

Jori Hiltunen

**FINCA-HIIRIMALLIN PUNASOLUTUTKIELMA**

# FINCA-HIIRIMALLIN PUNASOLUTUTKIELMA

Jori Hiltunen  
Opinnäytetyö  
Kevät 2020  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Oulun ammattikorkeakoulu



## TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

---

Tekijä(t): Jori Hiltunen

Opinnäytetyön nimi: FINCA-hiirimallin punasolututkimus

Työn ohjaaja: Mika Paldanius ja Katja Nummilinna

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2020

Sivumäärä: 32 + 10

---

Oulun yliopiston Lastenneurologian tutkimusyksikkö tutkii ihmispotilailla tavattua harvinaista, vakavaa, aiemmin tuntematonta monielintautia. NHL repeat containing 2 (*NHLRC2*)-geenin mutaatiot aiheuttavat FINCA-tautia, johon kuuluu mm. krooninen hemolyyttinen anemia. Taudin, geenivirheidien ja *NHLRC2*-proteiinin tutkimiseksi *in vivo* on luotu hiirimalli. Hiirimallia on geenimuunneltu siten, että se ilmentää ihmissairauden aiheuttaneita mutaatioita. Toukokuussa 2018 julkaistussa artikkelissa eriteltiin FINCA:n aiheuttamat muutokset punasoluihin ja veren proteiineihin.

FINCA-hiirimallin punasolututkimus on osa Lastenneurologian tutkimusyksikön FINCA-taudin tutkimuskokonaisuutta. Opinnäytetyön tavoitteena on luotettavasti mitata tutkimusryhmälle villityypin ja mutantin hiiren verenkuvista FINCA-mutaation aiheuttama säännönmukainen ero eli FINCA-taudin ilmeneminen myös hiirten veressä. Ero hiiriryhmien välillä on edellytys hiirimallin veren jatkokutkimuksille. Opinnäytetyön tarkoitus on tuottaa luotettava määrällinen poikkileikkausaineisto tutkimusryhmälle tilastotilastoanalyysia varten, jolla voidaan sulkea pois tai vahvistaa ero verenkuvissa.

Opinnäytetyössä käytetyt laboratoriomenetelmät perustuvat eläinmalleja käsittelevän kirjallisuuden ja FINCA-tutkimuksen osoittamiin muutoksiin ihmispotilaiden veressä. Ydinmenetelmiä mitauksessa ovat hemoglobiinin määrittäminen spektrofotometrialla, hematokriitin sentrifugointi kapillaarissa, solulaskenta mikroskoopilla Neubauer-kammiossa, sivelyvalmisteet, värjäystekniikat, retikulosyyttilaskenta ja punasolumorfologian tarkastelu mikroskoopilla. Punasoluideksit lasketaan mitatuista arvoista. Jäännösnäyte sentrifugoidaan ja eritellään pakastettavaksi plasmaksi. Sivelyvalmisteet kiinnitetään ja suojataan päällyslasilla säilyvyyden takaamiseksi. Pinnan suhteellinen paino sisällytetään tutkimustuloksiin herkkänä hiiren hemolyysin ja punasoluregeneraation mittarina.

Opinnäytetyön tulos on taulukoitu mittausaineisto N=23 (12:11 FINCA-ryhmä suhteessa kontrolliryhmään) hiiriryhmien veren hemoglobiinista, veren punasoluarvoista ja morfologiasta. Mittausten yhteydessä valmistetaan tutkimusryhmälle pakastetut plasmanäytteet, supravitaalivärjätyt retikulosyytti-, May-Grünwald-Giemsa-värjätyt- ja värjäämättömät sivelyvalmisteet. Lisäksi tuotetaan digitaalisia fotomikrografeja 1000X-suurennoksella punasoluista ja tutkimuspäiväkirja yksityiskohtaisilla menetelmäohjeilla.

FINCA-tutkimuksella on eettisten lautakuntien hyväksynnät. Kokeen hiirten perimä, ikä ja elinympäristö oli vakioitu. Mittausmenetelmissä näytteensaisilla vertailuilla varmistettiin tulosten yhdenmukaisuudesta. Menetelmien jatkuvuus oli hyvä ja tulostaso säilyi samana kaksi kuukautta kestäneiden mittausten ajan. Määrälliset tulokset taulukoitiin yksiselitteisyyden ja vertailun helpottamiseksi.

---

Asiasanat: verisolut, sairaus, hematologia, eläinmallit, geeniyhteydet, tutkimukset

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences  
Degree programme in Biomedical Laboratory Science

---

Author(s): Jori Hiltunen

Title of thesis: Study of red blood cells of FINCA mouse model

Supervisor(s): Mika Paldanius and Katja Nummilinna

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2020      Number of pages: 32 + 10

---

Pediatric neurology group of PEDEGO Research Unit and Medical Research Center in the University of Oulu are studying a novel progressive early-onset multi-organ disease in young children. It is caused by previously unknown mutations in the NHL repeat containing 2 (*NHLRC2*) gene. The disease, the genetic disorder and the protein NHLRC2 are being studied on a mouse model. This mouse model's genome has been edited to express the patient mutations. The disease was named FINCA and among its symptoms is chronic haemolytic anemia. In the first description of the disease in May 2018 the quantifiable haemolytic changes in the blood count of the children were specified.

As part of FINCA research this study aims to provide comparative blood test data of the wildtype and the mutant mouse to decipher if the haemolytic anemic changes recorded in the patients can also be measured in the mouse model's blood panels. The results of quantifiable difference between the groups' panels is expected in this study and would call for further testing of the blood. The purpose of the study is to provide a reliable quantitative cross-sectional data to be used in statistical analysis to confirm or disprove the difference in intergroup blood counts.

The chosen laboratory methods are based in animal model literature and the changes in patient blood counts as described in the FINCA research. Core methods of measurement are spectrophotometry to decipher total haemoglobin, centrifugation of hematocrit in capillary tubes, microscopic cell count in Neubauer-hemocytometer, blood smears, staining techniques, microscopic reticulocyte count and erythrocyte morphology assessment. Red cell indices are calculated from measured data. Left over sample is centrifuged and the plasma is separated to be frozen for a possible later use in FINCA research. Blood smears are mounted with cover glasses. Splenic weights are included in the data as they can be used as sensitive measurements of regenerative haemolysis.

The result of the study is the measurement data of N=23 (12:11 FINCA group to control group) specimens' total haemoglobin, blood cell values, indices and morphological analysis. In addition physical material of frozen plasma samples, supravitaly stained reticulocyte smears, May-Grünwald-Giemsa stained blood smears and unstained blood smears were collected and stored. Digital photomicrographs of 1000X magnification of red cells and a detailed research diary are prepared.

FINCA research has been approved by the Finnish ethics committees. In the thesis work the genetics, age and environment were standardized before the blood collection. Testing methods were controlled with intrasample conformity of different measurements. Continuity of measured values during the two month period of testing proved the methods sound and reliable. Quantitative results were compiled into numerical statistics to promote unambiguousness and comparativeness.

---

Keywords: blood cells, disease, haematology, animal models, genetic association studies

# SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	6
2	FINCA-TAUTI .....	7
2.1	FINCA/KO-hiirimalli .....	7
2.2	Veren poikkeavuudet.....	8
3	VERI JA HEMATOPOIEESI .....	9
3.1	Hemolyyysi ja hiiren pernan paino .....	10
3.2	Anemia .....	10
4	TARKOITUS JA TAVOITE.....	11
4.1	Tutkimuskysymys .....	11
4.2	Tutkimusasetelma .....	12
5	MENETELMÄT .....	14
5.1	Näytteenotto .....	14
5.2	Hematologiset perusmenetelmät.....	15
5.2.1	Hemoglobiinipitoisuus .....	15
5.2.2	Hematokriitti .....	16
5.2.3	Kammiolaskenta .....	17
5.2.4	Ohutsivelyvalmiste ja värjäys .....	18
5.2.5	Retikulosyyttivärjäys ja laskenta .....	19
5.2.6	Punasoluindeksit.....	20
5.2.7	Punasolujen kokojakauma .....	21
5.3	Pernan paino .....	22
5.4	Plasmanäytteet.....	22
6	TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET .....	23
6.1	Pätevyys ja eettisyys .....	24
6.2	Oppimistavoitteen toteutuminen .....	24
6.3	Laatutavoitteen toteutuminen .....	25
6.3.1	Luotettavuus .....	26
6.3.2	Laatupoikkeamat.....	27
7	POHDINTA.....	28
	LÄHTEET.....	30
	LIITTEET .....	33

# 1 JOHDANTO

Ihmispotilailla on tavattu harvinainen, aiemmin tuntematon, yhdistelmäheterotsygoottinen mutaatio NHL repeat containing 2 (*NHLRC2*)-geenissä, joka aiheuttaa vakavan sairauden, FINCA-taudin. FINCA:n oireisiin kuuluu myös krooninen hemolyyttinen anemia. Sairauden, geenimuunnoksen ja NHLRC2-proteiinin tutkimuksia varten on kehitetty hiirimalli. Hiirimallin *Nhlrc2*-geeni on muokattu vastaamaan ihmisessä tavattuja, sairautta aiheuttaneita mutaatioita. Tutkimusryhmä selvittää geenimuunnoksen ja proteiinin toimintaa sekä niiden vaikutusta ihmiseen. Sairauden tutkiminen mallieläimessä voi johtaa hoidollisten menetelmien kehittymiseen.

Villityypin ja FINCA-mallihiirten punasolujen vertailu voi osoittaa ilmeneekö *Nhlrc2*-geenin toimintahäiriö myös hiirten veressä. Tarkoitus on osoittaa tutkimusaineistolla joko punasolujen muuttamattomuus ryhmien välillä tai tarve lisätutkimuksille. Veressä ilmenevien muutosten lisätutkimukset eivät ole osa opinnäytetyötä, mutta mittausten sivutuotteena kerätään plasmanäyteaineisto, jota tutkimusryhmä voi hyödyntää jatkotutkimuksissa.

Opinnäytetyön mittauksissa käytetään hematologisia perusmenetelmiä, joilla tuotetaan määrällinen poikkileikkausaineisto. Ydinmenetelmiä tutkimuksissa ovat spektrofotometria, hematokriitin sentrifugointi kapillaarissa, mikroskopia, solulaskenta, sivelyvalmisteet, värjäystekniikat ja morfologinen tarkastelu. Tutkimusten edetessä tarkkaillaan näytteiden laatua ja annetaan ehdotuksia näytteenottoon, välineisiin ja säilytykseen sekä arvioidaan mittausten luotettavuutta, tutkimusasetelman pätevyyttä ja näytteiden tutkimuskelpoisuuden säilymistä. Mittausaineisto on merkityksellinen osa FINCA-taudin eläinmallitutkimusta, jonka tuloksen tutkimusryhmä voi liittää osaksi tulevia julkaisuja.

Opinnäytetyön oppimistavoitteet ovat hematologisen menetelmäopin tuntemuksen syventäminen sekä eläinmallitutkimukseen ja tutkimusyhteisössä työskentelyyn tutustuminen. Opinnäytetyön tietoperustan ydin on Acta Neuropathologicassa 2018 julkaistu artikkeli: NHLRC2 variants identified in patients with fibrosis, neurodegeneration, and cerebral angiomatosis (FINCA): characterisation of a novel cerebropulmonary disease. Mallieläintutkimusten menetelmäoppi perustuu pääosin Elsevierin the Laboratory Mouse ja Cold Spring Harbor Laboratory Pressin Mouse Hematology: A Laboratory Manual -kirjoihin.

## 2 FINCA-TAUTI

Oulun yliopiston lastenneurologian tutkimusryhmä on löytänyt uuden harvinaisen lasten hermorappeuma- ja monielintaudin, joka on nimetty FINCA-taudiksi. Se aiheuttaa potilailla keuhkofibroosia, keskushermoston rappeumaa ja aivojen verisuonituksen uudismuodostusta. Kaikille potilaille oli yhteistä myös hemolyyttinen anemia. FINCA-taudin vaikea muoto johtaa kuolemaan ennen kahta ikävuotta. (Uusimaa, Kaarteenaho, Paakkola, Tuominen, Karjalainen, Nadaf, Varilo, Uusi-Mäkelä, Suo-Palosaari, Pietilä, Hiltunen, Ruddock, Alanen, Biterova, Miinalainen, Salminen, Soininen, Manninen, Sormunen, Kaakinen, Vuolteenaho, Herva, Vieira, Dunder, Kokkonen, Moilanen, Rantala, Noguee, Majewski, Rämetsä, Hallman & Hinttala 2018.)

FINCA-taudin ihmispotilaat ovat yhdistelmäheterosygootteja *NHLRC2*-geenin osalta. FINCA-mutaatio on missense-pistemutaatio NHL repeat containing 2 (*NHLRC2*) -geenissä, joka aiheuttaa aminohappomuutoksen. Aminohappomuutos muuttaa proteiinin rakennetta. Ihmispotilailla toinen alleeli on sammunut, nonsense-mutaatio, joka aiheuttaa ennenaikaisen lopetuskodonin. FINCA-tutkimuksen tarkoitus on selvittää *NHLRC2*-proteiinin toimintaa ja sen yhteyttä FINCA-taudin syntyyn. (Uusimaa ym. 2018; Hiltunen, keskustelu 4.12.2019.) Myöhemmin proteiinin toiminnan tuntemuksesta voi olla apua myös yleisempien hermostorappeumatautiin tutkimuksessa, sillä *NHLRC2*-proteiinia on mm. esitetty Alzheimerin taudin biomarkkeriksi (Long, Pan, Ifeachor, Belshaw & Li 2016, viitattu 3.10.2018).

### 2.1 FINCA/KO-hiirimalli

FINCA-taudin *in vivo* -tutkimuksia varten on kehitetty hiirimalli. Hiirimallissa *Nhlrc2*-geeni on muokattu vastaamaan ihmispotilaiden mutaatioita: toinen alleeli on sammutettu eli KO (*knockout*) ja toinen alleeli on muokattu FINCA-mutaatiota vastaavaksi. Tutkimuksessa käytetään C57BL/6N-hiirikantaa. (Uusimaa ym. 2018; Hiltunen, keskustelu 19.1.2020.)

Hiirimalli tarkoittaa hiirikantaa, jolla tutkitaan ihmisen sairauksia tai oireita ja niiden estoa tai hoitoa. Villityypin hiiret ovat perimältään sellaisia, kuin ne olivat luonnosta löydettyinä, niiden geenit ovat muokkaamattomassa muodossa. (National Cancer Institute 2019, viitattu 15.1.2019.)

## 2.2 Veren poikkeavuudet

FINCA-mutaatiota ilmentävillä ihmispotilailla on varhain todettu krooninen hemolyyttinen anemia. Laboratoriotutkimuksissa havaittiin madaltunut veren hemoglobiini (69–95 g/L, viitearvo 100–136 g/L), madaltunut hematokriitti (0,19–0,26, viitearvo 0,31–0,42) ja retikulosytoosi (3,46–5,1 %, viitearvo 0,8–2 %). Lisäksi plasman tarkastelussa havaittiin bilirubiinien, hemoglobiinin ja maksaentsyymien pitoisuuksissa poikkeavuuksia. Morfologisessa analyysissä havaittiin anisosytoosia, makrosytoosia, mikrosytoosia, poikilosytoosia, polykromasiaa, hypokromiaa, ovalosyyttejä, sekä punasolukappaleita. (Uusimaa ym. 2018.)

### 3 VERI JA HEMATOPOIEESI

Veri on nestemäistä sidekudosta, joka koostuu soluista ja plasmasta. Veren punasolut eli erytrosyytit tuotetaan pääosin luuytimessä. Punasolut ovat veren soluista määrältään runsaimpia ja pitkäikäisimpiä. Punasolut ovat tumattomia ja niiden pääasiallinen tehtävä on kuljettaa happea. Punasolujen happea sitova proteiini, hemoglobiini, värjää veren punaiseksi. Punasolujen tuotantoa kutsutaan erytropoiesiksi ja verituotantoa hematopoiesiksi. Ihmisen punasolujen elinikä on 120 päivää. (Vipula & Atula 2018, 158–160.)

Plasma on veren nesteosa, joka voidaan erotella sentrifugoimalla verinäytettä. Se on kellertävä, miedon emäksinen ja koostuu vedestä (90 %), proteiineista (7–8 %), suoloista (1 %) sekä hivenaineista. Määrältään suurimmat proteiinit ovat albumiini, globuliini ja fibrinogeeni. Plasman proteiinit tuotetaan pääosin maksassa. Fibrinogeeni on olennainen osa veren hyytymisjärjestelmää. Plasma kuljettaa lämpöä, soluja ja aineita vapaina sekä proteiineihin sitoutuneina. Plasman proteiinit ja suolat puskuroivat muutoksia veren happamuudessa ja kooltaan suuret proteiinit albumiini ja globuliini säätelevät veren osmoottista painetta. Seerumi on plasmaa, josta hyytymisen ja sentrifugoinnin seurauksena on poistunut fibrinogeeni ja solut. (Vipula & Atula 2018, 158, 160.)

Verihiutaleet eli trombosyytit ovat tumattomia ja punasoluja pienempiä. Ne ovat epätarkkarajaisia (katso liite 3: kuvat 08–13) solulimaa sisältäviä megakaryosyytin kappaleita, joita tuotetaan luuytimessä. (McGarry, Protheroe & Lee 2010, 42.) Verihiutaleet ovat olennainen osa veren hyytymisjärjestelmää. Trombosyyttien elinikä ihmisellä on noin 3–7 päivää. (Vipula & Atula 2018, 160–161.)

Valkosolut eli leukosyytit ovat tumallisia, kudoksissa liikkuvia ja punasoluja suurempia soluja. Ne ovat lyhytikäisiä, vain 3–4 päivää eläviä soluja. Valkosolut ovat värittömiä ja niiden erotteluun mikroskopiaa varten käytetään organellien happamuuteen perustuvia värjäyksiä. Ihmisen valkosoluista yleisimpiä ovat granulotsyytit, joita on terveellä noin 70 % verenkierron valkosoluista. Lymfotsyyttejä on terveellä noin 30 % ja monotsyyttejä noin 6 %. Valkosolutuotantoa tapahtuu imusolmukkeissa, luuytimessä, pernassa ja kateenkorvassa. (Vipula & Atula 2018, 159–160.)

Hiiren valkosoluista 70–75 % on lymfotsyyttejä (katso liite 3: kuvat 15–22) ja 20–28 % on granulotsyyttejä (katso liite 3: kuvat 23–29). Monotsyyttejä (katso liite 3: kuvat 30–31) hiirellä on vain 2–6 % verenkierron valkosoluista. Nekroottisten varjosolujen ylimäärä (>5 % valkosoluista; katso liite 3:

kuvat 11–13 & 15; vertaa apoptoosi liite 3: kuva 14) voi viitata vialliseen menetelmään, hiirten tai hiirilinjan sairauteen tai hiirilinjan valkosolujen haurauteen (McGarry ym. 2010, 39–46.)

### **3.1 Hemolyysi ja hiiren pernan paino**

Kiihtyneessä punasolutuhoossa eli hemolyysissä ihmisen maksa ja perna avustavat punasolutuotannossa luuytimen ulkopuolisina eli ekstramedullaarisina kudoksina. Hemolyysissä hiiren ja ihmisen verenkuvat muuttuvat samalla tavalla. Elimistö pyrkii korvaamaan tuhoutumisesta johtuvan punasolukadon kiihdyttämällä punasolutuotantoa. Punasolujen koossa havaitaan suurempaa vaihtelua ja solujen sisältämän hemoglobiinin tiheys laskee. Punasolujen tavanomainen elinikä hiiren verenkierrossa on 30–52 päivää (vertaa ihmisen 120 päivää) ja hemolyytisessä sairaudessa punasolut tuhoutuvat huomattavasti aiemmin. (Bolliger Provencher & Everds 2012, 342.)

Poikkeuksena muihin lajeihin vähäinenkin hemolyysi saa hiiren pernan osallistumaan punasolutuotantoon johtaen elimen kasvuun. Pernal painon kasvua voidaan siis myös käyttää herkkänä mittarina hiiren punasolujen kiihtyneestä hajoamisesta. (Bolliger Provencher & Everds 2012, 342.)

### **3.2 Anemia**

Anemiat muuttavat punasoluihin liittyviä veriarvoja ja erytrosyyttien morfologiaa. Anemioissa veren hemoglobiini on madaltunut ja/tai punasoluja on riittämättömästi eli alhainen hematokriitti. (Vipula & Atula 2018, 268, 288.)

Hemolyytinen anemia kehittyy punasolujen tuhoutuessa nopeammin kuin verikudos kykenee uudistumaan ja kroonistuu anemiaa aiheuttavan sairauden pitkittyessä. Krooninen hemolyytinen anemia voi liittyä perinnölliseen ominaisuuteen, autoimmuunitautiin, myrkytykseen, luuytimen toimimattomuuteen, väärään verensiirtoon tai infektiin. (MedlinePlus 2019, viitattu 14.12.2019.)

Morfologisessa tarkastelussa hemolyytiseen anemiaan liitettäviä havaintoja ovat punasolujen ryhmittymisestä agglutinaatio eli kasaantuminen, muodonvaihtelusta punasolukappaleet, sferosyytit ja degmasytit, sekä inkluusiokappaleista Heinzin inkluusiot. Punasolujen koko ja koonvaihtelu voivat auttaa hemolyytisen anemian alkuperän arvioinnissa. Anemiaan viittaa myös sinertävä väri: polykromasia eli retikulosytoosi ja tumalliset punasolut. (Ford 2013.)



## 4 TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyön tarkoitus on osoittaa hiirimallissa samankaltaisia verenkuvan muutoksia kuin ihmispotilailla sekä kartoittaa tarvetta hiirimallin veren lisätutkimuksille. Mittausmenetelmien valinta perustuu laboratorioeläinlääketieteelliseen kirjallisuuteen sekä laboratorion perustyökalujen hyödyntämiseen ja luotettavuuteen.

Opinnäytetyön tavoitteena on luotettavasti mitata tutkimusryhmälle mutantin (FINCA-eläinmalli) ja villityypin (kontrolli) hiirten verenkuvista yhtäläisyys tai havaittava säännönmukainen ero. Mittausaineisto on merkityksellinen osa tutkimuskokonaisuutta ja tulevia tieteellisiä julkaisuja. Mittausten sivutuotteena kerättävä näyteaineisto jää tutkimusryhmän hyödynnettäväksi jatkotutkimuksiin.

Oppimistavoitteena on syventää hematologisten menetelmien tuntemusta ja laajentaa ammatillista osaamista tutkimusyhteisössä työskentelyyn ja mallieläintutkimuksen erityispiirteisiin. Opinnäytetyön laatutavoite on varmistua mittausten luotettavuudesta ja arvioida laadun säilymistä näytteenotosta analyysiin.

### 4.1 Tutkimuskysymys

Opinnäytetyön taustalla on ihmispotilaissa todettu hemolyyttinen anemia ja sen aiheuttamat muutokset hemoglobiiniin ja punasoluihin. Verinäytteiden tutkimuksilla pyritään vastaamaan kysymykseen: **onko FINCA-mutaatiolla vaikutusta hemoglobiiniin ja punasoluihin myös hiirimallilla?** Opinnäytetyö vastaa kysymykseen tuottamalla mittausaineiston villityypin kontrolli- ja FINCA/KO-hiirten hemoglobiinista ja punasoluista.

Hemolyyttinen anemia aiheutuu punasolujen ennenaikaisesta tuhoutumisesta (Terveyskirjasto 2018, viitattu 15.1.2019). Verisoluja ja hemoglobiinia eli verenkuvaa (Eskelinen 2016, viitattu 21.11.2019) mittaavalla tutkimusaineistolla voidaan osoittaa ero hiiriryhmien välillä. Valkosolut ja trombosyytit eivät ole osa opinnäytetyön verenkuvaa, sillä niissä ei havaittu muutoksia FINCA-tutkimuksessa (Uusimaa ym. 2018).

Sairausterminologia, kuten anemia, viittaa suuren populaation viitearvoihin. Mallieläintutkimuksessa tyypillisesti otokset ovat pieniä. Tästä syystä hiirten veriarvojen muutoksiin viitataan ilman sairausterminologiaa. (Bolliger Provencher & Everds 2012, 332.)

## 4.2 Tutkimusasetelma

Opinnäytetyölle valittiin luonnontieteille keskeinen määrällinen tutkimusote. Määrällisessä tutkimuksessa testataan aiempaan teoriaan perustuvaa hypoteesia mittausaineiston kautta (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 140). Opinnäytetyön perusjoukkoa (N=23) rajoitti hiirikannan koko ja tutkimusetiikan mukainen käyttö. Perusjoukko oli ensimmäinen riittävän kokoinen sukupolvi mallihiiriä. Perusjoukkoon kuului kuusi naarasta ja kuusi urosta FINCA/KO-ryhmästä sekä viisi naarasta ja kuusi urosta kontrolliryhmästä.

Opinnäytetyö tuotti poikkileikkausaineiston pienen, sisäsiittoisen hiirikannan mittaustuloksista. Tutkimusryhmä testaa tilastollisesti mittausaineistoa. Perusjoukkoon kuului kaksi ryhmää hiiriä, jotka eroavat perimältään vain muokatun *Nhlrc2*-geenin osalta. Hiiret olivat yhteisistä poikueista, 8kk ikäisiä ja eläneet yhteisessä ympäristössä. Yhteinen perimä, ympäristö ja ikä varmistavat kahden ryhmän näytteiden vertailukelpoisuuden ja FINCA-mutaation kausaalisuhteen. Tieto kunkin hiiriyksilön perimästä liitettiin mittauskokonaisuuteen vasta taulukoinnin yhteydessä, jolloin ennako-odotukset hiiriryhmien välisistä eroista eivät vaikuttaneet subjektiivisiin mittaustuloksiin.

Opinnäytetyö vastaa kysymykseen havaitaanko hiirimallissa veren kuvan riippuvuussuhdetta *Nhlrc2*-geenin FINCA-mutaatioon. Opinnäytetyön nollahypoteesi on, että hiirimallin kahden ryhmän välillä ei havaita eroa verenkuvassa. Vastahypoteesi on, että hiirimallien kahden ryhmän välillä on kiihtyneeseen hemolyyysiin viittaava ero verenkuvassa. Vastahypoteesin toteutuminen on yksi edellytys hiirimallin veren lisätutkimuksille, joihin valmistauduttiin keräämällä mittausten ohessa plasmanäyteaineisto.

Mittausaineiston muuttujiksi valittiin Uusimaan ym. (2018) mainitsevat ihmispotilaiden veren kuvan muutokset ja morfologia. Verenkuvaksi mitattiin kokonaihemoglobiini, punasolujen tilavuusosa sekä punasolujen ja retikulosyyttien määrät. Lisäksi laskettiin punasoluindeksi ja tarkasteltiin punasolujen muodonvaihtelua.

Mittaustulokset yhdistettiin tutkimusryhmän mittaamiin suhteellisiin pernan painoihin. Yksilökohtaisen, näytteensisäisten tulosten yhdenmukaisuutta vertailtiin mittausten laadun arvioimiseksi. Tutkimusten toistettavuuden varmistamiseksi menetelmiä valitessa ja testatessa sekä mittaustuloksia kerätessä pidettiin huolellista tutkimuspäiväkirjaa.

## 5 MENETELMÄT

Hiirellä on tehokas veren hyytymisjärjestelmä ja suuri määrä verihiutaleita. Hematologisten tutkimusten onnistumisen edellytyksenä on hyytymätön verinäyte (Bolliger Provencher & Everds 2012, 337). Antikoagulanttia valitessa huomioidaan veren käyttötarkoitus. Hepariini ja sitraatti aiheuttavat hiirellä verihiutaleiden kasaantumisen, lisäksi hepariini aiheuttaa häiriöitä värjäytymiseen ja sitraatti laimentaa näytettä. EDTA eli etyleenidiamiinitetraetikkahappo on paras vaihtoehto hematologiassa. (Bolliger Provencher & Everds 2012, 332; Eclinpath 2013, Sample collection, viitattu 17.11.2019.)

### 5.1 Näytteenotto

Näytteen preanalyttistä eli esianalyttistä laatua arvioitiin seuraamalla ja kommentoimalla näytteenottotilannetta ja näytteenottovälineitä. Laadun säilymistä analyysiin asti ja sen jälkeen arvioitiin esikokeella, jossa tutkimusotokseen kuulumattomista näytteistä tarkasteltiin menetelmien toimivuutta ja sivelyvalmisteiden säilymistä käsittelyssä.

Hiirten suonten pieni koko tekee verinäytteenotosta haastavaa. Kärsimyksen vähentämiseksi näytteenotto on järkevintä ja luotettavinta suorittaa lopetettaessa eläintä, jolloin näytettä saadaan tyyppillisesti noin 500 µl (Linden, Ward & Cherian 2012, 330–331). Näyte kerätään EDTA-mikroputkeen, joka on suunniteltu 500 µl näytteille.

Retro-orbitaalinäyte eli orbitaalipunktio on laskimoverinäytteenottotapa hiiren ja rotan silmäntakaisesta laskimopunoksesta. Näyte otetaan terminaalikeräyksenä, eli kuoleman yhteydessä, koe-eläinluvan mukaisessa anestesiassa. (Koe-eläinkeskus 2017, viitattu 15.1.2019.)

Retro-orbitaalinäytteenkeräyksessä käytetään neulan sijasta kapillaaria. Kapillaarien saatavuus EDTA-pinnoitettuna on huono ja Bolliger Provencher & Everds (2012, 332) varoittavat hepariini-kapillaarien aiheuttavan verihiutalekasoja. Tutkimusryhmän kanssa sovittiin, että pinnoittamattomista kapillaareista lasketaan läpi 0,25 mol/L EDTA-liuos juuri ennen näytteenottoa, jotta näyte saadaan luotettavasti ja kokonaisuudessaan kerättyä mikroputkeen analyysiä varten.

## 5.2 Hematologiset perusmenetelmät

Hiiren, kuten ihmisenkin, veren kuvan koneellinen analyysi on yleistä. Koneen suorittama määrällään suuri virtaussytometrinen laskenta tekee koneellisista tutkimuksista myös luotettavia (Linden ym. 2012, 331). Automaattiset solulaskurit ovat kuitenkin arvokkaita ja vähäisellä käytöllä ollut Oulun yliopiston hiirisolulaskuri on epäkunnossa, joten se ei ollut saatavilla tutkimuksiin.

Opinnäytetyössä käytettiin hematologisia perusmenetelmiä ilman koneellista laskentaa. Perusmenetelmiin tarvittavat välineet ja laitteet olivat saatavilla tutkimusryhmän laboratorioissa. Hematologiset perusmenetelmät ovat hemoglobiinin spektrofotometrinen mittaaminen, hematokriitin sentrifugointi, solujen laskenta kammiossa sekä sivelyvalmisteiden värjäys ja mikroskooppinen tarkastelu (Bolliger Provencher & Everds 2012, 333).

Perinteisten laboratoriomenetelmien käyttöä mittauksissa tutkimusryhmän laboratorioissa tuki myös geenitekniikkalaki (10.9.2004/847 §8), joka asettaa rajoituksia muuntogeenisten organismien siirtämiselle ja käsittelylle. Lain vaatima turvallisuuden arviointi on tehtävä siirrettäessä ja analysoidessa näytteitä. Tutkittava hiirilinja on rekisteröity kuulumaan geenitekniikalla muunnettujen organismien luokkaan 1 vaatien eristysluokan 1 (Hiltunen 2019a, sähköpostiviesti 17.1.2019).

### 5.2.1 Hemoglobiinipitoisuus

Uusimaa ym. (2018) totesivat ihmispotilailla matalan hemoglobiinipitoisuuden. Hemoglobiinipitoisuus tarkoittaa veren kokonaishemoglobiinia. Siihen kuuluu erittelemättä kaikki hemoglobiinityypit. Kokonaishemoglobiinin mittaaminen tapahtuu spektrofotometrisesti punasolulyysin jälkeen. Hemoglobiinipitoisuuden selvittäminen on tärkeää, sillä mittaaminen on luotettava ja hemolyysin yhteydessä hemoglobiinipitoisuuden muutokset tapahtuvat hiirellä nopeasti. Hemoglobiinipitoisuutta käytetään myös punasoluindeksien laskentaan. (Bolliger Provencher & Everds 2012, 335, 342.)

Hemoglobiinipitoisuus mitattiin tutkimusryhmän käytettävissä olevalla HemoCue Hb 201+-laitteella. Laitteella mitataan kertakäyttökyvetin läpi absorbanssi kahdella aallonpituudella; 570 nm ja 880 nm (HemoCue 2013, 2, viitattu 23.1.2019). Laite kalibroiti itsensä joka käyttökerralla. Laite kontrolloitiin

huoneenlämpöisellä kontrollilla käytön mukaan päivittäin (EuroTrolin valmistama HemoTrol-kontrolli, tasot 1, 2 ja 3). Kontrollien ja kyvettien valmistuseränumerot ja kontrollien tulokset kirjattiin tutkimuspäiväkirjaan.

EDTA-näytettä pipetoitiin puhtaalle foliolle pisara, josta täytettiin 10 µl näytekyvetti. Näytekyvetti on asetettava laitteeseen 10 minuutin kuluessa. Laite mittaa näytteen absorbanssit ja ilmoittaa hemoglobiinipitoisuuden 15–60 sekunnin kuluessa. (HemoCue 2013, 2, viitattu 23.1.2019.) Mittaustulokset kirjattiin välittömästi tutkimuspäiväkirjaan.

Mittaus ja kontrollointi uusitaan jos poikkeava arvo havaitaan kontrolloinnissa, mittauksessa tai veratessa hemoglobiinia yksilön hematokriittiin. Hemoglobiinin muutokset ovat yleensä samansuuntaisia hematokriitin kanssa (Eskelinen 2016, viitattu 21.11.2019).

### **5.2.2 Hematokriitti**

Uusimaan ym. (2018) sähköisessä lisämateriaalissa kaikkien kolmen potilaan hematokriitti eli veren punasolujen tilavuusosuus oli alle viitearvojen. Hiiren hematokriitti on samaa luokkaa kuin muillakin nisäkkäillä, sillä vaikka punasolut ovatkin pienempiä, on punasoluja runsaammin. Hemolyyssissä punasolujen kiihtynyt tuotanto kasvattaa veressä kiertävien punasolujen kokoa. (Bolliger Provencher & Everds 2012, 334, 342.)

Hematokriitin mittausta varten solut erotettiin plasmasta 75 µl mikrohematokriittikapillaarissa Clay-Adamsin vuoden 1963 mikrohematokriittisentrifugilla. Näyte sekoitettiin hyvin ennen kapillaarin täyttämistä. Kapillaarin pää painettiin tiivistevahaan kahdesti, joka muodostaa kapillaarin päähän nesteen pitävän tulpan. Solut pakattiin kapillaarin pohjalle sentrifugoimalla EDTA-kokoverta 5 minuuttia 11000–15000 RCF. Tulos luettiin laitteen mekaanisella hematokriittilukijalla, joka ilmoitti tuloksen prosentteina ilman laskentaa. (Clay-Adams 1963, 3, 7.) Tulos kirjattiin välittömästi tutkimuspäiväkirjaan.

Hematokriitin voi sentrifugoida myös tavallisessa sentrifugissa käyttämällä kapillaaria tukevaa putkisovitetta. Mikrohematokriitti pakkautuu sentrifugoimalla 5 minuutin ajan 1800 RCF:n voimassa. Nestesolupatsaan sekä verisolupatsaan pituudet mitataan viivaimella, joista voidaan laskea hematokriitti. (McGarry ym. 2010, 8–10.)

### 5.2.3 Kammiolaskenta

Punasoluindeksien ja retikulosyyttien absoluuttisen määrän laskenta edellyttävät tietoa punasolujen lukumäärästä veritilavuudessa. Ilman koneellista solulaskentaa on punasolujen määrä laskettava laskentakammiossa. Laskentakammio on mikroskopiassa käytettävä erikoislasi, jossa on mikroskooppinen ruudukko, jonka yläpuolinen tilavuus on tiedossa.

Laskemalla mikroskoopissa ruudukkoon jakautuneet, tietyssä tilavuudessa olevat solut, voidaan päätellä kokoveren solumäärä suuremmissakin tilavuuksissa. Menetelmän luotettavuus on huono, sillä tulokseen vaikuttaa ainakin näytteen epätasaisuus, pipetointi ja laimennos, tilastollinen virhe, peitinlasin asettelu ja kammio-tilavuus sekä näytemäärä kammiossa (Nexcelom 2019, viitattu 17.11.2019).

Tutkimusryhmällä on käytössä Neubauer-laskentakammiot. Laskentakammion peitinlasi asetetaan kammion laboratoriovedellä kostutettujen kannatteluharjanteiden päälle varovasti hieroen. Harjanteiden hiokepinnoissa tulee olla nähtävissä valon spektri. Lasi pysyy paikallaan koheesiolla, jolloin tilavuus kammion ja peitinlasin välissä on oikea. Puhtaisiin kammioihin pipetoidaan 5-10 µl hyvin sekoitettua punasolususpensiota. Kammion voi laittaa odottamaan mittausta petrimaljaan, jossa on kostea paperi pohjalla, jotta näyte ei kuivu kammioon. Näytteen punasolujen määrä RBC (*red blood cells*) lasketaan laimennos ja kammio-tilavuus huomioimalla (katso kaava 1).

Laskentaa varten kalibroitiin ja säädettiin omat pipetit. Punasolususpensio valmistettiin laimentamalla kokoverta 1:200, eli 5 µl kokoverta + 995 µl PBS (isotoninen fosfaattipuskuroitu natriumkloridiliuos) puhtaaseen 1,5 ml Eppendorf-putkeen. Kammioista laskettiin 400X-suurenoksella nurkkakeskiruudut ja keskimäinen keskiruutu, jolloin kahdesta kammioista laskettavien suurten ruutujen määrä oli 10 ja solujen määrä noin 2000 punasolua näytteestä. Laskenta kirjattiin välittömästi tutkimuspäiväkirjaan ja solujen lukumäärä veritilavuudessa (katso kaava 1) laskettiin taulukkolaskentaohjelmalla taulukoinnin yhteydessä.

*KAAVA 1. Punasolujen lukumäärä veritilavuudessa*

$$RBC (10^{12}/L) = \text{Lasketut punasolut} \times 50^9$$

## 5.2.4 Ohutsivelylvalmiste ja värjäys

FINCA-tutkimus osoitti ihmispotilailta olevan punasolujen muodonvaihtelua eli poikilosytoosia, ova-losytoosia ja punasolukappaleita verenkierrossa (Uusimaa ym. 2018). Hiirilläkin ilmenee punasolujen lisääntyntä muodonvaihtelua ja retikulosytoosia, jotka johtuvat punasoluihin vaikuttavasta taudista (McGarry ym. 2010, 41). Ohutsivelylvalmisteen mikroskooppinen tarkastelu on hematologisen arvion perusta (Bolliger Provencher & Everds 2012, 333).

Veren ohutsivelylvalmisteet kiinnitetään metanolilla ja värjätään tyypillisesti Romanowsky-värillä. Romanowsky-värjäyksessä metyleenisini sitoutuu happamiin rakenteisiin värjäten ne sini-violeteiksi ja hapan eosiini värjää emäksisiä rakenteita, kuten solulimaa punertavaksi. Tarkastelua ja säilymisen parantamista varten valmisteen päälle liimataan Pertex-ksyleeniliimalla peitinlasi. Näin valmistettu näyte säilyy valolta suojattuna tarkastelukelpoisena vuosia. (McGarry ym. 2010, 31.)

Punasolujen muotoa eli morfologiaa tarkastellaan Romanowsky-värjättyiltä sivelylvalmisteilta mikroskoopilla. Tutkimuksiin valittiin käytettäväksi Reagenan May-Grünwald-Giemsa -väri (myöhemmin MGG-väri) sen hyvän saatavuuden vuoksi. Giemsa-liuoksessa on Romanowsky-värien lisäksi atsuuriväri, joka syventää tuman väriä ja parantaa rakenteiden erottautumista (Reagena 2019, viitattu 16.11.2019). MGG-värjäys muuttaa punasolujen soluliman pinkki-punaiseksi ja retikulosyyttien happamat RNA-jäänteet solulimassa aiheuttavat sini-harmaata värjäytymistä (katso liite 3: kuvat 06–08, 12–13 & 19) (McGarry ym. 2010, 41).

MGG-värjäys on yleisesti käytössä suomalaisissa kliinisissä laboratorioissa punasolujen morfologian tarkastelussa, verisolujen erittelylaskennassa ja joidenkin kudosten histologisissa solueritteilyissä (Reagena 2019, viitattu 16.11.2019). Lasit valmistettiin myös mahdollisia jatkotutkimuksia varten, joten värin valintaan vaikutti myös näytelasien pitkä säilyvyys ja monikäyttöisyys opinnäytetyön jälkeenkin.

Hiiren punasolut ovat pienempiä kuin ihmisen ja vaikka hematokriitti onkin samaa luokkaa, hiiren veri hyytyy tehokkaammin ja on juoksevampaa. Sivelylvalmisteet tehtiin EDTA-verestä tehdaspuhtaille aluslaseille. Lasin päähän pipetoitiin pieni pisara verta ja näyte vedettiin vetolasilla aluslasille välittömästi. Sivelylvalmisteen annettiin kuivua 15–30 min vetokaapin lähes suljetun ikkunan alla. (McGarry ym. 2010, 27–28.) Kuivumisen jälkeen sivelylvalmisteita kiinnitettiin 40 minuuttia metanolissa.



Sivelyvalmisteet sovittiin värjättäväksi metanolikiinnityksen jälkeen Oulun ammattikorkeakoulun välineillä, liuoksilla ja tiloissa. Värjäyksessä käytettiin Reagenan MGG-kittivärjäysohjetta. Sivelyvalmisteiden värjäys kiinnityksen jälkeen tapahtui Reagenan ohjeen mukaan seuraavasti: 5 minuuttia laimennetussa May-Grünwald-liuoksessa, 12 minuuttia laimennetussa Giemsa-liuoksessa, 2 minuuttia puskuriliuoksessa, 5 minuuttia 2. puskuriliuoksessa, 2 minuuttia 3. puskuriliuoksessa ja kuivaus pystyasennossa huoneenlämmössä. Reagenan värjäysohje ja liuoslaskut liitettiin tutkimuspäiväkirjaan.

Kaikista näytteistä tehtiin punasolujen morfologinen tarkastelu. Morfologinen tarkastelu tehdään sivelyvalmisteesta alueelta, jossa punasolut ovat lähellä toisiaan, sivelyn häntäpäässä (Linden ym. 2012, 331). Morfologisessa tarkastelussa arvioidaan viittä ominaisuutta: 1) muotoa, 2) kokoa, 3) väriä, 4) inklusioita eli sisäisiä kappaleita ja 5) ryhmittymistä (Ford 2013).

### 5.2.5 Retikulosyyttivärjäys ja laskenta

Retikulosytoosi oli osa Uusimaan ym. (2018) ihmispotilaiden hemolyyttisen anemian oireita. Retikulosyytit ovat kookkaita epäkypsiä punasoluja, joissa on happamia jäänteitä hemoglobiinia tuottavasta RNA:sta. Laskentaa ennen verinäyte värjätään RNA:han sitoutuvalla ja sen sakkaavalla väriellä (katso liite 2: kuvat 01–05), jolloin retikulosyytit voidaan erotella normaaleista punasoluista luotettavasti mikroskopoimalla laskentakammiossa tai ohutsivelyvalmisteesta. Mikroskoopilla laskettaessa käytetään supravitaalivärjäystä esimerkiksi New Methylene Blue –väriellä. (Bolliger Provencher & Everds 2012, 336.)

Terveelläkin aikuisella hiirellä retikulosyyttien määrä on korkeampi kuin muilla lajeilla, johtuen punasolujen lyhemmästä eliniästä. Kohonnut retikulosyyttimäärä eli Ret (katso kaava 2) kertoo verikudoksen regeneraatiosta hemolyyssissä. (Bolliger Provencher & Everds 2012, 336, 342.)

*KAAVA 2: Retikulosyyttien määrä (Ecllinpath 2013, Absolute retic count, viitattu 17.11.2019.)*

$$Ret (10^9/L) = \text{Punasolujen määrä} (10^{12}/L) \times \frac{\text{Lasketut retikulosyytit}}{\text{Solut}_{\text{kaiikki}}} \times 1000, \text{ missä}$$

$$\text{Solut}_{\text{kaiikki}} = \text{Lasketut retikulosyytit} + \text{Lasketut punasolut}$$

Retikulosyytilaskennan ohjeen mukaan 1,5 ml Eppendorf-putkessa sekoitetaan hellävaraisesti vortexissa 2 tippaa väriä + 2 tippaa verta ja inkuboidaan 15–20 min huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen näyte sekoitetaan hellävaraisesti vortexissa ja tehdään sivelyvalmiste samaan tapaan kuin tavallinen ohutsivelyvalmiste. Peitinlasi liimataan kiinnityksen jälkeen Pertexillä. Laskenta tehdään vähintään 1000 punasoluun asti mikroskoopilla. (Ochei & Kolhatkar 2008, 314–315.)

Supravitaaliväri valmistettiin sekoittamalla 250 mg jauhemaista Merck Brilliant Cresyl Blue -väriä (CAS: 51716-96-2) 25 ml:aan 0,6 % natriumsitraattia sisältävään isotoniseen NaCl-liuokseen. Väriin metanoliliukoisuuden vuoksi 15–30 min kuivumisajan jälkeen näytteet kiinnitettiin 10 min 2-propanolissa.

Sivelyvalmisteista otettiin vakioitu fotomikrografia Oulun ammattikorkeakoulun tiloissa 1000X-suurennoksella ja laskettiin vähintään 2000 solua kustakin näytteestä ImageJ-ohjelmistolla paremman luotettavuuden saavuttamiseksi. Yhdellä kuvauskerralla kustakin näytteestä otettiin 25 vierekkäistä kuvaa vakioasetuksia käyttäen: polttoväli oli kiinteä, aukkoa säädettiin ainoastaan artefaktin vähentämiseksi tai erottelemiseksi, ja analyysivyöhyke valittiin noin 100X-kentän päästä sivelyvalmisteen häntäosan viuhkamaisesta laidasta, missä punasolut ovat lähellä toisiaan. Retikulosyytien määrä kirjattiin tutkimuspäiväkirjaan laskennan jälkeen, tulostaulukoinnin yhteydessä.

### 5.2.6 Punasoluindeksit

Uusimaan ym. (2018) mukaan FINCA-ihmispotilailla oli hemolyyttinen anemia. Hiirten hemolyyttiset muutokset pitäisi olla havaittavissa punasoluissa ja niiden laskennallisissa ominaisuuksissa jo muutaman päivän tai viimeistään viikkojen jälkeen oireiden alkamisesta. Kohonnut hemolyysi vaikuttaa erityisesti kahteen laskennalliseen ominaisuuteen (katso kaava 3 ja 4): punasolun keskitilavuus MCV (*mean corpuscular volume*) nousee ja punasolun keskihemoglobiinipitoisuus MCHC (*mean corpuscular haemoglobin concentration*) laskee. (Bolliger Provencher & Everds 2012, 342.) Punasoluindeksit kirjattiin tutkimuspäiväkirjaan tulostaulukkoon.

KAAVA 3. Punasolun keskitilavuus (Eclinpath 2013, MCV, viitattu 17.11.2019.)

$$MCV \text{ (fL)} = \frac{\text{Hematokriitti}}{\text{Punasolujen määrä (10}^{12}\text{/L)}} \times 10$$

KAAVA 4. Punasolun keskihemoglobiinipitoisuus (Eclinpath 2013, MCHC/CHCM, viitattu 17.11.2019.)

$$MCHC \text{ (g/L)} = \frac{\text{Hemoglobiini (g/L)}}{\text{Hematokriitti}} \times 100$$

### 5.2.7 Punasolujen kokojakauma

*NHLRC2*-mutaatiota ilmentävillä ihmispotilailla havaittiin punasolujen koon vaihtelua eli anisosytoosia (Uusimaa ym. 2018). Punasolujen koon vaihtelu on hiirillä suurempaa kuin muilla lajeilla, johon punasolujen lyhemmästä eliniästä ja epäkypsien punasolujen suuremmasta suhteellisesta määrästä verenkierrossa. Punasolujen kokojakauma voi kuitenkin hiirilläkin suurentua anemioissa. (O'Connell, Mikkola, Stepanek, Vernet, Hall, Sun, Yildirim, Staropoli, Lee & Brown 2015.)

Anisosytoosia eli punasolun koon vaihtelua kuvaa kliinisissä veritutkimuksissa RDW (*red cell distribution width*), joka on automaattisen solulaskurin tuottama tulos suuren solumäärän koon ja tilavuuden vaihtelusta. Opinnäytetyössä ei ollut käytettävissä automaattista solulaskuria. Mittausmenetelmäksi valittiin digitaalinen fotomikrografia Oulun ammattikorkeakoulun tiloissa 1000X-suurenokseilla ja tieteellinen kuva-analyysi ja mittaus ImageJ-ohjelmistolla ehjien punasolujen maksimihalkaisijasta (katso liite 3: kuvat 06–07). Mittaustuloksista laskettiin prosentteina ilmoitettava vaihtelu kaavan (5) mukaisesti. Laskennan tulos kirjattiin tutkimuspäiväkirjaan tulostaulukkoon.

KAAVA 5. Punasolujen koon vaihtelu (Eclinpath 2013, RDW, viitattu 17.11.2019.)

$$RDW \text{ (\%)} = \frac{\text{Mittaustulosten keskihajonta}}{\text{Mittaustulosten keskiarvo}} \times 100 \%$$

### 5.3 Pernal paino

Erythropoiesi tapahtuu hiirillä pääosin luuytimessä. Valtaosa hiiren luuytimestä osallistuu jatkuvasti hematopoiesiin. Johtuen ylimääräisen luuydinvaraston puutteesta hematologisessa kuormituksessa luuydin ei pysty lisäämään solutuotantoaan, joten hiiren perna avustaa verisolutuotannossa. Perna osallistuu vähäisesti terveekin hiiren punasolutuotantoon. Hiiren pernan paino on herkkä kiihtyneen punasolutuotannon mittari ja vähäinenkin hemolyysi saa pernan reagoimaan punasoluhukkaan lisäämällä soluisuuttaan ja punasolutuotantoaan. (Krinke & Weber 2012, 178; Bolliger Provencher & Everds 2012, 342.)

Perna on kokeneelle koe-eläintutkijalle luotettavasti poistettavissa oleva elin hiiren kudosteräyksessä, jolloin tutkija myös punnitsee sekä hiiren että pernan. Tutkimusryhmä suhteuttaa pernan painon hiiren painoon, jotta vertailussa pernan paino on vähemmän riippuvainen eläimen koosta. Tutkimusryhmä luovutti tiedon pernojen suhteellisista painoista mittausaineistoon. Pernal painon luotettava mitattavuus vahvisti sekä muiden mittausten yhdenmukaisuuden laadunarviointia että opinnäytetyön tulosta hiiriryhmien eroista. Pernojen suhteelliset painot kirjattiin tulostaulukkoon tulosten tarkastelun helpottamiseksi.

### 5.4 Plasmanäytteet

Mikäli hiiren verenkuvassa havaitaan hemolyyttisen sairauden merkkejä, on veritutkimusten syventäminen tarpeen. Näytteenoton yhteydessä hiiristä kerättiin ja pakastettiin plasmanäytteet, joita voidaan käyttää proteiinitutkimuksiin. Jatkotutkimukset eivät ole osa opinnäytetyötä. Tutkimuksia varten kerätystä verestä jäi vaihteleva määrä plasmaa mahdollisia jatkotutkimuksia varten. EDTA-plasmassa on jäljellä hyytymistekijät ja verihiutaleita (McGarry ym. 2010, 8).

Plasmanäytteet sentrifugoitiin kahdesti +4 °C:ssa, ennen ja jälkeen erottelun. Erottelu tehtiin ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen 500 µl Eppendorf-putkeen. Näytteet pakastettiin kaksivaiheisesti: jäädytys -20 °C pakastimessa, jonka jälkeen siirto pitkäaikaissäilytykseen -80 °C pakastimeen. Plasma ja seeruminäytteet säilyvät ainakin vuoden -70 °C pakastimessa lähes muuttumattomina (Cray, Rodriguez, Zaias & Altman 2009).

## 6 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön tavoite oli luotettava veren kuvan mittaus ja verenkuvan aineiston tuottaminen tutkimusryhmälle. Tutkimusmenetelmillä mitattiin verenkuvan 23 yksilöstä: 6 FINCA/KO-naarashiirestä ja 6 FINCA/KO-uroshiirestä sekä 6 villityypin kontrollinaarashiirestä ja 5 villityypin kontrolliuroshiirestä. Pernan suhteellinen paino kirjattiin 18 yksilöstä. Verinäytteistä otettiin verenkuvan eli mittaukset hemoglobiinista ja punasoluista.

Yhden näytteen käsittelyyn työjärjestyksen mukaisesti (katso liite 1) käytettiin aikaa noin 1h 20min välittömästi näytteenoton jälkeen. Lisäksi näytteestä kuvattiin 25 fotomikrografia vakioituilla: polttovälillä, valaistuksella, suurennoksella ja analyysivyöhykeen valinnalla Oulun ammattikorkeakoulun mikroskoopilla, joka vei noin 20 minuuttia ja solujen laskentaan meni kuvankäsittelyohjelmalla noin 30minuuttia. Yhteensä näytteen analyysiin kului aikaa vähintään 2h 30min aktiivista työskentelyä.

Opinnäytetyön tarkoitus oli osoittaa mittausaineistolla FINCA/KO-hiirimallin veren kuvan säännönmukaiset muutokset. Mittausaineisto on merkittävä osa tutkimuskokonaisuutta, sen avulla voidaan päätellä ilmeneekö *Nhlrc2*-geenin mutaatio hiiren veressä ihmispotilaissa havaitulla tavalla.

Mittausmenetelmien valinta perustui tutkimusryhmän julkaisuun (Uusimaa ym. 2018) *NHLRC2*-geenin mutaatioiden aiheuttamasta FINCA-taudista. Julkaisussa oli määritelty ihmisen verenkuvassa havaittuja muutoksia. Muutosten perusteella valittiin muuttujat määrälliseen mallieläimen veritutkimuskokonaisuuteen, josta tuotettiin poikkileikkausaineisto. Mallieläinkirjallisuuden perusteella hiiren pernan suhteellinen paino valittiin lisämuuttujaksi tutkimuskokonaisuuteen. Pernan suhteellista painoa voidaan käyttää kiihtyneen punasolutuhon ja punasoluregeneraation herkkänä mittarina (Bolliger Provencher & Everds 2012, 342). Kaikkiin muuttujiin saatiin tilastoanalyysikelpoinen vastaus.

Opinnäytetyössä tuotettua näyteaineistoa voidaan hyödyntää jatkotutkimuksissa, mikäli riippuvuussuhde FINCA-mutaation ja veriarvojen välillä osoitetaan tilastoanalyysissä. Mittausten lisäksi valmistettiin 23 plasmanäytettä. Mittausaineistosta jäi tutkimusryhmälle noin 50 supravitaalivärjättyä,

noin 50 MGG-värjättyä ja 23 värjäämätöntä, nimikoitua sivelyvalmistetta hyödynnettäväksi jatkotutkimuksiin. Värjättyt ja päällystetyt sivelyvalmisteet sekä pakastetut plasmanäytteet säilyvät pitkään käyttökelpoisina.

ImageJ-laskentaa ja mittausta varten otetuista fotomikrografeista syntyi 1,82 Gt kuva-aineistoa. Opinnäytetyön näyteaineisto, kuva-aineisto, mittausaineisto sekä tutkimuspäiväkirja on luovutettu tutkimusryhmälle analyysiä varten. Tutkimusryhmän pyynnöstä mittaustuloksia ei julkaista opinnäytetyön yhteydessä, vaan hyödynnetään aiemmin julkaisemattomana tutkimusryhmän tieteellisessä artikkelissa.

## **6.1 Pätevyys ja eettisyys**

Opinnäytetyön aineiston muuttajat valittiin tietoperustan ydinartikkelissa mainittujen verimuutosten perusteella. Muuttujiin lisättiin mallieläinlajikohtainen muuttuja, pernan paino, joka on herkkä indikaattori osoittamaan tutkittavaa muutosta ja tukee näytteensisäisellä yhdenmukaisuudella mittausmenetelmien luotettavuutta. Kohderyhmäksi valittiin perimältään tutkittavaa geeniä lukuun ottamatta homogeeninen ryhmä hiiriä, jotka olivat yhteisistä pesueista, saman ikäisiä ja eläneet yhteisessä ympäristössä. Näyteaineisto ja koeasetelma olivat sopivat tutkittavan ilmiön mittaamiselle.

Opinnäytetyössä mitattiin mallieläinnäytteitä, eikä sen yhteydessä käsitelty aiemmin julkaisemattomaa ihmistutkimustietoa. Laki koe-eläintoiminnasta (20.1.2006/62 8§) määrittelee Suomessa eläinkokeelle edellytykseksi mm. ihmisen sairauden määrittämisen. FINCA-tutkimuksella on eettiset hyväksynät hankelupalautakunnalta (ESAVI/5882/04.10.07/2014 ja ESAVI/5236/04.10.07/2016), joiden mukaan ”hankkeesta ihmisille, eläimille tai ympäristölle odotettavissa olevan hyödyn katsotaan olevan eettisesti hyväksyttävässä suhteessa eläimille hankkeessa aiheutuvaan haittaan”. Myös PPSHP:n alueellinen eettinen toimikunta on hyväksynyt tutkimuksen (EETTMK 51/2008).

## **6.2 Oppimistavoitteen toteutuminen**

Opinnäytetyön oppimistavoitteena oli hematologisen menetelmäopin tuntemuksen syventäminen ja ammatillisen osaamisen laajentaminen tutkimusyhteisön mallieläinten laboratoriotutkimuksiin. Oulun yliopiston ryhmä tutkii FINCA-sairautta hiirimallilla. Hiiren veren anatomiaan ja fysiologiaan

tutustuminen vaati perehtymistä kirjallisuuteen menetelmien valinnassa. Menetelmävalintaan vaikutti myös koneellisen verisolulaskurin puute ja saatavilla olevat hematologiset värit.

Hematologisen menetelmäopin tuntemus syveni Oulun yliopiston ja Oulun ammattikorkeakoulun kirjallisten- ja asiantuntijalähteiden käytössä menetelmäkokonaisuuden suunnittelussa. Perusmenetelmällä kymmenien tuhansien solujen laskenta kehitti mikroskopointinopeutta, -luotettavuutta ja -ergonomiaa. Ammatilliset valmiudet tutkimusyhteisössä ja mallieläintutkimuksen parissa kehittyivät työskentelyn yhteydessä. Mallieläinlajikohtainen tuntemus on erityisvaatimus eläinmallin veritutkimuksen suunnittelussa ja tuntemusta syvennettiin paneutumalla laboratorio- ja eläinlääketieteelliseen kirjallisuuteen. Laboratoriohiireen keskittyvää englanninkielistä kirjallisuutta on runsaasti.

Ammatillisen kehityksen ytimessä oli perehtyminen menetelmien perusteisiin, ammatillisen itsetunnon kohentuminen tietoperäisiä menetelmäsovelluksia ja -kokonaisuutta laadittaessa, sekä luottamus moniammatilliseen tukeen ja omaan asiantuntijuuteen. Tutkimusyhteisössä työskentelyyn vaaditaan omatoimisuutta, vahva tietopohja, keskeneräisyyden sietokyky sekä ratkaisulähtöinen ja utelias mielenlaatu. Tutkimuspäiväkirjan käyttö edisti ratkaisulähtöistä päättelyä tutkimuskokonaisuuden käyttöönotossa. Luottamus omaan asiantuntijuuteen ja moniammatilliseen yhteistyöhön parani ja työympäristö tuki kehitystä kaikilla ammatillisilla osa-alueilla.

### **6.3 Laatuavoitteen toteutuminen**

Opinnäytetyön laatuavoitteeksi asetettiin varmuus mittausten luotettavuudesta ja esianalytiikan laadunarviointi. Tutkimushiirten näytteenoton ohjeistus ja välineet perustuivat samasta hiirilinjasta otettujen hiirten näytteenottotilanteen ja näytteen laadun arviointiin tutkimuksissa käytetyillä tekniikoilla ja välineillä esikokeessa.

Verinäyte olisi voitu ottaa neulalla ja ruiskulla takaonttolaskimosta tai kapillaarilla silmäntakaisesta laskimopunoksesta (Koe-eläinkeskus 2017, viitattu 15.1.2019). Retro-orbitaalinäytteenottoon päädyttiin vähäisemmän hemolyysin, vähäisemmän sisäelinvaurion ja luotettavamman näytemäärän vuoksi. Hematologinen näytetyyppi edellytti EDTA-näyteputken käyttöä. Retro-orbitaalipunktiossa kokeiltiin puhdasta, 0,25 mol/L EDTA läpilaskettua sekä tehdasvalmisteista Li-hepariini-pinnoitettua kapillaaria. Parhaat tulokset saatiin EDTA-käsitellyllä kapillaarilla: näyte hyytyi puhtaaseen ka-

pillaariin estäen keräyksen sekä aiheuttaen hukkaa ja Li-hepariininäytteessä havaittiin rikkoontuneita soluja sekä trombosyyttikasoja. Näytteet suojattiin valolta jokaisessa vaiheessa ja solujen ja plasman erottelu tehtiin +4 °C lämpötilassa. Menetelmissä ei havaittu ohjeistuksen sopimisen jälkeen laatupoikkeamia koestusvaiheessa.

### **6.3.1 Luotettavuus**

Osittaisen verenkuvan ydinmittaukset olivat hemoglobiinin mittausta spektrofotometrisesti, hematokriitin sentrifugointi ja solulaskenta kammiossa. Hemoglobiininmittaukset kontrolloitiin, hematokriittitutkimus esitettiin ja kumpikin mittausta tuotti luottamusta herättäviä mittaustuloksia vaivattomasti. Näytteensisäisen yhdenmukaisuuden perustaksi valittiin luotettavat ja kontrolloidut hemoglobiinin ja hematokriitin mittaustulokset. Pinnan suhteellinen paino tuki yhdenmukaisuuden arviointia.

Käytetyt perinteiset laboratoriomenetelmät ovat vähemmän luotettavia ja subjektiivisempia kuin koneelliset menetelmät. Opinnäytetyössä vähennettiin subjektiivisuuden vaikutusta mittaustuloksiin salaamalla yksilöiden nimiä, kunnes mittaustulokset oli suoritettu sekä tarkastelemalla näytteen tulosten yhdenmukaisuutta perustuen luotettavuudeltaan parempiin, osittain koneellisiin mittaustuloksiin: hemoglobiini ja hematokriitti. Luotettavuutta heikensi myös kokemattomuus ja vanhemman laboratorioeläinlääketieteellisen asiantuntijan tuen puute.

Erityistä ammattitaitoa eniten vaatinutta mittausta, punasolujen morfologian tarkastelua, ei voida mitata koneellisesti. Oulun ammattikorkeakoululla on hyvä varasto hematologisiin menetelmiin sopivia värejä, joita käytettiin sekä supravitaali- että MGG-värjäyksessä. Opinnäytetyötä ohjaava opettaja ehdotti morfologian luotettavuuden parantamiseksi myös hematologin osallistamista tutkimustyöhön. Tutkimusryhmä arvioi hematologin tarpeellisuutta tilastoanalyysin ja morfologian esitarkastuksen perusteella.

Kammiolaskenta oli epäluotettavin käytetty menetelmä. Luotettavuutta parannettiin etukäteen harjoittelemalla kammiolaskentaa koneellisesti lasketulla ihmisverellä ja kalibroimalla ja säätämällä suspension valmistukseen käytetyt pipetit. Lasketut solumäärät olivat yhdenmukaisia hemoglobiinin ja hematokriitin kanssa. Tutkimusten aikana ei jouduttu toistamaan yhtään kammiolaskentaa



perustuen mittausarvojen epäyhdenmukaisuuteen. Yhden näytteen osalta mitattiin uudelleen hemoglobiini, mutta siinäkin tapauksessa uusintamittaus varmisti aiemman tuloksen ja hematokriitti tuki tuloksen oikeellisuutta.

Mittauskerrat jakaantuivat kahden kuukauden ajalle ja aikaan liittyviä muutoksia tuloksiin ei havaittu. Jatkuvuus mittaustuloksissa siis säilyi samankaltaisena läpi mittausten. Mittaustulokset taulukoitiin yksiselitteisyyden ja vertailun helpottamiseksi. Taulukko toimitettiin tutkimusryhmälle sähköisesti mittausarvoineen ja yhteenveto kopioitiin tutkimuspäiväkirjaan liitteeksi. Tulokset mittauksista valmistuivat luotettavasti ja ajallaan.

### **6.3.2 Laatupoikkeamat**

Mittausmenetelmien ohessa valmistettiin plasmanäytepakasteet. Näytteet olivat vaihtelevasti hie-man hemolyyttisiä. Arviot hemolyysistä kirjattiin tutkimuspäiväkirjaan. Näytteenottotekniikoiden arviointi ja valinta eivät vaikuttaneet hemolyysin määrään. Analyysivaiheeseen tehdyt muutokset eivät myöskään vähentäneet hemolyysia.

EDTA-käsitelty näytteenottokapillaari tuotti vähemmän hyytymiä sivelyvalmisteisiin kuin käsittelemätön tai Li-hepariini-kapillaari. Sivelyvalmisteissa havaittiin runsaasti varjosoluja kaikissa sivelyvalmisteen vyöhykkeissä (noin 56 % valkosoluista, katso liite 3: kuvat 11–13 & 15), jotka todennäköisesti johtuivat hiirilinjan valkosolujen hauraudesta, näytteenottotekniikasta tai vesipitoisesta kiinnitysmetanolista.

Vesipeiliartefakta supravitaalivärjättyissä sivelyvalmisteissa edellytti laskijalta tarkkuutta, sillä vesipeili (katso liite 2: kuvat 04 & 05) voi näyttää erehdyttävästi sakkaantuneelta RNA:lta. Supravitaalivärjättyjen sivelyvalmisteiden kiinnitys oli ongelmallista: metanolikiinnitys vei värin soluista ja 2-propanoli ei kiinnittänyt kunnolla, mutta oli silti parempi vaihtoehto ja siksi valittiin menetelmään. Vesipeilin ja sakatun RNA:n sävyeroista johtuen laskenta pystyttiin kuitenkin luotettavasti suorittamaan.

## 7 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoite oli villityypin ja mutantin hiiren verenkuvien luotettava mittaaminen. Tavoitteen saavuttamiseksi käytettiin menetelmänvalinnassa runsaasti kirjallisuutta mallieläinlääketieteen ja laboratoriolääketieteen hematologisten perusmenetelmien aihepiireistä. Opinnäytetyö tuotti analyysikelpoisen, luotettavan määrällisen poikkileikkausaineiston kaikista suunnitelluista muuttujista sekä tutkimuspäiväkirjan. Tutkimuspäiväkirjan käyttö ja ajallaan tehdyt kirjaukset havainnoista ja päätöksenteosta perusteluineen tukivat kirjallisen raportin tuottamista. Määrällinen opinnäytetyö sai toiminnallisia piirteitä suunnitteluvaiheessa johtuen menetelmien monimuotoisuudesta ja kirjallisessa vaiheessa johtuen mittaustulosten liittämistä työryhmän uuteen tieteelliseen julkaisuun.

Opinnäytetyöskentely Oulun yliopiston lastenneurologian tutkimusryhmässä syvensi laboratoriolääketieteen tuntemusta sekä edisti ammatillisia valmiuksia työskennellä moniammatillisessa tutkimusryhmässä ja tutkimuslaboratoriossa. Hematologian ja laboratoriomenetelmien tuntemusta syvennettiin kirjallisuuteen perehtymällä sekä haastatteleamalla Oulun ammattikorkeakoulun opettajia ja tutkimusryhmän työntekijöitä tutkimuskokonaisuuden suunnittelun ja koestamisen yhteydessä. Yhteistyö Oulun ammattikorkeakoulun ja Oulun yliopiston tutkijoiden kanssa sujui hyvin ja bioanalytiikan asiantuntijuutta haastettiin, mutta myös arvostettiin monessa työn vaiheessa. Kaikki osapuolet olivat tyytyväisiä yhteistyöhön, tuloksiin ja tuotoksiin.

Mittaustulosten tilastollinen analyysi voi osoittaa riippuvuuden *Nhlrc2*-mutaation ja verenkuvan muutosten välillä. Jos riippuvuussuhde löytyy voi olla syytä tarkastella hiiren pernan, maksan ja luuytimen soluisuutta histologisesta näytteestä sekä plasman proteiineja. Mikäli riippuvuussuhdetta ei löydy ja ryhmien verenkuvissa ei ole merkitsevää eroa, herää ajatus ihmisen punasolujen ekstravaskulaarisesta tuhosta, mahdollisesti liittyen mononukleaarisen fagosyyttijärjestelmän virheelliseen toimintaan, sekä ihmisen ja hiiren fysiologisista eroista. Pernal suhteellisen painon pitäisi myös olla herkkä indikaattori pitkittyneen hemolyysin yhteydessä tapahtuvasta regeneraatiosta, joten hiirimallin pernojen punnitseminen on aiheellista tulevaisakin hiirimallitutkimuksen vaiheissa.

Laatupoikkeamia havaittiin tutkimusten edetessä. Lähes kaikki hiirinäytteet olivat miedon hemolyttisiä ja hemolyysin syy jäi epäselväksi. Hemolyysi haittaa opinnäytetyön jälkeisiä plasman tutkimuksia sellaisten aineiden ja proteiinien osalta, joiden pitoisuudessa on eroa solunsisäisesti ver-

rattuna plasmaan. Hemolyysi ei häirinnyt opinnäytetyön hemoglobiinimittausta. Varjosolujen aikaisemalla havainnoinnilla olisi voitu varmistua niiden alkuperästä ja merkityksestä tutkimuskokonaisuudelle. Varjosolut vähentävät opinnäytetyön jälkeen tehtävän sivelyvalmisteen valkosolujen erittelylaskennan luotettavuutta. Menetelmäaikataulun paremmalla suunnittelulla olisi supravitaalivärjätyt retikulosyyttinäytteet voitu laskea kammiossa välittömästi näytteenoton jälkeen, jolloin näytteestä ei olisi säilynyt sivelyvalmistetta tai kuva-aineistoa, mutta vesipeiliartefakta ei olisi vaikeuttanut laskentaa.

Opinnäytetyön laajuus ylitti odotukset. Verta voidaan yhä tutkia hematologisilla perusmenetelmillä ja aiheesta on tuotettu ajan saatossa runsaasti kirjallisuutta. Kirjallisista lähteistä poimittujen menetelmien yhdistäminen tutkimuskokonaisuudeksi oli antoisa ja haastava tehtävä. Perinteisten laboratoriomenetelmien kokonaisuuden valinnassa ja käyttöönotossa väriliuokset, kiinnitystestaukset ja muut yksityiskohdat veivät odotettua enemmän aikaa. Perusmenetelmällä kymmenien tuhansien solujen laskenta ilman koneellista solulaskuria kehitti mikroskopointinopeutta, -luotettavuutta ja -ergonomiaa.

Työtä olisi voinut laajentaa jakamalla työn osa-alueisiin kahden tai useamman opinnäytetyöskentelijän kesken. Menetelmien valinnoista voisi tuottaa toiminnallisen opinnäytetyön, jossa ratkaistaisiin koestuksilla myös laatupoikkeamien synty ja merkitys. Opinnäytetyötä ohjaava opettajakin huomioi kuva-aineiston käytettävyyden erillisenä solukuvastojulkaisuna. Sivelyvalmisteita tai kuva-aineistoa on mahdollista hyödyntää solukuvastojulkaisuun myöhemminkin ja MGG-värjätyt näytteet säilyvät pitkään. Analyysin yhteydessä eroteltua plasmaa voidaan hyödyntää erillisessä plasman proteiineihin keskittyvässä tutkielmassa. Opinnäytetyön mittausaineisto voi tukea päätöksentekoa histologisten jatkotutkimusten teettämiseksi.

## LÄHTEET

Bolliger Provencher, A. & Everds, N. 2012. Haematology of the Mouse. Teoksessa Hedrich, H. J. (toim.) The Laboratory Mouse. Second Edition. London: Academic Press, 331-347.

Clay-Adams 1963. Instructions. Adams MECHANICAL MICRO-HEMATOCRIT READER A-2970. (ei julkaisupaikkaa.)

Cray, C., Rodriguez, M., Zaias, J. & Altman, N. H. 2009. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. Journal for the American Association for Laboratory Animal Science, 48 (2), 202-204.

Eclinpath 2013. Hematology. Cornell University College of Veterinary Medicine. Viitattu 17.11.2019, <http://eclinpath.com/hematology/>.

Eskelinen, S. 2016. Perusverenkuva (B-PVKT, PVK+T). Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 21.11.2019, [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=snk03030](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03030).

Ford, J. 2013. Red blood cell morphology. International Journal of Laboratory Hematology, 35 (3), 351-357.

Geenitekniikkalaki 10.9.2004/847.

HemoCue 2013. HemoCue Hb 201+ System. Viitattu 23.1.2019, [https://www.hemocue.us/-/media/hemocue-images/hemocue\\_us-images/pdf/hemoglobin--lit1056--hb-201product-sheet.pdf?la=en-US&la=en-US](https://www.hemocue.us/-/media/hemocue-images/hemocue_us-images/pdf/hemoglobin--lit1056--hb-201product-sheet.pdf?la=en-US&la=en-US).

Hiltunen, A. E. 2019a. Koe-eläinlupakopio. Tohtorikoulutettava, Oulun yliopisto, PEDEGO tutkimusyksikkö, Lastenneurologian tutkimusryhmä. Sähköpostiviesti 17.1.2019.

Hiltunen, A. E. 2019b. Tohtorikoulutettava, Oulun yliopisto, PEDEGO tutkimusyksikkö, Lastenneurologian tutkimusryhmä. Keskustelu 4.12.2019.

Hiltunen, A. E. 2020. Tohtorikoulutettava, Oulun yliopisto, PEDEGO tutkimusyksikkö, Lastenneurologian tutkimusryhmä. Keskustelu 19.2.2020.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Koe-eläin keskus 2017. Verinäytteet. Oulun yliopisto. Viitattu 15.1.2019, <https://www.oulu.fi/keks/node/13641>.

Krinke, G. J., & Weber K. 2012. Histology. Teoksessa Hedrich, H. J. (toim.) The Laboratory Mouse. Second Edition. London: Academic Press, 161-192.

Laki koe-eläintoiminnasta 20.1.2006/62.

Linden, M., Ward, J. M. & Cherian, S. 2012. Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Teoksessa Treuting P. M., Dintzis S. M., Frevert C. W., Liggitt D. & Montine K. S. (toim.) Comparative Anatomy and Histology. A Mouse and Human Atlas. London: Academic Press, 309-338.

Long, J., Pan, G., Ifeachor, E., Belshaw, R. & Li, X. 2016. Discovery of Novel Biomarkers for Alzheimer's Disease from Blood. Disease markers, vol. 2016. Viitattu 03.10.2018, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4250480>.

McGarry, M. P., Protheroe C. A. & Lee J. J. 2010. Mouse Hematology: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

MedlinePlus 2019. Hemolytic anemia. Viitattu 14.12.2019, <https://medlineplus.gov/ency/article/000571.htm>.

National Cancer Institute 2019. NCI Dictionary of Cancer Terms. Viitattu 15.1.2019, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/mouse-model>.

Nexcelom 2019. Sources of Hemacytometer Counting Errors. Viitattu 17.11.2019, <https://www.nexcelom.com/applications/cellometer/cell-counting/counting-errors/>.

Ochei, J. & Kolhatkar, A. 2008. Medical Laboratory Science, Theory and Practice. 10. uusintapainos. New Delhi: Tata McGraw-Hill.

O'Connell, K. E., Mikkola, A. M., Stepanek, A. M., Vernet, A., Hall, C. D., Sun, C. C., Yildirim, E., Staropoli, J. F., Lee, J. T. & Brown, D. E. 2015. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comparative medicine*, 65 (2), 96–113.

Reagenat 2019. Hematologian värjäysliuokset ja reagenssit. Viitattu 16.11.2019, <https://www.reagenat.com/fi/tuotteet/diagnostiikka/varjaysliuokset/hematologia/#MGG>.

Terveyskirjasto 2018. Lääketieteen sanasto. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 15.1.2019, [https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p\\_teos=ltt](https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_teos=ltt).

Uusimaa, J., Kaarteenaho, R., Paakkola, T., Tuominen, H., Karjalainen, M. K., Nadaf, J., Varilo, T., Uusi-Mäkelä, M., Suo-Palosaari, M., Pietilä, I., Hiltunen, A. E., Ruddock, L., Alanen, H., Biterova, E., Miinalainen, I., Salminen, A., Soininen, R., Manninen, A., Sormunen, R., Kaakinen, M., Vuolteenaho, R., Herva, R., Vieira, P., Dunder, T., Kokkonen, H., Moilanen, J. S., Rantala, H., Noguee, L. M., Majewski, J., Rämetsä, M., Hallman, M. & Hinttala, R. 2018. *NHLRC2* variants in patients with fibrosis, neurodegeneration, and cerebral angiomas (FINCA): characterisation of a novel cerebro-pulmonary disease. *Acta Neuropathol* 135 (5), 727-742.

Vipula & Atula 2018. Human Anatomy and Physiology : For Undergraduate Students of Pharmacy, Nursing, Physiotherapy and Other Paramedical Sciences. First edition. New Delhi: University Science Press.

## LIITTEET

LIITE 1	TYÖJÄRJESTYS.....	34
LIITE 2	SUPRAVITAALISOLUKUVASTO .....	35
	Punasolujen värjätyt RNA-jäänteet.....	36
LIITE 3	MAY-GRÜNWARD-GIEMSA-SOLUKUVASTO.....	37
	Punasolut, verihiutaleet ja varjosolu .....	38
	Nekroosi, apoptoosi ja lymfosyytit .....	39
	Lymfosyytit ja neutrofiili .....	40
	Neutrofiiliset ja eosinofiiliset granulositytit .....	41
	Monosyytit .....	42

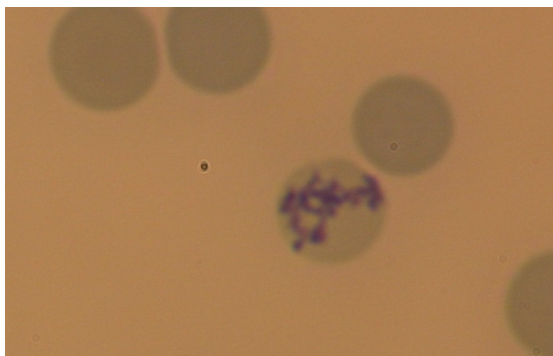
5-10min	Laita näytteet keinutukseen
100µl	Erottele analysoitava näyte Valmistele supravitaalieppendorf-putket
10µl	Kalibroi ja kontrolloi Hemocue kirjaa tulokset tutkimuspäiväkirjaan sivu 16 Mittaa hemoglobiini
75µl 5min	Täytä hematokriittikapillaari Sentrifugoi hematokriitti
10µl + 10µl 20min	Annostele väriä ja verta värjäysputkiin inkuboi
15-30min	Valmista, merkitse ja <i>kuivaa</i> verisivelyt 3 kokoverta 2 supravitaalia
10min +4 °C 2000RCF	Valmista kammiolaskentasuspensiot Sentrifugoi kokoveri erottele plasma 500µl eppendorf-putkiin
10min +4 °C 2000RCF -20 °C	Sentrifugoi plasma pakasta
10min 40min	Kiinnitä supravitaalisivelyt 2-propanolissa <b>Kiinnitä kokoverisivelyt metanolissa</b>
	<b>Laske kammiot</b>



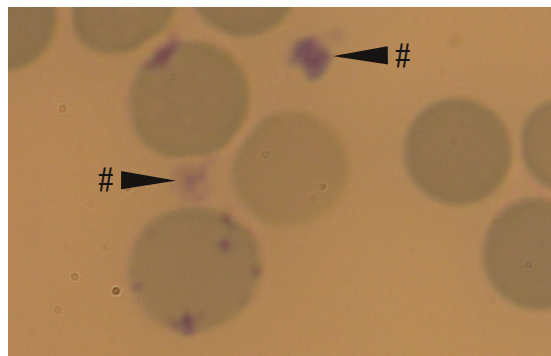
Merckin Brilliant Cresyl Blue (CAS:51716-96-2) -supravitaalivärjätty sivelyvalmisteet.

PUNASOLUJEN VÄRJÄTYT RNA-JÄÄNTEET..... 36

- 01 Retikulosyytti
- 02 Retikulosyytti ja trombosyyttejä
- 03 Retikulosyyttejä ja trombosyyttikasa
- 04 Retikulosyyttejä ja vesipeiliartefaktaa
- 05 Retikulosyytti ja voimakasta vesipeiliartefaktaa

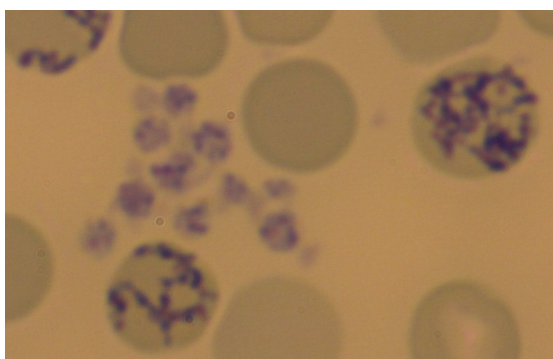


KUVA 01. Retikulosyytti

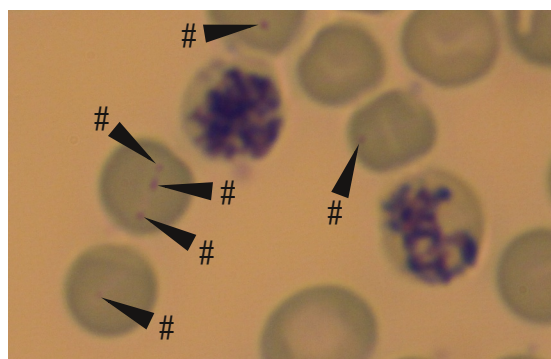


KUVA 02. Retikulosyytti

# trombosyyttejä

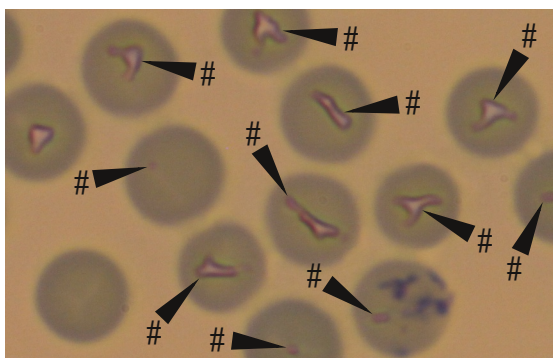


KUVA 03. Retikulosyyttejä ja trombosyyttikasa



KUVA 04. Retikulosyyttejä

# vesipeiliartefaktaa

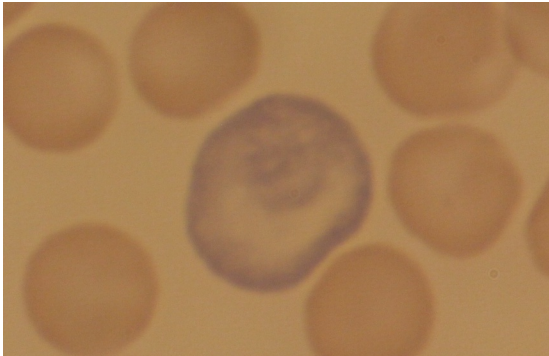


KUVA 05. Retikulosyytti

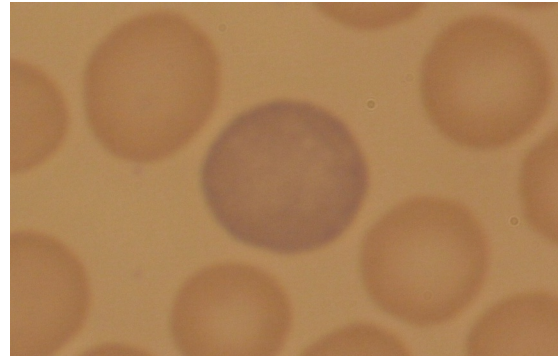
# voimakasta vesipeiliartefaktaa

Reagenan May-Grünwald-Giemsa-värjätyt sivelyvalmisteet.

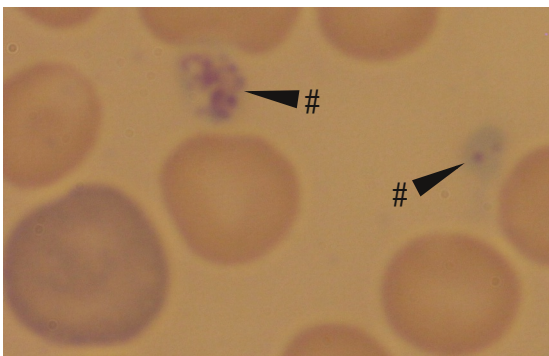
PUNASOLUT, VERIHIUTALEET JA VARJOSOLU.....	38
06    Suuri polykromaattinen erytrosyytti (retikulosyytti)	
07    Polykromaattinen erytrosyytti (retikulosyytti)	
08    Polykromaattinen erytrosyytti (retikulosyytti)	
09    Trombosyyttikasa ja ekinosyyttejä	
10    Suuri trombosyytti	
11    Varjosolu (nekroottinen valkosolu) ja ekinosyyttejä	
NEKROOSI, APOPTOOSI JA LYMFOSYYTIT.....	39
12    Varjosolu (nekroottinen valkosolu)	
13    Varjosolu (nekroottinen valkosolu)	
14    Apoptoottinen valkosolu	
15-17  Lymfosyytti	
LYMFOSYYTIT JA NEUTROFIILI.....	40
18-22  Lymfosyytti	
23    Neutrofiilinen granulosyytti	
NEUTROFIILISET JA EOSINOFIILISET GRANULOSYYTIT.....	41
24-27  Neutrofiilinen granulosyytti	
28-29  Eosinofiilinen granulosyytti	
MONOSYYTIT .....	42
30-31  Monosyytti	



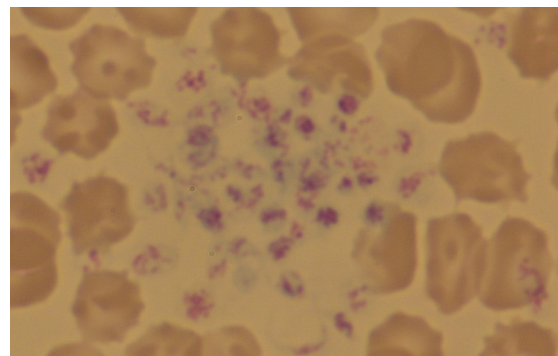
KUVA 06. Suuri polykromaattinen erytrosyytti erytrosyyttien koonvaihtelua



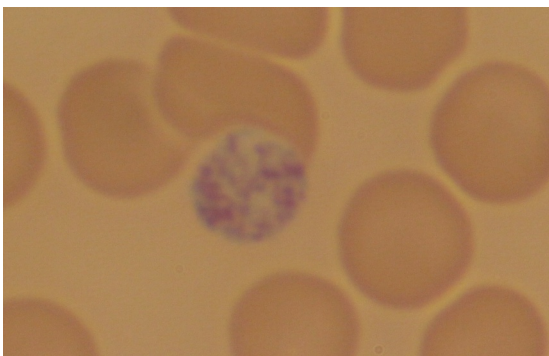
KUVA 07. Polykromaattinen erytrosyytti erytrosyyttien koonvaihtelua



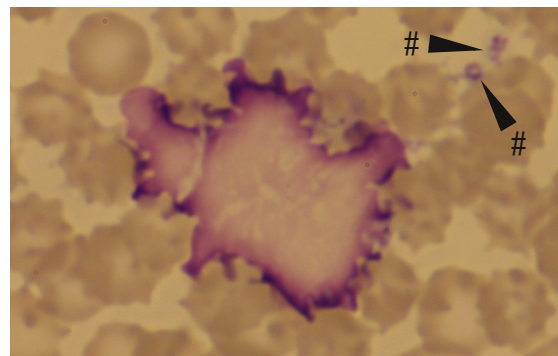
KUVA 08. Polykromaattinen erytrosyytti  
# trombosyyttejä



KUVA 09. Trombosyyttikasa ja ekinosyyttejä

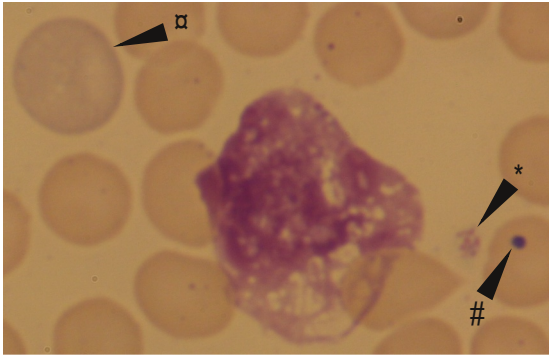


KUVA 10. Suuri trombosyytti



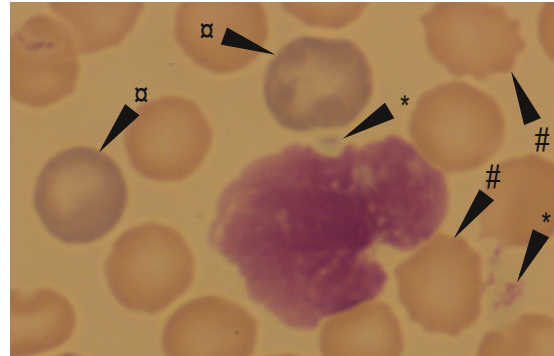
KUVA 11. Varjosolu ja ekinosyyttejä  
# trombosyyttejä





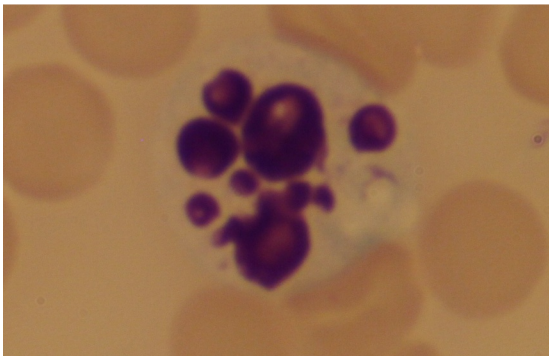
KUVA 12. Varjosolu

- # polykromaattinen erytrosyytti
- Howell-Jolly-inklusio
- \* trombosyytti

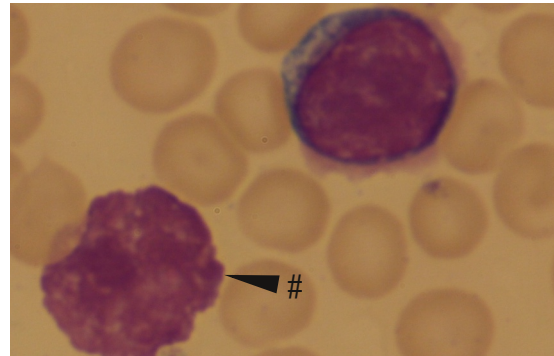


KUVA 13. Varjosolu

- # ekinosyyttejä
- polykromaattisia erytrosyyttejä
- \* trombosyyttejä

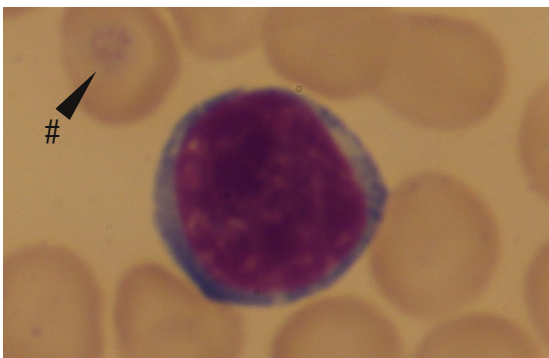


KUVA 14. Apoptoottinen valkosolu



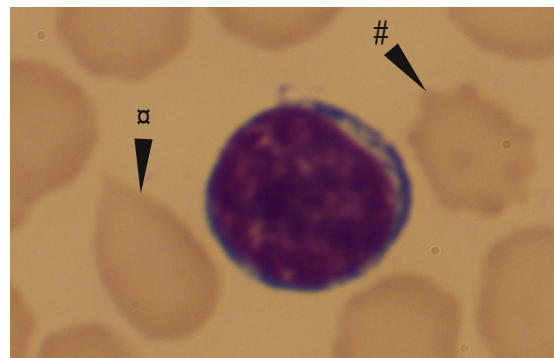
KUVA 15. Lymfosit

- # varjosolu



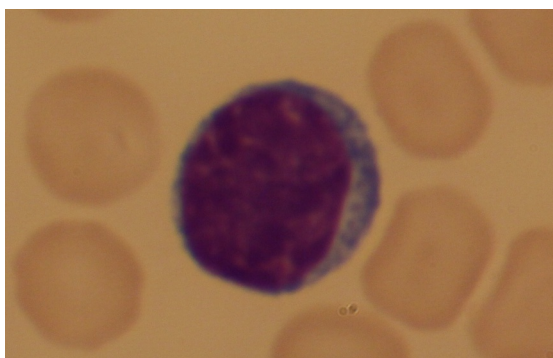
KUVA 16. Lymfosit

- # trombosyytti

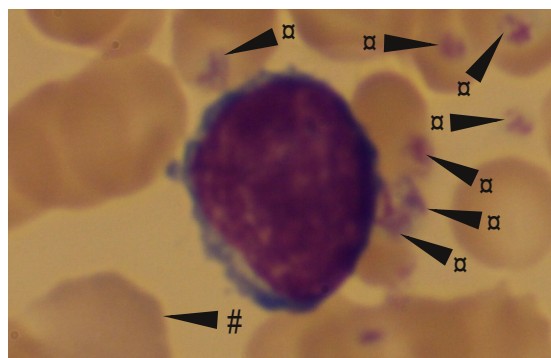


KUVA 17. Lymfosit

- # ekinosyytti
- pisarasolu

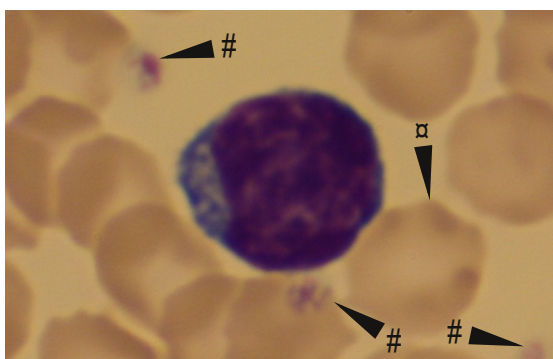


KUVA 18. Lymfosyytti



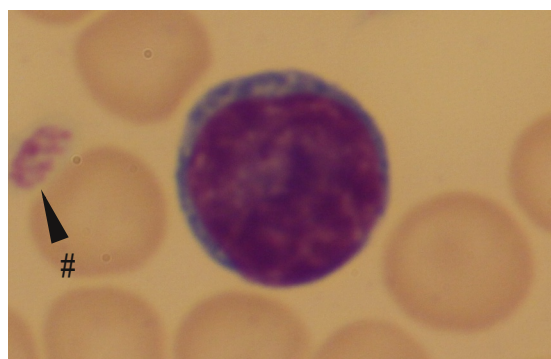
KUVA 19. Lymfosyytti

- # polykromaattinen erytrosyytti
- α trombosyyttejä



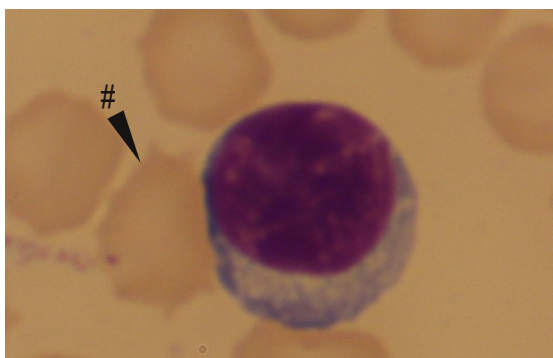
KUVA 20. Lymfosyytti

- # trombosyyttejä
- α ekinosyytti



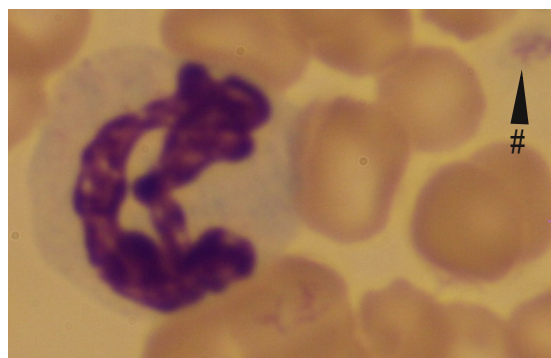
KUVA 21. Lymfosyytti

- # trombosyytti



KUVA 22. Lymfosyytti

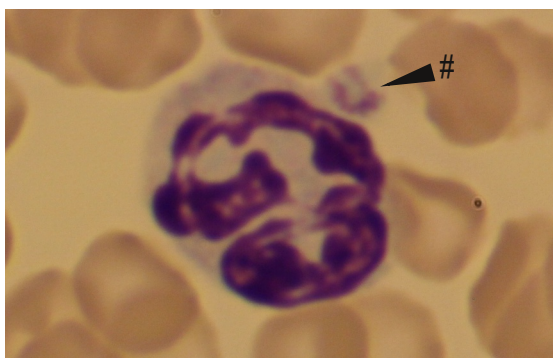
- # ekinosyytti



KUVA 23. Neutrofiilinen granulosyytti

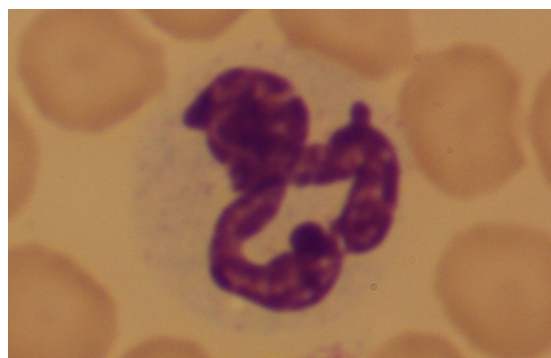
- # trombosyytti





KUVA 24. Neutrofiilinen granulositytti

# trombositytti

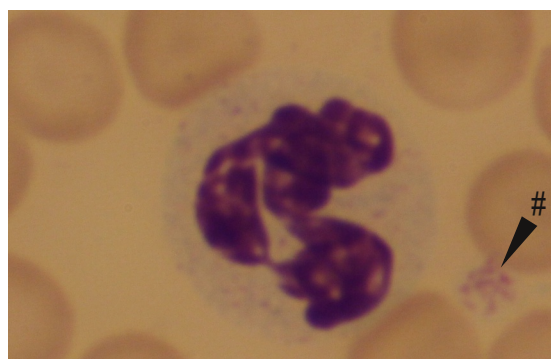


KUVA 25. Neutrofiilinen granulositytti



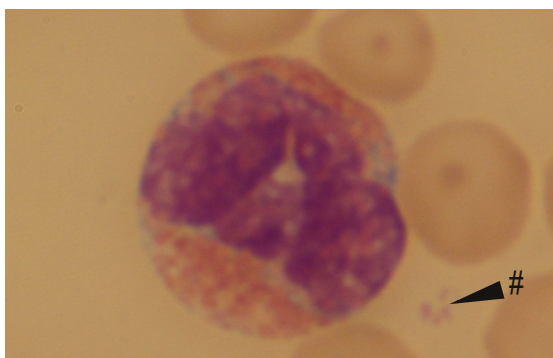
KUVA 26. Neutrofiilinen granulositytti

# trombositytti



KUVA 27. Neutrofiilinen granulositytti

# trombositytti



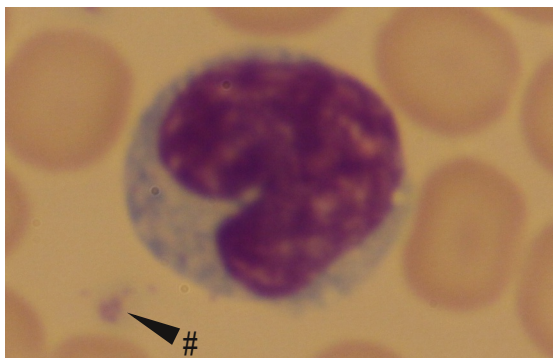
KUVA 28. Eosinofiilinen granulositytti

# trombositytti

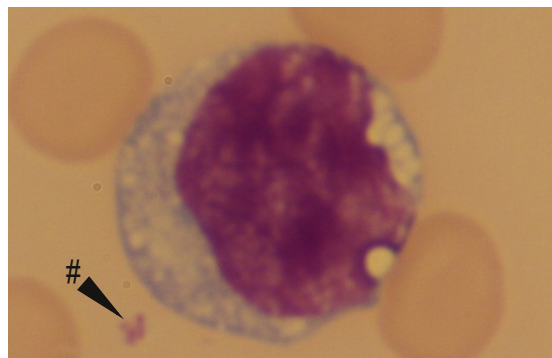


KUVA 29. Eosinofiilinen granulositytti

# trombosityttejä



KUVA 30. Monosyytti  
# trombosyytti



KUVA 31. Monosyytti  
# trombosyytti