

SAVONIA

ammattikorkeakoulu

OPINNÄYTETYÖ - YLEMPI AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

MIKROGLIASOLUJEN FLUORESENSSIVÄRJÄYKSET HIIREN KELLUVISTA AIVOKUDOSLEIKKEISTÄ

Immunohistokemiallinen värjäysmenetelmä osana
Alzheimerin taudin tutkimusta

TEKIJÄ Petra Mäkinen

SAVONIA-AMMATTIKORKEAKOULU OPINNÄYTETYÖ

Tiivistelmä

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala			
Tutkinto-ohjelma Bioanalytiikan kliinisen asiantuntijan tutkinto-ohjelma / Radiografian kliinisen asiantuntijan tutkinto-ohjelma			
Työn tekijä(t) Petra Mäkinen			
Työn nimi Mikrogliaisolujen fluoresenssivärjäykset hiiren kelluvista aivokudosleikkeistä - Immunohistokemiallinen värjäysmenetelmä osana Alzheimerin taudin tutkimusta			
Päiväys	04.05.2023	Sivumäärä/Liitteet	43
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Itä-Suomen yliopisto, Biolääketieteen yksikkö, Molekyyligenetiikan laboratorio			
Tiivistelmä Alzheimerin tauti (AT) on yleisin dementoiva sairaus maailmassa ja sairastuvuus lisääntyy dramaattisesti väestön ikääntyessä. Tällä hetkellä tähän kuolemaan johtavaan sairauteen ei ole parantavaa tai sitä estävää hoitoa. Nykytietämyksen mukaan, sairauteen liittyvät patologiset muutokset alkavat jo parikymmentä vuotta ennen ensimmäisiä näkyviä oireita ja sairaus etenee vaiheittain kohti hermosolujen tuhoa. GWAS (genome-wide association studies) tutkimusmenetelmien myötä uusia Alzheimerin taudin riskiä lisääviä tai sitä vähentäviä riskigeenejä on löytenyt. Monet niistä ilmestyvät mikroglia soluissa. Tähän pohjautuen PLCy2 (Fosfolipaasi C Gamma 2) - entsyymiä koodaava <i>PLCG2</i> geeni on tärkeä, sillä sen harvinainen variantti, P522R, ehkäisee riskiä sairastua AT:in ja muihin hermorappeumasairauksiin. Merkittävää on myös, että <i>PLCy2</i> P522R-variantti lisää tervettä vanhenemista ja pidentää elinikää. Lisäksi tämän suojaavan variantin toiminnan tutkiminen mikroglia soluissa voi avata uusia mahdollisuuksia AT parempaan diagnostiikkaan ja hoitoon tulevaisuudessa. Tämä opinnäytetyö oli tutkimuksellista kehittämistä ja pohjautui Itä-Suomen yliopistossa meneillään olevan PLCy2-P522R hankkeen immunohistokemialliseen osioon. Työn tarkoituksena oli kehittää hiiren kelluvien aivokudosleikkeiden värjäyspiste valmistamalla aivokudosleikkeitä ja värjäämällä ne immunohistokemiallisesti mikroglia soluille spesifisillä fluoresoivilla vasta-aineilla. Opinnäytetyön tavoitteena oli saada tietoa suojaavan variantin P522R toiminnasta ja aineenvaihdunnasta mikroglia soluissa hyödyntämällä työssä kehitettyä värjäysmenetelmää. Opinnäytetyön aikana testatut kelluvien leikkeiden mikroglia solujen värjäykset onnistuivat hyvin ja alustavat tulokset ovat yhteneväiset muihin suojaavan P522R variantin tutkimuksiin verrattuna. Kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmän pystytys ja käyttöönotto palvelee molekyyligenetiikan tutkimusryhmän tarpeita ja tuo käyttökelpoisen lisän ryhmän monipuolisiin tutkimusmenetelmiin.			
Avainsanat Alzheimerin tauti, mikroglia, PLCy2, fluoresenssivärjäykset, kelluvat leikkeet, validointi			

Field of Study Social Services, Health and Sports	
Degree Programme Master's Degree Programme in Biomedical Laboratory Science / Master's Degree Programme in Radiography	
Author(s) Petra Mäkinen	
Title of Thesis Fluorescence stainings of the microglia cells in mouse free floating brain sections – Immunohistochemical staining method as part of research in Alzheimer´s disease	
Date 04.05.2023	Pages/Appendices 43
Client Organisation /Partners University of Eastern Finland (UEF), Institute of Biomedicine, Laboratory of Molecular Genetics	
<p>Abstract</p> <p>Alzheimer´s disease (AD) is the most common cause of dementia worldwide and its prevalence increases dramatically due to aging of the population. Currently, there are no treatments or prevention for this devastating disease. It is well-established that AD starts long before the first notable clinical symptoms, even twenty years earlier, and slowly proceeds towards neurodegeneration.</p> <p>New gene variants that increases or decreases the risk of AD have been recently found owing to large scale genome-wide association studies. Many of these risk genes are expressed preferentially or selectively in the microglia cells. In this context, <i>PLCG2</i> encoding for PLCy2 (Phospholipase C Gamma 2) is extremely important as the rare variant P522R in <i>PLCG2</i> reduces the risk of AD and other neurodegenerative diseases. Importantly, <i>PLCG2</i> P522R variant also increases healthy aging and longevity. Thus, functional characterization of this protective variant in microglia cells may open new avenues to develop better diagnostic tools as well as treatment strategies for AD in the future.</p> <p>This thesis was set to develop methodological aspects related to PLCy2-based immunohistochemistry (IHC) and it integrates to the ongoing PLCy2 research conducted in the University of Eastern Finland (UEF). The goal of this thesis was to establish a reliable staining protocol for free floating sections originating from the mouse brain tissue and stain those IHC sections with microglia-specific, fluorescently labeled antibodies. Collectively, this thesis focused on retrieving new information related to functions and metabolism of protective P522R variant in microglia cells by applying developed IHC protocols.</p> <p>The developed IHC staining protocols worked well, and the preliminary data obtained during thesis process were similar to those obtained in the other studies focused on protective P522R variant. The developed IHC protocols will be integrated to the methodological toolbox of the molecular genetics group at UEF to be applied also in the future studies.</p>	
<p>Keywords</p> <p>Alzheimer´s Disease, microglia, PLCy2, fluorescence stainings, free floating sections, validation</p>	

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	7
2	OPINNÄYTETYÖN TEOREETTINEN VIITEKEHYS	8
2.1	Alzheimerin tauti.....	8
2.1.1	Taudin historiaa.....	8
2.1.2	Keskeiset patologiset muutokset aivoissa	8
2.1.3	Alzheimerin taudin riskitekijät.....	10
2.2	Mikroglia-solut	11
2.2.1	Mikroglia-solujen aktivaatio	11
2.2.2	Mikroglia-solujen rooli Alzheimerin taudissa	12
2.2.3	<i>PLCG2</i> ja suojaava variantti <i>Plcy2-P522R</i>	13
2.3	Immunohistokemialliset värjäykset.....	14
2.4	Kelluvien kudokset värjäysmenetelmän soveltavuuteen vaikuttavia tekijöitä	14
3	OPINNÄYTETYÖN TAUSTA, TARKOITUS JA TAVOITE	17
4	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	18
4.1	Tutkimuksellisen kehittämistyön määrittely	18
4.2	Opinnäytetyön prosessi	19
4.3	Opinnäytetyön tutkimusaineisto	19
4.4	Kelluvien leikkeiden valmistaminen.....	20
4.5	Leikkeiden värjäys fluoresoivilla vasta-aineilla	23
4.5.1	X-34 + Iba1 + 22C11 + TO-PRO™Iodide värjäys	25
4.5.2	Iba1 + GFAP + DAPI värjäys	25
4.5.3	Iba1 + CD68 + DAPI värjäys	26
4.5.4	Iba1 + BODIPY + DAPI värjäys	26
5	TUTKIMUKSEN TULOKSET	28
6	POHDINTA.....	33
6.1	Opinnäytetyön merkitys.....	33
6.2	Ammatillinen kehittyminen	34
6.3	Tutkimuksen eettisyys ja luotettavuus	35
6.4	Värjäysmenetelmän haasteet	36
6.5	Tulevaisuuden näkymät.....	37
	LÄHTEET	39

KUVALUETTELO

KUVA 1. Tautiprosessien aika-akseli (Tanila, Hiltunen & Myllykangas 2018, 2516)	9
KUVA 2. Patologiset muutokset AT:ssa ja niihin liitetyt biomarkkerit (Villa ym. 2020, 2).....	10
KUVA 3. Mikroglion morfologiset muutokset (Streit ym. 2014, 6)	12
KUVA 4. Menetelmän pystytykseen käytettyä välineistöä (Mäkinen 2022, BY)	21
KUVA 5. Kelluvien leikkeiden valmistus- ja värjäysprosessi (Mäkinen 2023, BY).....	22
KUVA 6. Testivärjäyksissä käytetty PLCy2-tutkimuksen hiirineisto (Mäkinen 2023, BY)	23
KUVA 7. Testatut primääri- ja sekundaarivasta-aineet laimennoksineen (Mäkinen 2023, BY).....	24
KUVA 8. PLCy2 hiirineiston beeta-amyloidiplakkien testivärjäys sitraattikeitolla (Takalo 2023, BY).....	29
KUVA 9. PLCy2 hiirineiston Iba1, GFAP ja DAPI värjäys 1:500 ilman sitraattikeittoa (Takalo 2023, BY).....	29
KUVA 10. Iba1, GFAP ja DAPI värjäys 1:1000 ilman sitraattikeittoa (Takalo 2022, BY).....	29
KUVA 11. Iba1, GFAP ja DAPI värjäys testattuna sitraattikeitolla (Takalo 2022, BY).....	30
KUVA 12. Mikroglia ja lysosomit (Kemppainen 2022, BY)	30
KUVA 13. Aktiivisten mikroglia-solujen sisällä olevia lysosomeja (Kemppainen 2022, BY).....	30
KUVA 14. Rasvapisaroita mikroglia-solun sisällä (Martiskainen 2022, BY)	31
KUVA 15. Verisuonten autofluoresenssista johtuvaa artefaktia (Martiskainen 2022, BY)	31
KUVA 16. Parhaimman tuloksen antaneet vasta-ainelaimennokset (Mäkinen 2023, BY)	32

SANASTO- JA LYHENNELUETTELO

<i>APOE</i>	Apoliproteiini E:tä tuottava geeni
ApoE	Apoliproteiini E
<i>APP</i>	Amyloidiprekursori geeni
APP	Amyloidiprekursori proteiini
AT	Alzheimerin tauti
DAM	Sairauksiin liitetty mikroglia (eng. disease-associated microglia)
EOAD	Varhainen AT <65 vuotta (eng. early onset Alzheimer´s Disease)
GWAS	Koko genomin kattava assosiaatiotutkimus (eng. Genome-wide association studies)
LOAD	Myöhäisiän AT >65 vuotta (eng. Late Onset Alzheimer´s Disease)
<i>P522R</i>	rs72824905, p.P522R, suojaava variantti
<i>PLCG2</i>	Fosfolipaasi C gamma 2 geeni
PLCy2	Fosfolipaasi C gamma 2 proteiini
<i>PSEN1</i>	Preseniliini1 geeni
<i>PSEN2</i>	Preseniliini 2 geeni
SNP	Yhden nukleotidin polyformismi (eng. Single Nukleotide Polyformism)
TREM2	eng. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2

1 JOHDANTO

Maailmassa arvellaan tällä hetkellä olevan yli 50 miljoonaa dementiaa sairastavaa ihmistä ja määrä kasvaa noin 10 miljoonalla vuosittain. Väestön ikääntyessä muistisairaudet lisääntyvät räjähdysmäisesti; vuoteen 2030 mennessä 82 miljoonan ja vuoteen 2050 peräti 152 miljoonan ihmisen on arvioitu sairastuvan johonkin aivoja rappeuttavaan sairauteen. (WHO 2022.) Tällä on valtava taloudellinen merkitys maailmanlaajuisesti. Alzheimerin tauti (AT) on taustalla 80 % kaikista dementia tapauksista (Villa, Lavitrano, Salvatore & Combi 2020, 1).

Suomessa erilaisiin muistisairauksiin sairastuu vuosittain noin 14 500 ihmistä, näistä 7000 on työikäisiä. Kaikkinensa muistisairauksien kustannukset ovat vuodessa lähes miljardi euroa. (Remes 2018, 2507; Käypä hoito -suositus 2021.) Lukuisista tutkimuksista huolimatta, AT ei vielä ole löydetty parantavaa tai taudin etenemistä hidastavaa lääkitystä, mutta mahdollisimman varhainen diagnoosi auttaa potilaan selviytymistä arjessa.

Itä-Suomen yliopiston biolääketieteen yksikössä toimiva molekyyli-genetiikan tutkimusryhmä professori Mikko Hiltusen johdolla on erikoistunut AT:n tutkimiseen. Ryhmän tavoitteena on löytää sairastumisriskiin vaikuttavia geenejä, tutkia ja tuottaa uutta tietoa niihin liittyvistä tautimekanismeista sekä siten tarjota uusia ennakoivia merkkiaineita sekä lääkekohteita sairauden hoitoon ja diagnostiikkaan. (UEF 2023.)

Viimeaikaisten funktionaalisten ja koko genomin kattavien assosiaatiotutkimusten (GWAS, eng. genome-wide association studies) perusteella aivojen immuunipuolustuksesta vastaavien mikrogliasolujen toiminta on noussut merkittävään rooliin AT:ssa. Molekyyli-genetiikan tutkimusryhmässä dosentti Mari Takalo vastaa projektista, jossa selvitetään mikrogliasoluissa ilmentyvän *PLCY2*-geenin ja varsinkin sen Alzheimerin taudilta suojaavan P522R-variantin toimintaa. Projektissa tutkitaan, onko suojaavan geenimuutoksen myötä mikrogliasolujen määrä, rakenne ja toiminta muuttuneet sekä näiden seikkojen vaikutusta sairaudelle tyypillisen patologian kehittymiseen ja etenemiseen. Eräs hankkeen osa-alueista on tutkimushiirten aivokudosten mikrogliasolujen määrittäminen immunohistokemiallisilla värjäyksillä, joilla pyritään saamaan uutta tietoa mikrogliojen toiminnasta sekä aineenvaihdunnasta normaalin ikääntymisen ja AT:lle tyypillisten patologisten muutosten aikana.

Mikrogliasolujen immunohistologisissa määrittäyksissä käytetään kelluvien kudokseteiden värjäysmenetelmää, jota tutkimusryhmässä ei ole ennestään kokeiltu. Menetelmässä hiirten aivokudoksista leikatut leikkeet kelluvat vapaasti värjäysliuoksessa, jolloin siinä olevat vasta-aineet pääsevät joka puolelta vaikuttamaan kudokseen lisäten värjäyksen tehokkuutta ja spesifisyyttä. Menetelmä myös säilyttää paremmin hermosolujen kolmiulotteisen rakenteen perinteiseen objektilasivärjäykseen verrattuna. (Potts, Coppotelli & Ross 2020, 1.)

Tämä opinnäytetyö on tutkimuksellista kehittämistä ja sen toimeksiantajana toimii molekyyli-genetiikan laboratorio Itä-Suomen yliopiston biolääketieteen yksiköstä. Työn tarkoituksena on kehittää luotettava mikrogliasolujen värjäysmetodi, valmistamalla hiirten aivokudokseteistä kelluvia leikkeitä ja värjäämällä ne immunohistokemiallisesti mikrogliasoluille spesifisillä fluoresoivilla vasta-aineilla. Opinnäytetyön tavoitteena on saada uutta tietoa mikrogliasolujen toiminnasta ja aineenvaihdunnasta sekä siten edistää AT:n tutkimusta.

2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTIINEN VIITEKEHYS

2.1 Alzheimerin tauti

AT on yleisin dementoiva sairaus maailmassa. Suomessa sitä sairastaa yli 70 000 ihmistä. Taudin keskeisiin patologiin muutoksiin kuuluu solun ulkoisten beeta-amyloidista koostuvien plakkien kertyminen aivoihin, hermosolujen sisäiset hyperfosforyloidusta tau-proteiinista muodostuvat hermosäievyhdet sekä neuroinflammaatio eli aivojen krooninen tulehdustila. Nämä muutokset aiheuttavat hermosolujen ja synapsien tuhoutumista, mikä lopulta johtaa laajamittaiseen ja peruuttamattomaan aivokudoksen rappeumaan. (De Strooper and Karran 2016, 603.) AT on vääjäämättömästi etenevä kuolemaan johtava sairaus, johon ei tällä hetkellä ole parantavaa, sen enempää kuin sairauden puhkeamista estävääkään hoitoa.

2.1.1 Taudin historiaa

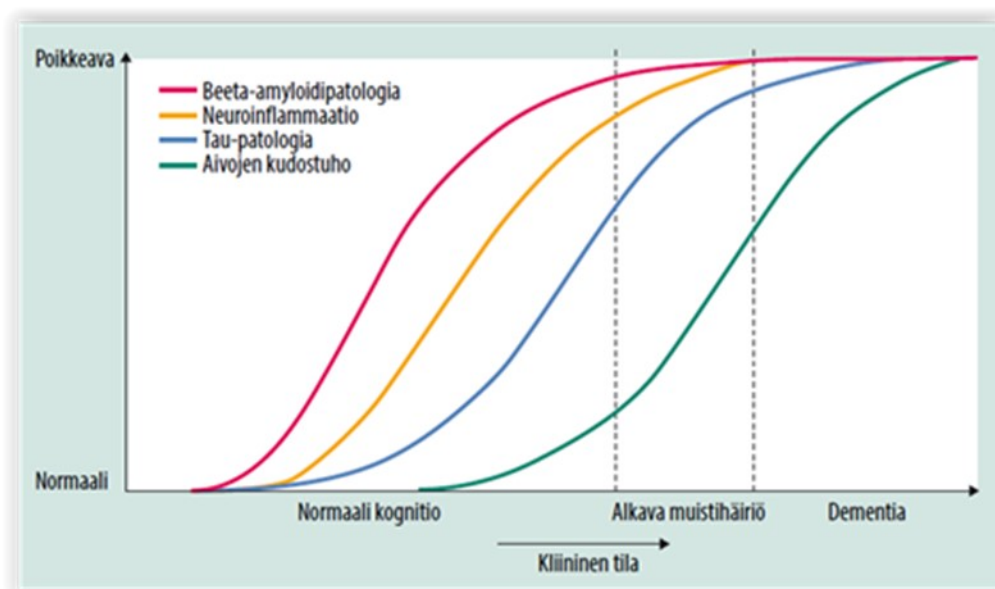
Marraskuussa 1906 saksalainen neuropatologi ja psykiatri Alois Alzheimer luennoi ensimmäistä kertaa potilaansa Auguste Deterin mittavista aivokudostuhoista. Hän oli saanut naisen hoidettavakseen viisi vuotta aiemmin, tämän kärsittyä vakavasta muistamattomuudesta, älyllisen toiminnan heikkeneemisestä, aistiharhoista sekä käytöshäiriöistä. Suorittamissaan muistitesteissä Alzheimer kuvasi potilaansa unohtavan sanoja välittömästi. Augustesta tuli lopulta täysin ajasta ja paikasta tiedostamaton. Kun hän kuoli 55-vuotiaana huhtikuussa 1906, Alzheimer vaati saada tutkia potilaansa aivot ja havaitsi tekemissään histologisissa hopeavärjäyksissä muun muassa valtavan määrän beeta-amyloidiplakkeja, tau-proteiinin muodostamia hermosäievyhteitä sekä verisuonten kalkkeutumiseen viitavia löydöksiä. Lähes kolmasosa kortikaalisista soluista oli tuhoutunut. (Maurer, Volk & Gerbaldo 1997, 1546–1549.) Aloisin kollega, Emil Kraepelin kuvasi vuonna 1910 ilmestyneessä teoksessaan ”Handbook of Psychiatry” näitä Alzheimerin löytämiä histopatologisia muutoksia keskeisiksi seniilissä dementiassa ja käytti ensimmäistä kertaa nimitystä Alzheimerin tauti. Vuotta myöhemmin AT oli sairauden nimenä vakiintunut käyttöön Euroopassa ja Yhdysvalloissa. (Bondi, Edmonds & Salmon 2017, 2.)

2.1.2 Keskeiset patologiset muutokset aivoissa

Ikääntymisen myötä riski sairastua AT:n sekä muihin aivorappeumasairauksiin kasvaa. Sairauden eteneminen oireettomasta, prekliinisestä vaiheesta ensin varhaiseen AT:n ja siitä edelleen lievän ja keskivaikean taudinkuvan kautta vaikeaan dementiaan kestää useita vuosia. Muistin kannalta tärkeän hippokampuksen alueen hermosolut tuhoutuvat ensimmäisinä, johtaen sairaudelle tyypillisiin ensioireisiin, kuten äskettäin puhuttujen ja tapahtuneiden asioiden unohteluun. (Koivisto ym. 2018, 2520; Tanila, Hiltunen & Myllykangas 2018, 2512.) Taudin edetessä kognitiiviset toiminnot, kuten ajattelun sekä uuden oppiminen heikkenee ja itsenäinen arjessa selviytyminen vaikeutuu. Sairastuneen persoonallisuudessa tapahtuu usein muutoksia, hän voi olla ahdistunut ja vainoharhainen. Hermosolujen etenevä tuhoutuminen vaikuttaa koko kehon toimintoihin, muun muassa käveleminen, puhuminen ja nieleminen vaikeutuvat. Lopulta potilas ei kykene enää nousemaan sängystä, vaan

tarvitsee liikuntakyvyttömänä ympärivuorokautista laitoshoidoa. (Alzheimer's Association Report 2019, 322–324.)

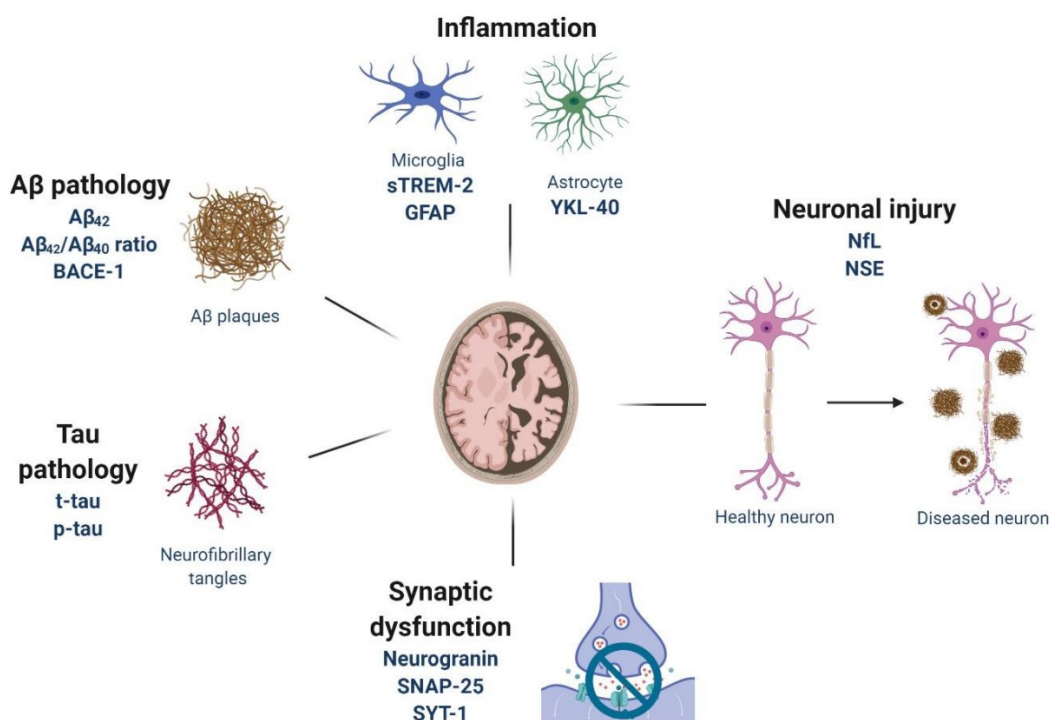
Nykytietämyksen mukaan AT:lle tyypilliset patologiset muutokset, kuten beeta-amyloidin lisääntyneet kertyminen, tauproteiinin muodostamat fibrillivyyhdet ja aivojen tulehdustila alkavat kehittyä jo vuosia (kuva 1), jopa vuosikymmeniä ennen ensimmäisiä havaittavia oireita. (Selkoe & Hardy 2016, 595; Tanila, Hiltunen & Myllykangas 2018, 2512.) Amyloidiprekursoriproteiinin (APP) entsyymattisen hajotuksen seurauksena muodostuvan beeta-amyloidipeptidin lisääntyneen kertymisen on uskottu olevan yksi keskeinen tekijä AT:n patofysiologiassa. APP on hermoston toiminnalle välttämätön solukalvoproteiini, joka pilkkoutuu joko ei-amyloidista reittiä alfasekretaasientsyymien toimesta tai beeta-sekretaasi- ja gammasekretaasientsyymien hajottamina, jolloin syntyy elimistölle vahingollista beeta-amyloidia. (Lichtenthaler, Tschirner & Steiner 2022, 101.) APP:n prosessointi molemmilla tavoilla on normaalia ja aivot poistavat niihin kertyvää beeta-amyloidia ongelmitta. AT:ssa puhdistuskapasiteetti on kuitenkin puutteellinen, jolloin beeta-amyloidia ja varsinkin sen liukenematonta beeta-amyloidia42 muotoa kertyy solujen ulkopuolelle.



KUVA 1. Tautiprosessien aika-akseli (Tanila, Hiltunen & Myllykangas 2018, 2516)

Amyloidikaskadihypoteesin mukaan juuri beeta-amyloidin liika sakkautuminen aivokudokseen olisi alkusysäys tapahtumaketjulle, joka johtaa sairastumiseen. AT:ssa havaitut, tiiviin ytimen omaavat neuriittiset plakit muodostuvat suurimmaksi osaksi beeta-amyloidia42-peptidistä ja ne saavat aivojen immuunipuolustuksen aktivoitumaan. (Selkoe & Hardy 2016, 597; Bondi ym. 2017, 7.) Mikroglia-solujen ja astrosyyttien aktivaation pitkittyminen johtaa aivojen tulehdustilaan. Hermosolujen tukirakenteista huolehtiva tau-proteiini alkaa hyperfosforyloitua ja laskostua väärin neuronien sisään. Näiden neurofibrillivyyhtien on osoitettu liittyvän moniin hermorappeumasairauksiin ja yhdessä amyloidiplakkien kanssa ne ovat tunnusomaisia patologisia muutoksia AT:ssa. (Selkoe & Hardy 2016, 597; Hampel ym. 2021, 5482.)

Kuvassa 2 nähdään, miten beeta-amyloidin lisääntynyt kertyminen, tau-neurofibrillivyyhtien muodostuminen ja neuroinflammaatio johtavat lopulta synapsien hajoamiseen ja aivokudoksen rappeutumiseen. Hermostolujen tuhoutumisen myötä tau-proteiinia ja sen fosforyloitunutta muotoa vapautuu selkäydinnesteeseen. Beeta-amyloidi42-peptidin määrä selkäydinnesteessä puolestaan vähenee, koska se kasaantuu plakeiksi aivoihin. (Koivisto ym. 2018, 2524.) Näiden proteiinien pitoisuuksien määrittäminen likvorista käytetäänkin hyödyksi Alzheimerin taudin diagnostiikassa.



KUVA 2. Keskeiset patologiset muutokset AT:ssa ja niihin liitetyt biomarkkerit (Villa ym. 2020, 2)

2.1.3 Alzheimerin taudin riskitekijät

AT on monitekijäinen sairaus, jonka synnystä ei vielä vuosikymmenien tutkimusten jälkeenkään ole päästy varmuuteen. Sen kehittymiseen vaikuttavat sekä perinnölliset että elintapoihin ja ympäristötekijöihin liittyvät syyt. Perinnöllinen Alzheimerin tauti edustaa vain pientä osaa, noin 1–2 % kaikista tautitapauksista ja alkaa tyypillisesti ennen 65 vuoden ikää, jolloin puhutaan varhaisiän AT:stä (eng. Early Onset AD, EOAD) (Bondi ym. 2017, 7). Varhaisiällä alkaneen sairauden taustalta löytyvät mutaatiot *APP*, *PSEN1* tai *PSEN2* geeneissä. Geenien toimintahäiriöt vaikuttavat APP proteiinin prosessointiin ja aiheuttavat joko beeta-amyloidi-peptidin ja varsinkin sen beeta-amyloidi42 isoformin normaalia aktiivisemmän pilkkoutumisen tai sen lisääntyneen kertymisen aivoihin läpi elämän. (Selkoe & Hardy 2016, 597; Villa ym. 2020, 2.)

Möhäisiän AT (eng. Late Onset AD, LOAD) on selvästi yleisin tautimuoto. Sen on katsottu liittyvän aivojen heikentyneeseen kapasiteettiin päästä eroon beeta-amyloidista. (Hansen, Hanson & Sheng 2018, 460.) Yli 65 vuoden iässä puhkeavan sairauden yleisin riskitekijä on ikä. Vaikka yli 85-vuotiailla

henkilöillä onkin 32 % riski sairastua AT:hen, on huomioitava, ettei sairaus kuulu normaaliin ikääntymiseen eikä korkea ikä yksistään aiheuta Alzheimerin tautia. (Alzheimer's Association Report 2019, 327.)

Molekyyligeneettiset tutkimukset ovat jo vuosia osoittaneet kolesterolin aineenvaihduntaan osallistuvan *APOE*-geenin tuottaman apolipoproteiini E:n (ApoE) $\epsilon 4$ alleelin löytyvän neljäsosalta myöhäisiin AT:hen sairastuneista, tehden siitä merkittävimmän geneettisen riskitekijän. Lisääntynyt riski sairastua on 8–12-kertainen muuhun väestöön verrattuna, jos henkilö on perinyt $\epsilon 4$ alleelin molemmilta vanhemmiltaan. (Verheijen & Sleegers 2018, 434.)

Viimeaikaisten GWAS-tutkimusten myötä uusia sairastuvuuden riskiä nostavia tai sitä ehkäiseviä geenejä on löytynyt runsaasti, kuten *TREM2*, *APOE*, *TYROBP*, *ABI3*, *SORL1* ja *PLCG2* (Keren-Shaul ym. 2017, 1280; Sims ym. 2017, 3). Esimerkiksi mikrogliojen hyvinvointiin, elävyyteen, rasva-aineenvaihduntaan ja fagosytoosiaktiivisuuteen vaikuttavan *TREM2*-geenin (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) muutosten on todettu nostavan sairastumisriskiä 3–5-kertaiseksi (De Strooper & Karran 2016, 610; Magno, Bunney, Mead, Svensson & Bictash 2021, 2.)

2.2 Mikroglia-solut

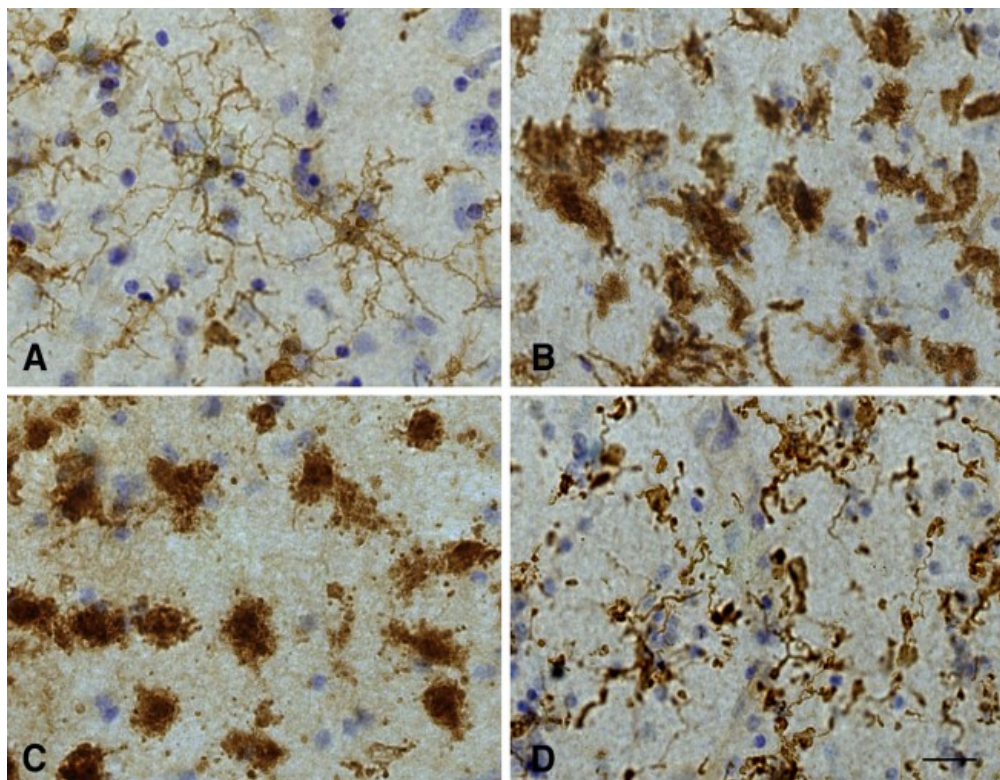
Noin 5–10 % ihmisen aivojen kokonaissolumäärästä on mikroglioja. Nämä paikalliset makrofagit vastaavat muun muassa keskushermoston immuunipuolustuksesta sekä aivojen kudostasapainon, homeostaasin, säätelyä. Niillä on myös tärkeä rooli aivojen kehityksen, oppimisen ja muistin kannalta. Homeostaattisessa eli normaalitilassa ne partioivat etsien taudinaiheuttajia pitkillä haarakkeillaan (kuva 3 A), pitävät huolta synapseista ja osallistuvat hermosolujen kehitykseen vaikuttavien kasvutekijöiden tuottoon. (Sarlus & Henke 2017, 3240; Airas & Saraste 2020, 751.)

Mikroglia reagoivat erittäin herkästi ympäristössään tapahtuviin muutoksiin ja ne aktivoituvat ikääntymisen, aivovammojen ja neurologisten sairauksien yhteydessä (kuva 3 B). Aivoja puolustaessaan ne fagosytoivat patogeenejä (kuva 3 C) ja erittävät tulehdusta hillitseviä, mutta myös sitä edistäviä tulehdusvälittäjäaineita, sytokiineja, sekä muita tulehduksellisia molekyylejä. Saatuaan tulehduksen hallintaan, ne palaavat takaisin normaaliin homeostaattiseen tilaansa. (Hemonnot, Hua, Ulmann & Hirbec 2019, 2.) Iän myötä, tulehdusten pitkittyessä tai kroonistuneissa patologisissa tiloissa mikrogliojen paluu normaaliin ei onnistu, hyperaktiivisten solujen toiminta heikentyy ja ne alkavat hajoamaan (kuva 3 D). Tällaisia dystrofisia soluja tavataan AT:ssa sekä muissa hermorapemasairauksissa. (Streit, Xue, Tischer & Bechmann 2014, 3.)

2.2.1 Mikrogliaojen aktivaatio

Taudinaiheuttajia tunnistaessaan mikroglia aktivoituvat, niiden morfologia muuttuu ameebamaisen pyöreäksi ja ne alkavat syödä soludebristä, kuolleita soluja sekä muita patogeenejä, kuten AT:ssa vahingollista beeta-amyloidia (Sarlus & Henke 2017, 3240). Aktivoituminen on välttämätöntä mikrogliojen tehokkaan fagosytoosin sekä tulehdusvasteen syntymisen kannalta. Kaikki mikroglia-solut

osallistuvat aivojen puolustukseen, mutta sellaisia, joita havaitaan erityisesti hermorappeumasairauksien yhteydessä, kutsutaan sairauksiin liitetyiksi mikrogliaiksi eli DAM-soluiksi (disease-associated microglia). AT:ssa DAM mikrogliait aktivoituvat tunnistessaan beeta-amyloidiplakkeja sekä solun sisältä vapautuvia tekijöitä, kuten myeliiniä ja solukalvon fosfolipidejä hermosolujen tuhoutuessa. (Keren-Shaul ym. 2017, 1278; Martiskainen ym. 2021, 1377–78.)



KUVA 3. Mikroglion morfologiset muutokset ihmisen aivokuorella kuvattuna Iba1 vasta-aineella A. Lepotilassa mikrogliait tutkivat ympäristöään pitkillä haarakkeillaan. B. Aktivoituessaan solut muuttuvat pallomaisemmiksi ja niiden aineenvaihdunta vilkastuu. C. Fagosyyttiset mikrogliait muistuttavat usein aivojen pyöreitä makrofageja. D. Dystrofisten mikroglion hajojneita haarakkeita. (Streit ym. 2014, 6.)

2.2.2 Mikroglion rooli Alzheimerin taudissa

Yhä kehittyneemmät tutkimusmenetelmät ja yksisolu-teknologiat mahdollistavat geenien ja proteiinien tutkimisen yksittäisen solun sisältä. AT:n neuroinflammaatiossa aktivoituvilla mikroglia soluilla uskotaan olevan merkittävä rooli jo sairauden alkuvaiheesta lähtien. Siksi niiden toiminnan tarkempi tutkiminen on tärkeää, avaten mahdollisuuksia ja kohteita uusille hoitokeinoille (Hemonnot, Hua, Ulmann & Hirbec 2019, 1.)

Eläinmalleilla sekä AT potilailla tehdyt tutkimukset osoittavat aktivoituneiden mikroglia solujen kerääntyvän beeta-amyloidista muodostuvien plakkien ympärille ja fagosytoivan sitä (Prokop, Miller & Heppner 2013, 462). Beeta-amyloidin löytyminen mikroglion sisältä kertoo näiden solujen tärkeästä roolista aivojen puhdistajina sekä AT:n ehkäisijöinä (McQuade & Blurton-Jones 2018, 1806; Andreone ym. 2020, 927).

Beeta-amyloidiplakkien aiheuttama paikallinen tulehdusreaktio saa mikroglia tuottamaan sytokiineja, mikä houkuttelee paikalle lisää mikrogliaja sekä muun muassa hermotukisoluihin kuuluvia astrosyyttejä. Sytokiini tuotannon aktivoituminen on välttämätöntä tehokkaan immuunipuolustuksen syntymiselle. Valitettavasti neuroinflammaation kroonistuessa mikroglia eivät enää kykene fagosytoimaan taudin aiheuttajia tarpeeksi tehokkaasti, jolloin hyperaktiiviset solut pitävät yllä aivojen tulehdustilaa sekä edesauttavat homeostaasin epätasapainoa ja synapsien tuhoutumista. (Hansen ym. 2018, 463.)

Useiden myöhäsiän AT:iin liitettyjen geneettisten riskitekijöiden, kuten *APOE*, *TREM2*, *ABI3* sekä *PLCG2* geenien on osoitettu ilmentyvän suureksi osaksi tai yksinomaan mikrogliaissa (Takalo ym. 2020, 2; Lichtenthaler, Tschirner & Steiner 2022, 101). Normaalitylanteessa niiden tuottamien proteiinien toiminta liitetään solujen fagosytoosiaktiivisuuden sekä elävyyden ylläpitämiseen, mutta proteiini tuotannon heikentyminen syystä tai toisesta johtaa solujen immuunipuolustuksen ja aineenvaihdunnan häiriöihin (Keren-Shaul ym. 2017, 1281).

Rasvapisarot ovat pääasiassa neutraaleja lipidejä ja kolesterolia sisältäviä solunsisäisiä partikkeleita, joilla on tärkeä rooli solujen rasva-aineenvaihdunnassa ja proteiinien interaktiossa. Niiden toimintahäiriöt voivat aiheuttaa aineenvaihduntasairauksia, kuten ylipainoa, diabetesta ja rasvamaksaa. (Fam, Klymchenko & Collot, 2018, 1.) Ikääntymisen, tulehdusten ja sairauksien yhteydessä rasvapisarot alkaa kertyä myös mikrogliajen sisään, jolloin niiden lisääntynyt määrä ja suurentunut koko toimii indikaationa mikrogliajen aineenvaihdunnan häiriöille. Mitä enemmän rasvakertymää soluissa on, sitä huonompi on niiden metabolia ja sen seurauksena solut toimivat yhä heikommin. Rasva-aineenvaihdunnan häiriöiden on osoitettu olevan yhteydessä mikrogliajen toiminnan ja elävyyden muutoksiin normaalissa ikääntymisessä sekä hermorappeumasairauksissa. (Marschallinger ym. 2020, 1.)

2.2.3 *PLCG2* ja suojaava variantti PLCy2-P522R

PLCy2-entsyymiä (Fosfolipaasi C gamma 2) koodaavan *PLCG2* -geenin ilmentyminen aivoissa on rikastunut mikrogliaihin. PLCy2-entsyymi osallistuu muun muassa solujen hyvinvoinnin, elävyyden, inflammatorisen vasteen ja fagosytoosin ylläpitoon sekä rasva-aineenvaihduntaan. (Andreone ym. 2020, 931.) Vuonna 2017 *PLCG2* geenissä identifioitiin harvinainen koodaava geenimuutos, jonka seurauksena proliini 522 muuttuu arginiiniksi, P522R. Tämän muutoksen on osoitettu edesauttavan tervettä ikääntymistä, lisäävän elinvuosia sekä suojaavan AT:lta ja muilta hermorappeumasairauksilta, kuten Lewyn kappaleen taudilta sekä otsalohkodementialta. (Sims ym. 2017, 237; Van der Lee ym. 2019, 237–238.)

Viimeaikaisissa tutkimuksissa P522R variantin on todettu lisäävän PLCy2-entsyymin aktiivisuutta, johtaen immuunisolujen elävyyden ja toiminnan, kuten inflammatorisen vasteen ja fagosytoosikyvyn parantumiseen. Suojaavan geenimuutoksen ei ole osoitettu lisäävän mikrogliajen määrää tai muuttavan niiden morfologiaa, joten sen oletetaan herkistävän soluja itsessään puolustautumaan tehokkaammin ympäristön haittavaikutuksia vastaan. Solujen toiminnan tarkempi tutkiminen avaakin uusia mahdollisuuksia Alzheimerin taudin lääkehoitoon. (Takalo ym. 2020, 6.)

2.3 Immunohistokemialliset värjäykset

Immunohistokemialliset värjäykset ovat laajasti käytetty menetelmä kudusrakenteiden, solujen ja proteiinien ilmentymisen sekä niiden lokalisaation tutkimiseen. Esimerkiksi AT:ssa kiinnostuksen kohteena olevat beeta-amyloidiplakit ja tau-fibrillivyyhdet saadaan näkyviin näytekudoksen antigeneihin kiinnittyvien vasta-aineiden avulla. (Potts ym. 2020, 2.)

Käytettävien vasta-aineiden valintaan vaikuttaa kohteen kudosis- ja solutyypin sekä käyttötarkoitus (diagnoosi vs. tutkimus). Tutkittavan kohteen anatomian tuntemus on tärkeää. Perehtyminen kirjallisuuteen ja tiedeartikkeleihin sekä muiden tutkimusryhmien konsultointi auttaa värjäysmenetelmien ja vasta-aineiden valinnassa. Polyklonaaliset vasta-aineet tunnistavat useita antigenei-epitopeja tutkittavan kohteen pinnalta, monoklonaliset vain yhden, mikä nostaa merkittävästi värjäyksen tarkkuutta ja spesifisyyttä, mutta usein myös hintaa. (Naukkari, Kirjavainen, Kukkonen & Remes 2020, 20, 54.)

Immunofluoresenssivärjäyksissä vasta-aineeseen kiinnitetty fluoresoiva aine, fluorokromi, saadaan näkyväksi fluoresenssimikroskoopin korkeaenergisestä valosta (UV, laser tai LED) avulla. Nykyaikainen teknologia ja konfokaalimikroskopia mahdollistavat värjäystuloksen hyvän resoluution ja kohteen hahmottamisen myös 3-ulotteisena. Suora immunofluoresenssivärjäys on herkempi ja usein käyttökelpoisempi menetelmä on epäsuora värjäys, jossa fluorokromilla leimattu sekundäärivasta-aine kiinnittyy leimaamattomaan primäärivasta-aineeseen. Tämä parantaa värjäyksen herkkyyttä. Menetelmässä on mahdollista myös käyttää kahta tai useampaa vasta-ainetta samanaikaisesti, mikä vähentää värjäykseen kuluva aikaa ja säästää näytettä. Fluoresoivia vasta-aineita käytettäessä on muistettava, ettei fluoresenssi ole pysyvää, vaan se haalistuu ajan myötä ja aina näytettä katsottaessa. Näytteet kannattaakin skannata tai valokuvata mahdollisimman pian värjäyksen jälkeen. Fluoresenssin kulumista voi estää suojaamalla näytteet värjäyksen aikana valolta sekä mikroskopoimalla ja säilyttämällä objektilasit pimeässä. (Naukkari ym. 2020, 20, 23, 28, 95.)

Kudosleikkeet on mahdollista värjätä heti mikrotomilla leikkaamisen jälkeen objektilasilla tai vapaasti vasta-aineliuoksessa kelluvina leikkeinä. Valinta riippuu näytteen laadusta, leikkeen paksuudesta sekä tutkimuksen tarkoituksesta. Molemmilla menetelmillä on omat hyvät ja huonot puolensa. Suoraan objektilasille kiinnitettyjen leikkeiden värjäykseen kuuluu usein vähemmän kalliita vasta-aineita, joten se tulee edullisemmaksi, mutta jos värjättäviä näytteitä on paljon, on kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmä silloin tarkoituksenmukaisempi. (Potts ym. 2020, 2–3.)

2.4 Kelluvien kudosleikkeiden värjäysmenetelmän soveltavuuteen vaikuttavia tekijöitä

Tutkimusmenetelmän soveltavuus käyttötarkoitukseensa varmistetaan validoinnilla, joka on prosessi menetelmän suunnittelusta, toteutuksesta ja tulosten tulokinnasta dokumentointiin. Käyttötarkoituksesta ja laboratoriosta riippuen validointi voi olla pitkä ja raskas. Verifiointi eli todentaminen on validointia suppeampi keino menetelmän laadunvarmistamiseksi ja sitä käytetään, jos menetelmä on jo ennestään validoitu tai siihen tehdään muutoksia. Laboratorio itse päättää, millä kriteereillä se hyväksyy menetelmän käyttöönsä. (Hägg, Margareta 2016, 7.)

Validointi ja verifiointi ovat osa laatujärjestelmää, joka kattaa koko tutkimusprosessin alusta alkaen ja perustuu objektiiviseen näyttöön ISO 15189: 2012 standardin mukaisesti (Labquality 2022). Myös menetelmän optimointi on osa laadunhallintaa ja sillä pyritään saavuttamaan parhain lopputulos käytettävissä olevilla keinoilla huomioiden muun muassa menetelmän toimivuus, luotettavuus ja toistettavuus (Naukkarinen ym. 2020, 56). Käsitteet validointi, verifiointi ja optimointi menevät helposti sekaisin ja kuten Hägg (2016, 7) toteaa, eri tutkimusaloilla saatetaan käyttää eri ilmaisuja samasta asiasta. Keskeisiä parametrejä uuden menetelmän luotettavuuden arviointiin ovat muun muassa toistettavuus, herkkyys, spesifisyys, sisäinen laadunvarmistus sekä näytteen prosessoinnin vaikutus lopputulokseen. Mikäli valmistaja on ilmoittanut käytettävien laitteiden ja reagenssien osalta ominaisuuksista, jotka voivat vaikuttaa tuloksiin, on ne testattava tai huomioitava tuloksia tulkittaessa. (Hägg, Margareta 2016, 17, 43.)

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä pyritään näyteleikkeen kudoksen intensiiviseen ja luotettavaan värjäytymiseen ilman häiritsevää taustaa. Menetelmää optimoitaessa säädetään aina vain yhtä parametriä kerrallaan. Tyypillisiä muuttujia ovat kudoksen näytteiden fiksointiaika, esikäsittelyt, primääri- ja sekundäärivasta-aineiden laimennokset, inkubaatioajat sekä lämpötilat. Mahdollisia virhelähteitä ovat useimmiten puutteellinen fiksaatio, epätasaiset tai repaleiset leikkeet sekä riittämätön ja epämääräinen värjäytyminen. Myös oikeanlainen taustaa aiheuttamaton peitinaine on muistettava valita värjäyksen lopuksi. (Naukkarinen ym. 2020, 56–57, 114–115.)

Kelluvien kudosten leikkeiden immunohistokemialliset värjäykset ovat erittäin hyvä tutkimusmenetelmä erityisesti aivokudoksen näytteille, kun halutaan tutkia hermosolujen rakennetta sekä säilyttää pitkien dendriittien ja aksonien kolmiulotteisuus. Menetelmässä käytetyt leikkeet ovat paksuja (25–50 µM), mikä soveltuu huonosti suoraan objektilasilla tehtävään värjäykseen. Vapaasti liuoksessa kelluviin näytteisiin vasta-aineet sen sijaan pääsevät vaikuttamaan joka suunnalta, lisäten värjäyksen tehokkuutta ja spesifisyyttä. (Potts ym. 2020, 1.)

Kudoksen näytteen esikäsittelyllä on merkittävä vaikutus värjäyksen lopputulokseen. Kudoksen fiksointi on olennainen osa näytteen valmistusta, se säilyttää näytteen mahdollisimman muuttumattomana irrotushetken verrattuna, eliminoi mikrobikasvua ja estää kudoksen hajoamisen. (Raheem 2018.) Fiksatiivina käytetty 10 % formalini tai 4 % paraformaldehydi muodostaa proteiinien ja aminohappojen kanssa sidoksia, jolloin kudoksesta tulee kovempi, mikä edistää helposti hajoavien ja pehmeiden aivonäytteiden tai kasvaimien prosessointia. On kuitenkin muistettava, että fiksaatio voi peittää alleen kudoksen antigenejä ja huonontaa siten värjäystulosta. Leikkeiden keittäminen 80°C sitraattipuskurissa ennen vasta-ainekäsittelyä purkaa formaliniin ja proteiinien välisiä ristsidoksia ja parantaa vasta-aineen sitoutumista. (Naukkarinen ym. 2020, 68; Potts ym. 2020, 2.) Endogeenisen peroksidaasin poistaminen vetyperoksidilla vähentää näytteen epäspesifistä taustaa ja lisää vasta-aineen tehokkuutta. Autofluoresenssia voidaan poistaa myös kaupallisilla reagensseilla. Leikkeiden käsittely BSA:lla (naudan seerumin albumiini) ennen värjäystä vähentää primäärivasta-aineen epäspesifistä sitoutumista muuhun kuin antigeeniin kudoksen pinnalla. (Naukkarinen ym. 2020, 45.)

Koska kudoksen näytteestä leikataan leikkeitä eri syvyyksiltä, leikemäärä voi kasvaa suureksikin. Kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmän ansiosta useita leikkeitä voidaan värjätä samassa astiassa tai kuoppalevyllä, jolloin säästyy aikaa, vaivaa ja rahaa. Leikkeiden huuhtelu vasta-aineiden välillä on

myös tehokkaampaa, mikä vähentää epäspesifistä taustaa ja parantaa fluoresenssin signaalia. (Potts ym. 2020, 1.) Onnistunut immunohistokemiallinen värjäys on kokonaisvaltainen prosessi kudoksen irrotuksesta, esikäsittelystä, leikkaamisesta ja värjäyksestä aina näytteen mikroskopointiin ja tulkintaan.

3 OPINNÄYTETYÖN TAUSTA, TARKOITUS JA TAVOITE

Tämä opinnäytetyö sai aiheensa dosentti Mari Takalon johtamasta PLCy2-tutkimuksesta, jossa monipuolisin geneettisin ja funktionaalisin menetelmin tutkitaan AT:lta suojaavan PLCy2 (P522R) variantin toimintaa. Eräs hankkeen osa-alueista oli tutkimushiirten aivokudosleikkeiden immunohistokemialliset värjäykset mikrogliaisolujen toiminnan ja morfologian tutkimista varten. Kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmä valittiin, koska sille oli jatkuva akuutti tarve. Menetelmä ei ollut ennestään käytössä tutkimusryhmässä eikä yksikössä, vaan aivokudosnäytteet oli jouduttu prosessoimaan yhteistyölaboratoriossa. Opinnäytetyössä testatut vasta-aineet valittiin kansainväliseen tieteelliseen näyttöön perustuen. Tutkiessaan mikrogliaisolujen morfologisia muutoksia, muun muassa Keren-Shaul ym. 2017, Parhizkar ym. 2019, Andreone ym. 2020, Marschallinger ym. 2020 ja Takalo ym. 2020 ovat käyttäneet samoja vasta-aineita AT mallintavien hiirten aivokudosleikkeiden värjäyksissä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää luotettava kelluvien aivoleikkeiden värjäysmetodi, valmistamalla hiirten aivokudosnäytteistä kelluvia leikkeitä ja värjäämällä ne immunohistokemiallisesti mikrogliaisoluille spesifeillä fluoresoivilla vasta-aineilla. Tutkimuskysymykseksi nousi valitun värjäysmenetelmän soveltuvuus mikrogliaisolujen tutkimiseen molekyyli-genetiikan laboratorion käytössä. Opinnäytetyön tavoitteena oli saada uutta tietoa mikrogliaisolujen toiminnasta ja aineenvaihdunnasta sekä siten edistää Alzheimerin taudin tutkimusta.

4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Opinnäytetyö tehtiin huhtikuun 2021 ja maaliskuun 2023 välisenä aikana Itä-Suomen yliopiston biolääketieteen yksikössä, jossa histologiin värjäyksiin erikoistunut laboratorio ja kuvantamisyksikkö tarjosivat työskentelylle erinomaiset puitteet. Akateemiseen tutkimukseen keskittyneessä molekyyli-genetiikan tutkimuslaboratoriossa ei tehdä kliinistä laboriodiagnostiikkaa eikä käytössä olevia tutkimusmenetelmiä ole ollut tarpeen akkreditoida. Akkreditoinnilla tarkoitetaan virallista tutkimusmenetelmän pätevyyden ja luotettavuuden osoittamista ja se toimii laadunvarmistuksena esimerkiksi markkinointi- ja kilpailutilanteissa (FINAS 2015).

Opinnäytetyö toteutettiin tutkimuksellisena kehittämistyönä. Tutkimuksellisella kehittämistyöllä pyritään ratkaisemaan todellisia työelämän ongelmia ja tuottamaan uutta ammattitietoa. Se mahdollistaa uusien ratkaisujen ja toimintamallien käytön, edesauttaa tutkimuksen tekijän ammatillista kehittymistä sekä hyödyttää työnantajaa. Tutkimuksen lähestymistapa oli konstruktivinen, jossa haluttu päämäärä oli ennalta tiedossa, mutta sen saavuttaminen ei. Konstruktiviselle tutkimukselle on ominaista käyttää olemassa olevaa tietoa uuden käytännön tuottamiseen. Olennaista on uusien ratkaisujen toimivuuden testaus sekä niiden oikeellisuuden osoittaminen teorian tietoon sekä käytäntöön perustuen. (HUMAK 2021; Rissanen 2021.)

4.1 Tutkimuksellisen kehittämistyön määritelmä

Salosen (2013,16) esittelemässä opinnäytetyön tutkimuksellisen kehittämishankkeen konstruktivistisessä mallissa lähtökohtana on hankkeen huolellinen suunnittelu ja vaiheistus, tutkimuksellinen työskentelyote, työssä oppiminen, eri menetelmien ymmärtäminen ja hallinta sekä ammatillinen osallisuus. Mallin tarkoituksena ei ole olla eksaktisti jäljiteltävä, vaan antaa tekijälle työkaluja ymmärtää paremmin tutkimusmaailmaa ja käytettävissä olevia mahdollisuuksia.

Konstruktivistinen kehittämismalli saa alkunsa työelämän kehittämistarpeesta ja jatkuu idean suunnittelulla, mikä konkretisoituu kirjalliseen opinnäytetyö- tai tutkimussuunnitelmaan. Oleellista on eri toimijoiden (tekijän, oppilaitoksen ja työelämän) yhteistyö ja ymmärrys hankkeen tarkoituksesta, tavoitteista sekä toiminnan mahdollistamisesta arvioidussa ajassa. Suunnitelman hyväksynnän jälkeen siirrytään työstövaiheeseen eli varsinaiseen työympäristöön ja tutkimuksen käytännön toteuttamiseen. (Salonen 2013, 17.) Opinnäytetyön edistymistä tarkastellaan ja arvioidaan säännöllisesti. Viimeistelyvaiheessa opinnäytetyötä hiotaan lopulliseen muotoonsa, johon voi kuluu yllättävän paljon aikaa. Tutkimuksellisen kehittämistyön tuloksena valmistuu yleensä jotain konkreetista, kuten työohje, kirja tai opas. Valmis tuotos esitellään tai julkaistaan ennalta sovittujen ohjeiden mukaisesti. (Salonen 2013, 19.)

4.2 Opinnäytetyön prosessi

Tämän tutkimuksellisen kehittämistyön idea suunnitella kelluvien leikkeiden värjäyspiste biolääketieteen yksikköön pohjautui PLCy2-tutkimushankkeen immunohistokemialliseen osioon. Värjäysmenetelmälle oli kysyntää ja tähän mennessä kelluvien leikkeiden valmistaminen ja värjäykset oli suoritettu yhteistyölaboratorion toimesta.

Opinnäytetyö aloitettiin kirjallisuuteen ja artikkeleihin perehtymällä. Kuten Saarnio ja Päätaalo (2022) toteavat, YAMK opinnäytetyön teorian tiedon hankinnan pohjana ovat järjestelmällisyys, kriittisyys sekä tiedon luotettavuuden ja eettisyyden arviointi. PubMedistä löytyi runsaasti tiedejulkaisuja haku-sanoilla AT, mikroglia ja PLCy2. Haut suoritettiin suomeksi ja englanniksi. Sitä vastoin immunohistokemiallisia värjäyksiä sekä kelluvia leikkeitä koskevia julkaisuja oli erittäin vähän. Tavanomaista onkin, että värjäyksiin liittyvä tieto kulkee henkilöstön keskuudessa työkokemuksen kautta saatuna hiljaisena tietona, minkä vuoksi yhteistyölaboratorion konsultointi värjäyspisteen pystytykseen sekä kelluvien leikkeiden värjäyksiin liittyvissä asioissa oli erittäin tärkeää.

Opinnäytetyön tutkimussuunnitelman hyväksynnän jälkeen siirryttiin käytännön työvaiheeseen. Värjäyspisteen pystytys aloitettiin kartoittamalla biolääketieteen yksikön histologian laboratoriosta mikrotomille sopiva paikka. Mikrotomi lainattiin kampukselta, se huollettiin ja terät teroitettiin asianmukaisesti ennen käyttöönottoa. Koska aivokudosten tuli olla jäässä koko leikkausprosessin ajan, täytyi kuivajäiden saaminen leikkauspäivälle varmistaa etukäteen. Aivoleikkeiden leikkaamista harjoiteltiin ensin varsinaiseen tutkimusaineistoon kuulumattomilla hiirten aivokudosnäytteillä riittävän kompetenssin saamiseksi.

Kelluvien leikkeiden värjäyksissä käytettävät välineet, reagenssit, vasta-aineet ja värjäysprotokollat suunniteltiin etukäteen yhdessä opinnäytetyön kenttäohjaajan kanssa. Huomioitavia tekijöitä olivat muun muassa testattavat vasta-ainelaimennokset, näytteiden esikäsittelyt sekä värjäyksiin kuluva aika. Leikkeiden pesuun ja esikäsittelyyn tarvittavat liuokset valmistettiin ja säilytettiin ohjeiden mukaisesti. Spesifiset kaupalliset vasta-aineet tilattiin tieteelliseen näyttöön ja yhteistyölaboratorion suositukseen perustuen, tarkoituksena saada näkyviin mikroglia-solut, mutta myös AT:lle tyypilliset patologiset muutokset, kuten beeta-amyloidiplakit, dystrofiset neuriitit ja astrosyyttien lisääntyminen. Myös solujen aineenvaihdunnasta ja hyvinvoinnista kertovista rasvapisarista oltiin kiinnostuneita.

4.3 Opinnäytetyön tutkimusaineisto

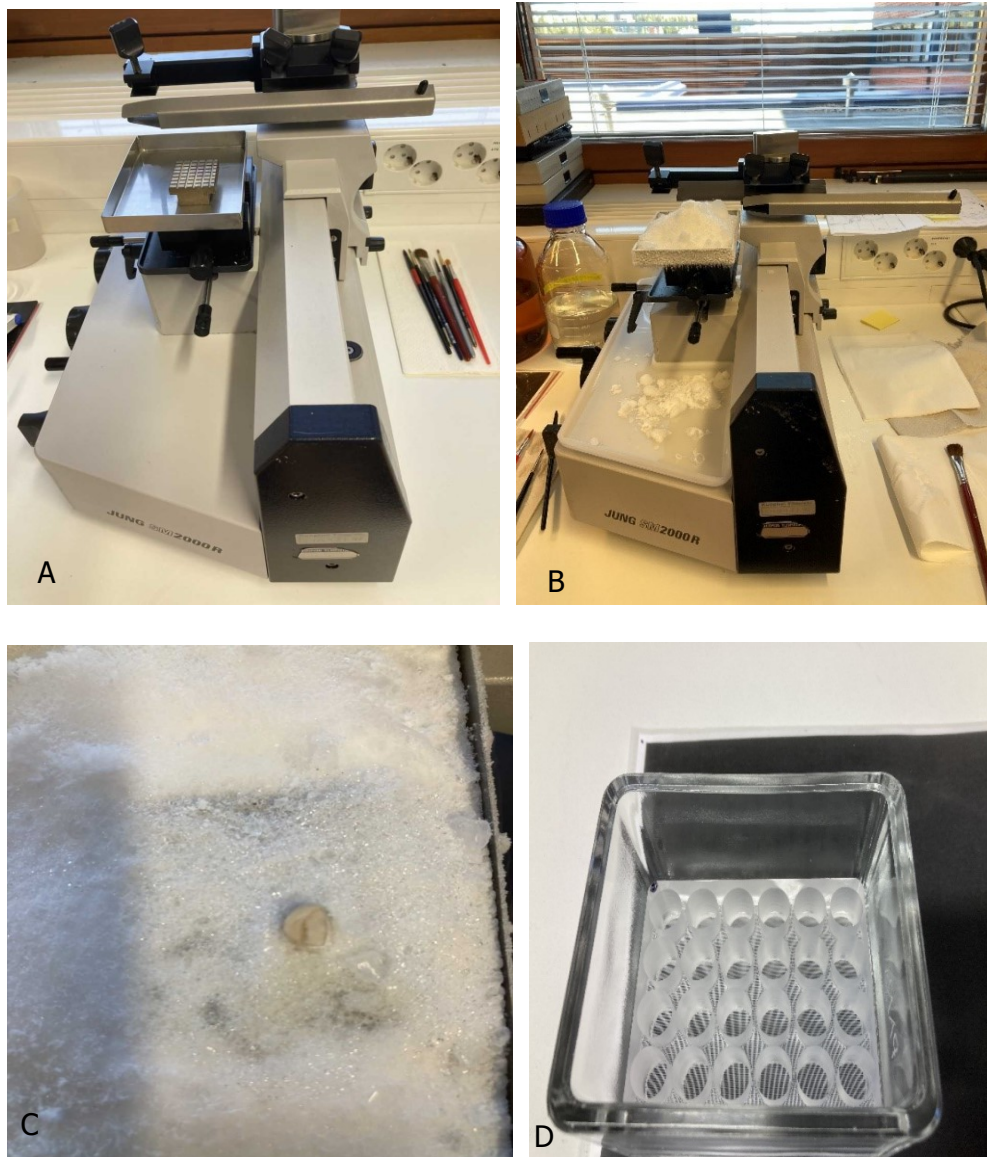
Tämä opinnäytetyö oli tutkimuksellista kehittämistä ja perustui arvostetuissa kansainvälisissä lehdissä julkaistuihin tutkimuksiin sekä yhteistyölaboratorion konsultaatioon. Koska kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmän soveltuvuus mikroglia-solujen tutkimiseen testattiin omaa laboratoriokäyttöä varten ja kaupalliset vasta-aineet olivat valmiiksi validoituja, riitti itse menetelmän pystytyksen validointiin värjäysolosuhteiden testaus ja optimointi. (Hägg, Margareta 2016, 7.) Aina ennen uuden tutkimuksen aloittamista värjäysolosuhteet on testattava näytekohtaisesti, vaikka menetelmä itsessään toimisikin.

Opinnäytetyössä käytetty tutkimusaineisto koostui PLCy2-hankkeen AT:a mallintavien APP/PSEN1-hiirten (APPdE9), taudilta suojaavan PLCy2 (P522R) variantin hiirten, molemmat genotyypit omaavien APPdE9 x PLCy2 (P522R) risteytyshiirien sekä villityypin hiirten aivokudoksista (Takalo ym. 2020, 8). Transgeeniset, kauppanimeltään APPswe/PSEN1dE9 (line 85), AT:a mallintavat hiiret oli tuotettu The Jackson laboratoriossa injektoimalla niihin APP ja PSEN1 geenejä ilmentävät vektorit (Alzforum 2023). Kukin hiiren genotyyppi tarkistettiin etukäteen sekvensoinnilla (Novogene Co.), TaqMan-pohjaisella yhden nukleotidin polyformismi (SNP) genotyyppauksella sekä PCR-analyysillä paikkansa pitäviksi. On huomioitava, että APPdE9 hiirten aivokudoksessa alkaa näkyä AT:lle tyyppilistä beeta-amyloidipatofysiologiaa vasta 4–6 kuukaudesta eteenpäin. Plakkien määrä ja koko kasvaa iän myötä, samoin kuin astrosyyttien määrä lisääntyy (Alzforum 2023). 12 kuukauden ikäisillä hiirillä käyttäytymismuutokset ovat selkeimpiä, siksi varsinainen PLCy2 -tutkimus ajoitettiin vähintään vuoden vanhoihin eläimiin. PLCy2 (P522R) -hiirillä beeta-amyloidipatologiaa ei ole. Pitkän odotusajan takia opinnäytetyössä käytettävien vasta-aineiden toimivuutta testattiin myös muilla tutkimusryhmässä meneillään olevien projektien näytteillä, joissa mikroglia-solut olivat kiinnostuksen kohteina.

4.4 Kelluvien leikkeiden valmistaminen

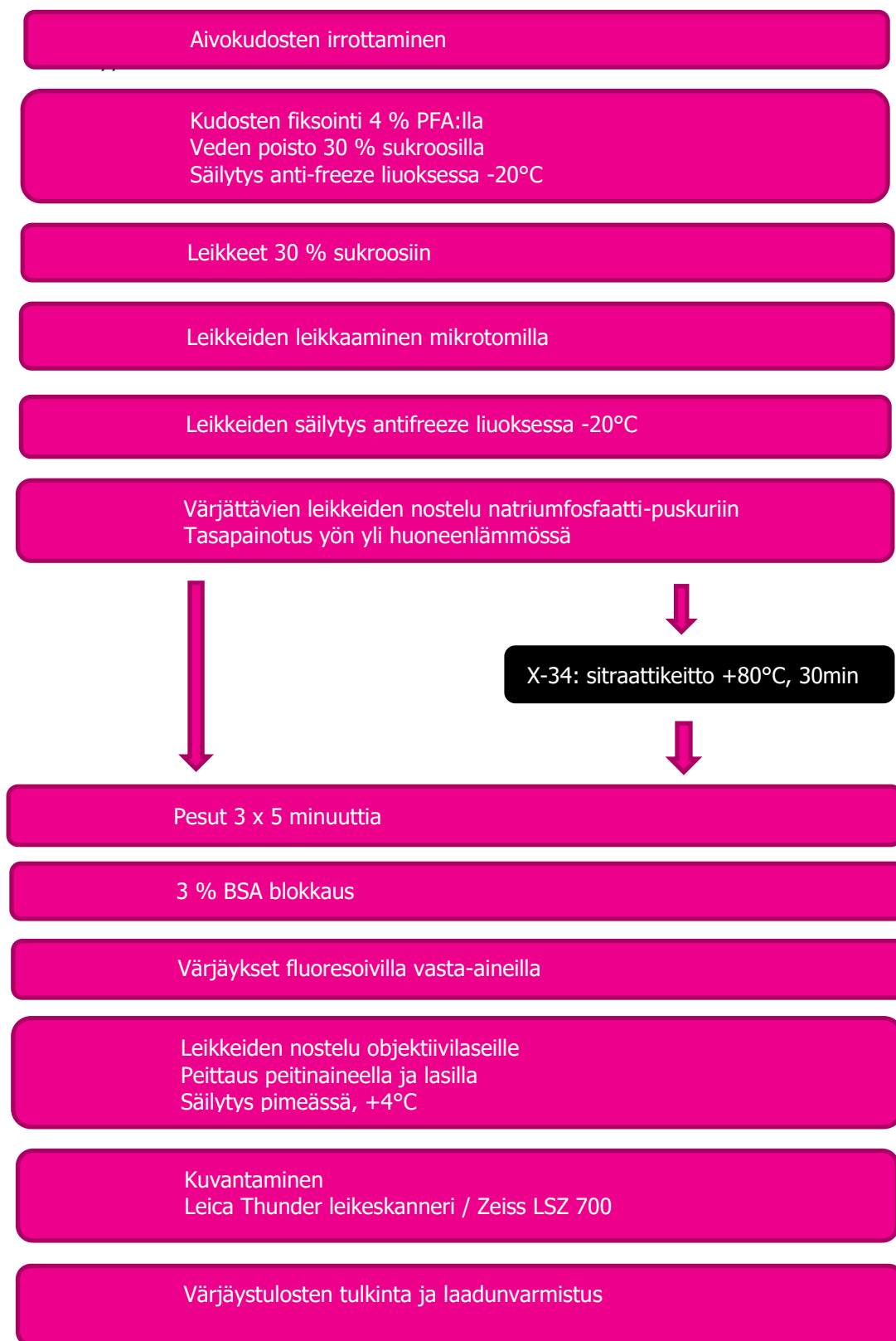
Preanalyttisessä vaiheessa aivokudoksen vasen puolisko fiksointiin 4 % paraformaldehydissä (#28908 Thermo Fisher Scientific), 24 tuntia, +4°C, jonka jälkeen se siirrettiin 15 millilitran falcon putkeen 12 millilitraan 30 % sukroosia. Sukroosi kyllästi näytteen ja poisti siitä veden, jotta solut eivät jäätyessään hajonneet ja aiheuttaneet kudokseen reikiä. Kun aivopala se oli painunut putken pohjalle, se siirrettiin jäätymisen estävään anti-freeze liuokseen. Itsetehty sukroosi-etyleeniglykoli-pohjainen anti-freeze (sukroosi 15 %, etyleeniglykoli 33 %) oli tarkoitettu näytteen säilyttämiseen -20°C asteessa. Mikrotomilla leikkaamista varten aivopala siirrettiin takaisin 12 millilitraan 30 % sukroosia, jotta mahdollinen anti-freeze liuoksesta kudokseen siirtynyt vesi poistui, eikä aiheuttanut värjäykseen reikäistä artefaktaa. Näyte oli valmis mikrotomilla (kuva 4 A) leikattavaksi, kun se oli painunut putken pohjalle.

Mikrotomin istukka huuhdeltiin vedellä puhtaaksi ja jäädytettiin kuivajäiden alla vähintään 20 minuuttia. Ylimääräinen osa aivopalan hajukämeistä leikattiin pois, kudoksesta istutettiin pikkuaivoista mikrotomin istukkaan vesiliukoisella ja kudosta värjäämättömällä kudoksiimalla (Tissue-Tek, #4583, Sakura), jonka jälkeen sen annettiin jäätymään vähintään puoli tuntia kuivajäiden alla (kuva 4 B ja C). Hippokampus oli keskeinen kiinnostuksen kohde ja kudoksen anatomian tunnistamisessa käytettiin apuna hiiren Atlas aivokudokskarttaa. Aivopalasta leikattiin 35 µm paksuisia leikkeitä, jotka kerättiin siveltimeillä 24-kuoppalevyille (Nunc 142475, Thermo Fisher Scientific) jäätymisen estävään anti-freeze liuokseen ja säilytettiin -20°C asteessa värjäyksen aloittamiseen saakka. Värjäystä edeltävänä päivänä, leikkeet siirrettiin huoneenlämpöön tasoravistelijaan tasapainottumaan 0,1 M natriumfosfaattipuskurissa 24- verkkokuoppalevyillä (kuva 4 D) yön yli.



KUVA 4. Menetelmän pystytykseen käytettyä välineistöä. A. mikrotomi B. Istukka täytettynä kuivajäillä C. Aivopala kiinnitettynä D. Värjäysmalja ja verkkokuoppalevy (Mäkinen 2022, BY)

Aivokudosten esikäsitteleminen, leikkaaminen ja värjäys on aikaa vievä prosessi ja jokainen vaihe vaikuttaa värjäytymisen lopputulokseen ja onnistumiseen. Kelluvien leikkeiden valmistus- ja värjäysprosessi on esitetty yksinkertaistettuna kuvassa 5.



KUVA 5. Kelluvien leikkeiden valmistus- ja värjäysprosessi (Mäkinen 2023, BY)

4.5 Leikkeiden värjäys fluoresoivilla vasta-aineilla

Testattavilla vasta-aineilla haluttiin näkyviin mikrogliasolut sekä mahdollisesti kudoksessa tapahtuvat AT:n beeta-amyloidipatologian aiheuttamat muutokset. Hippokampusleikkeet olivat optimoinnin keskiössä, koska siellä muutokset näkyvät ensimmäisenä (Tanila, Hiltunen & Myllykangas 2018, 2512). Kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmä puolsi paikkaansa, koska leikkeet olivat paksuja ja koko hippokampuksen alue leikattiin, jolloin leikemäärä kasvoi suureksi (Potts ym. 2020, 1).

Opinnäytetyössä käytetyt fluoresoivat vasta-aineet testattiin kahden eri primäärivasta-aineen yhteisvärjäyksinä. Tämän arveltiin antavan arvokasta tietoa mikrogliasolujen morfologiassa mahdollisesti tapahtuvista muutoksista sekä niiden kerääntymisestä ja sijoittumisesta suhteessa beeta-amyloidiplakkeihin. Yhteisvärjäys säästi myös aikaa ja näytteitä. Primäärivasta-aineiden valinnassa tuli huomioida, että ne oli tuotettu eri eläimessä (Naukkarinen ym. 2020, 98). Värjäykset suunniteltiin ja aikataulutettiin etukäteen, koska prosessi kesti useita päiviä ja mikroskoopit oli varattava ajoissa.

Opinnäytetyössä testatut vasta-aineet valittiin tieteelliseen näyttöön perustuen ja niiden toimivuus varmennettiin eri esikäsittelyin sekä käyttölaimennoksien. Mikroglia värjättiin kanissa tai vuoheissa tuotetulla Iba1 primäärivasta-aineella (Keren-Shaul ym. 2020, 1291.) APP:hen sitoutuvalla 22C11:lla detektoitiin dystrofiset neuriitit (Rohn, Ivins, Bahr, Cotman & Cribbs 2000, 2331). Mikroglion aktivaatio johtaa myös astrozyttien aktivaatioon, jotka värjättiin käyttäen astrozyttimarkkeri GFAP:a (Takalo ym. 2020, 6). Mikrogliasolujen aktivaatiosta ja fagosytoosikyvystä kertovat solunsisäiset lysosomit värjättiin CD68 vasta-aineella (Marshallinger ym. 2020, 200). BODIPY 493/503, X-34, DAPI ja TO-PRO™ Iodide eivät ole vasta-aineita, vaan fluoresoivia leimoja, jotka sitoutuvat soluorganelleihin. BODIPY 493/503 käytettiin värjäämään rasvapisarat ja näyttämään niiden lokalisaatio mikroglion sisässä (Marshallinger ym. 2020, 196). X-34 on amyloidi spesifinen leima, jolla saatiin näkyviin beeta-amyloidiplakit. DAPI ja TO-PRO™ Iodide väriaineita käytettiin värjäämään solujen tumien DNA tulosten normalisaatio tarkoitusta varten. (Parhizkar ym. 2020, 199; Takalo ym. 2020, 5.) Immunohistologiset värjäykset testattiin PLCy2 hiiriaineistossa kuvan 6 mukaisesti.

Genotyyppi	Amyloidipatologia	Testatut värjäykset
PLCy2 (P522R)	-	Iba1 + GFAP
APPdE9	+	x-34, Iba1, 22C11, TO-PRO™
APPdE9 + PLCy2 (P522R)	+ / -	x-34, iba1, 22C11, TO-PRO™
Villityyppi	-	Iba1 + GFAP

KUVA 6. Testivärjäyksissä käytetty PLCy2-tutkimuksen hiiriaineisto (Mäkinen 2023, BY)

Vasta-aineliuokset testattiin ja optimoitiin kahdella eri laimennospitoisuudella parhaimman lopputuloksen saamiseksi. Tämä oli erittäin tärkeää, sillä liian voimakas vasta-aineliuos aiheuttaa epäspesifistä taustaa ja vääristää värjäystulosta, liian laimea ei anna mitään tulosta (Naukkarinen ym. 2020,

115). Riippuen vasta-aineiden käyttöohjeista, tieteellisistä julkaisuista tai yhteistyölaboratorion kehokustuksista, leikkeet joko esikäsiteltiin ennen värjäysprosessin aloittamista keittämällä niitä puoli tuntia 0,05 M sitraattipuskurissa +80°C:ssa vasta-aineen sitoutumisen parantamiseksi (X-34) tai ne eteniivät 0,1 M natriumfosfaattiliuoksessa tehdystä tasapainotuksesta suoraan värjäykseen. BODIPY 493/503 vasta-ainetta käytettäessä oli huomioitava, ettei pintajännitystä poistavia aineita eli detergentejä, kuten Triton X tai Tween-20, saanut käyttää, sillä ne hajottivat rasvapisaraita. Tutkimuksessa käytetyt fluoresoivat vasta-aineet ja leimat olivat herkkiä valolle, siksi värjäysmaljat suojattiin foliolla koko prosessin ajan ja pitkäaikaista työskentelyä suorassa valossa pyrittiin välttämään. Jokaiseen testivärjäykseen sisällytettiin negatiivi- ja positiivikontrollit laadun ja luotettavuuden varmistamiseksi. Testatut primääri- ja sekundäärivasta-aineet laimennoksineen on mainittu kuvassa 7.

Primäärivasta-aine, alkuperä, testatut laimennokset	Kohde	Sekundäärivasta-aine	Fluoresenssi
Iba1 (019-19741), polyklonaalinen, kani 1:1000/ 1:2500/ 1:5000	mikroglia	Alexa Fluor 488, anti-goat (A11055) 1:500 Alexa Fluor 568, donkey anti-rabbit (A10042) 1:500	488/495, vihreä 568/578, punainen
Iba1 (ab5076), polyklonaalinen, vuohi 1:500/ 1:1000	mikroglia	Alexa Fluor 488, donkey anti-rat (A21208) 1:400	488/495, vihreä
X-34 (SML1954), 1 mM stock 1:10	A β -plakit	Ei sekundääriä, vaatii 0,05M sitraattikeiton 80°C:ssa, 30 minuuttia ennen värjäystä	367/497, sininen
22C11 (MAB348) monoklonaalinen, hiiri 1:2000/1:5000	dystrofiset neuriitit	Alexa Fluor 568 anti-mouse (A11004) 1:500	568/578, punainen
TO-PRO TM -3 ionide (T3605) 1:1000	nukleotidit		642/661, punainen
BODIBY 493/503 (D3922) 1 mg/mL 1:1000	rasvapisarot	Ei detergentejä huuhteluliuoksissa	Vihreä
CD68, MCA1957, monoklonaalinen hiiri 1:2500 / 1:5000	Lysosomit, aktiiviset mikroglia	Alexa Fluor 568, donkey anti-goat (A11057) 1:400	
GFAP (Z0334), polyklonaalinen, kani 1:500/ 1:1000	astrocytit	Alexa Fluor 488, donkey anti-goat (A11055) 1:500	488/495, vihreä
DAPI (D1306) 1 mg/mL 1:1000 / 1:2000	tumien DNA		sininen

KUVA 7. Testatut primääri- ja sekundäärivasta-aineet laimennoksineen (Mäkinen 2023, BY)

4.5.1 X-34 + Iba1 + 22C11 + TO-PRO™ Iodide värjäys

Värjäys testattiin APPdE9 X PLCy2 (P522R) hiirten aivokudosleikkeissä ja sen tarkoituksena oli saada näkyviin vanhenemisen myötä aivokudokseen kertyvää beeta-amyloidia ja siitä johtuvaa hermosolujen vaurioitumista (kuva 8). Leikkeet kerättiin värjäystä edeltävä päivänä pakastusmediumista 0,1 M natriumfosfaattipuskuriin 24-verkkokuoppalevyille, kustakin genotyypistä kaksi leikettä samaan kuoppaan ja leikkeet saivat tasapainottua yön yli huoneen lämmössä, tasoravistelijassa hiljalleen heiluen. X-34 väri vaati esikäsitteilyn keittämällä leikkeet 0,05 M sitraattipuskurissa, 30 minuuttia, +80°C:ssa paremman värjäytyvyyden vuoksi. Leikkeet jäädytettiin 0,1 M natriumfosfaattiliuoksessa 20 minuuttia, jonka jälkeen ne värjättiin X-34 (Thermo Fisher, SML1954, 1:10) värillä 60 % PBS/40 % etanoli-liuokseen laimennettuna, 1 tunnin ajan tasoravistelijassa huoneen lämmössä. Tämän jälkeen leikkeet huuhdeltiin kerran 60 % PBS/40 % EtOH liuoksessa ja pestiin 3 x 5 minuuttia tasoravistelijassa hiljalleen heiluttaen TBST (1x Tris + 0,05 % Tween, pH 7.6) liuoksessa. Epäspesifinen primääri-vasta-aineiden sitoutuminen estettiin käsittelemällä leikkeet 3 % naudan seerumin albumiinilla (BSA) + TBST, 1 tunnin ajan huoneen lämmössä tasoravistelijassa. Negatiivikontrollileikkeisiin ei tullut primääri-vasta-ainetta, joten ne eroteltiin blokkauksiliuoksessa erilliseen astiaan, muille leikkeille tehtiin primääri-vasta-ainekäsittelyt yhteisvärjäyksenä IBA1 (Wako, 019-19741, 1:1000) + 22C11 (Merck, MAB348, 1:2000) blokkauksipuskurissa, tasoravistelijassa valolta suojattuna, +4°C:ssa yön yli. Värjäyksen jälkeen leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia TBST:ssä kiinnittymättömän vasta-aineen poistamiseksi. Inkubaatio sekundääri-vasta-aineilla Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, A11008, 1:400) ja Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher, A11004, 1:400) tehtiin TBST:hen laimennettuna, 2 tuntia valolta suojattuna tasoravistelijassa, huoneen lämmössä. Kiinnittymätön aines pestiin pois 3 x 5 minuuttia TBST:ssä. TO-PRO™ Iodide 1:1000 TBST:ssä, 15 minuuttia, ravistelijassa, huoneenlämmössä. Kiinnittymätön väri pestiin pois 3 x 5 minuuttia TBST:ssä, huoneenlämmössä tasoravistelijassa hiljalleen heiluen. Leikkeet nosteltiin natriumfosfaattipuskuriin ja edelleen gelatiinikäsittelyille objektilaseille, jotka peitettiin 6–8 tipalla VectaShield HardSet mediumia (Vector H-1400) ja sopivan kokoisella peitinlasilla. Leikelasit kuivattiin valolta suojattuna 15 minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne säilytettiin +4°C:ssa.

4.5.2 Iba1 + GFAP + DAPI värjäys

Värjäys testattiin PLCy2 (P522R) hiirten aivokudosleikkeissä ja sen tarkoituksena oli saada näkyviin mikrogliasolut sekä astrosyytit. Värjäystä kokeiltiin keittämällä leikkeitä 0,05M sitraattipuskurissa, 30 minuuttia, +80°C:ssa sekä ilman keittämistä. Leikkeiden keittäminen sitraattipuskurissa ei oleellisesti parantanut värjäystulosta (kuva 9), joten siitä luovuttiin. Leikkeille kokeiltiin myös 1:1000 primääri-vasta-ainelaimennoksia, jotka toimivat hyvin (kuva 10). Koska vasta-aineet ovat kalliita, on tarkoituksenmukaista pyrkiä mahdollisimman suureen, mutta luotettavan lopputuloksen antavaan laimennokseen. Leikkeet kerättiin värjäystä edeltävä päivänä pakastusmediumista 0,1 M natriumfosfaattipuskuriin 24-verkkokuoppalevyille ja ne saivat tasapainottua tasoravistelijassa hiljalleen heiluen yön yli, huoneenlämmössä. Leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia TBST:llä. Epäspesifinen primääri-vasta-aineiden sitoutuminen estettiin 3 % BSA + TBST blokkauksella yhden tunnin ajan huoneenlämmössä, tasoravistelijassa heiluttaen. Primääri-vasta-ainekäsittelyt tehtiin yhteisvärjäyksenä IBA1 (Abcam,

ab5076, 1:1000) + GFAP (Dako, Z0334, 1:1000) blokkaustrupkurissa, tasoravistelijassa valolta suojattuna, +4°C yön yli. Negatiivikontrollit otettiin erilleen blokkaustruoksessa omaan astiaan. Inkubaation jälkeen leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia TBST:llä ja käsiteltiin sekundäärivasta-aineilla Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher, A10042, 1:500) ja Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, A11055, 1:500) TBST:ssä, yhden tunnin ajan valolta suojattuna tasoravistelijassa, huoneen lämmössä. Sekundäärivasta-aine inkubaation jälkeen kiinnittymätön aines pestiin pois 3 x 5 minuuttia TBST:llä. Solujen tumat värjättiin DAPI:llä (Thermo Fisher, D1306, 1:1000) TBST:ssä, 15 minuuttia huoneenlämmössä, tasoravistelijassa, jonka jälkeen leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia TBST:ssä. Leikkeet siirrettiin natriumfosfaattiliuosta sisältävälle maljalle ja nosteltiin gelatiinikäsittelyille objektilaseille. Leikkeiden päälle pipetoitiin 6–8 tippaa VectaShield HardSet mediumia (Vector H-1400) ja asetettiin sopivan kokoinen peitinlasi. Leikelaseja kuivattiin 15 minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna, jonka jälkeen ne säilytettiin +4°C:ssa.

4.5.3 Iba1 + CD68 + DAPI värjäys

Testauksessa käytettiin hiirten organotyyppisistä viljelmistä peräisin olevia näytteitä ja värjäyksen tarkoituksena oli tunnistaa iän myötä aktivoituvat mikroglia, joiden sisällä on lysosomeja, mikä kertoo solujen fagosytoosikyvystä ja entsymaattisesta aktiivisuudesta (kuvat 12 ja 13). Leikkeet kerättiin värjäystä edeltävä päivänä pakastusmediumista 0,1 M natriumfosfaattipuskuriin 24-verkkokuoppalevylle ja ne saivat tasapainottua tasoravistelijassa hiljalleen heiluen yön yli, huoneenlämmössä. Leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia TBST:llä. Epäspesifinen primäärivasta-aineiden sitoutuminen estetettiin 3 % BSA + TBST blokkauksella yhden tunnin ajan huoneenlämmössä, tasoravistelijassa heiluttaen. Primäärivasta-ainekäsittelyt tehtiin yhteisvärjäyksenä IBA1 (Abcam, ab5076, 1:500) + CD68 (Bio-Rad, MCA1957, 1:5000) blokkaustrupkurissa, tasoravistelijassa valolta suojattuna, +4°C yön yli. Negatiivikontrollit otettiin erilleen blokkaustruoksessa omaan astiaan. Leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia TBST:ssä. Sekundäärivasta-ainekäsittely tehtiin Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher, A10057, 1:400) ja Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, A21208, 1:400) TBST:een laimennettuna, 3 tuntia valolta suojattuna ravistelijassa, huoneen lämmössä. Kiinnittymätön vasta-aine huuhdeltiin 3 x 5 minuuttia TBST:ssä, jonka jälkeen solujen tumat värjättiin DAPI:lla (Thermo Fisher, D1306, 1:1000) TBST:ssä 15 minuuttia, tasoravistelijassa huoneenlämmössä hiljalleen heiluttaen. Leikkeet huuhdeltiin 3 x 5 minuuttia TBST:llä ja siirrettiin 0,1 M natriumfosfaattiliuokseen. Leikkeet nosteltiin gelatiinikäsittelyille objektilaseille ja peitettiin VectaShield HardSet mediumilla (Vector H-1400) ja sopivan kokoisella peitinlasilla. Leikelaseja kuivattiin 15 minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna, jonka jälkeen ne säilytettiin +4°C:ssa.

4.5.4 Iba1 + BODIPY 493/503 + DAPI värjäys

Värjäys testattiin APPdE9 hiirten aivokudosleikkeissä ja sillä pyrittiin saamaan näkyviin mikroglia-solujen sisällä olevat rasvapisarat (kuva 13). Leikkeet kerättiin värjäystä edeltävä päivänä pakastusmediumista 0,1 M natriumfosfaattipuskuriin 24-verkkokuoppalevylle ja ne saivat tasapainottua tasoravistelijassa hiljalleen heiluen yön yli, huoneenlämmössä. Leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia TBST:llä.

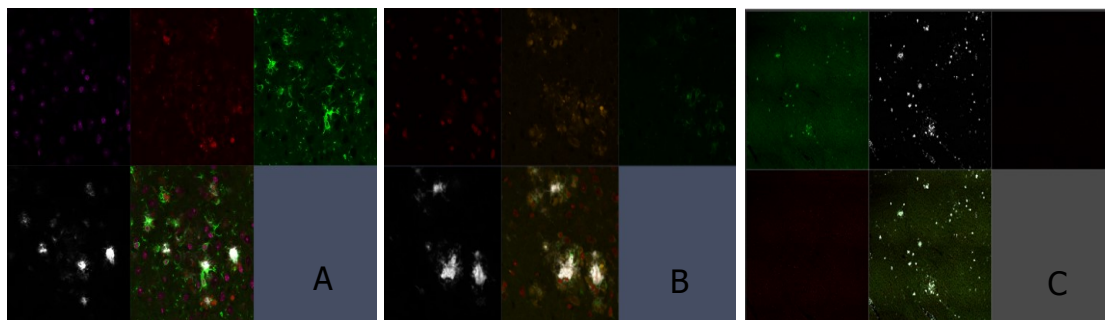
Epäspesifinen primäärivasta-aineiden sitoutuminen estettiin 3 % BSA + TBST blokkauksella yhden tunnin ajan huoneenlämmössä, tasoravistelijassa heiluttaen. Primäärivasta-ainekäsittely tehtiin Iba1 (Wako, 019-19741, 1:2500) vasta-aineella blokkaukspuskurissa, tasoravistelijassa valolta suojattuna, +4°C:ssa 48 tuntia. Negatiivikontrollit otettiin erilleen blokkauksliuoksessa omaan astiaan. Leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia 0,1 M natriumfosfaattiliuoksessa, jonka jälkeen ne käsiteltiin sekundäärivasta-aineella Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher, A11012, 1:1000) 3 % BSA + 0,1 M natriumfosfaattiliuoksessa, 3 tuntia huoneen lämmössä, valolta suojattuna tasoravistelijassa hiljalleen heiluen. Leikkeet pestiin 3 x 5 min 0,1 M natriumfosfaattiliuoksessa. Fluoresoivat leimat BODIPY 493/503 (Thermo Fisher, D3922, 1:1000) ja DAPI (Thermo Fisher, D1306, 1:2000) laimennettiin 0,1 M natriumfosfaattiliuokseen ja värjättiin 15 minuuttia, huoneenlämmössä tasoravistelijassa. Leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia 0,1 M natriumfosfaattiliuoksessa, jonka jälkeen ne siirrettiin gelatiinikäsittelyille objektilaseille ja peitettiin 6–8 tipalla VectaShield HardSet mediumilla (Vector H-1400) sekä sopivan kokoisella peitinlasilla. Leikelasit kuivattiin 15 minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna, jonka jälkeen ne säilytettiin +4°C:ssa.

5 TUTKIMUKSEN TULOKSET

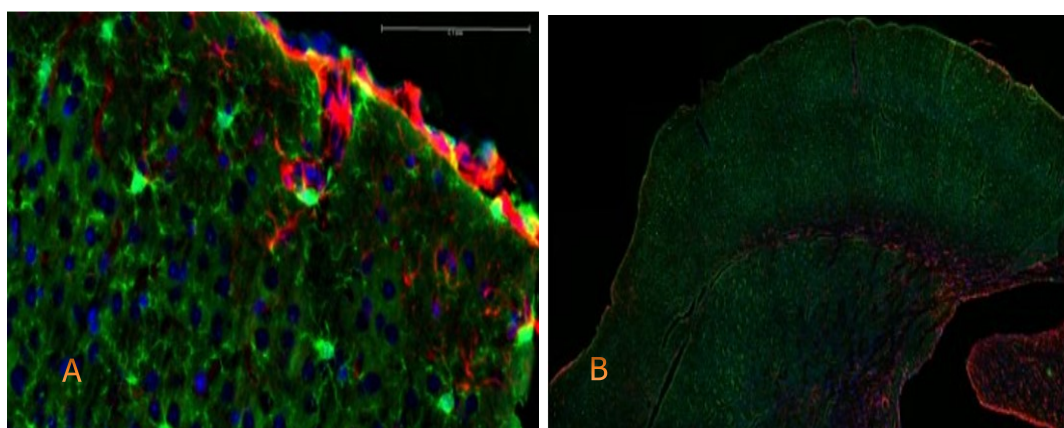
Tämän opinnäytetyön tuotoksena kehitettiin kelluvien leikkeiden värjäyspiste histologian laboratorioon biolääketieteen yksikköön. Työssä keskityttiin mikroglia-solujen värjäykseen eri esikäsittelyillä ja vasta-ainepitoisuuksilla PLCy2-hankkeen hiiriaineiston tutkimusta varten. Samalla testattiin beeta-amyloidiplakkien, dystrofisten hermosolujen, astrosyyttien sekä rasvapisaroiden värjäytyvyyttä tutkimushiirten aivokudosleikkeissä.

Värjäysmenetelmän testauksessa ja optimoinnissa käytettiin PLCy2-hankkeen tutkimushiirten aivokudoksista valmistettuja näytteitä sekä muita tutkimusryhmän projektien kelluvia aivokudosleikkeitä, joissa mikroglia-solut yhtä lailla olivat mielenkiinnon kohteena. Valituilla vasta-aineilla pyrittiin saamaan mahdollisimman kokonaisvaltainen kuva mikroglia-solujen morfologiasta ja sijoittumisesta aivokudoksessa AT:n amyloidipatologiaan verrattuna. Värjäysten tavoitteena oli vähäinen tausta sekä spesifi ja kirkas fluoresenssi, joka mahdollistaa solujen luotettavan tutkimisen.

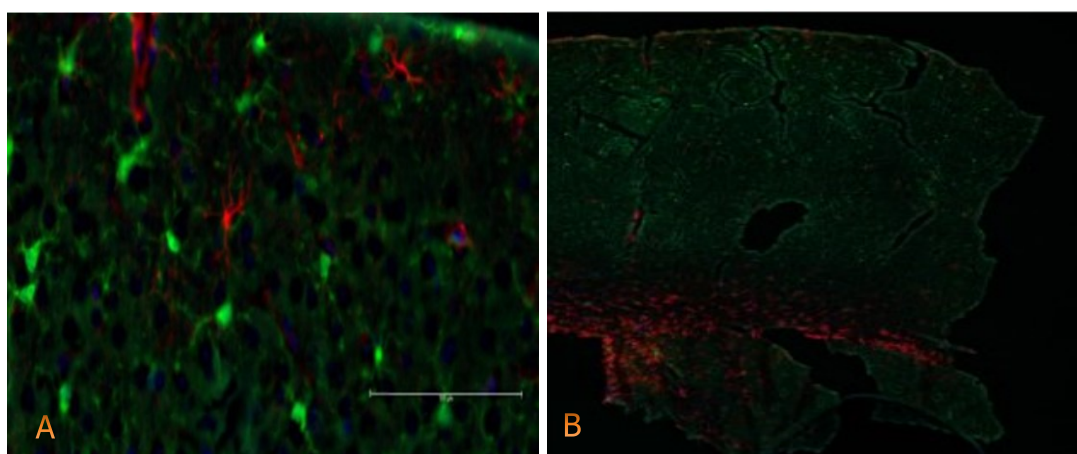
Värjäystulosten perusteella mikroglia-solut värjäytyivät hiiren kelluvissa aivokudosleikkeissä Iba1 vasta-aineilla hyvin. Molemmilla eri valmistajan vasta-aineilla päädyttiin käyttämään 1:000 laimennosta. Homeostaattiset eli perustilassa olevat mikroglia-tunnisti pitkistä haarakkeista, jotka solun aktivoituessa lyhenivät ja paksuuntuivat, samalla kun solujen morfologia muuttui pyöreämmäksi (Airas ja Saraste 2020, 752). Kuvassa 8 A, B nähdään aktivoituneiden mikroglia-solujen klusteroituvan eli muodostavan pesäkkeitä beeta-amyloidiplakkien ympärille, kuten aiemmissa tutkimuksissa (Prokop ym. 2013, 462; Airas ja Saraste 2020, 752; Andreone 2020, 927) on osoitettu. Samassa värjäyksessä X-34 fluoresoiva leima värjäsi beeta-amyloidiplakit 1:10 laimennoksella paikoin liiankin voimakkaasti, mikä on selvästi pääteltävissä värjäyksen visuaalisesta ilmeestä (kuva 8 A, B, C). APP:n sitoutuvan ja dystrofiset neuriitit värjäävän 22C11 vasta-aineen signaali oli selvästi voimakas beeta-amyloidiplakkien ympärillä, kuten kuuluukin (kuva 8 A, B). Muun muassa Jordà-Siquier ym. (2020, 2) ja Magno ym. (2019, 5) ovat osoittaneet APP:n akkumuloituvan voimakkaasti beeta-amyloidiplakkien ympärille. Mikroglia-solujen ja astrosyyttien värjäytyvyyttä testattiin aluksi voimakkaammalla 1:500 laimennoksella (kuva 9) ja myöhemmin 1:1000 laimennoksella, mikä toimi riittävän luotettavasti (kuva 10) ja niin saatiin säästettyä kalliita vasta-aineita. Sitraattikeittoesikäsittelyä kokeiltiin Iba1 (ab5076) vasta-aineelle, mutta sen ei huomattu parantavan mikroglia-solujen värjäytyvyyttä (kuva 11). Mikroglia-solujen aktiivisuus testattiin Iba1 ja CD68 kaksoisvärjäyksellä, jossa käytettiin hyödyksi organotyyppisiä leikeviljelmää. Mitä vanhempia viljelmät olivat, sitä selvemmin niissä näkyi fagosytoivien mikroglia-solujen sisällä olevia lysosomeja (kuva 12 ja 13). Tämä oli merkki solujen aktiivisuudesta ja toimintakyvystä (Parhizkar ym. 2019, 193.) Mikroglia-solujen hyvinvoinnista ja aineenvaihdunnasta kertovat rasvapisarot (Andreone ym. 2020, 932; Marschallinger ym. 2020, 1) värjäytyivät BO-DIPY 493/503 fluoresoivalla leimalla epätasaisesti, antaen usein joko liian voimakkaan tai liian laimean värjäystuloksen.



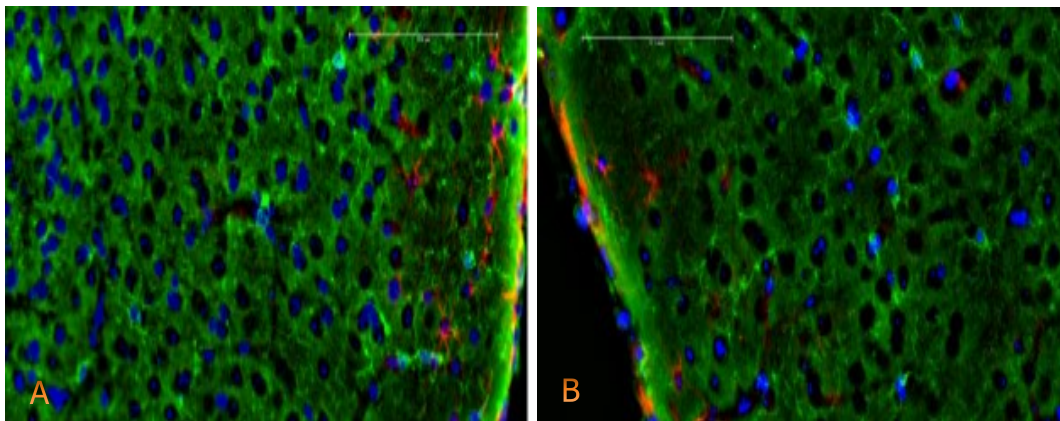
Kuva 8. PLCy2-hiiriaineiston beeta-amyloidiplakkien testivärjäys sitraattikeitolla. A ja B kuvissa beeta-amyloidiplakit (X-34, harmaa), mikroglia (Iba1 019-19741, vihreä), dystrofiset neuroiitit (22C11, punainen / oranssi) sekä solujen tumat (To-PRO-3, violetti) värjättyinä APPdE9 x PLCy2 (P522R) -hiirissä. Kuvassa C on negatiivikontrollinäyte, jota ei ole käsitelty Iba1 ja 22C11 vasta-aineilla. (Takalo 2023, BY.)



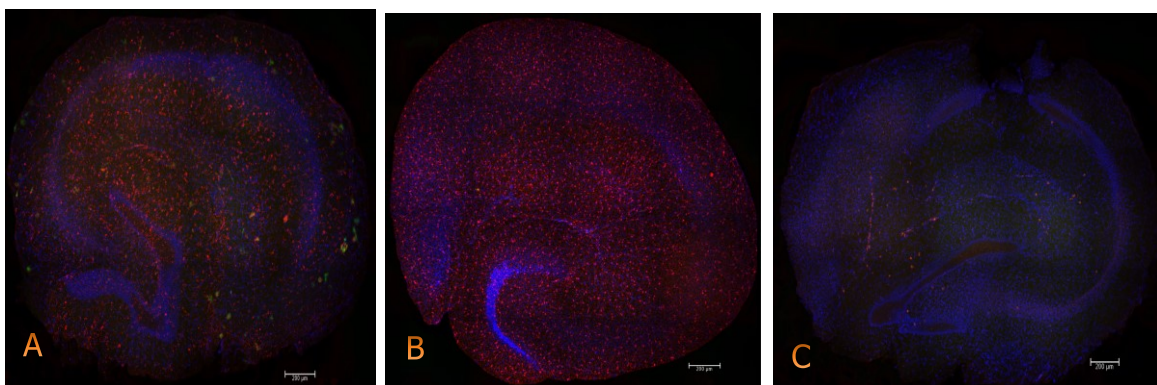
KUVA 9. PLCy2 hiiriaineiston värjäys ilman sitraattikeittoa A. Mikroglia (vihreä) värjättyinä Iba1 vasta-aineella (ab5076), 1:500, astrocytit (punainen) GFAP 1:500, solujen tumat DAPI (sininen) 1:1000, 40X suurennoksella. B. Koko aivoleike kuvattuna. (Takalo 2022, BY.)



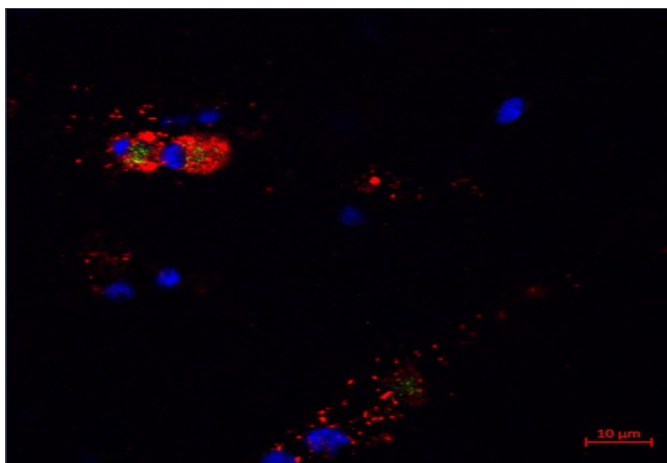
KUVA 10. Iba1 (ab5076) (vihreä), GFAP (punainen) ja DAPI (sininen) värjäys testattuna ilman sitraattikeittoa 1:1000 laimennoksella. Kuvassa A näkymä 40X suurennoksella ja kuvassa B koko aivoleike. Värjäystulos ilman keittoa sekä suuremmalla vasta-ainelaimennoksella toimi hyvin, mikä oli pääteltävissä mikrogliaisoluille tunnusomaisesta morfologiasta ja solujen värjäytyvyydestä. (Takalo 2022, BY.)



KUVA 11. Iba1 (ab5076), GFAP, DAPI värjäys testattuna sitraattikeitolla. A. Värjäys 1:500 vasta-aine laimennoksella ja B. 1:1000 vasta-ainelaimennoksilla. Keittäminen ei oleellisesti parantanut värjäytystä, siksi siitä luovuttiin. Sen sijaan 1:1000 laimennokset toimivat riittävän hyvin. (Takalo 2022, BY.)

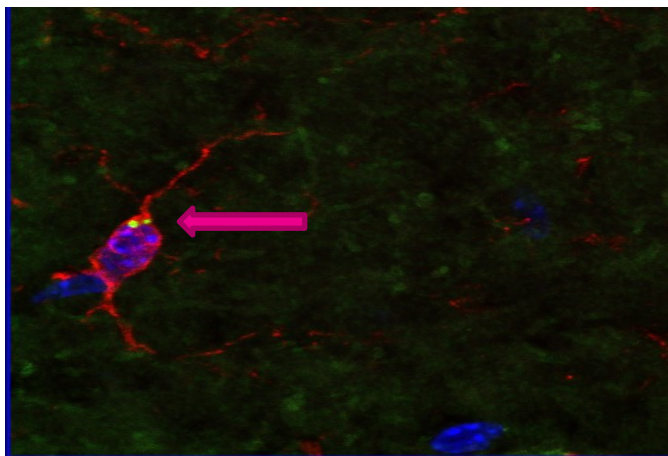


KUVA 12. Mikroglia ja lysosomit. Mikroglia (Iba1, 019-19741, punainen) ja lysosomit (CD68, vihreä) värjättyinä 14 viikon ja 0 viikon ikäisissä leikeviljelmissä. A. 14 vk ikäisissä viljelmissä näkyvät lysosomit indikoivat mikroglion aktiivisuutta ja fagosytoosikykyä B. 0 viikon ikäisissä leikeviljelmissä ei ole vielä nähtävissä mikroglion aktiivisuutta. C kuvassa on negatiivikontrolli, jossa näkyy vain DAPI (sininen), mikä kertoo primääri-vasta-aineiden toimivuudesta ja värjäyksen luotettavuudesta. (Kempainen 2022, BY.)



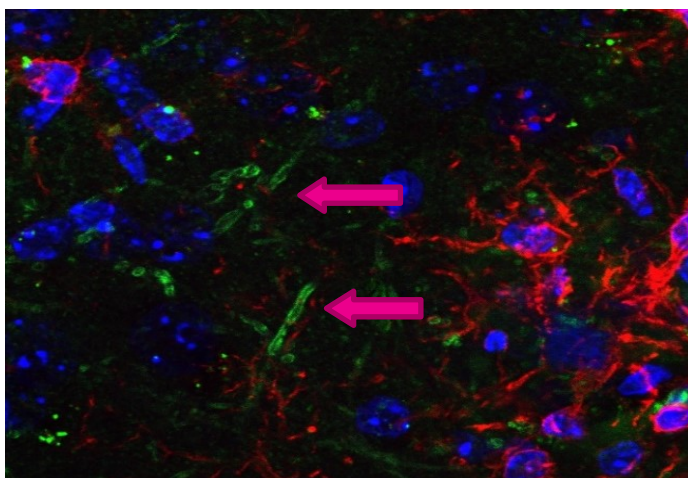
KUVA 13. Aktiivisten mikroglia-solujen (Iba1, punainen) sisällä olevia lysosomeja (CD68, vihreä). Solujen tumat värjättyinä DAPIlla (sininen). Mikroglion pyöreä muoto kertoi solujen aktivoitumisesta ja lysosomit niiden sisällä solujen fagosytoosikyvystä. (Kempainen 2022, BY.)

Mikroglion aineenvaihdunnasta ja solujen hyvinvoinnista (Marschallinger ym. 2020) kertovat rasvapisarot värjättiin Iba1 ja BODIPY 493/503 fluoresoivan leiman yhteisvärjäyksenä (kuva 14). BODIPY 493/503 leimaamat rasvapisarot osoittautuivat hankaliksi värjättäviksi, koska signaali saattoi heiketä nopeasti. Toisinaan leima oli taas hyvin voimakas ja värjäsi koko leikkeen epäspesifisesti vihreäksi. Positiivikontrollin sisällyttäminen rasvapisaroiden värjäyssarjaan oli ehdottoman tärkeää ja takasi tulosten tarkastelun luotettavuuden.



Kuva 14. Nuolen osoittamat kaksi rasvapisaraa (vihreä) mikrogliasolun (punainen) sisällä (Martiskainen 2022, BY).

Kuten Naukkarinen ym. (2020, 54) toteavat, on värjättävä kohde ja sen morfologia tunnettava hyvin, jotta vältetään mahdollisilta virhetulkinnoilta. Esimerkiksi näyttekudoksen perfuusion tai fiksoinnin epäonnistuminen saattoi aiheuttaa kudokseen jääneen veren punasolujen epäspesifisen fluoresoinnin (kuva 15) ja vaikeutti varsinkin BODIPY 493/503 värjättyjen rasvapisaroiden tulkintaa.



KUVA 15. Nuolet osoittavat verisuonten punasolujen autofluoresenssista johtuvaa artefaktia rasvapisaroiden (BODIPY, vihreä) ja mikroglion (Iba1, punainen) yhteisvärjäyksessä. (Martiskainen 2022, BY.)

CD68 vasta-aineen ja BODIBY 493/503 fluoresoivan leiman toimivuus testattiin hiirten organotyyppi-
sissä leikevielmissä sekä PLCy2-aineiston näytteillä. Mikroglia värjäytyivät hyvin ja ne kerääntyivät
beeta-amyloidiplakkien läheisyyteen. Solujen määrän, koon ja morfologian muutosten luotettavaan
havainnointiin on tutkimusryhmässä parhaillaan kehitteillä tietokonepohjainen analysointiohjelma.

Kullekin vasta-aineelle tehdyn testivärjäyksen ja olosuhteiden optimoinnin perusteella päädyttiin seu-
raaviin vasta-ainelaimennoksiin: Iba1 1:1000, 22C11 1:2000, GFAP 1:1000, X-34 1:10 ja TO-PRO
1:1000. Mikäli värjäys onnistui yhtä hyvin ilman sitraattikeittoa kuin keiton kanssa, jätettiin tämä
aikaa vievä esikäsittely pois. Testattujen vasta-aineiden ja fluoresoivien leimojen toimivimmat lai-
mennokset sekä värjäyksissä huomioonotetut seikat on koottu kuvaan 16. Niitä voidaan pitää tämän
opinnäytetyön tuloksina, joiden mukaisesti värjätään tulevat PLCy2-hiiriaineiston aivokudosleikkeet.

Yhteenvetona ja opinnäytetyön tutkimuskysymykseen vastaten kelluvien leikkeiden värjäysmene-
telmä soveltuu erinomaisesti mikroglion immunohistokemialliseen tutkimiseen. Se tuo hyvän lisän
molekyyligenetiikan tutkimusryhmän jo ennestään monipuolisiin tutkimusmenetelmiin ja on tarvitta-
essa hyödynnettävissä koko biolääketieteen yksikön käyttöön.

Vasta-aine ja laimennos	Tunnistaa	klonaalisuus	tuotenumero	valmistaja
Iba1, 1:1000 Ei sitraattikeittoa	mikroglia	polykl. kani	019-19741	Wako
Iba1, 1:1000 Ei sitraattikeittoa	mikroglia	polykl. vuohi	ab5076	Abcam
22C11, 1:2000	dystrofiset neuriitit	monokl. hiiri	MAB348	Merck
GFAP, 1:1000	astrocytit	polykl. kani	Z0334	DAKO
CD68, 1:5000	lysosomit	monokl. hiiri	MCA1957	Bio-Rad
BODIPY 493/503, 1:1000 Ei detergenttejä	rasvapisarot		D3922	Thermo Scientific
X-34, 1mM stock, 1:10 Vaatii sitraattikei- ton	beeta- amyloidiplakit		SML1954	Merck
TO-PRO™ Iodide, 1:1000	tumat		T3605	Thermo Scientific
DAPI, 1:2000	tumat		D1306	Thermo Scientific

KUVA 16. Parhaimman tuloksen antaneet vasta-ainelaimennokset (Mäkinen 2023, BY)

6 POHDINTA

Molekulaarisen genetiikan tutkimusryhmä on PLCy2 -hankkeen myötä aktiivisesti mukana kansainvälisessä AT:n tutkimuksessa ja tekee tärkeää työtä sairauden syntymekanismien ymmärtämiseksi. Ikääntyminen ja sen mukanaan tuomat terveydelliset haasteet sekä kyky reagoida nopeastikin muuttuviin globaaleihin ongelmiin ovat yksi osa Itä-Suomen yliopiston strategista fokusta (UEF 2023). Se edellyttää muun muassa kilpailukykyisten ja monipuolisten tutkimusmenetelmien hallintaa.

Kuten Martiskainen ym. (2021, 1377) nostavat esiin, useat viimeaikaiset GWAS-tutkimukset osoittavat mikrogliasolujen tärkeyden AT:n synnyssä ja kehittämisessä. Siksi niiden tutkiminen on tärkeää. Tässä opinnäytetyössä onnistuneesti kehitetyn ja testatun kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmän ansiosta tutkittavien kudoksenäytteiden prosessointi ja värjäykset immunohistokemiallisilla vasta-aineilla onnistuvat jatkossa omassa tutkimusyksikössä. Koska metodi mahdollistaa myös useiden aivoleikkeiden värjäyksen samalla kertaa, on sillä taloudellinen ja aikaa säästävä merkitys (Potts ym. 2020, 3).

Opinnäytetyön tarkoituksen voidaan katsoa toteutuneen, koska kudoksenleikkeiden valmistus onnistui hyvin, testatut vasta-aineet värjäisivät mikrogliat ja antoivat samanlaiset värjäystulokset tieteellisiin julkaisuihin verrattuna. Mikrogliojen ameebamainen morfologian muutos viittasi niiden aktivaatioon ja ne kerääntyivät odotetulla tavalla beeta-amyloidiplakkien ympärille. Tämä kertoo mikrogliojen puolustavasta roolista AT:ssa. (Prokop ym. 2013, 462; Airas ja Saraste 2020, 752). Samoin dystrofiset neuroiitit, jotka ovat merkki solujen ikääntymisestä tai sairauden aiheuttamista muutoksista aivokudoksessa, lokalisoituivat beeta-amyloidiplakkien ympärille (Magno ym. 2019, 5). Mikrogliasolujen aktivoituminen lisäsi astrosyyttien määrää (Takalo ym. 2020, 6) ja oli havaittavissa GFAP värjäyksissä. Andreone ym. (2020, 932) osoittivat rasvapisaroiden lisääntyvän mikrogliojen sisällä tulehdussellisissa tiloissa. Opinnäytetyössä testatulla BODIPY 493/503 leimalla saatiin näkyviin rasvapisaroita aktiivisten mikrogliojen sisällä, mutta värjäyksen spesifisyys ja luotettavuus vaihtelivat siinä määrin, että jatkossa värjäykseen kokeillaan muuta fluoresoivaa leimaa, esimerkiksi LipidTOXia.

Värjäystuloksia analysoitaessa voidaan katsoa myös opinnäytetyön tavoite saavutetuksi. Toki PLCy2-tutkimus jatkuu ja sen odotetaan tuovan vielä tarkempaa tietoa mikrogliasolujen käyttäytymisestä AT mallintavien hiirten aivokudoksessa. PLCy2-hiiriaineiston aivokudoksenäytteitä tullaan värjäämään kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmällä myös muilla mikrogliojen toiminnasta ja beeta-amyloidin kertymisestä kertovilla vasta-aineilla, kuten P2ry12 (homeostaattiset mikrogliat), 4G8 tai 6E10 (beeta-amyloidiplakit) sekä APOE (Parhizkar ym. 2019, 196). Mielenkiintoista on myös nähdä, vaikuttaako tutkimushiirten sukupuoli värjäystuloksiin.

6.1 Opinnäytetyön merkitys

Vaikka PLCy2-taustaprojektin myötä kehittämistyön fokus oli mikrogliasolujen värjäyksissä, on samalla menetelmällä mahdollista tutkia myös muita aivokudoksen soluja, esimerkiksi neuroneja ja astrosyyttejä sekä solun sisäisiä partikkeleita, kuten lysosomeja ja rasvapisaroita. Yhdessä erilaisten

funktionaalisten tutkimusten kanssa menetelmä lisää PLCy2-tutkimusprojektin kattavuutta, tieteellistä informaatiota sekä tutkimuksellista painoarvoa, mitä erilaiset tutkimuksien rahoittajat, säätiöt ja Suomen Akatemia nykyään vaativat.

Tähän mennessä kelluvien kudokset immunohistokemialliset värjäykset on suoritettu kokonaan toisessa yksikössä yhteistyökumppanin toimesta. Koska värjäysprotokollia pystytään modifioimaan eri vasta-aineiden käyttöä ja tutkimuskohteita varten, palvelee kelluvien leikkeiden värjäysmetodi erinomaisesti molekulaarisen genetiikan tutkimusryhmän sekä koko biolääketieteen yksikön tarpeita, tuoden tärkeän lisän jo ennestään monipuoliseen tutkimuspalettiin. Kelluvien leikkeiden valmistaminen ja värjäys omassa yksikössä säästää myös aikaa ja rahaa. Opinnäytetyön tuloksena kehitettyä kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmää käytetään PLCy2-hiiriaineiston tutkimuksissa myöhemmin, määritettäessä näytteistä muun muassa homeostaattisten mikrogliojen osuutta P2ry12-vasta-aineella sekä aktiivisten mikrogliojen määrää APOE- vasta-aineella. Värjäysmenetelmää tullaan käyttämään myös muissa tutkimusryhmän projekteissa aivokudokset tutkittaessa.

6.2 Ammatillinen kehittyminen

Salonen (2013, 18) määrittelee ammatillisen kehittymisen parametreiksi vuorovaikutteisuuden lisäksi itsenäisen työskentelyn, vastuullisuuden, suunnitelmallisuuden, itsensä kehittämisen, sitkeyden ja kyvyn sietää epävarmuutta. Tämän opinnäytetyön tekijän ammatillisen kehittymisen arvioinnin lähtökohtana on yli 20 vuoden kokemus AT:n tutkimuksesta ja hän on tottunut noudattamaan hyviä laboratoriokäytänteitä. Jo bioanalytikko-opinnoissaan hän erikoistui patologiaan ja histologisiin värjäysmenetelmiin, mutta nykyinen työnkuva ei ole pitänyt niitä sisällään. Kelluvien leikkeiden valmistaminen ja värjäminen oli mielenkiintoista ja motivoi tekijäänsä. Perehtyminen etukäteen laadittuihin värjäysprotokolleihin sekä tieteelliseen aineistoon syvensi tekijän tietämystä ja auttoi opinnäytetyön käytännön suunnittelussa. Uusi aluevaltaus syvensi erinomaisesti ammatillista osaamista ja kuuluu jatkuvan itsensä kehittämisen ja oppimisen piiriin. Kuvantaminen konfokaalimikroskoopilla ja leikeskannerilla jäi pääosin tutkijoiden tehtäväksi ja opinnäytetyöntekijän kannalta vähäiseksi. Kuvantamiseen olisi mielekästä perehtyä paremmin tulevaisuudessa, koska tutkimusryhmässä on jatkuva tarve fluoresenssimikroskopoinnin taitajille.

Opinnäytetyön tekeminen sekä SAVONIA-YAMK opinnot itsessään ovat kannustaneet itsenäiseen tiedon hankkimiseen kansainvälisiltä foorumeilta sekä sen prosessointiin. Tutkimuksen tekeminen näyttäytyi ammatillisen kehittymisen, työssä oppimisen ja moniammatillisen yhteistyön lisääntymisenä ja antoi uutta perspektiiviä AT tutkimiseen. Ammatillisen kehittymisen myötä on helpompi hahmottaa oman alan erikoisosaamista ja toimia asiantuntijana alati muuttuvassa tutkimus- ja terveydenhuoltoympäristössä.

6.3 Tutkimuksen eettisyys ja luotettavuus

Opinnäytetyössä käytetty tutkimusaineisto oli peräisin koe-eläimistä. Koe-eläinten pito on Suomessa ja Euroopassa erittäin tarkasti säädeltyä, lainalaista ja luvanvaraista toimintaa. Euroopan parlamentin ja neuvoston 22.9.2010 antama direktiivi 2010/63/EU tähtää tutkimuseläinten hyvinvointiin (EUR-Lex 2022). Hiiret kasvatettiin ja niiden aivokudosmateriaali kerättiin molekyyliogenetiikan tutkimuslaboratorion alkuperäisellä koe-eläinluvalla ESAVI/21203/2019 sekä muutosluvalla ESAVI/21493/2022. Eläinten hyvinvoinnista vastasivat Itä-Suomen yliopiston koe-eläinkeskuksen eläinlääkäri sekä eläinhenoitajat. Tutkimushiirten eutanasian suorittivat asianmukaisen koulutuksen ja luvan tutkimuseläinten käsittelemiseen omaavat tutkimusryhmän tutkijat.

Opinnäytetyön luotettavuutta puoltaa se, että molekyyliogenetiikan tutkimusryhmässä noudatetaan hyviä laboratorioskäytänteitä ja tutkimuksellista läpinäkyvyyttä Itä-Suomen yliopiston periaatteiden mukaisesti. Toiminta perustuu rehellisyyteen, tarkkaan ja huolelliseen tutkimustyöskentelyyn, tulosten tallentamiseen sekä esittämiseen. Tiedonhankinta- ja tutkimusmenetelmät ovat eettisesti kestäviä ja avoimia. (UEF 2022.) Tutkimusryhmä tekee aktiivisesti yhteistyötä kansallisten sekä kansainvälisten tutkimusryhmien kanssa ja julkaisee vuosittain artikkeleita arvostetuissa tiedelehdissä. Opinnäytetyön kenttäohjaaja ja PLCy2-tutkimushankkeen vetäjä, dosentti Mari Takalo, on Alzheimerin taudin tutkimuksen asiantuntija. Opinnäytetyön tekijällä oli päivittäin mahdollisuus konsultoida kenttäohjaajaa, tutkijoita ja muita asiantuntijoita tutkimukseen liittyvissä kysymyksissä.

Käytetyt fluoresoivat vasta-aineet olivat kaupallisia ja valmistajan taholta valmiiksi validoituja. Opinnäytetyössä testattiin vasta-aineita eri laimennoksilla ja inkubaatioajoilla värjäytymistuloksen optimoimiseksi ja lopputuloksen varmistamiseksi. Jokaisella värjäyskerralla oli mukana negatiivi- ja positiivikontrollit laadun ja luotettavuuden varmistamiseksi. Tarvittavat vasta-ainelaimennokset, reagenssit ja puskurit valmistettiin ja säilytettiin ohjeiden mukaisesti. Opinnäytetyössä käytettiin eri projektien näytteitä, mikä lisäsi menetelmän luotettavuuden arviointia ja värjäysten optimointia. Käytettävät laitteet huollettiin ennen käyttöönottoa ja kuvantamismenetelmät sekä mikroskoopit biolääketieteen yksikössä olivat kilpailukykyisiä.

Prosessin eri vaiheiden suorittaminen, värjäystulokset ja mahdolliset virhelähteet kirjattiin tarkasti. Värjäysten onnistuminen tarkistettiin konfokaalimikroskoopilla ja leikeskannerilla viikon sisällä jokaisen värjäyskerran jälkeen voimakkaimman ja tarkimman fluoresenssivasteen takaamiseksi. Tarvittavat korjaukset vasta-ainelaimennoksien pitoisuuksissa ja käsittelyissä tehtiin seuraavaa värjäyskertaa varten. Onnistunut värjäysprotokolla toistettiin luotettavuuden takaamiseksi. Kuten Hägg (2016, 7) toteaa, laboratorio itse päättää, millä kriteereillä se ottaa uuden menetelmän käyttöönsä. Koska saadut värjäystulokset olivat yhdenmukaisia kansainvälisiin lehtiartikkeleihin sekä yhteistyölaboratorion tuloksiin verrattuna, voitiin kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmää pitää luotettavana.

6.4 Värjäysmenetelmän haasteet

Vaikka kelluvien leikkeiden värjäysmetodi itsessään sopii molekyyli-genetiikan tutkimusryhmän tarpeisiin, sisältyy siihen myös haasteita. Kudosten fiksointi 4 % paraformaldehydillä ja 30 % su-kroosikäsitteilyt onnistuivat pääsääntöisesti hyvin. Aivokudoksen epätäydellinen perfuusio preanalyyt-tisessä vaiheessa sai kudokseen jääneen veren punasolut fluoresoimaan värjäyksessä epäspesifi- sesti. On muistettava, että liian pitkä fiksaatioaika vähentää vasta-aineen sitoutuvuutta antigeneeniin ja voi myös aiheuttaa kudoksen epäspesifistä värjäytyvyyttä. Jotkut vasta-aineet vaativat tietyn esi- käsittelyn, kuten sitraattikeiton tai H₂O₂ käsittelyn ennen värjäystä, jolloin vasta-aineen ja kudoksen fysiologian tuntemus nousee tärkeäksi. (Naukkarinen ym. 2020, 35, 54.)

Hiiren aivokudoksen morfologian tietämys, erityisesti hippokampuksen erottaminen oli välttämätöntä ja Atlas aivokudokskartan käyttö suositeltavaa. Tasalaatuisten leikkeiden leikkaaminen oli harjoitusta vaativaa ja mikrotomin käyttöä harjoiteltiin etukäteen muilla kuin varsinaisilla PLCy2-hiiriaineiston näytteillä, jotta työskentelyrutiini löytyi. Aivopalan liimaaminen vedellä huuhdeltuun jääkylmään is- tukkaan ilman PBS pisaraa toimi hyvin. Kudospalan tuli antaa jäätyä riittävän kauan (20–30 minuut- tia) kuivajäiden alla ennen leikkeiden leikkaamista, muuten se sulii liian nopeasti ja tahtoi irrota alus- tasta. Mikrotomilla näytettä leikatessa tuli muistaa tasainen rauhallinen veto, koska liika nopeus ai- heutti leikkeen rullautumisen ja vaikeutti sen käsiteltävyyttä siveltimellä värjäysten aikana sekä ob- jekttilasille nostelussa. Leikkeet saattoivat jäädä kiinni siveltimeen, jolloin vaarana oli niiden repeyty- minen.

Mikrotomilla leikkaamista varten olisi jatkossa mielekästä hankkia kylmäistukka, joka säilyttäisi ku- dospalan jäisenä ilman kuivajäätä. Kuivajään ongelmana on nopea haihtuminen ja siitä vapautuva hiilidioksidi. Kuivajäiden oikeaoppinen käsittely kuuluu työturvallisuuteen samoin kuin terveydelle haitallisten reagenssien ja jopa vaarallisten laitteiden (mikrotomi) oikeaoppinen käyttö.

Kuten Naukkarinen ym. (2020, 56) korostavat, oikean vasta-ainelaimennoksen löytäminen vaatii tes- taamista ja aikaa, protokollien ollessa useiden päivien pituisia. Vasta-aineet ovat kalliita ja mitä suu- remmalla vasta-aine laimennoksella värjäys toimii, sitä enemmän säästetään kustannuksissa. Liian voimakas vasta-aine aiheuttaa epäspesifistä värjäytymistä ja vääristää tuloksia, liian suuri laimennos ei anna mitään tulosta.

Opinnäytetyössä testattu, beeta-amyloidiplakit värjäävä X-34 oli joskus erittäin voimakas, plakit pa- loivat ja vuotivat taustaa vihreälle kanavalle, jossa ei pitäisi näkyä mitään, mutta plakkien keskustat hohtivat vihreänä. Tulevaisuudessa ongelmaa voi vähentää lisäämällä X-34 värjäyksen jälkeisiä pesu- ja tai laimentamalla itse leimaa. On myös muistettava, että X-34 vaatii värjättävien leikkeiden esi- käsittelyn sitraattipuskurikeitolla ennen värjäysprosessin aloittamista. TO-PRO "fotobleechautui" eli väri haihtui herkästi, jolloin tumat eivät olleet punaisia vaan keskeltä mustia. Tämä oli enemmänkin kuvaustekninen asia, eikä johtunut värjäyksestä, koska osassa näytteitä tumat näyttivät hyvin vär- jäytyneiltä. Lisäksi far-red alueella fluoresoivat värit ovat heikosti erotettavissa ihmissilmälle ja saat- tavat toimia vaihtelevammin kuin muut. Jatkossa värin ennenaikaista haalistumista voi yrittää välttää kuvaamalla punainen kanava ensimmäisenä. Myös rasvapisaroiden värjäys BODIPY 493/503 leimalla

oli haasteellista. Värjäystulos ei ollut aina luotettava voimakkaan taustan vuoksi ja normaalissa pesuliuoksessa käytetyt detergentit olivat kiellettyjä, koska ne huuhtoivat rasvapisarat pois. BODIPY 493/503 korvataan jatkossa muulla fluoresoivalla leimalla.

Kuten Naukkarinen ym. (2020, 95) toteavat, vasta-aineissa käytetyt fluorokromit ovat herkkiä valolle, joten näytelasit säilytettiin pimeässä ja analysoitiin mahdollisimman pian (1–2 viikon kuluessa) värjäyksen jälkeen. Näytteiden tarkastelu konfokaalimikroskoopin Zeiss LSZ 700 alla heikensi fluoresenssia, koska mikroskoopin valonlähteenä käytetään voimakasta laseria. Leica Thunder leikeskannerin valonlähteenä on LED-valo. Kuvaukset suoritettiin Itä-Suomen yliopistossa Solu- ja Kudostutkimuksen yksikössä. Kuvatiedostot olivat suuria ja niiden prosessointiin meni paljon aikaa, koska leikeskanneri otti useita kuvia leikkeen eri syvyyksiltä ja kokosi ne yhdeksi kuvaksi. Tutkimusryhmässä kehitellään parhaillaan yhdessä bioinformatikkojen kanssa tietokonepohjaista ohjelmaa, jolla värjäytyneiden solujen kokoa ja määrää voidaan objektiivisesti ja luotettavasti analysoida.

Tämän opinnäytetyön puitteissa kuvantamisella varmistettiin värjäysten toimivuus ja valittiin sopivat esikäsittelyt sekä vasta-ainelaimennokset 12–15 kuukauden ikäisten hiiret aivoleikkeiden tutkimista varten. AT tutkimuksen kannalta mielenkiintoisten beeta-amyloidiplakkien sekä niiden kertymisestä aiheutuvien patologisten muutosten oletetaan silloin näkyvän aivokudoksessa kaikkein selvimmin (Alzforum 2023). PLCy2-hiirten tutkimuksen aikaväli muodostuu näin ollen pakostakin hyvin pitkäksi ja tutkimushiirten ylläpito lisää taloudellisia kustannuksia.

Värjäysmenetelmän haasteista huolimatta, kelluvien leikkeiden värjäysmetodi soveltui erittäin hyvin mikroglia-solujen tutkimiseen. Opinnäytetyössä testatut vasta-aineet toimivat odotetusti, joskin fluoresoivien leimojen optimointi beeta-amyloidiplakkien sekä rasvapisaroiden osalta jatkuu. Kelluvien leikkeiden värjäysprotokollaa pystytään tarvittaessa modifioimaan muiden aivokudoksen solujen ja partikkeleiden tutkimista varten, joten se palvelee molekyyli-genetiikan tutkimusryhmän ja tarvittaessa koko biolääketieteen yksikön tarpeita.

6.5 Tulevaisuuden näkymät

Väestön ikääntyessä myös muistisairauksien määrä kasvaa. Alzheimerin tauti on kansantaloudellisesti erittäin kallis sairaus ja se lisää merkittävästi yhteiskunnan sosiaali- ja terveydenhuollon menoja. Alzheimer's Disease International arvioi jo vuonna 2015, että muistisairauksien kustannukset ovat maailmanlaajuisesti noin 820 miljardia dollaria ja kustannukset ovat jatkaneet vain nousuaan. (THL 2021.) Viimeisen parinkymmenen vuoden aikana AT:n tutkimus on mennyt harppauksin eteenpäin. Yhä kehittyneemmät tutkimusmenetelmät ovat tuoneet uutta tietoa tästä monitekijäisestä sairaudesta. Siitä huolimatta tarpeeksi varhaiset ennakoivat sekä diagnostiset testit puuttuvat. Lisäksi suoraan beeta-amyloidin kertymiseen kohdistetut terapeuttiset lääkekokeet ovat epäonnistuneet, minkä vuoksi tarvitaan vaihtoehtoisia ja turvallisempia lähestymistapoja. (Lichtenthaler ym. 2022, 107.)

Tulevaisuudessa olemme menossa kohti yksilöllisempää ja personoidumpaa terveydenhuoltoa, jolloin yksilön riskigeenien kartoitus nousee yhä tärkeämmäksi osaksi määrittämään hänelle annettavaa

hoitoa. GWAS tutkimukset ovat osoittaneet mikroglia-solujen merkittävyyden hermorappeumasairauksissa. Riskigeenien tutkiminen voi tarjota uusia terapeuttisia näkymiä, jotka ovat hyödyllisiä tarkkailtaessa mikroglia-solujen toimintaa Alzheimerin taudissa. (Hemmonot, Hua, Ulmann & Hirbec 2019, 1.)

PLCy2-projektin odotetaan tuottavan oivalluksia ikääntymisen ja hermoston rappeutumisen mikroglia-spesifisistä mekanismeista. Projektilla pyritään edistämään mikroglia-solujen toiminnan ymmärtämistä ja tietoa voidaan käyttää hyödyksi uusien hoitomuotojen ja varhaisten biomarkkereiden kehittämisessä. AT tutkimuksen tuloksia hyödynnetään parantamaan hyvinvointia yhteiskunnassa ja auttamaan hermorappeumasairauksien hallinnassa pitkällä aikavälillä ikääntyvässä väestössä. (UEF 2022.)

Mikroglia-solujen immunohistokemialliset värjäykset ovat yksi osa PLCy2-tutkimusta, jolla pyritään kartoittamaan AT syntyyn ja kehitykseen vaikuttavia tekijöitä. Tässä opinnäytetyössä testattiin kelluvien leikkeiden värjäysmenetelmän soveltuvuutta mikroglia-solujen tutkimiseen, varmistettiin värjäysten toimivuus sekä valittiin sopivat esikäsittelyt ja vasta-aine laimennokset myöhemmin tehtäviä värjäyssarjoja varten. Värjäysmenetelmän käyttöönotto onnistui hyvin, menetelmää on helppo muuntaa ja se puoltaa käyttökelpoisuudessaan paikkaansa molekyyli-genetiikan tutkimusryhmän sekä koko biolääketieteen yksikön käytössä. PLCy2- hiirten aivokudosleikkeillä jatkossa tehtävät värjäykset, esimerkiksi P2ry12 ja APOE vasta-aineilla, odotetaan antavan lisää tietoa muun muassa mikroglia-solujen morfologiasta, toiminnasta, rasva-aineenvaihdunnasta sekä beeta-amyloidiplakkien sijoittumisesta mikroglia-soluihin nähden (Takalo ym. 2020, 5). Tulevaisuudessa värjäysten bioinformatiivinen analysointi kehitteillä olevalla digitaalisella ohjelmalla parantaa analysoinnin luotettavuutta, spesifisyyttä ja toistettavuutta.

PLCy2-tutkimuksen tulokset voivat tuoda uusia näkökulmia lääketieteellisiin sovelluksiin ja auttaa parantamaan AT ennustettavuutta. Kuten Koivisto ym. (2018) nostavat esille, mitä varhaisemmassa vaiheessa sairaus tunnistetaan, sitä tehokkaamman hoitovasteen potilas saa. PLCy2-tutkimus tarjoaa uutta tietoa suojaavan P522R-variantin roolista mikroglia-solujen toiminnassa ja toiminnan vaikutuksista normaaliin vanhenemiseen ja AT liittyvissä fysiologisissa ja patologisissa muutoksissa. Vaikutusten tarkempi tutkiminen hyödyntää AT patogeneesin ymmärtämistä ja kuten Airas & Saraste (2020, 757) sekä Takalo ym. (2020,1) toteavatkin, se voi mahdollistaa tulevaisuudessa spesifisten mikroglia-solujen toimintaan vaikuttavien lääkkeiden kehittämisen sekä avata uusia mahdollisuuksia AT:n hoitoon ja diagnostiikkaan.

LÄHTEET

- Airas, Laura & Saraste, Maija 2020. Mikroglia-solut - aivojen puhdistajat ja puolustajat. *LÄÄKETIETEELLINEN AIKAKAUSKIRJA DUODECIM*, 136 (7), 751–758. <https://www.duodecim-lehti.fi/duo15489>. Viitattu 12.11.2022
- Alzheimer's Association Report 2019. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* (2019). Verkkojulkaisu. Volume 15, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>. Viitattu 21.10.2022
- Alzforum 2023. Verkkojulkaisu. <https://www.alzforum.org/research-models/appswepsen1de9-line-85> Viitattu 25.3.2023.
- Andreone, Benjamin J., Przybyla, Laralynne, Llapashtica, Ceyda, Rana, Anil, Davis, Sonnet S, van Lengerich, Bettina, Lin, Karin, Shi, Ju, Mei Yuan, Astarita, Giuseppe, Di Paolo Gilpert, Sandmann, Thomas, Monroe, Kathryn M. & Lewcock, Joseph W. 2020. Alzheimer's-associated PLC γ 2 is a signaling node required for both TREM2 function and the inflammatory response in human microglia. *Natural Neuroscience*, 23(8), 927–938. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0650-6>. Viitattu 8.12.2022.
- Bondi, Mark W., Edmonds, Emily C. & Salmon, David P. 2017. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society* 23(9-10): 818–831. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X> . Viitattu 12.12.2022
- De Strooper, Bart & Karran, Eric 2016. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164 (4), 603–615. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>. Viitattu 8.10.2022.
- EUR-Lex, Euroopan Unionin virallinen verkkosivu. EUR-Lex - 02010L0063-20190626 - FI <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/ALL/?uri=celex%3A31986L0609>. Viitattu 12.12.2022
- Fam, Tkhe Kyong, Klymchenko, Andrey S. & Collot, Mayeul 2018. Recent Advances in Fluorescent Probes for Lipid Droplets. *MDPI, Materials* 2018, 11 (9), 1768; <https://doi.org/10.3390/ma11091768> Viitattu 12.1.2023.
- Finnish Accreditation Service, FINAS, 2015. <https://www.finas.fi/>. Viitattu 22.11.2022.
- Hempel, Harald, Hardy, John, Blennow, Kaj, Chen, Christopher, Perry, George Hyun Kim, Seung, Villemagne, Victor L., Aisen, Paul, Vendruscolo, Michele, Iwatsubo, Takeshi, Masters, Colin L., Cho, Min, Lannfelt, Lars, Cummings, Jeffrey L. & Vergallo Andrea 2021. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry* (2021) 26:5481–5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>. Viitattu 20.12.2022
- Hansen, David V., Hanson, Jesse E. & Sheng, Morgan 2018. Microglia in Alzheimer's Disease. *Journal of Cell Biology*, 217 (2), 459–472. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>. Viitattu 8.5.2021.
- Hemonnot, Anne-Laure, Hua, Jennifer, Ulmann, Lauriane & Hirbec, Helene 2019. Microglia in Alzheimer Disease: Well-Known Targets and New Opportunities. *Frontiers in Aging Neuroscience*. Verkkojulkaisu. 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00233>. Viitattu 21.10.2022
- Humanistinen ammattikorkeakoulu, 2021. <https://hmak.libguides.com/c.php?g=688355&p=4925415> Viitattu 16.5.2021.
- Hägg, Margareta (toim.) 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT. Verkkojulkaisu, 1–50. <https://publications.vtt.fi/pdf/technology/2016/T276.pdf>. Viitattu 28.1.2023
- Jordà-Siquier, Tomàs, Petrel, Melina, Kouskoff, Vladimir, Cordelières, Fabrice, Frykman, Susanne, Müller, Ulrike, Mulle, Christophe & Barthelet Gaël 2020. APP accumulates around dense-core amyloid plaques with presynaptic proteins in Alzheimer's disease brain. *bioRxiv* 1–55. <https://doi.org/10.1101/2020.10.16.342196>. Viitattu 12.4.2023.

- Kemppainen, Susanna 2022. KUVA 12. Mikroglia ja lysosomit. Viitattu 21.1.2023.
- Kemppainen, Susanna 2022. KUVA 13. Aktiivisten mikroglia-solujen sisällä olevia lysosomeja. Viitattu 21.1.2023.
- Keren-Shaul, Hadas, Spinrad, Amit, Weiner, Assaf, Matcovitch-Natan, Orit, Dvir-Szternfeld, Raz, K.Ulland, Tyler, David, Eyal, Baruch, Kuti, Lara-Astaiso, David, Toth, Beata, Itzkovitz, Shalev, Colonna, Marco, Schwartz, Marco & Amit, Ido 2017. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* (2017) 169, 1276–1290. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>. Viitattu 21.9.2022.
- Koivisto, Anne M., Paajanen, Teemu, Rinne, Juha, Hokkanen, Laura, Vanninen, Ritva, Herukka, Sanna-Kaisa, Lötjönen, Jyrki & Hallikainen, Merja 2018. Alzheimerin taudin varhainen tunnistaminen. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 134 (24), 2519–2528. <https://www.duodecimlehti.fi/duo14670>. Viitattu 24.9.2022.
- Labquality 2022. Validointi ja verifiointi. Verkkojulkaisu. <https://www.labquality.com/fi/terveydenhuollon-ammattilaisille>. Viitattu 12.1.2023.
- Lichtenthaler, Stefan F., Tschirner, Sarah K. & Steiner Harald 2022. Secretases in Alzheimer's disease: Novel insights into proteolysis of APP and TREM2. *Current Opinion in Neurobiology* 2022, 72:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.09.003> Viitattu 12.1.2023
- Magno, Lorenza, Bunney, Tom D., Mead, Emma, Svensson, Fredrik & Bictash, Magda N. 2021. TREM2/PLCγ2 signalling in immune cells: function, structural insight, and potential therapeutic modulation. *Molecular Neurodegeneration* 16, (1) 22, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00436-5> . Viitattu 18.9.2022.
- Magno, Lorenza, Lessard, Christian B., Martins, Marta, Lang, Verena, Cruz, Pedro, Asi, Yasmine, Katan, Matilda, Bilslund, Jamie, Lashley, Tammarny, Chakrabarty, Paramita, Golde, Todd E. & Whiting, Paul J. 2019. Alzheimer's disease phospholipase C-gamma-2 (PLCG2) protective variant is a functional hypermorph. *Alzheimer's Research & Therapy* (2019) 11:16; 2–11. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0469-0>. Viitattu 12.4.2023.
- Marschallinger, Julia, Iram, Tal, Zardeneta, Macy, Lee, Song E., Lehallier Benoit, Haney Michael S., Pluvinage, John V., Mathur, Vidhu, Hahn, Oliver, Morgens, David W., Kim, Justin, Tevini, Julia, Felder, Thomas K., Wolinski, Heimo, Bertozzi, Carolyn R., Bassik, Michael C., Aigner, Ludwig & Wyss-Coray, Tony 2020. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nature Neuroscience* 23, 194–208. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0566-1> . Viitattu 8.5.2022.
- Martiskainen, Henna, Takalo, Mari, Konttinen, Henna, Malm, Tarja, Haapasalo, AnnaKaisa, Leinonen, Ville & Hiltunen, Mikko 2021. Alzheimerin taudin uudet riskigeenit – keskiössä mikroglia-solut. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 2021, 137:13, 75–78. <https://www.duodecimlehti.fi/duo16319>. Viitattu 16.10.2022
- Martiskainen, Henna 2022. Kuva 14. Kaksi rasvapisaraa mikroglia-solun sisällä. Viitattu 21.1.2023.
- Martiskainen, Henna 2022. Kuva 15. Verisuonten punasolujen autofluoresenssista johtuvaa artefaktia. Viitattu 21.1.2023.
- Maurer, Konrad, Volk, Stephan & Gerbaldo, Hector 1997. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 1997; 349: 1546–49. <file:///D:/AD/alzheimerLancet.pdf>. Viitattu 18.12.2022.
- McQuade, Amanda & Blurton-Jones, Mathew 2019. Microglia in Alzheimer's disease: Exploring How Genetics and Phenotype Influence Risk. *Journal of Molecular Biology*. 2019 April 19; 431(9): 1805–1817. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.045>. Viitattu 21.10.2022

- Muistisairaudet. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseura Duodecimin ja Suomen Neurologisen Yhdistyksen asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2021. <https://www.kaypahoito.fi/hoi50044>. Viitattu 16.5.2021
- Mäkinen, Petra 2022. Kuva 4. Menetelmän pystytykseen käytettyä välineistöä. Viitattu 21.1.2023.
- Mäkinen, Petra 2023. Kuva 5. Kelluvien leikkeiden valmistus- ja värjäysprosessi. Viitattu 21.1.2023.
- Mäkinen, Petra 2023. Kuva 6. Testivärjäyksissä käytetty PLCy2-tutkimuksen hiirineisto. Viitattu 21.1.2023.
- Mäkinen, Petra 2023. Kuva 7. Testatut primääri- ja sekundäärivasta-aineet laimennoksineen. Viitattu 21.1.2023.
- Mäkinen, Petra 2023. Kuva 16. Parhaimman tuloksen antaneet vasta-ainelaimennokset. Viitattu 21.1.2023.
- Naukkarinen, Anita, Kirjavainen, Sanna, Kukkonen, Tiia-Maria & Remes, Satu 2020. Suomen histotekniikan yhdistys ry. Immunohistokemian peruskurssi. Kurssimoniste. 10. painos, 2020. Viitattu 20.12.2022.
- Parhizkar, Samira, Arzberger, Thomas., Brendel, Matthias, Kleinberger, Gernot, Deussing, Maximilian, Focke, Carola, Nusher, Brigitte, Xiong, Monica, ... & Haas Christian 2019. Loss of TREM2 function increases amyloid seeding but reduces plaque-associated ApoE. *Nature Neuroscience* 22, 191–204. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0296-9>. Viitattu 12.4.2023.
- Potts, Emily M., Coppotelli, Giuseppe & Ross, Jaime M. 2020. Histological-Based Stainings using Free-Floating Tissue Sections. *Journal of Visualized Experiments* 162, 1-17. <https://doi.org/10.3791/61622>. Viitattu 22.4.2022.
- Prokop, Stefan, Miller, Kelly R & Heppner, Frank L. 2013. Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2013 Oct;126(4):461-77. <http://doi: 10.1007/s00401-013-1182-x>. Viitattu 21.9.2022.
- Raheem, Olayinka, Huslab, Labqualitydays 2018. https://www.labqualitydays.fi/wp-content/uploads/sites/2/2018/01/LQD18_Abstrakti_Raheem_Olayinka.pdf. Viitattu 11.5.2021.
- Remes Anne. Muistipotilaan laadukas hoito tulevaisuudessa - mahdollon haaste yhteiskunnalle? Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim [verkkojulkaisu]. 2018, 134(24):2507. <https://www.duodecimlehti.fi/duo14666>. Viitattu 21.10.2021
- Rissanen, Marja-Liisa 2020. Tutkimukselliset lähestymistavat – lähtökohtia kehittämiseen. Luento. Erilaiset lähestymistavat tutkimus- ja kehittämistyössä. Savonia ammattikorkeakoulu 2020. Viitattu 26.5.2021.
- Rohn, Troy T., Ivins, Kathryn J., Bahr, Ben A., Cotman, * Carl W., Cribbs & David H. 2002. A Monoclonal Antibody to Amyloid Precursor Protein Induces Neuronal Apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 74(6):2331–42. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0742331.x>. Viitattu 22.1.2023.
- Saarnio, Reetta & Päätaalo, Kati 2022. YAMK-opinnäytetyöt – tutkimuksellista kehittämistä yhteistyössä työelämän kanssa. Oulun ammattikorkeakoulun julkaisuja. 30.9.2022. Verkkojulkaisu. <https://oamk.fi/oamkjournal/2022/yamk-opinnaytetyot-tutkimuksellista-kehittamista-yhteistyossa-tyoelaman-kanssa/>. Viitattu 27.3.2023.
- Salonen, Kari 2013. Näkökulmia tutkimukselliseen ja toiminnalliseen opinnäytetyöhön. Opas opiskelijoille, opettajille ja TKI-henkilöstölle. Turun Ammattikorkeakoulun puheenvuoroja 72. <https://julkaisut.turkuamk.fi/isbn9789522163738.pdf>. Viitattu 27.3.2023.

- Sarlus, Heela & Heneke, Michael T. 2017. Microglia in Alzheimer's disease. *The Journal Clinical Investigation* 2017;127(9):3240–3249. <https://doi.org/10.1172/JCI90606>. Viitattu 12.11.2022.
- Sims, Rebecca, van der Lee, Sven, Naj, Adam C., Bellenguez, Celine, Badarinarayan, Nandini, Jakobsdottir, Johanna & Schellenberg Gerald D. 2017. Rare coding variants in *PLCG2*, *ABI3*, and *TREM2* implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 49 (9), 1373–1384. <https://doi.org/10.1038/ng.3916>. Viitattu 20.12.2021.
- Selkoe, Dennis J & Hardy, John 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine* Vol 8, No 6, 2016, 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210> Viitattu 10.10.2022.
- Streit, Wolfgang J., Xue, Qing-Shan, Tischer, Jasmin & Bechmann Ingo 2014. *Acta Neuropathologica Communications* 2014, 2:142. <http://www.actaneurocomms.org/content/2/1/142> .Viitattu 12.12.2022.
- Streit, Wolfgang J., Xue, Qing-Shan, Tischer, Jasmin & Bechmann Ingo 2014. Kuva 3. Mikroglion morfologiset muutokset ihmisen aivokuorella kuvattuna Iba1 vasta-aineella
- Takalo, Mari, Wittrahm, Rebekka, Wefers, Benedikt, Parhizkar, Samira, Jokivarsi, Kimmo, Kuulasmaa, Teemu, Mäkinen, Petra, Martiskainen, Henna, Wurst, Wolfgang, Xiang, Xianyuan, Marttinen, Mikael, Poutiainen, Pekka, Haapasalo, Annakaisa, Hiltunen, Mikko & Haass, Christian 2020. The Alzheimer's disease-associated protective *Plcγ2*-P522R variant promotes immune functions. *Molecular Neurodegeneration*, 15 (52), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00402-7>. Viitattu 10.10.2022.
- Takalo, Mari 2023. Kuva 8. *PLCγ2* hiiriaineiston beeta-amyloidiplakkien testivärjäys sitraattikeitolla. Viitattu 21.1.2023.
- Takalo, Mari 2022. Kuva 9. *PLCγ2* hiiriaineiston värjäys ilman sitraattikeittoa. Viitattu 21.1.2023.
- Takalo, Mari 2022. Kuva 10. Iba1, GFAP, DAPI värjäys testattuna ilman sitraattikeittoa 1:1000 laimennoksella. Viitattu 21.1.2023.
- Takalo, Mari 2022. Kuva 11. Iba1, GFAP, DAPI värjäys testattuna sitraattikeitolla. Viitattu 21.1.2023.
- Tanila, Heikki, Hiltunen Mikko & Myllykangas Liisa 2018. Alzheimerin taudin patofysiologia - mitä uutta? *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 134 (24), 2511–2518. <https://www.duodecimlehti.fi/duo14656>. Viitattu 22.9.2021.
- Tanila, Heikki, Hiltunen Mikko & Myllykangas Liisa 2018. Kuva 1. Tautiprosessien aika-akseli. Viitattu 21.1.2023.
- Terveyden ja hyvinvoinninlaitos 2022. Muistisairaudet. <https://thl.fi/fi/web/kansantaudit/muistisairaudet>. Viitattu 17.9.2022.
- UEF//Connect, 2022. Itä-Suomen yliopisto. <https://uefconnect.uef.fi/tutkimusryhma/alzheimerintaudin-molekyyligenetiikka/>. Viitattu 17.9.2022.
- UEF 2023. Itä-Suomen yliopisto. <https://uef.fi/fi/tutkimus> . Viitattu 19.4.2023.
- Van der Lee, Sven J., Conway, Olivia J., Jansen, Iris, Carrasquillo, Minerva M., Kleineidam, Luca, van den Akken, Erik, Hernandez, Isabel, van Eijk, Kristel R., Stringa, Najada, Chen, Jason A., Zettergren, Anna, Andlauer, Till F.M., Diez-Fairen, Monica, Simon-Sanchez, Javier, Lleo, Alberto, Zetterberg, Henrik, Nygaard, Marianne, Blauwendraat, Cornelis, ... & Holstege Henne 2019. *Acta Neuropathologica* (2019) 138:237–250 <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02026-8>. Viitattu 22.12.2022.

Verheijen, Jan & Sleegers, Kristel 2018. Understanding Alzheimer Disease at the Interface between Genetics and Transcriptomics. *Trends in Genetics*, June 2018, Vol. 34, No. 6. 434–447. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.02.007> Viitattu 15.12.2022.

Villa, Chiara, Lavitrano, Marialuisa, Salvatore, Elena & Combi Romina 2020. *Journal of Personal Medicine* 2020, 10(3), 61; 1–30. <https://doi.org/10.3390/jpm10030061>. Viitattu 22.12.2022.

Villa, Chiara, Lavitrano, Marialuisa, Salvatore, Elena and Combi Romina 2020. Kuva 2. Patologiset muutokset AT:ssa ja niihin liitetyt biomarkkerit. Viitattu 21.1.2023.

World Health Organization, 2022. Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Viitattu 17.11.2022.