



Anastasia Sergeeva

# Lysergihapon dietyyliamidin vaikutukset ruokahaluun ja hermosolujen aktivaatioon

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

3.11.2021

## Tiivistelmä

Tekijä:	Anastasia Sergeeva
Otsikko:	Lysergihapon dietyyliamidin vaikutukset ruokahaluun ja hermosolujen aktivaatioon
Sivumäärä:	38 sivua + 2 liitettä
Aika:	3.11.2021
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	-
Ohjaajat:	Dosentti Teemu Aitta-aho Lehtori Jarmo Palm

---

Opinnäytetyö lysergihapon dietyyliamidin (LSD) vaikutukset ruokahaluun ja hermosolujen aktivaatioon tehtiin tutkimus- ja opetuskeskus Biomedicum Helsingissä lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian osastolla. Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia LSD:n vaikutuksia ruokahaluun ja aivojen hermosolujen aktivaatioon hiirimallissa. Tämä opinnäytetyö toimii jatkona Biomedicumissa olevalle laajemmalle tutkimustyölle, jossa tutkitaan syömishäiriöitä, kuten ahmimissyömistä, ja näiden häiriöiden mahdollisia parannuskeinoja.

Lihavuuden ja metabolisen oireyhtymän simulointia koe-eläimillä käytetään lihavuuden patogeneettisten mekanismien tutkimiseen ja lääkkeiden kehittämiseen. Tutkimuksessa hiiret jaettiin neljään ryhmään, joilla jokaisella oli oma ruokintamalli ja injektio- ja ruokailuohjelma. Riippuen ryhmästä, johon hiiret kuuluivat, niille injisoitiin LSD:tä tai suolaliuosta. Ruokavalio koostui joko hiirille tarkoitetusta tavallisista ruokapelleteistä tai maukkaasta, runsasrasvaisesta ruoasta. Tällä testattiin LSD:n vaikutusta tavalliseen ja ahmimissyömistyyppiseen ruokahaluun.

Seuraavassa vaiheessa tutkittiin tutkittavien hiirien aivokudosnäytteistä LSD:n yhteyttä ruokahaluun ja hermosolujen aktivaatioon. Hermosolujen aktiivisuutta tutkittiin värjäämällä aivokudosleikkeet c-Fos-immunohistokemiallisella värjäysmenetelmällä. Värjätyt aivokudosnäytteet kuvannettiin valomikroskoopilla ja aktivoituneet c-Fos-solut laskettiin tietokoneohjelman avulla sekä manuaalisesti. T-testiä ja kaksisuuntaista ANOVA-varianssianalyysiä käytettiin saadun datan analysointiin.

Ruokahalun säätelykokeesta saadut tiedot osoittivat, että LSD vähensi selvästi ruokahalua ahmintatyyppistä syömiskäyttäytymistä hiirillä ja normaalisti syöville hiirillä. LSD:n vaikutus hermosolujen aktivoitumiseen oli myös huomattava, tilastollisesti merkitsevä vaikutus havaittiin 10:llä tutkituista 30 aivoalueesta. Havaittiin myös kaksi aluetta, joilla oli sekä LSD:n että ruoan yhdysvaikutus ja yksi alue, jossa oli vain ruoan merkitsevä vaikutus. Jäljellä olevilla 17 aivoalueella c-Fos-solujen lukumäärä oli samalla tasolla kuin suolaliuosta saaneilla koe-eläimillä. LSD:n havaittu vaikutus tässä opinnäytetyötutkimuksessa on mielenkiintoinen ja kannustaa jatkotutkimuksiin.

Avainsanat: LSD, c-Fos, ahmintahäiriö, ruokahalu

## Abstract

Author: Anastasia Sergeeva  
Title: The Effects of Lysergic Acid Diethylamide on Appetite and Neuronal Activation  
Number of Pages: 38 pages + 2 appendices  
Date: 3 November 2021

Degree: Bachelor of Laboratory Services  
Degree Programme: Laboratory Sciences  
Professional Major:  
Supervisors: Teemu Aitta-aho, University Lecturer  
Jarmo Palm, Senior Lecturer

---

This thesis study concerning the effects of LSD on appetite and neuronal activation was conducted at the Biomedicum, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine. The aim was to study the effects of LSD on appetite and brain neuronal activation in a mouse model. This study is part of a larger research project at Biomedicum, which is investigating eating disorders such as binge eating and possible ways to cure them.

The simulation of obesity and metabolic syndrome in laboratory animals is used to study the pathogenetic mechanisms of obesity and to develop drugs for its treatment. Mice used in the study were divided into four groups, each with its own feeding pattern and medication. Depending on the group to which the mice belonged, they were injected with LSD or saline. The diet consisted of either the usual food pellets or a tasty high-fat diet. This was used for testing the effect of LSD on appetite.

In the next stage, brain tissue samples from the mice studied were used to investigate the relationship between LSD's effect on appetite and neuronal activation. Neuronal activation was verified by staining brain tissue sections with c-Fos immunohistochemical staining. Stained brain tissue samples were imaged by light microscopy and activated c-Fos cells were counted using computer software and also manually. T-test and the two-way ANOVA variance analysis were used to analyze the obtained data.

Data from the appetite regulation (binge) experiment showed that LSD markedly reduced food eating in both binge eating mice and normal eating mice. The effect of LSD on neuronal activation was also notable, with a statistically significant effect observed in 10 of the 30 brain regions examined. There were also two areas where an interaction effect of both LSD and food was observed, and one area where only food had a significant effect. In the remaining 17 brain areas, the number of c-Fos cells was at the same level as in the saline-treated animals. The observed effect of LSD in this thesis study is interesting and encourages further studies.

Keywords: LSD, c-Fos, Binge eating, appetite

# Sisällys

1	Johdanto	1
2	Teoreettinen tausta	2
2.1	Syömishäiriöt	2
2.1.1	Laihuushäiriö	2
2.1.2	Bulimia	3
2.1.3	Ahmintahäiriö	3
2.1.4	Sairauden hoito	4
2.2	Psykedeliterapia	4
2.3	Tutkittavat aivoalueet	7
2.4	D-Lysergihapon dietyyliamidi, LSD	9
2.5	c-Fos	12
2.6	Immunohistokemia	13
2.7	Ahmintahäiriöiden mallintaminen jyrksijöillä	14
3	Menetelmät ja työn suoritus	16
3.1	Ruokahalun säätelyn koe	17
3.2	Binge-koe	18
3.3	Näytteiden keräys	20
3.4	Aivoleikkeiden tekeminen	20
3.5	Immunohistokemiallinen värjäys	20
3.6	Mikroskopointi	23
3.7	Kuva-analyysi	24
4	Tulokset	24
4.1	LSD:n vaikutus ruokahaluun	24
4.2	LSD:n vaikutus hermosolujen aktivaatioon	26
5	Yhteenveto ja pohdinta	31
	Lähteet	35
	Liitteet:	
	Liite 1: Immunohistokemiallinen värjäys	
	Liite 2: Kaksisuuntaisen ANOVAn tulokset	

## Lyhenteet

5-HT <sub>2A</sub>	5-hydroksi-tryptamiini-2A-reseptori.
ANOVA	Analysis of variance. Varianssianalyysi.
BED	Binge Eating Disorder. Ahmintahäiriö.
BSA	Bovine Serum Albumin. Naudan seerumin albumiini.
CA1	First region in the hippocampal circuit. Aivoalue.
CA2	Second region in the hippocampal circuit. Aivoalue.
CA3	Third region in the hippocampal circuit. Aivoalue.
c-fos	Cellular homologue of the retroviral oncogene v-fos. Proto-onkogeeni.
c-jun	Cellular homologue of viral oncogene v-jun. Proto-onkogeeni.
c-myc	Cellular homologue of transforming sequence of the avian myelocytomatosis virus. Proto-onkogeeni.
DAB-Ni	3,3-diaminobentsidiini ja nikkeli.
DEA	Drug Enforcement Administration. Huumevirasto.
DMT	N, N-dimetyylitryptamiini. Huumausaine.
IEG	Immediate early genes. Välittömät varhaisgeenit.
HED	High Energy Diet. Runsasenerginen ruokavalio.
LH	Lateral hypothalamus. Lateraalinen hypotalamus.

LSD	D-lysergihapon dietyyliamidi. Huumausaine.
MDMA	3,4-metyleenidioksi-metamfetamiini. Huumausaine.
m-RNA	Messenger Ribonucleic Acid. Lähetti-RNA.
PFA	Paraformaldehyde. Paraformaldehydi.
PVT	Paraventricular nucleus of the thalamus. Aivoalue.
TBS-T	Tris-buffered saline & Tween-20 (Polysorbate 20). Pesuneste.
RSC	Retrosplenial cortex. Aivoalue.
SEM	Standard Error of Mean. Keskiarvon keskivirhe.
VMH	Ventromedial hypothalamus. Aivoalue.

## Alkusanat

Haluan esittää erityiskiitokseni opinnäytetyöni yritysohjaajalle Teemu Aittaholle erinomaisesta ohjauksesta, keskusteluista ja avusta koko projektin ajan. Ja ylipäätään mahdollisuudesta osallistua näin mielenkiintoiseen projektiin. Lisäksi haluaisin kiittää ohjaavaa opettajaani Jarmo Palmia kaikesta tuesta ja avusta opinnäytetyön aikana.

Helsingissä 3.11.2021

Anastasia Sergeeva

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö toteutettiin Biomedicumien lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian osastolla. Farmakologian yksikkö tarjoaa lääketieteellistä ja hammaslääketieteellistä perusopetusta lääkeaineiden vaikutuksista, vaikutusmekanismeista ja lääkkeiden käyttötavoista eri sairauksissa. Lisäksi osastolla tehdään tieteellistä tutkimustoimintaa. [1.] Tämä opinnäytetyö toimii jatkona farmakologian osastolla olevalle laajemmalle tutkimustyölle, jossa tutkitaan syömishäiriöitä, kuten ahmimissyömistä, ja näiden häiriöiden mahdollisia parannuskeinoja.

Yleisimpiä syömishäiriöitä ovat anoreksia nervosa, bulimia nervosa ja ahmintahäiriö. Kun ihminen alkaa olla niin huolissaan ruoasta ja painosta, että hänen on yhä vaikeampi keskittyä muihin elämänsä osa-alueisiin, se voi olla varhainen merkki syömishäiriöstä. Tällaiset häiriöt ovat mielenterveyden häiriöitä. Ilman hoitoa syömishäiriöt voivat hallita henkilön elämää ja johtaa vakaviin seurauksiin. Huonosta maineestaan huolimatta psykedelit ovat onnistuneet aiemmin osoittamaan toimivuutensa riippuvuuden torjunnassa. Psilosybiiniä sisältäviä lääkkeitä on testattu menestyksekkäästi tupakointi- tai alkoholiriippuvuus hoidossa. [2.] Psilosybiinillä ja LSD:llä (d-lysergihapon dietyyliamidi) on samankaltainen vaikutusprofiili, minkä vuoksi olisi mielenkiintoista tutkia LSD:n mahdollisia terapeuttisia vaikutuksia ahmimissyömisessä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia LSD:n vaikutuksia ruokahaluun ja aivojen hermosolujen aktivaatioon hiirimallissa. Hiirimalleja on käytetty pitkään tautien mekanismien tutkimisessa ihmisen ja hiiren genomien samankaltaisuuden ansiosta [3]. Tutkimuksen hiiret jaettiin neljään ryhmään, joilla jokaisella oli oma ruokintamalli ja injektiohoito. Koemenettely alkoi binge-kokeesta, jolla tarkistettiin LSD:n vaikutus ruoan kulutukseen hiirillä. Seuraavan vaiheen tavoitteena oli tutkia yhteyksiä LSD:n vaikuttamisen ruokahaluun ja hermosolujen aktivaatioon välillä. Hermosolujen aktiivisuutta tutkittiin värjäämällä ja laskemalla hiirien aivoleikkeistä aktivoituneet c-Fos-solut.

## 2 Teoreettinen tausta

### 2.1 Syömishäiriöt

Syömishäiriöt ovat käyttäytymistiloja, joille on ominaista vakava ja jatkuva häiriö syömiskäyttäytymisessä, sekä siihen liittyvät ahdistavat ajatukset ja tunteet.

Syömishäiriön tarkkoja syitä on vaikea määrittää, mutta useimmiten kyseessä on psyykinen trauma tai geneettinen alttius. [4.] Häiriö voi johtua myös yhteiskunnallisista paineista. Jokaiseen sairauteen liittyy äärimmäisiä ruoka- ja paino-ongelmia, mutta jokaisella sairaudella on kuitenkin ainutlaatuisia oireita, jotka erottavat sen muista sairauksista.

#### 2.1.1 Laihuushäiriö

Laihuushäiriötä (lat. anorexia nervosa) sairastavat ihmiset kieltävät itseltään ruokaa nälkään asti, koska heillä on pakkomielle laihduttamisesta. Anoreksiaa sairastava henkilö kieltää nälän ja kieltäytyy syömästä, voi harjoittaa ahmimista ja puhdistautumiskäyttäytymistä tai harrastaa liikuntaa uupumukseen asti yrittäessään rajoittaa, poistaa tai "polttaa" kaloreita.

Anoreksian emotionaalisiin oireisiin kuuluvat ärtyneisyys, sosiaalinen vieraantuminen, mielialan tai tunteiden puute, kykenemättömyys ymmärtää tilanteen vakavuutta, pelko syödä julkisesti sekä pakkomielleet ruoan ja liikunnan suhteen. Usein kehitetään ruokarituaaleja tai poistetaan kokonaisia ruokaryhmiä henkilön ruokavaliosta "lihomisen" pelossa. [5, s. 5–8.]

Anoreksia voi verottaa raskaasti fyysisiä voimavaroja. Hyvin vähäinen ruoan saanti ja riittämätön ravitseminen saavat henkilön laihtumaan. Keho joutuu hidastamaan vauhtia säästääkseen energiaa, mikä voi aiheuttaa kuukautisten epäsäännöllisyyttä tai loppumista, ummetusta ja vatsakipuja, sydämen rytmihäiriöitä, matalaa verenpainetta, nestehukkaa ja univaikeuksia. [6, s. 4.]

### 2.1.2 Bulimia

Bulimiasta (lat. bulimia nervosa) kärsivät ihmiset tuntevat itsensä hallitsemattomiksi, kun he ahmivat lyhyiden ajanjaksojen aikana hyvin suuria määriä ruokaa, ja yrittävät siten päästä eroon ylimääräisistä kaloreista pakotetun oksentelun, laksatiivien väärinkäytön tai liiallisen liikunnan avulla. Tästä tulee toistuva sykli, joka hallitsee monia henkilön elämän osa-alueita ja sillä on hyvin kielteinen vaikutus sekä henkisesti että fyysisesti. Bulimiasta kärsivät ihmiset ovat yleensä normaalipainoisia tai jopa hieman ylipainoisia. [6, s. 5.]

Bulimian emotionaalisiin oireisiin kuuluvat huono itsetunto, joka liittyy tyytymättömyyteen ulkonäköä kohtaan, hallitsemattomuuden tunne, syyllisyyden tai häpeän tunne syömisestä sekä vieraantuminen ystäväistä ja perheestä. [5, s. 12–13.]

Anoreksian tavoin bulimia aiheuttaa fyysisiä vaurioita. Ahmiminen ja sen jälkeinen oksentaminen voivat vahingoittaa vakavasti syömiseen ja ruoansulatukseen osallistuvia kehon osia, hampaat vaurioituvat usein oksentamisen vuoksi ja happamat refluksit ovat yleisiä. Liiallinen oksentaminen voi aiheuttaa neste-hukkaa, joka vaikuttaa elimistön elektrolyytteihin ja johtaa sydämen rytmihäiriöihin sekä sydämen vajaatoimintaan. [5, s. 14–16.]

### 2.1.3 Ahmintahäiriö

Ahmintahäiriöstä (engl. Binge Eating Disorder, BED) kärsivä henkilö menettää syömisensä hallinnan ja syö hyvin suuren määrän ruokaa lyhyessä ajassa. Hän saattaa myös syödä suuria määriä ruokaa silloinkin, kun hänellä ei ole nälkä, tai sen jälkeen, kun hän on epämiellyttävän kylläinen. Tämä saa heidät tuntemaan olonsa noloksi, inhottavaksi, masentuneeksi tai syylliseksi käytöksestään. [5, s. 18.]

BED:tä sairastava henkilö ei ahmintakohtauksen jälkeen yritä tyhjentää vatsaa tai harrastaa liikuntaa kohtuuttomasti, kuten anoreksian tai bulimian

tapauksessa. Ahmintahäiriöstä kärsivä henkilö voi olla normaalipainoinen, ylipainoinen tai lihava. [5, s. 19.]

#### 2.1.4 Sairauden hoito

Syömishäiriöitä hoidetaan erilaisilla tekniikoilla. Hoidot vaihtelevat häiriön tyypin mukaan, mutta niihin kuuluvat yleensä seuraavat:

- Psykoterapia, kuten puheterapia tai käyttäytymisterapia.
- Lääkkeet, kuten masennuslääkkeet ja ahdistuslääkkeet. Monilla syömishäiriön kanssa elävillä ihmisillä on usein samanaikainen sairaus, kuten masennus tai ahdistuneisuus. Vaikka syömishäiriöiden varsinaiseen hoitoon ei ole saatavilla lääkkeitä, niin on huomattu, että nämä lääkkeet auttavat taustalla oleviin ongelmiin.
- Ravitsemusneuvonta ja painon palautumisen seuranta ovat myös ratkaisevan tärkeitä. Perhepohjainen hoito on erityisen tärkeää lapsi- ja nuorisoperheille, koska se auttaa perheitä varmistamaan paremmat ruokailutottumukset sekä lisää tietoisuutta ja tukea. [7.]

## 2.2 Psykedeeliterapia

Hallusinogeenit jakautuvat useisiin eri luokkiin, jotka määritellään farmakologisen vaikutusmekanismin ja kemiallisen rakenteen perusteella. Näihin kuuluvat serotoniini 5-hydroksi-tryptamiini-2A-reseptorin (5-HT<sub>2A</sub>) agonistit, kuten LSD, psilosybiini ja N, N-dimetyylitryptamiini (DMT), joita kutsutaan usein klassisiksi hallusinogeeniksi tai psykedeeliksi; sekalaiset serotoniinin ja dopamiinin takaisinoton estäjät ja vapauttajat, kuten 3,4-metyleenidioksi-metamfetamiini (MDMA), joita kutsutaan myös entaktogeeniksi. [8, s. 133, 194, 456, 955.]

Hallusinogeenien käyttö on laitonta useimmissa maissa. Hallusinogeenit aiheuttavat muuttuneita tajunnantiloja ja valvomattomissa olosuhteissa voivat johtaa

vaarallisiin seurauksiin. Yhdysvalloissa ja monissa Euroopan maissa näitä aineita voidaan kuitenkin tutkia lääketieteellisiin tarkoituksiin. Joitakin mielenterveyden häiriöitä, joiden hoitoon psykedeeleillä tuettuja hoitomuotoja tutkitaan parhaillaan, ovat muun muassa ahdistuneisuus, riippuvuus ja erilaiset stressihäiriöt. [9, s. 99.]

LSD ja psilosybiini ovat osoittautuneet hyväksi ahdistuneisuushäiriön sekä alkoholi- ja nikotiiniriippuvuuden hoidossa. MDMA:lla on myös saatu hyviä tuloksia ahdistuneisuushäiriöiden, kuten traumaperäisen stressihäiriön, hoidossa. Mutta kaikissa tapauksissa, joissa psykedeelejä käytetään stressihäiriöiden hoidossa, terapiaan kuuluu lääkityksen lisäksi myös psykoterapia. [10.] Taulukossa 1 on esitetty muutamia kliinisiä tutkimuksia, joissa oli käytetty psykedeelejä ja niiden tulokset.

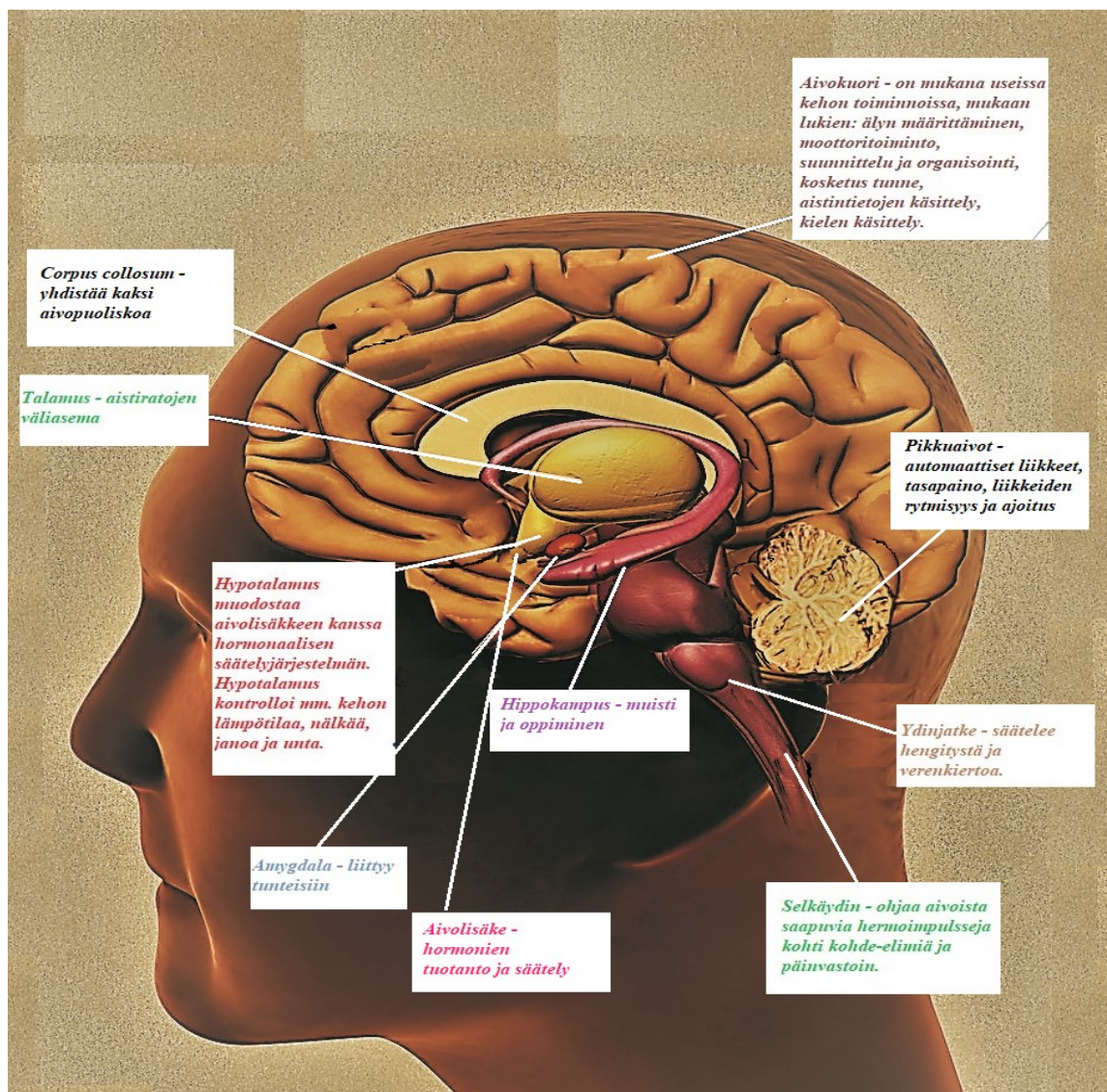
Taulukko 1. Esimerkkejä erilaisista kliinisistä tutkimuksista, joissa on käytetty psykedeelejä.

Lääke	Tutkimuksen muotoilu	Osallistujien määrä	Diagnoosi	Yhteenveto tutkimuksesta	Tutkimus
Psilosybiini (0.3–0.4 mg/kg)	Motivaatiota edistävä terapia; Open label*	10 (6 miestä & 4 naista)	Alkoholi-riippuvuus	Itse raportoitujen juomapäivien ja juomapatkien merkittävä väheneminen 32 viikon ajan psilosybiinin antamisen jälkeen lähtötilanteeseen verrattuna ( $p < 0,05$ ).	Michael P. Bogenschutz [11.]
Psilosybiini (10 mg ja 25 mg)	Tukeva psykoterapia; Open label	12 (6 miestä & 6 naista)	Unipolaarinen hoitoresistentti masennus	Kaikilla potilailla masennuksen vaikeusaste väheni jonkin verran 1 viikon kuluttua hoidon jälkeen, ja suurimmalla osalla potilaista se säilyi 3 kuukauden ajan.	Robin L. Carhart-Harris [12.]
LSD (200 µg)	Tukeva psykoterapia; Kaksoissokkokeo	11 (7 miestä & 4 naista)	Sairauteen liittyvä ahdistus	Tässä tutkimuksessa korkeellinen annos LSD:tä vähensi merkitsevästi ahdistuneisuutta. ( $p < 0,05$ ) Nämä tulokset pysyivät vakaina ajan myötä, kuten 12 kuukauden seuranta osoitti.	Peter Gasser [13.]
MDMA (125–187.5 mg)	Tukeva psykoterapia; Kaksoissokkokeo	20 (3 miestä & 17 naista)	Krooninen traumaperäinen stressihäiriö	MDMA ja tukeva psykoterapia verrattuna samaan psykoterapiaan, jossa käytettiin inaktiivista lumelääkettä, tuotti kliinisesti ja tilastollisesti merkitseviä parannuksia PTSD-oireisiin standardilla oireasteikoilla mitattuna. ( $p < 0,05$ ).	Michael C. Mitroff [14.]

\*Open label - kliininen tutkimus, jossa tietoja ei salata tutkimukseen osallistuilta.

## 2.3 Tutkittavat aivoalueet

Aivot ovat yksi ihmiskehon suurimmista ja monimutkaisimmista elimistä. Ne koostuvat tiivisti rakentuneista hermosoluista ja niiden haaroista, jotka kommunikoivat keskenään synapsien välityksellä. Aivot on jaoteltu alueisiin, jotka vastaavat kukin eri toiminta-alueista (kuva 1). Aivokuori on aivojen uloin kerros, joka antaa aivoille niiden tyypillisen ryppyisen ulkonäön. Aivokuori jakautuu pituussuunnassa kahteen aivopuoliskoon, jotka on yhdistetty toisiinsa aivokurkiaisella (lat. corpus callosum). [16, s. 29.]



Kuva 1. Aivojen eri osat ja niiden yleiset toiminnot. [15, muokattu.]

Perinteisesti kumpikin aivopuolisko on jaettu neljään lohkoon: otsa-, pääläen-, ohimo- ja takaraivolohkoihin. Otsalohko vastaa ongelmanratkaisusta, arvostelukyvyistä ja motorisista toiminnoista. Päälakilohko hallitsee aistimuksia. Ohimolohko osallistuu muistiin ja kuuloon. Takaraivolohko sisältää aivojen visuaalisen prosessointijärjestelmän. Pikkuaiivot sijaitsevat aivojen pohjalla, takaosassa ja vastaavat koordinaatiosta sekä tasapainosta. Aivorunko yhdistää aivot selkäyttimeen ja koordinoi monia elintärkeitä toimintoja, kuten hengitystä ja sydämen sykettä. [16, s. 22.]

Tämän opinnäytetyön yhteydessä kiinnostuksen kohteena on kuitenkin aivojen limbinen järjestelmä, koska se sisältää hypotalamuksen, joka on vastuussa näiden tunteista. Hypotalamus, huolimatta pienestä koostaan, on tärkein homeostaasia hallitseva keskus. [17, s. 469.] Se sisältää eri toimintoja sääteleviä keskuksia, jotka vaikuttavat fysiologisiin perustoimintoihin, kuten ruumiinlämpöön, tunteisiin, nälkään, janoon, ruoansulatukseen ja uneen [18]. Lateraalinen hypotalamus ja lähellä oleva substantia innominata osallistuvat ruokailun valvontaan. Näillä alueilla on neuronipopulaatio, joka reagoi ruoan näkemiseen ja maistamiseen, jos elimistö on nälkäinen. Tieto siitä, mitkä visuaaliset ärsykkeet ovat ruokaa, pääsee hypotalamukseen ohimolohkon alaosan aivokuorialueen (lat. inferior temporal cortex) ja amygdalan kautta. Amygdala on tärkeä opittaessa, mitkä visuaaliset ärsykkeet ovat ruokaa. [19, s. 12.]

Sellaisilla psykedeelillä kuten LSD:llä ja psilosybiinillä puolestaan on monenlaisia vaikutuksia aivoihin, ja niillä on agonistisia ominaisuuksia useissa eri välittäjäainereseptoreissa. Niiden affiniteetin serotoniini 5-HT<sub>2A</sub>-reseptoriin uskotaan kuitenkin määrittävän suurelta osin sille ominaiset psykologiset ja siihen liittyvät neurofysiologiset vaikutukset. [20.] 5-HT<sub>2A</sub>-reseptorit ovat erityisen keskittyneitä aivojen etuaivokuoreen, clastrumiin [21]. Tämän lisäksi häiriintynyt aktiivisuus ja liitettävyyden peruslepotilassa (engl. default mode network) [22], sekä myös vähentynyt liitettävyyden parahippokampuksen ja retrosplenialisen aivokuoren (engl. Retrosplenial cortex, RSC) välillä korreloi voimakkaasti "egon hajoamisen" ja "muuttuneen merkityksen" luokitusten kanssa koehenkilöillä [23].

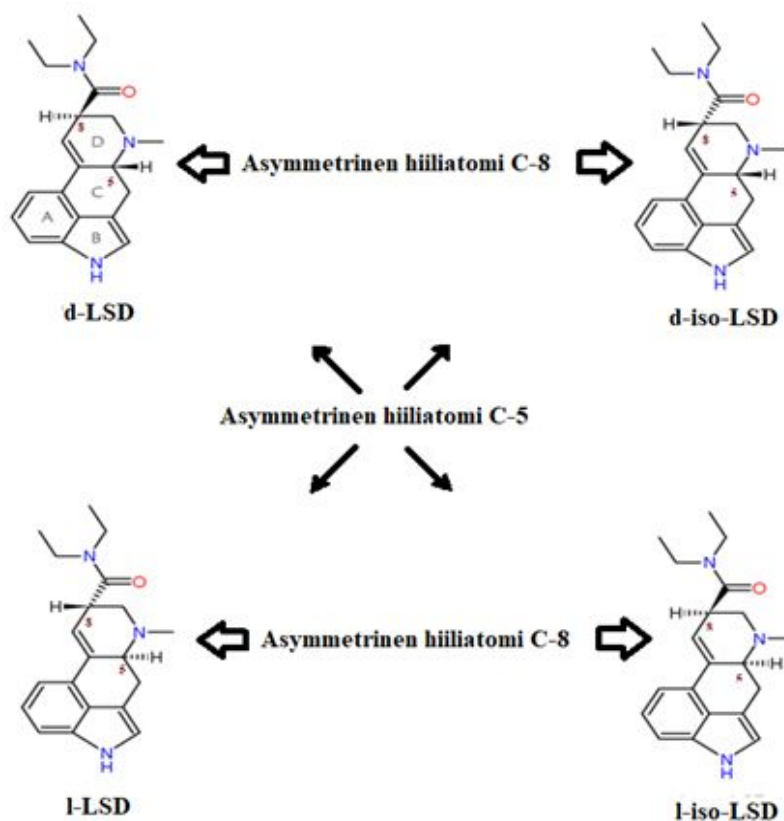
## 2.4 D-lysergihapon dietyyliamidi, LSD

Lysergihapon dietyyliamidi on kemiallinen johdos lysergihaposta, joka esiintyy luonnossa rukiin loissienenä. Sveitsiläisen kemistin Albert Hoffmanin toimesta lysergihapon dietyyliamidi syntetisoitiin ensimmäisen kerran vuonna 1938. [24, s. 617.] Albert Hoffman oli etsinyt analeptisia lääkeaineita ja analysoinut torajyväsienien (lat. *Claviceps purpurea*) komponentteja, jolloin työprosessissaan hän eristi LSD:tä. Tuolloin LSD:n psykoaktiiviset ominaisuudet jäivät huomaamatta, ja vasta vuonna 1943 Hoffman päätti toistaa kokeensa ja syntesoinnin aikana hänen työnsä keskeyttivät epätavalliset tuntemukset, joiden seurauksena LSD:n todelliset vaikutukset löydettiin. [25, s. 452.]

LSD:n lääketieteellisiä mahdollisuuksia tutkittiin eniten 1950–1960-luvulla, koska tällä yhdisteellä uskottiin olevan suuri potentiaali mielenterveyspotilaiden hoidossa. Mutta tutkimuksen aikakausi ei kestänyt kauan, LSD:n viihdekäyttö lisääntyi dramaattisesti 1960-luvulla, ja Yhdysvaltain lääkevalvontahallinto (engl. Drug Enforcement Administration, DEA) lisäsi LSD:n valvottavien aineiden luetteloon I. Se mitätöi melkein kaikki tämän yhdisteen tutkimukset silloin, huolimatta sen mahdollisesta lääkepotentiaalista. [23.]

Kemiallisilta ominaisuuksiltaan LSD on väritön, mauton, hajuton yhdiste, joka liukenee hyvin veteen ja alkoholiin ja sen sulamispiste on 80–85 °C. LSD:n molekyylipaino on 323,44 g/mol. Asymmetristen hiiliatomien seurauksena asemassa 5 ja 8 LSD:llä on 4 stereoisomeeriä. Nämä ovat d- ja l-LSD sekä d- ja l-isolysergihapon dietyyliamidit (kuva 2). Vain d-LSD-isomeerillä on psykoaktiivisia ominaisuuksia. Lysergiinihappo ja dietyyliamiini ovat esiasteita, joita käytetään d-lysergiinihappo-dietyyliamidin synteesissä. LSD:tä yleensä stabiloidaan tartaarihapon suolan liuoksessa. [25, s. 453–454.]

## LSD:n stereoisomeerit



Kuva 2. LSD:n stereoisomeerit. [26, muokattu.]

LSD:llä on suuri affiniteetti useisiin G-proteiinikytkentäisiin välittäjäreseptoreihin keskushermostossa, mutta LSD:n voimakkaat psykoaktiiviset vaikutukset johtuvat sen agonistisesta tai osittain agonistisesta aktiivisuudesta aivojen serotoniini 5-HT<sub>2A</sub>-reseptorissa. Erityisen tärkeitä viimeaikaisten tutkimusten mukaan ovat ne, jotka ilmentyvät neokortikaalisten pyramidisolujen V-kerroksen apikaalisissa dendriiteissä. [27, s. 266.] Vaikka 5-HT<sub>2A</sub>-reseptorin stimulaatio on välttämätön edellytys LSD:n hallusinogeenisille vaikutuksille, niin biokemiallisia ja signaalintireittäjiä, jotka ovat vastuussa näistä vaikutuksista ei ole vielä täysin määritelty. 5-HT<sub>2A</sub>-reseptorin antagonisteista ketanseriinia on tutkittu paljon, ja tutkimukset

ovat osoittaneet, että ketanseriini estää LSD:n aiheuttamat niin kognitiiviset häiriöt kuin tajunnantilan muutoksetkin. [28.]

Serotoniinireseptoreihin vaikuttamisen lisäksi LSD vaikuttaa myös muihin hermovälittäjäainejärjestelmiin. On näyttöä siitä, että LSD on vuorovaikutuksessa dopaminergisten järjestelmien kanssa. Sen on todettu toimivan osittaisena agonistina keskushermoston D1- ja D2-dopamiinireseptoreissa. [29.] Tämän lisäksi LSD lisää aivojen glutamaatin aktiivisuutta [30], joka mahdollistaa signaalien välittämisen hermosolujen välillä ja jolla on merkittävä rooli oppimisessa sekä muistissa [31, s. 40].

Pienin kliinisesti havaittava aikuisen oraalinen annos on noin 25 µg, ja optimaaliset psykedeeliannokset ovat 100–500 µg. LSD:n puoliintumisaika plasmassa ihmisillä on noin 2–3 tuntia, ja joillakin koe-eläimillä, kuten hiirillä, puoliintumisaika on huomattavasti lyhyempi. Sekä ihmisillä että eläimillä esiintyy nopeasti toleranssia LSD:n käyttäytymisvaikutuksille 5-HT<sub>2A</sub>-reseptorin määrän vähene-  
misen takia (engl. downregulation). Toleranssi kehittyy tyypillisesti muutaman päivän päivittäisen käytön jälkeen, mutta akuutti toleranssi häviää 3–4 päivän kuluessa LSD:n käytön lopettamisesta. [25, s. 455; 26, s. 281.] Fyysisen riippuvuuden osalta LSD:tä ei yleisesti pidetä riippuvuutta aiheuttavana huumeena verrattuna useimpiin muihin huumeisiin, eikä tyypillisten LSD-annosten nauttimisen jälkeen ole sattunut yliannostuskuolemia. Fyysisten oireiden sijaan LSD-riippuvuudelle voi olla psyykinen riippuvuus: tunteet, emootiot ja kokemukset, joita henkilö on kokenut LSD-tripin aikana. [27, s. 274.]

LSD:n vaikutusten osalta päihdekäyttäjät voivat kokea ensimmäisen tunnin aikana nauttimisesta visuaalisia muutoksia, joihin liittyy dramaattisia mielialan vaihteluita. Hallusinaatioiden aikana käyttäjän syvyys- ja aikahavainnot voivat heikentyä, minkä lisäksi esineiden muodon ja koon, liikkeen, värien, äänen, kosketuksen ja kehonkuvan havaitseminen vääristyy. Kyky tehdä perusteltuja arvioita ja nähdä yleisiä vaaroja heikkenee, jolloin käyttäjä on altis loukkaantumisille. Tämä vaara on merkittävä varsinkin silloin, kun LSD:tä käytetään vapaa-  
aikana valvomattomassa ympäristössä. Usko siihen, että ihmisellä on yli-

inhimilliset voimat, kun hallusinogeenit heikentävät harkintakykyä, voi johtaa loukkaantumiseen tai kuolemaan, kun valvoton käyttäjä suorittaa vaarallisia toimintoja, kuten kävelyä moottoritiellä tai lento yrityksiä. [30.]

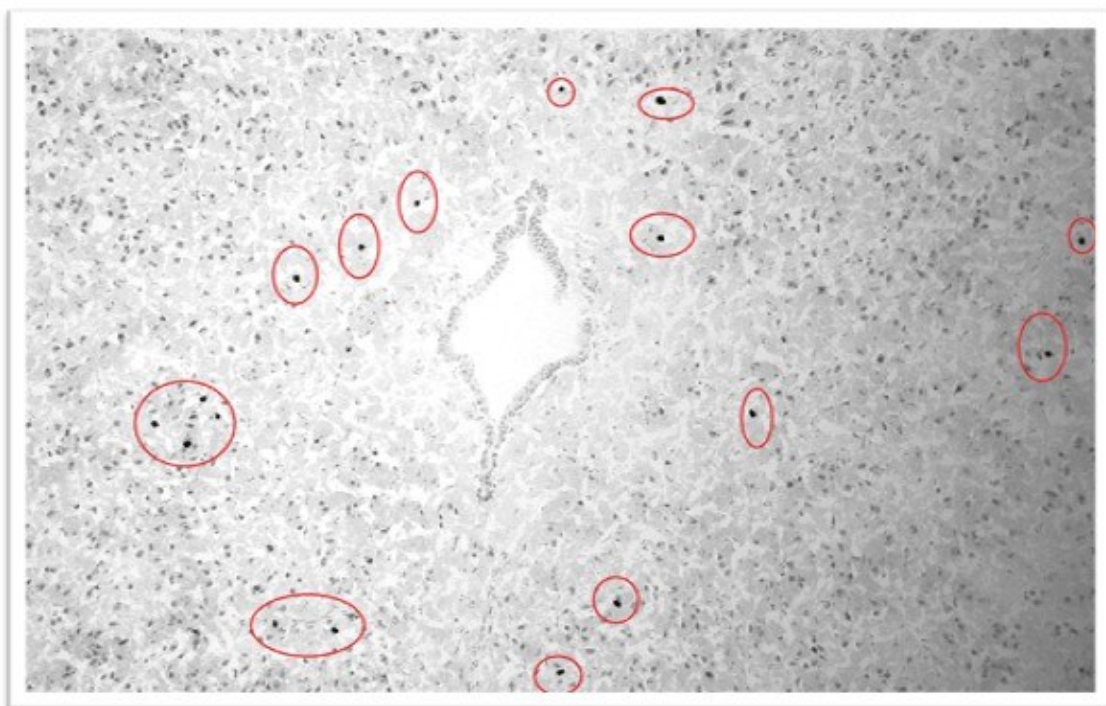
## 2.5 c-Fos

Proto-onkogeeni c-fos on yksi monista välittömistä varhaisgeeneistä (engl. Immediate early genes, IEG), joiden mRNA- ja proteiinitasot indusoituvat nopeasti, mutta ohimenevästi ärsykkeiden vaikutuksesta [32, s. 308]. Vuosikymmenien ajan välittömiä varhaisgeenejä käytetään epäsuorana merkkiaineena hermosolujen aktiivisuuden mittaamiseksi. Vaikka monia niistä mitataan rutiininomaisesti tuhansissa laboratorioissa ympäri maailmaa, niiden roolia monissa biologisissa prosesseissa ei vielä tunneta täysin. On olemassa useita esimerkkejä, joissa hermosolujen aktivaatio tapahtuu ilman IEG:n induktiota tai hermosolujen aktivaation markkereita ei ilmene kroonisesti aktivoiduissa neuroneissa. Näistä tapahtumista huolimatta c-fos, c-jun, c-myc ja muita välittömiä varhaisgeenejä käytetään laajasti hermosolujen aktivaation markkereina tutkimusmaailmassa. [33, s. 665.]

Yksi eniten tutkituista ja käytetyistä välittömistä varhaisgeeneistä analyyseissa on proto-onkogeeni c-fos. c-fos ilmenee hermosoluissa kalvojen depolarisaation vaikutuksesta. Tämä induktio riippuu kalsiumionien sisään virtauksesta jänniteohjatun kalsiumkanavan kautta. [34, s. 571–572.] c-fos proto-onkogeenin ilmentymisen voi havaita c-fos-mRNA:sta esimerkiksi *in situ* -hybridisaation avulla tai sen proteiinituotteen immunohistokemiallisella värjäyksellä. Immunohistokemiallisen proteiinvärjäyksen erottava piirre on se, että c-Fos-proteiinit sijaitsevat hermosolun ytimessä. Suorittamalla sytoplasmassa olevien osien immunohistokemiallista kaksoisvärjäystekniikkaa voi tunnistaa aktivoidun hermosolun fenotyypin. [35, s. 176.]

Hermosolujen aktivaatiota tutkittaessa on kriittistä, että kaikki vaiheet toteutuvat oikeassa järjestyksessä ja olosuhteissa. c-fos-mRNA:n käytön haittapuoli tutkimuksissa on, että sen ilmentyminen alkaa jo 5–10 minuutin kuluttua

stimulaatiosta ja saavuttaa maksiminsa 30 minuutissa, minkä jälkeen sen määrä vähenee. c-Fos-proteiinin ilmentyminen tapahtuu taas 30–45 minuutin päästä, saavuttaa maksiminsa noin 60–90 minuutin kohdalla ja säilyy aktiivisuutensa vielä noin 2–5 tuntia. Edellä mainittu viive antaa tutkijoille enemmän aikaa kokeessa oleviin välttämättömiin toimenpiteisiin ennen tutkittavan eläimen lopettamista, jotta koe-eläimelle ei aiheudu epäspesifistä tai stressin aiheuttamaa IEG:n ilmentymistä. [35, s. 176–177.] Kuvassa 3 on esitetty esimerkki, miltä aktivoituneet c-Fos-solut näyttävät aivoleikkeessä.



Kuva 3. Immunohistokemiallisesti värjätty 14 µm:n paksuinen hiiren aivoleike. Kuva otettu periaqueductal gray alueesta, jossa aktivoituneet c-Fos-solut korostettu punaisella (10-kertainen suurennos).

## 2.6 Immunohistokemia

Immunohistokemia on värjäysmenetelmä, jossa tietyt molekyylit havaitaan kudoksenäytteistä vasta-aineiden avulla. Immuunijärjestelmä käyttää vasta-aineiksi kutsuttuja erityismolekyylejä vieraiden aineiden havaitsemiseksi ja tuhoamiseksi. Niille on ominaista spesifisyys: kukin vasta-aine voi sitoutua tiukasti

tiettyyn antigeeniin. [36, s. 185–186.] Immunohistokemia sai alkunsa yli 120 vuotta sitten, kun lääkäri Emil Von Behring löysi seerumin vasta-aineet vuonna 1890 ja käytti niitä kurkkumätä- ja jäykkäkouristustautien hoitoon [37, s. 3].

Immunohistokemia voi olla suoraa tai epäsuoraa. Ensimmäisessä tapauksessa käytetään yhtä vasta-ainetyyppiä, jonka on sitouduttava tiettyyn kohdemolekyyliin. Jos kohdemolekyyliä on kudoksessa ja reaktio on tapahtunut, tutkittava kudos värjäytyy. Yleisemmin käytetään epäsuoraa immunohistokemiaa, jossa on kaksi vasta-ainetta. Toinen sitoutuu antigeeniin ja toinen sitoutuu saatuun antigeeni-vasta-ainekompleksiin. Värimuutoksen aiheuttava merkkiaine sitoutuu toiseen vasta-aineeseen. Epäsuoralla menetelmällä on joitakin etuja: sen herkkyys on suurempi, koska yksi primaarivasta-aine (joka sitoutuu kohdeproteiiniin) voi sitoutua useisiin sekundaarivasta-aineisiin. [36, s. 198.]

Immunohistokemiassa antigeenien lokalisointi visualisoidaan käyttämällä merkkiainetta, kuten fluoresoivaa väriainetta. Vasta-aineeseen lisätään fluoresiinia tai rodamiinia, ja värjäytyminen havaitaan fluoresenssimikroskopiolla. Toisessa menetelmässä käytetään enstyymikonjugoitua vasta-ainetta, kuten peroksidasia. Tämä entsyymi katalysoi kemiallista reaktiota, joka johtaa värimuutokseen. On olemassa myös tekniikoita, joissa merkkiaineena toimii radioaktiivisia elementtiä tai kolloidista kultaa. [36, s. 194–197.]

## 2.7 Ahmintahäiriöiden mallintaminen jyräjillä

Lihavuuden ja metabolisen oireyhtymän simulointia koe-eläimillä käytetään lihavuuden patogeneettisten mekanismien tutkimiseen ja lääkkeiden kehittämiseen sen hoitoon. On olemassa useita malleja, joilla simuloidaan ahmimisesta kärsivien hiirten käyttäytymistä. Kaikkiin ahmintamalleihin liittyy epätavallisen suuren ruokamäärän nauttiminen suhteellisen lyhyessä ajassa, ja niille on yleensä ominaista tunne hallinnan puutteesta aterian aloittamisen jälkeen. Yleensä malliin kuuluu ajoittainen pääsy erittäin maukkaisiin, runsaasti sokeria tai rasvaa tai molempia sisältäviin ruokiin, ja kontrolliryhmät, jotka syövät samaa ruokaa, mutta ilman rajoittamista. [38, s. 402–408.] Useat todisteet viittaavat siihen, että

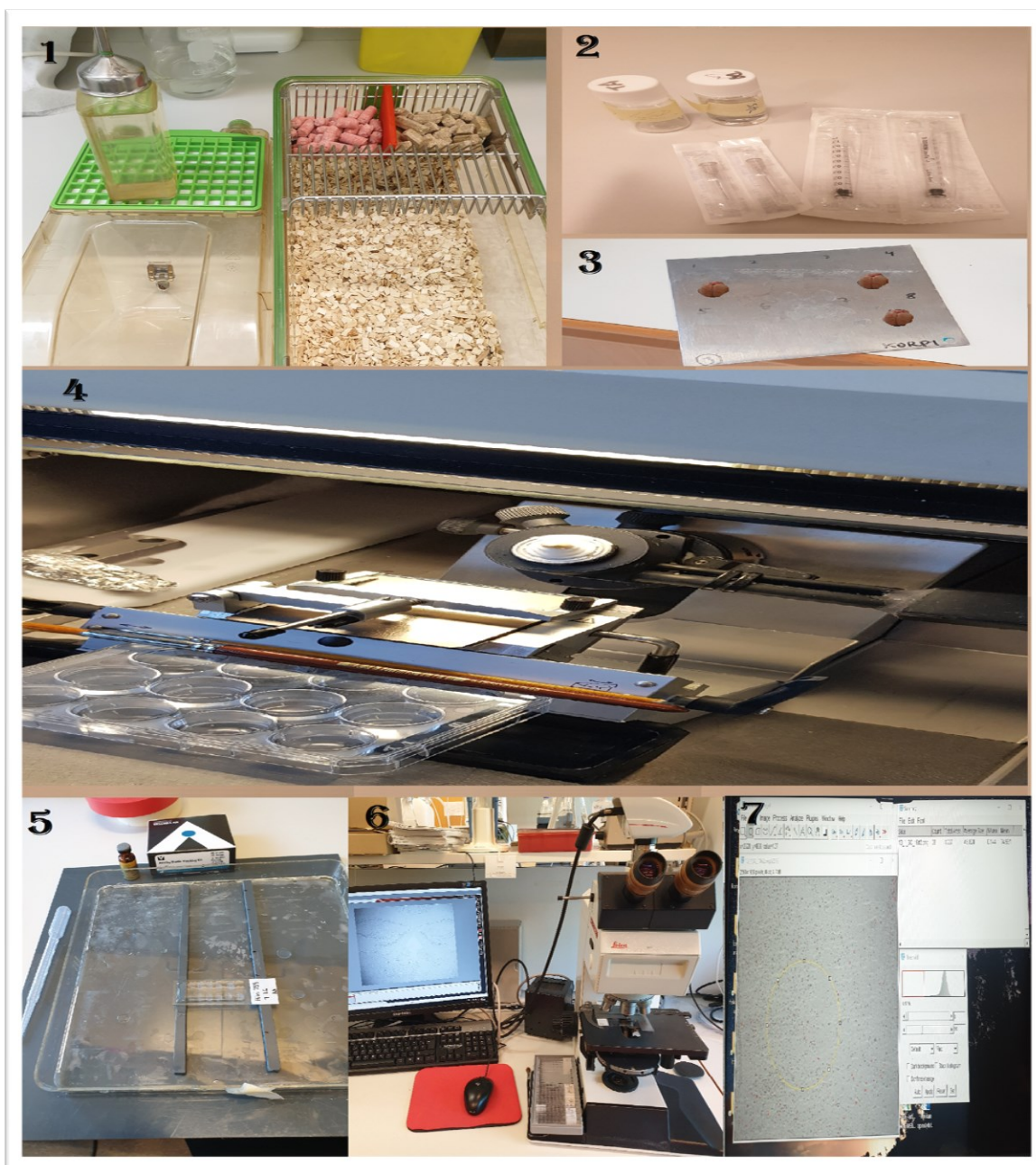
ihmisillä stressin ja ahmimissyömisen välillä on yhteys [39]. Siksi stressin aiheuttaminen on usein käytetty ahmimisen käyttäytymismalleissa. Taulukossa 2 on esitetty muutama esimerkkiä erityyppisistä ahmimissyömisen malleista.

Taulukko 2. Ahmimissyömisen mallit.

Mallin nimi	Mallin toteamistapa	Positiiviset puolet	Negatiiviset puolet	Tutkimus
Ruokarajoittaminen ja stressi	Rotat altistetaan toistuville rajoitus-ruokintajaksoille. Viimeisenä ruokintapäivänä rotat altistetaan sähköiskulle (0,6 mA), minkä jälkeen ne saavat kaloripitoista ruokaa	Monimutkainen toteamistapa, eläinten vahingoittaminen	Hyvin tutkittu ja toimiva menetelmä	M.M. Hagan [40.]
Ajoittainen pääsymalli	Hiiret altistetaan toistuville jaksoille, jossa niillä on rajoittamaton pääsy tavalliseen ruokaan ja kerran viikossa herkulliseen ruokaan	Ei ruokarajoitusta	Ei simuloi stressiä/ahdistusta	Traci A. Czyzyk [41.]
Pidempiaikaiset stressitekijät	Rotat ruokitaan 2 tuntia päivässä viikon ajan. Sen jälkeen rotat sijoitetaan todella pieneen häkkiin 24 tunniksi ilman ruokarajoitusta	Helppo toteamistapa, ei täydellinen ruokarajoittaminen	Tutkimuksessa ei käytetä herkullista ruokaa, vain tavallista	Koki Inoue [42.]
Rajoitettu pääsy	Rotille annetaan 2 tuntia päivässä herkullista ruokaa ja rajoittamaton pääsy tavalliseen ruokaan	Ei ruokarajoitusta, painon nousu	Ei simuloi stressiä/ahdistusta	Laura A. Berner [43.]

### 3 Menetelmät ja työn suoritus

Kokonaisuudessaan opinnäytetyö koostui seitsemästä vaiheesta. Nämä olivat ruokahalun säätelyn koe (binge), LSD:n injektointi, näytteiden keräys, aivoleikkeiden tekeminen, immunohistokemiallinen värjäys, värjättyjen näytteiden mikroskopiointi ja saatujen tulosten analyysi.



Kuva 4. Työn eri vaiheiden eteneminen.

### 3.1 Ruokahalun säätelyn koe

Tässä opinnäytetyötutkimuksessa käytettiin T. A. Czyzykin laatimaa mallia ahmimiseen liittyvästä syömiskäyttäytymisestä. Malliin sisältyy ajoittainen pääsy maistuvaan, runsasrasvaiseen ruokaan (engl. High Energy Diet, HED) kerran viikossa ja rajoittamaton pääsy ravitsemuksellisesti täydelliseen laboratoriojyrsijöiden ruokavalioon (chow) (kuva 5). Tämän mallin edellytys on se, että hiiret eivät kärsi nälästä. Toisaalta hiiret eivät koe stressiä, masennusta tai ahdistusta, jotka ovat myös ahmintahäiriön tunnusmerkkejä. [41.]



Kuva 5. Havainnollistava kuva hiirille annetuista ruoasta.

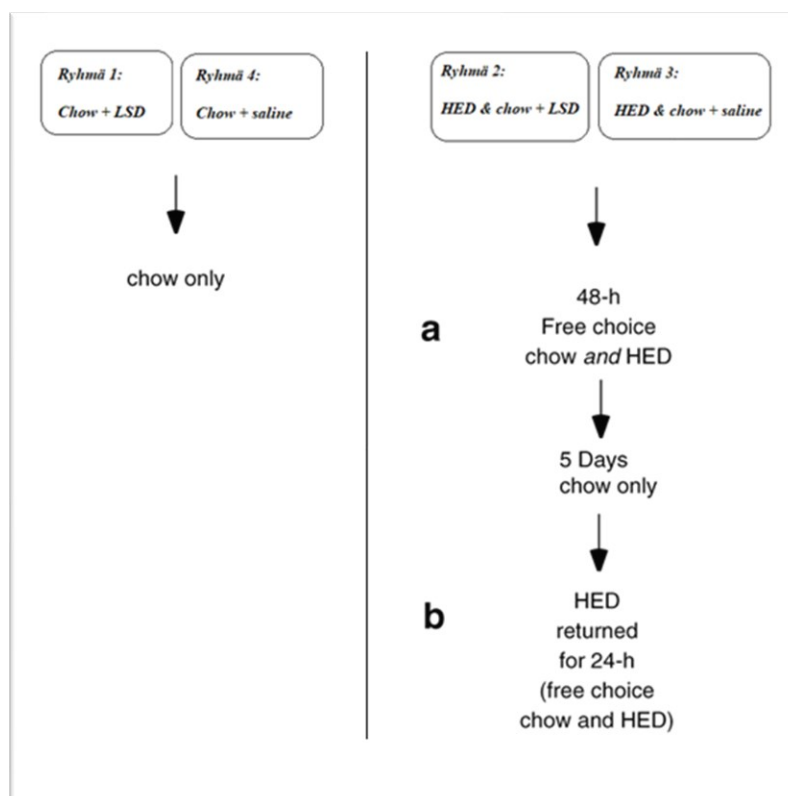
## 3.2 Binge-koe

B6N/129S6-kannan uros- ja naarashiiret osallistuivat binge-kokeeseen. Yhteensä niitä oli 20 kappaletta (n = 20). Hiirien keskipaino oli 29 grammaa ja ne olivat noin vuoden ikäisiä. Kaikkia hiiriä pidettiin jatkuvasti saatavilla olevalla, ravitsemuksellisesti täydellisellä, pelletöidyllä kaupallisella laboratoriojyrsijöiden ruokavaliolla (3,23 kcal/g, Altromin 1324, Lage, Saksa). Vesijohtovettä oli vapaasti saatavilla koko koemenettelyn ajan. Eläinlaboratoriossa toimi yleinen 12–12 valo-pimeä-jakso (valo syttyi klo 6.00).

Hiiret jaettiin neljään ryhmään:

1. Chow + LSD (n = 5)
2. HED & chow + LSD (n = 5)
3. HED & chow + saline (n = 5)
4. Chow + saline (n = 5).

Saline on fysiologinen suolaliuos (NaCl 0,9 %). LSD:n annos oli 625 µg/kg. Kaksi ryhmää, joiden ruokavalioon sisältyi HED (rasvainen ruoka 4.496 kcal/g, Altromin C1090-45, Lage, Germany), esivalmistettiin käyttämällä kaavaa, joka on esitetty kuvassa 6. Noudattamalla tätä ohjetta tutkittavilla hiirillä ilmenee ahmimisen kaltaista syömistä (engl. binge like eating).



Kuva 6. Menettely, jolla ahmimisen kaltaista syömistä simuloitiin hiirillä.

Ahmimisjakso toteutettiin kuvassa 6 esitetyllä tavalla antamalla hiirille ryhmästä kaksi ja kolme 48 tunnin vapaa valinta sekä tavallista ruokaa että rasvaista ruokaa, minkä jälkeen hiiret saivat vain tavallista ruokaa viiden päivän ajan. Kuu- dentena päivänä binge-koe aloitettiin; ensin punnittiin tutkittavat hiiret ja niille tarkoitetut ruoat. LSD:n ja suolaliuoksen injektiot ruiskutettiin klo 9.00. Vaikka suolaliuoksella ei ole mitään merkittävää vaikutusta, fysiologisen suolaliuoksen pistos on välttämätön, sillä pistos aiheuttaa hiirille stressiä, ja näin ollen pistos tarvittiin koeolosuhteiden järjestelyn kannalta mahdollisimman tasapuoliseksi. Binge-kokeen päättymisajaksi valittiin 1,5 tuntia, koska c-Fos-proteiinin ilmentyminen saavuttaa maksiminsa noin 60–90 minuutin kohdalla. Puolentoista tunnin kuluttua injektioiden antamisesta tutkittavien hiirien ruoan kulutus tarkistettiin punnitsemalla niiden ruoat ja sitten hiiret siirrettiin leikkaushuoneeseen näytteiden keräämistä varten.

### 3.3 Näytteiden keräys

Binge-kokeen jälkeen tutkittavat hiiret lopetettiin käyttäen hiilidioksidia. Kotihäkkiä käytettiin lopetuskammiona, ja sillä tavalla minimoitiin käsittelytarve ja stressi hiirillä. Hiilidioksidia johdettiin kotihäkkiin virtausnopeudella  $\approx 1,7$  litraa/minuutissa. Täyttönopeuden on oltava sellainen, että tajunnan menetys tapahtuu mahdollisimman nopeasti, jotta liian korkea CO<sub>2</sub>-pitoisuus ei aiheuta eläimelle liiallista ärsytystä tai kipua.

Leikkaushuoneessa hiirien kallot irrotettiin varovasti kirurgisilla saksilla ja pinsettillä. Aivot irrotettiin ja ne asetettiin välittömästi jäähdytettyyn 2-metyylibutaaniliuokseen pikajäädytystä varten noin kymmeneksi sekunniksi. Tämän jälkeen aivot siirrettiin kylmennetyille hiilidioksidijäällä metallilevyille jäätymään täydellisesti. Viimeisenä vaiheena kaikki aivonäytteet pakattiin, merkittiin ja vietiin pakastimeen -80 °C:n lämpötilaan.

### 3.4 Aivoleikkeiden tekeminen

Pakastetut aivonäytteet leikattiin kryostaatin avulla (Leica CM3050). Seuraava vaihe työssä oli immunohistologinen värjäys, jota varten leikkeiden paksuudeksi tarvittiin 14  $\mu\text{m}$ . Ennen työn aloittamista, pakastetut -80 °C:ssa olevat aivot laitettiin tunniksi kryostattiin sisään (lämpötila oli -20 °C), jotta lämpötila tasaantuisi. Yhteensä oli 20 aivonäytettä, joista jokaisesta aivonäytteestä otettiin 13 leikettä objektilasille tietyistä aivoalueista ja lisäksi 3 rinnakkaisnäytettä ennakoimattomien tapahtumien varalta. Aivoalueet valittiin tarkoituksella monista paikoista, jotta voitiin seurata missä c-Fos-ekspressiota esiintyy.

### 3.5 Immunohistokemiallinen värjäys

c-Fos-immunohistokemian värjäysmenetelmää käytettiin c-Fos-proteiinin ilmenemisen havaitsemiseen aivokudosnäytteistä. Se on epäsuora vasta-ainevärjäys, jossa on käytössä kaksi vasta-ainetta, joista toinen sitoutuu antigeneihin ja toinen sitoutuu saatuun antigeeni-vasta-ainekompleksiin. Kun c-Fos-proteiinia

sisältäviä kudoksenäytteitä inkuboidaan primaarivasta-aineliuoksessa, anti-c-Fos-vasta-aine (polyklonaalinen; valmistettu kaniinista) sitoutuu spesifisesti c-Fos-proteiiniin. Kun näytteitä inkuboidaan sekundaarivasta-aineliuoksessa, sekundaarinen vasta-aine, anti-kaniini-vasta-aine (valmistettu hevosesta), sitoutuu primaariseen vasta-aineeseen. Kemiallisessa reaktiossa DAB-Ni-liuoksen kanssa (3,3-diaminobentsidiini ja nikkeli) sekundaarivasta-aine ja sen biotinyloidut osat saavat aikaan havaittavan värimuutoksen, joka voidaan havaita valomikroskopilla.

Värjäysmenetelmä jakautuu kahdelle päivälle, joista kumpaankin sisältyy omat liuoksensa ja valmistelunsa. Pesujen varten tarvittava 1xTBS ja 0,05-prosenttinen Tween-20 seos sekä PFA-liuos (engl. Paraformaldehyde) valmistettiin etukäteen. Muiden värjäyksessä käytettyjen liuoksien oli oltava tuoreita, niiden valmistaminen oli nopeaa ja yksinkertaista. Liitteessä 1 on esitetty värjäyksessä käytetyt reagenssit ja niiden laimennokset. Tutkittavat aivokudoksenäytteet olivat objektilaseilla, ja ennen värjäyksen aloittamista objektilaseille piirrettiin reunat hydrofobisella kynällä. Täten pipetoitaessa objektilasille reagenssiliuokset eivät valu ulos. Tällaista menetelmää kutsutaan kuplatekniikaksi (kuva 7).



Kuva 7. Havainnollistava kuva värjäyksessä käytetystä kuplatekniikasta.

c-Fos-immunohistokemian värjäysmenetelmä aloitettiin inkuboimalla näytteet 10 minuuttia 4-prosenttisessä PFA-liuoksessa (fiksaatio vaihe). Inkuboinnin jälkeen näytteet pestiin 3 minuuttia TBS-T (1xTBS & 0,05 % Tween-20) -liuoksessa, pesut toistettiin 3 kertaa. Sitten suoritettiin endogeeninen peroksidaasin esto inkuboimalla näytteitä 15 minuuttia 1-prosenttisessä vetyperoksidi-metanoli-liuoksessa ja jälleen näytteet pestiin 3 kertaa 3 minuuttia. Tämän jälkeen näytteet inkuboitettiin 10-prosenttisessä normaalissa hevosseerumissa ja avidiinissa 15 minuutin ajan, mitä seurasi inkubointi yön yli kaniinin anti-c-Fos-primaarivasta-aineessa (Abcam, ab190289, Lot.GR3212874-1) neljän asteen lämpötilassa. Primaarivasta-aine seos sisälsi biotiinia, BSA:ta (engl. Bovine Serum Albumin) ja TBS-T:tä, laimennussuhde oli 1:2000.

Toinen vasta-ainevärjäys päivä aloitettiin pesemällä näytteet TBS-T-liuoksessa (3\*3 min), minkä jälkeen näytteet inkuboitettiin biotinyloidussa hevosen anti-kaaniini-sekundaarivasta-aineessa (Vector laboratories, BA-1100, Lot.ZA0319; Burlingame, USA) 30 minuutin ajan huoneenlämmössä. Sekundaarivasta-aine seos sisälsi BSA:ta ja TBS-T:tä, laimennussuhde oli 1:200. Seuraavassa vaiheessa pesut toistettiin uudelleen (3\*3min) ja ABC-kittiä käytettiin avidiini-biotiini-piparjuuriperoksidaasikompleksin muodostamiseen. Avidiini-biotiini-piparjuuri-peroksidaasikompleksissa näytteet inkuboitettiin 30 minuuttia, mitä seuraasi taas pesut TBS-T-liuoksessa (3\*3min). Seuraavassa vaiheessa muodostuneessa kompleksissa oleva piparjuuriperoksidaasi reagoi kromogeenin 3,3-diaminobentsidiinin (DAB) kanssa ja nikkelikloridin (Ni) lisäys johti harmaanmustaan reaktiotuotteen. DAB-Ni-kittiä käytettiin vasta-aineen ekspression ilmentämiseksi. Mitä kauemmin näytteitä inkuboidaan DAB-Ni:n seoksessa, sitä voimakkaampi värjäysreaktio on. Optimaaliseksi värjäysajaksi valittiin kokeilemalla ja tarkistamalla valomikroskoopilla 2,5 minuuttia. Kun tämä aika oli kulunut, näytteet upotettiin välittömästi milli-Q-veteen kahdeksi minuutiksi sekä suoritettiin pesut TBS-T-liuoksessa (2\*3 min).

Värjäyksen loppuunsaattamiseksi näytteet kuivattiin alkoholin nousevassa sarjassa 70 %, 96 % ja 100 %. Alkoholina käytettiin etanolia, näytteet upotettiin kahdesti kuhunkin liuokseen kahden minuutin ajan. Dehydraation jälkeen etanolin jäämiä poistettiin upottamalla näytteet histo-cleariin kolme kertaa kahden minuutin ajan. Viimeisenä vaiheena kuivatuille objektilaseille pipetoitiin mounting mediumia ja asetettiin peitinlasit paikoilleen.

### 3.6 Mikroskopointi

Värjätyt aivokudosnäytteet kuvannettiin valomikroskoopilla (Leica DMR, SN237017) ja LAS core -ohjelmalla. Yhteensä oli 20 objektilasia. Yhdellä objektilasilla oli 13 leikettä, jokainen leike sisälsi useita alueita, jotka kuvannettiin erikseen. Vaikka leikkeitä oli 13, niin tutkittavia alueita oli 30, koska yhdellä aivoleikkeellä oli useita alueita ja työn yhtenä aiheena oli katsoa missä c-Fos-solujen aktiivisuus ilmenee. Tutkittavat aivoalueet on lueteltu taulukossa 5.

Enimmäkseen käytettiin 10-kertaista suurennosta. 5-kertaista suurennosta käytettiin vain niillä aivoalueilla, jotka olivat tutkimuksen pääpaino lisätestausta varten, koska isommalla suurennoksella oli vaikeampi navigoida, kun etsitään tiettyjä aivoalueita. 5-kertaista suurennosta käytettiin aivoalueisiin, jotka kuuluivat syömiskäyttäytymiseen ja kylläisyyden säätelyyn.

### 3.7 Kuva-analyysi

Mikroskopoinnista saadut kuvat analysoitiin Fiji-ohjelman avulla, joka helpotti teollista kuva-analyysiä. Tehtävänä oli laskea hiirien aivoleikkeistä aktivoituneet c-Fos-solut eri aivoalueelta. Osittain c-Fos-soluja voitiin laskea manuaalisesti, mutta pääosin laskenta tapahtui Fiji-ohjelman avulla solujen ison määrän takia. Taulukossa 3 on esitetty käytetyt analyysissä ohjelman parametrit.

Taulukko 3. Fiji-ohjelmaparametrit.

Configuration	
Scale	pixels
Particle size	15–500
Threshold	80–100
Thresholding method	Yen/red

## 4 Tulokset

Tässä tutkimuksessa tutkittiin LSD:n vaikutuksia ruokahaluun ja hermosolujen aktivaatioon. Saatu data-aineisto analysoitiin tilastollisten testien avulla. Ruokintakokeiden analysointiin käytettiin t-testiä, ja ANOVA-testiä käytettiin analysoimaan hermosoluaktiivisuuden muutoksia eri ruokintaryhmien välillä.

### 4.1 LSD:n vaikutus ruokahaluun

Binge-kokeessa osallistui 20 hiirtä. Kymmenellä hiirillä oli ahmintatyypistä syömiskäyttäytymistä. Tälle ryhmälle annettiin rasvaista ruokaa (HED) ja kaksityypistä injektiota: LSD ja suolaliuos. Loput kymmenen hiirtä saivat vain tavallista

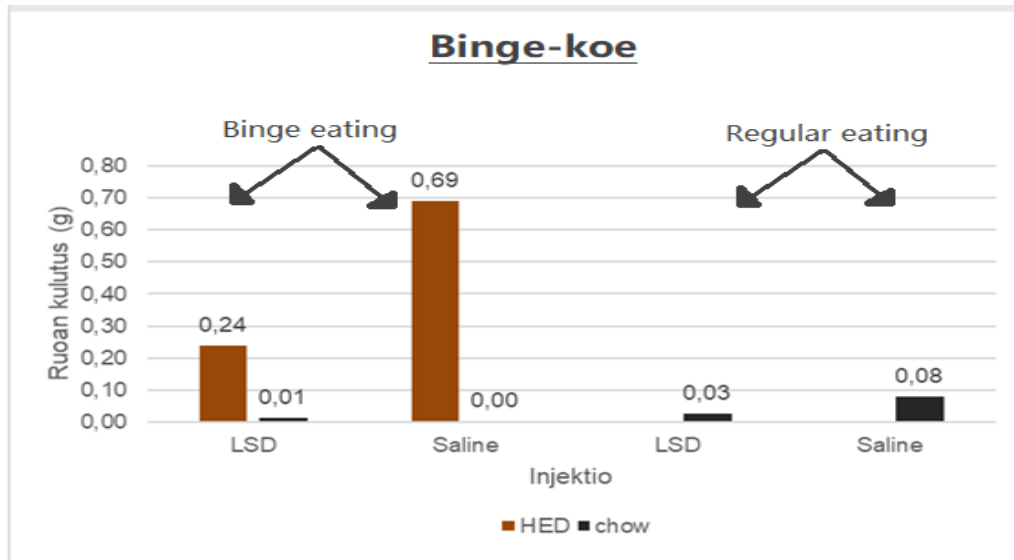
ruokaa (chow) ja samat injektiot kuin edellinen ryhmä. Taulukossa 4 on esitetty hiirien tiedot, ruoan kulutus 1,5 tunnin aikana sekä keskiarvo ja SEM-arvo (engl. Standard Error of Mean).

Taulukko 4. Hiirien tiedot, ruoan kulutus 1,5 tunnin aikana sekä keskiarvo ja SEM-arvo ruoankulutuksesta ryhmittäin.

ID	Hiiren paino (g)	Injektio	Ruoka	Kulutus chow 1,5 h (g)	Kulutus HED 1,5 h (g)	Ryhmiä keskiarvo ± SEM; n
1	31	LSD 625	HED/chow	0,00	0,50	0,24 ± 0,08 g; n=5 (HED)
2	31	LSD 625	HED/chow	0,04	0,20	
3	23	LSD 625	HED/chow	0,00	0,06	
4	24	LSD 625	HED/chow	0,02	0,33	
5	21	LSD 625	HED/chow	0,00	0,13	
6	29	Saline	HED/chow	0,02	0,98	0,69 ± 0,12 g; n=5 (HED)
7	28	Saline	HED/chow	0,00	0,94	
8	30	Saline	HED/chow	0,00	0,70	
9	23	Saline	HED/chow	0,00	0,34	
10	25	Saline	HED/chow	0,00	0,49	
11	24	LSD 625	Chow	0,01		0,03 ± 0,01 g; n=5 (chow)
12	30	LSD 625	Chow	0,02		
13	21	LSD 625	Chow	0,00		
14	31	LSD 625	Chow	0,02		
15	39	LSD 625	Chow	0,08		
16	22	Saline	Chow	0,13		0,08 ± 0,02 g; n=5 (chow)
17	29	Saline	Chow	0,06		
18	38	Saline	Chow	0,07		
19	32	Saline	Chow	0,03		
20	34	Saline	Chow	0,11		

Ennen binge-kokeen aloittamista hiiret ja niille tarkoitetut ruoat punnittiin, LSD:tä ja fysiologista suolaliuosta annettiin intraperitoneaalisesti. Kahdessa ensimmäisessä ryhmässä, jotka saivat sekä HED- että chow-ruokaa, ei ollut juuri lainkaan kosketusta chow-ruokaan, joten keskiarvoa ja SEM-arvoa chow-ruoasta ei laskettu. Hiiret, joilla oli ahmintatyyppistä syömiskäyttäytymistä, oli selvästi enemmän ruoan kulutusta, verrattuna ryhmään, jotka olivat saaneet vain tavalista ruokaa. Kuitenkin LSD:n vaikutus ruokahaluun oli selvästi näkyvässä eri ruokintaryhmien välillä. Niillä ryhmällä, jotka saivat LSD:tä ruoan kulutus

vähentyi melkein puolella, verrattuna ryhmään, jolla oli sama ruokintamalli, mutta injektiona ne saivat fysiologista suolaliuosta. Kuvassa 4 esitetty ruoan kulutuksen keskiarvot ryhmittäin.



Kuva 8. Binge-kokeessa ruoan kulutuksen keskiarvot ryhmittäin.

T-testien perusteella molempien ryhmien välillä ruoan kulutus erosi tilastollisesti merkitsevästi luottamustasolla 95 %, HED ryhmän p-arvo oli 0,0189 ja chow ryhmän p-arvo oli 0,0447.

#### 4.2 LSD:n vaikutus hermosolujen aktivaatioon

Binge-kokeessa osallistuneista hiiristä kerättiin aivoja. Kerätyt aivokudosnäytteet värjättiin c-Fos-immunohistokemian värjäysmenetelmän avulla. Värjätyt aivoleikkeet kuvattiin mikroskoopilla ja saaduista kuvista laskettiin c-Fos-soluja. Hermosolujen aktivaatiota tutkittiin aktivoituneiden c-Fos-solujen avulla. Alla olevassa taulukossa esitetty tiedot tutkittavasta aivoalueista, yhteinen keskiarvo ja SEM-arvo aktivoituneista c-fos-soluista neljästä hiiriryhmästä, joista jokaisessa ryhmässä oli 5 hiirtä.

Taulukko 5. Tiedot tutkittavasta aivoalueista, yhteinen keskiarvo ja SEM-arvo aktivoituneista c-fos-soluista neljästä hiiriryhmästä.

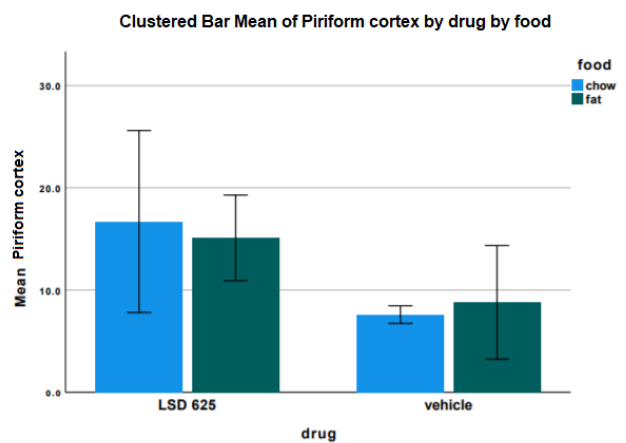
Aivoalueet	LSD + chow (n=5) Kes- kiarvo ± SEM	LSD + HED & chow (n=5) Kes- kiarvo ± SEM	Saline + chow (n=5) Kes- kiarvo ± SEM	Saline + HED & chow (n=5) Keskiarvo ± SEM
GrA (granule cell layer of the olfactory bulb)	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,7	3,3 ± 1,9	3,8 ± 1,7
Fmi (forceps minor of the corpus callosum, prelimbic area)	70,6 ± 11,6	44,7 ± 11,6	18,3 ± 4,1	23,2 ± 5,7
Orbitofrontal area	32,6 ± 7,5	27,1 ± 3,1	6,9 ± 1,9	8,7 ± 2,1
A24a (cingulate cortex)	51,6 ± 14,9	58,4 ± 6,7	36,8 ± 5,0	35,2 ± 7,4
Cpu (caudate putamen(striatum))	7,4 ± 1,0	6,1 ± 1,5	2,7 ± 1,3	3,7 ± 1,4
LSI (lateral septal nucleus, intermediate part)	35,8 ± 7,8	39,6 ± 6,1	27,4 ± 9,7	22 ± 4,9
Pir (piriform cortex)	16,7 ± 4,5	15,1 ± 2,1	7,6 ± 0,4	8,8 ± 2,8
AcbC (accumbens nucleus, core region)	6,6 ± 1,1	4,7 ± 1,6	2,3 ± 0,7	3,1 ± 0,6
NDB (diagonal band nucleus)	18 ± 2,1	18,2 ± 4,6	8,2 ± 3,9	7,0 ± 1,4
BNST (nucleus of stria terminalis)	22,2 ± 3,0	18,2 ± 1,9	13,4 ± 4,6	14,2 ± 4,3
MPO (medial preoptic nucleus)	13,4 ± 2,2	11,4 ± 1,6	5,8 ± 1,7	8,0 ± 1,6
LH (lateral hypothalamus)	6,6 ± 2,2	6,0 ± 1,8	2,1 ± 1,0	4,5 ± 1,7
ZI (zona incerta)	3,0 ± 0,7	3,4 ± 1,3	3,0 ± 1,3	2,2 ± 0,4
Pa (paraventricular hypothalamic nucleus)	32,4 ± 10,4	17,6 ± 5,2	10,4 ± 1,8	11,2 ± 6,8
PoDG (Granule cell layer of the dentate gyrus)	2,5 ± 0,8	2,2 ± 0,5	1,6 ± 0,4	2,2 ± 0,8
Hippocampus (CA1, CA2 & CA3)	2,9 ± 0,8	8,5 ± 1,8	5,5 ± 2,3	7,6 ± 1,0
PVT (paraventricular nucleus of the thalamus)	21,8 ± 3,7	17 ± 2,4	7,8 ± 1,8	14,8 ± 3,2
CeA (central amygdaloid nucleus)	15,6 ± 3,3	14,1 ± 1,1	5,6 ± 0,8	11,0 ± 2,8
VMH (ventromedial hypothalamus)	4,7 ± 1,1	2,0 ± 1,3	0,6 ± 0,2	4,3 ± 1,3
VPM (ventral posteromedial nucleus of the thalamus)	1,9 ± 0,9	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0 ± 0
PH (posterior hypothalamic nucleus)	12,1 ± 3,3	9,1 ± 2,1	11,5 ± 3,2	10,9 ± 2,8
SN (substantia nigra)	9,9 ± 2,7	8,1 ± 2,6	4,9 ± 2,4	8,1 ± 1,7
PAG (periaqueductal gray)	17,2 ± 3,0	15 ± 2,0	12,4 ± 4,3	17,6 ± 5,1
DRD (dorsal raphe nucleus)	11,0 ± 2,3	9,8 ± 1,9	10,2 ± 1,8	20,4 ± 5,6
PTg (pedunculotegmental nucleus)	2,5 ± 1,5	2,1 ± 0,4	1,0 ± 0,5	2,8 ± 0,5
MnR (median raphe nucleus)	5,2 ± 1,2	6,8 ± 1,8	4,2 ± 1,6	3,4 ± 0,7
LC (locus coeruleus)	3,2 ± 0,8	2,3 ± 0,9	1,1 ± 0,5	4,4 ± 1,4
LDTg (laterodorsal tegmental nucleus)	8,4 ± 1,9	3,9 ± 0,4	4,9 ± 1,2	4,6 ± 1,4
MVe (medial vestibular nucleus)	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,5	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,5
Sol (solitary nucleus)	7,6 ± 4,4	3,0 ± 1,7	0,8 ± 0,4	3,2 ± 2,2

Saatu data analysointiin kaksisuuntaisen varianssianalyysin avulla (engl. analysis of variance, ANOVA). ANOVAn avulla haluttiin selvittää LSD:n ja ruoan mahdollinen itsenäinen vaikutus sekä niiden yhdysvaikutus. Kuvassa 9 esitetty esimerkki ANOVA-analyysin tulos piriform cortex -alueesta. Kuvasta ja laske-  
tuista arvoista ilmeni, että LSD on lisännyt c-Fos-aktiivisuutta tilastollisesti mer-  
kitsevästi (paljon positiivisia soluja) tässä aivoalueessa verrattuna hiirillä, jotka  
olivat saaneet suolaliuosta (p-arvo = 0,015).

**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: Piriform cortex

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	16.700	9.9536	5
	fat	15.100	4.6824	5
	Total	15.900	7.3817	10
vehicle	chow	7.600	.9618	5
	fat	8.800	6.2109	5
	Total	8.200	4.2374	10
Total	chow	12.150	8.2126	10
	fat	11.950	6.1574	10
	Total	12.050	7.0653	20



**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Piriform cortex

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	306.450 <sup>a</sup>	3	102.150	2.546	.093
Intercept	2904.050	1	2904.050	72.375	.000
drug	296.450	1	296.450	7.388	.015
food	.200	1	.200	.005	.945
drug * food	9.800	1	9.800	.244	.628
Error	642.000	16	40.125		
Total	3852.500	20			
Corrected Total	948.450	19			

a. R Squared = .323 (Adjusted R Squared = .196)

Kuva 9. Piriform cortex -alueen ANOVA-analyysin tulos.

Yhteensä 10 aivoalueilla 30:stä oli tilastollisesti merkitsevä LSD-vaikutus (p-arvo < 0,05) (taulukko 6). Näiden alueiden analyysitulokset löytyvät liitteessä 2.

Taulukko 6. Kaikki tilastollisesti merkitsevät aivoalueet.

Aivoalue	Vaikutus	P-arvo
Fmi (forceps minor of the corpus callosum, prelimbic area)	drug	0,001
Orbitofrontal area	drug	0,000
Cpu (caudate putamen(striatum))	drug	0,015
Pir (piriform cortex)	drug	0,015
AcbC (accumbens nucleus, core region)	drug	0,014
NDB (diagonal band nucleus)	drug	0,005
MPO (medial preoptic nucleus)	drug	0,007
Hippocampus (CA1, CA2 & CA3)	food	0,028
PVT (paraventricular nucleus of the thalamus)	drug	0,013
CeA (central amygdaloid nucleus)	drug	0,011
VPM (ventral posteromedial nucleus of the thalamus)	drug	0,045
VMH (ventromedial hypothalamus)	drug AND food	0,008
LC (locus coeruleus)	drug AND food	0,041

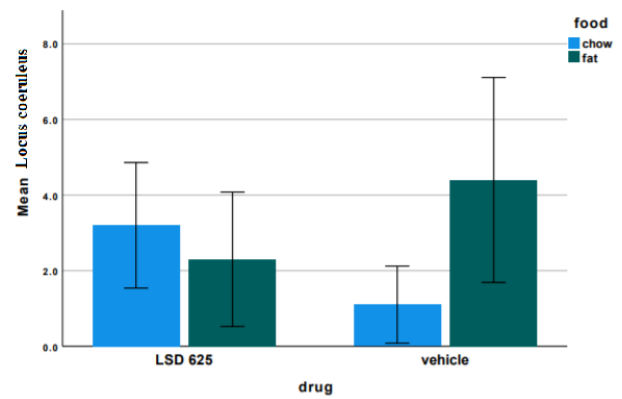
Tilastollisesti merkitsevä yhdysvaikutus oli kahdella aivoalueella, ventromedial hypothalamus -alueella ja locus coeruleus -alueella. Siis tässä tapauksessa sekä LSD että ruoka vaikuttavat yhdessä tulokseen yhdysvaikutuksen kautta. Yhdysvaikutuksen keskineliösumma oli selvästi suurin neliösummista, joten yhdysvaikutus on dominoiva tekijä. Kuvassa 10 esitetty tulos locus coeruleus -alueesta. VMH-alueen tulos liitteessä 2 (5).

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Locus coeruleus

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	3.200	1.8574	5
	fat	2.300	1.9875	5
	Total	2.750	1.8745	10
vehicle	chow	1.100	1.1402	5
	fat	4.400	3.0290	5
	Total	2.750	2.7714	10
Total	chow	2.150	1.8265	10
	fat	3.350	2.6568	10
	Total	2.750	2.3027	20

Clustered Bar Mean of Locus coeruleus by drug by food



### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Locus coeruleus

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	29.250 <sup>a</sup>	3	9.750	2.182	.130
Intercept	151.250	1	151.250	33.846	.000
drug	.000	1	.000	.000	1.000
food	7.200	1	7.200	1.611	.222
drug * food	22.050	1	22.050	4.934	.041
Error	71.500	16	4.469		
Total	252.000	20			
Corrected Total	100.750	19			

a. R Squared = .290 (Adjusted R Squared = .157)

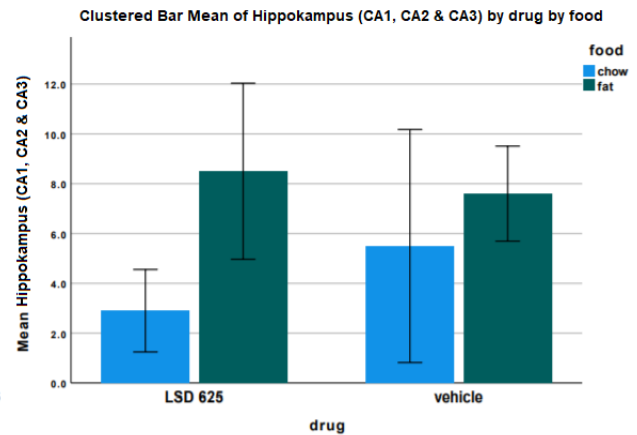
Kuva 10. Locus coeruleus -alueen ANOVA-analyysin tulos.

Ruoan vaikutus oli vain yhdellä hippokampus (CA1, CA2 & CA3) –alueella. Tämän alueen tulos esitetty alla olevassa kuvassa.

**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: Hippokampus (CA1, CA2 & CA3)

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	2.900	1.8507	5
	fat	8.500	3.9528	5
	Total	5.700	4.1446	10
vehicle	chow	5.500	5.2321	5
	fat	7.600	2.1331	5
	Total	6.550	3.9261	10
Total	chow	4.200	3.9455	10
	fat	8.050	3.0318	10
	Total	6.125	3.9533	20



**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Hippokampus (CA1, CA2 & CA3)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	93.038 <sup>a</sup>	3	31.013	2.434	.103
Intercept	750.313	1	750.313	58.877	.000
drug	3.613	1	3.613	.283	.602
food	74.113	1	74.113	5.816	.028
drug * food	15.313	1	15.313	1.202	.289
Error	203.900	16	12.744		
Total	1047.250	20			
Corrected Total	296.938	19			

a. R Squared = .313 (Adjusted R Squared = .185)

Kuva 11. Hippokampus alueen ANOVA-analyysin tulos.

Jäljellä olevilla 17 aivoalueella c-fos-solujen lukumäärä oli samalla tasolla kuin suolaliuosta saaneilla koe-eläimillä. Näille alueille LSD:llä eikä ruoalla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta.

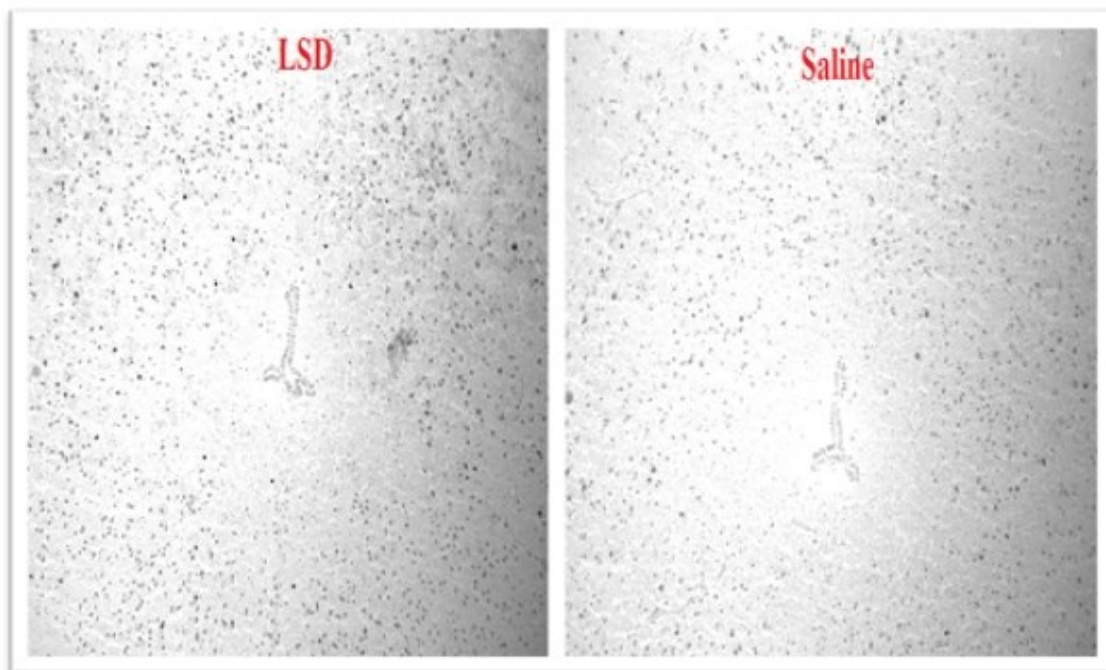
## 5 Yhteenveto ja pohdinta

Binge-kokeen tulosten perusteella voidaan sanoa, että tehdyssä kokeessa LSD on selkeästi vähentänyt ruokahalua sekä ahmintatyyppistä syömiskäyttäytymistä hiirillä, joille annettiin maukasta ruokaa, että normaalisti syövillä hiirillä, joille annettiin tavallista ruokaa. Myös LSD:n vaikutus hermosolujen aktivaatioon oli huomattava. Taulukossa 6 on lueteltu kaikki alueet, joilla LSD:n ja myös sen yhdysvaikutus ruoan kanssa olivat merkittäviä. Tässä tutkielmassa oltiin kiinnostuneita niistä alueista, jotka liittyvät kylläisyyden ja nälän tunteeseen. Koska aivojen eri alueet ovat vuorovaikutuksessa ja tekevät yhteistyötä aistimusten

tulkitsemiseksi ja käyttäytymisen luomiseksi, ei ole aina oikein erottaa tiettyjä alueita. Yritetään kuitenkin korostaa tärkeimpiä kiinnostavia aivoalueita, joilla oli tilastollisesti merkitsevää vaikutus. Esimerkiksi VMH liittyy syömiskäyttäytymisen ja kylläisyyden säätelyyn [44]. PVT-alueen neuronit vastaanottavat hypotalamuksesta, etuaivoista ja aivorungosta (kaudaalinen) useita tulosignaaleja, joiden tiedetään säätelevän syömiskäyttäytymistä [45]. Amygdalalla on tärkeä rooli oppimisessa tunnistamaan visuaalisia ärsykeitä, kuten esimerkiksi ruokaa [19, s.12]. Piriform cortex -alueella on ratkaiseva rooli hajujen erottelussa ja havaitsemisessa [46, s. 95]. Myös muilla aktivoituneilla aivoalueilla voi olla melkoinen vaikutus syömiskäyttäytymiseen, mutta ei niin suoraan.

Lateraalinen hypotalamus (LH) ja sen lähialueet eivät aktivoituneet, vaikka sen aktivoituminen oli odotettavissa, koska LH:ta pidetään tärkeimpänä ruoan saannin ohjauskeskuksena. Lisäksi aktivoituneiden c-Fos-solujen lukumäärissä oli suuri keskihajonta monissa aivojen osissa ryhmien välillä, mikä viittaa siihen, että tiedot ovat laajalle levinneitä ja näin ollen vähemmän luotettavia. Mikäli olisi mahdollista suurentaa koe-eläimien määrää kussakin ryhmässä (nyt koe-eläimiä oli viisi per ryhmä), niin saataisiin enemmän luotettavia tuloksia. Olisi myös mukavaa verrata tuloksia samankaltaiseen tai läheiseen tutkimukseen, mutta valitettavasti tällaista tutkimusta ei ole ainakaan vielä tehty.

Suhteessa c-fos-menetelmän toimivuuteen ja herkkyyteen tässä opinnäytetyössä tämä menetelmä vaikutti toimivan hyvin. Kokonaisuudessaan c-Fos-värijäys-prosessi ja solujen laskeminen toimi onnistuneesti. Käyttämällä tätä menetelmää tuloksena nähtiin, että LSD:tä saaneiden hiirten monilla tutkituilla aivoalueilla oli huomattavasti enemmän aktiivisia soluja (taulukko 5), kuin suolaliuosta saaneiden hiirten. Oli myös alueita, joissa ei ollut erikoista aktiivisuutta, vaan aktiivisuus oli samalla tasolla kuin suolaliuosta saaneilla koe-eläimillä. Ero oli hyvin havaittavissa mikroskoopilla (kuva 12).



Kuva 12. 10-kertaisella suurennoksella otettu kuva aivoleikkeen PAG-alueesta. Vasemmalla LSD:tä saanut hiiren aivokudosnäyte ja oikealla suolaliuosta saanut hiiren aivokudosnäyte.

Syömishäiriöt ovat yleistyneet maailmalla. Tilanne on vielä huonontunut julkisen internetin ja sosiaalisten verkostojen leviämisen jälkeen. Monet ihmiset ovat alkaneet kärsiä alemmuuskompleksista, jonka taustalla voi kehittyä masennus, ja se voi johtaa esimerkiksi siihen, että henkilö alkaa syödä ahnaasti, tai johonkin muuhun ääripäähän, jossa henkilö jatkuvasti rajoittaa syömistään, kuten anoreksian tapauksessa. Tässä tutkielmassa LSD näytti hyviä tuloksia ainakin ahmimishäiriön torjunnassa, joten näitä tutkimuksia olisi hyödyllistä jatkaa. Uutisissa kerrotaan usein LSD:n mikroannoksista, ja LSD:n mikroannos koostuu noin kymmenesosasta vapaa-ajan annoksesta (tavallisesti 10–20 mikrogrammaa), joka ei yleensä ole riittävän voimakas aiheuttamaan hallusinaatioita. Sen sijaan sen on raportoitu lisäävän valppautta, energiaa ja luovuutta. [47.] Kuitenkin tällä hetkellä psykedeelien käyttöönotto lääketieteessä ei ole vielä sujuvaa. Sääntelyviranomaiset pakottavat tutkijat hankkimaan lukuisia lisensejä ja lupia, mikä vie paljon aikaa, mutta LSD:n sovelluksille lääketieteessä voisi olla potentiaalia. Havaitut hoitotulokset ovat kiinnostusta herättäviä ja kannustavat

jatkotutkimuksiin. Psykedeelien vaikutusmekanismien parempi ymmärtäminen voisi avata mielenkiintoisia mahdollisuuksia eri lääketieteen aloilla.

## Lähteet

- 1 Farmakologian osaston tehtävät. Verkkoaineisto. Helsingin yliopisto. <<https://www2.helsinki.fi/fi/laaketieteellinen-tiedekunta/farmakologian-osasto>>. Luettu 9.4.2021
- 2 Antidepressive, anxiolytic, and antiaddictive effects of psychedelics. Verkkoaineisto. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4910400/>>. Luettu 15.7.2021
- 3 Elixir Finland. INFRAFRONTIER: hiirimalleista apua ihmisten tautien syntymekanismien selvittämiseen. Verkkoaineisto. <[https://www.elixir-finland.org/wp-content/uploads/2019/04/IF-oulu\\_SU.pdf](https://www.elixir-finland.org/wp-content/uploads/2019/04/IF-oulu_SU.pdf)>. Luettu 3.5.2021.
- 4 Raevuori, A. Syömishäiriöiden perinnöllinen tausta. Duodecim. 2013. Verkkoaineisto. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo11271>>. Luettu 21.7.2021.
- 5 Michel, D.M. & Willard, S.G. 2002. When dieting becomes dangerous: a guide to understanding and treating anorexia and bulimia. Yale University Press.
- 6 Strumia, R. 2013. Eating Disorders and the Skin. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 7 Duodecim Terveyskirjasto. Syömishäiriöt. 2015. Verkkoaineisto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/khp00109>>. Luettu 21.07.2021.
- 8 Barceloux, D.G. 2012. Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants. First Edition. John Wiley & Sons, Inc
- 9 Sessa, Ben, Worthley, Eileen. 2016. Psychedelic Drug Treatments: Assisting the Therapeutic Process. Mercury Learning & Information.
- 10 Exp Clin Psychopharmacol. Clinical Applications of Hallucinogens. 2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/libproxy.helsinki.fi/pmc/articles/PMC5001686/>>. Luettu 1.8.2021.
- 11 NIH. Psilocybin-assisted treatment for alcohol dependence: a proof-of-concept study. 2015. Verkkoaineisto. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/libproxy.helsinki.fi/25586396/>>. Luettu 12.8.2021.
- 12 NIH. Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: an open-label feasibility study. 2016. Verkkoaineisto. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/libproxy.helsinki.fi/27210031/>>. Luettu 12.8.2021.
- 13 NCBI. Safety and Efficacy of Lysergic Acid Diethylamide-Assisted Psychotherapy for Anxiety Associated with Life-threatening Diseases. 2014.

- Verkkoaineisto. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.libproxy.helsinki.fi/pmc/articles/PMC4086777/>>. Luettu 12.8.2021.
- 14 NCBI. The safety and efficacy of  $\pm$ 3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy in subjects with chronic, treatment-resistant post-traumatic stress disorder: the first randomized controlled pilot study. 2011. Verkkoaineisto. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.libproxy.helsinki.fi/pmc/articles/PMC3122379/>>. Luettu 12.8.2021.
  - 15 National Institutes of Health. NIH Image Gallery. 2016. Brain side view. Verkkoaineisto. <<https://www.flickr.com/photos/132318516@N08/24414866102/>>. Luettu 10.8.2021
  - 16 Ackerman, S. 1992. *Discovering the Brain*. National Academies Press, Washington (DC).
  - 17 Purves, Dale, S. Mark Williams. 2012. *Neuroscience*. 5th edition. Sinauer Associates, Inc.
  - 18 Young, John K. 2012. *Hunger, Thirst, Sex, and Sleep: How the Brain Controls Our Passions*. Lanham: Rowman & Littlefield Publishers.
  - 19 Sandler, M. Silverstone, T. 1985. *Psychopharmacology and Food*. British Association for Psychopharmacology. Oxford University Press.
  - 20 Nichols, C.D. Sandersbush, E. A single dose of lysergic acid diethylamide influences gene expression patterns within the mammalian brain. *Neuropsychopharmacology* vol. 26. 2002. Verkkoaineisto. <<https://www.nature.com/articles/1395848>>. Luettu 9.8.2021
  - 21 Barrett, F. Krimmel, S.R. Psilocybin acutely alters the functional connectivity of the claustrum with brain networks that support perception, memory, and attention. *NeuroImage* vol. 218. 2020. Verkkoaineisto. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811920304663?via%3Dihub>>. Luettu 9.8.2021.
  - 22 Lebedev, A.V. Kaelen, M. LSD-induced entropic brain activity predicts subsequent personality change. *Hum Brain Mapp*. 2016. Verkkoaineisto. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6867426/>>. Luettu 10.8.2021
  - 23 Carhart-Harris, R. L. Muthukumaraswamy, S. Neural correlates of the LSD experience revealed by multimodal neuroimaging. *Pnas*. 2016. Verkkoaineisto. <<https://www.pnas.org/content/113/17/4853#ack-1>>. Luettu 10.8.2021.
  - 24 Rang, H.P. Dale, M.M. 2008. *Rang & Dale's Pharmacology*. 6. painos. Churchill Livingstone, Elsevier

- 25 Barceloux, D.G. 2012. Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants. 1. painos. John Wiley & Sons, Inc.
- 26 World of molecules. LSD molecule. Verkkoaineisto. <<https://www.worldof-molecules.com/drugs/lsd.htm>>. Luettu 17.6.2021.
- 27 Pharmacological Reviews. Psychedelics. 2016. vol. 68. Verkkoaineisto. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/libproxy.helsinki.fi/pmc/articles/PMC4813425/?report=classic/>>. Luettu 17.6.2021.
- 28 ACS Chemical Neuroscience. Dark Classics in Chemical Neuroscience: Lysergic Acid Diethylamide (LSD). 2018. Verkkoaineisto. <<https://pubs-acs.org/libproxy.helsinki.fi/doi/pdf/10.1021%2Facschemneuro.8b00043>>. Luettu 13.6.2021.
- 29 NIH. LSD and structural analogs: pharmacological evaluation at D1 dopamine receptors. 1995. Verkkoaineisto. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7568626/>>. Luettu 13.6.2021.
- 30 CNS Neuroscience & Therapeutics. The Pharmacology of Lysergic Acid Diethylamide. 2008. Verkkoaineisto. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6494066/>>. Luettu 14.6.2021.
- 31 Chayat, G. Yedidya, A. 2012. Glutamate: Functions, Regulation and Disorders. Nova Biomedical; UK.
- 32 The journal of biological chemistry. Isolation and Characterization of a Nerve Growth Factor-regulated Fos Kinase from PC12 Cells. 1994. Vol. 269. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc
- 33 Journal of Neuroendocrinology. Measurement of Immediate-Early Gene Activation-c-fos and beyond. 2008. Vol 20. Blackwell Publishing Ltd
- 34 Neuron. Membrane Depolarization and Calcium Induce c-fos Transcription via Phosphorylation of Transcription Factor CREB. 1990. Vol 4. United States: Elsevier Inc.
- 35 Journal - Frontiers in Neuroendocrinology. c-Fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems. 1993. Volume 14. San Diego, CA: Elsevier Inc
- 36 Lacey, Alan J. 1999. Light microscopy in biology: a practical approach. 2nd edition. Oxford, England; New York: Oxford University Press.
- 37 Elsevier Science Publishers. Pathobiology of Human Disease. 2014. History of Immunohistochemistry. Verkkoaineisto. <[https://www.researchgate.net/publication/267751939\\_History\\_of\\_Immunohistochemistry#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/267751939_History_of_Immunohistochemistry#fullTextFileContent)>. Luettu 17.8.2021.

- 38 Consoli, D. Contarino, A. 2009. Binge-like eating in mice *The International journal of eating disorders*, Vol.42. Hoboken: Wiley Subscription Services.
- 39 Vicki M. Soukup M.S. 1990. Stress, coping style, and problem-solving ability among eating-disordered inpatients. *Journal of clinical psychology*. Vol.46. p.592–599. Brandon: Wiley Subscription Services.
- 40 *Physiology & Behavior*. A new animal model of binge eating: Key synergistic role of past caloric restriction and stress. 2002. Verkkoaineisto. <<https://www-sciencedirect-com.libproxy.helsinki.fi/science/article/pii/S0031938402008090>>. Luettu 2.8.2021.
- 41 *A research journal, Obesity*. A Model of Binge-Like Eating Behavior in Mice That Does Not Require Food Deprivation or Stress. 2012. Verkkoaineisto. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/oby.2010.46>>. Luettu 2.8.2021.
- 42 *Biological psychiatry journal*. Prefrontal and striatal dopamine metabolism during enhanced rebound hyperphagia induced by space restriction—a rat model of binge eating. 1998. Verkkoaineisto. <<https://www-sciencedirect-com.libproxy.helsinki.fi/science/article/pii/S0006322397005180>>. Luettu 2.8.2021.
- 43 *A research journal, Obesity*. Bingeing, Self-restriction, and Increased Body Weight in Rats with Limited Access to a Sweet-fat Diet. 2012. Verkkoaineisto. <<https://onlinelibrary-wiley-com.libproxy.helsinki.fi/doi/full/10.1038/oby.2008.328>>. Luettu 2.8.2021.
- 44 *Scientific reports*. Ventromedial hypothalamic nucleus in regulation of stress-induced gastric mucosal injury in rats. 2018. Verkkoaineisto. <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-28456-0>>. Luettu 15.9.2021.
- 45 *Frontiers in molecular neuroscience*. Anterior Paraventricular Thalamus to Nucleus Accumbens Projection Is Involved in Feeding Behavior in a Novel Environment. 2018. Verkkoaineisto. <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00202/full>>. Luettu 15.9.2021.
- 46 Larry R. Squire. 2009. *Encyclopedia of Neuroscience*. First edition. Elsevier science & technology. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- 47 *SpringerLink*. Microdosing psychedelics: personality, mental health, and creativity differences in microdosers. 2019. Verkkoaineisto. <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-018-5106-2>>. Luettu 16.9.2021.

## Immunohistokemiallinen värjäys

### c-Fos immunohistochemistry

#### Antibodies:

- **Primary antibody** - Rabbit anti c-Fos IgG (1 mg/ml) (*Abcam, Anti-c-Fos antibody ab190289, Lot.GR3212874-1*)
- **Secondary antibody** - Biotinylated horse anti-rabbit IgG [*Vector laboratories, BA-1100, Lot.ZA0319; Burlingame, CA, USA*]

#### Kits:

- **Avidin Biotin Blocking kit** [*Vector laboratories, SP-2001; Burlingame, CA, USA*]
- **Avidin – Biotin peroxidase complex kit** [*Vectastain Elite ABC kit; PK-6100, Vector laboratories; Burlingame, CA, USA*]
- **DABNi kit** [*Vector laboratories, SK-4100; Burlingame, CA, USA*]

<b>Procedure_1<sup>st</sup> Day</b>
-------------------------------------

#### Bubble technique → 500 µl / glass when full of sections

1. Bring slides to RT from -80C (open slide boxes only in -20C freezer or inside cryostat)
2. Mark the borders of the glasses with a hydrophobic barrier pen (use the Liquid Blocker Super Pap Pen)
3. Immerse in **4% PFA in 1xPBS** (jars; 10 min; **on ice**; in hood) → Fixation
4. Wash in **1xTBS & 0.05% Tween-20 (TBS-T)** (3 jars → **3 x 3min**; RT)
5. Immerse in **1% H2O2 & methanol** (jars; **15min**; RT) → Block endogenous peroxidase  
(= Peroxidase quenching)
6. Wash in **TBS-T** (3 jars → **3 x 3min**; RT)
7. Keep the tray humid by putting some 1x TBS-wet paper at the base of a tray. Move the glass slides onto the sticks inside the tray.
8. Incubate in **10% HS & Avidin (blocking kit) & TBS-T** (bubble = Pipette 500 µl / glass; 15min; RT) → Block endogenous protein
9. Suction away liquid in excess from the glass with vacuum (should not dry)
10. Incubate in **Primary antibody solution 1:2000. Antibody diluent (BSA+TBS-T) & Biotin & Rabbit anti c-Fos IgG**; (bubble= Pipette 500 µl/glass; **O/N**; **+4C** OR 60-120min; RT)

Note: you may leave the slides in TBS-T for longer time, for example if you are working with more slides, consider the time you might need when you suction away the excess liquid.

<b>Procedure_2<sup>nd</sup> Day</b>
-------------------------------------

**Bubble technique → 500µl / glass when full of sections**

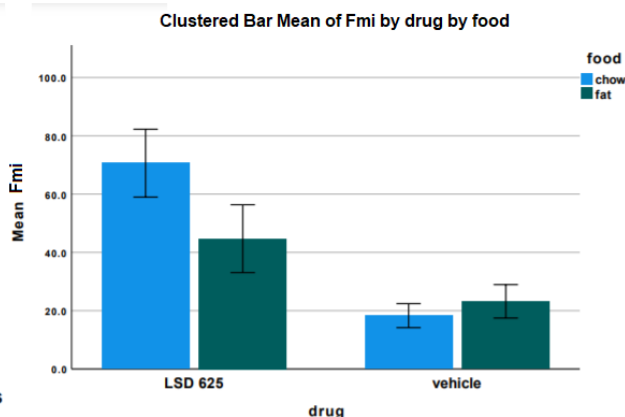
1. Wash in **TBS-T** (jars; **3 x 3min**; RT)
2. Incubate in **Secondary antibody solution 1:200. Biotinylated horse anti-rabbit IgG & Antibody diluent** (bubble; **30min**, can wait till 1h; RT)
3. Wash in **TBS-T** (jars; **3 x 3min**; RT)
4. Incubate in **Avidin/Biotin peroxidase complex** (bubble; **30min**, can wait till 1h; RT)
5. Wash in **TBS-T** (jars; **3 x 3min**; RT)
6. Stain with **DABNi kit (nickel-intensified diaminobenzadine)** (bubble; 5-6 min, time needs to be tested before hand; RT)
7. Immerse immediately in **mQ H2O** (jar; 2min; RT)
8. Wash in **TBS-T** (jars; **2 x 3min**; RT), or longer
9. Wash in **mQ H2O** (3x jars; 3 x 2min; RT; fumehood)
10. Wash in **70% EtOH** (2x jars; 2 x 2min; RT; fumehood)
11. Wash in **96% EtOH** (2x jars; 2 x 2min; RT; fumehood)
12. Wash in **100% EtOH** (2x jars; 2 x 2min; RT; fumehood)
13. Wash in **Histoclear** (2x jars; 2 x 2min; RT; fumehood)

Coverslip with **DPX mounting medium** (RT; fumehood; use a clean disposable glass/plastic pipette, discard the pipette after use)

## Kaksisuuntaisen ANOVAn tulokset

- Fmi (Forceps Minor of the Corpus Callosum, Prelimbic area):

Descriptive Statistics				
Dependent Variable: Fmi				
drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	70.600	26.0202	5
	fat	44.700	26.0207	5
	Total	57.650	28.0744	10
vehicle	chow	18.300	9.2168	5
	fat	23.200	12.8384	5
	Total	20.750	10.8481	10
Total	chow	44.450	33.1432	10
	fat	33.950	22.4183	10
	Total	39.200	28.0607	20

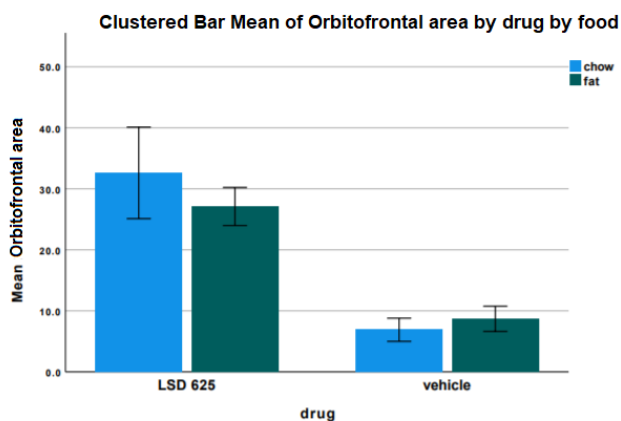


Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Fmi					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8545.100 <sup>a</sup>	3	2848.367	7.104	.003
Intercept	30732.800	1	30732.800	76.645	.000
drug	6808.050	1	6808.050	16.979	.001
food	551.250	1	551.250	1.375	.258
drug * food	1185.800	1	1185.800	2.957	.105
Error	6415.600	16	400.975		
Total	45693.500	20			
Corrected Total	14960.700	19			

a. R Squared = .571 (Adjusted R Squared = .491)

- Orbitofrontal area:

Descriptive Statistics				
Dependent Variable: Orbitofrontal area				
drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	32.600	16.7683	5
	fat	27.100	6.9946	5
	Total	29.850	12.4545	10
vehicle	chow	6.900	4.2485	5
	fat	8.700	4.6179	5
	Total	7.800	4.2895	10
Total	chow	19.750	17.7893	10
	fat	17.900	11.1923	10
	Total	18.825	14.4962	20



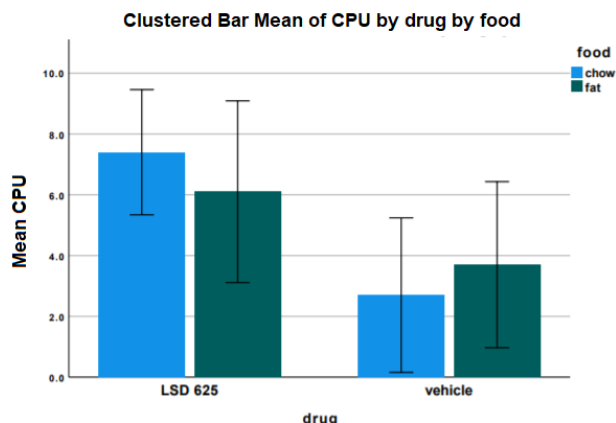
Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Orbitofrontal area					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2514.737 <sup>a</sup>	3	838.246	9.075	.001
Intercept	7087.613	1	7087.613	76.732	.000
drug	2431.012	1	2431.012	26.319	.000
food	17.113	1	17.113	.185	.673
drug * food	66.613	1	66.613	.721	.408
Error	1477.900	16	92.369		
Total	11080.250	20			
Corrected Total	3992.638	19			

a. R Squared = .630 (Adjusted R Squared = .560)

- Cpu (Caudate Putamen)

**Descriptive Statistics**  
Dependent Variable: CPU

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	7.400	2.3022	5
	fat	6.100	3.3429	5
	Total	6.750	2.7914	10
vehicle	chow	2.700	2.8417	5
	fat	3.700	3.0537	5
	Total	3.200	2.8304	10
Total	chow	5.050	3.4757	10
	fat	4.900	3.2728	10
	Total	4.975	3.2866	20



**Tests of Between-Subjects Effects**  
Dependent Variable: CPU

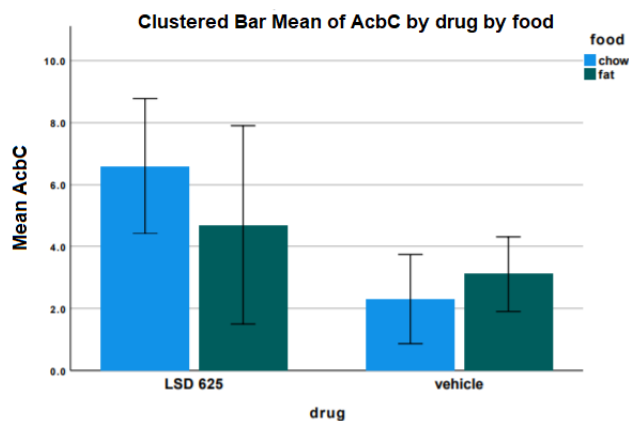
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	69.738 <sup>a</sup>	3	23.246	2.745	.077
Intercept	495.013	1	495.013	58.452	.000
drug	63.013	1	63.013	7.441	.015
food	.113	1	.113	.013	.910
drug * food	6.613	1	6.613	.781	.390
Error	135.500	16	8.469		
Total	700.250	20			
Corrected Total	205.238	19			

a. R Squared = .340 (Adjusted R Squared = .216)

- AcbC (Accumbens Nucleus, Core region)

**Descriptive Statistics**  
Dependent Variable: AcbC

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	6.600	2.4341	5
	fat	4.700	3.5812	5
	Total	5.650	3.0555	10
vehicle	chow	2.300	1.6047	5
	fat	3.100	1.3416	5
	Total	2.700	1.4568	10
Total	chow	4.450	2.9856	10
	fat	3.900	2.6854	10
	Total	4.175	2.7781	20



**Tests of Between-Subjects Effects**  
Dependent Variable: AcbC

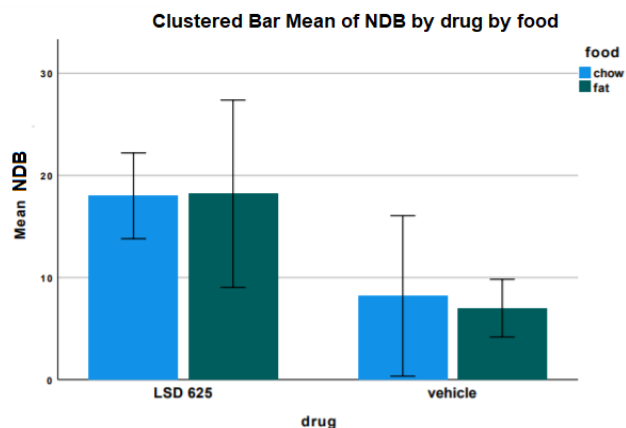
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	54.138 <sup>a</sup>	3	18.046	3.121	.055
Intercept	348.613	1	348.613	60.301	.000
drug	43.513	1	43.513	7.526	.014
food	1.513	1	1.513	.262	.616
drug * food	9.113	1	9.113	1.576	.227
Error	92.500	16	5.781		
Total	495.250	20			
Corrected Total	146.638	19			

a. R Squared = .369 (Adjusted R Squared = .251)

- NDB (Diagonal Band Nucleus)

**Descriptive Statistics**  
Dependent Variable: NDB

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	18.00	4.690	5
	fat	18.20	10.257	5
	Total	18.10	7.520	10
vehicle	chow	8.20	8.786	5
	fat	7.00	3.162	5
	Total	7.60	6.257	10
Total	chow	13.10	8.412	10
	fat	12.60	9.276	10
	Total	12.85	8.622	20



**Tests of Between-Subjects Effects**  
Dependent Variable: NDB

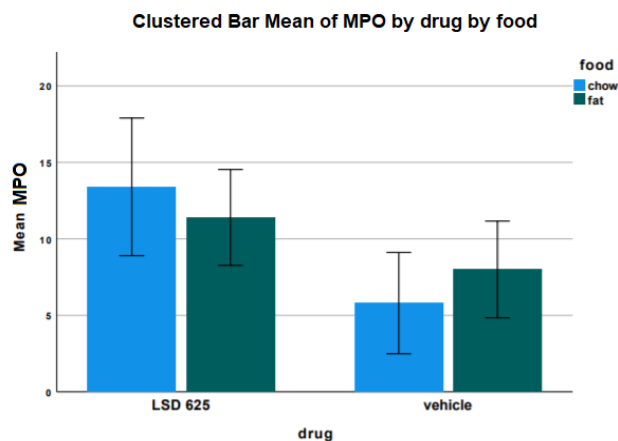
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	554.950 <sup>a</sup>	3	184.983	3.451	.042
Intercept	3302.450	1	3302.450	61.613	.000
drug	551.250	1	551.250	10.285	.005
food	1.250	1	1.250	.023	.881
drug * food	2.450	1	2.450	.046	.833
Error	857.600	16	53.600		
Total	4715.000	20			
Corrected Total	1412.550	19			

a. R Squared = .393 (Adjusted R Squared = .279)

- MPO (Medical Preoptic Nucleus)

**Descriptive Statistics**  
Dependent Variable: MPO

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	13.40	5.030	5
	fat	11.40	3.507	5
	Total	12.40	4.222	10
vehicle	chow	5.80	3.701	5
	fat	8.00	3.536	5
	Total	6.90	3.604	10
Total	chow	9.60	5.777	10
	fat	9.70	3.773	10
	Total	9.65	4.749	20



**Tests of Between-Subjects Effects**  
Dependent Variable: MPO

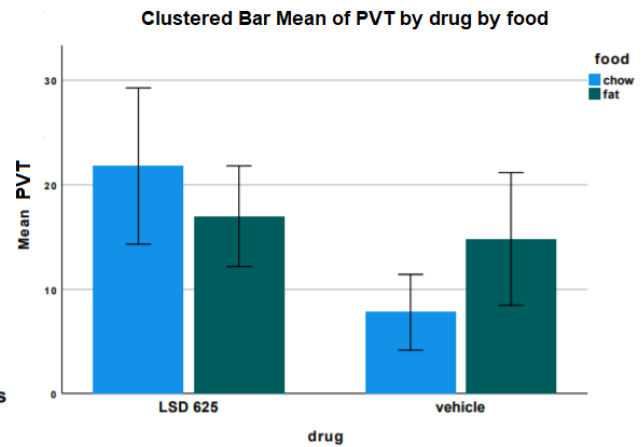
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	173.350 <sup>a</sup>	3	57.783	3.623	.036
Intercept	1862.450	1	1862.450	116.768	.000
drug	151.250	1	151.250	9.483	.007
food	.050	1	.050	.003	.956
drug * food	22.050	1	22.050	1.382	.257
Error	255.200	16	15.950		
Total	2291.000	20			
Corrected Total	428.550	19			

a. R Squared = .405 (Adjusted R Squared = .293)

- PVT (Paraventricular Nucleus of the Thalamus)

**Descriptive Statistics**  
Dependent Variable: PVT

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	21.80	8.349	5
	fat	17.00	5.385	5
	Total	19.40	7.090	10
vehicle	chow	7.80	4.087	5
	fat	14.80	7.120	5
	Total	11.30	6.601	10
Total	chow	14.80	9.636	10
	fat	15.90	6.064	10
	Total	15.35	7.856	20



**Tests of Between-Subjects Effects**  
Dependent Variable: PVT

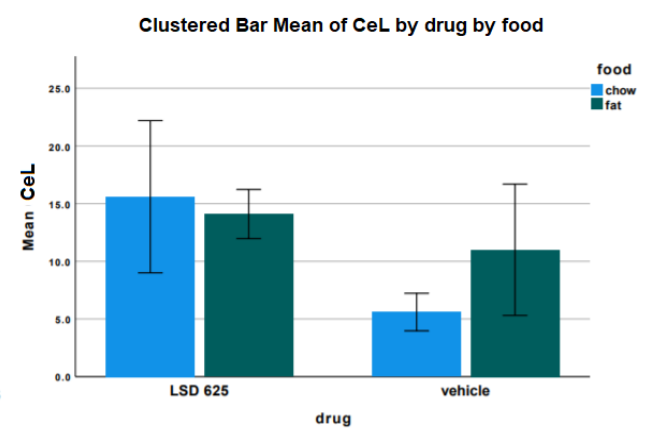
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	508.150 <sup>a</sup>	3	169.383	4.079	.025
Intercept	4712.450	1	4712.450	113.485	.000
drug	328.050	1	328.050	7.900	.013
food	6.050	1	6.050	.146	.708
drug * food	174.050	1	174.050	4.191	.057
Error	664.400	16	41.525		
Total	5885.000	20			
Corrected Total	1172.550	19			

a. R Squared = .433 (Adjusted R Squared = .327)

- CeL (Central Amygdaloid Nucleus)

**Descriptive Statistics**  
Dependent Variable: CeL

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	15.600	7.3773	5
	fat	14.100	2.3822	5
	Total	14.850	5.2284	10
vehicle	chow	5.600	1.8166	5
	fat	11.000	6.3640	5
	Total	8.300	5.2504	10
Total	chow	10.600	7.3098	10
	fat	12.550	4.8158	10
	Total	11.575	6.1071	20



**Tests of Between-Subjects Effects**  
Dependent Variable: CeL

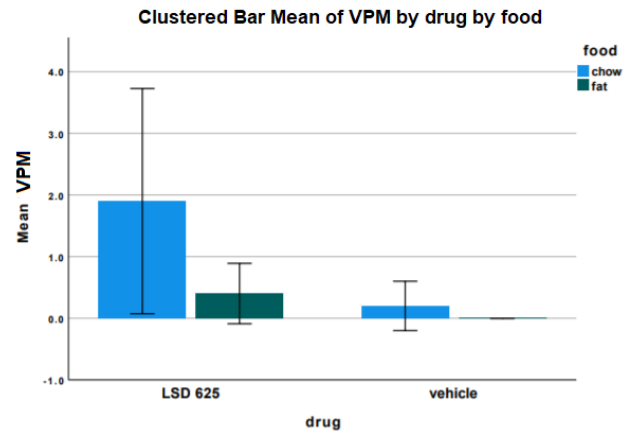
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	293.037 <sup>a</sup>	3	97.679	3.761	.032
Intercept	2679.613	1	2679.613	103.161	.000
drug	214.513	1	214.513	8.258	.011
food	19.013	1	19.013	.732	.405
drug * food	59.513	1	59.513	2.291	.150
Error	415.600	16	25.975		
Total	3388.250	20			
Corrected Total	708.638	19			

a. R Squared = .414 (Adjusted R Squared = .304)

- VPM (Ventral Posteromedial Nucleus of the Thalamus)

**Descriptive Statistics**  
Dependent Variable: VPM

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	1.900	2.0433	5
	fat	.400	.5477	5
	Total	1.150	1.6168	10
vehicle	chow	.200	.4472	5
	fat	.000	.0000	5
	Total	.100	.3162	10
Total	chow	1.050	1.6575	10
	fat	.200	.4216	10
	Total	.625	1.2553	20



**Tests of Between-Subjects Effects**  
Dependent Variable: VPM

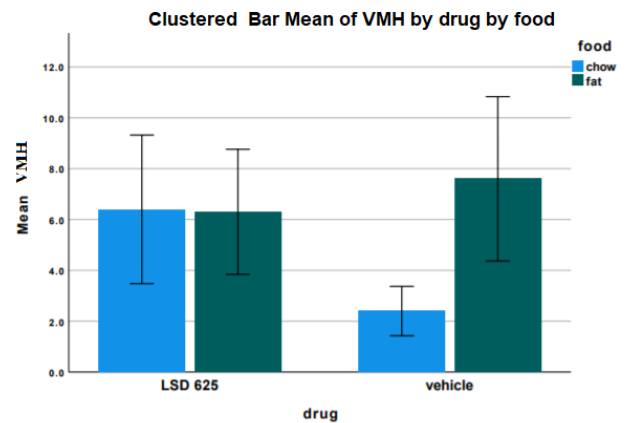
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	11.237 <sup>a</sup>	3	3.746	3.205	.051
Intercept	7.813	1	7.813	6.684	.020
drug	5.513	1	5.513	4.717	.045
food	3.613	1	3.613	3.091	.098
drug * food	2.113	1	2.113	1.807	.198
Error	18.700	16	1.169		
Total	37.750	20			
Corrected Total	29.937	19			

a. R Squared = .375 (Adjusted R Squared = .258)

- VMH (Ventromedial Hypothalamus)

**Descriptive Statistics**  
Dependent Variable: VMH

drug	food	Mean	Std. Deviation	N
LSD 625	chow	6.400	3.2673	5
	fat	6.300	2.7523	5
	Total	6.350	2.8485	10
vehicle	chow	2.400	1.0840	5
	fat	7.600	3.6125	5
	Total	5.000	3.7193	10
Total	chow	4.400	3.1163	10
	fat	6.950	3.1042	10
	Total	5.675	3.2978	20



**Tests of Between-Subjects Effects**  
Dependent Variable: VMH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	76.737 <sup>a</sup>	3	25.579	3.151	.054
Intercept	644.113	1	644.113	79.336	.000
drug	9.113	1	9.113	1.122	.305
food	32.513	1	32.513	4.005	.063
drug * food	35.113	1	35.113	4.325	.054
Error	129.900	16	8.119		
Total	850.750	20			
Corrected Total	206.637	19			

a. R Squared = .371 (Adjusted R Squared = .253)