

Kohdunkaulan syövän biologinen tausta

Henna Karhunen

Luonnontieteiden kandidaatin-
tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma

Oulun yliopisto

Joulukuu 2018

Sisällys

1. Johdanto	3
2. Syövän biologia.....	4
2.1. Syövän määritelmä	4
2.2. Syövän synty	4
2.3. Syövän kehitys	6
2.3.1. Karsinoomat.....	7
3. Ihmisen papilloomavirus	7
3.1. Viruksen rakenne ja toiminta	7
3.2. Virustyyppit ja niiden luokittelu	9
3.3. HPV ja kohdunkaulan syöpä	9
3.3.1. HPV-testi	11
3.3.2. HPV-rokote	11
4. Kohdunkaulan syöpä ja esiasteet	12
4.1. Kohdunkaulan normaali histologia.....	12
4.2. Sytologiset ja histologiset muutokset.....	15
4.2.1. Luokittelu	18
4.2.2. Levyepiteeli.....	19
4.2.3. Lieriöepiteeli	21
5. Yhteenveto	21
Lähdeluettelo.....	23

1. Johdanto

Kohdunkaulan syöpä on maailmanlaajuisesti naisten toiseksi yleisin syöpä ja suuri taakka erityisesti kehittyvissä maissa (Schiffman, Castle, Jeronimo, Rodriguez, & Wacholder, 2007). Kehittyneissä maissa kohdunkaulan syövän esiintyvyyttä on saatu laskettua tehokkaan seulonnan ansiosta. Kohdunkaulan syöpää aiheuttaa ihmisen papilloomavirus (*Human papilloma virus, HPV*), jonka syöpää aiheuttavia, niin sanottuja korkean riskin HPV-tyyppejä ovat etenkin HPV 16 ja 18. (Monie, Hung, Roden, & Wu, 2008) Matalan riskin HPV-tyypit ovat vaarattomampia. Ne aiheuttavat esimerkiksi hyvänlaatuisia ihon papilloomia ja genitaalialueen kondyloomia. (Doorbar ym., 2012) Ihmisen papilloomavirus tarttuu hyvin herkästi seksin välityksellä eikä siltä pysty täydellisesti suojautumaan, sillä se pystyy tarttumaan myös miehen anogeenitaalialueen iholta, jota kondomi ei suojaa. HPV-infektio onkin erittäin yleinen etenkin nuorten naisten keskuudessa. (Schiffman ym., 2007)

Kohdunkaulan syövän seulonnassa käytetään yleisesti sytologista tutkimusta, joka tehdään kohdunkaulan pinnalta otetusta irtosolunäytteestä. Näytteestä pystytään mikroskooppisesti havaitsemaan HPV-infektioon sekä kohdunkaulan syöpään tai sen esiasteisiin liittyvät solumuutokset. Sytologian lisäksi seulonnassa käytetään myös kudoksenäytteiden histologista tutkimusta, jossa soluja ja niiden järjestäytymistä pystytään niin ikään tutkimaan mikroskooppisesti. Seulonnan ansiosta kohdunkaulan syövän esiintyvyys ja kuolleisuus on laskenut jopa 70 %. (Jenkins, 2007)

Sytologian ja histologian rinnalle on viime vuosina noussut myös HPV-testi, joka perustuu HPV-DNA:n etsimiseen kohdunkaulasta otetusta näytteestä (Nieminen, Vuorma, Viikki, Hakama, & Anttila, 2004). Seulonnan lisäksi HPV-infektion ja kohdunkaulan syövän ehkäisyyn on kehitetty myös rokotteita, jotka suojaavat etenkin korkean riskin HPV-tyyppejä vastaan (Monie ym., 2008).

2. Syövän biologia

2.1. Syövän määritelmä

Biologisesta näkökulmasta syövät ovat yhtenäinen ryhmä sairauksia, joiden taustalla ovat samat geneettiset häiriöt. Nämä syöpää aiheuttavat geneettiset häiriöt vaikuttavat solussa geenien ilmenemiseen ja sitä kautta solun toimintaan. Geenien ilmenemisen muutokset voivat johtua esimerkiksi geenimutaatioista tai epigeneettisistä muutoksista johtuvasta geenin virheellisestä transkriboinnista. Niillä on vaikutusta moniin solun toimintoihin, joiden säätely terveissä soluissa on tarkassa tasapainossa. Syövässä nämä muutokset johtavat epätasapainoon solun jakautumisen, erilaistumisen ja solukuoleman välillä, joka aikaansaa solujen epänormaalin kasvun ja syöpäsolukon kehittymisen. (Ruddon, 2007, s. 7)

Kasvaimet voivat olla joko hyvänlaatuisia eli benignejä tai pahanlaatuisia eli maligneja. Suurin osa elimistön kasvaimista on hyvänlaatuisia, jolloin ne kasvavat vain paikallisesti ja ovat usein isännälleen harmittomia. Pahanlaatuisesta kasvaimesta käytetään usein nimitystä syöpä: se pystyy tunkeutumaan ympäröiviin kudoksiin ja lähettämään etäpesäkkeitä kauaskin primaarikasvaimesta elimistön veri- ja imunestekierron välityksellä. Invasiivisuus ja kyky metastasoitua vetävätkin rajan hyvän- ja pahanlaatuisen kasvaimen välille. (Ruddon, 2007, s. 4; Weinberg, 2014, s. 32-33).

Syöväälle ominaisia piirteitä ovat nopeasta jakautumisesta johtuva geneettinen epätasapainoisuus sekä muutokset solun toiminnassa ja vuorovaikutuksessa soluväliaineen kanssa. Syövässä solujen kasvu ei ole säädeltyä ja ne pystyvät välttämään apoptoosin eli ohjelmoidun solukuoleman, jolla elimistö normaalisti tuhoaa virheelliset solut. Kehittyneet syöpäkasvaimet kykenevät myös kehittämään ympärilleen verisuoniston ravinnon ja hapen saannin turvaamiseksi. (Ruddon, 2007, s. 120)

2.2. Syövän synty

Karsinogeneesi on tapahtumasarja, joka aikaansaa syöpäsolun syntymisen elimistössä. Siihen vaikuttavat useat eri ulkoiset ja sisäiset osatekijät, joita tunnetaan paljon. Ulkoisia syitä ovat esimerkiksi elinympäristön saasteet ja elintavat, kuten tupakointi. Syöpää aiheuttavia sisäisiä syitä

voivat olla esimerkiksi synnynnäiset geenivirheet ja erilaiset häiriöt immuunipuolustuksessa. Nämä tekijät yhdessä voivat käynnistää tai edistää syövän kehittymistä elimistössä. (Ruddon, 2007, s. 7)

Yksi syöpää aiheuttava tekijä on virukset: tutkimusten mukaan jopa 25% ihmisten syövästä johtuu erilaisista infektoivista mikro-organismeista, joista noin 12% on viruksia (Araldi ym., 2018).

Virukset pystyvät leviämään nopeasti infektoimalla jatkuvasti uusia soluja, jolloin ne saavat solut tuottamaan lisää viruspartikkeleita, jotka edelleen jatkavat infektoimista. Normaalisti virukset lopulta tappavat isäntäsolunsa. Syöpää aiheuttavat virukset pystyvät sen sijaan pakottamaan infektoimansa solun jakautumaan hallitsemattomasti, joka johtaa syövän kehittymiseen.

(Weinberg, 2014, s. 71, 74) Virusinfektiot voivat aiheuttaa syöpää suoraan, jolloin viruksen geenit itsessään saavat solusta pahanlaatuisen, tai epäsuorasti heikentämällä solun puolustuskykyä ja edistämällä sitä kautta infektion aikaansaamaa pahanlaatuista kasvua. (Ruddon, 2007, s. 53)

Syövän syntymiseen liittyvät ulkoiset ja sisäiset tekijät vaikuttavat geenitasolla solussa tapahtuviin mutaatioihin. Syövän synnyssä oleellisessa osassa ovat elimistön onkogeeneit ja syövänestogeneit. Mutaatiot onkogeeneissä saavat ne aktivoitumaan ja aiheuttavat solussa solunjakautumisen häiriöitä. Syövänestäjägeeneit inaktivoituvat mutaatioiden seurauksena, jolloin solusyklin säätely muuttuu. Syöpäsolun syntymiseksi näihin geeneihin täytyy kohdistua ainakin kaksi mutaatiota, joista toinen voi olla synnynnäinen tai molemmat spontaaneja. (Ruddon, 2007, s. 5) Näiden geenien aktivaatio ja inaktivaatio ovat seurasta muutoksista geenien ilmenemisessä, jonka avulla eri kudoksissa olevat solut saamaan toimimaan ja ilmenemään eri tavoin, vaikka niiden genomi on sama. (Weinberg, 2014, s. 21)

Geenien ilmenemisessä pääosassa ovat transkriptiofaktorit, jotka vaikuttavat siihen, transkriboidaanko geeni solussa vai ei. Soluissa transkriptiofaktorit ovat sitoutuneet paitsi toisiinsa, myös useisiin muihin proteiineihin muodostaen DNA:han tarttuvan proteiinikompleksin (*transcription initiation complex*). Transkription aloitus vaatii kompleksin muodostumisen. Transkriptiofaktorit voivat joko edistää tai estää RNA-polymeraasin kiinnittymisen kompleksiin. Geenien ilmenemiseen vaikuttavat myös histonien modifikaatiot. Tumassa DNA on kromatiinina eli pakattuna proteiinien ympärille. Nukleosomi on kromatiinin proteiiniydin, joka muodostuu neljästä histonimolekyylistä. Näiden molekyylien modifikaatiot vaikuttavat kromatiinin rakenteeseen ja sitä kautta transkriptioon ja geenien ilmenemiseen. Kromatiinirakenteen muutokset vaikuttavat myös translaation jälkeisiin proteiinin modifikaatioihin. (Weinberg, 2014, s. 21-22)

Kolmas geenien ilmenemiseen vaikuttava tekijä ovat mikroRNA:t (miRNA), jotka säätelevät lähetti-RNA-molekyylien ja niiden translaation määrää sytoplasmassa. Ne toimivat sytoplasmassa osana RISC-nukleoproteiini-kompleksia (*RNA-induced silencing complex*), jolloin ne pystyvät liittymään lähetti-RNA:n kokonaan tai osittain komplementaariseen kohtaan ja rikkomaan sen tai estämään sen translaation. (Weinberg, 2014, s. 25)

2.3. Syövän kehitys

Syöpä lähtee kehittymään normaalista kudoksesta progressiivisesti kohti pahanlaatuista kasvainta. Se saa alkunsa usein vain yhdestä solusta, joka mutaatioiden seurauksena alkaa jakaantua ja muodostaa monoklonaalista kasvainsolukkoa. Kudoksessa voidaan tällöin nähdä useita muutoksia, jotka ovat merkkejä syöpäkasvaimen kehittymisestä. Niitä ovat esimerkiksi solujen hallitsematon kasvu ja niiden morfologiset muutokset sekä kasvaimen invasiivisuus. (Weinberg, 2014, s. 50)

Aluksi solujen kasvu on usein hyperplastista, jolloin solut eroavat normaaleista vain vähän, mutta niiden kasvu kudoksessa on kiihtynyt. Solun nopea kasvu on merkki kasvun säätelyn epäonnistumisesta, joka on syöpäsoluille tyypillistä. Toinen merkki epänormaalista kasvusta on metaplasia: se on kudoksen normaalien solujen korvautumista sellaisilla soluilla, joita kudoksessa ei normaalisti esiinny. Metaplasia on yleistä epiteelin muuntumisalueella, kuten kohdunkaulassa, jossa levyepiteeli muuttuu nopeasti limaa erittäväksi lieriöepiteeliksi. (Weinberg, 2014, s. 45-46)

Dysplasia on hyvänlaatuisten muutosten ja syövän esiasteiden välimuoto. Dysplastiset solut ovat epänormaalin näköisiä soluja: niiden tuman koko ja muoto, tuma-sytoplasma-suhde tai värjäytyvyys on mahdollisesti muuttunut, minkä seurauksena koko kudoksen rakenne näyttää sytologisesti erilaiselta. Tällöin myös normaalien kudoksen eri solutyypien erottuvuus vähenee. (Weinberg, 2014, s. 47) Syöpäsolut ovat usein myös anaplastisia eli vähemmän kehittyneitä kuin kudoksen muut solut. Anaplasia onkin yksi pahanlaatuisen kasvaimen tunnusmerkeistä.

Hyvänlaatuiset kasvaimet ovat sytologisesti muun kudoksen kaltaisia. (Ruddon, 2007, s. 11)

Neoplasia on kasvainsolukon levittäytymistä lähtökudoksen ulkopuolelle. Sitä voi esiintyä missä tahansa kudoksessa, jossa on jakautumiskykyisiä soluja ja se voi olla hyvän- tai pahanlaatuista. Esimerkiksi invasiivinen karsinooma pystyy leviämään epiteelin tyvikalvon ulkopuolelle ja on kykenevä myös metastasoitumaan. (Ruddon, 2007, s. 10; Weinberg, 2014, s. 47)

2.3.1. Karsinoomat

Suurin osa ihmisen kasvaimista on alkujaan peräisin epiteelikudoksesta, joka on paitsi elimistön ulkopintaa, myös elimistössä olevien onkaloiden ja kanavien pintaa peittävää kudosta. Karsinoomat ovat epiteelikudoksesta lähtöisin olevia syöpiä. Ne ovat ihmisten yleisimpiä syöpäsairauksia: yli 80% länsimaisista syöpäkuolemista johtuu karsinoomista. Karsinoomat voivat olla niin ekto-, endo- kuin mesodermaalistakin alkuperää riippuen siitä, minkä elimen epiteelisolukerroksessa kasvain on syntynyt. (Weinberg, 2014, s. 34-35)

Epiteelikudoksen solut ovat joko levy- tai lieriöepiteelisoluja. Levyepiteeli on esimerkiksi ihon pintaa suojaava epiteelityyppi ja sen päätehtävänä on olla kudoksen pinnalla suojaamassa sen alla olevia soluja. Levyepiteelikarsinooma on levyepiteelistä alkunsa saava syöpä. Epiteelikudoksessa on myös epiteelin tiheyttä suojaavia lieriöepiteelisoluja, jotka erittävät eritystuotteitaan tiehyisiin suojaamaan niiden pintaa. Näistä soluista alkava syöpä on nimeltään adenokarsinooma. (Weinberg, 2014, s. 37)

Kohdunkaulan syöpä on esimerkki karsinoomasta. Kohdunkaulassa on sekä ektoserviksin pintaa suojaavaa levyepiteeliä, että endoserviksiä peittävää lieriöepiteeliä, jonka seurauksena kohdunkaulan syöpä voi olla joko levyepiteeli- tai adenokarsinooma. Harvinaisissa tapauksissa kohdunkaulan syöpäkasvaimessa voi olla soluja molemmista alkuperistä. (Weinberg, 2014, s. 37)

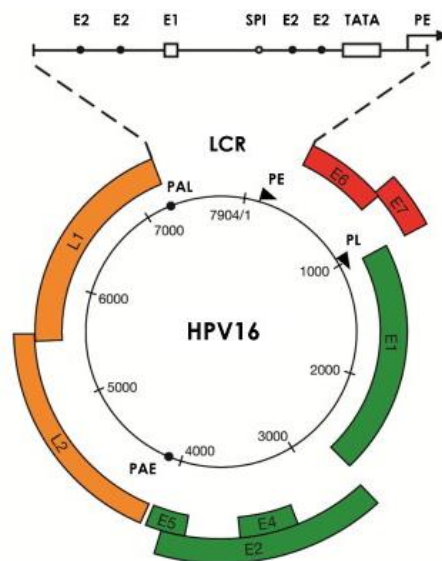
3. Ihmisen papilloomavirus

3.1. Viruksen rakenne ja toiminta

Ihmisen papilloomavirus (*Human papilloma virus, HPV*) on ihon, genitaalialueiden ja suun limakalvoja infektoiva virus, joka kuuluu *Papillomaviridae* -virusperheeseen (Araldi ym., 2018). HPV-tyyppejä on sekvensoitu yli 150 (Doorbar ym., 2012), joista genitaalialueita infektoivia on noin 40 (Muñoz ym., 2003). HPV-virukset ovat rakenteeltaan ikosahedraaleja ja kooltaan noin 50–55 nanometriä. Niiden perintöainne on rengasmaista kaksijuosteista DNA:ta, jonka pituus on noin 8000 emäsparia. (Araldi ym., 2018) HPV:n DNA sisältää vain kahdeksan geeniä ja se on jaettu kolmeen alueeseen: aikainen (*early, E*), myöhäinen (*late, L*) ja ei-koodaava (*non-coding, NCR*). E-

alueella sijaitsevat geenit E1, E2, E4, E5, E6 ja E7. L-alueella on lisäksi geenit L1 ja L2. (Araldi ym., 2018) Lähetti-RNA:n vaihtoehdoisen silmukoinnin ansiosta viruksen tuottamien geenituotteiden määrä on kuitenkin geenien määrää suurempi (Doorbar ym., 2012). (Kuva 1)

HPV:n E1- ja E2 -geenituotteet liittyvät geenien ilmenemisen ja viruksen DNA:n replikaation säätelyyn (Doorbar ym., 2012). E4- ja E5 -geenit muokkaavat solu ympäristöä ja säätelevät mm. solun tukirangan muodostumista (Doorbar ym., 2012; Monie ym., 2008). E6- ja E7 -geenit koodaavat papilloomaviruksen onkoproteiineja, joiden toiminnan seurauksena syövän kehitys on mahdollista. Näiden onkoproteiinien pääkohteet ovat epiteelisolun p53- ja pRB (*retinoblastoma tumor suppressor*) -proteiinit, joiden toimintaa hiljentämällä ne estävät solun apoptoosin ja normaalin solusyklin pysähtymisen. (Schiffman ym., 2007) E2-geeni toimii erityisesti E6- ja E7- onkogeneenien repressorina (Monie ym., 2008). L1- ja L2-geenit koodaavat viruksen proteiini kuoren rakenteita (Schiffman ym., 2007). HPV16-tyypistä on löydetty kaksi promoottoria: PE (*early promoter*) ja PL (*late promoter*), jotka säätelevät eri geenituotteiden ilmenemistä (Doorbar ym., 2012).



Kuva 1: HPV 16-virustyyppin genomirakenne. Säätelyalue (*long control region, LCR*) sisältää mm. sitoutumiskohtia E1- ja E2-geenituotteille sekä transkriptiofaktoreille. PAL ja PAE ovat lähetti-RNA:n muokkaamisessa liitettävien Poly-A-häntien liitoskohtia. (Doorbar ym., 2012)

Ihmisen papilloomavirus infektoi epiteelikudoksen tyvikerroksen soluja, joihin virus pääsee limakalvon pienien repeämien tai haavaumien kautta. Tyvikerroksen soluissa virus-DNA:ta ylläpidetään ja solujen erilaistessa kohti epiteelin pintakerrosta viruksen elinkierto käynnistyy,

jolloin ne kootaan ja lopuksi vapautetaan ulos soluista. On esitetty, että HPV tarvitsisi infektoimisen onnistumiseksi isännäkseen mitoottisesti aktiivisen solun. (Doorbar ym., 2012)

3.2. Virustyyppit ja niiden luokittelu

Ihmisen papilloomavirukset voidaan jakaa niiden DNA:n perusteella viiteen sukuun: alfa-, beta-, gamma-, nu- ja mu-papilloomaviruksiin. Alfa-suvun virustyyppit voidaan jakaa kohdekudoksen perusteella ihoon tai limakalvoon liittyviin, joista jälkimmäiset voidaan jakaa vielä matalan- ja korkean riskin tyypeihin. Eri HPV-sukujen virukset eroavat toisistaan myös esimerkiksi kohdekudoksen ja elinkiertonsa perusteella. (Doorbar ym., 2012)

Matalan riskin tyyppejä ovat HPV 6 ja 11 ja niitä on löydetty pääsääntöisesti genitaalialueen hyvänlaatuisista kondyloomista (Muñoz ym., 2003). Karsinogeenisiksi tai korkean riskin tyypeiksi luetaan WHO:n (World Health Organization) mukaan HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 ja 59. Lisäksi tyyppit 68 ja 73 ovat mahdollisesti karsinogeenisiä. Näistä erityisesti tyyppit 16, 18, 31, 33 ja 45 on yhdistetty kohdunkaulan syöpään. (Doorbar ym., 2012)

3.3. HPV ja kohdunkaulan syöpä

Genitaalialueen papilloomavirustartunta on hyvin yleinen: yli 80% naisista saa sen jossain vaiheessa elämänsä aikana (Doorbar ym., 2012). Tartunta saadaan yleensä nuoruudessa tai varhaisaikuisuudessa seksin välityksellä (Schiffman ym., 2007). Suurin osa, jopa 90% infektiosta etenkin nuorilla naisilla paranee itsestään kahden vuoden sisällä. Infektion saaminen johtaakin vain harvoin kohdunkaulan syövän kehittymiseen. (Doorbar ym., 2012)

Kohdunkaulan syövän kehittymiseksi HPV-infektion täytyy pystyä säilymään elimistössä immuunipuolustuksesta huolimatta ja integroitumaan solujen genomiin, jonka jälkeen viruksen infektoimat solut pystyvät kehittymään hiljalleen syövän esiasteiksi ja lopulta kohdunkaulan syöväksi. Infektoivan HPV-tyypin tulee olla karsinogeeninen, jotta levyepiteeli- tai adenokarsinoma voi kehittyä. (Schiffman ym., 2007; Bützow & Stenbäck, 2012b) Kohdunkaulassa esiintyvä levy- ja lieriöepiteelin junktio, eli muuntumisalue epiteelityypistä toiseen, on erityisesti altis kudos solumuutosten kehittymiselle (Doorbar ym., 2012).

Useimmissa tapauksissa elimistön soluvälitteinen immuunipuolustus estää HPV-infektion säilymisen elimistössä, jolloin se ei pääse etenemään tarpeeksi aiheuttaakseen kohdunkaulan syöpää tai sen esiasteita. Häiriöt immuunipuolustuksessa voivat kuitenkin johtaa pysyvään virusinfektioon ja etenkin korkean riskin virustyyppien kohdalla lisätä siten kohdunkaulan syövän kehittymisen riskiä. Papilloomavirusinfektioiden estämisessä erityisesti elimistön immuunipuolustuksen CD4-positiivisten T-lymfosyyttien Th1-vasteella on huomattu olevan suuri vaikutus. (Doorbar ym., 2012)

Infektiosta kuluva aika mahdolliseen syövän esiasteen kehittymiseen on arvioitu olevan noin 5-10 vuotta ja esiasteita löydetäänkin eniten 25-35-vuotialta naisilta. Esiasteiksi tai syöväksi etenemisen sijaan infektio usein paranee itsestään ja jopa esiastemuutosten palautuminen normaaliin on mahdollista. Kahden vuoden sisällä parantumattomia infektoita on noin 10% kaikista infektoista ja suurimmalla osalla niistä on selvä yhteys kohdunkaulan syövän esiasteisiin. Syövän esiasteista kuitenkin vain pieni osa etenee invasiiviseksi syöväksi. (Schiffman ym., 2007)

Geenitasolla syövän kehittymisen mahdollistavat muutokset viruksen onkogeeneiden toiminnassa. HPV:n onkogeeneinä toimivat E6- ja E7-geenit ilmenevät papilloomavirusinfektion alussa vain vähäisesti. Geenien ilmenemisen säätely kuitenkin muuttuu infektion edetessä syövän esiasteeksi ja johtaa lopulta niiden yli-ilmenemiseen infektion aiheuttamissa kudosisvaurioissa. Kehittyneessä syövässä onkogeenejä transkriboidaan jatkuvasti. (Schiffman ym., 2007) Matalan riskin HPV-tyypit eivät aiheuta neoplasiaa ja niiden E6- ja E7-geenien toiminta onkin vielä epäselvää (Doorbar ym., 2012). HPV-infektio saa solun geneettisesti epästabiiliksi, jonka vuoksi infektoituneisiin soluihin kohdistuu herkästi uusia somaattisia mutaatioita, jotka edistävät esiasteen kehittymistä. (Bützow & Stenbäck, 2012b)

HPV-infektio voi olla yhden tai useamman virustyyppin aiheuttama. Koska HPV tarttuu hyvin herkästi, on yleistä, että useat virustyyppit tarttuvat yhdessä. Useampi HPV-tyyppi yhtäaikaaisesti lisää ilmeisesti kokonaisriskiä sairastua kohdunkaulan syöpään tai sen esiasteisiin. Joskus jo parantunut infektio voi myös ilmetä uudelleen, mikä ilmeisesti johtuu viruksen säilymisestä epiteelin tyvikerroksen soluissa latenssilassa, josta se pystyy myöhemmin uudelleenaktivoitumaan. (Schiffman ym., 2007)

3.3.1. HPV-testi

HPV-testi on yksi kohdunkaulan syövän seulontamenetelmistä. Se on perinteistä sytologiaa herkempi menetelmä seulontatarkoitukseen: vain noin kolmasosalla naisista, jotka on testattu HPV-positiivisiksi, havaitaan sytologisia muutoksia kohdunkaulassa. HPV-testin avulla voidaan huomata muutokset, jotka jäisivät muuten huomaamatta ja jotka voisivat johtaa syövän esiasteiden kehittymiseen. Testiä käytetään erityisesti tilanteissa, jossa sytologialla saatu tulos on epäselvä. (Schiffman ym., 2007)

Monet HPV-testit perustuvat DNA:n hybridisaatioon ja monistumiseen (Nieminen ym., 2004). PCR-menetelmää on yleisesti käytetty HPV-DNA:n tunnistamisessa. Sen rinnalle kaupalliseen käyttöön on kehitetty esimerkiksi Hybrid Capture 2 (HC2) -analyysimenetelmä, joka tunnistaa 13 korkean riskin HPV-tyyppiä. Menetelmä on laadullinen ja perustuu DNA:n hybridisaatioon ja mikrolevyjen kemiluminesenssiin. (Kulmala ym., 2004)

HPV-testi on hyvin herkkä menetelmä erityisesti syövän esiasteiden löytämiseksi (Nieminen ym., 2004), mutta se löytää myös sellaiset infektiot, jotka todennäköisesti paranisivat itsestään ilman hoitoa. Se on myös perinteistä sytologiaa epätarkempi menetelmä. HPV-testiä ja perinteistä sytologiaa käytetäänkin usein rinnakkain. (Schiffman ym., 2007)

3.3.2. HPV-rokote

Kohdunkaulan syövän ehkäisyyn seulonnan rinnalle on kehitetty rokote, jonka tarkoituksena vähentää HPV-infektioita ja sitä kautta kohdunkaulan syövän ja muiden papilloomavirusinfektiosta johtuvien sairauksien esiintymistä. Yleisimmin käytössä olevat rokotteet ovat Cervarix® ja Gardasil®. Cervarix® sisältää kahta korkean riskin virustyyppiä (HPV 16 ja 18). (Monie ym., 2008) Gardasil®-markkinanimellä tunnetussa rokotteessa on neljää eri virustyyppiä (HPV 6, 11, 16 ja 18) eli se toimii myös hyvänlaatuisia kondyloomia aiheuttavia matalan riskin HPV-tyyppejä 6 ja 11 vastaan (Bryan, Buckland, Hammond, & Jansen, 2016). Paras teho rokotteesta saadaan annettaessa se mahdollisimman varhaisessa vaiheessa ennen seksielämän aloittamista (Monie

ym., 2008). Suomessa Cervarix© otettiin osaksi kansallista rokotusohjelmaa vuonna 2013. Rokote annetaan 11-13-vuotiaille tytöille ja se on todettu turvalliseksi (Skufca ym., 2018).

Rokotteet perustuvat ihmisen papilloomaviruksen L1-pintaproteiiniin, joka pystyy tuottamaan viruksenkaltaisia partikkeleita (*virus-like particles, VLPs*). Ne toimivat oikeiden virusten tavoin, jolloin ne saavat elimistön tuottamaan vasta-aineita näitä virustyyppijä vastaan jopa 40-kertaisesti verrattuna luonnolliseen infektiin. (Monie ym., 2008)

Gardasil© hyväksyttiin käyttöön vuonna 2006 ja Cervarix© vuonna 2009, jonka jälkeen HPV-tyyppien esiintyvyys on laskenut merkittävästi. Esimerkiksi Yhdysvalloissa HPV-tyyppien 6, 11, 16 ja 18 esiintyvyys laski vuodesta 2006 keskimäärin 56% vuoteen 2010 mennessä. (Bryan ym., 2016)

Rokotteiden teho kohdunkaulan syöpää vastaan on jopa 75-80% (Monie ym., 2008). Tehon lisäämiseksi on kehitetty kolmas rokote, joka tehoaa yhteensä yhdeksää HPV-tyyppiä vastaan. Neljän aiemman virustyyppin lisäksi siihen on liitetty maailmanlaajuisesti seuraavaksi yleisimmät tyyppit 31 ja 45 sekä Euroopassa, Aasiassa ja Afrikassa lisääntyneet tyyppit 33, 52 ja 58. Rokotetta voidaan käyttää myös miehille. (Bryan ym., 2016)

4. Kohdunkaulan syöpä ja esiasteet

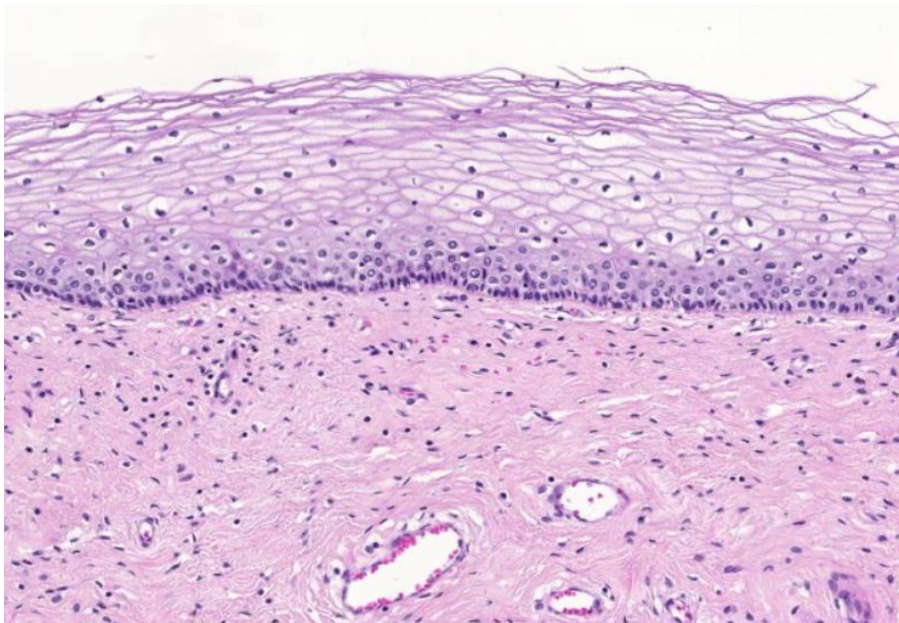
4.1. Kohdunkaulan normaali histologia

Kohdunkaula (*cervix*) jaetaan ektoserviksiin eli kohdunkaulan ulko-osaan (*portio*) ja endoserviksiin eli varsinaiseen kohdun kaulakanavaan (Jenkins, 2007). Portio ulottuu kohdun kaulakanavasta emättimeen, ja kohdunkaula emättimeen päin kohdun ulkosuuhun (*os externum*) ja kohtuun päin kohdun sisäsuuhun (*os internum*) (Bützow, 2012). Kohdunkaulassa on kahta erilaista epiteelikudosta: ektoserviksin pintaa peittävä epiteeli on levyepiteeliä ja endoserviksin pinta yksinkertaista lieriöepiteeliä (Jenkins, 2007). Ektoserviksin levyepiteeli on kerrostunutta ja sen tyvisolukko on yksirivinen (Bützow & Stenbäck, 2012c) (kuva 2). Kohdun kaulakanavan lieriöepiteeli on polarisoitunutta ja limaa tuottavaa (kuva 3). Se muodostaa kudokseen muutaman millimetrin syvyyteen ulottuvia haaroittuvia rauhasia (kuva 4). Endo- ja ektoserviksin muuntumisalueella (*transformation zone*) eli junktiossa tapahtuu metaplasiaa eli lieriöepiteelin

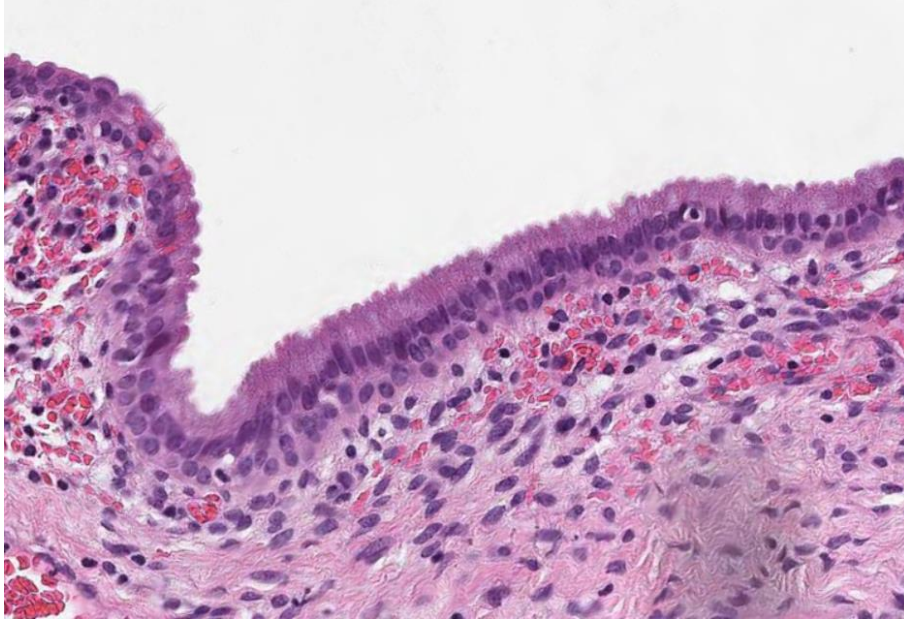
erilaistumista kestävämmäksi kerrostuneeksi epiteeliksi. (Bützow, 2012) Epiteelin muuntumisalue (kuva 5) on erityisen herkkä alue kohdunkaulan syövän kehittymiselle (Jenkins, 2007).

Epiteelikudoksessa kypsät, täysin erilaistuneet solut ovat pintakerroksessa ja niiden alla on soluja, joiden kypsyminen on vielä kesken. Epiteelisolukerrosten alla on tyvikalvo (*basal lamina*), joka erottaa epiteelikudoksen ja sen alla olevan sidekudoksen eli strooman toisistaan. Tyvikalvo on muodostunut soluväliaineesta, jonka epiteelisolujen erittämät proteiinit ovat kasanneet yhteen. (Weinberg, 2014, s. 34) Stroomassa on myös epiteelille ravintoa ja happea kuljettavia verisuonia (Ruddon, 2007, s. 10). Epiteelikudoksen rakenne on kaikkialla elimistössä sama (Weinberg, 2014, s. 34).

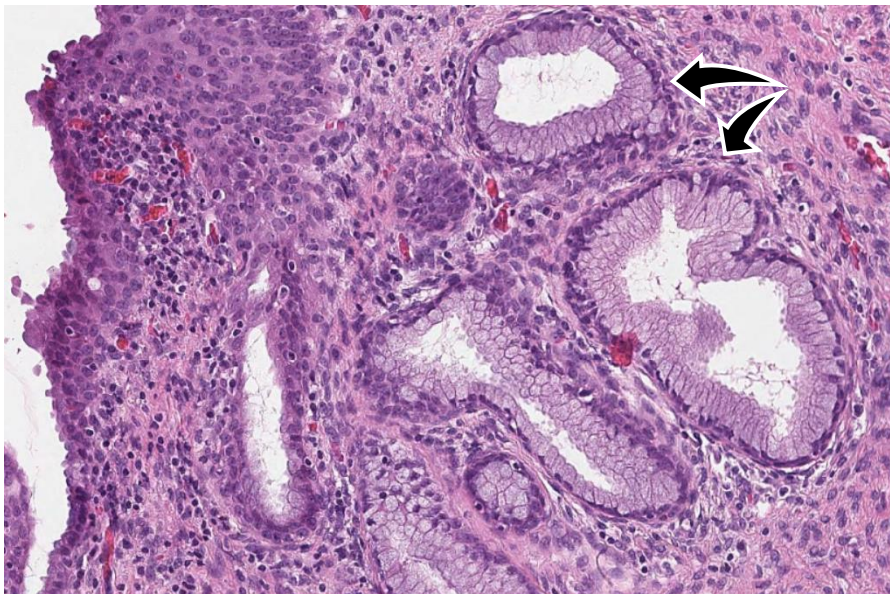
Epiteelikudoksessa on oma immuunijärjestelmä, jossa puolustuksesta vastaavat lymfosyytit, plasmasolut, makrofagit, NK-solut ja Langerhansin solut. Epiteelisolukerrosten alla olevan strooman alapuolella on sileää lihaskudosta. (Jenkins, 2007)



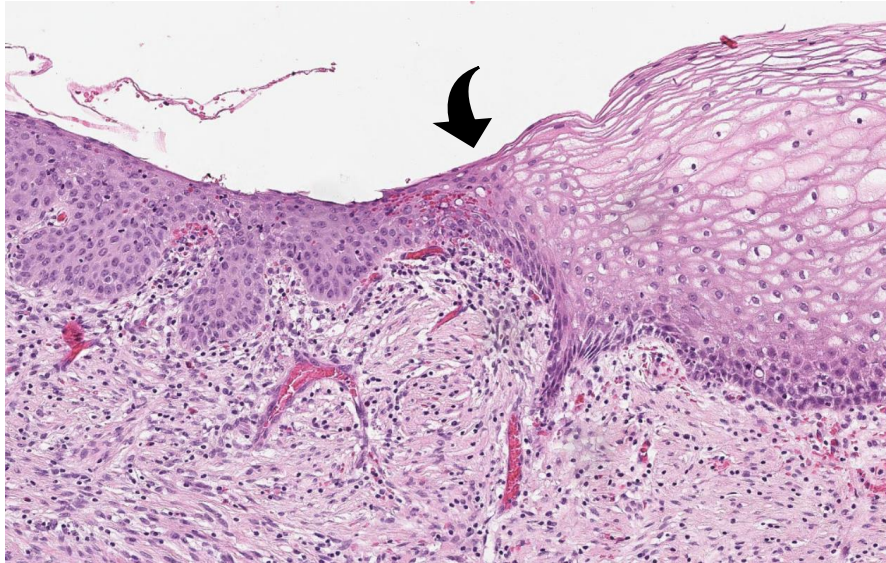
Kuva 2: Kerrostunut levyepiteeli
(Patologian oppiaineen opetuskokoelma, Oulun yliopisto)



Kuva 3: Yksirivinen lieriöepiteeli
(Patologian oppiaineen opetuskokoelma, Oulun yliopisto)



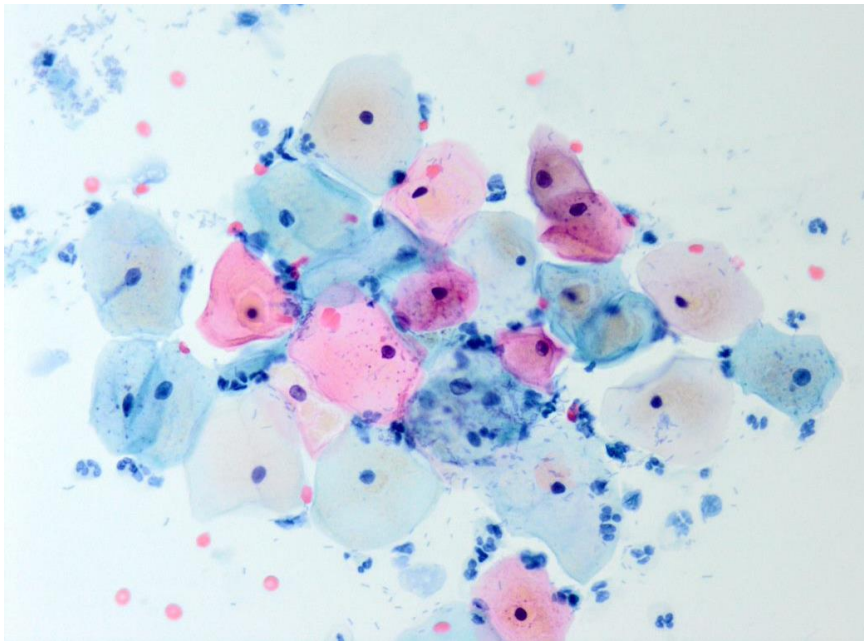
Kuva 4: Lieriöepiteelin rauhasia
(Patologian oppiaineen opetuskokoelma, Oulun yliopisto)



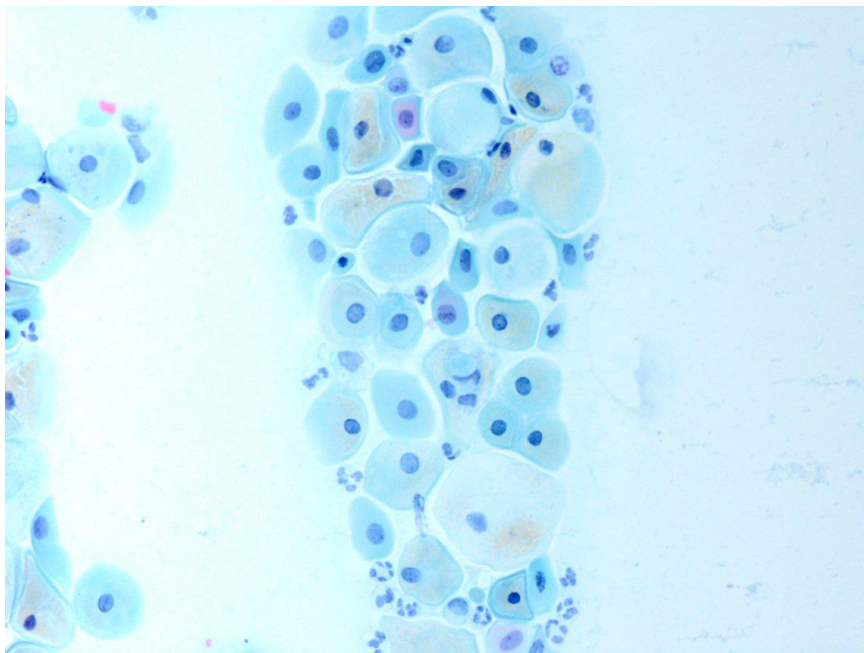
Kuva 5: Levy- ja lieriöepiteelin junktio
(Patologian oppiaineen opetuskokoelma, Oulun yliopisto)

4.2. Sytologiset ja histologiset muutokset

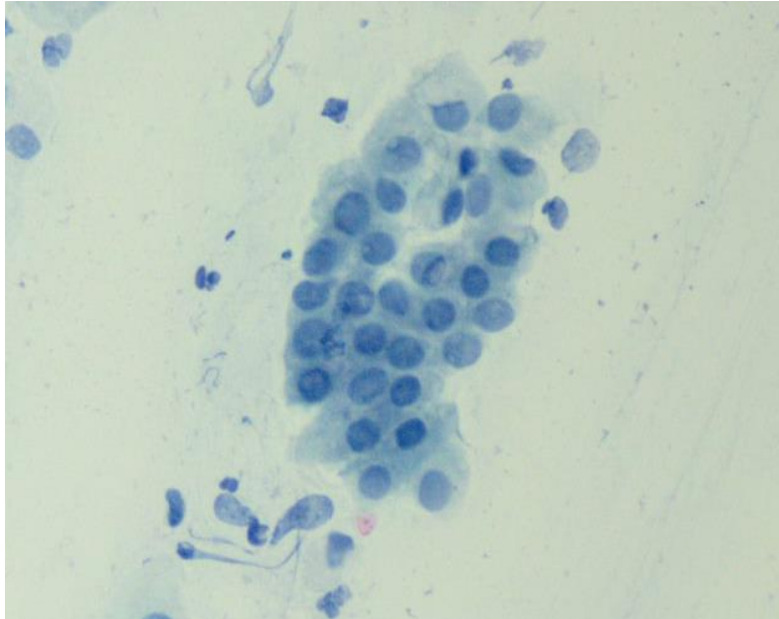
Sytologia on kohdunkaulan syövässä tärkein seulontamenetelmä. Sen avulla voidaan tutkia kohdunkaulan pinnalta kaavittuja soluja ja löytää mahdollisesti syöpään johtavat muutokset. (Jenkins, 2007) Sytologisessa näytteessä on irtosoluja emättimestä, porttiosta ja kohdunkaulakanavasta. Emättimen ja portion näytteet edustavat usein levyepiteeliä ja niissä voidaan nähdä kerrostuneen epiteelin keski- ja pintakerroksen soluja (kuva 6). Syvän kerroksen soluja (kuva 7) on nähtävissä näytteessä vain harvoin fertiili-ikäisillä naisilla ja ne viittaavatkin usein epiteelin vaurioon. Kohdunkaulakanavan näytteen solut ovat lieriöepiteelisoluja, jotka ovat näytteessä usein suurena kappaleena ja joskus hunajakennomaisesti järjestäytyneinä (kuva 8). (Bützow & Stenbäck, 2012a)



Kuva 6: Normaaleja levyepiteelisoluja sytologisessa näytteessä (Vesa-Matti Pohjanen)



Kuva 7: Levyepiteelin syvän kerroksen soluja sytologisessa näytteessä (Vesa-Matti Pohjanen)



Kuva 8: Normaaleja lieriöepiteelisoluja sytologisissa näytteissä (Vesa-Matti Pohjanen)

Sytologisessa näytteessä soluissa voidaan nähdä tiettyjä piirteitä, jotka ovat tyypillisiä kasvainsolukoille. Atyypisten solujen morfologia on usein monimuotoisempaa kuin terveessä kudoksessa ja niiden tuma on suurempi, epänormaali tai niitä voi olla useita. Tuma voi olla myös hyperkromaattinen ja siinä voi olla nähtävissä suuria tumajyväsiä. Tuma-sytoplasma-suhde on usein suurempi kuin terveessä solussa. Lisäksi mitooseja on nähtävissä tavallista enemmän ja ne voivat olla epänormaaleja. (Ruddon, 2007, s. 14)

Histologia on biopsia- tai kudoksenäytteiden mikroskooppista tarkastelua ja sen avulla voidaan yksittäisten solujen tutkimisen lisäksi mm. tarkastella solujen järjestäytymistä kudoksessa. Myös syövän tai sen esiasteen luokitus ja hoito määräytyvät usein histologisen tutkimuksen perusteella. (Jenkins, 2007)

Sytologiaa ja histologiaa käytetään yleisesti rinnakkain kohdunkaulan syövän seulonnassa ja hoidossa ja yhdessä ne ovat vähentäneet kohdunkaulan syövän esiintyvyyttä huomattavasti. Sytologian ja histologian rinnalle ovat nousseet myös virologiset ja molekulaariset menetelmät, kuten HPV-DNA-testaus, mutta ne eivät ole toistaiseksi syrjäyttäneet näitä perinteisempiä menetelmiä kohdunkaulan syövän ehkäisyssä. (Jenkins, 2007)

Kohdunkaulan syövän sytologisten muutosten luokitukset ovat aiemmin perustuneet Papanicolaun järjestelmään, jossa muutokset on luokiteltu niiden pahanlaatuisuuden perusteella luokkiin I-V. Järjestelmässä luokka I edustaa atyyppisten solujen puuttumista ja luokka V selkeästi pahanlaatuisia muutoksia. Solumuutosten histologisessa luokittelussa on yleisesti käytetty CIN (*cervical intraepithelial neoplasia*) -järjestelmää. CIN-järjestelmän avulla levyepiteelimuutokset voidaan luokitella niiden morfologian perusteella luokkiin CIN 1, CIN 2 ja CIN 3. Nykyään yleisesti käytössä oleva luokittelusysteemi on Bethesdan järjestelmä. Sen avulla syto- ja histologisia termejä on yhtenäistetty. (Jenkins, 2007)

Bethesdan järjestelmässä levyepiteelimuutokset muutokset jaetaan atyyppisiin solumuutoksiin, levyepiteelimuutoksiin ja levyepiteelikarsinoomaan. Atyyppiset solumuutokset luokitellaan ASC (*atypical squamous cells*) -luokkaan, jonka alaluokkia ovat ASC-US (merkitys epäselvä) ja ASC-H (HSIL ei poissuljettavissa). Kohdunkaulan levyepiteelimuutokset voidaan jakaa kahteen luokkaan: LSIL (*low squamous intraepithelial lesion*) eli lieväästeinen levyepiteelimuutos ja HSIL (*high squamous intraepithelial lesion*) eli vahva-asteinen levyepiteelimuutos. (Jenkins, 2007)

CIN 1 luetaan kuuluvaksi Bethesdan luokkaan LSIL, kun taas CIN 2 ja CIN 3 luetaan luokkaan HSIL (Jenkins, 2007). Kohdunkaulan syövän esiasteiksi luokitellaan CIN 3 -asteen solumuutokset, johon luokitellaan kuuluvaksi myös carsinoma in situ eli pintasyöpä. CIN 2 -asteen muutokset voivat olla myös matalan riskin virustyyppien aiheuttamia, jolloin niitä ei voida määrittää esiastemuutoksiksi. (Schiffman ym., 2007)

Bethesdan järjestelmässä lieriöepiteeliatypiat (*atypical glandular cells, AGC*) jaetaan kahteen luokkaan: AGC-FN -luokkaan kuuluvat atyyppiset solumuutokset, joissa on epäily neoplasiasta. AGC-NOS -luokkaan luetaan atyyppiset rauhasolut, joiden merkitys on epäselvä. Atyyppiset lieriöepiteelisolut jaetaan niiden alkuperän perusteella endoservikaalisiksi tai endometriaalisiksi. Aina alkuperää ei pystytä määrittämään. (Jenkins, 2007)

Lieriöepiteelin pintasyöpä luokitellaan adenocarsinoma in situksi (AIS) ja invasiivinen syöpä adenokarsinoomaksi. (Jenkins, 2007)

Taulukko 1: Bethesda-systeemin mukainen levy- ja lieriöepiteelimuutosten luokittelu

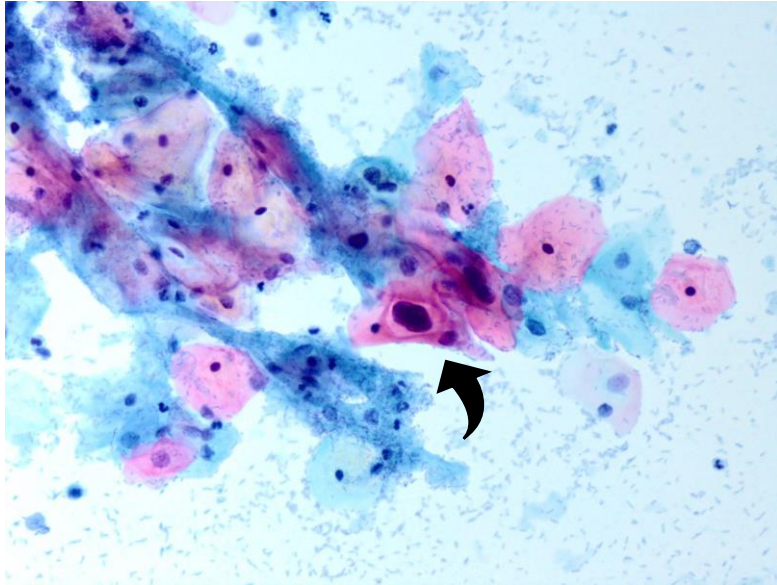
Levyepiteeli	Atyyppiset solumuutokset	ASC-US
		ASC-H
	Levyepiteelimuutokset	LSIL
		HSIL
Levyepiteelikarsinoma		
Lieriöepiteeli	Atyyppiset solumuutokset	AGC-FN (endoservikaalinen/ endometriaalinen/merkitys epäselvä)
		AGC-NOS (endoservikaalinen/ endometriaalinen/merkitys epäselvä)
	Adenocarsinoma in situ	
	Adenokarsinoma	

4.2.2. Levyepiteeli

Suurin osa kohdunkaulan syövästä ja esiasteista on levyepiteeliperäisiä: n. 70% invasiivisista kohdunkaulan syövästä on levyepiteelikarsinomia. Suuressa osassa näissä karsinomoissa HPV 16 on pääasiallinen virustyyppi. (Jenkins, 2007)

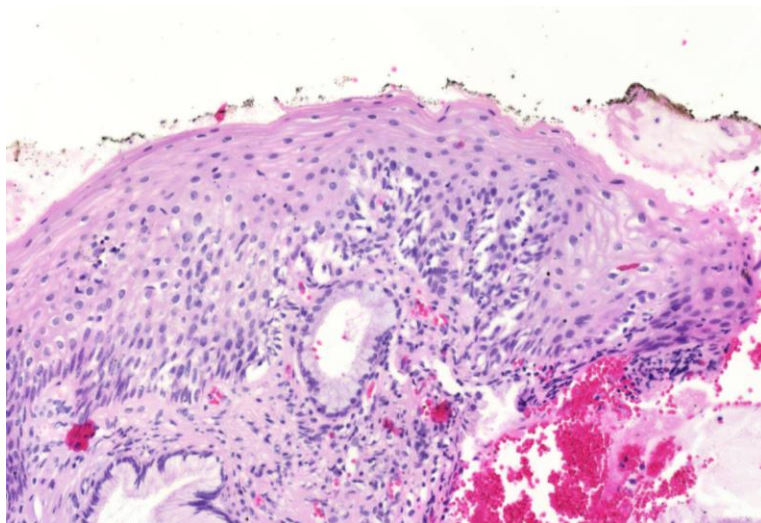
LSIL-muutoksissa (CIN 1) tyvikerroksissa on hyperplasiaa, jonka seurauksina kerrosten paksuus on kasvanut. Epiteelisolujen tumat ovat epänormaaleja ja joissain soluissa tumia voi olla kaksi. HPV-infektiosta merkinä näkyvät keratinisaatio eli sarveistuminen sekä koilosyytit (kuva 9). Koilosyytit ovat epiteelisoluja, joiden tuma on suurentunut ja sen reuna on epätasainen. Ne ovat usein myös hyperkromaattisia ja niiden tuman ympärillä on selvärajainen aukio, ”halo”. (Jenkins, 2007)

Epäkypsiä ja mitoottisesti aktiivisia soluja on kolmasosa epiteelin paksuudesta (Bützow & Stenbäck, 2012c).



Kuva 9: Koilosyytti LSIL-muutoksessa sytologisessa näytteessä (Vesa-Matti Pohjanen)

HSIL-muutoksissa (CIN 2 ja CIN 3) solujen tumat ovat selvästi atyyppisiä ja koilosyytit ovat yleisiä. Epäkypsiä soluja on jopa kaksi kolmasosaa epiteelin paksuudesta, mutta epiteelin pinnan puolella on vielä kypsyneitä, tosin atyyppisiä soluja (kuva 10). Soluissa voi näkyä epänormaaleja mitooseja ja mitoottisia soluja voi näkyä epätavallisen korkealla kypsyneessä epiteelissä. (Jenkins, 2007) Myös rauhaskäytävissä voi näkyä atyyppistä solukkoa (Bützow & Stenbäck, 2012c). HSIL-muutoksiin luetaan myös carcinoma in situ, missä kypsät solut ovat korvautuneet epäkypsillä soluilla koko epiteelin paksuudelta. HSIL-muutoksissa voi näkyä myös piirteitä LSIL-muutoksista. (Jenkins, 2007)



Kuva 10: HSIL-muutos histologisessa näytteessä (Patologian oppiaineen opetuskoelma, Oulun yliopisto)

Lieriöepiteelimuutosten kulku ja adenokarsinooman kehittyminen muistuttaa levyepiteelikarsinooman kehittymistä. Adenokarsinoomassa HPV 18 on pääasiallinen virustyyppi ja yhdessä HPV 16 -tyypin kanssa ne löytyvät 80% tapauksista. Adenokarsinomia tai adenolevyepiteelikarsinomia on noin 30% kohdunkaulan invasiivisista syövästä. (Jenkins, 2007)

Adenokarsinooman esiasteen tyypillisiä piirteitä ovat lieriöepiteelin järjestyksen ja rakenteen muutokset, solujen kerrostuminen, epänormaalit mitoosit ja epäsäännölliset ja suurentuneet tumat sekä silmiinpistävä tumajyvänen epiteelisoluissa (Jenkins, 2007). Atypia on korostuneempaa in situ -adenokarsinoomassa. Adenokarsinoomassa on tyypillisesti nähtävissä rauhasten epäjärjestyttä ja invasiivisuutta epiteelin alla olevaan stroomaan. (Bützow & Stenbäck, 2012c) Myös kohdunkaulan adenokarsinooma saa yleensä alkunsa epiteelin junktiosta (Jenkins, 2007).

Lieriöepiteelin matala-asteiset muutokset ovat hankalampia määrittää, sillä muutokset voivat olla epäyhtenäisiä ja esiintyä epiteelikudoksessa pirstaloituneena. Matala-asteisten lieriöepiteelimuutosten seulonta on ollut yhtä tehokasta kuin levyepiteelimuutoksissa. In situ -adenokarsinooma ja muut vahva-asteiset muutokset ovat helpompia havaita ja määrittää. (Jenkins, 2007)

5. Yhteenveto

Kohdunkaulan syövän taustat tiedetään nykyään tarkasti aina geenitasolle asti. Etenkin kohdunkaulan syövän taustalla vaikuttavaa ihmisen papilloomavirusta on tutkittu paljon ja tiedon määrän lisääntymisen ansiosta esimerkiksi syövän hoitoon ja ehkäisyyn on pystytty kehittämään uusia välineitä. Uutta tietoa ja teknologiaa on hyödynnetty esimerkiksi HPV-DNA-testin ja HPV-rokotteen kehittämisessä. Kuitenkin perinteiset menetelmät, sytologia ja histologia, ovat pysyneet vielä toistaiseksi valtamenetelminä seulonnassa ja hoidossa.

Sytologia ja histologia perustuvat solujen ja kudosten mikroskooppiseen tarkasteluun ja ihmisen fysiologian sekä solubiologian tuntemukseen. Näytteistä voidaan nähdä kohdunkaulan syöpään tai sen esiasteisiin viittaavia muutoksia sekä merkkejä HPV-infektiosta. HPV-tyyppiä tai viruksen

määrää ei sytologisesti tai histologisesti pystytä määrittämään. Sytologinen irtosolunäyte ja seulontojen aloitus vähensivät kohdunkaulan syöpää ja siihen liittyvää kuolleisuutta aikanaan huomattavasti: nyt nähtäväksi jää, kuinka paljon tartunnat vähenevät HPV-rokotteiden ansiosta. Suomessa rokotusohjelman myötä tytöt tullaan rokottamaan järjestelmällisesti alakouluikäisinä.

Kohdunkaulan syöpä on yksi harvoista syöivistä, jota vastaan pystyy suojautumaan rokotteella tai jonka ehkäisyyn on kehitetty väestön seulontaohjelma. Esimerkiksi Suomessa kohdunkaulan syöpä on rintasyövän ohella ainoa seulottava syöpä. HPV-tutkimuksen tuotteena syntyneet HPV-rokotteet ovat käytännössä ainoita keinoja suojautua yleisimpien HPV-tyyppien aiheuttamilta infektioilta ja sitä kautta mahdollisesti myös kohdunkaulan syövältä.

Lähdeluettelo

- Araldi, R. P., Sant'Ana, T. A., Módolo, D. G., de Melo, T. C., Spadacci-Morena, D. D., de Cassia Stocco, R., . . . de Souza, E. B. (2018). The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *106*, 1537-1556. doi:10.1016/j.biopha.2018.06.149
- Bryan, J. T., Buckland, B., Hammond, J., & Jansen, K. U. (2016). Prevention of cervical cancer: Journey to develop the first human papillomavirus virus-like particle vaccine and the next generation vaccine. *Current Opinion in Chemical Biology*, *32*, 34-47. doi:10.1016/j.cbpa.2016.03.001
- Bützow, R. (2012). Gynekologisten elinten embryologia ja anatomia. Teoksessa: Mäkinen, M., Carpen, O., Kosma, V. M., Lehto, V. P. Paavonen, T., Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Bützow, R., Stenbäck F. (2012)a. Gynekologinen irtosolututkimus eli papatutkimus. Teoksessa: Mäkinen, M., Carpen, O., Kosma, V. M., Lehto, V. P. Paavonen, T., Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Bützow, R., Stenbäck F. (2012)b. Kohdunkaulan HPV-infektio. Teoksessa: Mäkinen, M., Carpen, O., Kosma, V. M., Lehto, V. P. Paavonen, T., Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Bützow, R., Stenbäck F. (2012)c. Kohdunkaulan karsinooman esiasteet. Teoksessa: Mäkinen, M., Carpen, O., Kosma, V. M., Lehto, V. P. Paavonen, T., Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, *30*, F70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Jenkins, D. (2007). Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Disease Markers*, *23*(4), 199-212. doi:10.1155/2007/874795
- Kulmala, S. M., Syrjänen, S., Shabalova, I., Petrovichev, N., Kozachenko, V., Podistov, J., . . . the NIS Cohort Study Group. (2004). Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(6), 2470-2475. doi:10.1128/JCM.42.6.2470-2475.2004

- Monie, A., Hung, C. -, Roden, R., & Wu, T. -. (2008). Cervarix™:A vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, 2(1), 107-113. Haettu osoitteesta: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Muñoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., . . . Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518-527. doi:10.1056/NEJMoa021641
- Nieminen, P., Vuorma, S., Viikki, M., Hakama, M., & Anttila, A. (2004). Comparison of HPV test versus conventional and automation-assisted pap screening as potential screening tools for preventing cervical cancer. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 111(8), 842-848. doi:10.1111/j.1471-0528.2004.00210.x
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology*. Oxford: Oxford University Press. Haettu osoitteesta: <http://ebscohost.com>
- Schiffman, M., Castle, P., E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370, 1-17. doi:10.1128/CMR.16.1.1-17.2003
- Skufca, J., Ollgren, J., Artama, M., Ruokokoski, E., Nohynek, H., & Palmu, A. A. (2018). The association of adverse events with bivalent human papilloma virus vaccination: A nationwide register-based cohort study in finland. *Vaccine*, 36(39), 5926-5933. doi:10.1016/j.vaccine.2018.06.074
- Weinberg, R. A. (2014). *The biology of cancer* (2nd ed ed.). New York: Garland Science.
- Kuva 1: Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083, Figure 2B. Kuvan käyttöön saatu lupa (3.12.2018/Elsevier).
- Kuvat 2, 3, 4, 5, 10: Patologian oppiaineen opetuskokoelma, PathXL-virtuaalimikroskooppi, Oulun yliopisto. Haettu osoitteesta: <http://lieko.oulu.fi>. Kuvien käyttöön saatu lupa (2.12.2018/Markus Mäkinen).
- Kuvat 6, 7, 8, 9: Vesa-Matti Pohjanen. Kuvien käyttöön saatu lupa (3.12.2018).