

Jari Salmela

KORKEAN pH:n VAIKUTUS KOHDUNKAULANSYÖVÄSTÄ ERISTETTYIHIN  
ELÄVIIN CaSki-SOLUIHIN

Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Syyslukukausi 2023

Jari Salmela

KORKEAN pH:n VAIKUTUS KOHDUNKAULANSYÖVÄSTÄ ERISTETTYIHIN  
ELÄVIIN CaSki-SOLUIHIN

Hammaslääketieteen laitos

Syyslukukausi 2023

Tutkielman ohjaaja: FT, dosentti Terhi Heino, Biolääketieteen laitos, Turun yliopisto

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

1	JOHDANTO.....	1
2	KIRJALLISUUSKATSAUS .....	2
2.1	Suusyöpä, HPV ja HPV-rokote.....	2
2.2	pH:n merkitys ja säätely solussa ja kudoksessa .....	3
2.3	pH:n merkitys syöpäkudoksessa.....	3
2.4	Apoptoosi ja Bcl-2 .....	4
2.5	Solumallit syöpätutkimuksessa .....	4
3	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEESEIT .....	5
4	TUTKIMUSMENETELMÄT.....	5
4.1	Reagenssit.....	5
4.2	Solulinjat .....	6
4.3	Solukasvatukset .....	6
4.4	Solujen pH-altistus.....	6
4.5	Emäksisen liuoksen altistusajan määrittäminen .....	7
4.6	Hematoksyliini-eosiinivärjäys .....	7
4.7	Bcl-2 immunofluoresenssivärjäys .....	7
4.8	Solun sisäinen pH-rodo-värjäys.....	8
4.9	Yhdistetty pH 9-altistus ja Bcl-2-leimaus .....	8
4.10	Yhdistetty pH 9-altistus ja pH-rodo-leimaus .....	8
5	TULOKSET .....	9
5.1	Emäksisen liuoksen altistusaika 30 minuuttia.....	9
5.2	Bcl-2 leiman laimennossuhde.....	9
5.3	pH-altistus ja Bcl-2-leimaus solujen kuvantaminen .....	9
5.4	Yhdistetty pH-käsittely, Bcl-2- ja pH-rodo Red-leimaus.....	10
6	LOPPUPÄÄTELMÄT .....	13
7	VIITTEET .....	14

## TIIVISTELMÄ

Tavoitteena työssä oli tutkia emäksisen liuoksen vaikutuksia elävään soluun. Kirjallisuudessa on esitetty hypoteesejä syöpäkudokseen ja syöpäsoluihin liittyvän normaalista poikkeavan käänteisen pH-tasapainon hyväksikäytöstä syövän hoidossa, jolloin lääkityksellä voitaisiin yrittää kääntää syöpäkudoksen hapan soluvälitila ja emäksinen strooma kohden normaalia pH-tasapainoa.

Työssä kasvatettiin ihmisperäisiä kohdunkaulan syövästä eristettyjä CaSki-soluja, sekä määritettiin soveltuvia mikroskooppisia tutkimusmenetelmiä eläville soluille tehdyn korkean pH-altistuksen jälkeisten tapahtumien seurantaan. Elävien solujen emäksiseen altistukseen käytetty liuos valmistettiin natriumhydroksidista ja säädettiin pH:n arvoon 9,0.

Työssä perehdyttiin myös aiempaan aihetta käsittelevään kirjallisuuteen. Kokeellisessa osuudessa havainnoitiin emäksisen ympäristön vaikutusta solun elinkelpoisuuteen vaihekontrasti- ja konfokaalimikroskopian keinoin.

Tutkimusmenetelminä käytettiin sekä fluoresoivia pH-herkkiä leima-aineita että fluoresoivia Bcl-2-molekyyliin sitoutuvia vasta-aineita. Konfokaalimikroskooppi Zeiss LSM880 osoittautui parhaaksi käytettävissä olevaksi kuvantamismenetelmäksi elävien solujen tutkimiseen työssä käytetyssä tutkimusasetelmassa.

Tutkimuksen tuloksena saatiin selvitettyä menetelmiä ja kokeellisia toimintatapoja, joiden avulla voidaan tutkia eläviä soluja. Menetelmät solujen kasvattamiseen ja käsittelyyn, emäksisen pH-altistuksen tekeminen, elävien solujen leimaaminen sekä yhdellä että kahdella eri leima-aineella saatiin kokeellisesti toteutettua. Tutkimuksen tuloksena havaittiin pH-herkkien leimojen soveltuvan solunsisäisten vesikkelien ja niiden liikkeiden havaitsemiseen elävässä solussa.

Jatkossa kuvantamisen voisi tehdä nopeammin, jolloin voitaisiin vielä paremmin havaita vesikkelien liikettä. Nyt tehtyjen kuvantamisten tarkkuus oli suuri, mutta ajallisesti liian hidasta solun sisäisen vesikkeliliikenteen havainnoimiseen. Mahdollisena jatkotutkimuksen kohteena voisi olla selvittää olemassa olevien solun pH:ta säätevien lääkeaineiden vaikutusta CaSki-syöpäsoluihin ja niiden vesikkeliliikenteeseen.

Avainsanat: syöpä, HPV, elävien solujen kuvantaminen, korkea pH, solukasvatus, konfokaalimikroskopia.

# 1 JOHDANTO

pH vaikuttaa moniin elimistön toimintoihin vaikuttaen aina solun soluelimissä tapahtuvista molekyylitason ilmiöistä kudosis-, elin- ja elimistötasolle saakka. Elimistömme pH on tarkoin säädeltyä ja se toimii monissa kudoksissa merkittävänä fysiologisten ja kemiallisten prosessien ajavana voimana. Ihmisen elimistössä pH:lla on merkittävä rooli esimerkiksi ruoansulatuksessa, hengityksessä, luun uudistumisessa sekä elimistön puolustautumisessa ja taistelussa mikrobeja vastaan.

Normaalisti soluliman ja soluorganellien sisäinen pH on hyvin tarkasti säädelty. pH vaihtelee lysosomin happamasta (pH noin 5) solulimakalvoston pH-gradienttiin. Asteittain muuttuva solulimakalvoston pH muokkaa proteiineja vaihteittain eri pH-arvoilla aktivoituvien entsyymien avulla (Hassinen 2012). Malignit solut puolestaan lisäävät merkittävästi solun energian tuottoa aerobisen glykolyysin avulla (ns. Warburgin efekti). Happamien lopputuotteiden seurauksena solu joutuu entistä voimakkaammin poistamaan protoneita solusta ulos (Heiden 2009). Tuumorin kasvaessa soluvälitilan happamuus alenee toimien osaltaan signaalina angiogeneesille ja mahdollistaen primaarituumorin kasvun (Koltai 2016).

Ihmisen papilloomaviruksen (HPV) ns. korkean riskin virustyypit aiheuttavat kehon eri alueille syöpiä. Tärkein syöpää aiheuttava genotyyppi on HPV16 (Rautava, Syrjänen 2012). HPV16:n tuottama E5-proteiini pystyy estämään endosomien pH:n laskua ja siten osaltaan selittää HPV16:n karsinogeneesiä (Maufort 2010). pH:n muutokset solussa ja sen organelleissa indikoivat ja aiheuttavat solujen proliferaatiota ja muuttumista maligneiksi monilla eri mekanismeilla.

Meta-analyysissä on aiemmin yhdistetty HPV lisääntyneeseen suusyövän riskiin, ja malignien suusyöpien tiedetään olevan huonoennusteisia (Rautava, Mäkitie 2019). Leikkaushoidolla maligni suusyöpä johtaa usein suun rakenteiden laajaan poistamiseen. Esimerkiksi kielen ja alaleuan osittainen tai laaja poisto heikentää merkittävästi potilaan elämänlaatua, joten lääkehoito tai muu kirurgisen hoidon välttävä parantaminen olisi potilaan kannalta parempi lopputulos.

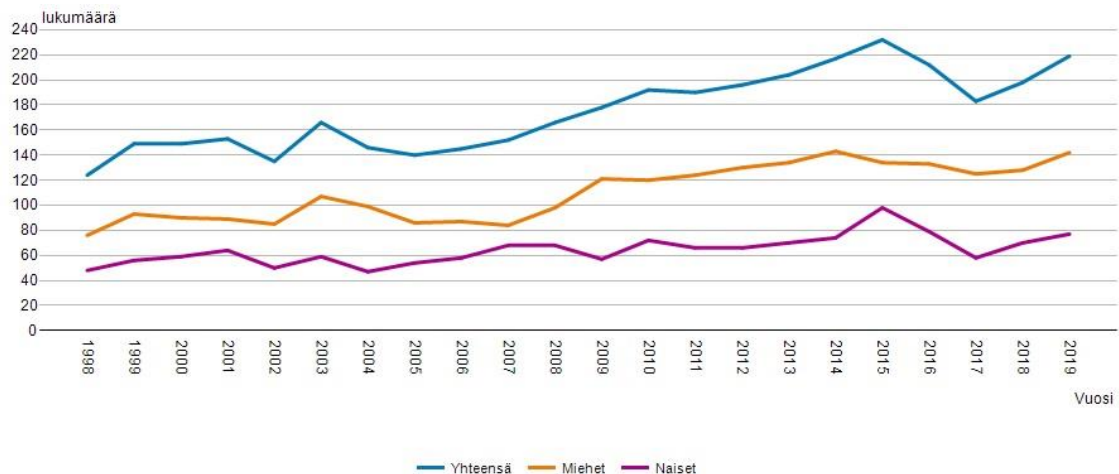
Korkean pH:n aiheuttavia aineita käytetään lääkinnällisissä hoidoissa. Esimerkiksi kalsiumhydroksidia käytetään apikaalisen parodontiitin ja hampaan juurenhoidon yhteydessä juurikanavissa lääkeaineena, joka aiheuttaa erittäin korkean pH:n tappaen soluja ja bakteereja (Byström 1985). Juurikanavan infektioineet bakteerit aiheuttavat juurikanavan tulehdustilan, nekroosin ja periapikaalisen parodontiitin (Kakehashi 1965). Bakteerien poistaminen juurikanavasta mahdollistaa periapikaalisen tulehduksen paranemisen. Vaikka juurihoidot eivät aina onnistu (Nairin 2004), uusista juurihoidoista jopa yli 90% parantaa periapikaalisen tulehduksen (Hampaan juurihoito 2022).

Tässä työssä tutkittiin emäksisen liuoksen vaikutusta eläviin kohdunkaulan syövästä eristettyihin soluihin, ja pyrittiin kuvantamismenetelmin seuraamaan solujen reaktioita altistuksen jälkeen. Solut altistettiin emäksiselle liuokselle, jonka jälkeen solujen käyttäytymistä seurattiin näkyvän tai sen lähialueen valon aallonpituusalueen mikroskoopeilla. Menetelminä käytettiin sekä pH-herkkiä fluoresoivia väriaineita että immunofluoresenssia Bcl-2-molekyylin havainnoimiseksi, sillä tutkimuksessa haluttiin selvittää myös korkean pH:n sytotoksisuuden mahdollista vaikutusta solukuolemaan.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Suusyöpä, HPV ja HPV-rokote

Maailmassa arvoitiin vuonna 2020 olleen noin 19,3 miljoonaa uutta syöpää, joista huulen ja suuontelon uusia syöpiä oli 377 713, kun taas syöpäkuolemia arvioitiin vuonna 2020 olleen noin 10,0 miljoonaa, joista huulen ja suuontelon syöpäkuolemia oli 177 757. Suun ja nielun alueen syövät ovat seitsemänneksi yleisin syöpä ja niistä noin puolet sijaitsee suuontelossa (Wild 2020, Sung 2021). Suomessa huulen ja suuontelon syöpäkuolemia (ICD-10 luokat C00-C14) vuonna 2020 oli 225; trendi kuolemissa on ollut vuosina 1998-2020 nouseva (Kuva 1). Kaikkiaan syöpään kuolleita (ICD-10 luokat C00-C97) Suomessa vuonna 2020 oli 12998 (Tilastokeskus 2023).



Kuva 1: Huulen, suuontelon ja nielun syöpäkuolemat (C00-C14) Suomessa vuosina 1998-2019.

Suusyöivistä noin 90% on levyepiteelikarsinomia (Johnson 2011). Pienten sylkirauhasten syövät edustavat 5% suusyöivistä. Sylkirauhasten syöivistä 60% on kovan suulaen alueella, 25% huulissa ja 15% posken limakalvolla; harvinaisena limakalvon melanoomat esiintyvät yleisimmin kovan suulaen ja ikenen alueella (Montero ja Patel 2015).

Merkittävimmät suusyöpäriskiä kasvattavat tekijät ovat tupakka ja alkoholi, ja syöpäriski kasvaa altistuksen määrän kasvaessa. Tupakan ja alkoholin samanaikainen käyttö kasvattaa syöpäriskiä enemmän kuin osiensa summa (Pöllänen, Syrjänen 2019). Muita suusyöpäriskiä lisääviä tekijöitä ovat ihmisen papilloomavirus (HPV), runsas punaisen lihan ja prosessoitujen lihatuotteiden syöminen, jotkin perinnölliset taudit kuten Fanconin anemia ja APECED-oireyhtymä, huonokuntoiset proteesit tai muu mekaaninen ärsytys, suuhygienian puute ja parodontiitti, sekä krooninen suun hiivasien aiheuttama infektio (Suusyöpä: Käypä hoito -suositus, 2019).

HPV-varianteista erityisesti HPV16 ja HPV18 lisäävät suun levyepiteelikarsinooman riskiä (Syrjänen 2011). Meta-analyysissä havaittiin HPV-DNA:ta löytyvän limakalvon levyepiteelisyöivissä 46,5%:ssa tapauksista, kun normaalilla limakalvolla sitä löydettiin vain 10%:ssa tapauksista (Syrjänen 2011).

HPV:lle on olemassa rokote, joka suojaa HPV:n aiheuttamien pään ja kaulanalueen syöpien lisäksi kohdunkaulan-, emättimen-, ulkosynnyttimien-, peniksen-, ja peräaukonsyöviltä. Rokote antaa lähes 100%:n suojan kohdunkaulansyöpätapauksista ja on olemassa näyttöä myös siitä, että rokote suojelisi muilta pahanlaatuisilta HPV:hen liitettyä syöviltä (Luostarinen 2018). Suomen kansallisessa rokoteohjelmassa on käytössä Cervarix HPV-rokote ja se annetaan ilmaiseksi 10-12 vuotiaille (thl.fi, viitattu 9.8.2023).

## **2.2 pH:n merkitys ja säätely solussa ja kudoksessa**

Normaalisti solun sisäinen pH on tarkoin säädeltyä ollen 7,1 ja 7,2:n välillä. Soluliman muuttuminen happamaksi ajaa solua apoptoosiin eli ohjelmoituun solukuolemaan. Solun pääasiallisia mekanismeja happamuuden nousun estoon ovat natrium-vety-pumppu, jänniteohjattu natrium kanava, vakuolaarinen ATPaasi-entsyymi, hiilihappoanhydraasi sekä monokarboksylaattitransferaasi. Solun elintoiminnot tuottavat happamia sivutuotteita, jotka poistetaan solusta ulos tai siirretään solun sisäisiin vesikkeleihin, kuten lysosomeihin (Koltai 2016).

Lysosomi hajottaa solun materiaaleja osasiinsa entsyymien, lipaasien, proteaasien ja nukleaasien avulla. Lysosomin sisällä pH on 4,0-5,0, mikä mahdollistaa lysosomaalisten entsyymien toiminnan. Lysosomien on havaittu vaikuttavan myös solujen signaalointiin, jakautumiseen ja erilaistumiseen. Lysosomit voivat liikkua solun tukirankaa, mikrotubuluksia pitkin. Liikkeen voi aiheuttaa kinesiinimoottori, kun taas päinvastaiseen suuntaan mikrotubulusta pitkin liikuttaa dynein-dynaectin moottori. Lysosomien liikenopeus solun sisällä voi olla useita mikrometrejä sekunnissa (Lawrence 2019).

Lysosomien toiminnan häiriöitä on liitetty syöpiin, kuten keuhkon adenokarsinoomaan sekä ikään liittyviin tauteihin kuten Parkinsonin tautiin, Alzheimerin tautiin ja Huntingtonin tautiin. Lysosomaalisten syöpien hoitoon on esitetty heikoilla emäksillä pH:ta häiritseviä hoitoja (Zeng 2020, Lawrence 2019).

## **2.3 pH:n merkitys syöpäkudoksessa**

Normaalisti solun elämä ja jakautuminen on tarkasti säädeltyä. Syövässä nämä säätelymekanismit ovat muuntuneet mahdollistamaan solujen rajoittamattoman kasvun ja jakautumisen. Syöpäsoluille tyypillisiä ominaisuuksia ovat kyky hallita itsenäisesti kasvusignaaleja, kyky vastustaa kasvua tukahduttavia signaaleja, kyky läpäistä solujen ja kudosten välisiä esteitä sekä lähettää etäpesäkkeitä, kyky rajattomaan lisääntymiseen, kyky ylläpitää verisuonten muodostumista, sekä kyky välttää apoptoosi (Hanahan ja Weinberg 2000).

Energia-aineenvaihdunnan uudelleenohjelmointi ja kyky välttää immuunipuolustuksen aiheuttamaa syöpäsolujen tuhoa, ovat syöpäsoluille tyypillisiä solun geeneihin uudelleen ohjelmoituja ominaisuuksia (Hanahan ja Weinberg 2011). Lisäksi normaaliin verrattuna käänteinen solun sisä- ja ulkopuolen välinen pH on syöväälle ominainen tunnusmerkki (Koltai 2020). Syöpäsolussa aineenvaihdunta on voimakkaasti lisääntynyt tavoitteena moninkertaistaa solumassa. Energian kulutus maksimoituu, jonka seurauksena solun sisälle kertyy protoneja. Solu pyrkii siirtämään ylimääräisiä protoneja soluvälitilaan mahdollisimman tehokkaasti. Tämän seurauksena syöpäsoluille ominaisesti soluvälitilan pH laskee normaalin alapuolelle ja solun sisällä pH voi hieman jopa nousta normaalista.

Syöpäsolun normaalista poikkeava pH heikentää apoptoosia, mahdollistaa angiogeneesin ja syövälle solujen ja kudosten välisten seinämien läpäisyn sekä etäpesäkkeiden lähettämisen. Tätä syöpäsoluille ominaista pH-gradientin poikkeamaa voitaisiin yrittää käyttää syövän hoidossa hyväksi. Esimerkiksi jo käytössä olevia protonipumpun estäjillä (esimerkiksi lansoprazole, omeprazole, esomeprazole) voitaisiin estää syöpäsolua siirtämään protoneita soluvälitilaan, jolloin solun sisällä laskeva pH voisi ajaa syöpäsolun apoptoosiin samalla heikentäen syöpäsolun malignisoitumispotentiaalia (Koltai 2016, Koltai 2020).

## 2.4 Apoptoosi ja Bcl-2

Solun elinkaari päättyy useimmiten hallittuun solukuolemaan, apoptoosiin. Hallitsematon solukuolema on patologista, jolloin solu ajautuu nekroosiin. Monisoluiselle eliölle ylimääräisten solujen hallittu poistaminen on elion normaalin toiminnan kannalta tärkeää. Apoptoosissa solun rakenteita pilkkotaan osasiinsa ja kierrätetään, eivätkä ne pääse aiheuttamaan viereisille soluille tai kudokselle haittaa, jolloin kudoksen normaali homeostaasi jatkuu (Hengartner 2000).

Bcl-2-proteiini on ensimmäinen tunnistettu apoptoosin estävä proteiini. Proteiini löydettiin B-solulymfoomasta ja sen havaittiin estävän apoptoosia ilman proliferaatiota. Bcl-2-proteiinien ryhmään kuuluu apoptoosia estäviä ja apoptoosia edistäviä proteiineja. Apoptoosia estävien proteiinien, eli antiapoptoottisten proteiinien, pääasiallinen toimintamekanismi on estää soluja apoptoosiin ajavien proteiinien toimintaa (Adams ja Cory 1998, Hengartner 2000).

## 2.5 Solumallit syöpätutkimuksessa

Normaalisti solujen elossa pysyminen on tarkoin säädeltyä. Elimistön ulkopuolella solut tyypillisesti kuolevat ympäröivän kudoksen signaaloinnin puuttuessa. Syöpäsolut voivat kuitenkin jakaantua ja välttää apoptoosia riippumatta ulkoisista signaaleista, jolloin niitä voidaan pitää elossa myös elimistön ulkopuolella, mikä mahdollistaa elävien solujen käytön tutkimuksessa.

Maailman ensimmäinen syöpäsolulinja, HeLa, on eristetty kohdunkaulan syöpäkudoksesta ja se saatiin stabiloitua vuonna 1953 (Lucey 2009). Syöpäsolut muuntuvat herkästi, mutta voivat kuitenkin toimia hyvänä mallina syöpätutkimuksessa, sillä solumalli pääsääntöisesti säilyttää lähtökudoksen ja siihen muodostuneen syövän ominaisuudet mahdollistaen luotettavan tutkimuksen teon liittyen kyseiseen syöpätyyppiin (Mirabelli 2019).

Valmiita eläviä solulinjoja on kaupallisesti saatavilla. Solut säilytetään tyypillisesti syväjäädetytynä ja sulatuksen jälkeen solut jatkavat kasvua ja jakautuvat. Syöpäsoluja käytettäessä tulee kuitenkin varoa näytteen kontaminoitumista vierailta soluilla. Solukasvatusmaljalle joutuneista vieraista syöpäsoluista nopeimmin jakautuvat solut valtaavat pian koko kasvatusmaljan. Lisäksi muut vieraat solut, erityisesti mykoplasma, ja virukset tai bakteerit voivat muuttaa solujen käyttäytymistä ja vaikuttaa soluilla tehtävän tutkimuksen tuloksiin. Syöpäsoluihin voi myös kasvatuksen aikana tulla uusia mutaatioita ja siksi solujen liian suureksi kasvavia jakokertoja tulisi välttää ja aloittaa ajoittain uusi kasvatus syväjäädetytystä solulinjasta. Solulinjan solujen ominaisuudet tulisi myös ajoittain varmistaa esimerkiksi geenitestauksella (Masters 2000).

### 3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEESEIT

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, mitä solutason muutoksia syöpäsoluissa on havaittavissa korkean pH:n käsittelyn seurauksena. Koeasetelmassa kohdunkaulansyövästä peräisin olevat elävät CaSki-solut altistettiin korkealle pH:lle, ja määritettiin sopivat altistusajat emäksisille olosuhteille. Tavoitteena oli saada aineistoa myös solujen kuvantamisesta, jolla seurattiin pH-herkkien indikaattorivärien avulla eri tavoin värjäytyviä solunsisäisiä vesikkeleitä.

Kirjallisuudessa on esitetty syövän hoitomuodoksi syöpäkudoksen aiheuttaman solun sisäisen ja ulkoisen pH:n muutosta vastaan hyökkäämistä. Olemassa olevia pH:ta muokkaavia lääkkeitä on jo kliinisissä testeissä, joissa tutkitaan indikaation laajentamista myös syöpien hoitoon. pH-herkkien indikaattorivärien seurantakuvantamisen avulla voisi olla mahdollista selvittää kyseisten lääkeaineiden mahdollisia solutason mekanismeja.

### 4 TUTKIMUSMENETELMÄT

Tutkimuksessa seurattiin elävien solujen emäksisen käsittelyn jälkeisiä sisäisiä muutoksia valo- ja fluoresenssimikroskopiolla. Fluoresenssimikroskopiassa käytettiin kahta menetelmää: Bcl-2-proteiiniin kiinnittyvään vasta-aineeseen perustuvaa immunofluoresenssia ja pH:n muutokseen reagoivia fluoresoivia leimoja. Saadusta kuva-aineistosta tutkittiin solun vesikkeliliikennettä, solun jakautumista ja jätisolujen muodostumista.

#### 4.1 Reagenssit

PBS-liuos on fosfaattipuskurin avulla pH:n 7,4:ssä ja suolatasapainon vakiona pitävä neste. Suolatasapaino mahdollistaa solun osmoottisen ympäristön pysymisen vakiona, jolloin soluun ei kerry nestettä tai solu ei ala siirtämään solunsisäistä nestettä liaksi ulos. PBS-käyttöliuos valmistettiin laimentamalla kaupallinen liuos (10x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco) 1:10 steriiliin veteen.

Työssä käytettiin PBS:n lisäksi myös HEPES-liuosta, joka on yleisesti käytetty kaupallinen puskuroitu solukasvatuksessa käytetty liuos (Fisher Scientific). HEPES-nimi tulee lioksen vaikuttavan aineen englannin kielisestä kemiallisesta nimestä 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid. HEPES liuksella on alhainen absorbanssi näkyvän- ja ultraviolettivalon aallonpituuksille.

Solujen kasvatusliuksena käytettiin DMEM:ä (Dulbecco's modified eagle medium), joka valmistettiin laboratorioissa laatukäsikirjan mukaisella reseptillä kaupallisista komponenteista (Life Technologies): 26,76g DMEM, 40,00 ml HEPES 1M, 3,8g NaHCO<sub>3</sub>, 20,0 ml penicillin – streptomysin (10000IU/ml – 0,001 g/ml). Lisäksi useissa kasvatuksissa valmiiseen solukasvatuliukseen lisättiin naudan sikiön seerumia (FBS, fetal bovine serum, Fisher Scientific), jonka prosenttiosuus on ilmoitettu lioksen valmistuskuvauksen yhteydessä.

Emäksinen (pH 9) liuos valmistettiin lisäämällä PBS-liuokseen 1M NaOH-vesiliuosta. Tyypillinen emäksisen lioksen valmistusmäärä oli 61 ml PBS-liuosta ja 200 µl 1M

NaOH-vesiliuota. Liuosta valmistettaessa pH:n muutosta seurattiin sähköisellä pH-mittarilla (Meterlab PHM 240 pH/ionmeter) NaOH-liuoksen lisäyksen ajan päättäen lukemaan 9.000. Valmis liuos suodatettiin 0,22 µm:n selluloosasuodattimen läpi steriiliyden takaamiseksi. pH-mittalaitteet oli kalibroitu laboratorion laatukäsikirjan mukaisesti. Emäksinen liuos valmistettiin samana päivänä ennen solualtistusta.

## 4.2 Solulinjat

Tutkimuksessa käytettiin kaupallista ihmisperäistä kohdunkaulansyövän CaSki -epiteelisyöpäsolulinjaa (ATCC CRL-1550, LGC Standards). Syväjäädetyistä soluista sulatettiin erä kasvatukseen kokeita varten. Solujen jakokerrat (passages) merkittiin ylös aina soluja jaettaessa.

## 4.3 Solukasvatukset

Solukasvatukset tehtiin suljetussa solukasvatuskaapissa (inkubaattorissa), jossa oli 5% hiilidioksidipitoisuus ja +37 °C lämpötila. Kaikki kokeet ja tarvittavat nesteiden ja reagenssien vaihdot suoritettiin huoneilmassa noin +20 °C lämpötilassa laminaarivirtauskaapissa. Solukasvatusmaljat nostettiin reagenssien vaikutusajaksi takaisin solukasvatuskaappiin. Solujen kasvatusliuos vaihdettiin 2-3 päivän välein.

Solujen jakamiseksi CaSki-solut irrotettiin kasvatusalustasta ja toisistaan trypsiinillä, jonka vaikutusaika oli noin 5 minuuttia solukasvatuskaapissa. Vaikutusajan jälkeen solut sentrifugoitiin pelletiksi koeputken pohjalle DMEM:llä laimennetussa trypsiiniliuoksessa. Sentrifugoinnin jälkeen solupelletti sekoitettiin huolellisesti Vortex-sekoittimella DMEM-liuokseen tasaiseksi liuokseksi ja tästä määritettiin solumäärä (solujen lukumäärä/ml) solulaskurissa käytettävän värjäysliuoksen ja automaattisen solulaskurin (Bio Rad) avulla. Solumääräksi mitattiin mikroskopointia varten noin 50 000. Solujen annettiin kiinnittyä noin vuorokausi ennen pH-altistusta. Tällöin soluviljelmä oli noin 60% täyteen kasvanut eli 60%:sti konfluentti.

Työskentelyalueen pinnat pidettiin puhtaana pyyhkimällä alkoholilla ja työskentely suoritettiin vetokaapissa. Lisäksi nesteiden käsittelyssä käytettiin steriilejä kertakäyttöisiä tai steriloituja pipettejä ja muita tarvittavia instrumentteja ja astioita. Menettelyllä pyrittiin estämään solukasvatusten kontaminoituminen vierailta soluilla, bakteerilla, sienillä tai muilla eliöillä tai vierailta aineilla.

## 4.4 Solujen pH-altistus

Emäksinen pH-altistus aloitettiin poistamalla solujen kasvatusliuos kasvatusalustalle kiinnittyneiden solujen päältä imemällä kasvatusliuos varoen pois. Kasvatusmaljalle lisättiin välittömästi +37 °C lämpöistä pH 9 liuosta kasvatusmaljan tilavuuteen soveltuva määrä ja kasvatusmalja siirrettiin takaisin solukasvatusinkubaattoriin. Emäksisen liuoksen annettiin vaikuttaa joko 10 tai 30 minuutin ajan, jonka jälkeen emäksinen liuos imettiin kasvatusmaljalta pois. Solut huuhdeltiin PBS-liuoksella ja lopuksi solut jätettiin tuoreeseen DMEM-liuokseen solukasvatuskaappiin. pH altistuksen jälkeen seuraavaan vaiheeseen solujen käsittelyssä siirryttiin minimoiden turha solujen seisottaminen.

#### 4.5 Emäksisen liuoksen altistusajan määrittäminen

Soluja (Ca Ski, p21) kasvatettiin halkaisijaltaan noin 12 mm:n peitinlaseille kuoppalevyissä ja altistettiin 10 minuutiksi pH 9 liuokselle. Altistuksen jälkeen solut huuhdeltiin PBS-liuoksella 1 ml ja lopuksi DMEM 1 ml tilalle. Soluja kasvatettiin altistuksen ja huuhtelun jälkeen eri pituisia aikoja, jonka jälkeen tilanne pysäytettiin fiksaamalla solut formaliinilla. Kasvatusajat olivat 0, 10, 20, 30, 60 minuuttia, 2, 3, 4 tuntia ja 1, 2, 5, 6, 7 vuorokautta, jokaista kasvatusaikaa kohden kaksi peitinlasia. Kasvatusajan jälkeen solut kiinnitettiin formaliinilla vähintään yön yli. Formaliinikäsittelyn jälkeen tehtiin hematoksyliini-eosiini (H&E) -värjäys. Samoin käsiteltiin kontrollinäytteet ilman pH-altistusta. H&E-värjätyt peitinlasit siirrettiin objektilaseille ja näytteet tutkittiin valomikroskooppilla.

Solukasvatus ja koeasetelmat toistettiin kuten edellä muuttaen pH 9 liuokselle altistus 30 minuutiksi. Fiksaukset formaliinilla pH 9 altistuksen jälkeen 0, 10, 20, 30, 60 minuutin, 2, 3, 4 tunnin, sekä 1, 4, 5 ja 6 vuorokauden kuluttua.

#### 4.6 Hematoksyliini-eosiinivärjäys

H&E-värjäyksessä solut huuhdeltiin aluksi kahdesti vedellä 5 minuutin ajan. Tämän jälkeen hematoksyliini-liuoksen annettiin olla solujen päällä 10 minuutin ajan, jonka jälkeen solut huuhdeltiin kahdesti vedellä 5 minuutin ajan. Tämän soluille annosteltiin eosini-liuos 5 sekunnin ajaksi ja lopuksi solunäyte huuhdeltiin vedellä taas kahdesti 5 minuutin ajan. Hematoksyliinin värjäämät kohteet (solujen tumat) näkyvät näytteessä violettina ja eosinin (solulima) punaisena.

#### 4.7 Bcl-2 immunofluoresenssivärjäys

Värjätessä soluja Bcl-2-proteiinin suhteen solukasvatusmaljalta poistettiin aluksi kasvatusliuos ja solut huuhdeltiin PBS-liuoksella. Seuraavaksi PBS-liuos korvattiin FITC-leimatulla Bcl-2-vasta-aineella (Nordic Biosite AB, Täby, Ruotsi) 30 minuutin ajan solukasvatuskaapissa. Vasta-aineen käytön minimoimiseksi käsiteltävien solujen päälle asetettiin tyypillisesti 15 µl:n tippa Bcl-2-vasta-aine-leima liuosta ja tipan päälle peitinlasi estämään käsittelyn aikainen haihtuminen. Käsittelyn jälkeen näyte huuhdeltiin PBS-liuoksella kahdesti 5 minuutin ajan. Ensimmäisen huuhtelun yhteydessä poistettiin varovasti peitinlasi. Bcl-2-proteiiniin spesifisti sitoutuvassa vasta-aineessa on fluoresoiva leima (FITC).

Bcl-2-analyysin laimennussuhteen määrittämiseksi kasvatettiin soluja (Ca Ski, p27) peitinlaseille ja fiksattiin asetonilla. Fiksatu solut leimattiin eri Bcl-2-analyysi-PBS -liuos laimennossuhteilla. Koe aloitettiin 30 minuutin pH 9 altistuksella, jonka jälkeen solut pestiin PBS-liuoksella ja lopuksi soluille pipetoitiin DMEM-liuos. Solut fiksattiin asetonilla 10 minuutin ajan, jonka jälkeen pesu kahdesti PBS-liuoksella. Bcl-2-analyysi-PBS -liuoksia valmistettiin kolme eri laimennosta: 1:5 (3 ul Bcl-2-liuosta ja 12 ul PBS-liuosta), 1:15 (1 ul + 14 ul), 1:25 (1 ul + 24 ul), joista jokaista laimennosta pipetoitiin 15 ul:n tippa mikroskooppilasille. Lisäksi tehtiin yksi kontrollipeitinlasi ilman Bcl-2-vasta-aine-käsittelyä. Peitinlasi asetettiin solupuoli tipan päälle 30 minuutin ajaksi pimeään huoneenlämpötilassa. Vaikutusajan jälkeen peitinlasit käännettiin varovasti PBS-liuoksen avulla ja jonka annettiin vaikuttaa 5 minuutin ajan. Pesu PBS-liuoksella toistettiin ja sitten peitinlasi upotettiin steriiliin veteen kahdesti. Lopuksi peitinlasit liimattiin mikroskooppilasille tipalla pikaliimaa solupuoli kohden mikroskooppilasilla.

#### **4.8 Solun sisäinen pH-rodo-värjäys**

Solun sisäisen pH:n määrittämiseen käytettiin kaupallista testiä (Life Technologies), joka sisältää itse leiman (pH-rodo Red AM tai Green AM) sekä Power load-liuoksen. pH-rodo Red AM ja pH-rodo Green AM -värjäyksellä fluoresoivien leimojen emittoiman valon intensiteetti riippuu pH:n arvosta, intensiteetti kasvaa pH:n laskiessa. pH-rodo Red AM fluoresenssin suurin arvo saavutetaan aallonpituudella noin 590nm ja pH-rodo Green AM:lle noin 530nm. Molemmat fluoresoivat leimat emittoivat pH-alueella 4-9, pH-rodo Red AM omatessa hieman laajemman herkkyuden alueen emäksiseen päähän.

Solujen leimaus pH-rodo Red AM ja Green AM:llä suoritettiin valmistajan ohjetta mukailten. Leimausliuos valmistettiin lisäämällä 2,5 µl pH-rodo Red liuosta, 25 µl Power load-liuosta ja 2,5ml HEPES-liuosta (HEPES korvasi käyttöohjeen LCIS-liuoksen). Altistetut solut pestiin aluksi HEPES-liuoksella, jonka jälkeen solujen päälle laitettiin leimausliuos ja annettiin sen vaikuttaa solukasvatuskaapissa 30 minuutin ajan. Vaikutusajan jälkeen solut pestiin HEPES:llä. Lopuksi lisättiin tuore DMEM-liuos, jossa oli mukana 5% FBS. pH-rodo Green AM leimaus tehtiin samoin kuten pH-rodo Red AM:llekin.

#### **4.9 Yhdistetty pH 9-altistus ja Bcl-2-leimaus**

Ca Ski-soluja kasvatettiin mikroskooppiin sopivalle solukasvatusmaljalle, mikroskooppimaljalle. Solut altistettiin 30 minuutin ajan pH 9-liuokselle. Vaikutusaikana valmisteltiin 1:15 PBS:llä laimennettu Bcl-2-leimaliuos, jota säilytettiin odotusaika pimeässä jääkaapissa. pH 9-liuoksen vaikutusajan jälkeen emäksinen liuos poistettiin ja tilalle pipetoitiin PBS-liuosta. PBS-liuoksen poiston jälkeen mikroskooppimaljan optisen alueen ympäristö kuivattiin steriloidulla vanurullalla. Optiseen alueeseen pipetoitiin 15 ul laimennettua Bcl-2-leimaliuosta ja tipan päälle asetettiin peitinlasi 30 minuutin ajaksi. Vaikutusajan jälkeen leimaliuos poistettiin. Peitinlasi nostettiin varovasti PBS-liuoksen avulla. Liuoksen annettiin vaikuttaa 5 minuutin ajan ja vastaava PBS-pesu toistettiin. Lopuksi mikroskooppimaljalle pipetoitiin DMEM, johon oli lisätty 5% FBS:ää.

#### **4.10 Yhdistetty pH 9-altistus ja pH-rodo-leimaus**

Ca Ski-soluja kasvatettiin mikroskooppimaljalle. Aluksi solut altistettiin 30 minuutiksi pH 9-liuokselle. pH-altistuksen aikana valmistettiin pH-rodo Red AM -leimausliuos. pH-altistuksen jälkeen emäksinen liuos poistettiin mikroskooppimaljalta ja solut pestiin HEPES:llä. Pesun jälkeen pH-rodo Red AM-liuos pipetoitiin 30 minuutiksi mikroskooppimaljalle. Vaikutusajan jälkeen leimaliuos poistettiin ja solut pestiin HEPES:llä. Lopuksi mikroskooppimaljalle pipetoitiin DMEM sekä 5% FBS:a.

## 5 TULOKSET

Solukasvatuskokeet suunniteltiin ja kokeiden toimivuus varmistettiin alustavilla kasvatuskokeilla. Kun solukasvatus ja värjäysten toimivuus oli varmistettu, toistettiin samat solukasvatukset ja kuvannettiin solut konfokaalimikroskoopilla.

Kokeissa havainnoitiin solujen jakautumisen alkua ja seurattiin monitumaisten jättisolujen ilmaantumista. Lisäksi havainnoitiin solujen vesikkeleiden liikkeitä.

### 5.1 Emäksisen liuoksen altistusaika 30 minuuttia

Kokeessa 10 minuutiksi pH 9 liuoksella altistetuissa soluissa havaittiin 4 tunnin jälkeen solun jakautumisia ja vuorokauden jälkeen monitumaisia jättisoluja. Kuten 10 minuutin altistuksessa, myös 30 minuutiksi pH 9 liuokselle altistetuissa soluissa havaittiin 4 tunnin jälkeen solun jakautumisia. Kokeen näytteiden perusteella päätettiin jatkossa altistaa solut 30 minuutiksi emäksiselle liuokselle.

### 5.2 Bcl-2 leiman laimennossuhde

Bcl-2 leimattuja ja fiksattuja näytteitä tutkittiin mikroskoopilla. Näytteiden tutkimisen perusteella todettiin 1:15-laimennossuhteen antavan riittävän signaalitason ja laimennossuhdetta valittiin käytettäväksi lopuissa Bcl-2-leimauksissa.

### 5.3 pH-altistus ja Bcl-2-leimaus solujen kuvantaminen

Ca Ski -soluille (p20) tehtiin yhdistetty pH altistus ja Bcl-2 leimaus. Eläviä soluja kuvattiin LSM880-mikroskoppilla, seurantakuvaaminen aloitettiin noin 180 minuuttia ja päätettiin noin 1560 minuuttia pH-altistuksen päättymisen jälkeen. Kuva 2 on noin 240 minuuttia pH-altistuksen päättymisen jälkeen. Bcl-2-leima erottuu kuvassa 2 vaaleina pisteinä, kuvassa jättisolun tuman alue, leimat keskittyvät seuranta-ajan tuman keskelle.

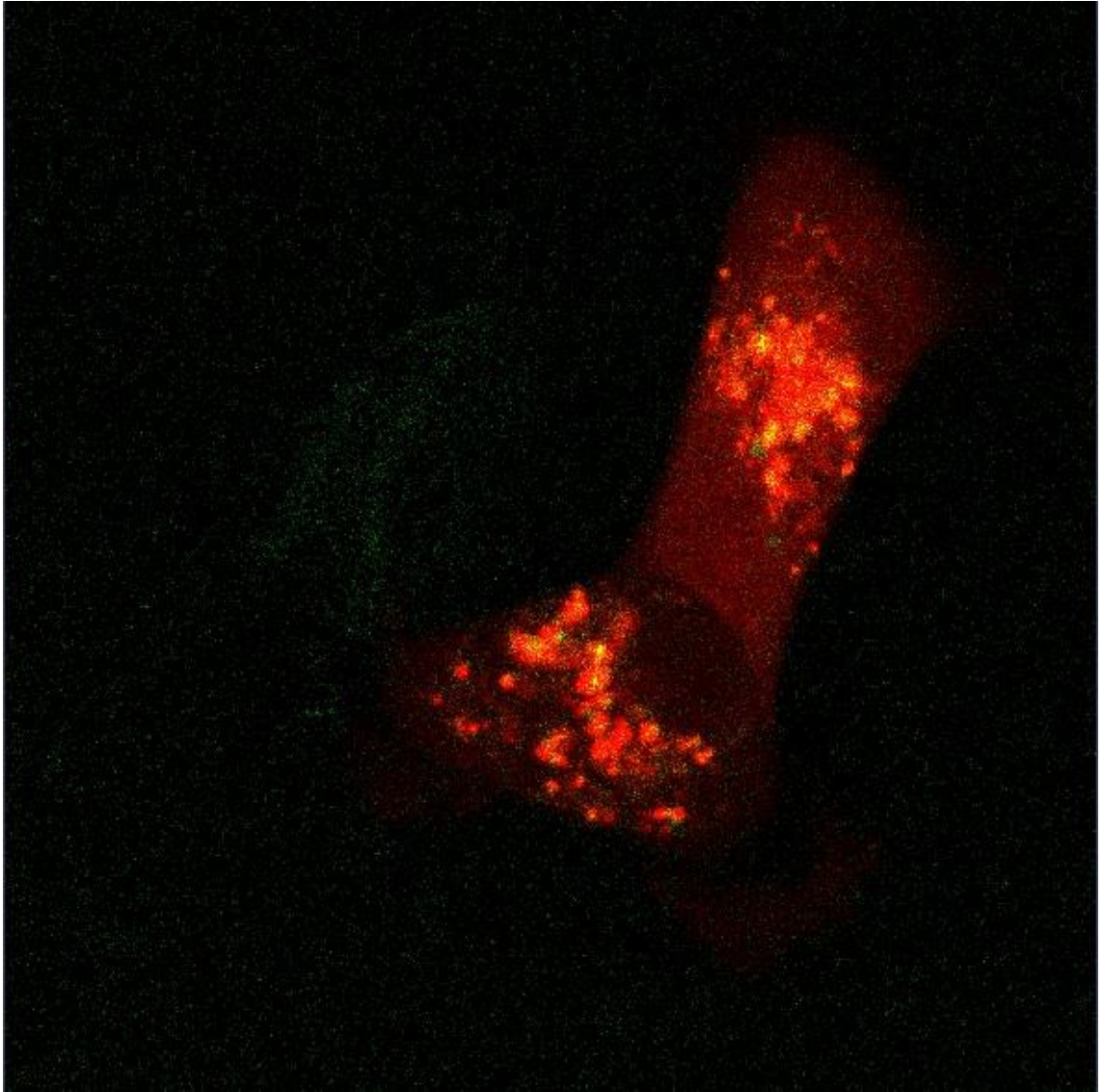


*Kuva 2: Jättisolun tuman alue vaihekontrastikuvassa, Bcl-2-leima valkoisina pisteinä.*

#### **5.4 Yhdistetty pH-käsittely, Bcl-2- ja pHrodo Red-leimaus**

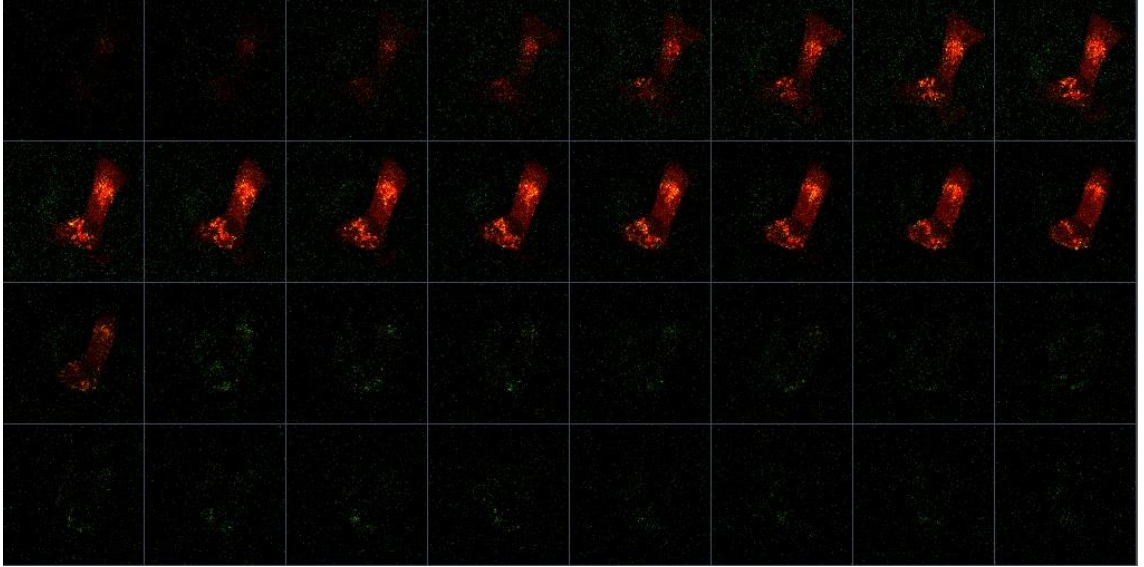
CaSki-soluille (p35) tehtiin yhdistetty pH-altistus ja Bcl-2-leimaus sekä lopuksi solun sisäinen pHrodo Red-värjäys. Solujen käsittelyyn ja leimaamiseen kului noin 1h 50min ja kuvantaminen päästiin aloittamaan noin 3 tuntia leimauksen valmistumisesta. Eläviä käsiteltyjä soluja kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (Zeiss LSM880) kuva-alan ollessa  $67,48\mu\text{m} \times 67,48\mu\text{m} \times 11,38\mu\text{m}$ , missä korkeussuunnassa ( $11,38\mu\text{m}$ ) kuva-ala koostui 32 leiketasosta. Näytteen valaisuun käytettiin kahta eri aallonpituuden laseria eri fluoresoivien leimapartikkelien virittämiseen. Bcl-2-leimat näkyvät kuvissa 3 ja 4 vihreänä ja pHrodo Red-leimalla punaisen sävyinä. Yhden kolmeulotteisen kuvan ottamiseen kului 8 minuuttia 22 sekuntia.

Kuvassa 3 on kaksi solua yhdestä leiketasosta 10 ajan hetkellä 11min ja kuvassa 4 kaikki leikkeet ajan hetkestä 8min 22s kuvantamisen aloittamisesta eteenpäin. Kuvassa havaitaan pH-sensitiivisen leiman värjäävän vesikkeleitä, jotka ovat pääasiassa solun tuman ympärillä. Bcl-2-leiman värjää yksittäisiä alueita solun alueella, sillä Bcl-2-molekyylit ovat tyypillisesti mitokondrion pinnalla.



*Kuva 3: Bcl-2-leima vihreällä ja pHrodo Red punaisensävyillä värjättyinä.*

Kuvassa 4 havaitaan pH-sensitiivisen leiman värjänneiden vesikkelien keskittyvän solun tumen ympärille eri leiketasoissa.



*Kuva 4: Kuvan 3 solujen kaikki leiketaset ajanhetkestä 8min 22s eteenpäin kuvantamisen aloituksesta.*

## 6 LOPPUPÄÄTELMÄT

Työ antoi hyvän kuvan elävien solujen kanssa työskentelystä. Työssä tutustuttiin soluviljelymenetelmiin, solujen tutkimiseen, sekä erilaisiin solujen leimaus- ja kuvantamismenetelmiin, Työ opetti elävillä soluilla tehtävän tutkimuksen käytänteisiin ja rutiineihin.

Nykyaikainen mikroskopia ja kemialliset analyysimenetelmät mahdollistavat solujen toiminnan tutkimisen molekyylitasolla. Solun elintoimintojen selvittäminen molekyylitasolla mahdollistaa solun toimintojen ymmärtämisen, joka puolestaan avaa mahdollisuuksia selvittää ja päätellä kuinka niihin voidaan vaikuttaa. Tämä puolestaan mahdollistaa solun normaaliin ja normaalista poikkeavaan toimintaan puuttumiseen lääkeaineilla tai muilla solun elintoimintoihin vaikuttavilla mekanismeilla. Yksittäisten solujen yhteistoiminta vaikuttaa sekä kudosten, elinten että koko elimistön tasolla, joista pH:n muuttuminen on yksi esimerkki, ja jolla voi olla esimerkiksi syövän hoidossa terapeutista merkitystä.

Suoritetuissa kuvantamisissa voitiin havainnoida tarkasti solussa tapahtuvia muutoksia. Muutokset ovat kuitenkin nopeita ja kuvantamisnopeuden kasvattaminen voisi tulevaisuudessa mahdollistaa yksityiskohtaisemman tiedon saamisen. Kokeellisessa osuudessa kuvantamisen nopeus ei riittänyt solun sisäisten vesikkeliin liikkeen havainnointiin, sillä kuvien välinen aika oli liian pitkä eikä koko solun alueella nopeus riittänyt liikkeen pysäyttämiseen. Lisäksi kuvantaminen olisi mielenkiintoista aloittaa heti pH-altistuksen aikana tai heti sen jälkeen.

Teknisesti nesteiden vaihto, tutkittavien aineiden annostelu, huuhtelut ja aseptisen työrutiinin ylläpito voivat olla hankalia, mutta kuitenkin mahdollisia solukasvatusmaljan ollessa mikroskoopissa. Koko prosessin kuvantaminen voisi antaa paremmin selville niistä muutoksista, joita emäksinen liuos tai muu soluihin vaikuttava aine tutkittavissa soluissa aiheuttaa.

Emäksisen liuoksen vaikutuksen selvittämiseksi olisi mielenkiintoista seurata yksittäisten solujen käyttäytymistä ennen altistusta, altistuksen aikana ja altistuksen jälkeen. Altistukseen voitaisiin käyttää olemassa olevia, jo lääkeluvan saaneita eri indikaatioon tarkoitettuja, solun pH-tasapainoon vaikuttavaa lääkeainetta. Tämä voisi mahdollistaa olemassa olevien lääkeaineiden indikaation laajentamisen. Esimerkiksi ruoansulatuskanavan happotasapainon säätelyyn on runsaasti lääkeluvan saaneita lääkeaineita.

## 7 VIITTEET

Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998;281;5381;1322-6.

Byström A, Claesson R, Sundqvist G, The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dental Traumatology*, 1985;1;5;170-175.

Hampaan juurihoito. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Hammaslääkäriseura Apollonia ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim (viitattu 26.2.2023) [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi).

Hanahan D, Weinberg R A, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 2000;100;1;57-70.

Hanahan D, Weinberg R A, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 2011;144;646-674.

Hassinen A, Functional organization and membrane dynamics of Golgi glycosyltransferases. PhD thesis, University of Oulu, 2012

Heiden M G V, Cantley L C, Thompson C B, Understanding the Warburg effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009;324;1029-1033.

Hengartner M O, The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407;770-776.

Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AAHK, Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontology* 2000. 2011 Oct;57(1):19-37.

Takehashi S, Stanley H, Fitzgerald R, The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1965;20;3;340-349.

Koltai T, Cancer: fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *Onco Targets and Therapy* 2016;9;6343-6360.

Koltai T, The Ph paradigm in cancer. *European Journal of Clinical Nutrition* 2020;74;14-19.

Lawrence R E, Zoncu R, The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nature cell biology*, vol 21, February 2019;133-142.

Lucey B P, Nelson-Rees W A, Hutchins G M, Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Med* 2009;133;1463-1467.

Luostarinen T, Apter D, Dillner J, Eriksson T, Harjula K, Natunen K, Paavonen J, Pukkala E, Lehtinen M, Vaccination protects against invasive HPV-associated cancers. *Int J Cancer* 2018;142:2186-7.

Masters J R W, Human cancer cell lines: fact and fanatasy. Nature reviews, Molecular cell biology, December 2000;1;233-236.

Maufort J P, Shai A, Pitot H C, Lambert P F, A Role for HPV16 E5 in Cervical Carcinogenesis. Cancer Research, 2010;70(7);2924-2931.

Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M, Cancer Cell Lines Are Useful Model systems for Medical Research. Cancers 2019;11;1098.

Montero PH, Patel SG, Carsinoma of the oral cavity. Surg Oncol Clin N Am. 2015 July; 24(3):491-508.

Nair PNR, Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med, 2004;15;348-81.

Pöllänen M, Syrjänen S, Tupakka ja alkoholi yhdessä suusyövän vaaratekijöinä. Näytönastekatsaus, Käypähoito, 22.5.2019 (viitattu 1.8.2023 [kaypahoito.fi/nak03876](http://kaypahoito.fi/nak03876)).

Rautava J, Mäkitie A. Suusyöpä ja ihmisen papilloomavirus (HPV). Käypähoito, näytönastekatsaus, 23.05.2019.

Rautava J, Syrjänen S, Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis. Head and Neck Pathology, 2012;6;S3-S15.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. A Cancer Journal for Clinicians, 2021;71;3;209-249.

Suusyöpä. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseura Duodecimin ja Suomen Kardiologisen Seuran asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 22.5.2019 (viitattu 29.8.2023). Saatavilla internetissä: [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi)

Syrjänen S, Lodi G, von Bultzingslööwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz, Zhou H M, Maeda H, Miller C, Jontell M, Human papilloma viruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. Oral Dis 2011;17 Suppl 1:58-72.

Tilastokeskus, Kuolleet muuttujina Tilaston peruskuollinsyy (ICD-10, 3-merkkitaso) viitattu 6.7.2023.

Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editoijat. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. International Agency for Research on Cancer, 2020.

Zeng J, Shirihai O S, Grinstaff M W, Modulating lysosomal pH: a molecular and nanoscale materials design perspective. J Life Sci 2020 Dec; 2(4); 25-37.