalla syklobutaani-pyrimidiinidimeerejä ja pyrimidiini-pyridonituotteita.

Raajat ja vartalon alue tyypillisesti altistuu auringonvalolle vain jaksoittain. Näillä alueilla tyypillisesti esiintyy parempiennusteisia, pinnallisesti leviäviä melanoomatyyppisiä. Puolestaan jatkuvasti auringolle altistuvilla ihoalueilla, kuten pään ja kaulan alueella esiintyy enemmän lentigo maligna -tyyppisiä melanoomia. Jalkapohjien, kämmenten ja kynsien alueen melanooma liittyy edellistä vähemmän valoaltistukseen. (8)

Yksilölliset ominaisuudet vaikuttavat ihon palamisherkkyyteen. Ihosyöpäriskiä arvioitaessa käytetään Fitzpatrickin ihotyypiluokitusta, joka huomioi ihon, hiusten ja silmien värin, ihon palamisherkkyyden ja ruskettumistaipumuksen. Siinä ihotyypit on jaoteltu kuuteen luokkaan, joista tyyppi I on auringolle herkin.

Toinen merkittävä melanooman riskiä lisäävä tekijä on runsasluomisuus. (8).

Melanooman ennustetta voidaan jaotella vartijaimusolmuketutkimuksen perusteella.

Mikäli todetaan metastasointi vartijaimusolmukkeisiin, on potilaalla huonompi ennuste kuin jos metastasointia ei todeta. 5-vuoden elossaolo potilailla joilla ei todeta vartijaimusolmukemetastasointia on jopa 90 % kun taas potilailla joilla metastasointia todetaan jää sama ennuste 60-70 % luokkaan. (11,12)

Diagnostiikka

Taudin alkuvaiheen diagnostiikka ja hoito on melanoomassa tärkeää, selviytymisaste yleensä heikkenee jos tauti pääsee etenemään ilman hoitoa. Luomen pahanlaatuisuuden arviointiin käytetään yleisesti nk. ABCDE-sääntöä, jonka perusteella kliinisesti arvioidaan luomen epäsäännöllisyyttä (A=asymmetry), reunoja (B=border), väriä (C=color), kokoa (D=diameter, yli 6 mm on merkittävä) ja kasvua sekä muuttumista (E=evolution). Kliinisesti kuitenkin ei voi täysin poissulkea melanoomaa vaan näitä kriteereitä käytetään apuna muutoksen poistoa tai koepalan tarvetta arvioitaessa. Yleensä epäilty melanosyyttinen luomi poistetaan tai epäilyttävästä ihomuutoksesta otetaan koepala, jonka jälkeen patologi tutkii näytteet ja antaa vastauksen melanoomadiagnoosista.

Melanooma poistetaan kirurgisesti, poistettava alue määräytyy tuumorin levinneisyyden, erityisesti syvemmälle kudokseen invasoitumisen mukaan. In situ -muutoksissa riittää pienin marginaali, 0,5 cm. Alle 1 mm melanoomat poistetaan 1 cm marginaaleilla ja paksummat 1-2 cm marginaaleilla. Poisto tehdään faskiatasoon saakka. Tarvittaessa

laajojen poistojen vuoksi joudutaan iho sulkemaan erilaisten kielekkeiden ja ihonsiirteiden avulla.

Leikkauksen yhteydessä tehdään vartijasolmukemittaus, mikäli muutoksen paksuus on yli 1 mm tai luomessa on muita pahanlaatuisuuteen viittaavia merkkejä kuten haavaumia tai verisuonimuodostusta. Vartijaimusolmuketutkimuksella pyritään määrittämään onko melanooma metastasoinut lähimpiin imusolmukkeisiin. Jos metastasointia löydetään, myös nämä imusolmukkeet poistetaan, lisäksi onkologi tekee näille potilaille yksilöllisen hoitosuunnitelman.

Jos epäillään melanooman metastasoituneen jo kliinisen tutkimuksen perusteella, esimerkiksi tunnetaan palpoituvia imusolmukkeita, tehdään näiden imusolmukkeiden kaikukuvaus ja ohutneulabiopsia jo ennen leikkaushoitoa ja imusolmuke-evakuaatiota. Jos todetaan taudin levinneen paikallisiin imusolmukkeisiin, tehdään yleensä vartalon tietokone-TT tutkimus laajemman metastasoinnin tutkimiseksi.

Melanooman seuranta tapahtuu yleensä alkuun keskitetysti ihotautiklinikoissa. Potilaita seurataan leikkauksen jälkeen 6-12 kuukauden välein viiden vuoden ajan. Seurannassa tulee huomioida poistoalue ja paikalliset imusolmukealueet ja lisäksi potilaan yleisvointi ja uudet oireet. Rutiininomaisia kuvantamistutkimuksia ei suositella; tarpeen mukaan edetään kuvantamistutkimuksiin, mikäli epäillään taudin uusiutumista. (9)

Lääkehoito

Melanooma on yksi niistä syöpäsairauksista, johon on olemassa immunologisiin mekanismeihin perustuvia lääkityksiä. Melanooman lääkehoito on kuitenkin edelleen melko vähäistä. Lääkehoidolla pyritään pääasiassa joko vähentämään suuren riskin melanooman uusiutumista adjuvanttihoidolla, eli liitännäishoidolla. Pitkälle levinneessä

taudissa siirrytään tarvittaessa oireenmukaiseen, eli palliativiseen hoitoon potilaiden elämänlaadun parantamiseksi.

Vakiintunutta käytäntöä adjuvanttihoitoon ei ole ja esimerkiksi solunsalpaajista ei ole todettu olevan merkittävää hyötyä. Yleisimmin käytetty solunsalpaaja levinneen melanooman hoidossa on ollut dakarbatsiini.

Joissain tapauksissa adjuvanttihoitoon on käytetty interferoni- α :ta (INF-alfa); tällöin taudin uusiutumista onnistuttiin siirtämään, mutta vaikutusta kokonaiskuolleisuuteen ei ole havaittu ja hoidolla on paljon haittavaikutuksia.(13) Interferonihoitoa käytetäänkin Suomessa vain valikoiduissa tapauksissa suuren uusiutumisriskin potilaille.

Interferonihoidon lisäksi melanooman hoidossa on käytössä muitakin immuunivasteen kautta vaikuttavia lääkkeitä. Esimerkiksi T-soluvastetta voimistavat ipilimumabi, nivolumabi ja pembrolitsumabi.

Ipilimumabi on monoklonaalinen vasta-aine, joka estää CTLA-4-immuunijärjestelmän tarkastuspisteen ja siten salpaa tämän reitin indusoiman T-solujen inhibitorisen vasteen. Tällöin T-solujen määrä lisääntyy ja tuumorin aiheuttama immuunivaste voimistuu. Ipilimumabi oli ensimmäinen tarkastuspisteen estoon perustuva lääke, joka on otettu kliiniseen käyttöön. (40)

Nivolumabi ja pemrolitsumabi ovat myös monoklonaalisia vasta-aineita. Niiden vaikutus perustuu PD-1-reseptoriin sitoutumiseen. Tuumorisolut voivat ilmentää PD-L1 tai PD-L2 ligandeja, jotka sitoutuvat PD-1 reseptoriin ja saavat aikaan T-solujen toiminnan vaimenemisen. Estämällä näiden ligandien sitoutumisen PD-1 reseptoriin nivolumabi ja pembrolitsumabi voimistavat T-soluvastetta. (40)

Melanooman lääkehoito on aktiivinen tutkimuskohde ja uusia hoitomuotoja kehitetään jatkuvasti. Markkinoille on tullut pitkälle edenneen metastoituneen melanooman hoitoon virusgeeniterapiaa. Tässä käytetään heikennettyä replikaatiokykyistä Herpes Simplex 1-virusta, jota on geneettisesti muokattu siten että se tuottaa granulosyyttejä ja magrofageja stimuloivaa kasvutekijä GM-CSF:ää. Hoito annetaan kasvaimensisäisenä ruiskeena ja sen vaikutus perustuu viruksen lisääntymiseen kasvainsoilujen sisällä, joka rikkoo solun ja pyrkii siten suoraan tappamaan melanoomasoluja. Toisena vaikutusmekanismina on immuunivasteen stimuloiminen GM-CSF-kasvutekijällä. (14)

Kasvaimen mikroympäristö

Syövän kehityksessä kasvainta ympäröivällä kudoksella on merkitystä kasvaimen kasvun ja leviämisen kannalta, mikroympäristö voi edistää tai ehkäistä tuumorin kasvua. Kasvainta ympäröivän kudoksen ajatellaan nykyaikana olevan monipuolinen ja monimutkainen rakenne, joka koostuu monista eri solutyypeistä, joista suuri osa on tulehdussoluja. Myös kudoksen väliaineella on vaikutusta kasvaimen kasvuun. Solut kommunikoivat välittäjäaineiden välityksellä, välittäjäaineet voivat houkuttaa paikalle erilaisia soluja tai vaimentaa toisten solujen toimintaa.

Kasvaimen mikroympäristössä esiintyviä soluja ovat mm. kudospäliaineen, eli strooman solut, fibroblastit, immuunijärjestelmään liittyvät tulehdussolut kuten lymfosyytit, NK-solut ja makrofagit. Lisäksi mikroympäristöön lasketaan kuuluvaksi mm. kasvainta ympäröivä kudos, verisuonet ja soluväliaine, ekstrasellulaarimatriksi. (43)

Makrofagit

Makrofagit ovat immuunijärjestelmän soluja. Yleisen käsityksen mukaan ne kehittyvät luuytimessä promonosyyteistä verenkiertoon vapautuvista monosyyteistä. Monosyytit vaeltavat verenkierron mukana kudoksiin ja kypsyvät siellä makrofageiksi. Kudoksissa olevia makrofageja kutsutaan retikuloendoteliaaliseksi systeemiksi, koska makrofagit

ovat sijoittuneet sidekudokseen, verisuonia ympäröivälle tyvikalvolle sekä eri elimiin kehossa kuten keuhkoihin, maksaan ja keskushermostoon. (2)

Uudet tutkimukset ovat muokanneet käsitystä makrofagien alkuperästä. Uuden käsityksen mukaan suurin osa makrofageista syntyy jo sikiökaudella ja osassa kudoksista luuytimeistä lähteneet monosyytit korvaavat myöhemmin sikiökausia makrofageja. (15). Tulehdusreaktion aikana luuytimen monosyytit tuottavat tulehdusvasteena kudoksiin makrofagisolukkoa.

Ihossa tärkeitä ovat makrofagi-monosyytti-linjaan kuuluvat dendriittisolut, jotka toimivat soluvälitteisessä immunitetissä antigeeniä esittelevinä soluina.

Makrofagien tehtäviin kuuluu solunsisäisten mikrobien tuhoaminen, ylimääräisten partikkelien sekä elimistön omien, vaurioituneiden solujen (kuten syöpäsolut) hävittäminen. Lisäksi makrofagit osallistuvat soluvälitteiseen immunitettiin toimimalla antigeenejä esittelevinä soluina. (2). Kudoksessa olevat makrofagit ovat tärkeitä myös kudoksen uudelleen-muokkauksessa (16)

Makrofageilla on todettu olevan polarisaatiota, yleensä puhutaan M1- ja M2-tyypin makrofageista. M1-makrofageilla on immunitettä stimuloivia vaikutuksia ja ne tuottavat tulehdussytokiineja. M2- makrofagit puolestaan tehostavat angiogeneesiä ja kudonsvaurioiden paranemista sekä hiljentävät immunitettä. (17) Makrofagien polarisaatio muodostuu niiden ympäristön perusteella, tulehdusta lisäävässä ympäristössä makrofagit yleensä suuntautuvat M1-tyypin soluiksi ja allergiaan liittyviä välittäjäaineita sisältävässä ympäristössä puolestaan M2-tyypin soluiksi. (18)

Sytokiinit

Sytokiinit ovat immuunijärjestelmän solujen tuottamia yhdisteitä, joilla on monia tulehdusreaktiota sekä vahvistavia että heikentäviä vaikutuksia. Sytokiinit vaikuttavat mm. tulehdussolujen aktivaatioon ja erilaistumiseen ja säätelevät tulehdussolujen toimintaa.

Makrofagit tuottavat monia eri sytokiineja, erityisesti interleukiineja, tuumoreinekroositekijää (TNF), sekä interferoneja. Tulehdusreaktiota voimistavia sytokiineja ovat interleukiini-1 (IL-1) sekä tuumoreinekroositekijä (TNF). Tulehdusreaktiota vaimentavia sytokiineja puolestaan ovat esimerkiksi IL-10 ja transformoiva kasvutekijä B (TGF- β). Interferoneilla puolestaan on esimerkiksi antiproliferatiivisia vaikutuksia. (2)

Makrofagit ja syöpä

Yksi syöpätutkimuksen tärkeä osa-alue on kasvaimen ja sen mikroympäristön välisen vuorovaikutuksen tutkiminen. On todettu, että kasvainta ympäröivän strooman koostumuksella voi olla vaikutuksia myös mm. metastaasien syntyyn. Tuumorin mikroympäristössä on kasvutekijöitä, signaalimolekyylejä ja monenlaisia soluja, joilla kaikilla on vaikutuksia kasvaimen kasvuun. (19).

Tiedetään, että esimerkiksi pitkäkestoinen matala-asteinen tulehdus on merkittävä tekijä monen syöpäsairauden synnyssä. (20). Makrofagit tuottavat mm. sytokiineja ja kasvutekijöitä, jotka voivat ylläpitää matala-asteista tulehdusta. Usein kasvaimen ympäristössä ja infiltoituneena kiinteään kasvaimeen voidaan nähdä valkosoluja ja monesti makrofagit muodostavat merkittävän osuuden näistä soluista. (21).

Aiemmin on ajateltu, että makrofagit ovat osa syöpää vastaan toimivasta puolustussysteemistä, uudet tutkimustulokset kuitenkin osoittavat, että makrofageilla

saattaisi ennemminkin olla suurempia vaikutuksia kasvaimen kasvun edistämiseen ja angiogeneesiin sekä metastasointiin ja ekstrasellulaarisen matriksin muokkaamiseen. Tällöin makrofagit edesauttaisivat syövän kehitystä pahanlaatuisemmaksi. (22).

Useimmissa syövässä kasvain ja siihen liittyvät makrofagit voivat toimia yhteistyössä: syöpäsolut pystyvät houkuttelemaan paikalle makrofageja ja makrofagit tuottavat sytokiineja, jotka edistävät kasvaimen kasvua ja angiogeneesiä (23) Tutkimusten mukaan useimmissa syövässä makrofagien suuri määrä kasvaimen ympäristössä vaikuttaisi lisäksi korreloivan huonoon ennusteeseen. (22, 24)

Kuten edellä on mainittu, makrofageilla on olemassa polarisaatiota ja potentiaalisesti M1-tyypin makrofageilla on kasvaimen kasvua ehkäiseviä ominaisuuksia, kun taas M2-tyypin makrofageilla on kasvaimen kasvua edistäviä ominaisuuksia. On todettu, että syöpäkudoksessa on tyypillisesti monenlaisia makrofageja, on löydetty sekä sikiöaikaisia, että luuydinperäisiä soluja, lisäksi syöpäkudoksen ympäristö muokkaa makrofagien polarisaatiota joko tyypin 1 tai – 2 makrofageiksi. (18)

Makrofagien kasvaimia ehkäiseviä mekanismeja ovat esimerkiksi syöpäsolujen fagosytointi ja tappaminen. Lisäksi makrofagit voivat tunnistaa kuolevien solujen signaaleja ja fagosytoida näitä. Lisäksi makrofagit esittelevät syöpäantigeenejä ja lisäävät näin muita kasvaimen kasvua hillitseviä mekanismeja, kuten lymfosyyttivastetta. (18).

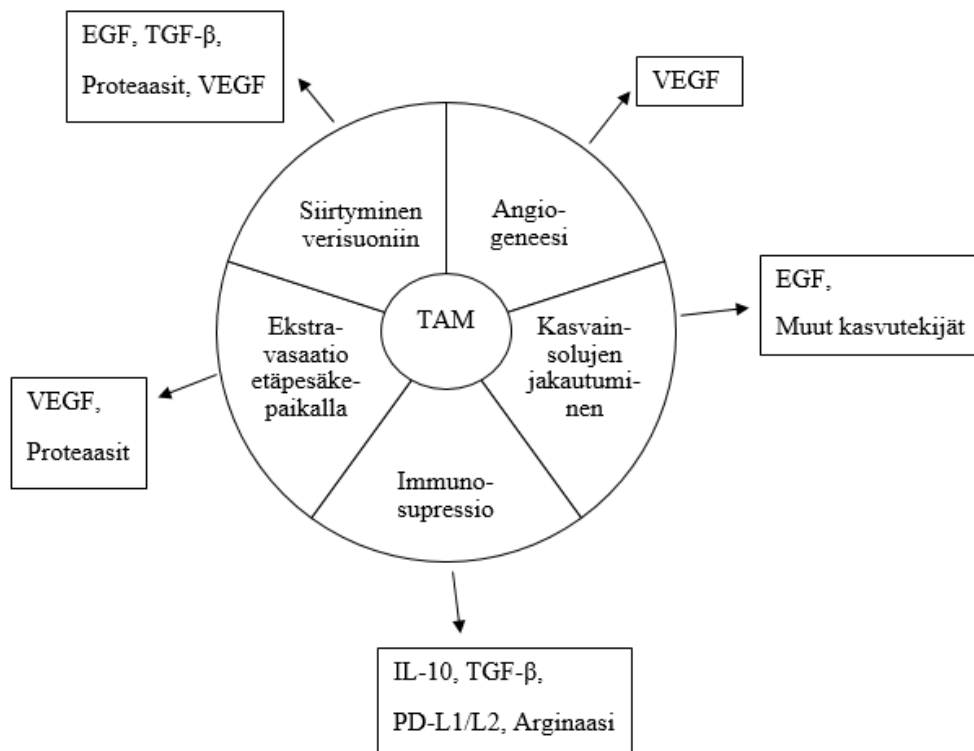
Kasvaimia edistävät makrofagit sijoittuvat yleensä syövän verisuonten ympärille, ne tuottavat runsaasti verisuonten uudismuodostusta lisääviä kasvutekijöitä, kuten VEGF:ää ja siten edistävät kasvaimen kasvupotentiaalia. (25) Lisäksi näillä makrofageilla on vaikutusta myös syöpäsolujen lisääntymiseen ja solujen invaasioon. (22)

Makrofagien rooli syövän synnyssä ja etenemisessä on kaksijakoinen. Kasvainta ympäröivä makrofagipopulaatio on hyvin heterogeeninen ja soluilla on siten monenlaisia

vaikutuksia. Lisäksi usein M1-tyyppin makrofageilla on merkitystä syövän kehittymisen alkuvaiheissa, M1-tyyppin makrofagit luovat kasvaimelle olosuhteet, joissa mutatoituneet solut voivat jakaantua tuottamalla solujen ympäristöön kasvutekijöitä. Solut voivat käynnistää muiden puolustussolujen aktivoinnin, joka osaltaan myös lisää kasvaimen kasvua. (41)

Myöhemmässä vaiheessa kasvaimeen liittyvät M2-tyyppin makrofagit edistävät tuumorin kasvua muokkaamalla kasvaimen mikroympäristöä immuunosuppressiivisemmäksi. M2-tyyppin makrofagit vaikuttavat tuottamiensa välittäjäaineiden kautta siten, että ne edistävät tuumorin kasvua, helpottavat primaarituumorin invaasiota, ja edistävät metastasointia. (42)

M2-tyyppin makrofagit toimivat huonosti antigeenejä esittelevinä soluina ja ne vaimentavat T-solujen tuottamaa immuunivastetta tuottamalla mm. IL-10:ää ja TGF-B:aa. T-solut ovat keskeisessä osassa elimistön puolustuksessa syöpäsoluja vastaan ja vaimentamalla syöpäsolujen aiheuttamaa immuunivastetta M2-tyyppin makrofagin auttavat syöpäsoluja piiloutumaan elimistön puolustusmekanismeilta. (42)



Kuva 1. Tuumoriin liittyvien makrofagien (TAM=tumor associated macrophages) ominaisuuksia ja niihin liittyviä välittäjäaineita. Mukailtu M. Salmi, Makrofagit ja syöpä, Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim, 2017;133(9):829-37 (18).

Makrofagit ja melanooma

Makrofageja on todettu löytyvän pahanlaatuisista melanoomista ja niiden määrän korreloivan huonon ennusteen kanssa kuten useimmissa muissakin syövässä (26).

Kasvainsolut pystyvät houkuttelemaan paikalle monosyyttejä, joista kehittyy makrofageja, tuottamalla erilaisia kemotaktisia yhdisteitä ja sytokiineja kuten MCP-1 (monocyte chemotactic proteiin 1), M-CSF (monocyte colony stimulating factor) ja VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A). Nämä makrofagit puolestaan voivat erittää sytokiineja ja entsyymejä, jotka voivat edistää kasvaimen angiogeneesiä ja ekstrasellulaarisen matriksin muokkausta. (26)

Makrofagit pystyvät myös erittämään tekijöitä, joilla voi olla kasvaimen kasvua rajoittavia vaikutuksia. Näitä ovat esimerkiksi sytokiinit TNF- α (tumour necrosis factor α), IL-12 ja IL-18 (27)

MCP-1 on molekyyli, joka houkuttelee makrofageja kohdekudokseen. Melanoomasoluissa esiintyy tätä molekyyliä ja on havaittu että sen toimintaa ehkäisemällä melanooma tuumorien kasvu ja angiogeneesi heikentyvät. (28)

Toisaalta matalat määrät MCP-1 molekyyliä saattavat olla myös yhteydessä kasvaimen kasvun edistämiseen. (29)

MCP-1 molekyylin vaikutukset perustuvat makrofagien välittämiin välittäjäaineisiin, mm. TNF- α , IL-1 ja VEGF. Lisäksi sillä on itsenäisiä suoria vaikutuksia melanoomasoluihin. (28)

VEGF-C kasvutekijää on havaittu melanoomissa. Tuumoreissa jotka ylituottavat VEGF-C:tä on todettu lisääntyntä makrofagien määrää ja tuumorin progressiota. VEGF-C:llä ei ole todettu itsenäisiä vaikutuksia tuumorisoluihin, sen vaikutukset ovat myös kaksijakoiset. Toisaalta lisääntynyt makrofagimäärä voi suojata kasvaimen kasvulta ja edistää kehon puolustusmekanismeja. (30)

Makrofagien polarisaatioon vaikuttavia sytokiineja ja kasvutekijöitä voi erittyä sekä makrofageista että melanoomasoluista. Polarisaatioon vaikuttavat mm. TGF-B (transformin growth factor B), IL-10 (interleukiini 10), ADM (adrenomedullini).

TGF-B:tä on todettu esiintyvän tuumorisoluissa. (31). M2-tyypin makrofagit tuottavat tätä kasvutekijää ja se edesauttaa makrofagien polarisaatiota M2-tyypin makrofageiksi. (32). Se voi myös vaimentaa M1-tyypin makrofagien vaikutusta, joka voi edistää melanoomakasvaimen säilymistä.(33).

IL-10 erittyy sekä valkosoluista että melanoomasoluista. IL-10 voi polarisoida makrofageja M2-tyyppin soluiksi muokkaamalla niiden toimintaa. Erittämällä IL-10:ä melanoomasolut voivat muokata tuumorin aiheuttamaa immuunivastetta.(34)

Adrenomedulliini on peptidimolekyyli, sitä ja sen reseptoreja löytyy ihon normaalirakenteista sekä maligneista ihomuutoksista. AM:llä on monia toimintoja, se on mm. osallisena ihon kasvunsäätelyssä ja sillä on myös merkitystä ihon puolustuskyvyssä. (35). Makrofageilla on osoitettu olevan merkittävä rooli adrenomedulliinin erittämisessä melanoomissa. Se voi edistää makrofagien polarisaatiota M2-tyyppin soluiksi ja siten edistää tuumorin kasvua ja angiogeneesiä. (36).

Makrofagien tuottamia aineita, jotka voivat edistää melanoomakasvaimen kasvua ja metastasointia ovat mm. interferonit, angiotensiini, syklo-oksigenaasi-2, interleukiinit.

Vaikka tiedetään, että makrofageja on syöpäkudoksessa ja sen ympäristössä ja että niillä on vaikutusta taudin etenemiseen ja on todettu korrelaatiota ennusteen ja makrofagien määrän välillä, silti tarkat mekanismit syöpäsolujen ja makrofagien toiminnan välillä ovat vielä epäselviä. Koska makrofagit pystyvät sekä edistämään, että hillitsemään kasvaimen kasvua ja syövän etenemistä, syöpäsolujen ja makrofagien välisten yhteyksien ymmärtäminen voisi auttaa mahdollisesti kehittämään uusia hoitomuotoja syöpää vastaan.

TYÖN TARKOITUS

Melanooma on yksi nopeimmin lisääntyneistä syöpäsairauksista niin Suomessa kuin muissakin länsimaissa. Pinnallinen melanooma on melko yksinkertaista hoitaa leikkaushoidolla, mutta levinneen taudin hoitokeinot ovat rajoitetut, ja levinneen taudin ennuste on tehokkaiden hoitojen puuttuessa kehno.

Melanooman hoito on maailmanlaajuisesti aktiivisen tutkimuksen kohde ja useiden syöpäsairauksien kohdalla on osoitettu että makrofageilla on merkitystä syövän kasvussa ja leviämisessä. Lisäksi makrofageilla on mielenkiintoisia vaikutuksia erilaisiin syöpälääkkeisiin.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin makrofagien ilmaantuvuutta eriasteisissa melanoomanäytteissä. Tämä tutkimus liittyy laajempaan kokonaisuuteen, jossa selvitetään mm. hyaluronaanin aineenvaihduntaan osallistuvien proteiinien ilmentymistä melanooman eri vaiheissa ja onko näillä proteiineilla ennusteellista merkitystä melanoomassa. Aineiston näytteistä on kerätty potilaiden kliiniset tiedot (mm. syövän uusiutuminen, mitoosiaktiivisuus, ulseraatio jne.) ja mikäli tässä tutkimuksessa nousee esille mielenkiintoisia tuloksia, tutkimusta on tarkoitus jatkaa pidemmälle, jossa selvitetään makrofagien assosiaatiota kliinisiin parametreihin sekä niiden määrän mahdollista ennusteellista merkitystä melanoomassa.

AINEISTO JA MENETELMÄT

Näytteet

Tutkimus oli retrospektiivinen ja siinä tarkasteltiin yhteensä 62 näytettä, joista 22 kpl benignejä neevuksia (6 n. junctionalis, 8 n. compositus, 8 n. Intradermalis), 9 kpl dysplastisia neevuksia, 8 kpl in situ melanomia, 7 kpl pinnallisia melanomia (Breslow <1mm), 9 kpl syviä melanomia (Breslow >4mm) ja 8 kpl imusolmukemetastaaseja. Näytteet on kerätty Kuopion yliopistollisessa sairaalassa vuosina 2000 – 2006. Tutkimus on hyväksytty Kuopion yliopistollisen sairaalan eettisen toimikunnan ja Suomen sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontaviraston (Valvira) toimesta. Kudoksenäytteiden ottamisen jälkeen ne on fiksoitu 10 % puskuroituun formaldehydiin, jonka jälkeen ne on valettu paraffiiniin ja leikattu 5 µm paksuisiksi leikkeiksi. Näytteille tehtiin immunohistokemiallinen värjäys vasta-aineilla CD68 ja CD163.

Vasta-aineista CD68 ajatellaan värjäävän kaikki makrofagi-monosyytti -linjan solut, mutta myös joitain normaaleja soluja, koska se reagoi lysosomeissa ja fagosomeissa sekä neutrofiilisissä primaarisissa granuloissa oleviin yhdisteisiin (37). CD163 ajatellaan olevan spesifimpi vasta-aine ja joidenkin tutkimusten mukaan spesifi nimenomaan M2-makrofageille (37).

Immunohistokemialliset värjäykset

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä pystytään tunnistamaan erilaisia soluja tai kudoksia niiden sisältämien antigeenien perusteella. Värjäyksissä käytetään primaarivasta-ainetta, joka tunnistaa halutun antigeenin ja liittyy siihen. Sekundaarivasta-aine pystyy tunnistamaan primaarivasta-aineen immunoglobuliiniosan. Immunoglobuliini on peräisin siitä eläimestä, jossa primaarivasta-aine on tuotettu. Sekundaarivasta-aine on biotinyloitu, jolloin siihen pystyy liittymään liitännäisentsyymi, ABC (avidini-biotiini -kompleksi). Tämä entsyymikompleksi voi puolestaan reagoida varsinaisen väriaineen, DABn (3,3-diaminobentsidiinitetrahydrokloridi) kanssa, jolloin näytteeseen muodostuu mikroskoopissa havaittavissa oleva sakka.

Näyteleikkeistä poistettiin paraffiini ja ne rehydroitiin laskevassa xyleeni – etanoli -sarjassa, jonka jälkeen ne lämpökäsiteltiin mikroaaltouunissa 0,01M sitraattipuskurissa, jotta solukalvo saadaan vastaanottavaiseksi vasta-aineille. Tämän jälkeen näytteille tehtiin endogeenisen peroksidaasin poisto käsittelemällä ne 1 % vetyperoksidissa 5 minuuttia. Näytteitä inkuboitii yön yli primaarisissa vasta-aineissa jääkaapissa. Värjäykset tehtiin rinnakkain molemmille vasta-aineille.

Käytetyt primaariset vasta-aineet olivat CD68 (MA5-13324, clone KP1, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) ja CD163 (MA5-11458, clone 10D6, Pierce Biotechnology, Rockford, USA).

Seuraavana päivänä näytteitä inkuboitii sekundaarisessa vasta-aineessa (50A) 1 tunti huoneenlämmössä, joka jälkeen näytteitä inkuboitii ABC-reagenssilla 1 tunti huoneenlämmössä. Värjäykset saatiin näkyviksi inkuboimalla niitä lopuksi 5 minuuttia DAB- liuoksessa, tämän jälkeen solujen tumat värjättiin hematoksyliinilla.

Näytteiden analysointi

Näytteet analysoitiin visuaalisesti käyttämällä valomikroskooppia (Carl Zeiss, Microscopy GmbH, Jena, Germany) ja 10x objektiivia. Jokaisesta näytteestä pyrittiin löytämään viisi näkymää, joissa on eniten makrofageja ja näiden määrä laskettiin. Näytteistä tarkasteltiin vain itse tuumorin aluetta ja sen välitöntä ympäristöä. Vasta-aineet värjäisivät solut ruskeiksi, osassa näytteitä oli laajoja ruskeaksi värjäytyneitä alueita, joissa soluja oli lähes madotonta erottaa. Näiden alueiden arveltiin koostuvan melaniinipigmenttiä sisältävistä soluista tai olevan suurien kasvaimien sisäosissa kuolleita soluja. Nämä alueet jätettiin huomiotta makrofageja laskiessa, vaikka makrofageja olisi voinut näillä alueilla ollakin.

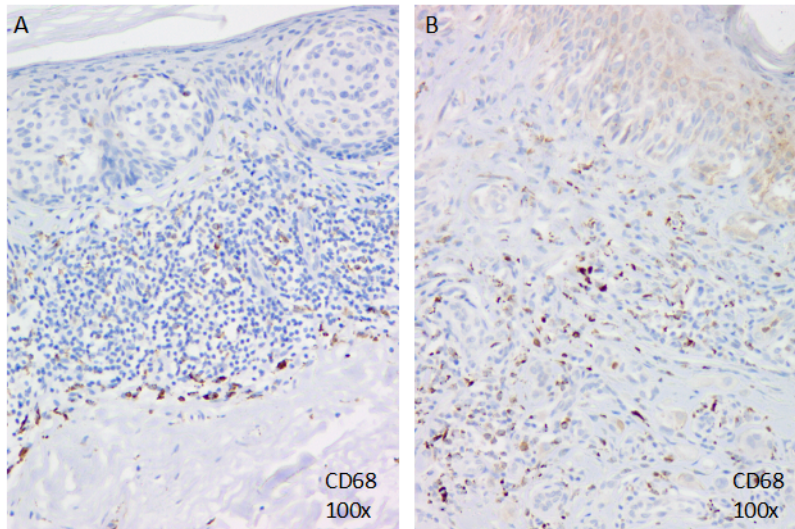
Viiden lasketun alueen makrofagimäärästä laskettiin keskiarvo ja tulokset taulukoitiin käyttämällä luokkia benign nevus, joka sisälsi kaikki tarkastellut hyvänlaatuiset luomet (n. Junctionalis, n. Compositus, n. Intradermalis), nevus dysplasticus, melanoma in situ, melanoma breslow<1mm, melanoma breslow>4mm sekä imusolmukemetastaasi.

Vaikka melanoma ei aina kehitykään jo olemassa olevaan luomeen, tuloksista tehtiin myös kuvaaja, jossa taudin ajateltiin kehittyvän luomesta edelleen dysplastiseksi ja siitä melanoomaksi ja edelleen imusolmukemetastaasiin. Näin voitiin vertailla miten makrofagien määrä muuttuu taudin eri vaiheissa.

TULOKSET

Näytteistä oli selvästi havaittavissa sekä CD68 että CD163 -positiivisia makrofageja ja niiden määrä vaikuttaisi jossain määrin korreloivan näytteen pahanlaatuisuuden kanssa. Sekä CD68- että CD163 -positiiviset makrofagit sijoittuivat pääasiassa tuumorin stroomaan. Osassa tutkituista näytteistä makrofagit sijoittuivat kasvaimeen liittyvän

lymfosyytti-infiltraation strooman puoleiselle osalle (kuva A) ja osassa näytteistä lymfosyyttisolukon keskelle (kuva B).



Kuva 2. Makrofagien (ruskea väri, CD68 värjäys) sijoittuminen melanosyyttisissä tuumoreissa (A=in situ melanooma; B=pinnallinen melanooma).

Vähiten CD68⁺ makrofageja oli hyvänlaatuisissa neevuksissa, kun taas eniten näitä makrofageja oli syvissä melanoomissa. Kaikkien luokkien kohdalla makrofagien määrä eri ryhmissä vaihteli suuresti näytteiden välillä.

Taulukko 1. Makrofagien määrä (keskiarvo) CD68-värjäyksessä.

Näyte	Benign nevus	Nevus dysplasticus	Melanoma in situ	Melanoma Breslow <1mm	Melanoma Breslow >4m m	imusolmuke-metastaasi
makrofagit	13	18	19	27	37	28
Min	6	5	9	17	15	15
Max	37	37	32	47	62	56
n (kpl)	21	9	8	7	9	8

CD163 vasta-aine tunnistaa M2-tyypin makrofagit. Ennako-odotuksena oli, että tällä värjäyksellä makrofagien määrä on pienempi. Tässä tutkimuksessa kuitenkin saatiin

suuremmat määrät makrofageja laskettua CD163 vasta-aineella. Voidaan olettaa, että suuri osa näytteissä värjäytyneistä makrofageista edusti siis M2-tyypin makrofageja. Hyvänlaatuisissa neevuksissa oli vähemmän CD163 -positiivisia soluja kuin pahalaatuisissa. Keskimäärin eniten CD163 -positiivisia makrofageja oli in situ melanoomassa tässä tutkimuksessa. Myös CD-163 värjäyksellä makrofagien määrät vaihtelivat kussakin ryhmässä runsaasti näytteiden välillä.

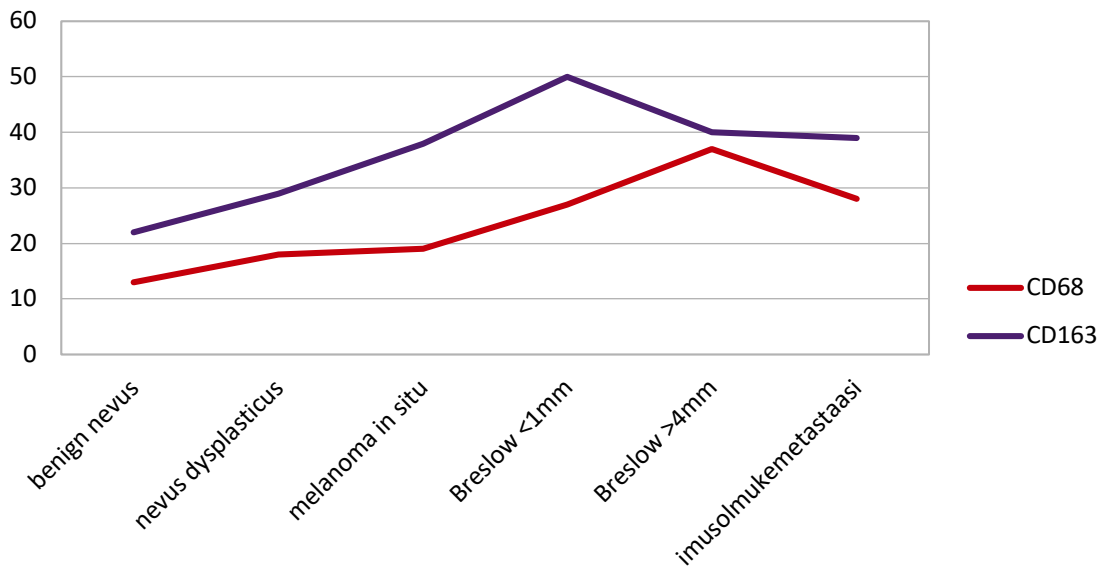
Taulukko 2. Makrofagien määrä (keskiarvo) CD163-värjäyksessä.

Näyte	Benign nevus	Nevus dysplasticus	Melanoma in situ	Melanoma Breslow <1mm	Melanoma Breslow >4mm	imusolmuke-metastaasi
makrofagit	22	29	38	50	40	39
Min	5	10	19	26	11	12
Max	42	57	60	93	80	70
n (kpl)	21	9	8	7	9	8

Näytteissä oli vaihteleva määrä makrofageja, mutta pääasiassa voidaan sanoa, että benigneissä neevuksissa makrofagien määrä oli pienempi kuin maligneissa tuumoreissa. Poikkeuksiakin löytyi ja nämä näytteet voisivat nimenomaan olla kiinnostavia, jos tutkimusta jatketaan ja selvitetään miten tauti on edennyt tutkimuskohteilla.

Tässä tutkimuksessa ei vielä ollut käytössä esimerkiksi tietoa tutkittavien hoidosta, taudin uusiutumisen tai elinajanodotuksesta, joten ei voida tehdä johtopäätöksiä siitä, onko makrofagien määrällä positiivisia vai negatiivisia vaikutuksia taudin etenemiseen.

Tässä tutkimuksessa aineiston koko oli kuitenkin vielä melko pieni, joten lopullisia päätelmiä siitä, onko makrofagien määrä suurempi maligneissa kuin benigneissä melanosyyttisissä tuumoreissa ei voida lopullisesti sanoa. Tulokset antavat kuitenkin viitteitä siitä, että makrofagien määrä mahdollisesti lisääntyy taudin asteen myötä.



Kuva 3. Makrofagien määrä (keskiarvo) suhteessa melanooman asteeseen.

POHDINTA

Melanooma on länsimaissa jatkuvasti yleistynyt syöpäsairaus. Sairauden ennuste riippuu pitkälti siitä missä vaiheessa melanooma todetaan. Varhaisessa vaiheessa todettuna melanooman ennuste on melko hyvä. Paikallisen melanooman hoito on melko yksinkertaista ja suoraviivaista, kirurgisella hoidolla saadaan monesti kuratiivinen vaikutus. Levinneen sairauden hoito on usein monimutkaisempaa ja hoitokeinot ovat rajalliset. Levinnyttä tautia hoidettaessa tavoitteena harvoin on kuratiivinen hoito, vaan taudin etenemistä pyritään olemassa olevin keinoin hillitsemään.

Melanooma yksi niistä syöpäsairauksista, joilla on todettu immunologisia mekanismeja. Yleisesti syöpäsairauksien suhteen ja melanooman kohdalla on todettu, että syöpään liittyvällä tulehdusreaktiolla on vaikutusta taudin etenemiseen ja mm. kasvaimen invaasioon. Tämä mahdollistaa monenlaisten uusien hoitomenetelmien kehittämisen, jotka perustuvat kasvaimen aiheuttaman immuunivasteen muunteluun.

Syöpätutkimuksen yksi keskeinen osa-alue on kasvaimen mikroympäristön tutkiminen. Matala-asteisella tulehduksella on todettu olevan merkitystä monien syöpäsairauksien synnyssä ja kasvaimen ympäristöllä on keskeinen rooli kasvaimen kasvussa ja esimerkiksi metastasoinnissa.

Makrofagit ovat keskeisessä osassa melanooman aiheuttamaa immuunivastetta ja niitä on todettu löytyvän eriasteisista melanoomista. Makrofageilla on sekä kasvaimen kasvua edistäviä ominaisuuksia, sekä kasvua ehkäiseviä ominaisuuksia. Useissa kasvaimissa on todettu esiintyvän runsaasti M2-tyypin makrofageja, joilla on enemmän kasvaimen kasvua edistäviä ominaisuuksia.

Monet tekijät vaikuttavat makrofagien polarisaatioon joko M1- tai M2-tyyppisiksi. Tärkeitä tekijöitä ovat mm. kasvaimen ominaisuudet sekä muiden makrofagien tuottamat välittäjäaineet.

Tämän työn tutkimusosiossa tarkasteltiin eriasteisia melanoomia, in-situ –muutoksia, sekä imusolmukemetastaaseja. Näytteistä värjättiin immunohistokemiallisesti CD68⁺ ja CD163⁺ makrofagit.

Työssä käytetyillä värjäysmenetelmillä havaittiin tutkituissa näytteissä makrofageja. CD163 värjäykset onnistuivat teknisesti CD68 värjäyksiä paremmin. CD68 värjäyksissä näytteisiin tuli jostain syystä paljon artefaktaa, joka hankaloitti solujen laskua.

CD163 vasta-aine tunnistaa M2-tyypin makrofagit, kun taas CD68 vasta-aine tunnistaa kaikki makrofagityypit. Tässä suhteessa oli yllättävää, että CD163 värjäyksellä saatiin laskettua suuremmat makrofagimäärät.

Keskimäärin tutkituissa näytteissä ilmeni enemmän makrofageja syvissä melanoomissa ja hyvänlaatuisissa muutoksissa makrofageja oli kaikista vähiten. Tutkituissa

imusolmukemetastaaseissa oli vähemmän makrofageja kuin melanosyyttisissä neevuksissa, mutta kuitenkin enemmän kuin hyvänlaatuisissa neevuksissa.

Tulos on johdonmukainen muiden samankaltaisten tutkimusten kanssa, joissa melanoomissa on todettu esiintyvän makrofageja. Ja koska makrofageilla on todettu olevan merkitystä kasvaimen kasvussa, on johdonmukaista että paksummissa melanoomissa esiintyy myös enemmän makrofageja.

Koska CD163 värjäyksen ajatellaan olevan spesifimpi M2-tyyppin makrofageille ja tällä värjäyksellä saatiin tutkituissa näytteissä esille suurimmat määrät makrofageja, voitaneen ajatella että tutkituissa näytteissä suurin osa havaituista makrofageista oli M2-tyyppin makrofageja. Myös tämä tulos on johdonmukainen muiden tutkimusten kanssa, joissa on todettu että suurin osa melanoomakasvaimiin liittyvistä makrofageista on nimenomaan M2-tyyppin makrofageja.

Tässä työssä ei tarkasteltu tarkemmin tutkitun aineiston osalta muita ominaisuuksia, mutta kliiniset tiedot esimerkiksi taudin uusiutumisesta on kerätty aiemmin. Koska nämä tiedot ovat käytettävissä, voisi olla mielenkiintoista tarkastella taudinkulkua ja sitä onko kasvaimen yhteydessä esiintyvillä makrofageilla yhteyttä tutkitussa aineistossa taudin etenemiseen. Jotta tutkimuksesta voitaisiin tehdä mitään johtopäätöksiä, tulisi tarkasteltavien näytteiden määrä olla myös riittävän suuri, joten näytteitä tulisi analysoida lisää ja tuloksista tulisi tehdä tilastollisia analyysyjä.

LÄHTEET

- (1) Mäkinen Markus, Carpén Olli, Kosma Veli-Matti, Lehto Veli-Pekka, Paavonen Timo & Stenbäck Frej (2012) Patologia. Duodecim.
- (2) Hedman Klaus, Heikkinen Terho, Huovinen Pentti, Järvinen Asko, Meri Seppo & Vaara Matti. (2011) Immunologia. Duodecim.
- (3) Joensuu Heikki, Roberts Peter J, Kellokumpu-Lehtinen Pirkko-Liisa, Jyrkkiö Sirkku, Kouri Mauri & Teppo Lyly (2013) Syöpätaudit. Duodecim.
- (4) www.syoparekisteri.fi
- (5) Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS ym. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 2012;118(16):4014-23.
- (6) Jang S, Atkins MB. Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? *Lancet Oncol* 2013;14(2):e60-9. PubMed
- (7) Arlo J Miller, Martin C Mihm. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355:51-65
- (8) Siiskonen Hanna & Harvima Ilkka. Melanooman riskitekijät. *Lääkärilehti* 2017; 72:1563-67
- (9) Pia Vihinen. Melanooma. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 2014; 130(13):1365-6
- (10) Ladányi A Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 Sep; 28(5):490-500
- (11) Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, ym. Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999;17:976-83.
- (12) Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, ym. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2006;355: 1307-17.
- (13) Cascinelli N, Belli F, MacKie RM, ym. Effect of long-term adjuvant therapy with interferon alpha-2a in patients with regional node metastases from cutaneous melanoma: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:866-9.
- (14) Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim, Onkolyttinen virusgeeniterapia tulossa metastasoituneen melanooman hoitoon, Seppo Ylä-Herttua 2016;132(4):297-8.

- (15) Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages, developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;14:392-404.
- (16) Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol* 2015;33:643-75.
- (17) Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002 Nov;23(11):549-55.
- (18) Salmi M. Makrofagit ja syöpä. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*, 2017;133(9):829-37
- (19) Catalano V, Turdo A, Di Franco S, Dieli F, Todaro M, Stassi G. Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. *Seminars in Cancer Biology* 23P 2013:522-532
- (20) Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013;39:1-10
- (21) Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014 Jul 17;41(1):49-61
- (22) Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141(1):39-51.
- (23) Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002;196(3):254-65.
- (24) Zhang QW, Liu L, Gong CY ym. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* 2012;7:e50946
- (25) Lewis CE, Harney AS, Pollard JW. The multifaceted role of perivascular macrophages in tumors. *Cancer Cell* 2016;30:18-25
- (26) Varney ML, Johansson SL, Singh RK. Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: role of monocyte chemoattractant protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. *Melanoma Res* 2005; 15:417-425.
- (27) Hussein M. Tumour-associated macrophages and melanoma tumorigenesis: integrating the complexity. *Int J Exp Path* 2006;87:163-176
- (28) Koga M, Kai H, Egami K, Murohara T, Ikeda A, Yasuoka S, Egashira K, Matsuishi T, Kai M, Kataoka Y, Kuwano M, Imazumi T. Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365(2):279-84
- (29) Nesbit M, Schaidt H, Miller TH, Herlyn M. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol.* 2001; 166(11):6483-90.
- (30) Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol.* 2001; 159(3):893-903.
- (31) Reed JA, McNutt NS, Prieto VG, Albino AP. Expression of transforming growth factor-beta 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. Implications for tumor progression. *Am J Pathol.* 1994; 145(1):97-104.
- (32) Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO,

- Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014; 41(1):14-20.
- (33) Berking C, Takemoto R, Schaidler H, Showe L, Satyamoorthy K, Robbins P, Herlyn M. Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res*. 2001; 61(22):8306-16.)
- (34) Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer*. 1994; 56(5):755-60.
- (35) Martínez A, Elsasser TH, Muro-Cacho C, Moody TW, Miller MJ, Macri CJ, Cuttitta F. Expression of adrenomedullin and its receptor in normal and malignant human skin: a potential pluripotent role in the integument. *Endocrinology*. 1997; 138(12):5597-604.
- (36) Chen P, Huang Y, Bong R, Ding Y, Song N, Wang X, Song X, Luo Y. Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(23):7230-9.
- (37) Lau S, Chu P, Weiss L. CD 163 A specific marker for macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol* 2004;122:794-801
- (38) Linck RDM, Costa RLP, Garicochea B. Cancer immunology and melanoma immunotherapy. *An Bras Dermatol*. 2017 Nov-Dec;92(6):830-835. doi: 10.1590/abd1806-4841.201756511.
- (39) Bosisio, F.M. & van den Oord, J.J. Immunoplasticity in cutaneous melanoma: beyond pure morphology *Virchows Arch* (2017) 470: 357.
- (40) Linck RDM, Costa RLP, Garicochea B. Cancer immunology and melanoma immunotherapy. *An Bras Dermatol*. 2017 Nov-Dec;92(6):830-835.
- (41) Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014; 41:49–61.
- (42) Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 2014; 6: pp. 1670–1690.
- (43) Hui L, Chen Y, Tumor microenvironment: sanctuary of the devil. *Cancer Lett*. 2015 Nov 1;368(1):7-13