

Kaisu Mikkola

Kolmoiskuvantamismenetelmän kehitys hermo- soluyhteyksien toiminnallisuuden tutkimiseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

28.5.2017

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Kaisu Mikkola Kolmoiskuvantamismenetelmän kehitys hermosoluyhteyksien toiminnallisuuden tutkimiseen 33 sivua + 3 liitettä 28.5.2017
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Tutkijatohtori Teemu Aitta-aho Lehtori Tiina Soininen
<p>Ruokahalunsäätelyyn vaikuttavia tekijöitä on tutkittu laajalti etenkin hypotalamuksesta. Etuaivojen pohjaosassa sijaitsevien kolinergisten neuroneiden tuottamalla välittäjäaine asetyylikoliinilla on uskottu olevan myös rooli ruokahalunsäätelyssä, mutta tutkimuksia asetyylikoliinin roolin selvittämiseksi ei ole juuri tehty. Menetelmiä hermoyhteyksien tutkimiseksi on useita kuten esim. immunohistokemialliset värjäykset, <i>in situ</i> -hybridisaatio ja hermoyhteyksissä kulkeutuvat beadit.</p> <p>Tämän insinööriyön tavoitteena oli kehittää kolmoiskuvantamismenetelmä, jota voidaan käyttää tutkittaessa uusia ja tunnettuja hermosoluyhteyksiä, jotka säätelevät syömiskäyttäytymistä. Menetelmän kehityksen jälkeen koe-eläimille suoritettiin syömiskoe, jossa käytettiin lähtötietona jo tunnettua hermoyhteyttä, joka alkaa etuaivojen pohjaosan aivoalueesta SIB päättyen mantelitumakkeen aivoalueeseen BLA. Hypoteesina oli selvittää, aktivoituko tutkittava hermoyhteys koe-eläimillä niille suoritettulla syömiskokeella, jolloin voitiin tutkia kehitetyn kolmoiskuvantamismenetelmän toimivuutta sekä sitä, oliko kyseisellä hermoyhteyden kolinergisella signaaloinnilla merkitystä ruokahalunsäätelyn kannalta.</p> <p>Työ aloitettiin kolmoiskuvantamismenetelmän kehittämällä, jossa uutena menetelmänä käytettiin RetroBead (RB), Red -lateksipalloja, jotka kulkeutuvat hermoyhteyksissä synapsista soomaan. Kolmoiskuvantamismenetelmän kehittämällä oli tarkoituksena saada leikkeellä näkyviin RB:t ja kaksi immunohistokemiallista värjäystä - ChAT- ja c-Fos-DAB-värjäys. Onnistuneen menetelmän kehittämisen jälkeen aloitettiin varsinaiset syömiskokeet tehden RB-injektio, jonka jälkeen RB:n annettiin kulkeutua 48 h hermoyhteyksissä. Syömiskokeet suoritettiin RB:n kulkeutumisen jälkeen ja ne kestivät 1,5 h. Syömiskokeet suoritettiin kahdeksalle hiirelle, joista puolet kuului kontrolliryhmään ja puolet sukroosiryhmään. Hiirten aivot leikattiin 30 µm:n paksuisiksi leikkeiksi ja leikkeille suoritettiin immunohistokemialliset värjäykset. Leikkeet kuvattiin epifluoresenssimikroskoopilla ja laskettiin kuvissa näkyvät asetyylikoliinisolut, joissa näkyi RB:t tai RB:t ja c-Fos-proteiini. Tilastollisena analyysinä käytettiin t-testiä, luottamusvälillä 0,05, jonka tarkoituksena oli selvittää, oliko kontrolli- ja sukroosiryhmän hiirien keskiarvojen välillä tilastollisesti merkitsevää eroa.</p> <p>Koko työssä kolmoiskuvantamismenetelmän kehittäminen onnistui erittäin hyvin ja on toimiva menetelmä uusien ja tunnettujen hermoyhteyksien tutkimisessa. Syömiskokeiden tilastollisissa analyysissä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa sukroosi- ja kontrolliryhmän hiirien välillä. Vaikka tilastollista merkitsevyyttä ei ollut, voidaan kuitenkin sanoa sukroosi- ja kontrolliryhmän hiirien välillä näkyvän selviä eroja aktiivisten solujen määrissä. Koe voidaan uusia samoja menetelmiä käyttäen kasvattaen koe-eläinten otoskokoa, jolloin tuloksista saadaan luotettavampia.</p>	
Avainsanat	ACh, RetroBead, ChAT, cFos, etuaivojen pohjaosa, SIB, mantelitumake, BLA

Author Title Number of Pages Date	Kaisu Mikkola Developing a triple labeling method to study functionality of neuronal connections 33 pages + 3 appendices 28 May 2017
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Teemu Aitta-aho, Postdoctoral Researcher Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>Factors affecting appetite regulation has been widely researched specifically in hypothalamus. Cholinergic neurons which produce the neurotransmitter acetylcholine and are located in the basal forebrain has been suggested to have a role in appetite control, but almost no research has been done to determine what the role is. There are many methods to research neural connections, i.e immunohistochemical stainings, <i>in situ</i> -hybridization and neuronal tracer's beads.</p> <p>The objective of this thesis was to develop a triple labeling method which can be used for researching brand new and already known neural connections which regulate eating behavior. After the method development, test animals underwent a feeding experiment in which the already known neural connection was used as initial data. The already known neural connection starts in basal forebrain's brain region SIB and ends in amygdalas brain region BLA. The purpose was to determine whether the neural connection activated in the feeding experiment performed on the test animals, which could be used to research the functionality of the developed triple labeling method and to establish whether the specific neural connection's cholinergic signaling plays a role in appetite control.</p> <p>The project started by developing a triple labeling method in which retrobead (RB), red latex microspheres were used as a new method. RBs are carried from synapses to somas in neural connections. The purpose of developing a triple labeling method was to make the RBs and two immunohistochemical stainings – ChAT- and c-Fos-DAB –stainings visible. After successful development of triple labeling method the actual feeding experiment started by injecting RBs and letting them carried in neural connections 48 h. After RBs were carried in neural connections feeding experiment started and lasted 1,5 h. Experiment were performed for eight mice which half of them belonged in <i>control</i> group and other half to a <i>sucrose</i> group. Mice brain were cut to 30 µm thick sections and the sections were performed immunohistochemical stainings. Images were taken of the sections by epifluorescence microscope after stainings, and from the images it was possible to count the acetylcholine cells which exhibited RBs or RBs and c-Fos-protein. A t-test was used with the confidence level of 0.05 as a statistical analysis method to determine whether there were statistically significant difference between the averages of the <i>control</i> group and those of the <i>sucrose</i> group.</p> <p>The development of the triple staining method was very successful and was found to be a working method to study brand new and already known neural connections. There were no statistically significance between the <i>control</i> and <i>sucrose</i> group mice. Despite the lack of statistical significance, it can be said that there were clear differences in the active cell counts. This study could be repeated using the same methods by increasing the sample size of the test animals, making the results more reliable.</p>	
Keywords	ACh, RetroBead, ChAT, cFos, basal forebrain, SIB, amygdala, BLA

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Asetyylikoliinin välittämä hermoyhteys	2
2.1	Asetyylikoliinin rooli ruokahalun säätelyssä	2
2.2	Asetyylikoliinijärjestelmä aivoissa	2
2.3	ChAT-entsyymi	4
2.4	Mantelitumake	5
2.5	Etuaivojen pohjaosa	6
2.6	Tutkimusmenetelmiä neurotieteessä	7
2.6.1	RetroBead, Red -merkkiaine	7
2.6.2	C-Fos-proteiini	10
2.6.3	Immunohistokemia	10
2.6.4	Avidiini-biotiini-kompleksi	11
2.6.5	Epifluoresenssimikroskopia	12
3	Työn suoritus	13
3.1	Työn suorittamisen vaiheet	13
3.2	Näytteen esikäsittely	14
3.2.1	Perfuusio	14
3.2.2	Jäädityssuojauskäsittely	14
3.2.3	Aivojen jäädytys	14
3.3	Jääleikkeet	15
3.4	RetroBead, Red -merkkiaineen käyttö	15
3.5	ChAT-värjäys	15
3.6	c-Fos-DAB-värjäys	16
3.7	ChAT- ja c-Fos-DAB-värjäykset	17
3.8	Mikroskopia	17
4	Tulokset	18
4.1	Menetelmän kehittäminen	18
4.1.1	RetroBead-optimointi	18
4.1.2	ChAT-värjäyksen ja RetroBeadin optimointi	19
4.1.3	c-Fos-DAB-värjäyksen ja RetroBeadin optimointi	21
4.1.4	ChAT- ja c-Fos-DAB -värjäysten ja RetroBeadin optimointi	22

4.2	Menetelmän soveltaminen	23
4.2.1	RetroBead-injektiot	23
4.2.2	Tilastolliset tulokset	24
5	Yhteenveto	30
	Lähteet	32
	Liitteet	
	Liite 1. ChAT-vasta-ainevärijäys	
	Liite 2. C-Fos-DAB-vasta-ainevärijäys	
	Liite 3. C-Fos-DAB- ja ChAT-vasta-ainevärijäykset yhdistettynä	

Lyhenteet

ACh	Asetyylikoliini. Välittäjäaine.
BLA	Basolateral amygdala. Manteliumakkeessa sijaitseva aivoalue.
c-Fos	Proto-onkogeeni, jonka ilmentymistä käytetään leimana neuroaliselle aktivaatiolle.
ChAT	Koliiniasetyylitransferaasi. Entsyymi, joka osallistuu asetyylikoliinin synteesiin.
DAB	3,3' -diaminobentsidiini. Substraatti, joka hapettuu peroksidaasientsyymien vaikutuksesta.
PBS	Phosphate-buffered saline. Fosfaattipuskuri.
RB	RetroBead. Neurotieteissä käytettävä merkkiaine, joka kulkeutuu hermoyhteyksissä synapsista soomaan eli "takaperin".
SIB	Substantia innominata, basal part. Etuaivojen pohjaosassa sijaitseva aivoalue.

1 Johdanto

Hermosto muodostuu keskushermostosta ja ääreishermostosta. Hermosto on monimutkainen tiedonvälitys- ja säätelyjärjestelmä, joka perustuu hermosolujen sähkökemialliseen viestintään. Hermoverkot koostuvat hermosolujen muodostamista hermoista, jotka saattavat ulottua monelle eri aivoalueelle. Hermoverkkojen tutkimisessa uusien lääkevaikutusalueiden löytämisen näkökulmasta, tutkitaan hermoverkon muodostaneiden hermosolujen toimintaa ja niiden vaikutusalueita. Uusien lääkevaikutusalueiden löytämisen tarkoituksena on kohdentaa lääkkeitä suoraan lääkittävään kohteeseen, vaikka toistaiseksi ei ole mahdollista kohdentaa lääkkeitä juuri tiettyyn kohtaan aivoissa. Lääkevaikutusalueiden löytämisellä voidaan vähentää lääkkeiden kulkeutumista muualle kehoon ja estää lääkkeiden kulkeutumisesta aiheutuneet haittavaikutukset.

Etuaivojen pohjaosan tärkeimpiä tehtäviä tiedetään olevan valveillaolon ja unen säätely. Etuaivojen pohjaosassa sijaitsee aivojen tutkituimpia hermosolujen verkostoja, joissa on suuria hermosoluja, jotka käyttävät välittäjäaineenaan asetyylikoliinia (ACh). ACh aivoissa vaikuttaa solujen väliseen viestintään ja ACh:a sisältävät solut toimivat aivoissa pääosin neuromodulaattoreina, jolloin ne vaikuttavat muihin hermoverkkojen soluihin. Hermosolut, jotka käyttävät välittäjäaineenaan asetyylikoliinia, kutsutaan kolinergisiksi neuroneiksi. ACh:n roolia ruokahalunsäätelyssä on tutkittu vielä hyvin vähän, mutta etuaivojen pohjaosassa sijaitsevien kolinergisten solujen signaaloinnin häiriöt mahdollisesti voivat vaikuttaa ruokahalunsäätelyyn.

Tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää kolmoiskuvantamismenetelmä, etuaivojen pohjaosan ja manteliumakkeen välisen kolinergisen hermosoluyhteyden aktiivisuuden mittaamiseksi. Kolmoiskuvantamismenetelmän toimivuutta oli tarkoituksena testata tutkimalla etuaivojen pohjaosasta lähtevää ja manteliumakkeeseen päättyvää hermoyhteyttä, jonka oletettiin aktivoituvan koe-eläimen kokiessa mielihyvän tunnetta eli niiden juodessa sukroosiliuosta. Kolmoiskuvantamismenetelmän kehityksessä käytettiin RetroBead (RB), Red -lateksipalloja, jotka kulkeutuvat hermoyhteyksissä synapsista soomaan. RB:n lisäksi käytettiin solujen tutkimiseen ChAT- ja c-Fos-DAB-vasta-ainevärjäyksiä, joilla haluttiin tunnistaa kolinergisten solujen värjäytyminen ja c-Fos-proteiinin muodostuminen sekä tutkia toimivatko kyseiset immunohistokemialliset värjäykset RB:n kanssa.

2 Asetylikoliinin välittämä hermoyhteys

2.1 Asetylikoliinin rooli ruokahalun säätelyssä

Aivojen ruokahalunsäätelyn tutkimuksissa on pääpaino ollut hypotalamuksen roolin selvittämisessä. Tutkimuksia on myös aloitettu tekemään selvittäessä välittäjäaine asetyylikoliinin (ACh) mahdollista roolia ruokahalun säätelyssä. ACh:n on uskottu liittyvän mahdollisesti ruokahalunsäätelyn vaikuttajiin, koska ACh on toiminnallisesti samankaltainen kuin nikotiini, jonka tiedetään hillitsevän ruokahalua. Nikotiini on eksogeeninen reseptoriagonisti, joka aktivoi asetyylikoliinireseptoreita. Kolinergisen signaloinnin on uskottu olevan osana ruokahalunsäätelyssä. (Arenkiel ym.2016: 253.)

Kolinergiset solut etuaivojen pohjaosassa mahdollisesti vaikuttavat lisääntyvään ruoan syöntiin ja painoon. Kolinergisten solujen signaloinnin häiriöt voivat vaikuttaa lisääntyvään ruoan syöntiin ja sitä kautta liikalihavuuteen, kun taas solujen välisen signaloinnin voimistuminen alentaa ruoan kulutusta. (Arenkiel ym.2016: 253–254)

Koska etuaivojen pohjaosassa on paljon ACh:ta tuottavia aivosoluja, on tutkimuksia tehty juuri sille alueelle. Hiirikokeilla etuaivojen pohjaosan ACh:a tuottavat solut on tuhottu ja katsottu vaikuttaako se ruokahalun säätelyyn. ACh:a tuottavien solujen tuhottua, on huomattu hiirien haluavan syödä enemmän. Sellaiset hiiret joille on lisätty ACh:n tuotantoa, ovat ne melkeinpä menettäneet ruokahalunsa. (Arenkiel ym. 2016: 253–256)

2.2 Asetyylikoliinijärjestelmä aivoissa

Asetyylikoliinia (ACh) käytetään välittäjäaineena hermo-lihasliitoksissa sekä aivojen hermosolujen toiminnassa. Aivoissa ACh toimii pääasiassa neuromodulaattorina (Paxinos ym. 2012: 685). ACh voi toimia eksitoivana tai inhiboivana välittäjäaineena riippuen synapsista (Guyton & Hall 2006: s. 96.) Kolinergisiksi neuroneiksi kutsutaan hermosoluja, jotka tuottavat ACh:a ja käyttävät sitä kemiallisessa viestinvälityksessä toisten hermosolujen välillä.

Aivoissa kolinerginen järjestelmä on jakautunut kahteen osaan. Kolinergisia soluja löytyy aivosillan alueelta sekä septumista ja etuaivojen pohjaosasta. Etuaivojen pohjaosan kolinergiset solut aktivoivat aivokuorta suoraan, kun taas aivosillan tumakkeet aktivoivat aivokuorta talamuksen kautta. (Porkka-Heiskanen & Stenberg 2008: 248.)

Etuaivojen pohjaosassa sijaitsee hermosolujen verkosto, joka on tutkituimpia aivoissa olevista verkostoista. Verkosto koostuu suurista hermosoluista ja kyseiset hermosolut käyttävät niiden välisessä kommunikoinnissa välittäjäaineenaan ACh:a. (Nathans ym. 2014: 2.) Etuaivojen pohjaosan kolinergiset neuronit aktivoivat aivokuoren valveessa sekä REM-unessa.

Etuaivojen pohjaosassa sijaitsee paljon kolinergisia soluja, jotka käyttävät asetyylikoliinia välittäjäaineenaan. Kolinergiset neuronit syntetisoivat ACh:a koentsyymi A:sta ja kolinista koliniasetyyli transferaasi (ChAT) entsyymiä käyttäen, jossa kolinin saatavuus rajoittaa synteesiä. ACh:n vapautumisen jälkeen asetyylikoliiniesteraasi entsyymi pilkkoo synapseissa sijaitsevaa ACh:a koliniksi ja asetaatiksi. Asetyylikoliiniesteraasi on siis entsyymi, joka säätelee ACh:n vaikutuksen kestoa synapseissa. ACh lisääntyy aivoissa, jos stimuloidaan etuaivojen pohjaosaa. Lisääntynyt asetyylikoliinin määrä vaikuttaa esim. muistiin ja oppimiseen. (Koulu & Piepponen 2013: 175–179; Fadem 2012: Ch. 5.)

Nikotiini- ja muskariini reseptorit ovat keskushermostossa sijaitsevia asetyylikoliini reseptoreita, joihin ACh voi kiinnittyä. Kyseiset reseptorit siis toimivat ACh:n viestin vastaanottajina. Nikotiini- ja muskariini reseptorit ovat asetyylikoliini reseptoreiden kaksi päätyyppiä. Vireystilaan näistä kahdesta päätyypistä erityisesti vaikuttaa muskariini reseptorit. (Porkka-Heiskanen & Stenberg 2008: 248.) Lääkinnällisellä ACh muskariini reseptorien blokkauksella aiheutuu antikolinergisia sivuvaikutuksia, joihin kuuluu mm. suun kuivuminen, näön hämärtyminen, ummetus sekä virtsaamisvaikeudet. Antikolinergisia sivuvaikutuksia aiheuttavat antipsykoottiset lääkkeet ja trisykliset masennuslääkkeet. (Fadem 2012: Ch. 5.)

Kolinergiset mekanismit ovat tärkeitä kognitiivisten toimintojen kannalta. Kolinergisten neuroneiden vähentyminen tai niiden vähentynyt tuotanto vaikuttavat kognitiivisiin häiriöihin esim. Alzheimerin taudissa. Alzheimerin tautia sairastavilla potilailla ei ole löydetty lääkinällistä hoitokeinoa palauttamaan menetettyjä toimintoja, mutta joillain potilailla voidaan taudin etenemistä hidastaa lääkinällisesti. Lääkinällisiin hoitoihin käytetään donepetsiilia (Aricept), rivastigmiinia (Exelon) ja galantamiinia (Razadyne), jotka estävät

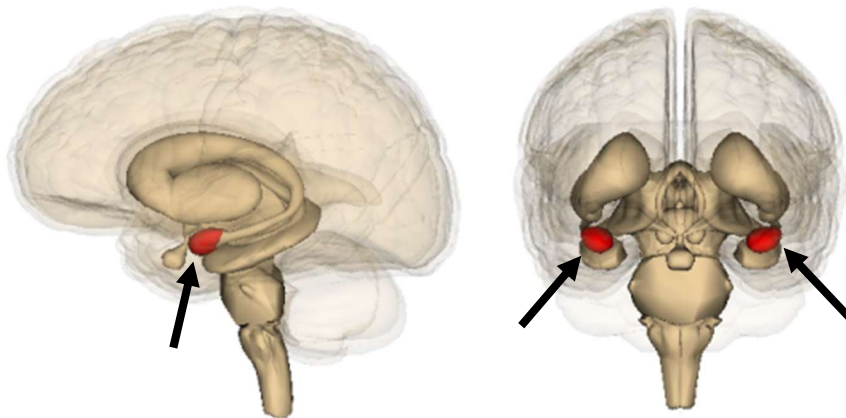
asetylikoliiniesteraasin toimintaa. Myös Downin oireyhtymän, liikunnallisten- ja nukkumisen häiriöiden on todettu liittyvän ACh:n vähentyneeseen tuotantoon. (Fadem 2012: Ch. 5.)

2.3 ChAT-entsyymi

ChAT on lyhenne koliiniasetyylitransferaasi entsyymistä, jota on hermopäätteiden sytoplasmassa (Koulu & Piepponen 2013: s. 175–176). ChAT-entsyymiä syntetisoidaan kolinergisten neuroneiden soomassa, josta se luultavasti kuljetetaan hermopäätteisiin hitaan ja nopean aksonaalisen kuljetuksen kanssa. ChAT-entsyymi osallistuu kolinergisten neuroneiden ACh:n syntetisointiin. ChAT-entsyymi on yksijuosteinen globuraalinen proteiini, jota pidetään indikaattorina ääreishermoston kolinergisten solujen toiminnallisen tilan tutkimisessa. ChAT-värjäystä käytetään leimaamaan asetyylikoliinisolut tutkitavasta aivoalueesta. (Oda 1999: 921–923.)

2.4 Manteliumake

Manteliumake on saanut nimensä mantelinmuotoisesta rakenteestaan. Manteliumakkeita on kaksi ja ne sijaitsevat syvällä inferomediaalisissa ohimolohkoissa. Kuvasta 1 nähdään manteliumakkeen tarkka sijainti kuvattuna aivoja sivulta ja aivojen takaosasta. Manteliumake koostuu yli kymmenestä eri tumakkeesta, jotka eroavat toisistaan toiminnallisesti sekä morfologisesti. (Albayrak 2016: 12.) Manteliumake on osa limbistä järjestelmää ja sillä on päärooli muistin, päätöksen teon ja emotionaalisten reaktioiden prosessoinnissa.



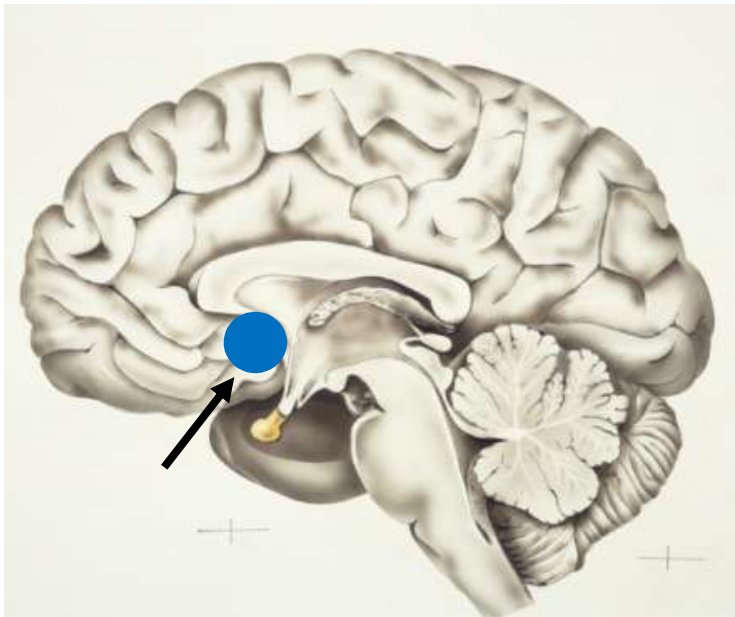
Kuva 1. Manteliumakkeiden sijainnit aivoissa osoitettuina punaisina alueina (Äidin masennus näkyy lapsen aivoissa. 2011. muok. 8.4.2017).

Nisäkkäillä on osoitettu etuaivojen pohjaosan alueista olevan yhteyksiä manteliumakkeen aivoalueisiin histokemiallisesti asetyylikoliiniesteraasin ja muiden markkereiden avulla. ACh-yhteyksiä manteliumakkeessa on osoitettu olevan BLA:ssa, La:ssa (the lateral nuclei) ja LOT:ssa (the lateral olfactory tract) sekä reaktiivisuutta CEA:ssa (the central extended amygdala). ACh-yhteydet voivat merkitä kolinergisten soluryhmien afferenttien olevan etuaivojen pohjaosan alueen nucleus basalis-substantia innominatata (Ch4) sekä muista aivojen alueista kuten parabigeminalista (Ch9), laterodorsal tegmentalista (Ch6) ja pedunculo-pontinesta (Ch5). (Paxinos ym. 2012: 163.)

BLA:sta on vahva yhteys etuaivojen pohjaosan kolinergisiin säikeisiin (Cagri ym. 2015: 853). BLA:n tärkeimpiä toiminnallisia tehtäviä on tallentaa muistiin merkittävät emotionaaliset tapahtumat. BLA voidaan jakaa kolmeen osa-alueeseen. Osa-alueet ovat anteriorinen (BLA), posteriorinen (BPL) ja ventraalinen (BLV). (Paxinos ym. 2012: 156.)

2.5 Etuaivojen pohjaosa

Etuaivojen pohjaosa sijaitsee nimensä mukaisesta alhaalla aivojen etuosassa. Kuvassa 2 on esitelty etuaivojen pohjaosan tarkka sijainti aivoissa. Etuaivojen pohjaosa koostuu eri rakenteista, joihin kuuluu medial septum, ventral pallidum, diagonal band nuclei, substantia innominata/extended amygdala ja peripallidal regions. (Paxinos ym. 2012: 684.) Nämä rakenteet sisältävät sekalaisen kokoelman kolinergisiä, GABAergisiä, glutamatergisiä, peptidergisiä projektio- ja välineuroneita (Golowasch ym. 2012: 1). Etuaivojen pohjaosassa on monia eri solutyyppisiä, jotka eroavat toisistaan välittäjäaineiltaan, morfologialtaan ja hermosoluyhteyksiltään (Paxinos ym. 2012, 685).



Kuva 2. Etuaivojen pohjaosan sijainti aivoissa osoitettuna sinisellä alueella (Boyer, C. 2015. muok. 15.4.2017).

Valveillaolon ja unen säätelyn tiedetään olevan etuaivojen pohjaosan tärkeimpiä tehtäviä. Myös tarkkaavaisuuden, motivaation, muistin ja joidenkin neuropsykiatristen, kuten Alzheimerin ja Parkinsonin taudin, skitsofrenian ja huumeiden väärinkäytön katsotaan

olevan yhteyksissä etuaivojen pohjaosan tehtävissä. Etuaivojen pohjaosan roolia ylläolevien toimintojen ymmärtämisessä vaikeuttaa sen anatominen monimuotoisuus. (Paxinos ym. 2012, 685.)

Etuaivojen pohjaosa on aivojen tutkituimpia verkostoja, koska siellä sijaitsee suurikokoisia neuroneita. Näissä neuroneissa on monissa ChAT-entsyymiä, jota tarvitaan asetyylikoliini (ACh) synteesissä. Neuronit käyttävätkin ACh:a toistensa kanssa viestimiseen. Etuaivojen pohjaosan verkoston neuronit ovat ensimmäisiä, jotka rappeutuvat Alzheimerin taudissa. Etuaivojen pohjaosan kolinergisten (koliiniasetyyli transferaasi (ChAT) -positiivinen) neuroneiden tutkimisesta standarditekniikoilla tekee vaikean niiden suuri koko. (Nathans ym. 2014: 2; Paxinos ym. 2012, 685.) Toisaalta neuroneiden suuri koko myös auttaa värjättyjen solujen detektoinnissa mikroskoopilla.

Kolinergiset neuronit etuaivojen pohjaosassa koostuvat pääosin projektioneuroneista. Projektioneuroneilla on pitkät ja kauas ulottuvat aksonit, joilla ne hermottavat kohteitaan. etuaivojen pohjaosassa sijaitsee aivojen laajin kolinerginen verkosto. Kolinergisten neuroneiden suuri pituus ja monitahoinen haarautuminen voivat selittää, miksi jokainen neuronit pystyy muuntamaan monien muiden verkostossa olevien aktiivisuutta. Selitys neuroneiden alttiudesta rappeutumiselle saattaisi löytyä myös niiden pituudesta ja haarautumisesta, sillä niiden täytyy kuljettaa aineita pitkiä matkoja, jolloin se voi rajoittaa niiden kykyä vastata tapahtuviin vahinkoihin. (Nathans ym. 2014: 1–4.)

2.6 Tutkimusmenetelmiä neurotieteessä

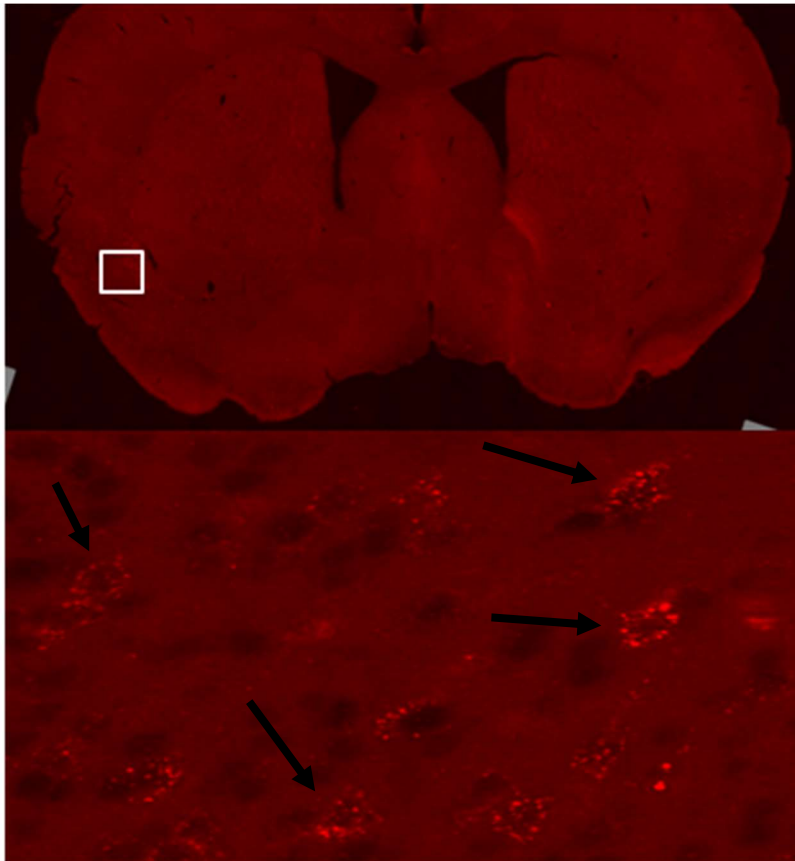
RetroBeadeja (RB) sekä c-Fos-proteiinia käytetään neurotieteissä hermoyhteyksien sekä neuraalisen aktivaation tutkimisessa. RB:t kulkeutuvat hermoyhteyksissä, jolloin hermoyhteyksien reittejä voidaan tutkia niitä apuna käyttäen. C-Fos-proteiiniaktiivisuus taas kertoo neuraalisesta aktivaatiosta.

2.6.1 RetroBead, Red -merkkiaine

RetroBeadeja (RB) käytetään merkkiaineena neurotieteessä hermoyhteyksien tutkimisessa. RB:n avulla seurataan hermoyhteyksiä niiden päätepisteestä eli synapsista niiden lähteelle eli soomaan. RB:t kulkeutuvat siis hermoyhteyksissä ”takaperin”, jolloin ne täytyy injektoida aivoihin tutkittavan hermoyhteyden päätepisteeseen.

RB:t ovat on pieniä, halkaisijaltaan 0,02–0,2 µm:n lateksista valmistettuja palloja. RB:n kulkeuduttua hermoyhteydessä hermosolun soomaan leima säilyy soluissa *in vivo* -menetelmässä vähintään 10 viikkoa ja fiksaation jälkeen vähintään vuoden. RB:n ei ole todettu olevan myrkyllisiä. RB:n käyttö on yhteensopiva anterogradisten merkkiaineiden, *in situ* -hybridisaation ja immunohistokemian kanssa. Merkittävänä etuina RB:t eivät vaadi leikkeiden värjäystä ennen mikroskopointia, ne jättävät hyvin tarkan injektiokohdan, niillä on korkea kuljetustehokkuus ja ne ovat helppokäyttöisiä. (Burkhalter ym. 1984: 498.)

Lateksista valmistetut RB:t ovat päällystetty fluoresoivalla aineella, joita ovat rodamiini ja fluoreskiini. Fluoresoivan päällysteen vuoksi RB:t eivät vaadi erillistä värjäystä mikroskoipoitaessa. RB:n pitäisi näkyä mikroskoopilla jo 10-kertaisella suurennoksella, mutta RB:a mikroskoipoitaessa suositellaan käyttämään vähintään 20-kertaista suurennosta, jotta RB:t eivät jää huomaamatta. RB:t näkyvät ilman fluoresenssimikroskooppia, mutta tarkemmassa RB:n tutkimisessa esim. solujen laskemisessa fluoresenssimikroskoopin käyttö on ehdotonta. Kuvassa 3 nähdään RB:t kuvattuna epifluoresenssimikroskoopilla. Alempi kuva zoomatusta leikkeestä havainnollistamaan miltä RB:t näyttävät. RB:t näkyvät erityisesti alemmassa kuvassa hyvin kirkkaina pisteinä, jotka ovat selvästi solun muodossa. Mustat nuolet alemmassa kuvassa osoittavat RB:a, jotka ovat selvästi solun muodossa.



Kuva 3. Molemmat kuvat on otettu 20-kertaisella suurennoksella kokonaisesta hiiren 540 aivoleikkeestä, jossa alempana lähikuvaa RetroBeadista.

RB:t jättävät 50–200 μm halkaisijaltaan olevan injektiokohdan, joka auttaa mm. injektioiden optimoinnissa. Injektio kohta on tarkka, joka johtuu luultavasti RB:n suhteellisen isosta koosta sekä niiden sitoutumiskyvystä hydrofobisen pinnan avulla. RB:n tarkkaa kuljetusmekanismia soomaan ei tunneta, mutta mahdollisesti RB:t pääsevät synapsiin endosytoosin kautta, jolloin ne pääsevät kulkeutumaan hermoyhteyksissä. (Burkhalter ym. 1984: 498–499.)

RB:a valmistetaan punaisina (rodamiini) ja vihreinä (fluoreskiini). Erona vihreissä ja punaisissa on niissä käytetyt fluoresenssileimat. Vihreillä RB autofluoresenssi vähentää näkyvyyttä, jota voidaan vähentää käyttämällä tutkimuksissa nuoria koe-eläimiä, tekemällä ohuempia leikkeitä ja mahdollisimman nopealla leikkeiden mikroskopoinnilla laseille laiton jälkeen. Vihreitä RB:a ei suositella myöskään laimentamaan. Punaiset RB:t näkyvät hyvin ilman erityistoimenpiteitä sekä niiden etuna on laimentamismahdollisuus. (Protocol. 2017.)

2.6.2 C-Fos-proteiini

C-Fos on 380 aminohaposta muodostuva proteiini, jolla on leusiinivetoketju-alue. C-Fos on proto-onkogeeni, joka säätelee transkriptiota. C-fos-proteiini osallistuu moniin solujen toimintoihin kuten jakaantumiseen, erilaistumiseen, transformaatioon ja apoptoosiin. (Eriksson, M. 2005: 22.) Neurotieteissä käytetään c-Fos-proteiinin ilmentymistä leimana neuraaliselle aktivaatiolle, koska c-Fos-proteiini usein ilmentyy neuroneiden aktivoituessa (Appleyard 2009: 5199)

Neuraalisen aktivaation selvittämisessä c-Fos-proteiinia käytetään yleensä hermoeitistysten tutkimuksissa. C-Fos-proteiini kuuluu välittömiin varhaisen vaiheen geeneihin (IEG, immediate-early gene). C-Fos-proteiinin nopea tuotto aktivoituissa neuroneissa yhdistettynä histologisiin tunnistusmetodeihin solutasolla on johtanut c-Fos-proteiinin käyttöön tarkasteltaessa aktivoituja aivojen rakenteita. C-Fos-proteiinin tuottamia lähetti-RNA molekyylejä voidaan visualisoida käyttämällä radioaktiivista leimausta *in situ* -hybridisaatioissa. Tutkittaessa c-Fos-proteiineja voidaan ne detektoida käyttämällä immunohisto- tai immunosytokemiallisia värjäyksiä. (Chaudhuri & Zangenehpour 2002: 221–222)

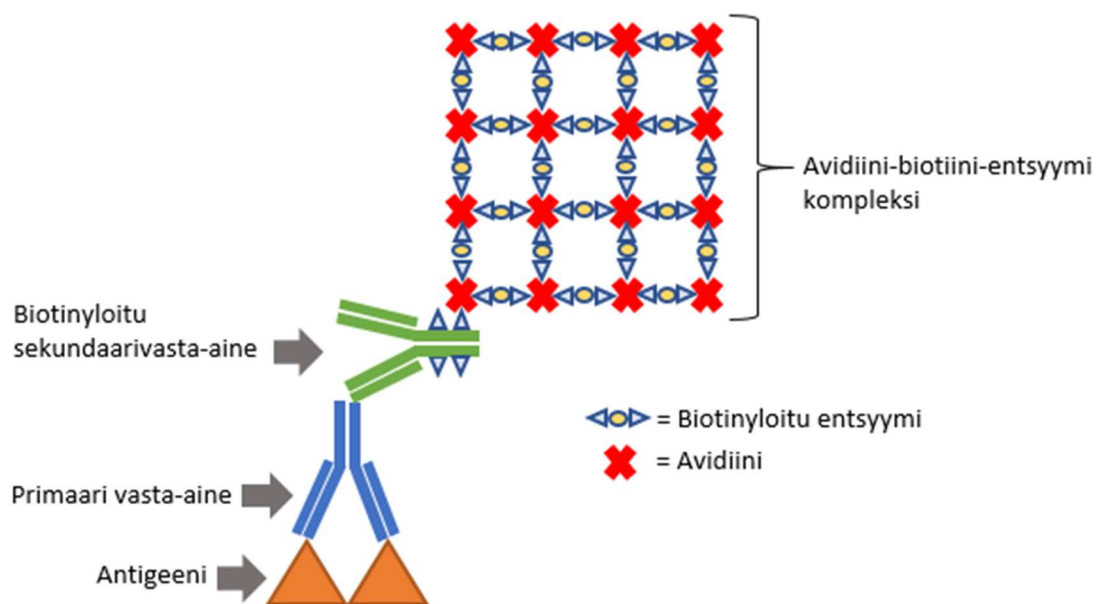
2.6.3 Immunohistokemia

Immunohistokemia on yleisesti käytetty värjäysmenetelmä, jossa voidaan tutkia kudoksen antigeenejä, kun ne sitoutuvat spesifisesti vasta-aineeseen. Immunohistokemiassa värjäysmenetelmät voidaan jakaa joko suoraan tai epäsuoraan menetelmään riippuen, miten vasta-aineet sitoutuvat antigeeniin. Suorassa menetelmässä on vain primaari vasta-aine, joka on leimattu leima-aineella. Epäsuorassa menetelmässä vasta sekundaarivasta-aine on leimattu leima-aineella, joka liitetään primaarivasta-aineeseen. Vasta-aineeseen voidaan kiinnittää esim. fluoresoiva tai entsyymi leima, jolloin saadaan vasta-aine näkyväksi. Suora menetelmä on helppo ja nopea tehdä, sillä se vaatii vain yhden inkubaation. Suoran menetelmän heikkoutena on sen alhaisempi herkkyys verrattuna epäsuoraan menetelmään, jonka etuna on signaalin vahvistuminen ja jopa heikomman antigeenin havaitseminen. (Kalyuzhny 2016: 15–18.)

2.6.4 Avidiini-biotiini-kompleksi

Avidiini-biotiini-kompleksia (ABC, avidin-biotin complex) käytetään hyväksi mm. immunohistokemiallisissa värjäyksissä. Avidiinin sitoutuminen biotiiniin on erittäin voimakasta. Avidiini-biotiini-kompleksi koostuu biotinyloidusta sekundaarivasta-aineesta, johon voidaan liittää leimattuja avidiinimolekyylejä. Menetelmän tarkoituksena on voimistaa leiman intensiteettiä ja herkkyyttä. Menetelmää käytetään yleensä silloin kun antigeeniä esiintyy pieninä määrinä tai kun primaarivasta-aineiden hinta on korkea. (Fanger ym. 1980: 577–580).

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä, jossa käytetään hyväksi avidiini-biotiini kompleksia, annetaan ensimmäiseksi primaarivasta-aineen inkuboitua värjättävän kudoksen kanssa, jolloin vasta-aine tarttuu kohdeantigeeniin. Ensimmäisen inkuboinnin jälkeen suoritetaan sekundaarivasta-aineinkubaatio, jolloin biotinyloitu sekundaarivasta-aine kiinnittyy primaarivasta-aineeseen. Vasta-aineiden annettua kiinnittyä toisiinsa, suoritetaan esi-inkubaatio, jossa sekoitetaan avidiinia ja biotinyloitua entsyymiä. Avidiinin ja biotinyloidun entsyymin annetaan muodostaa avidiini-biotiini-entsyymi-kompleksi, johon inkuboinnin jälkeen siirretään kudoksenäyte. Kudoksenäytteeseen kiinnittynyt sekundaarivasta-aine kiinnittyy avidiini-biotiini-kompleksissa avidiiniin vapaille biotiinin sitoutumiskohdille. Avidiini-biotiini-kompleksin muodostuminen ja kiinnittyminen sekundaarivasta-aineeseen on esitelty kuvassa 4. (Bayer & Wilchek 1984: 39).

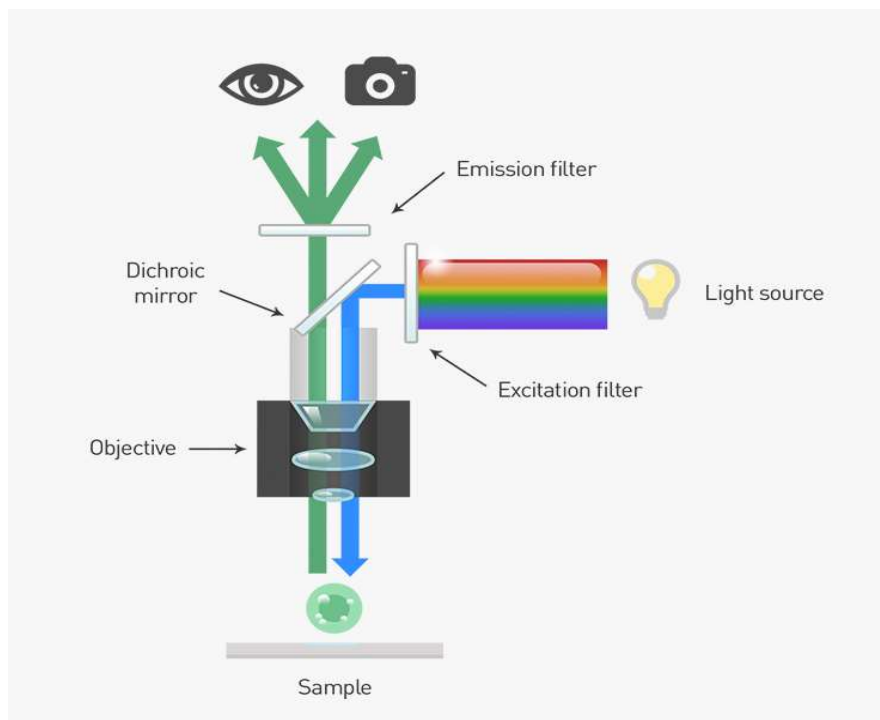


Kuva 4. Avidiini-biotiini-kompleksin muodostuminen.

Avidiini-biotiini-kompleksia käytetään c-Fos-DAB-värjäyksessä DAB-värireaktion aikaan saamiseksi. DAB (3,3' -diaminobentsidiini) on substraatti, joka hapettuu peroksidaasientsyymin vaikutuksesta ja muodostaa ruskean reaktiotuotteen.

2.6.5 Epifluoresenssimikroskopia

Epifluoresenssimikroskooppia käytetään työkaluna biotieteissä. Perinteiseen mikroskooppiin verrattuna, epifluoresenssimikroskoopissa okulaareihin näkyvä valo ei tule suoraan silmiin valonlähteestä. Okulaareista näkyvä valo tulee fluoresoivan näytteen kautta. Epifluoresenssimikroskoopissa valon säteet suodatetaan kahden suodattimen läpi. Kuvasta 7 nähdään, kuinka valon lähteeltä valo tulee ensin eksitaatiosuodattimelle. Eksitaatiosuodattimen läpi pääsee vain käytetyn fluorokromin eksitaatioaallonpituus ja suodatin pidättää muut aallonpituudet. Valo suodatetaan tämän jälkeen dikroisen peilin kautta objektiiville valaistakseen näytteen tietyllä valon aallonpituudella. Jos näyte fluoresoi, lähtee emissoiva valo objektiivin kautta takaisin dikroiselle peilille. ”Valosäde” suodatetaan tämän jälkeen vielä emissiosuodattimella, joka estää muut aallonpituudet ja päästää läpi vain käytetyn fluorokromin emissioaallonpituuden. (Brown & Webb 2013: 30–31).

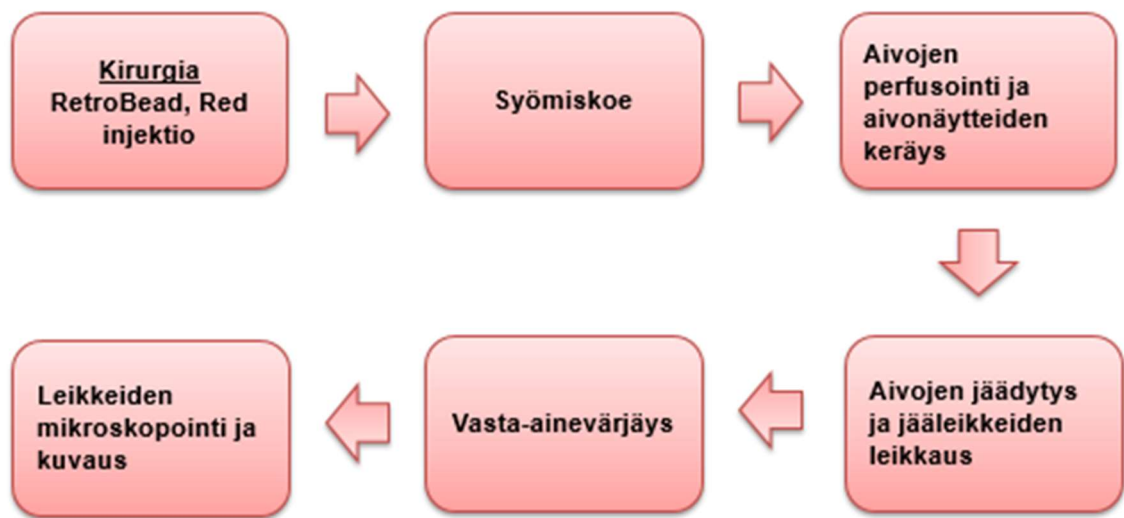


Kuva 5. Epifluoresenssimikroskoopin toimintaperiaate (Epifluorescence Microscope Basics. 2017.)

3 Työn suoritus

3.1 Työn suorittamisen vaiheet

Varsinainen työ aloitettiin kolmoiskuvantamismenetelmän kehityksen jälkeen, jolloin pystyttiin olemaan varmoja menetelmien toimivuudesta itse kokeessa. Kuvasta 6 nähdään työn suorittamisen vaiheet. Ensimmäinen vaihe oli hiirien kirurgia, jossa hiirien aivojen manteliumakkeeseen injektoidiin 1:4 laimennettua RetroBeadia (RB). Hiiriä injektoidiin yhteensä kahdeksan kappaletta ja hiiret numeroitiin välille 535–542.



Kuva 6. Työn vaiheet

Injektoinnin jälkeen hiirille suoritettiin syömiskokeet. Kahdeksasta hiirestä neljän annettiin juoda sukroosiliuosta ja toiset neljä eivät juoneet. Syömiskoe suoritettiin laitteistossa, jossa puolella hiiristä oli mahdollisuus juoda sukroosiliuosta. Hiiret saivat siis itse mennä juomaan, jolloin laite tunnisti eläimen käyneen juomassa. Hiirien juotua, laite antoi eripituisien ajanjaksojen (ajanjakso vaihteli 7–17 sekunnin välillä) jälkeen lisää sokeria. Eripituisilla ajanjaksoilla haluttiin välttää eläimen ehdollistuminen sukroosiliuoksen saannille. Hiiret olivat kokeessa n. 1,5 h, jonka jälkeen ne fiksattiin.

Kirurgian ja syömiskokeen välissä odotettiin 48 h. 48 h:n tarkoituksena oli odottaa RB:n kulkeutuminen hermoyhteyksissä. Syömiskokeiden jälkeen suoritettiin näytteiden esikäsitteilyt, vasta-ainevärjäys, leikkeiden mikroskopointi ja kuvaus sekä tilastollinen t-testi kontrolli- ja sukroosiryhmän hiirien keskiarvojen välillä.

3.2 Näytteen esikäsittely

Ennen jääleikkeiden valmistusta ja immunohistokemiallisten värjäysten suoritusta, aivo-näytteille suoritettiin esikäsittelyt. Esikäsittelyihin kuului aivojen perfuusiofiksaus, jäädytys-suojauuskäsittely sukroosilla sekä perfusoitujen aivojen jäädyttäminen.

3.2.1 Perfuusio

Perfuusio tehtiin hiirille ennen jääleikkeiden valmistusta. Perfuusio aloitettiin antamalla hiirille syvä anestesia pentobarbitaalilla. Varmistuttua hiiren riittävästä anestesiasta aloitettiin veren kierrättäminen elimistöstä pois korvaten se PBS-liuoksella. PBS-liuoksella huuhtelulla ennen fiksausta varmistettiin, että veri ei jää elimistöön ja aiheuta turhaa taustaa leikkeiden värjäykseen. PBS-huuhtelun jälkeen varsinainen aivojen fiksaus suoritettiin paraformaldehydi, 4-prosenttisella PBS-liuoksella. Riittävän perfuusion jälkeen koe-eläimiltä kerättiin aivot, jotka pidettiin paraformaldehydissa vielä muutamia tunteja ennen sokeriliuokseen laittoa.

3.2.2 Jäädytys-suojauuskäsittely

Perfusoidut aivot säilytettiin ennen jäädyttämistä sokeriliuoksessa. Jäädytys-suojauuskäsittely suoritettiin 30-prosenttisella sukroosi-PBS-liuoksessa, jonka tarkoituksena oli suojata solutason rakennetta. Sukroosiliuoksessa solujen vesi korvattiin sokerilla, jotta vesi ei aivoja jäädytettäessä rikkoisi soluja ja näin ollen päästäisi päästäisi mm. RB vapaaksi soluista. Jäädytys-suojauuskäsittely kesti n. 48 h, jolloin aivot laskeutuivat falcon-putken pohjaan.

3.2.3 Aivojen jäädytys

Kun voitiin olla varmoja aivoissa olevan veden korvautumisesta sokerilla, aloitettiin aivojen jäädyttäminen. Aivojen jäädyttämiseen käytettiin isopentaania, joka viilennettiin riittävän kylmäksi kiinteän hiilidioksidin avulla. Isopentaanikäsittely mahdollisti aivojen nopean jäätyksen ja aivot voitiin leikata heti käsittelyn jälkeen tai asettaa vähintään -20 °C:seen odottamaan leikkeiden leikkausta.

3.3 Jääleikkeet

Jääleikkeet leikattiin optimointivaiheessa sekä varsinaisessa työssä kryostaatilla 30 µm paksuisiksi leikkeiksi ja valmiit leikkeet laitettiin pakkasnestettä sisältäviin 24-kuoppalevyihin. Leikkeet sisältävät kuoppalevyt säilytettiin pakkasessa odottamassa värjäyksiä. RB-käsiteltyjen aivoleikkeiden pakkasneusteessa ei käytetty glyserolia, koska RB:t ovat erittäin herkkiä glyserolille ja saattavat haalistua siitä.

3.4 RetroBead, Red -merkkiaineen käyttö

Koko työssä uutena merkkiaineena käytettiin RetroBead (RB), Red -lateksipalloja (LumaFluor). RB:lle täytyi optimoida oikea injektio kohta sekä niiden toimivuus ja näkyvyys ilman värjäyksiä sekä värjäyksien kanssa. Optimointiin kuului myös tarkastella, oliko leikkeissä olevien RB:n näkyvyydessä eroja, kun käytettiin laimentamatonta sekä laimennettua RB:a.

3.5 ChAT-värjäys

ChAT-värjäys kesti kaksi päivää ja se suoritettiin liitteenä 1 olevan työohjeen mukaan. Ensimmäisissä vaiheissa leikkeiden värjäykseen kuului muutosten palauttaminen (antigen retrieval), jossa leikkeet pidettiin sitraattipuskurissa lähellä kiehumispistettä. Perfuusiossa käytetty paraformaldehydi muodostaa aivoihin metyleenisiltoja, jotka on tarkoitus hajottaa leikkeistä pois sitraattikäsittelyllä. Muutosten palauttaminen tekee vasta-aineiden sitoutumisesta antigeeniin spesifisempää.

Metyleenisiltojen hajotuksen jälkeen leikkeet blokattiin 6-kuoppalevyllä. Blokkauksen tarkoituksena on blokata kudoksen kaikki epitoopit, jolloin estetään vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista. Blokkauksia suoritettiin aasin seerumilla ennen primaarivasta-aine käsittelyä ja näytteen annettiin blokkautua 1 tunti.

Primaarivasta-ainekäsittely suoritettiin 24-kuoppalevyllä yön yli valolta suojattuna. Sekundaarivasta-aine käsittely suoritettiin seuraavana päivänä ja annettiin inkuboitua valolta suojattuna kaksi tuntia. Kaikki käytetyt vasta-aineet olivat polyklonaalisia vasta-aineita. Taulukossa 1 on käytettyjen primaari- ja sekundaarivasta-aineiden tiedot.

Taulukko 1. ChAT-värjäyksessä käytettyjen vasta-aineiden tiedot.

Laimennos	Vasta-aine (ChAT)	Valmistaja
1:100	Goat anti-ChAT AB-144P	Millipore
1:1000	Donkey anti-goat A-11055	Life Technologies

3.6 c-Fos-DAB-värjäys

C-Fos-DAB-värjäyksessä käytettiin entsyymileimaa, jota voitiin tarkastella valomikroskoopilla. C-Fos-DAB-värjäyksen tarkoituksena oli värjätä c-Fos-proteiini solujen tumasta. Värjäys kesti kaksi päivää ja se suoritettiin liitteessä 2 olevan työohjeen mukaan. C-Fos-DAB-värjäyksessä käytettiin myös metyleenisiltojen rikkomiseksi sitraattia, joka lämmitettiin lähelle kiehumispistettä. Muutosten palauttamisen jälkeen leikkeille tehtiin vetyperoksidikäsittely 6-kuoppalevyllä. Esikäsittely vetyperoksidilla poistaa taustavärjäytymistä, jota endogeeninen peroksidaasiaktiivisuus aiheuttaa.

Näytteille suoritettiin blokkaukset ennen primaarivasta-aine käsittelyä, kuten ChAT-värjäyksessä. Blokkauksessa käytettiin hevosen seerumia ja blokkaukset kestivät tunnin.

Primaarivasta-ainekäsittely suoritettiin kuten aiemmin selitettynä ChAT-värjäyksessä. Taulukossa 2 on c-Fos-DAB -värjäyksessä käytettyjen primaari- ja sekundaarivasta-aineiden tiedot.

Taulukko 2. c-Fos-DAB -värjäyksessä käytettyjen vasta-aineiden tiedot.

Laimennos	Vasta-aine (cFos)	Valmistaja
1:500	Rabbit anti-cFos sc-52	Vector Laboratories
1:200	Horse anti-rabbit BA-1100	Santa Cruz Biotechnology

C-Fos-DAB -värjäyksessä ennen DAB-reaktion suorittamista valmistettiin ABC-liuos. ABC-liuos valmistettiin valmiskitillä (Vector Laboratories). Seoksen annettiin inkuboitua 24-kuoppalevyllä 30 minuuttia ennen kudoksenäytteiden siirtämistä kuoppalevyille. Inkuboinnin jälkeen kudokset asetettiin ABC-liuosta sisältävään kuoppalevyyn, jotta sekundaarivasta-aineeseen sitoutuisi avidiini-biotiini-entsyymi-kompleksi.

ABC-liuos on tärkeä suorittaa ennen DAB-reaktiota, sillä c-Fos-DAB -värjäyksessä DAB-substraatti hapettuu peroksidaasi-entsyymien vaikutuksesta ja muodostaa ruskean reaktiotuotteen. DAB substraattiliuoksessa käytettiin mukana myös nikkeliä, jonka seurauksena reaktiotuote näkyi musta-harmaana. DAB-substraattiliuoksessa näytteiden annettiin inkuboitua 2-10 min. Tarkkaa reaktioaikaa ei ole määritelty ja tekijän tulee ajan määrittäminen tehdä itse. DAB-substraattiliuos tehtiin valmiskitillä (Vector Laboratories).

3.7 ChAT- ja c-Fos-DAB-värjäykset

Yhdistettäessä ChAT- ja c-Fos-DAB-värjäyksiä kestivät ne yhteensä kolme päivää. Työohje on esiteltynä liitteessä 3. ChAT- ja c-Fos-DAB-värjäyksissä käytetyt primaari- ja sekundaarivasta-aineet ovat esiteltynä taulukoissa 1 ja 2.

Värjäykset aloitettiin c-Fos-DAB-värjäyksellä, joka kesti kaksi päivää. Ensimmäisenä päivänä suoritettiin c-Fos-DAB-värjäyksen primaarivasta-aine käsittely ja seuraavana päivänä sekundaarivasta-aine käsittely sekä DAB-reaktio. Värjäysten toisena päivänä heti DAB-reaktion jälkeen aloitettiin ChAT-värjäys, jolloin suoritettiin ChAT-primaarivasta-aine käsittely. Viimeisenä eli kolmantena päivänä värjäyksiä suoritettiin ChAT-sekundaarivasta-aine käsittely.

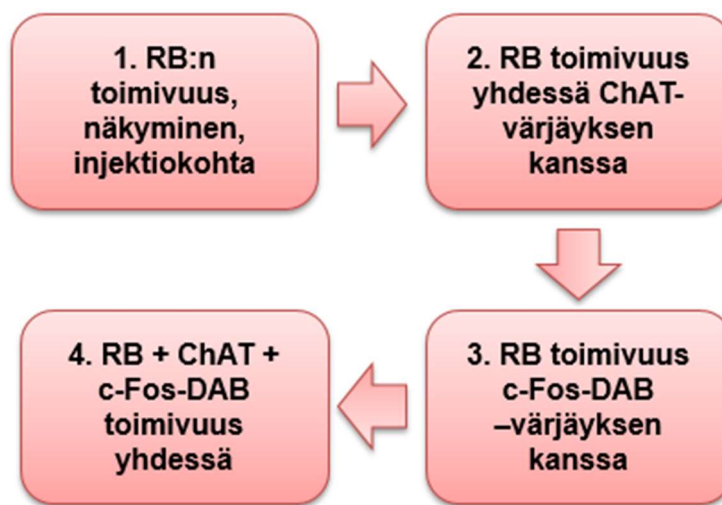
3.8 Mikroskopia

Leikkeitä kuvattaessa käytettiin apuna tavallista valomikroskooppia sekä epifluoresenssimikroskooppia. Valomikroskoopilla pystyttiin tarkastelemaan leikkeiltä c-Fos-DAB -värjäystä, joka oli entsyymileimainen värjäys ja etenkin RB-merkkiaineen optimointi vaiheessa RB:n injektiokohtia. Epifluoresenssimikroskoopilla pystyttiin tarkastelemaan fluoresenssileimaista ChAT-värjäystä sekä solujen laskemisvaiheessa RB:a.

4 Tulokset

4.1 Menetelmän kehittäminen

Tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää kolmoiskuvantamismenetelmä, etuaivojen pohjaosan ja mantelimumakkeen välisen kolinergisen hermosoluyhteyden aktiivisuuden mittaamiseksi. Kolmoiskuvantamisessa tarkoituksena oli visualisoida RetroBeadit (RB), ChAT- sekä c-Fos-DAB-värjäys hermosoluissa saman aikaisesti näkyväksi. Optimointivaiheet ovat esiteltyinä kuvassa 7.



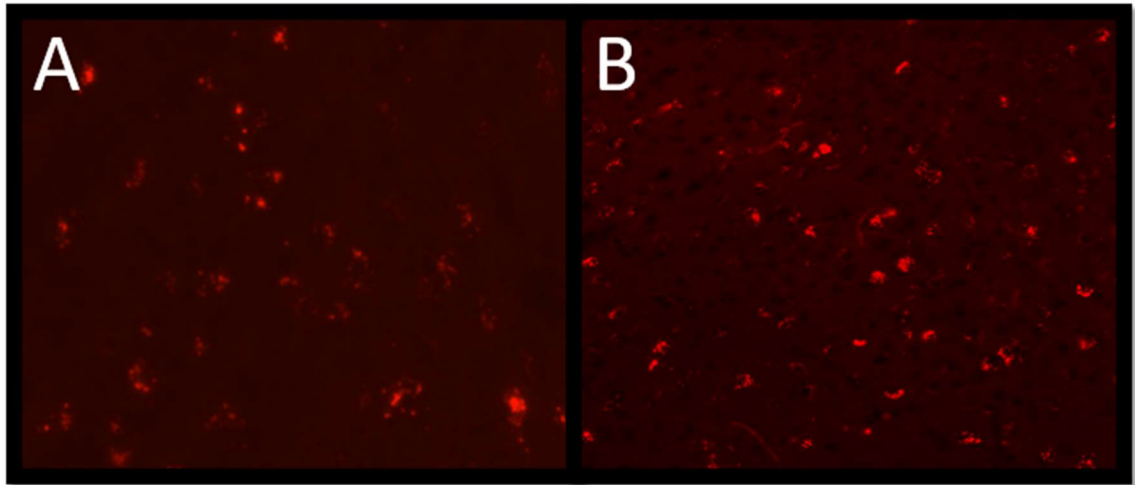
Kuva 7. Kolmoiskuvantamismenetelmän optimointivaiheet.

Kuva 7 on tehty havainnollistamaan optimointivaiheiden suorittamisjärjestystä. Optimointivaiheissa edettiin aina seuraavaan, kun varmistuttiin edeltävän vaiheen toimivuudesta.

4.1.1 RetroBead-optimointi

Optimointi aloitettiin käyttämällä injektioissa laimentamatonta RetroBeadia (RB). Ensimmäisillä injektioilla haluttiin varmistaa, että pelkät RB:t näkyivät leikkeissä ilman värjäyksiä. Laimentamattoman RB:n käyttö asetti haasteita, sillä injektorit menivät laimentamattomasta RB:stä tukkoon ja hidasti injektioiden tekoa merkittävästi. RB, red valikoitui käytettäväksi kuitenkin pääosin siksi, koska niitä on mahdollisuus laimentaa tarvittaessa, jolloin pystyttiin ehkäisemään injektorien jatkuva tukkeutuminen. Kuvasta 8 nähdään,

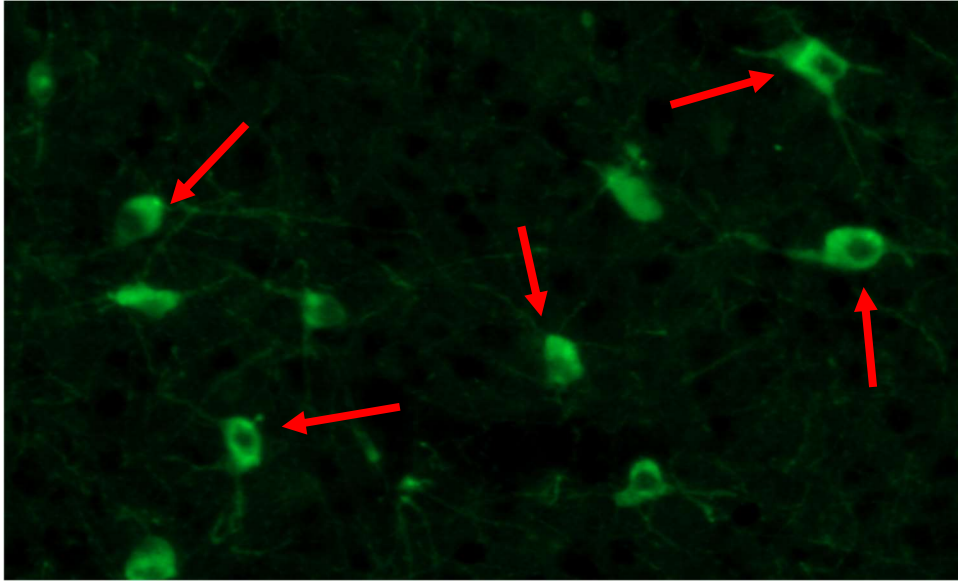
että laimentamattomassa ja 1:4 laimennetussa RB:n käytössä ei näy eroja näkyvyydessä.



Kuva 8. Kuvissa 1:4 laimennetun (B) ja laimentamattoman (A) RetroBeadien näkyvyys hiiren 540 aivoleikkeestä 20-kertaisella suurennoksella (B) ja harjoitushiiren 502 aivoleikkeessä 10-kertaisella suurennoksella (A).

4.1.2 ChAT-värjäyksen ja RetroBeadin optimointi

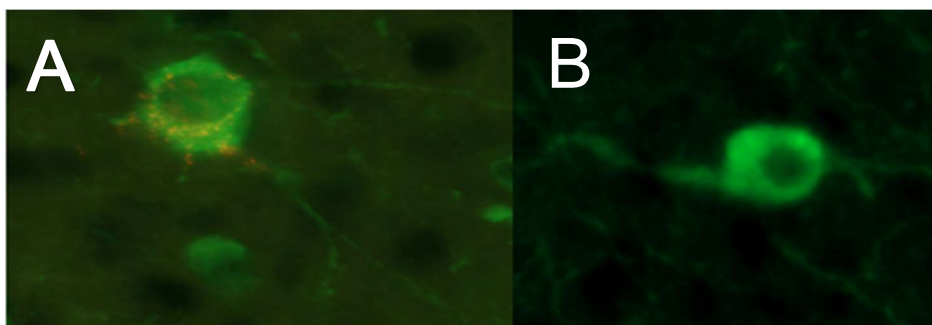
ChAT-värjäystä kokeiltiin ennen RetroBeadien (RB) injektioita, jolla haluttiin varmistaa värjäyksen onnistuminen. ChAT-värjäystä käytettiin leimaamaan asetyylikoliinisolut tutkittavasta aivoalueesta fluoresenssileimalla, jolloin soluja pystyttiin tarkastelemaan epifluoresenssimikroskoopilla. Kuvassa 9 nähdään värjäytyneitä kolinergisia ChAT-soluja.



Kuva 9. ChAT-värjäytyneitä kolinergisia neuroneita hiiren harjoitusavoleikkeessä, jotka on osoitettu kuvaan punaisiin nuolin.

Värjäys onnistui erittäin hyvin ja kolinergiset hermosolut näkyivät leikkeillä erinomaisesti. Hermosoluista oli värjäytynyt hyvin myös viejä- ja tuojahaarakkeita.

Kun varmuus pelkän ChAT-värjäyksen onnistumisesta oli tehty, suoritettiin ChAT-värjäys RB-injektoiduille hiiren aivoille. ChAT-värjäyksen optimointi RB:n kanssa onnistui myös hyvin. Värjätyt solut näkyivät leikkeessä RB:n kanssa erinomaisesti. Kuvassa 10 on esiteltynä kolinerginen solu ilman RB:a (B) sekä RB:n kanssa (A). Kuva 10 on havainnollistamassa kolinergisia hermosoluja RB:n kanssa ja ilman. A-puolen kuvassa nähdään, kuinka RB:t ovat kulkeutuneet hermoyhteydessä kolinergisen hermosolun soomaan.



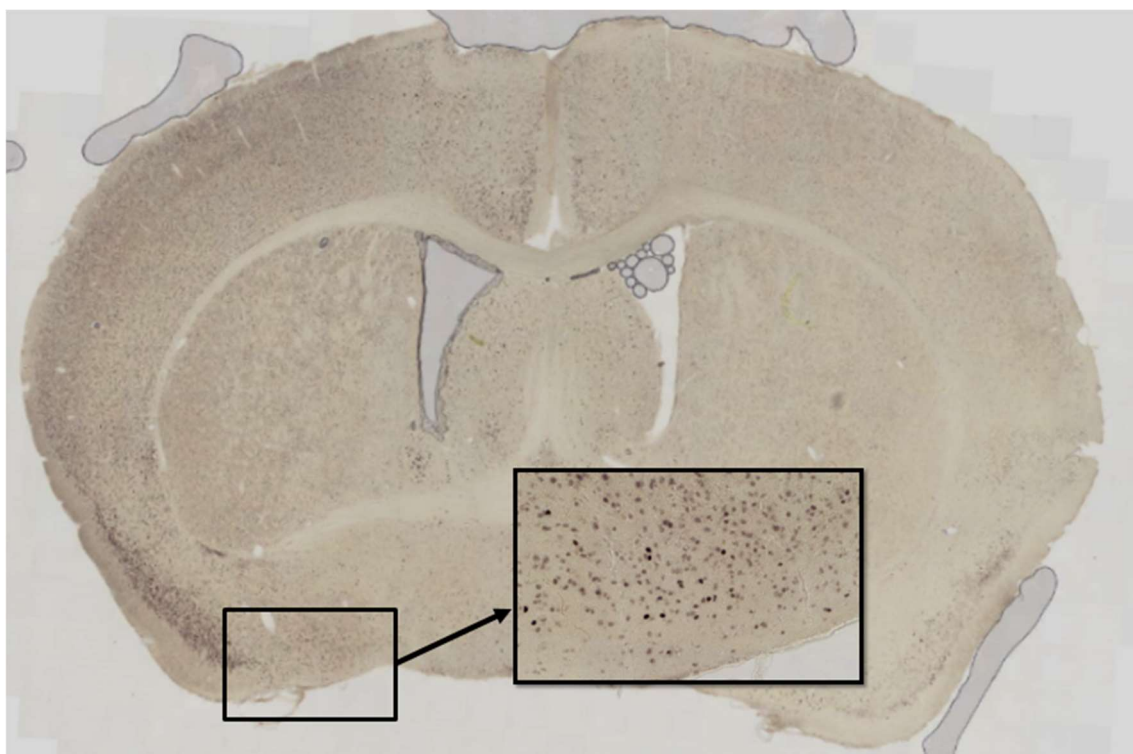
Kuva 10. Kuvassa esitelty hiiren 538 avoleikkeessä ChAT -solu RetroBeadilla (A) ja ilman (B) 20-kertaisella suurennoksella.

Kolinergiset värjätyt solut täytyi kuvata ja tarkastella epifluoresenssimikroskoopilla ChAT-värjäyksessä käytettävän fluoresenssileiman vuoksi. RB:t näkyivät myös hyvin epifluoresenssimikroskoopilla, jolla ne oli helppo havaita.

4.1.3 c-Fos-DAB-värjäyksen ja RetroBeadin optimointi

Myös c-Fos-DAB -värjäykset onnistuivat hyvin RetroBeadien (RB) kanssa. Optimointivaiheessa DAB-reaktion annettiin tapahtua 4,45 minuuttia. Kyseisessä ajassa leikkeet tummuivat juuri sopivasti eivätkä jääneet liian vaaleiksi tai tummuneet liikaa.

Kuvassa 11 nähdään c-Fos-DAB -värjäys leikkeessä. Kuvan 11 perusteella c-Fos-DAB -värjäys onnistui hyvin ja värjäys näkyi myös hyvin yhdessä RB:n kanssa.



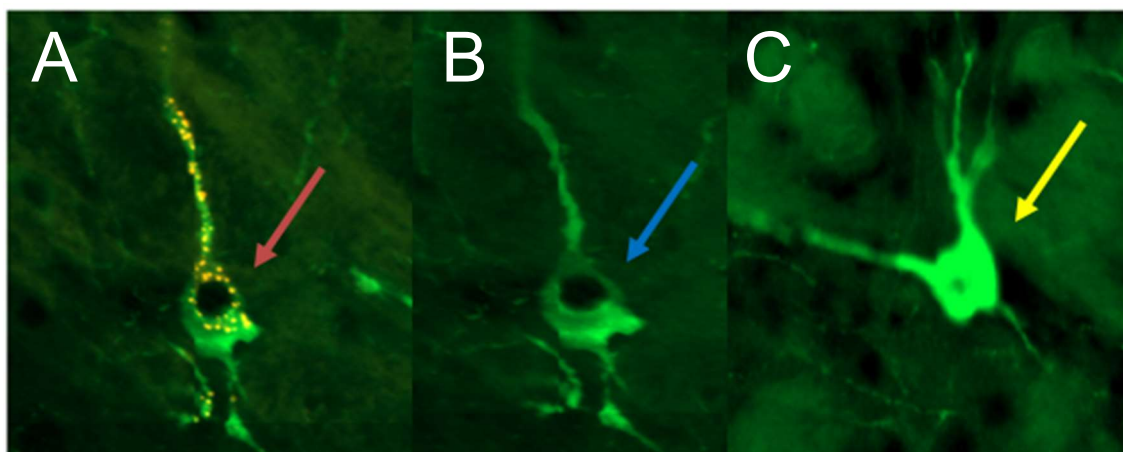
Kuva 11. C-Fos-DAB -värjäys hiiren 540 aivoleikkeessä 20-kertaisella suurennoksella.

C-Fos-DAB -värjäystä pystyttiin tarkastelemaan valomikroskoopilla, koska värjäyksessä käytettiin entsyymileimaa. Kuva 11 otettu epifluoresenssimikroskoopilla brigtfield-suodattimella, jolla RB:n injektiojälki on mahdollista nähdä. Koska leike ei ole injektiokohdasta, ei RB:a kuvassa 11 tämän vuoksi näy.

4.1.4 ChAT- ja c-Fos-DAB -värjäysten ja RetroBeadin optimointi

Viimeisessä optimoinnin vaiheessa piti selvittää, toimivatko ChAT- ja c-Fos-DAB -värjäykset yhdessä RetroBeadien (RB) kanssa, kun tiedettiin niiden toimivan erikseen värjäysten kanssa. DAB-substraattiliuoksen annettiin vaikuttaa 2,5 minuuttia, koska leikkeet näyttivät tummuvan liikaa silmin havaittaessa. Varsinaista koetta varten päätettiin aikaa kuitenkin pidentää. Vaikka leikkeet näyttivätkin tummuvan liikaa, olisivat ne kuitenkin voineet olla DAB-liuoksessa pidemmän aikaa, jotta värjäys näkyisi tummempana eli selkeämmin soluissa.

Kuvassa 12 on havainnollistettu, miltä kolinerginen hermosolu fluoresenssimikroskopiolla näyttää, jossa näkyvät RB:t sekä molemmat värjäykset.



Kuva 12. Hiiren 542 aivoleikkeestä otettu kuva 20-kertaisella suurennoksella, jossa esitellyt kolinerginen neuroni, jossa on RetroBead, cFos-DAB- ja ChAT -värjäys (A), cFos-DAB- ja ChAT -värjäys (B) ja pelkkä ChAT-värjäys (C).

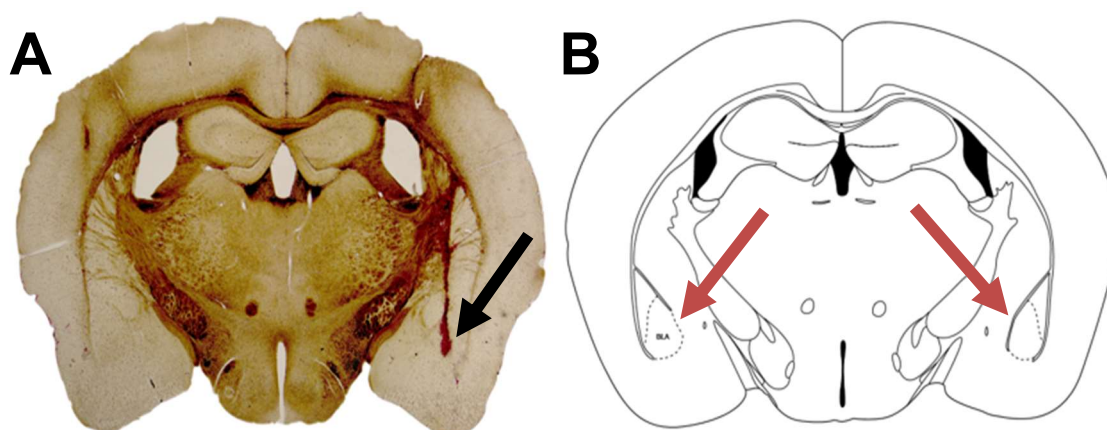
Kuvassa 12 punaisella nuolella on osoitettuna solu (A), jossa molemmat värjäykset ovat onnistuneet sekä RB:t näkyvät solussa. Sinisellä nuolella osoitettu solu (B) on havainnollistamassa solua, jossa näkyy ChAT- sekä cFos-DAB -värjäys, mutta ei RB:a. Keltainen nuoli osoittaa solua (C), jossa on ChAT-värjätty solu ilman cFos-DAB -väriä tai RB:a.

4.2 Menetelmän soveltaminen

Varsinainen työ aloitettiin kolmoiskuvantamismenetelmän kehityksen jälkeen. Varsinaisessa kokeessa RetroBeadit (RB) laimennettiin ennen injektiota 1:4, jotta injektorit eivät olisi tukkeutuneet. Laimennus näytti parantavan injektorien toimintaa eikä se myöskään vaikuttanut RB:n näkyvyyteen leikkeessä.

4.2.1 RetroBead-injektiot

Varsinaisessa työssä tarkasteltiin RB:n injektiokohtia, vaikka optimointivaiheessa tarkat injektiokohdat olivatkin jo optimoitu. Injektiokohtien tarkastelulla haluttiin varmistua injektioiden päätyemisestä oikeaan kohtaan aivoja. Koska aivot eivät ole tarkalleen identtisiä, voi injektiokohdat optimoinnista huolimatta päätyä väärään kohtaan. Tarkastelua helpotti RB:n jättämä tarkkarajainen injektiokohdan jälki leikkeeseen. Kuvassa 13 nähdään hiiren RB-injektio kohta (A) ja kuva aivokartastosta (B).



Kuva 13. A-kuva otettu 2,5-kertaisella suurennoksella värjäämättömästä hiiren 539 aivoleikkeestä. B-kuva on havainnollistamassa injektiokohtaa aivokartaston kuvassa (B: Franklin & Paxinos 2012: Figure 42, muok. 3.4.2017).

Kuvassa 13 A-puolen kuvassa oleva musta nuoli osoittaa injektiokohtaa, joka näkyi leikkeessä punertavana terävänä viivana. B-puolen kuvassa on käytetty aivokartaston kuvaa havainnollistamaan tarkkaa kohtaa injektioista. Aivokartastossa kohta BLA oli paikka, johon injektio pyrittiin saamaan. Punaiset nuolet osoittavat katkoviivoin rajatulle alueelle, joka on kohta, johon injektio yritettiin kokeessa saada. Injektio näyttäisi kyseisen kuvan pohjalta menneen hiirellä oikeaan kohtaan ainakin toisella puolella aivoista.

Taulukossa 3 on merkitty kaikkien kahdeksan hiiren leikkeistä otettujen kuvien perusteella katsottujen injektioiden onnistuminen. RB-kohdat leikkeissä kuvattiin erikseen valomikroskoopilla.

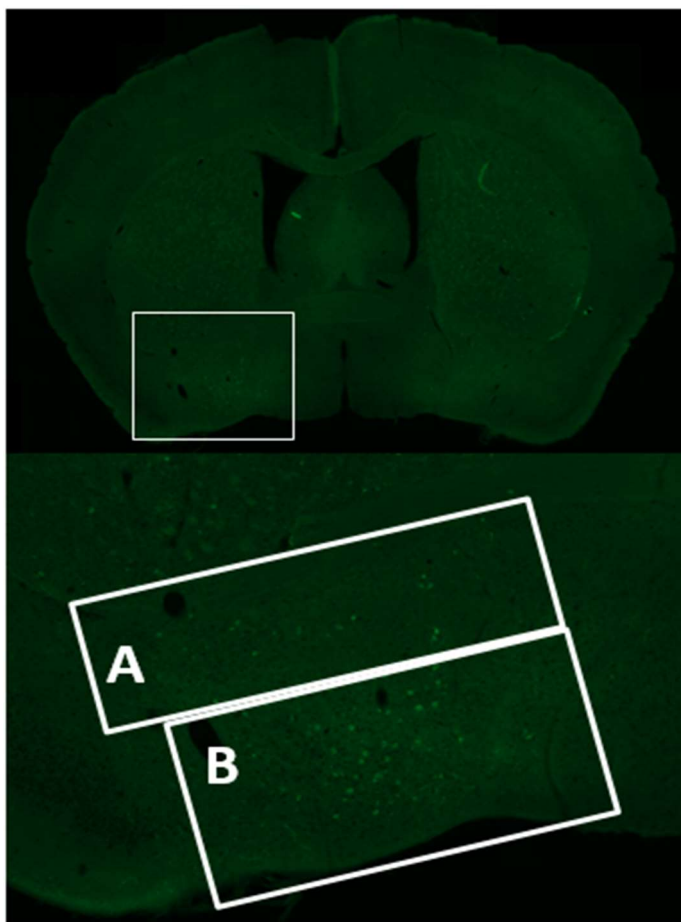
Taulukko 3. RetroBead-injektioiden onnistuminen hiirillä.

Hiiri nro.	Onnistunut toinen puoli	Onnistunut molemmat puolet	Ei onnistunut
535			x
536		x	
537		x	
538		x	
539		x	
540	x		
541		x	
542	x		

Taulukosta 3 nähdään viiden hiiren injektioiden onnistuneen hyvin molemmilta puolilta. Kahden hiiren injektio näyttivät menneen ainakin toiselta puolelta oikeaan kohtaan, ja yhdellä hiirellä kuvien perusteella injektio ei näyttänyt onnistuneen. Tulokset eivät kuitenkaan anna välttämättä aina aivan tarkkaa kuvaa injektioiden onnistumisesta, sillä jääleikkeitä tehdessä hiirien aivot ovat voineet olla esim. hiukan vinossa, jolloin injektio kohtaa saattaa näyttää olevan leikkeellä hiukan väärässä kohtaan aivoja. Vasta solujen laskeminen ja injektio kuvien tarkkailu yhdessä antavat optimaalisen kuvan injektioiden todellisesta onnistumisesta.

4.2.2 Tilastolliset tulokset

ChAT-soluista laskettiin ne, joissa näkyi RetroBead (RB) ja ne joissa näkyi RB sekä c-Fos-proteiini. Solut laskettiin erotellen ChAT-solut ylempänä ja alempana leikkeissä näkyviin etuaivojen pohjaosassa sijaitseviin soluihin kuten esiteltynä kuvassa 14.



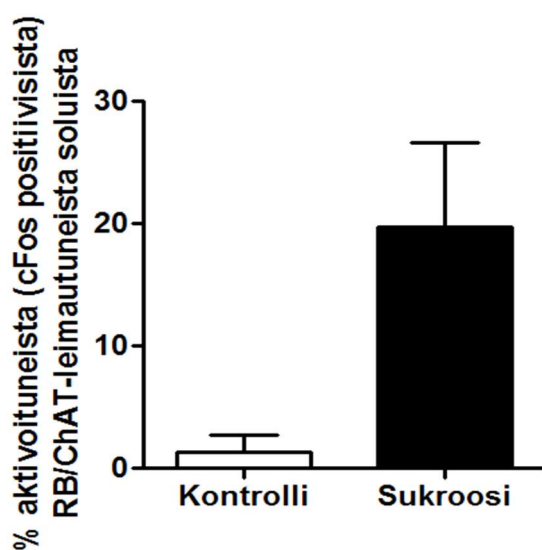
Kuva 14. Kuva otettu hiiren 540 aivoleikkeestä 20-kertaisella suurennoksella havainnollistamaan solujen laskussa käytettyä rajaa yläpuolen (A) ja alapuolen (B) ChAT-solujen välillä.

Taulukossa 4 on esiteltyä leikkeissä alhaalla näkyviin ChAT-soluihin. Solut on laskettu erotellen ne ChAT-solut, joissa näkyi RB:a, ja ne, joissa oli RB:a sekä c-Fos-proteiinia. Taulukkoon 4 on myös laskettu RB:a ja c-Fos-proteiinia sisältävien asetyylikoliinisolujen (ChAT-positiiviset) %-osuus niistä soluista, joissa näkyi vain ChAT-värjäys ja RB:t. Taulukkoon 4 on myös esitelty hiiret, jotka olivat syömiskokeessa joko kontrollihiiriä tai sukroosia juovia hiiriä. Sukroosihiiret ovat korostettu taulukkoon 4,5 ja 6 keltaisella värillä.

Taulukko 4. Leikkeissä alapuolella näkyvien solujen määrät taulukoituna.

Hiiri nro.	Syömiskoe	ChAT + RB (ala)	ChAT + RB + cFos (ala)	cFos %-osuus ChAT + RB -soluista
535	kontrolli	15	0	0 %
536	sukroosi	12	3	25 %
537	kontrolli	57	2	4 %
538	sukroosi	31	2	6 %
539	kontrolli	6	0	0 %
540	sukroosi	6	0	0 %
541	kontrolli	35	6	17 %
542	sukroosi	18	5	28 %

Taulukosta 4 nähdään sukroosihiiressä olevan korkeammat %-osuudet kuin kontrollihiiressä. Vaikka hiiren 535 injektio kuvista tehtiin päätelmät injektioiden epäonnistumisesta, tuloksissa kuitenkin RB:t ovat olleet oikeissa ChAT-soluissa ja luultavasti injektio oli kuitenkin onnistunut. Hiiren 540 solujen laskeminen tuotti vaikeuksia, sillä leikkeistä otetut kuvat eivät olleet hyviä. ChAT-solut, joissa näkyi RB:t, oli kuvista helppo laskea eli niiden tulosta voidaan pitää luotettavana, mutta c-Fos-proteiinin osuutta ChAT-värjäytyneistä RB-soluista ei voi sanoa luotettavaksi. Hiiren 540 tulos jätettiin huomioimatta tehdyssä t-testin tuloksissa. Hiirellä 541 oli todella suuri määrä c-Fos-proteiinia eli aktiivisia ChAT-soluja. Tämä voi johtua siitä, että perustasoltaan hiirellä 541 oli enemmän c-Fos-aktiivisuutta tai c-Fos-proteiini värjäytyi paremmin ja siksi sitä näyttää olevan enemmän. Kuvassa 15 on t-testin tulokset esiteltynä kuvaajana. T-testin teossa käytettiin taulukon 4 c-Fos %-osuus ChAT + RB -soluista -arvoja.



Kuva 15. T-testin tulos c-Fos %-osuus RetroBead ja ChAT -soluista, leikkeiden alapuolelta lasketuista ChAT-soluista.

Kuvassa 15 olevan kuvaajan t-testin tuloksiin on jätetty hiiren 540 ja 541 arvot huomioimatta, sillä ne eivät olleet luotettavat kyseissä kokeessa. Kuvaajasta nähdään sukroosihiiirillä olevan suurta hajontaa tuloksissa, kun taas kontrollihiiirillä hajonta on paljon pienempi. Hajonta sukroosihiiirillä johtui siitä, että pienin t-testissä käytetty arvo on 6 % ja suurin 28 % ja otoskoko oli niin pieni. T-testin tuloksia alapuolelta leikkeistä laskettujen c-Fos %-osuudesta ChAT + RB -soluista ($t=2,61$, $p=0,059$) ei voi pitää tilastollisesti merkitsevinä.

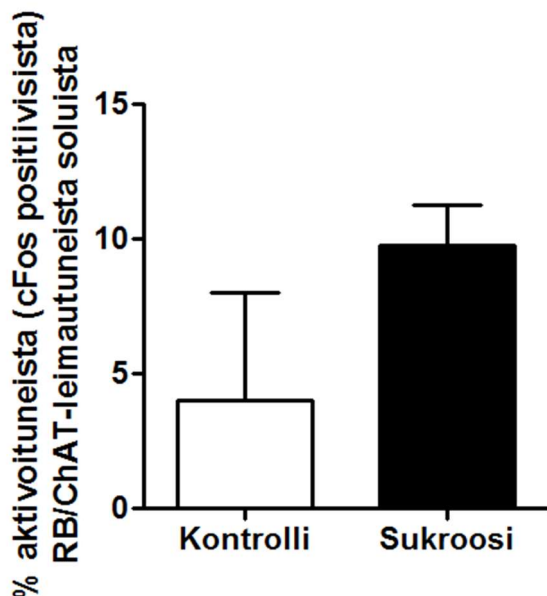
Taulukossa 5 on esiteltynä leikkeissä ylhäällä näkyvät ChAT-solut. Taulukkoon 5 on esitelty samat tiedot kuin taulukossa 4.

Taulukko 5. Leikkeissä yläpuolella näkyvien solujen määrät taulukoituna.

Hiiri nro.	Syömiskoe	ChAT + RB (ylä)	ChAT + RB + cFos (ylä)	cFos %-osuus ChAT + RB -soluista
535	kontrolli	17	2	12 %
536	sukroosi	9	1	11 %
537	kontrolli	24	0	0 %
538	sukroosi	17	1	6 %
539	kontrolli	11	0	0 %
540	sukroosi	33	3	9 %
541	kontrolli	6	3	50 %
542	sukroosi	8	1	13 %

Taulukosta 5 nähdään taas hiirellä 541 olevan todella suuri c-Fos %-osuus ChAT + RB -soluista, joka mahdollisesti johtuu jo aiemmin mainituista syistä. Hiirellä 540 on taulukossa 5 solujen laskussa korkeampi prosentuaalinen lukema kuin taulukossa 4, mikä varmasti kuvaa paremmin todellista arvioita c-Fos-proteiinin määrästä leikkeessä. Tulos voisi toisaalta olla jopa suurempikin, jos solut olisivat olleet paremmin laskettavissa. Kontrollihiirellä 535 on yläpuolelta lasketuista soluista korkeampi c-Fos %-osuus. Koska ChAT-värjättyjä ja RB:a sisältäviä soluja on ollut kokonaisuudessa melko vähän, on %-osuus tällöin suurempi.

Kuvassa 16 on t-testin tulokset esiteltynä kuvaajana. T-testin teossa käytettiin taulukon 5 c-Fos %-osuus ChAT + RB -soluista -arvoja.



Kuva 16. T-testin tulos c-Fos %-osuus RetroBead + ChAT -soluista, leikkeiden yläpuolelta lasketuista ChAT-soluista.

Kuvassa 16 olevassa kuvaajassa t-testin tuloksiin on jätetty hiirien 540 ja 541 arvot huomioimatta, sillä ne eivät olleet tarpeeksi luotettavia. Kuvassa 16 nähdään kontrollihiirillä olevan suurta hajontaa tuloksissa, kun taas sukroosihiirillä hajonta on paljon pienempi. Hajonta kontrollihiirillä johtui siitä, että t-testissä käytetyt arvot vaihtelevat 0 % ja 12 %:n välillä ja otoskoko oli niin pieni. T-testin tuloksia alapuolelta leikkeistä laskettujen c-Fos %-osuudesta ChAT + RB -soluista ($t=1,52$, $p=0,189$) ei voi pitää tilastollisesti merkitsevinä.

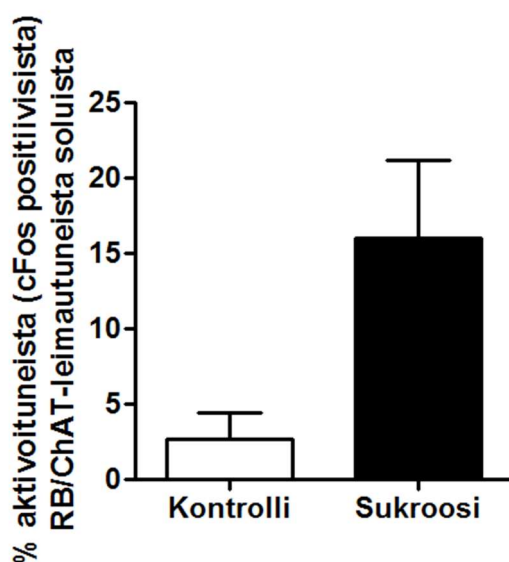
Taulukossa 6 on esiteltyä alapuolelta sekä yläpuolelta näkyvien ChAT-solujen yhteenlaskettu määrä. Taulukkoon 6 on esitelty samat tiedot kuin taulukoissa 4 ja 5.

Taulukko 6. Leikkeissä ala- ja yläpuolella näkyvien solujen yhteenlasketut määrät taulukoituna.

Hiiri nro.	Syömiskoe	ChAT + RB (ala+ylä)	ChAT + RB +cFos (ala+ylä)	cFos %-osuus ChAT + RB -soluista
535	kontrolli	32	2	6 %
536	sukroosi	21	4	19 %
537	kontrolli	81	2	2 %
538	sukroosi	48	3	6 %
539	kontrolli	17	0	0 %
540	sukroosi	39	3	8 %
541	kontrolli	41	9	22 %
542	sukroosi	26	6	23 %

Hiirellä 541 luonnollisesti myös yhteenlaskettujen solujen määrässä on korkeampi tulos. Kontrollihiirellä 535 on yhteenlasketuista soluista korkeampi c-Fos-proteiinin %-osuus, kuin esim. sukroosihiirellä nro. 538. Tämä johtuu siitä, että kontrollihiirellä 535 on pienempi kokonaismäärä laskettuja ChAT-värjättyjä RB -soluja. Koska ChAT-värjättyjä ja RB:a sisältäviä soluja on ollut kokonaisuudessa vähemmän, on %-osuus tällöin suurempi.

Kuvassa 17 on t-testin tulokset esiteltynä kuvaajana. T-testin teossa käytettiin taulukon 6 c-Fos %-osuus ChAT + RB -soluista -arvoja.



Kuva 17. T-testin tulos c-Fos %-osuus RetroBead + ChAT -soluista, leikkeistä ylä- ja alapuolelta yhteenlasketuista ChAT-soluista.

Kuvassa 17 olevan kuvaajan t-testin tuloksiin on jätetty hiirien 540 ja 541 arvot huomiomatta, sillä ne eivät olleet tarpeeksi luotettavia. Kuvaajassa 17 nähdään sukroosihiirillä olevan suurta hajontaa tuloksissa, kun taas kontrollihiirillä hajonta on paljon pienempi. Hajonta kontrollihiirillä johtui siitä, että t-testissä käytetyt arvot vaihtelevat 6 % ja 23 %:n välillä ja otoskoko oli niin pieni. T-testin tuloksia ylä- ja alapuolelta yhteenlaskettujen c-Fos %-osuudesta ChAT + RB -soluista ($t=2,46$, $p=0,0699$) ei voi pitää tilastollisesti merkitsevinä.

5 Yhteenveto

Kolmoiskuvantamismenetelmän kehittäminen onnistui hyvin. RetroBeadit (RB) on toimiva menetelmä uusien ja tunnettujen hermoyhteyksien tutkimisessa. Huomattava etu muihin hermoyhteyksissä kulkeutuviin merkkiaineisiin verrattuna oli RB:n jättämä tarkkarajainen injektiokohdan jälki, joka koettiin tässäkin työssä erittäin hyväksi ominaisuudeksi. Injektiokohdan näkyvyydellä voidaan helposti ensin optimoida haluttu injektiokohta ennen varsinaisia kokeita, mikä tuo varmuutta varsinaisten kokeiden suorittamiselle ja siten nopeuttaa mahdollisesti niiden suoritusta.

RB:n todettiin soveltuvan myös hyvin käytössä olevien immunohistokemiallisten värjäysten (c-Fos-DAB, ChAT) kanssa, ja niiden näkyvyys mikroskoopilla oli erinomainen. Tässä työssä huomattiin RB:n näkyvän hyvin 10-kertaisella suurennoksella, mutta tarkemmassa solujen laskentavaiheessa oli tarpeen ottaa kuvat 20-kertaisella suurennoksella. Injektioissa olisi voitu jo optimointivaiheessa käyttää laimennettua RB:a, sillä laimennetun ja laimentamattoman RB:n näkyvyydessä ei huomattu merkittäviä eroja. RB:n laimentaminen helpotti injektorien tukkeutumista ja nopeutti työskentelyä injektoiden kanssa.

Aivoleikkeiden kuvaaminen onnistui melko hyvin. Kuvat olivat melkein kaikista leikkeistä riittävän tarkkoja laskemiseen, mutta kuvaaminen vei ehdottomasti eniten aikaa koko työssä. Yhden koe-eläimen leikkeistä ei voitu olla riittävän varmoja solujen määrästä, sillä kuvat eivät olleet tarpeeksi tarkkoja. Kyseisen hiiren tulokset jätettiin huomiomatta tilastollisessa analyysissä.

Solujen laskennassa käytettiin konservatiivista solujen mukaanoton kriteeriä, jotta vältettiin väärän positiivisen tuloksen syntymiseltä. Mukaan laskettiin sellaiset solut, joissa näkyi selkeästi musta c-Fos-proteiini-piste, mutta ne joista ei täyttä varmuutta ollut, jätettiin ne laskuista pois. Solujen laskemisessa täyttä varmuutta solujen määrästä ei voi olla, sillä aktivoituneita soluja on voinut olla todellisuudessa enemmän, koska mahdollisesti leikkeiden pinnalla olevat solut ovat olleet tummimpia väriltään tai solujen aktivaatiota-soissa on voinut olla eroja, jolloin jotkut solut ovat värjäytyneet tummemmiksi. Tämä on voinut vaikuttaa t-testin tuloksiin.

Varsinaisten syömiskokeiden tuloksissa ei ollut tilastollista merkitsevyyttä, mutta niistä kuitenkin näkyi selviä eroja kontrolli- ja sukroosiryhmän välillä, mikä oli hypoteesina kyseiselle kokeelle. Näillä tuloksilla näyttää siltä, että etuaivojen pohjaosasta lähtevällä ja manteliumakkeeseen päättyvällä hermoyhteydellä kolinergisessä signaloinnissa saattaa olla merkitystä ruokahalunsäätelyssä. Jos kyseisessä kokeessa olisi ollut esimerkiksi kaksinkertainen määrä koe-eläimiä, olisi tulos luultavasti ollut jo tilastollisesti merkittävä, vaikka osa hiiristä olisi jouduttu varsinaisista tuloksista hylkäämään. Tilastollista testiä varten kahdeksan hiiren otos on erittäin pieni, mikä näkyy erityisesti tulosten hajonnassa. Koska pääpaino työssä oli kolmoiskuvantamismenetelmän kehittämisellä, ei varsinaisessa kokeessa käytetty enempää koe-eläimiä. Kyseisen hermoyhteyden tutkimuksia olisi ehdottomasti mielenkiintoista jatkaa ruokahalun säätelyn näkökulmasta, koska jo näiden tulosten perusteella voidaan sanoa kolinergisellä signaloinnilla olevan mahdollisesti rooli ruokahalun säätelyssä. Tutkimukset vaatisivat kuitenkin suuremman otoksen koe-eläimiä tilastollisen analyysin luotettavuuden vuoksi.

Lähteet

Albayrak, I. 2016. Mantelitimake neuropaattisen kivun säätelyssä. Tutkielma. Helsingin yliopisto.

Appleyard, S. 2009. Lighting Up Neuronal Pathways: The Development of a Novel Transgenic Rat that Identifies Fos-Activated Neurons Using a Red Fluorescent Protein. *Endocrinology*. Vol. 150, s. 5199–5210.

Arenkiel, B., Carlson, J., Herman, A., Herman, I., Kochukov, M., Oztiz-Guzman, J., Patel, J., Quast, B., Selever, J., Tepe, B., Tong, Q. & Ung, K. 2016. A cholinergic basal forebrain feeding circuit modulates appetite suppression. *Nature*. Vol. 538, s.253–256.

Bayer, E. & Wilchek, M. 1984. The avidin-biotin complex in immunology. *Immunology Today*. Vol. 5, s. 39–43.

Boyer, C. 2015. OSU scientist grows tiny brain to study diseases. Verkkouutinen. Dayton Daily News. <<http://www.daytondailynews.com/news/osu-scientist-grows-tiny-brain-study-diseases/VMUqRcNMRLNpFUdFUeF0N/>> Luettu 15.4.2017.

Brown, C. & Webb, D. 2013. Epi-Fluorescence Microscopy. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 931, s. 29–59.

Burkhalter, A., Dreyer, W. & Katz, L. 1984. Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature*. Vol. 310, s. 498–500.

Cagri, T., Pare, D. & Zaborsky, L. 2015. Impact of Basal Forebrain Cholinergic Inputs on Basolateral Amygdala Neurons. *Journal of Neuroscience*. Vol. 35, s.853–863.

Chaudhuri, A. & Zangenehpour, S. 2002. Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Molecular Brain Research*. Vol. 109, s.221–225.

Epifluorescence Microscope Basics. 2017. Verkkosivu. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/epifluorescence-microscope-basics.html>> Luettu 8.3.2017.

Eriksson, M. 2005. AP-1 Transcription factor in cell differentiation and survival. Väitöskirja. Helsingin yliopisto.

Fadem, B. 2012. Behavioral science in medicine. 2nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Fanger, H., Hsu, S. & Raine, L. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Vol. 29, 577–580.

Franklin, K. & Paxinos, G. 2012. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic*. 4th ed. Boston: Academic Press.

Golowasch, J., Unal, C. & Zaborszky, L. 2012. Adult mouse basal forebrain harbors two distinct cholinergic populations defined by their electrophysiology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Vol. 6, s. 21.

Guyton, A., Hall, J. 2006. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. USA: Elsevier inc.

Kalyuzhny, A. 2016. *Immunohistochemistry: essential elements and beyond*. Switzerland: Springer International Publishing.

Koulu, M. & Piepponen, P. 2013. *Johdanto neurofarmakologiaan, neurotransmissio*. Koulu, M. & Mervaala, E. (toim.). *Farmakologia ja toksikologia*. 9th ed. Kuopio: Medicina.

Nathans, J., Williams & J., Wu, H. 2014. Complete morphologies of basal forebrain cholinergic neurons in the mousen. *Verkkodokumentti*. eLife. <<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.02444>> Luettu 7.3.2017.

Oda, Y. 1999. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int.* Vol. 49, s.921–937.

Paxinos, G., Puelles, L. & Watson, C. 2012. *The mouse nervous system*. Amsterdam: Academic Press.

Porkka-Heiskanen, T. & Stenberg, D. 2008. Unen kemia. *Duodecim*. Vol. 124, s. 246–253.

Protocol. 2017. *Verkkosivu*. Lumafluor Inc. <https://www.lumafluor.com/Protocol__Rev_8_05_.php> Luettu 28.2.2017.

Äidin masennus näkyy lapsen aivoissa. 2011. *Verkkouutinen*. Tiede. <http://www.tiede.fi/artikkeli/uutiset/aidin_masennus_nakyy_lapsen_aivoissa> Luettu 8.4.2017.

ChAT-vasta-ainevärijäys

Päivä 1.

1. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
2. Muutosten palauttaminen (antigen retrieval): Laita pestyt leikkeet eppendorf-putkeen ja peitä leikkeet 10 mM sitraatilla, pH 8,5 (15 min).
3. Anna jäähtyä huoneenlämpöiseksi ennen pesua n. 5-10 min.
4. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
5. Blokkaukset suoritetaan 24-kuoppalevyllä, johon pipetoidaan 500 µl blokkaukseen liuosta (blocking solution) leikkeiden kanssa. Blokkaukset suoritetaan 1 h huoneenlämmössä koko ajan sekoittaen.
6. Primaarivasta-ainekäsittely: Pipetoi blokkattujen leikkeiden ja blokkaukseen liuoksen sekaan 5 µl 1:100 goat anti-chat AB144P vasta-ainetta.
7. Inkuboi leikkeitä yön yli +4 °C:ssa koko ajan sekoittaen valolta suojattuna.

Päivä 2.

1. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
2. Sekundaarivasta-ainekäsittely: Pipetoi 24-kuoppalevyllä leikkeiden päälle 500 µl blokkaukseen liuosta ja 0,5 µl 1:1000 donkey anti-goat 488 A-11055 vasta-ainetta.
3. Inkuboi leikkeitä 2 h huoneenlämmössä koko ajan sekoittaen valolta suojattuna.
4. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä valolta suojaten.
5. Pesujen jälkeen leikkeet voidaan asettaa mikroskooppilaseille.

ChAT-vasta-ainevärjäyksessä tarvittavien liuosten valmistusohjeet:

Blokkausliuos (ChAT):

1 % BSA	→ 0,05 g
10 % Donkey serum	→ 0,5 ml
0,3 % Triton	→ 15 µl
1xPBS	→ laimenna 5 ml:ksi

C-Fos-DAB -vasta-ainevärjäys

Päivä 1.

1. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
2. Muutosten palauttaminen (antigen retrieval): Laita pestyt leikkeet eppendorff-putkeen ja peitä leikkeet 10 mM sitraatilla, pH 8,5 (15 min).
3. Anna jäähtyä huoneenlämpöiseksi ennen pesua n. 5-10 min.
4. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
5. Blokkaukset suoritetaan 24-kuoppalevyllä, johon pipetoidaan 500 µl blokkaukseen liuosta (blocking solution) leikkeiden kanssa. Blokkaukset suoritetaan 1 h huoneenlämmössä.
6. Vetyperoksidikäsittely: Pipetoi 6-kuoppalevyille n. 5 ml 1 % H₂O₂ leikkeiden sekaan ja inkuboi huoneenlämmössä 1 h.
7. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
8. Blokkaukset suoritetaan 24-kuoppalevyllä, johon pipetoidaan 500 µl blokkaukseen liuosta (blocking solution) leikkeiden kanssa. Blokkaukset suoritetaan 1 h huoneenlämmössä koko ajan sekoittaen.
9. Primaarivasta-ainekäsittely: Pipetoi blokkattujen leikkeiden ja blokkaukseen liuoksen sekaan 1 µl 1:500 rabbit anti-cFos sc-52 vasta-ainetta.
10. Inkuboi leikkeitä yön yli +4°C koko ajan sekoittaen valolta suojattuna.

Päivä 2.

1. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.

2. Sekundaarivasta-ainekäsittely: Pipetoi 24-kuoppalevyille leikkeiden päälle 500 µl blokkauслиuosta ja 2,5 µl 1:200 horse biotinylated anti-rabbit, Vector cat#BA-1100 vasta-ainetta.
3. Inkuboi leikkeitä 2 h huoneenlämmössä koko ajan sekoittaen valolta suojattuna.
4. Valmista n. 15 min ennen sekundaarivasta-ainekäsittelyn päättymistä ABC-liuos 24-kuoppalevyille. Pipetoi ABC-kitistä A-liuosta 2 µl, B-liuosta 2 µl ja 500 µl PBS. Anna ABC-liuoksen inkuboitua valolta suojattuna 30 min, ilman sekoitusta.
5. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä valolta suojaten.
6. Inkuboi leikkeitä ABC-liuoksessa huoneenlämmössä valolta suojattuna koko ajan sekoittaen 1 h.
7. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä valolta suojaten.
8. DAB-reaktio nikkelillä: Valmista DAB-substraattiliuos kitin ohjeiden mukaisesti falcon-putkeen, sekoita hyvin ja peitä falcon-putki foliolla. Suorita DAB-reaktio 6-kuoppalevyllä koko ajan sekoittaen ja ota aika reaktionkulusta. Muista suojata leikkeet reaktion aikana valolta. **(DAB-reaktio tulee suorittaa vetokaapissa!)**
9. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä valolta suojaten.
10. Pesujen jälkeen leikkeet voidaan asetella mikroskooppilaseille.

C-Fos-DAB-vasta-ainevärjäyksessä tarvittavien liuosten valmistusohjeet:**1 % H₂O₂:**30 % H₂O₂ → 0,1 ml

1xPBS → 10 ml

Blokkausliuos (cFos):

3 % BSA → 0,15 g

10 % Donkey serum → 0,5 ml

0,3 % Triton → 15 µl

1xPBS → laimenna 5 ml:ksi

C-Fos-DAB- ja ChAT-vasta-ainevärjäykset yhdistettynä

Päivä 1.

1. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
2. Muutosten palauttaminen (antigen retrieval): Laita pestyt leikkeet eppendorf-putkeen ja peitä leikkeet 10 mM sitraatilla, pH 8,5 (15 min).
3. Anna jäähtyä huoneenlämpöiseksi ennen pesua n. 5-10 min.
4. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
5. Blokkaukset suoritetaan 24-kuoppalevyllä, johon pipetoidaan 500 µl blokkaukseen liuosta (blocking solution) leikkeiden kanssa. Blokkaukset 1 h huoneenlämmössä.
6. Vetyperoksidikäsittely: Pipetoi 6-kuoppalevyille n. 5 ml 1 % H₂O₂ leikkeiden sekaan ja inkuboi huoneenlämmössä 1 h.
7. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
8. Blokkaukset suoritetaan 24-kuoppalevyllä, johon pipetoidaan 500 µl blokkaukseen liuosta (blocking solution) leikkeiden kanssa. Blokkaukset 1 h huoneenlämmössä koko ajan sekoittaen.
9. Primaarivasta-ainekäsittely: Pipetoi blokkattujen leikkeiden ja blokkaukseen liuoksen sekaan 1 µl 1:500 rabbit anti-cFos sc-52 vasta-ainetta.
10. Inkuboi leikkeitä yön yli +4°C koko ajan sekoittaen valolta suojattuna.

Päivä 2.

1. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.

2. Sekundaarivasta-ainekäsittely: Pipetoi 24-kuoppalevylle leikkeiden päälle 500 µl blokkauслиuosta ja 2,5 µl 1:200 horse biotinylated anti-rabbit, Vector cat#BA-1100 vasta-ainetta.
3. Inkuboi leikkeitä 2 h huoneenlämmössä koko ajan sekoittaen valolta suojattuna.
4. Valmista n. 15 min ennen sekundaarivasta-ainekäsittelyn päättymistä ABC-liuos 24-kuoppalevylle. Pipetoi ABC-kitistä A-liuosta 2 µl, B-liuosta 2 µl ja 500 µl PBS. Anna ABC-liuoksen inkuboitua valolta suojattuna 30 min, ilman sekoitusta.
5. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä valolta suojaten.
6. Inkuboi leikkeitä ABC-liuoksessa huoneenlämmössä valolta suojattuna koko ajan sekoittaen 1 h.
7. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä valolta suojaten.
8. DAB-reaktio nikkelillä: Valmista DAB-substraattiliuos kitin ohjeiden mukaisesti falcon-putkeen, sekoita hyvin ja peitä falcon-putki foliolla. Suorita DAB-reaktio 6-kuoppalevyllä koko ajan sekoittaen ja ota aika reaktionkulusta. Muista suojata leikkeet reaktion aikana valolta. **(DAB-reaktio tulee suorittaa vetokaapissa!)**
9. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä valolta suojaten.
8. Blokkauслиuosta suoritetaan 24-kuoppalevyllä, johon pipetoidaan 500 µl blokkauслиuosta (blocking solution) leikkeiden kanssa. Blokkauслиuosta leikkeitä 1 h huoneenlämmössä koko ajan sekoittaen.
9. Primaarivasta-ainekäsittely: Pipetoi blokattujen leikkeiden ja blokkauслиuoksen sekaan 5 µl 1:100 goat anti-chat AB144P vasta-ainetta.
10. Inkuboi leikkeitä yön yli +4°C koko ajan sekoittaen valolta suojattuna.

Päivä 3.

1. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä.
2. Sekudaarivasta-ainekäsittely: Pipetoi 24-kuoppalevylle leikkeiden päälle 500 µl blokkauслиuosta ja 0,5 µl 1:1000 donkey anti-goat 488 A-11055 vasta-ainetta.
3. Inkuboi leikkeitä 2 h huoneenlämmössä koko ajan sekoittaen valolta suojattuna.
4. Leikkeiden pesu 6-kuoppalevyllä 3 x 5 min 1xPBS:llä valolta suojaten.
5. Pesujen jälkeen leikkeet voidaan asetella mikroskooppilaseille.

C-Fos-DAB- ja ChAT-vasta-ainevärjäyksissä tarvittavien liuosten valmistusohjeet:**1 % H₂O₂:**30 % H₂O₂ → 0,1 ml

1xPBS → 10 ml

Blokkausliuos (cFos):

3 % BSA → 0,15 g

10 % Donkey serum → 0,5 ml

0,3 % Triton → 15 µl

1xPBS → laimenna 5 ml:ksi

Blokkausliuos (ChAT):

1 % BSA → 0,05 g

10 % Donkey serum → 0,5 ml

0,3 % Triton → 15 µl

1xPBS → laimenna 5 ml:ksi