



Nikolai Baranov

Diatsepaamin vaikutus c-Fosin aktiivisuuden aivoissa hermokasvuteki- jäpoistogeenisillä hiirillä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

7.12.2023

Tiivistelmä

Tekijä:	Nikolai Baranov
Otsikko:	Diatsepaamin vaikutus c-Fosin aktiivisuuteen aivoissa hermokasvutekijäpoistogeenisillä hiirillä
Sivumäärä:	59 sivua + 1 liite
Aika:	7.12.2023
Tutkinto:	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine:	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat:	Dosentti Teemu Aitta-aho Yliopettaja Riitta Lehtinen

Diatsepaami on bentsodiatsepiineihin kuuluva lääkeyhdiste. Yhdisteellä on kykyä lisätä GABA_A-reseptorin avautumistodennäköisyyttä liittymällä reseptoriin tiettyyn kohtaan, ja tämän avulla lääke tehoaa suoraan aivotoimintaan hiljentämällä hermosolujen välistä viestintää. Lääkkeen haittapuolina voidaan pitää sen käytöstä aiheutuvaa riippuvuuden ja toleranssin kehitystä. Toleranssin syntymisen taustalla arvellaan olevan aivojen kyky muovautuvuuteen eli plastisuuteen. Hermokasvutekijän BDNF:n ja sen reseptorin TrkB:n välittämä toiminta GABAergisissä soluissa voi potentiaalisesti toimia tekijänä, joka välittää GABAergisten hermosolujen, mm. SST-solujen adaptatiota lääkkeen vaikutusta kohtaan. SST-solut ovat interneuroneihin kuuluva soluryhmä, joiden tarkasta roolista esim. manteliumakkeen alueella on vain rajallista tietoa.

Insinööriyössä poistogeenisillä uroshiirillä SST-soluista on tyrmätty TrkB-reseptorin toiminta, jonka seurauksena BDNF ei pysty aktiivisesti toimimaan näissä soluissa. Työn tarkoituksena oli tutkia TrkB:n puutoksen vaikutusta plastisuuteen aivojen tietyltä kerrospaksuudelta käyttämällä plastisuuden muutoksen solumarkkerina, välittömien varhaisten geenien (fos-geenien) avulla, indusoimaa c-Fosia.

TrkB-poistogeenisille hiirille ja villityypin kontrollihiirille oli annettu diatsepaamia ja 2 tuntia tämän jälkeen hiiret oli perfusoitu, ja aivot oli säilytetty +4 °C:ssa. Aivopuoliskon sagittaalisille aivoleikkeille (leikepaksuus 40 µm) oli tehty immunohistokemiallinen vasta-aineväryjäys sekä fluoresenssikuvantaminen, joiden avulla molempien hiiriryhmien c-Fos-positiiviset solut pystyttiin laskemaan manteliumakkeen alueelta.

Työn tulosten perusteella diatsepaamin käytöstä johtuva c-Fosin aktiivisuus näyttäisi tietyn aivokerrospaksuuden perusteella säilyvän poistogeenisillä hiirilläkin. Asiasta tarvittaisiin jatkotutkimuksia ja esim. plastisuuden muutoksen mittareina tutkimuksissa voitaisiin käyttää myös muita hermosolujen plastisuutta välittäviä markkereita.

Avainsanat: hermosolut, biomolekyylit, GABA, diatsepaami, toleranssi, BDNF, neuroplastisuus, c-Fos, aivojen geneettinen muisti, immunohistokemia, fluoresenssikuvantaminen

Abstract

Author: Nikolai Baranov
Title: Effect of diazepam on c-Fos activity in the brain of nerve growth factor knockout mice
Number of Pages: 59 pages + 1 appendix
Date: 7.12.2023

Degree: Bachelor of Engineering
Degree Programme: Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major: Biotechnology and Food Engineering
Supervisors: Teemu Aitta-aho, Docent
Riitta Lehtinen, Principal Lecturer

Diazepam is a drug compound related to benzodiazepines. The compound has the ability to increase the opening probability of the GABAA receptor by binding to the receptor at the regulation site, which results in a direct effect on brain activity by inhibiting communication between neurons. The drug's drawbacks include its potential for addiction and the development of tolerance. It is believed that the brain's plasticity is responsible for the emergence of tolerance. Activity mediated by the nerve growth factor BDNF and its receptor TrkB in GABAergic cells may play a role in mediating GABAergic neurons' adaptation to the drug's effects. SST cells, a subgroup of interneurons, may be influenced by this process, particularly in the amygdala.

In an engineering thesis, the TrkB receptor was genetically inactivated in SST cells of male mice, preventing BDNF from functioning in these cells. The aim of thesis was to investigate the impact of TrkB deficiency on plasticity, specifically c-Fos expression, as an indicator of changes in layer plasticity at a specific thickness. Both TrkB-inactivated mice and wild-type control mice were administered diazepam. Two hours later, the mice were perfused, and their brains were stored at +4°C. Immunohistochemical antibody staining, and fluorescence imaging were conducted on 40 µm sagittal brain sections from the cerebral hemisphere. c-Fos-positive cells were counted in the amygdala region in both groups of mice.

On the basis of the results of the thesis, cFos activity appears to remain preserved even in mice with the deleted TrkB gene when exposed to diazepam, especially in relation to brain layer thickness. Further research is necessary, including the exploration of other markers influencing neuron plasticity as indicators of changes in plasticity.

Keywords: neurons, biomolecules, GABA, diazepam, tolerance, BDNF, neuroplasticity, c-Fos, genetic memory of the brain, immunohistochemistry, fluorescence imaging

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Hermosolujen välinen viestintä ja GABAergiset solut	3
2.1	Hermosolujen välinen signaali	3
2.2	GABA välittäjäaineena	5
2.3	GABA _A -reseptori	6
2.4	Inhibitorinen ja eksitatorinen järjestelmä	8
2.5	GABAergiset solut	9
3	Bentsodiatsepiinit ja toleranssin käsite	12
3.1	Bentsodiatsepiinit lääkeryhmänä	12
3.2	Diatsepaamin käyttö ja vaikutusmekanismit	13
3.3	Lääkkeiden haittavaikutukset	15
3.4	Toleranssi ja riippuvuus	16
3.5	Toleranssin mahdollisia mekanismeja	17
4	Neuroplastisuus ja hermokasvutekijät	18
4.1	Neuroplastisuus käsitteenä	18
4.2	Neuroplastisuus hermoverkon tasoilla ja molekyyllitasolla solussa	18
4.3	Rakenteellinen ja synapsinen plastisuus	20
4.4	BDNF-hermokasvutekijä ja sen reseptori TrkB	21
4.5	BDNF:n ja TrkB:n mahdollinen rooli toleranssin kehityksessä	23
4.6	Neuroplastisuusmarkkerit	24
4.7	C-Fosin toiminta neuroplastisuusmarkkerina	26
5	Immunohistokemia ja fluoresenssimikroskopia	28
5.1	Vasta-ainevärjäyksen periaate	28
5.2	Fluoresenssi ja fluoroforit	30
5.3	Fluoresenssimikroskopia	32
6	Eläintutkimusmalli	33
6.1	Tutkimusmalli	33
6.2	Poistogeeniset hiiret	34

7	Materiaalit ja menetelmät	35
7.1	Tutkimushiiret	35
7.2	Immunohistokemiallisen analyysin vaiheita	35
7.3	Leikkaus	36
7.4	Leikkeiden pesu	40
7.5	Värjäys	42
7.6	Mikroskopointi	44
7.7	Solujen laskenta	46
8	Tulokset ja pohdinnat	48
9	Päätelmät	51
	Lähteet	53
	Liitteet	
	Liite 1: C-Fos staining protocol (fluorescent Alexa 594)	

Lyhenteet

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid. α -amino-3-hydroksi-5-metyyli-4-isoksatsolipropionihappo.

AP-1: *Activator protein 1*. Aktivaattoriproteiini 1.

ATP: *Adenosine triphosphate*. Adenosiinitrifosfaatti.

BDNF: *Brain derived neurotrophic factor*. Hermokasvutekijä.

CREB: *cAMP-response element binding protein*. cAMP-vaste-elementtiä sitova proteiini.

DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole. 4',6-diamidino-2-fenyyliindoli.

DNA: *Deoxyribonucleic acid*. Deoksiribonukleiinihappo.

EPSP: *Excitatory postsynaptic potential*. Eksitatorinen postsynaptinen potentiaali.

GABA: *Gamma-aminobutyric acid*. Gamma-aminovoihappo.

GABA-T: *Gamma aminobutyrate aminotransferase*. Gamma-aminobutyraatti-aminotransferaasi.

GAD: *Glutamic acid decarboxylase*. Glutamiinihappodekarboksylaasi.

GAT-1: *GABA transporter type 1*. GABA-kuljettaja, tyyppi 1.

GFP: *Green fluorescent protein*. Vihreä fluoresoiva proteiini.

5HT3aR: *Ionotropic serotonin receptor*. Ionotrooppinen serotoniinireseptori.

IPSP: *Inhibitory postsynaptic potentials*. Estävät postsynaptiset potentiaalit

NCAM: *Neural cell adhesion molecule*. Hermosolujen adheesiomolekyyli.

NMDA: *N-methyl-D-aspartate*. N-metyyli-D-aspartaattireseptori.

PSA-NCAM: *Polysialylated neuronal cell adhesion molecule*. Polysialyloitu hermosolujen adheesiomolekyyli.

PV: *Parvalbumin*. Parvalbumiini.

SST: *Somatostatin*. Somatostatiini.

TrkB: *Tropomyosin receptor kinase B*. Tropomyosiinireseptorin kinaasi B.

1 Johdanto

Aivojen toimintaan tehoavien uusien lääkeyhdisteiden kehitys edellyttää parempaa tietämystä siitä, mitä prosesseja aivoissa tapahtuu, kun keskushermoston toimintaan vaikuttavat erilaiset yhdisteet, kuten diatsepaami. Uuden kehitettävän lääkkeen tehokkuus voisi olla mahdollisesti korkeampi kuin nykyisin käytävissä olevilla vaihtoehdoilla, jos olisi enemmän tietoja eri aivoalueiden ja hermosoluryhmien roolista esim. aivotoiminnan mukautumisessa tiettyä ainetta kohtaan. Aivoissa tapahtuvia monimutkaisia biokemiallisia prosesseja voi yrittää arvioida seuraamalla erilaisten biomolekyylien, kuten neuroplastisuusmarkkereiden, toimintaa. C-Fos on välittömiin varhaisiin geeneihin kuuluva molekyyli, jota voi nopeasti ilmetä hermosoluissa uuden ja merkittävän kokemuksen seurauksena.

Insinööriyön tarkoituksena oli tutkia tutkimushiirten avulla aivojen c-Fos-aktiivisuutta, jota esiintyisi diatsepaamin ensimmäisen käytön seurauksena. Tutkimuksen tavoitteena oli, käyttäen poistogeenisiä hiiriä vertailukohteena, kerätä dataa siitä, miten hiirten aivojen TrkB-reseptorin puutos tietyn tyyppisistä GABAergisista soluista vaikuttaisi c-Fosin ilmentymiseen diatsepaamin käytön myötä. Tutkimuksen suorittamiseen käytettiin apuna immunohistokemiallisia metodeja. Aivopuoliskon leikkeille tehtiin vasta-ainevärjäys, jonka aikana tietty vasta-aine pystyi sitoutumaan spesifisesti antigeeninä toimivaan c-Fosiin. Värjätty leikkeet analysoidaan käyttäen apuna fluoresenssimikroskopiaa, jonka avulla voidaan nähdä aivoleikkeistä esim. c-Fosia ilmentäneitä soluytimiä [5]. Vertaamalla värjäytyneiden solujen määriä hiiriryhmien välillä voidaan yrittää arvioida, millä tavoin TrkB-reseptorin heikentynyt toiminta heijastuu c-Fosin tasoissa tietyllä aivoalueella, kun hiirten aivojen hermosolut reagoivat diatsepaamin toimintaan.

Bentsodiatsepiinit on 1960-luvulta käytössä oleva lääkeryhmä kemiallisia yhdisteitä, joita käytetään mm. ahdistuksen, unettomuuden, lihasjäykkyyden tai epilepsian hoitoon. Lääkkeiden teho perustuu siihen, että ne pystyvät hiljentämään

keskushermoston toimintaa. Lääkkeiden kemiallisen rakenteen ansiosta niillä on mahdollisuus sitoutua GABA_A-ionikanareseptorin tiettyihin kohtiin. Optimoimalla solukalvoilla toimivan GABA_A-reseptorin kemiallista reaktiota varsinaisen reseptorin aktivoijan, hermosolusignaaleja estävän välittäjäaineen GABA:n kanssa, lääkeyhdiste kykenee lisäämään välittäjäaineen vaikutusta hermosoluihin. [1.] Diatsepaami on bentsodiatsepiinien ryhmään kuuluva lääkeyhdiste, jolla on voimakas rauhoittava vaikutus ja moniin muihin ryhmän edustajiin nähden pitkämpi lääkkeen vaikutusaika.

Diatsepaamin ja muiden bentsodiatsepiinien käytöllä on kuitenkin omat haittavaikutuksensa, ja ne voivat esim. aiheuttaa riippuvuutta, minkä vuoksi lääkkeet on tarkoitettu pääsääntöisesti lyhytaikaiseen käyttöön, ja yleensä lääkekuuri ei kestä muutamaa viikkoa kauemmin. Yhdisteet voivat aiheuttaa käytön jälkeen vieroitusoireita, kuten ahdistuneisuutta, unihäiriöitä tai epileptisiä kohtauksia. Lääkkeiden käytön aikana on olemassa riski, että saman lääkeannoksen teho ei enää riitä ja samaan vaikutukseen tarvitaan suurempaa lääkeannosta. [2.] Tämän nopean toleranssin kehittymisen tarkkoja biokemiallisia mekanismeja aivoissa ei tarkoin tunneta, mutta mahdollisia syitä on etsitty koehiirien avulla tehdyissä kokeissa. On ollut näyttöä, että yhtenä tekijänä toleranssin kehittymiselle toimisi aivojen kyky muovautuvaisuuteen eli neuroplastisuuteen.

Neuroplastisuudella tarkoitetaan aivojen kykyä muutoksiin elämän aikana [3]. Plastisuus voi näkyä molekyylitasojen muutoksina hermosoluissa, mitä voi tapahtua esim. solun reaktiona ulkoiseen ärsytykseen (rakenteellinen plastisuus). Tiettyjen biomolekyylien synteesien tasot voivat vaihdella soluissa, riippuen mm. siitä, mitä tietoja soluytimeen tulee solukalvon reseptoriproteiineilta esim. biokemiallisten kaskadien eli erityisten signalointireittien ja molekyylien kautta. Soluytimessä tapahtuu geenien ekspressiota. On havaittu, että neuroplastisuusprosesseihin osallistuu myös aivoperäinen neurotrofinen tekijä eli BDNF (brain derived neurotrophic factor), joka toimii yhdessä oman spesifisen reseptorin, TrkB:n (tropomyosin receptor kinase B), kanssa. BDNF:n toiminta ilmenee voimakkaasti keskushermostossa. Se on osallisena esim. synaptisessa

plastisuudessa, jossa on kyse signaloinnin tehostamisesta tai sen vaimentamisesta hermosolujen välillä.

BDNF voi toimia yhtenä riippuvuutta aiheuttavista tekijöistä diatsepaamin käytön aikana, vaikka varsinaista näyttöä siitä ei ole [6]. GABAn toiminnan tehokkuuden väheneminen ja toleranssin kehittyminen lääkkeiden käytön seurauksena näyttäisi johtuvan siitä, että GABA_A-reseptorijärjestelmä alkaa toimimaan heikommin GABAa välittäjäaineena käytävissä soluissa eli GABAergisissä soluissa, joskin tuntemattomasta syystä [6].

2 Hermosolujen välinen viestintä ja GABAergiset solut

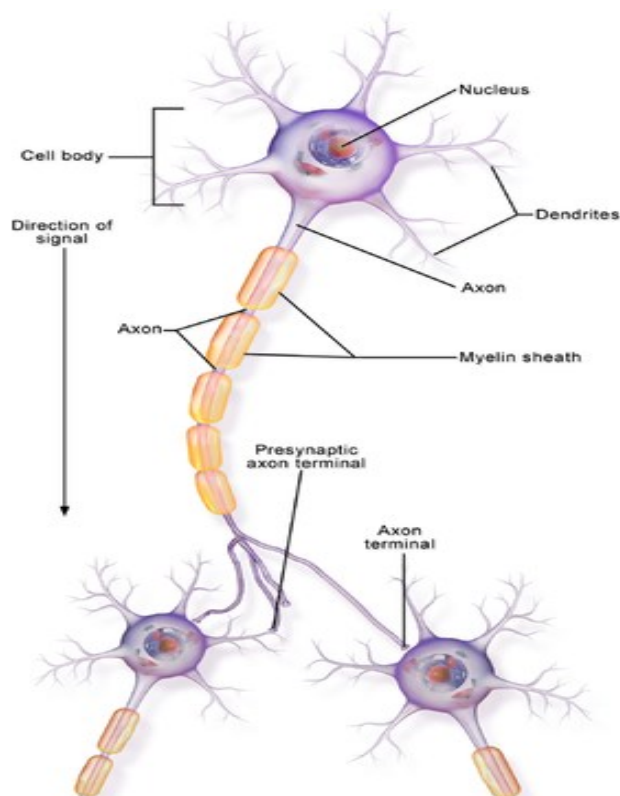
2.1 Hermosolujen välinen signaali

Aivoissa sijaitsee uskomattoman monimutkainen ja kiehtova systeemi, jonka avulla ihmiset pystyvät pohtimaan asioita, tekemään päätöksiä ja kontrolloimaan omaa tilaansa. Aikuisella ihmisellä tämä systeemi koostuu noin 86 miljardista neuronista eli hermosolusta, mikä vastaa suunnilleen tähtien määrää omassa galaksissa, Linnunradassa. Nämä hermosolut muodostavat verkon, johon kuuluu erikoistuneita ja yhteistyötä tekeviä hermosolutyyppejä, jotka kattavat kaikki aivoalueet, ja jossa jokaisella hermosolulla on jopa tuhansia yhteyksiä, eli synapseja, muihin hermosoluihin. Niitä arvellaan olevan kaiken kaikkiaan lähes kvadriljoona kaikkien solujen välillä eli hermoverkossa. [7.]

Jo yksittäinen synapsi on itsessään varsin edistynyt systeemi, joka voi sisältää mm. omia rakenteellisia piirteitä, omia biomolekyylejä, kuten välittäjäaineita, ja niiden jonkinlaisen vapautumisen todennäköisyyden ja erilaisen määrän omia postsynaptisia reseptoreita (erityisiä proteiinimolekyylejä) [8]. Osa näistäkin ominaisuuksista voi kokea jonkinlaisia dynaamisia muutoksia, eli voidaan sanoa, että yksi synapsi voisi karkeasti vastata yli tuhatta transistoria tehokkuudeltaan, jos neuroniverkkoa vertaisi sähköjärjestelmiin (esim. tietokoneeseen) [7].

Herverkossa tapahtuu koko ajan sarja biokemiallisia ja sähköisiä prosesseja, eli solut kommunikoivat keskenään sähköisten ja kemiallisten signaalien kautta. Soluviestintä ja tiedonkäsittely voi tapahtua aivojen eri osissa sekä rinnakkaisina että peräkkäisinä prosesseina [9].

Tällaisen viestinnän mahdollistaa hermosolujen rakenne, johon kuuluu solurungon eli soman lisäksi ohuita puun oksia muistuttavia dendriittejä, joilla solu vastaanottaa kemiallisia signaaleja, sekä pitkä, yksittäinen, johtoa muistuttava aksoni, joka haarautuu lopussa aksonipäätteiksi eli synapseiksi. Synapseissa on pakattuna pieniin paketteihin (vesikkeleihin) kemiallisia yhdisteitä, jotka reagoivat sähköisiin impulsseihin. Kuvassa 1 havainnollistetaan aivoissa toimivien hermosolujen yksinkertaistettua rakennetta.



Kuva 1. Aivoissa toimivien hermosolujen yleinen rakenne [4].

Solukalvoilla olevat reseptorimolekyylit mahdollistavat varautuneiden hiukkasten liikkeen solun sisälle ja ulos. Niiden aktivoituminen tapahtuu välittäjäaineen vaikutuksesta, mikä luo mahdollisuuden nopealle jännitemuutokselle solun ja

ympäristön välille. Jännite-ero aiheuttaa pulssin, joka kulkee soluseinää pitkin aina synapsiin saakka.

Viestintäprosessin haasteellisuutta kuvaa se, että viestinnässä on mukana paljon erilaisia biomolekyylejä esim. proteiineja, joilla kullakin on oma roolinsa prosessin eri vaiheissa. Biokemialliseen signalointiin välittäjäaineiden ohella osallistuu mm. entsyymejä, kuljetusproteiineja, pumppuproteiineja, kanavaproteiineja ja erittäin tärkeitä kalvoproteiineja (reseptorit), joilla on yhteys solun sisälle ja solun ulkopuolelle. [17.] Myös muilla biomolekyyleillä on tärkeä rooli viestinnässä. Esimerkiksi rasvapohjaiset molekyylit toimivat systeemien eristeinä ja tehostavat sähköisten impulssien kulkua soluissa.

2.2 GABA välittäjäaineena

GABA eli gamma-aminovoihappo (engl. gamma amino butyric acid) on keskushermoston tärkein inhiboiva välittäjäaine. Arvioltaan ainakin kolmasosa kaikista synapseista sisältää GABAa välittäjäaineena [10]. GABAn inhiboiva rooli on tärkeä keskushermostossa, sillä se mahdollistaa ylimääräisten informaatiovirtojen eston hermoverkossa vaimentamalla sähköisiä signaaleja. GABAn moitteeton toiminta välittäjäaineena edesauttaa ihmisillä mm. keskittymiskyvyn, liikkuvuus-toimintojen ja tunteiden hallintaa.

GABA-molekyylillä on rakenteeltaan suhteellisen yksinkertainen ja pieni biomolekyylillä, aminohappo, joka muodostuu keskushermostossa glutamaatista. Glutamaattidekarboksylaasientsyymillä (GAD) avulla glutamaatista irtoaa hiilidioksidimolekyylillä (CO_2) ja näin muodostuu GABA. Glutamaatti on käytännössä GABAn esiastemolekyylillä, vaikka niillä on päinvastainen rooli keskushermostossa. Välittäjäaineena toimivan GABAn synteesi tapahtuu suoraan synapseissa. GABAa kemialliseen signalointiin tuottavia GABAergisiä soluja löytyy lähes kaikilta aivojen alueilta. [11.]

Välittäjäaineena GABA tehoaa ensisijaisesti GABA_A- ja GABA_B-reseptoreihin. GABA_A-reseptori on ionikanavareseptori, kun taas GABA_B-reseptori on G-

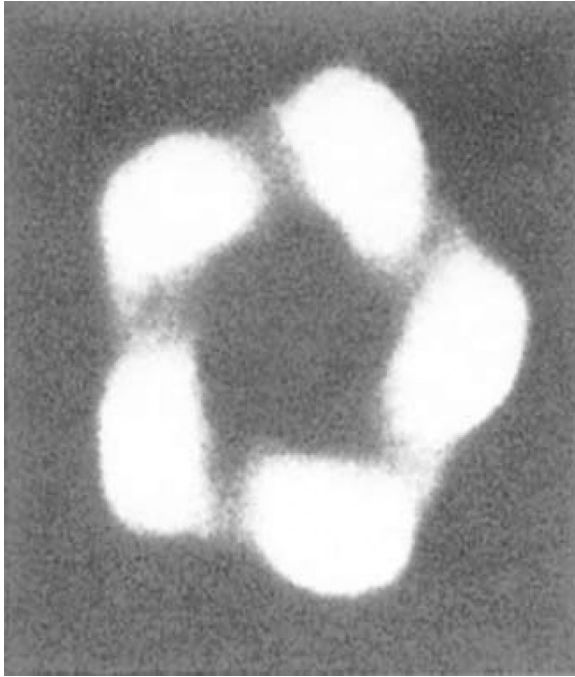
proteiinikytketty metabotrooppinen reseptori [12]. Sähköisen impulssin (depolarisoiva ärsyke) tullessa GABAergisen solun synapsiin kalsiumionit kiinnittyvät vesikkeleihin, minkä myötä vesikkeleihin pakattu GABA irtoaa synapsien väliin tilaan ja sitoutuu sille spesifisille reseptoreille toimien niiden luontaisena (endogeenisenä) agonistina eli reseptoreiden aktivaattorina.

GABAn sitoutuminen GABA_A-reseptoriin aiheuttaa negatiivisten kloridi-ionien vuon virtausta soluun reseptorin rakenteellisen muutoksen kautta. Tämä voi aiheuttaa jännitteen pienenemistä eli hyperpolarisaatiota seuraavassa solussa, mikä puolestaan estää solun aktiivisuutta. [13.]

GABA on reseptorin kanssa yhteydessä vain muutaman millisekunnin, jonka jälkeen se voidaan kuljettaa takaisin mm. presynaptiseen tilaan, ja kierrättää siellä GAT-proteiinin ansoista. GABAa voidaan myös hajottaa tarvittaessa GABA-transaminaasientsyymin avulla, jolloin se hajoaa meripihkan semialdehydiksi. GABA-T niin kuin myös GABAn synteestistä vastaava GAD säätelevät toiminnallaan GABAn pitoisuutta GABAergisissä soluissa. Lisäksi GAD-molekyyliä näyttää esiintyvän vain GABAa syntetisoivissa ja välittäjäaineena käytettävissä soluissa, minkä vuoksi yhdistettä voidaan pitää tekijänä, joka erottaa GABAergiset solut muista soluista. [14, s. 192.]

2.3 GABA_A-reseptori

GABA_A-reseptorikompleksiin kuuluu viisi proteiineista muodostuvaa alayksikköä, jotka sijaitsevat keskushuokosen ympärillä. Tämä rakenne saatiin näkyväksi elektronimikroskoopin avulla (kuva 2). Alayksikköjä muodostavat proteiinit ovat rakenteeltaan erilaisia. Rakenteeltaan toisiaan lähellä olevat muodostavat omia klustereita, kuten α -, β - ja γ -alayksiköitä. [13.] Yleensä ionikanavareseptori, joka toimii kanavana kloridi-ioneille, sisältää kahta α -alayksikköä, kahta β -alayksikköä ja yhtä γ - tai δ -alayksikköä. GABA_A-reseptori on aivojen tärkein signaalien inhibitioon vaikuttava reseptori, ja se toimii nopeasti. Monet kliinisesti merkittävät lääkkeet kohdistavat tehonsa reseptorin toimintaan. [15.]



Kuva 2. GABA_A-reseptorin viisi alayksikköä havainnollistettu elektronimikroskoopilla [13].

GABA sitoutuu β -alayksikköön toimien agonistin lisäksi reseptorin luonnollisena ligandina. Ligandi on biokemiassa ainetta (molekyyli tai ioni), joka sitoutuessa varsinaiseen yhdisteeseen muuttaa sen kolmiulotteista rakennetta biologisesti aktiiviseen muotoon. Bentsodiatsepiinien sitoutumiskohta löytyy kompleksista α -alayksikön paikalta. Jotkut yhdisteet, kuten barbituraatit, näyttäisivät vaikuttavan suoraan kloridikanavan avautumiseen ilman GABAa, minkä vuoksi niillä on voimakkaampi jarruttava vaikutus, mutta myös voimakkaammat sivuvaikutukset. [14, s. 425.]

Bentsodiatsepiinit sitoutuvat reseptorin sivukohtaan ja säätelevät reseptorin toimintaa vain epäsuorasti tehostamalla varsinaisen aktiivisen kohdan toimintaa. Aivot näyttäisivät kuitenkin reagoivan lääkkeen käyttöön, mikä näkyy esimerkiksi toleranssin kehityksessä tai jopa muistin muodostumisen heikentymisenä [13].

Reseptorin alayksikkö α :n isoformeilla näyttäisi olevan erilaisia herkkyksiä yhdisteille. Tämän takia reseptori voi eri α :n alayksiköillä varustettuna edistää

bentsodiatsepiinien erilaisia vaikutuksia eri tavoin ja näitä erilaisia vaikutuksia voidaan myös tutkia. [16.]

2.4 Inhibitorinen ja eksitatorinen järjestelmä

Hermosolut eivät toimi yksinään, vaan ne ryhmittyvät ketjuiksi ja verkoksi. Soluissa informaatio kulkee sähköisinä pulsseina eli aktiopotentiaaleina (signaali kulkee solukalvoa pitkin). Tämä potentiaali kulkee presynaptiseen päätteeseen, jossa jännitemuutokselle herkäät proteiinikanavakompleksit vapauttavat kalsiumioneita. Nämä sitoutuvat vesikkeleihin (ikään kuin pieniä eristettyjä organelleja), joissa välittäjäainetta on ns. kvantteina eli tiettyinä molekyylimäärinä. Kalsiumionien avulla välittäjäaineet vapautuvat vesikkeleistä pieneen, tyhjäan, solujen välitilaan. Prosessia kutsutaan eksosytoosiksi, ja se on energiaa vaativa tapahtuma. [17.]

Vastaanottavien solujen pinnalla on reseptoreita, jotka reagoivat glutamaatin kanssa, kuten NMDA- ja AMPA-reseptorit, ja GABAn kanssa, kuten GABA_A-reseptori. Soluryhmät kommunikoivat sekä keskenään että toisten ryhmien kanssa. Ne vaikuttavat toistensa toimintaan esim. säätämällä tiettyjen soluryhmien aktivointia ajallisesti (taajuudet) joko estämällä tai stimuloimalla signaaleja. Ryhmillä on myös hitaampia viestintämuotoja toistensa välillä, kuten viestintä peptidien avulla. [10.]

Hermosolu vastaanottaa koko ajan paljon kemiallisia viestejä eri solujen synapseista ja summaamalla sekä eksitatoriset että inhibitoriset signaalit reseptoreiden kautta (pienet potentiaalimuutokset) joko tuottaa toimintapotentiaalin tai ei [10.] Glutamaatin aktivoidessa omia reseptoreita solun sisälle voi virrata positiivisesti varautuneita hiukkasia pääasiassa kalsium- ja natriumioneita, jolloin solu voi tuottaa toimintapotentiaalin eli depolarisoituu (solu aktivoituu). GABAn avulla soluun virtaa kloridi-ioneita, ja solu voi hyperpolarisoitua. Solun stimuloituessa puhutaan usein kiihottavan postsynaptisen potentiaalin (EPSP:n) ja vastakkaisessa tapauksessa estävän potentiaalin (IPSP:n) synnystä. [14, s.161.]

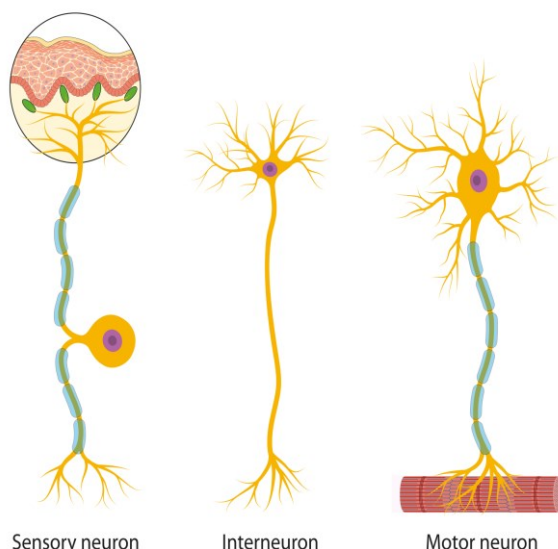
GABAergisillä neuroneilla on tärkeä rooli tarkoin säädettyssä systeemissä, jossa on tärkeätä ylläpitää viritys- ja estosignaalien välinen balanssi, mikä on mahdollista dynaamisessa vuorovaikutuksessa ja yhteistyössä eksitatoristen, eli signaaleja johtavien glutamaergisten solujen kanssa [3]. GABAn ja glutamaatin tasapainoinen vaikutus hermojärjestelmässä vakauttaa sen toimintaa ja auttaa ylläpitämään elimistössä tarpeellista vireystilaa.

Keskushermoston tila, joka johtaa esim. kouristusten syntyyn ja sen leviämiseen lihaksiin, tapahtuu joko inhibitorisen järjestelmän heikkenemisestä tai eksitatorisen järjestelmän voimistumisesta [13]. Vahva GABAn tehon väheneminen suhteessa glutamaatin toimintaan aiheuttaa liiallista signaalien johtumista hermosoluissa, mistä seurauksena henkilöllä voi esiintyä mm. ahdistuneisuutta tai yliaktiivisuutta. Sähköisen toiminnan vakava häiriötila voi esim. aivojen lokaalilla alueella aiheuttaa myös epileptisen kohtauksen. Epilepsia on aivosairaus, joka johtuu liiallisesta sähköisten signaalien purkautumistoiminnasta aivoissa. [18.]

2.5 GABAergiset solut

Aivoista löytyy monia erilaisia GABA-yhdisteitä signaalien inhibitioon tuottavia soluryhmiä. Interneuronit ovat soluja, jotka muodostavat keskenään monimutkaisia piirejä toimien aisteista tietoa vastaanottavien ja motoristen, selkärangan yhteyksissä olevien solujen välissä [19]. GABAa esiintyy suurina määrinä lyhyissä interneuroneissa [14, s. 188]. Kuvassa 3 on esitetty kolme erilaista neuroniryhmää.

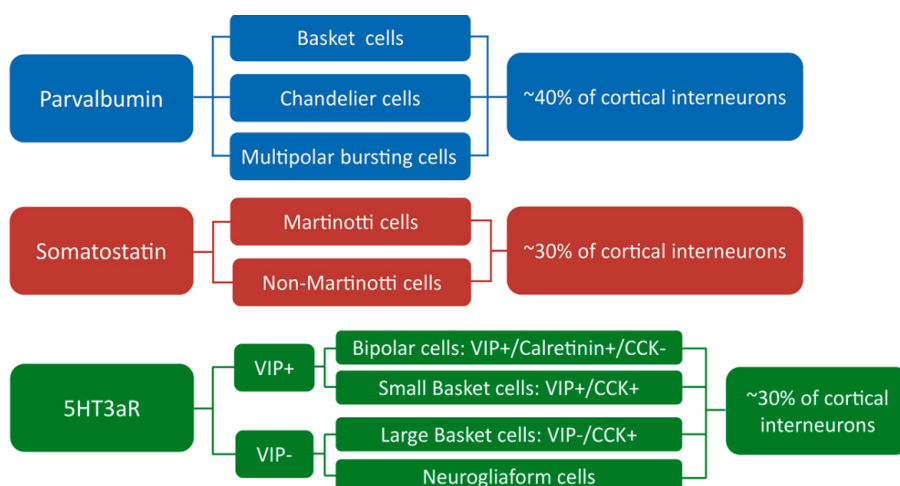
Types of neurons



Kuva 3. Kolme erilaista neuroniryhmää [32].

Eri ryhmien GABAergiset solut eroavat toisistaan mm. morfologisesti eli muodon ja rakenteen perusteella, ja sen lisäksi ne voidaan erotella soluryhmiin spesifisten molekyyli-markkereiden tuottamisen perusteella. Esimerkiksi aivokuoressa suurimman osan GABAergisistä interneuroneista muodostavat kolme ryhmää. Näihin ryhmiin kuuluvat parvalbumiinisolut (PV) ilmentävät parvalbumiini-proteiineja, jotka sitovat Ca^{2+} -ioneja, neuropeptidisomatostatiinia markkerina erittävät SST-solut ja ionotrooppisen serotoniinireseptorin 5HT_{3a} (5HT_{3aR}) muodostavia soluja. Kuhunkin ryhmään kuuluu lisäksi erilaisia alaryhmiä, kuten kuvassa 4 on esitetty. Markkereiden avulla on mm. mahdollista erotella kortikaaliset eli aivokuoren interneuronit toisistaan, sillä on näyttöä siitä, että parvalbumiinisolut ja SST-solut muodostavat omat ryhmänsä, koska ne eivät ilmennä toistensa merkkiyhdistettä. [20.]

Aivojen korteksissa olevista GABAergisistä interneuroneista noin 40 % on PV soluja ja 30 % SST-soluja. Eri soluryhmien erottelun mahdollisuus luo väyliä tutkia erillisten soluryhmien ja niiden muodostamien spesifisten piirien käyttäytymistä ja roolia eri käyttäytymismalleissa.



Kuva 4. GABAergisten interneuronien solutyypit ja niiden alatyyppejä [62].

Somatostatiini on kasvuhormonin eritystä estävä peptidi, joka löydettiin ensimmäisen kerran hypotalamuksen alueelta 1970-luvulla. Keskushermostossa somatostatiini toimii välittäjäaineena tai neuromodulaattorina eli säätelijänä. Somatostatiinia tuottavissa soluissa on oma molekyylikoostumuksensa sekä muotonsa muihin GABAergisiin neuroneihin nähden, ja sen vuoksi niiden vuorovaikutus esim. eksitatorisiin solujen dendriitteihin tai niiden tulppiin synapsien kautta eroaa voimakkuudeltaan ja vaikutukseltaan muista neuroniryhmistä. Vaikutus näkyy mm. eksitatoristen solujen kyvyssä vaikuttaa SST-solujen synaptiseen plastisuuteen tai SST-solujen vaikutuksessa eksitatoristen solujen syötteiden tehoon. [21.]

Säätelijän ja välittäjäaineen roolissa somatostatiini voi osaltaan vaikuttaa lisäämällä hyperpolarisuutta postsynaptisissa soluissa eli signaaleja hiljentävällä tavalla mm. manteliumakkeen ja aivokuoren alueilla. Somatostatiinille on olemassa omat reseptorimolekyylinsä soluissa.

SST-interneuroneilla on mahdollisesti osallisuutta unen säätelyssä ja aistinvaraisessa informaatiokäsittelyssä, mikä kertoo siitä, että soluissa voi ilmetä kokemuksen kautta vaikuttavaa plastisuutta. [22.] Somatostatiinia sisältävät solut voivat edistää rauhoittavia ja masennuslääkkeiden kaltaisia vaikutuksia kroonisesti stressaantuneissa jyrsijöissä [23].

SST-soluilla on myös vaikutusta vieressä olevien eksitatoristen pyramidisolujen depolarisaation taajuuksiin, mikä voi aiheuttaa postynaptisissa pyramidihermosoluissa kalsiumin tasojen nostoa solutasolla, mm. AMPA-reseptorien kautta, joka vuorostaan voisi stimuloida glutamaergisissä soluissa BDNF:n ilmentymistä [43].

SST-solujen tarkasta roolista ja mm. solujen suhteesta muihin interneuroneihin esim. manteliumakkeen alueella on varsin vähän tietoja, ja asiasta tarvittaisiin lisätutkimusta. BDNF:n vaikutus somatostatiinia sisältävien solujen toiminnan säätelyyn on monilta osin tuntematon ja saattaa vaihdella myös jopa sukupuolen perusteella. [43.] Estämällä BDNF:n toiminta näissä soluissa voidaan kerätä enemmän tietoja, vaikuttaako hermokasvutekijä mm. GABA_A-reseptorin toiminnan muutokseen.

3 Bentsodiatsepiinit ja toleranssin käsite

3.1 Bentsodiatsepiinit lääkeryhmänä

Bentsodiatsepiinit ovat ryhmä kemiallisesti syntetisoituja, aromaattisia yhdisteitä. Kliinisessä käytössä on parikymmentä bentsodiatsepiini johdannaista ja tyypillisiin johdoksiin kuuluvat mm. diatsepaami, loratsepaami ja klooridiatsepoksidi. [14, s. 413.]

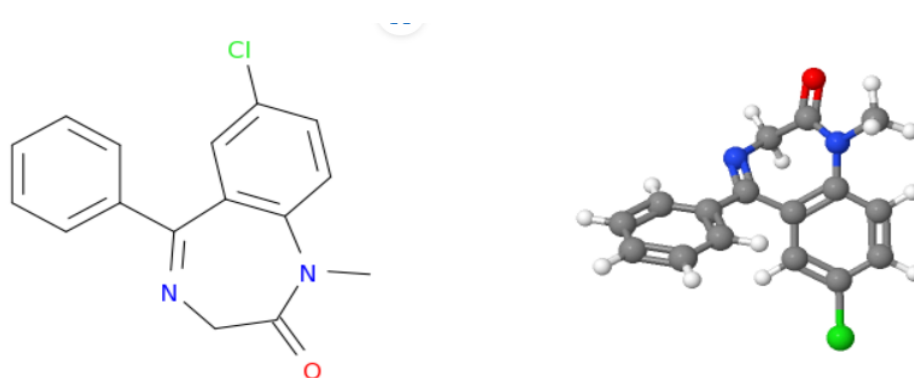
Bentsodiatsepiinit vaikuttavat keskushermoston toimintaan, ja niitä käytetään mm. ahdistuneisuushäiriöiden, paniikkikohtausten ja lihaskouristusten hoidossa [6]. Kyky lihasten rentouttamiseen ja hermoston toiminnan rauhoittamiseen on monesti tärkeä epileptisten kohtausten lievittämisessä, ja joitakin johdoksia käytetään epilepsian hoitoon erityisesti diatsepaamia, joka on lääkeryhmän tyypillisin edustaja [14, s. 413].

Bentsodiatsepiinit voimistavat välittäjäaine GABAn vaikutusta hermostossa, aiheuttaen GABA_A-reseptoreiden rakenteellisen muutoksen kautta GABAn paremman sitomisen proteiinikompleksiin, joka edistää solun sisälle pääsevien

kloridi-ionien parempaa kulkua. Lääkkeet ovat melko tehokkaita oireiden hoidossa, ja ne ovat samankaltaisiin lääkeyhdisteisiin, kuten barbituraatteihin verrattuna miedompia hermostolle ja turvallisempia, aiheuttaen vähemmän hengityksen lamaantumista tai yleisanestesiaa terapeuttisesti suurempina annoksina. [14, s. 414.] Bentsodiatsepiinien merkittävänä haittapuolena on niiden kyky aiheuttaa riippuvuutta, ja pitkäaikaishoidon aikana lääkkeiden teho vähenee [14, s. 482].

3.2 Diatsepaamin käyttö ja vaikutusmekanismit

Diatsepaami on 1,4-bentsodiatsepiini johdannaisiin kuuluva yhdiste (kuvassa 5 on esitetty sen kemiallinen rakenne), jota myydään lääkkeenä mm. tunnettuna markkinointinimillä Diapam ja Valium. Se syntetisoitiin ja patentointiin lääkkeenä ensimmäistä kertaa vuonna 1963. Diatsepaamin farmakologinen vaikutus perustuu siihen, että se sitoutuu GABA_A-reseptoriin mutta eri paikkaan kuin GABA, eli sille on olemassa oma sitoutumiskohta reseptorikompleksissa [13]. Tällaista rakennetta kutsutaan GABA_A-bentsodiatsepiinireseptoriksi. Diatsepaami toimii GABA_A-reseptorin positiivisena allosteerisena säätelijänä, eli se vaikuttaa biokompleksin toimintaan sitoutumatta proteiiniyhdisteen varsinaiseen aktiiviseen kohtaan. Farmakologiassa diatsepaami voidaan katsoa myös agonistiksi, koska se aktivoi reseptorin toimintaa.



Kuva 5. Diatsepaamin kemialliset 2D- ja 3D-rakennekaavat [63].

Diatsepaami tehoaa siten, että se alentaa tarvittavaa GABA-pitoisuutta, jota reseptori tarvitsee avatakseen kloridikanavan. [13.] Diatsepaamin antagonistina toimii flumatseliini-niminen yhdiste. Antagonistilla tarkoitetaan farmakologiassa ainetta, joka estää agonistien toimintaa. Antagonisteja voidaan käyttää esim. välttääkseen myrkytystä.

Diatsepaami on rasvaliukoinen molekyyli ja sen takia pääsee nopeasti pääkoh-teisiinsa [14, s. 416]. Lääkettä voidaan antaa esim. tabletteina, suspensioina tai sitä voidaan antaa suonen kautta. Suun kautta lääke imeytyy nopeasti, suonen kautta otettuna epämääräisemmin. Sen puoliintumisaika elimistössä voi olla 48 tuntia. [24.] Kerta-annoksena lääkkeen vaikutusaika on kuitenkin lyhytkestoinen johtuen mm. reseptoritasolla tapahtuvista adaptaatioista [14, s.440]. Moniin muihin bentsodiatsepiineihin verrattuna yhdiste vaikuttaa kuitenkin varsin pitkään, yli 12 tuntia [25].

Diatsepaamin hyväksytyä hoitoa käytetään pääsääntöisesti lihaskouristusten hoitoon sen lihasrentouttamista tukevien ominaisuuksien vuoksi. Diatsepaamia käytetään myös epileptisten kohtausten hoitoon, pääasiassa status epilepticuksen hoitoon [24]. Lääkettä käytetään myös alkoholin akuuttiin vieroitushoitoon. Joissakin tapauksissa yhdistettä käytetään, lääkärin määräyksestä, myös ahdistuksen tai unettomuuden hoitoon. Ennen leikkausta tai muuta kirurgista toimenpidettä potilaalle voidaan antaa ensihoitona lääkettä rauhoitustarkoituksiin. Diatsepaami on ensisijainen lääke status epilepticuksen ja akuuttien toistuvien kohtausten hoidossa [26].

Status epilepticus on epilepsian (aivojen toimintahäiriön) vakava tapaus. Koh- taukset tapahtuvat sarjassa, ne kestävät kauan ja uusi kohtausta alkaa nopeasti edellisen päätyttyä. Yli 5 minuuttia kestävää kohtausta pitäisi hoitaa kuten sta- tus epilepticusta. Aikuisille voidaan esim. ensihoitona antaa 5 mg:n diatsepaa- miannoksia laskimoon. [14, s. 490.]

Diatsepaami tehoaa tehokkaasti kouristuksiin, sillä on myös voimakas rauhoit- tava vaikutus koko hermoston toiminnalle [14, s. 414]. Johtuen sen rajallisesta

tehoajasta sitä saattaa vakavissa kouristustapauksissa joutua kuitenkin ottamaan lisää muutamien tuntien kuluessa edellisestä annoksesta. Lääkeannosten tiheä käyttö ja melko isot annoskoot voivat johtaa potilailla nopeasti sedaation (kevytuni) kehittymiseen. Myös toleranssin kehitystä tapahtuu kohtalaisen nopeasti käytön jälkeen.

3.3 Lääkkeiden haittavaikutukset

Diatsepaamin yleisiin haittavaikutuksiin voi kuulua sedaation lisäksi mm. väsymystä, päänsärkyä tai hengitysvaikeuksia. Jos diatsepaamihoito on kestänyt pitkään esim. useita kuukausia, diatsepaamin käyttöä ei saisi lopettaa saman tien, vaan pikkuhiljaa pienentää annoksia, varsinkin kun on kyse ahdistuneisuuden tai unettomuuden hoidosta. Äkillinen lopetus voi aiheuttaa vieroitusoireita, joita ei välttämättä esiintynyt ennen hoitoa, kuten levottomuutta, unettomuutta tai ahdistuneisuutta.

Diatsepaamin myrkyllisyys on vähäistä, jopa terapeuttisesti suurempina annoksina. Yhdessä mm. opioidien tai alkoholin kanssa se voi kuitenkin pahentaa käyttäjän hyvinvointia esim. aiheuttamalla voimakasta masennusta. [25.]

Diatsepaamin yliannostuksen hoitoon voi käyttää flumatseniilia.

Diatsepaamin suurimpana haittapuolena on kuitenkin sen käytöstä syntyvä riippuvuus. Riippuvuus voi syntyä varsinkin pitkään kestäneen hoidon seurauksena esim. jos potilas on käyttänyt yhdistettä useita kuukausia. Toisena tekijänä riippuvuuden synnyssä on potilaan päivittäin käyttämät suuret annoskoot. Toleranssin kehittyminen tietyn suuruisille annoksille ja lääkkeen aiheuttama riippuvuus ovat suurimpia syitä, miksi lääkettä käytetään harvemmin esim. ahdistuneisuuden hoitoon mm. 1980-lukuun verrattuna. Nykyaikana lääkärit voivat määrätä potilaille samankaltaisia mutta lievempiä aineita. Esimerkiksi etifoksii-nia käytetään joissain maissa ahdistuneisuuden hoitoon. [27.]

3.4 Toleranssi ja riippuvuus

Riippuvuudella tarkoitetaan mm. lääkkeiden tai huumeiden jatkuvasta käytöstä aiheutuvaa tapahtumasarjaa, jota voidaan kuvata erilaisilla ominaisuuksilla (kriteereillä). Riippuvuuteen kuuluu usein pakonomainen tarve lääkkeen ottamiselle, jotta saataisiin aikaan tuttu, helpottava vaikutus, tai halutaan vähentää alkavaa epämiellyttävää tunnetta [26]. Mahdollisia kriteerejä riippuvuuden kaltaiseen tilaan ovat esim. lääkkeiden käytön lopettamiseen liittyvät fyysiset tai psyykkiset oireet tai toleranssin kehittyminen lääkettä kohtaan.

Riippuvuuden kehittyminen diatsepaamia ja muita bentsodiatsepiineja kohtaan on hyvin yksilökeskeistä ja vaihtelee suuresti, vaikka jonkinlaisen tason riippuvuus ilmenee monilla käyttäjillä, varsinkin jos bentsodiatsepiinien säännöllinen käyttö on ollut vähintään 4 viikkoa tai enemmän. Suomessa bentsodiatsepiinit ovat tavallisin riippuvuutta aiheuttava lääkeryhmä. [14, s. 454.]

Toleranssiksi kutsutaan sellaista ilmiötä, johon kuuluu lääkkeen vaikutuksen asteittainen heikkeneminen hoidon aikana. Sama lääkkeen teho voidaan edelleen saavuttaa, jos suurennetaan alkuperäistä annosta. Toleranssin kehittyminen vaatii aikaa, ja sen taustalla voivat olla mm. farmakodynaamiset syyt esim. reseptoriproteiinien tasolla tapahtuvat muutokset. [14, s. 105.]

Diatsepaamin käyttö voi aiheuttaa toleranssia esim. kouristuksia estäville tai rauhoittavalle vaikutuksille [28]. Kullekin tekijälle toleranssi voi kehittyä eri tahdissa, ja tutkimusten perusteella on saatu erilaisia tuloksia. Eräässä tutkimuksessa mainitaan, että bentsodiatsepiinien käytöstä syntyisi nopeammin toleranssi rauhoittaville vaikutuksille kuin kouristusvaikutuksille [29].

Toleranssin kehittyminen ei välttämättä tarkoita, että potilailla ilmenisi samalla riippuvuuteen usein liitettyjä vieroitusoireita ja päinvastoin, riippuvuus ei välttämättä tarkoita, että se olisi toleranssista johtuvaa [14, s. 440]. Mahdollisen toleranssin kehitys luo vaikeuksia diatsepaamin käytölle eri potilasryhmien keskuudessa, joille olisi muuten ollut lääkkeestä hyötyä. Toleranssi hillitsee

diatsepaamin käyttöä epilepsian hoidossa, ja sitä käytetään enemmänkin akuuttien kourituskohtauksien tai vakavien epilepsia-kohtauksien hoidossa [30].

Riippuvuus ja toleranssi ovat riskitekijöitä diatsepaamin käytölle. Toleranssin kehityksessä tärkeässä roolissa näyttäisi olevan GABA-järjestelmä ja etenkin GABA_A-reseptorin mahdollinen mukautuminen. GABA_A-reseptorin eri alayksiköt välittävät bentsodiatsepiinien erilaisia vaikutuksia, esim. $\alpha 1$ -alayksikköä sisältävä GABA_A välittää sekä rauhoittavia että myös mahdollisia riippuvuusvaikutuksia. Muutokset GABAn viestintätoiminnassa vaikuttavat myös signaaleja johtavien solujen toimintaan, ja esim. riippuvuus yhdistetään yhä useammin epänormaaliin aivojen palkitsemisjärjestelmän toimintaan (hermoverkon plastisuus). Bentsodiatsepiinien kaltaiset aineet voivat tehotta mm. aivojen dopamiinijärjestelmän toimintaan. [15.]

3.5 Toleranssin mahdollisia mekanismeja

Tarkkoja toleranssin kehittymisen mekanismeja ei vielä täysin tunneta. Diatsepaamia käytettäessä hermosoluissa voi syntyä mukautuvia mekanismeja, jotka käytännössä ilmenevät soluissa esim. molekyyliitasojen muutoksina, eli kyse on neuroplastisuudesta. Mekanismin parempi ymmärrys auttaisi esimerkiksi tällaisten täsmälääkkeiden kehittämisessä, jotka säilyttäisivät tehonsa lääkehoidon aikana.

Toleranssin syntyminen voi olla monen eri tekijän yhteisvaikutus, ja näiden tekijöiden vaikutus saattaa vaihdella eri aivoalueilla. Mahdollisia syitä toleranssin kehitykselle bentsodiatsepiinien käytön aikana ovat mm. GABA_A-reseptorin eri alayksiköiden ja lääkkeen heikentynyt sitoutumisvaikutus, GABA_A-reseptorien väheneminen solukalvolla, glutamaergiseen siirtoon liittyvät häiriöt GABAn voimistuvan vaikutuksen takia sekä aivoperäisen neurotrofisen tekijän BDNF:n rooli. [30.] BDNF-molekyyli on olennainen säätelvä tekijä mm. inhiboivan synaptisen siirron toiminnassa, ja se pystyy vaikuttamaan solujen kehitykseen ja toimintaan [31].

4 Neuroplastisuus ja hermokasvutekijät

4.1 Neuroplastisuus käsitteenä

Neuroplastisuudessa on kyse siitä, että hermosolujen rakenteenteet pystyvät muovautuvaisuuteen. Neuroplastisuus auttaa eliöitä oppimaan ja omaksumaan uusia asioita, esimerkiksi ihminen voi oppia kieliä tai soittamaan pianoa. Tiettyjen hermosolujen väliset yhteydet voivat vahvistua tai heikentyä, solut voivat muodostaa uusia synaptisia yhteyksiä oman rakenteensa ansiosta, ja ne pystyvät korjaamaan, ainakin osittain, omia yhteyksiä, vaikka aivovamman jälkeen.

Plastisuus on voimakkaasti vaikutuksessa ärsyketekijöiden kanssa, jotka tulevat elimistön muista osista tai ympäristön kautta ja joita hermosolut vastaanottavat ja käsittelevät selkäytimen tai aistien kautta.

Solut ovat kuin mikrotehtaita, joiden toimintaa säätelee geneettinen informaatio, jonka avulla se säätelee ja muokkaa omaa toimintaa, tuottaen esim. hermosolujen muistimekanismina neuroplastisuuteen liittyviä markkeriaineita. Hermoverkossa solut tekevät tiiviistä yhteistyötä synaptisen viestinnän kautta, mikä mahdollistaa luomaan esimerkiksi erilaisia neuroadaptatiivisia reittejä ja piirejä hermostossa, jotka aktivoituvat mm. kokemuksen, stressin tai oppimisen aikana.

Diatsepaamin ja joidenkin muiden yhdisteiden haittapuolet saattavat olla myös seurausta aivojen hermopiirien ja niiden toiminnan takana olevien mekanismien kyvystä mukautua ja muuttaa toimintaa vastauksena näiden yhdisteiden käyttöön.

4.2 Neuroplastisuus hermoverkon tasoilla ja molekyyllitasolla solussa

Hermosoluryhmien aktiivisuus voi kokea muutoksia, aivojen reagoiessa dynaamisesti erilaisiin tapahtumiin. Pelkästään yhden hermosolun yhdellä synapsilla, saattaa olla kymmeniä fyysisiä tiloja, jotka vastaavat tiedonsiirrosta moduloimalla esim. välittäjäaineiden vapautumisen todennäköisyyksiä, eli synapseilla on kykyä lyhytaikaiseen ja pitkäaikaiseen plastisuuteen [34]. Synapsia voidaan

pitää itsessään solusta melko itsenäisenä yksikkönä, jossa on vesikkeleiden ja proteiinien lisäksi esim. ATP-molekyylejä ja mitokondrioita.

Hermosolutyypeillä aivoissa on erilaisia ominaisuuksia esim. kyky eri laukaisunopeuksiin. Ryhmien välillä on myös erilaisia yhteyksiä. Joissakin osissa verkkoa ne saattavat olla vahvempia kuin toisissa, minkä vuoksi plastisuuden määrä eli muutoksen luonne eri aivoalueilla ja soluryhmissä voi vaihdella, vaikka hermoverkko toimii yhtenä kokonaisuutena aivoissa. Solupopulaatioiden tuottamat sähköiset impulssit eri tilanteissa ja niiden koodaama tieto on hankala tulkita, eli joitain solujen välisiä viestinnän mekanismeja ei tarkoin tunneta ja tämä kuvastaa aivotoiminnan monimutkaisuutta [35].

Eri soluryhmiä voidaan erottaa toisistaan, ja tutkia niiden toimintamekanismeja erilaisiin ärsykkeisiin. Yhdistämällä solujen molekyylikonsentraatioiden muutoksia tiettyyn assosiativiseen muistiin (eläintutkimusmalli) voidaan saada lisää tietoa eri soluryhmien (esim. SST-solujen) kyvystä plastisuuteen muihin ryhmiin nähden. Näin voidaan selvittää, millä tavalla eri molekyylien toiminta saattaa edistää näiden solujen välisten yhteyksien voimistumista/heikentymistä (plastisuuden ilmentymät) muihin ryhmiin nähden.

Hermosolujen viestinnän aikana soluytimessä DNA:n avulla erilaisten molekyylien tasot soluissa voivat vaihdella, ja näitä vaihteluja seuraamalla voidaan tehdä joitain johtopäätöksiä plastisuuden vaikutuksista esim. diatsepaamin käytön seurauksena. Proteiineilla on kolmiulotteisen rakenteen ansiosta kyky muuttaa reaktioaktiivisuuttaan, kun siihen liitetään tai siitä irrotetaan kemiallisia ryhmiä.

Kinaasientsyymeillä on tärkeä rooli, kun ne katalysoivat proteiinien rakennemuutoksia fosforylaation avulla, ja niillä voi olla laaja substraattispesifisyys, eli entsyymien aktiivisiin kohtiin voi sitoutua monia erilaisia proteiineja. Fosfataaseilla on taas päinvastainen rooli, eli ne defosforyloivat proteiineja poistamalla niiltä fosfaattiryhmän. Nämä entsyymit toimivat solun sisäisten viestintäreittien

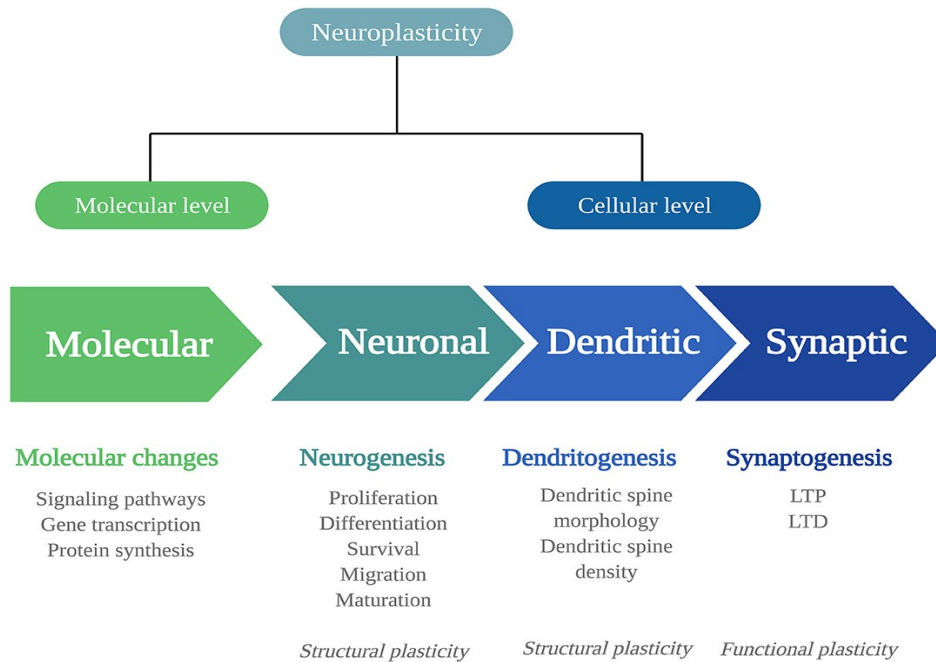
risteyskohdissa ja mahdollisesti vaikuttavat mm. synapsien proteomiin eli proteiinimääriin tiettyinä ajankohtina. [36.]

Soluytimessä aktivoituu geeni-informaation avulla bioyhdisteiden transkriptiota. Transkription moduloinnin mahdollistavat esim. erikoistuneet proteiinit (transkriptiotekijät, esim. CREB-proteiini), jotka reagoivat tietyn kinaasin aktivaatioon ja auttavat geenien säätelyssä sitoutumalla DNA:han. Plastisuusmarkkereina hermosolu voi tuottaa mm. välittömiä varhaisia geenejä, kuten c-Fosia, Fosb:tä, tai Junb:tä. Molekyylitason muutokset voivat vaikuttaa solutasolla ilmenevään plastisuuteen. [3.]

4.3 Rakenteellinen ja synapsinen plastisuus

Solutasolla plastisuus voi olla rakenteellista tai toiminnallista. Hermosolujen kyky ylläpitää toimintaansa ja tarvittaessa reagoida esim. lisääntyneeseen viestintään viereisten solujen kanssa, lisäämällä tai vahvistamalla dendriittisiä piikkejä (signaaleja vastaanottavat kontaktit) ovat esimerkkejä rakenteellisesta plastisuudesta. Synapsista plastisuutta voidaan pitää rakenteellisen plastisuuden lisäksi toiminnallisena plastisuutena.

Synapsista plastisuutta on pitkään yhdistetty muisti- ja oppimisprosesseihin aivoissa. Tiettyjen synapsien aktiivinen toiminta voi johtaa näiden synapsien voiman lisääntymiseen. Tätä ilmiötä kutsutaan pitkäaikaiseksi potensoinniksi (engl. long-term potentiation eli LTP). Pitkäaikainen potensointi voi aiheuttaa muutoksia geenien ilmentymiseen, eli sen kautta sillä on myös suoraa vaikutusta molekyylikonentraatioiden vaihteluihin soluissa. LTP:n kesto synapseissa voi olla tunteja, päiviä ja jopa viikkoja, eli se on tehokas muistimekanismin muoto. [51.] Kun synapsit eivät toimi aktiivisesti, esiintyy vastakkaista ilmiötä eli pitkäaikaista masennusta (long-term depression eli LTD). Neuroplastisuuden eri tasoja on esitetty kuvassa 6. Synapsisen plastisuuden säätelyssä suuri rooli vaikuttaa olevan esim. hermokasvutekijä-BDNF:llä. [3.]



Kuva 6. Neuroplastisuuden erilaisia ilmentymiä ja tasoja [3].

Synapsinen plastisuus on ilmiönä mutkikas, ja in vivo -tutkimuksissa on haasteellista yhdistää synaptisella tasolla tapahtuvien tiettyjen muutosten vaikutukset, tietyn muistin koodaukseen [37]. Plastisuuden vaikutus näkyy sekä presynaptisessa että postsynaptisessa solussa, esim. aksonipäätteiden tai dendriitti-piikkien rakenteellisina muutoksina mm. niiden paksuuntumisena LTP:n aikana.

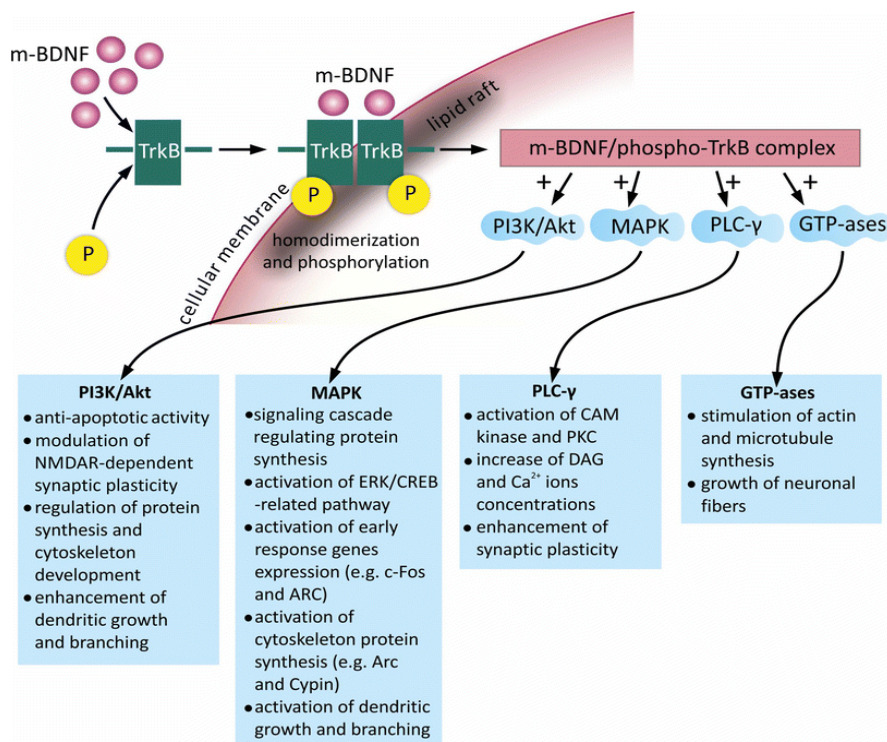
Dendriittisissä piikeissä kemiallisia signaaleja vastaanottavien reseptorien määrä voi myös kasvaa ja tehostaa näin solujen välistä kommunikaatiota. Eksitatorisilla neuroneilla on tärkeä rooli LTP:n muodostumisessa, sillä ne varmistavat signaalien kulun eteenpäin ja erilaisten piirien muodostumisen hermostossa, mutta myös inhibitorisilla neuroneilla (GABAerginen järjestelmä) on tärkeä rooli koska niiden signaalien kulun estävät synapsit ovat olennaisena tekijänä eksitatoristen neuroniryhmien laukaisunopeuksien säätelyssä. [38.]

4.4 BDNF-hermokasvutekijä ja sen reseptori TrkB

BDNF on neurotrofiinien perheeseen kuuluva aivoperäinen hermokasvutekijä. Se on kooltaan varsin pieni proteiinimolekyyli, jota koodaa soluissa BDNF-

geeni, ja se muodostuu 11 eksonista eli geeniä koodaavasta DNA:n osasta. BDNF tukee mm. hermosolujen toimintakykyä ja selviytymistä. [39.] BDNF-molekyyliä esiintyy runsaasti aivoissa, erityisesti hippokampuksen ja korteksin alueilla [3]. On ollut näyttöä siitä, että BDNF-molekyyli kykenee tiiviisiin vesikkeleihin pakattuna diffundoitumaan synaptisen halkeaman yli ja sitoutumaan sitä kautta toisen solun TrkB-reseptoriin [42].

BDNF vaikuttaa keskushermoston toimintaan sitoutumalla sille korkean affiniteetin omaavaan, tyrosiinikinaasientsyymeihin kuuluvaan, tropomyosiinireseptorin kinaasi B:hen (TrkB) [40]. TrkB-reseptori kuuluu transmembraanireseptoreihin, mikä tarkoittaa sitä, että BDNF:n sitoutuessa siihen se aktivoi solun sisällä toisia biomolekyyliä (erilaisia kinaaseja, kuva 7), jotka muodostavat biokemiallisen signaalireitin, jonka kautta informaatio kulkee soluytimeen, ja ilmenee mm. muuttuneena geeniekspressiona ja sitä kautta esim. myös solun metabolian muutoksina. BDNF:n toiminta yhdessä reseptorin kanssa tehoaa solujen plastiisuuteen. Sillä on merkitystä synapsien kemiallisen tiedonsiirron säätelyssä solujen välillä, ja mm. synapsien muodostuminen, muovautuminen, tehokkuus ovat olennaisia osia hermosolun dynaamisista toimintaa [33].



Kuva 7. BDNF/TrkB-kompleksin aktivoimia kinaasireittejä [64].

BDNF-tasot vaihtelevat soluissa, eli sen geneettisen transkription säätely vaihtelee solujen tilan mukaan, riippuen esim. siitä, millaisille ärsyketekijöille solut altistuvat. Joidenkin lääkeyhdisteiden, kuten ketamiinin, käyttö voi lisätä BDNF:n konsentraatiota soluissa. Bentsodiatsepiinien käyttö voi vähentää BDNF-pitoisuuksia, mutta tulokset aiheesta ovat ristiriitaisia. [41.] Jotkut tutkimukset osoittavat, että diatsepaamihoito vähensi BDNF-tasoa soluissa [6].

Erilaisina pitoisuuksinakin yhdisteellä näyttäsi olevan merkittävä rooli esim. solujen muistimekanismin osana (plastisuus tai adaptaatio), mikä näkyy esim. sen vaikutuksena LTP:n säätelyyn (kinaasireittien kautta) ja sitä kautta solujen väliseen viestintään, erilaisten piirien syntyyn, mikä voi johtaa aivojen kykyyn sopeutua tietyille ärsyketekijöille. Bentsodiatsepiinien käyttö aiheuttaa jatkuvia neuroadaptatiivisia muutostiloja aivoissa, ja tämä taas voi johtaa ei-toivottuihin haittavaikutuksiin, kuten riippuvuuden tai toleranssin kehitykseen [15].

4.5 BDNF:n ja TrkB:n mahdollinen rooli toleranssin kehityksessä

Erilaisten tutkimustulosten kautta on saatu näyttöä siitä, että biokompleksi lisäsi toiminnallaan sähköisten signaalien kulkua solujen välillä, esim. hippokampuksen pyramidisolujen viritys lisääntyy kompleksin edistämänä. Johtosignaalien voimistuminen johtaa synaptisen plastisuuden lisääntymiseen, ja aivoalueilla voi esiintyä lisää mm. LTP:tä.

Hermokasvutekijän ja sen reseptorin tarkat tehomekanismit ovat vielä epäselviä. Ne voivat lisätä plastisuutta tehoamalla myös useampaan kuin yhteen kemialliseen reaktioon. BDNF voi vaikuttaa esim. väittäjäaineen vapautumisen helpottamiseen, mutta se voi myös lisätä signaalien johtokykyä epäsuorasti vaikuttamalla estosignaalien tehon laskuun, eli sillä voi olla kykyä muuttaa GABAergisten solujen toimintaa [43].

TrkB:n reseptorin rakenne, jossa solunsisäinen osa reseptoria reagoi hermokasvutekijän sitoutumiseen kahtena molekyylikompleksina eli dimeerinä (joka käyttää esim. autofosforylaatiota), mahdollistaa fosforylaatioreittien

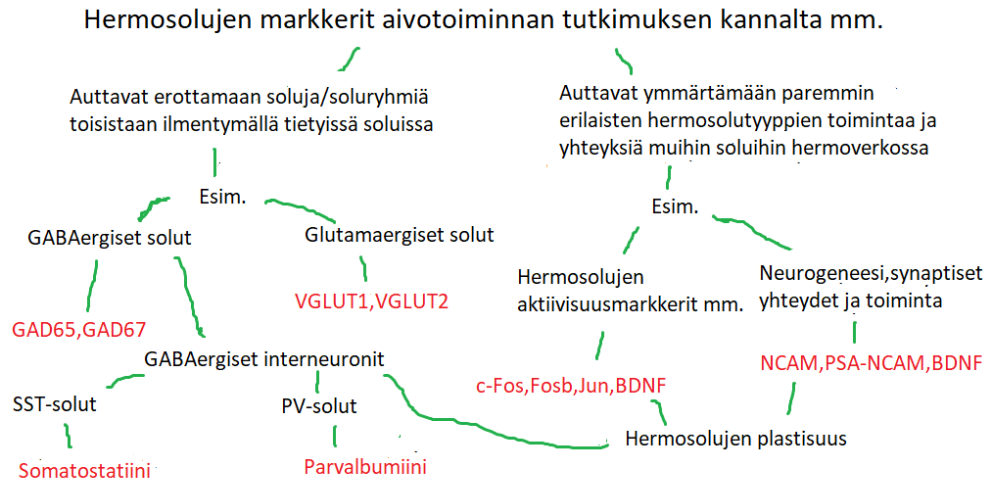
aktivoimisen, joissa proteiinit fosforyloivat toisiaan [50]. Fosforylaation aikana kinaasientsyymien avulla proteiiniin sitoutuu fosfaattiryhmä, ja tämä joko aktivoi tai inaktivoi proteiinia. Osa näistä kaskadireiteistä, kuten MAPK-kinaasireitti, voi vaikuttaa GABA_A-reseptorin alayksiköihin esim. niiden fosforylaation kautta [44].

BDNF voi näin vaikuttaa mm. GABA_A-reseptorien rakenteellisiin muutoksiin tai reseptorien fosforylaatioon monimutkaisten molekyylimekanismien kautta, ja mahdollisesti vähentää GABAn tehoa GABAergisissä soluissa, jos BDNF toimii soluissa jonkin aikaa. [33] Tällainen vaikutus GABA_A-reseptoriin saattaa olla yhtenä syynä esim. toleranssin kehittymiseen diazepaamin käytön aikana. Proteiinimolekyylin translaation jälkeen fosforyloinnilla on merkitystä molekyylin konformaation eli rakenteen muutostiloissa, ja se on yleisin mekanismi proteiinien toiminnan säädössä ja helpottaa soluissa tapahtuvaa biokemiallista signalointia. [31].

Muutokset GABA_A-reseptorin toiminnassa voi johtaa omalta osalta estosignaalien tehon heikkenemiseen. BDNF-kompleksin ilmentyminen kohtausaktiivisilla aivoalueilla, esim. hippokampuksessa, voi olla osoitus siitä, että biokompleksi edistäisi myös esim. epileptisten kohtausten etenemistä [45].

4.6 Neuroplastisuusmarkkerit

Neuroplastisuusmarkkerit ovat bioyhdisteitä, jotka vaikuttavat hermosolujen plastisuuteen eri tavoin esim. erilaisten solujen aktivaatioiden aikana (kuva 8). Näiden yhdisteiden konsentraatio soluissa voi vaihdella riippuen aktivaatiosta ja mutkikkaasta synapsien sähkökemiallisen toiminnan ja hermosolun yhdisteiden synteessin välisestä suhteesta. Välittömien varhaisten geenien lisäksi on olemassa muita plastisuuteen vaikuttavia molekyyliä, kuten hermosolujen adheesiomolekyyli eli NCAM. Adheesiolla tarkoitetaan tässä tapauksessa solujen välisten yhteyksien ylläpidon parantamista erilaisilla mekanismeilla, kuten liimautumiskyvyn avulla (kahden vierekkäisen solujen NCAM:ien välillä) [46].



Kuva 8. Ajatuskartta, jossa esimerkkejä hermosoluissa toimivien markkereiden roolista aivotutkimuksen kannalta.

NCAM on glykoproteiini, joka kuuluu elimistön vasta-aineiden superperheeseen. NCAM näyttää olevan läsnä rakenteellista ja synaptista plastisuutta ohjaavana tekijänä. Molekyylillä saattaa olla roolia aksonien/dendriittien rakenteellisissa muutoksissa, (esim. haarautuminen ja kasvu). NCAM-molekyylin tiettyyn domeeniin (tietty rakenteellinen osa proteiinia) voi liittyä toinen biomolekyylä, polysialihappo (PSA).

Molekyylin liittyminen NCAM:n osaksi heikentää adheesiomolekyylin kemiallisia vaikutuksia. Tällä PSA-NCAM-yhdistelmä-molekyylillä (proteiini-isoformi) näyttäisi olevan potentiaalia lisätä rakenteellista plastisuutta enemmän verrattuna pelkkään NCAM-molekyyliin. Kompleksi esim. lisää solujen välisiä etäisyyksiä, minkä vuoksi PSA-NCAM:ia pidetään negatiivisena säätelevänä tekijänä. [47.]

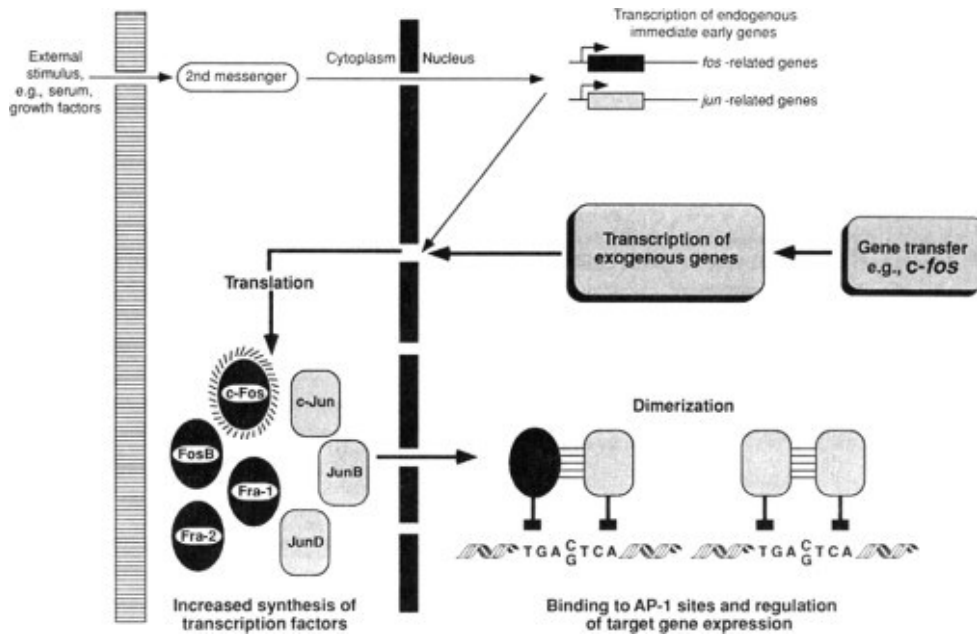
PSA-NCAM-molekyyliä havaitaan aikuisten aivoalueilla, joissa voi esiintyä runsaasti plastisuutta, kuten amygdalassa (mantelitumake) tai aivokorteksissa. Mielenkiintoisen molekyylistä tekee se, että sitä esiintyy pääosin interneuronien solutyypeissä mm. PV-soluissa ja SST-soluissa. Vaikuttamalla näiden solujen rakenteelliseen ja toiminnalliseen säätelyyn (esim. synapsien tehokkuuteen) se vaikuttaa näiden solujen käyttäytymiseen ja edistää inhiboivien neuronien

plastisuutta (negatiivisella tavalla). [48.] Joillekin lääkeyhdisteille plastisuuden vähentämisestä saattaisi olla hyötyä, eli niille molekyylistä voisi olla jotain hyötyäkin.

Fos-perheeseen kuuluva Fosb-geeni ja sen tuottama stabiili proteiini-isoformi, Δ FosB, välittävät plastisuutta toimimalla DNA:n transkriptiotekijöinä eli tehoavat mm. loppupään geenien koodamien proteiinien transkription tasoihin. Fos-perheen jäsenet ilmenevät soluissa melko nopeasti esim. joidenkin hermostoon vaikuttavien lääkkeiden toistuvan käytön jälkeen. Δ FosB:lla on lisäksi kykyä säilyä hermosoluissa jopa viikkoja (pitkä puoliintumisaika) mm. erilaisten väärinkäyttölääkkeiden (joihin myös bentsodiatsepiinit kuuluvat) lopettamisen jälkeen. Sinä aikana biomolekyyli välittää tasaisia muutostiloja DNA:n koodaamisessa liittymällä tiettyyn DNA:n emäsjärjestykseen [49.] Δ FosB:lla on näin potentiaalia olla riippuvuusmekanismien taustalla, välittämällä molekyyalitasolla olevaa plastisuutta [16].

4.7 C-Fosin toiminta neuroplastisuusmarkkerina

C-Fos on biomolekyyli, jota ilmentyy normaalisti aivoissa matalina tasoina. Se kuuluu myös ns. proto-onkogeeneihin, eli sellaisiin geeneihin, joita virukset voivat käyttää osana niiden geenimateriaalia oman jakautumisen yhteydessä. C-Fosilla näyttää olevan myös tärkeä rooli keskushermoston biokemiallisen muisti- ja oppimismekanismien osana. Koe-eläinten esim. hiirien kohdatessa niille uuden ärsykkeen tai niiden joutuessa niille ennestään tuntemattomaan tilanteeseen (uusi kokemus, voi olla myös farmakologinen stimulaatio jollain lääkeaineella, kuten diatsepaamilla), tapahtuu nopea välittömän varhaisiin geeneihin kuuluvan c-Fosin transkription nousua. C-Fosin ilmentyminen on usein voimakkaimmillaan muutaman tunnin kokemuksen alkamisen jälkeen (esim. 1,5–2 tuntia) [52]. C-Fosin ilmentymistasot laskevat tämän jälkeen nopeasti eli sen synteesin induktio on nopeasti ohimenevä [52]. Kuvassa 9 on esitetty c-Fosin toimintamekanismi.



Kuva 9. C-Fosin mahdollinen toimintamekanismi [65].

Ulkoisen ärsyksen seurauksena soluun voi virrata reseptoreiden kautta esim. kalsiumioneita, jotka toimivat ensimmäisinä toissijaisina lähettäjinä (2nd messengers). Tämä voi aktivoida sytoplasmassa kaskadien reittejä (proteiinit), joiden kautta tieto välittyy soluytimeen, jossa välittömät varhaiset geenit (mm. fos-geenit) aktivoituvat, usein minuuttien sisällä stimulaation alkamisesta. Translaation jälkeen c-Fos-molekyylit yhtyvät dimeerinä mm. c-Junin kanssa (Jun-proteiinit), ja tämä dimeerikompleksi (ns. aktiivinen proteiini, AP-1) toimii aktiivisena transkriptiotekijänä, sitoutuessaan uudestaan DNA:han. Se moduloi nyt erilaisien geenien ekpressiota, tuottaen esim. myöhäisen vasteen geenejä. [53.] Näiden modulointimekanisimien avulla c-Fos voi vaikuttaa myös eri soluryhmien pitempiaikaiseen muistiin, vaikka sen konsentraatio ei nousisi aivan samoille tasolle hiiren kohdatessa saman ärsyksen uudestaan, seuraavina kertoina. c-Fosin toimintaa pidetään yhtenä avaintekijöistä solujen reaktiona ärsykkeisiin ja siksi se on neuroplastisuusmarkkeri, jota käytetään laajasti markkeriaineena eri neurobiologisissa tutkimuksissa. C-Fos-positiiviset solut voidaan saada näkyviin esim. immunohistokemiallisten metodien avulla.

Aiempien tutkimusten perusteella on näyttöä siitä, että diatsepaamin käyttö aktivoi c-Fosin ilmentymistä erityisesti mantelitimakkeen alueella. Mantelitimake on parillisena osana esiintyvä pieni aivorakenne, joka pystyy vastaanottamaan tietoja kaikista aisteista. Rakenne yhdistetään usein tunteiden, kuten pelon tai ahdistuksen muodostumiseen, missä sillä näyttäisi olevan suuri rooli. [67.]

5 Immunohistokemia ja fluoresenssimikroskopia

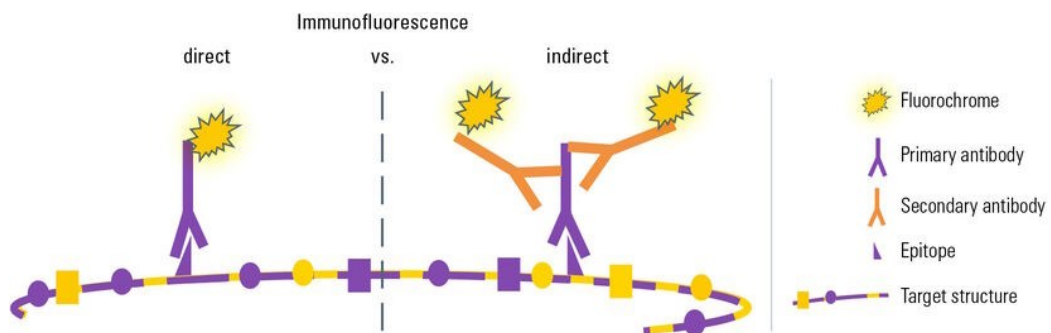
5.1 Vasta-ainevärjäyksen periaate

Immunohistokemia on laboratoriotekniikka, jota käytetään spesifisten antigeenien paikantamiseksi kudososista tai soluista, vasta-aineiden avulla. Metodien avulla voidaan visualisoida tutkimuksen kannalta kiinnostava biomolekyylejä, mm. tiettyjä proteiineja, tietyistä soluista (joko solun pinnalta tai solun sisältä). Visualisointiin tarkoitettu molekyyli toimii siis biomarkkerina ja antigeenina, jonka havaitsemiseksi se leimataan sille spesifisellä vasta-aineella. Värjäyksen aikana tapahtuvan kemiallisen reaktion avulla voidaan paikallistaa esim. entsyymejä tai transkriptiotekijöitä, kuten c-Fos-molekyylejä, ja määrittää tämän perusteella esim. kiinnostavien solujen lukumäärän. Tämän perusteella saadaan lisätietoa tiettyjen solujen aktivaatioista, tietyistä osista kudosta. Metodia käytetään laajasti lääketieteessä ja kliinisessä diagnostiikassa esim. sitä käytetään kasvainmarkkereiden määrittämiseksi. [54.]

Tasalämpöisten eläinten ja ihmisten elimistö tuottaa vasta-aineita (immunoglobuliineja, viisi eri luokkaa), jotka muodostavat veriseerumin globuliinifraktion, osana elimistön immuunijärjestelmää. Vasta-aine sitoutuu esim. proteiinitoksiineihin (antigeeneihin) liittymällä antigeenin tiettyyn kohtaan, jonka vasta-aine tunnistaa. Tätä kohtaa kutsutaan epitoopiksi. Vasta-aineet voidaan jakaa tämän perusteella kahteen päätyyppiin, polyklonaalisiin ja monoklonaalisiin. Polyklonaaliset vasta-aineet (eri vasta-aineiden seos) pystyvät tunnistamaan ja sitoutumaan useisiin epitooppeihin, kun taas monoklonaaliset aineet sitoutuvat yhteen epitooppiin. Tämän takia monoklonaaliset vasta-aineet sijoituvat spesifisemmin

mutta polyklonaaliset vasta-aineet tuottavat usein voimakkaamman signaalin. [57.]

Kahdentyyppisten vasta-aineiden lisäksi immunohistokemiassa käytetään kahta eri värjäysmetodia. Suorassa värjäysmetodissa primääri vasta-aine (johon suoraan liitetään fluorokromi) sitoutuu haluttuun epitoppiin, ja tämä rakenne visualisoidaan mikroskoopilla. Menetelmä on nopeampi, kun epäsuora värjäys, mutta epäsuora värjäys on usein joustavampi metodi. Siinä pelkän primääriseen vasta-aineen sitouduttua haluttuihin paikkoihin siihen vuorostaan liitetään sekundäärinen vasta-aine. Ne ovat ns. antivasta-aineita eli isännälleen vieraspe räisiä, ja ne toimivat spesifisten antigeenien tavoin. Yhteen primääriseen vasta-aine molekyyliin voi liittyä useampia sekundäärisiä vasta-ainemolekyyliä, mikä mahdollistaa paremman signaalin voimakkuuden, ja tämän takia primääristä vasta-ainetta voi käyttää pienemmissä konsentraatioissa. Epäsuoraa värjäysmetodia käytettäessä myös kohdeproteiinia voi olla näytteessä pieninä määrinä, tätä metodia käytettäessä. Kuvassa 10 on havainnollistettu kaksi värjäysmetodia. [55.]

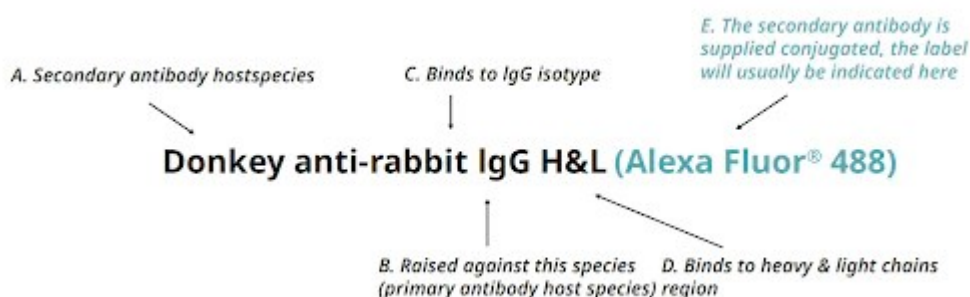


Kuva 10. Suora ja epäsuora värjäysmetodi [55].

Antigeenien epäsuoraan tunnistamiseen ja visualisointiin on olemassa kromogeeninen metodi, fluoroforien käytön lisäksi. Metodi vaatii ylimääräisiä värjäysvaiheita fluoresenssivärjäysprotokollaan verrattuna. Siinä tiettyjä entsyymejä liitetään sekundääriseen vasta-aineeseen (fluoroforin sijasta sekundärisiin vasta-ainesiin on lisätty esim. biotiinia) ja sen jälkeen entsyymeihin liitetään substraatteina kromogeenejä. Ne ovat aineita, jotka muuttuvat reaktiossa

värilliseksi, minkä myötä muodostuu liukenematon värillinen sakka mikroskooppilla havainnollistamiseen. Fluoroforin tai entsyymien valinta leimatarraksi riippuu värjäyksen päämääristä ja siitä mitä värjäyksellä pyritään analysoimaan. [56.]

Immunohistokemiallisessa analyysissä on tärkeää valita oikeanalaiset vasta-aineet värjäykseen. Esim. sekundäärisen vasta-aineen alkuperä pitäisi olla erilaisesta isäntälajista kuin primäärin. Jos käytetään kanista peräisin olevaa primääristä vasta-ainetta, sekundäärisen vasta-aineen alkuperä pitäisi olla vaihtoehdosta lajista esim. aasin anti-kanin vasta-aine olisi toimiva. Sekundäärisestä vasta-aineesta voidaan mainita, minkä luokan vasta-aineille se on vastakkainen ja mihin ketjuihin primääristä vasta-ainekompleksia se voi sitoutua. Lopussa yleensä mainitaan, mihin fluoroforiin se on konjugoitu. Mallikuvassa 11 sekundäärinen vasta-aine on konjugoitu esim. Alexa Fluor® 488:een, vihreään fluoroforiin. [57.]



Kuva 11. Sekundäärisen vasta-aineen ja konjugoidun fluoroforin tiedot [57].

5.2 Fluoresenssi ja fluoroforit

Fluoresenssi on yksi luminesenssi-ilmiön muodoista. Luminesenssissa materia säteilee sähkömagneettista säteilyä, joka ei johdu varauksellisten hiukkasten lämpöliikkeen aiheuttamasta lämpösäteilystä. Sitä säteilevät kaikki aineet, joiden lämpötila on yli 0 kelviniä. Fluoresenssissa on kyse siitä, että aine voi absorboida (ottaa vastaan) tietyn pituista sähkömagneettista säteilyä, kun siihen sitä kohdistuu, ja näin tietyn energian omaavat fotonit voivat virittää yhdisteen elektroneja. Elektroni voi siirtyä hetkellisesti sen perustilasta virittyneempään tilaan,

ja sen palatessa takaisin perustilaan se emittoi fotonin, säteilee sähkömagneettista säteilyä ympäristöön. Tätä tapahtumaa kutsutaan fluoresenssiksi.

Fluoresenssissa säteilyn stimulaatio tapahtuu ulkoisen fotonilähteen vaikutuksesta ja se lakkaa nopeasti, jos ulkoisen stimulaation lähde otetaan pois. Fluoresenssissa vaimennusaika, eli aika, jolloin molekyylien elektronit ensin stimuloituvat ja sitten emittoivat fotoneja, on lyhyt, nanosekuntien luokkaa. Esimerkiksi näiden tekijöiden ansiosta fluoresenssi eroaa fosforesenssista. [58.]

Emittoitu säteily on pidempiaaltoisempaa eli vähemmän energisempää kuin absorboidut aallonpituudet. Tämä johtuu siitä, että elektronin palatessa takaisin virittyneestä tilasta tapahtuu ensin säteilemättömiä energiahäviöitä mm. elektronin värähtelytasoista johtuvan, relaksaatioksi nimitetyn prosessin aikana [58]. Fluoresenssiin kykenevät esim. jotkut epäorgaaniset mineraalit ja orgaaniset yhdisteet mm. jotkut proteiinit, ja esim. GFP-proteiinia, jota alun perin eristettiin meduusoista, käytetään laajasti molekyylibiologiassa kiinnostavien geenien toiminnan tutkimiseen [58].

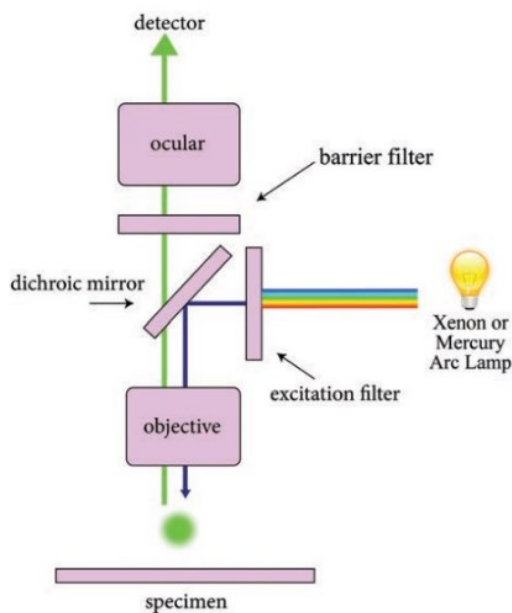
Fluoresoivia molekyyliä sanotaan fluorokromeiksi tai väriaineiksi. Fluoresenssimikroskopiaa varten käytetään usein makromolekyyliin, kuten nukleiinihappoihin tai proteiineihin, liitettyjä spesifisiä fluoresoivia leimoja haluttujen solujen/molekyylien detektoimiseksi. Näitä kovalenttisella sidoksella esim. vasta-aineisiin konjugoituja molekyyliä kutsutaan fluoroforeiksi. Luonnollisten väriyhdisteiden (mm. GFP-proteiini) lisäksi nykyisin fluoroforeina käytetään paljon synteettisiä väriaineita ja erilaisia modifioituja biokemikaaleja. [58.]

Esimerkiksi Alexa Fluor -väriaineperheen fluoroforeja käytetään paljon tieteellisissä kokeissa, koska ne ovat vesiliukoisia, laajalla pH:n skaalalla toimivia, haalistumista kestäviä ja niitä on mahdollista konjugoida erilasiin biomolekyyliin. Lisäksi niiden kvanttisaanto eli emittoitujen fotonien määrä verrattuna absorboitujen fotonien määrään on korkeampi kuin useiden muiden väriyhdisteiden. Monet Alexa Fluor -väriaineet ovat sulfonoituja rodamiinijohdannaisia. [59.] Tässä tutkimuksessa käytettiin Alexa Fluor® 594 -fluoroforia, joka fluoresoi näkyvän

spektrin punaisella alueella. Sen absorbanssihuipun maksimi on 590 nm ja emissiohuipun maksimi on 617 nm. Huippujen siirtymää kutsutaan Stokesin siirrokksi.

5.3 Fluoresenssimikroskopia

Työssä käytetty Zeiss Axio Imager -mikroskooppi kuuluu epifluoresenssimikroskooppeihin, joissa objektiivi sekä valaisee näytettä että myös kuvaa sen. Fluoresenssimikroskoopin tehtävänä on valaista valinnaisesti suodatetulla, halutulla valokaistalla (tietyllä aallonpituudella) näytettä, aiheuttaen fluorokromeissa fluoresenssia. Sen jälkeen myös heikompaa valoa ohjautuu objektiivien kautta takaisin mikroskooppiin, jossa emissiosäteily suodatetaan ja ohjataan okulaareille tai kameras ilmaisimeen, kuten kuvassa 12 on esitetty. Fluoresenssimikroskooppi sisältää kameras ja objektiivien lisäksi mm. valonlähteen, virityssuodattimen, dikromaattisen peilin ja emissio- eli sulkusuodattimia.



Kuva 12. Fluoresenssimikroskopian yksinkertaistettu toimintaperiaate [66].

Valonlähteenä toimivat mm. kaarilamput tai diodilähteet (LED). Suodattimet eli filterit ovat optisia systeemejä, joiden tehtävä on ensin virittää ja ohjata

näytteeseen tarvittavaa säteilyä, ja myöhemmin estää näytteeseen alun perin osunutta sähkömagneettista säteilyä kulkeutumasta kameran ilmaisimeen, koska tarkoituksena on ohjata sinne emission tuloksena syntyvää säteilyä. Dikromaattisen säteenjakapeilin (asetettu 45°:n kulmassa valolähteeseen nähden) tehtävänä on auttaa erottaman emissiosäteily alkuperäisestä viritys- säteilystä. Se ensin heijastaa osuvaa säteilyä näytteeseen ja myöhemmin päästää emissiosäteilyä kohti ilmaisinta, jossa sulkusuodatin pystyy edelleen erottamaan pidempiä aallonpitoisuuksia ennen kuin säteily osuu ilmaisimeen. Filtrit ja peili on tehty ohuista, optisista materiaaleista, joissa on käytetty uusimpia materiaali- teknologian ratkaisuja, joiden avulla esim. filtrin materiaalin taitekerroin voi vaihdella. [60.] Taitekerroin on valonnopeuden suhde muuttuneeseen valonno- peuteen, valon kohdatessa uuden väliaineen.

6 Eläintutkimusmalli

6.1 Tutkimusmalli

Jyrsijöitä, varsinkin hiiriä, ja jonkin verran rottia käytetään paljon biolääketieteen tutkimuksissa. Kun kehitetään uutta lääkeyhdistettä ihmisten mahdolliselle käy- tölle, kaikki lääkkeiksi tarkoitetut aineet on prekliinisessä vaiheessa testattava ensin eläimillä. Useimmiten tämä testaus tehdään hiirillä. Seuraavassa vai- heessa osana lääkkeen testausta voidaan tutkia vielä lähinnä lääkeyhdisteen annoskokoja koirilla, ennen kuin lääkkeitä aloitetaan testaamaan jo vapaaeh- toisten koehenkilöiden avulla eli aloitetaan yhdisteen kliinisen tutkimuksen vaihe.

Laboratoriohiirien avulla voidaan myös tutkia esim. eri geenien toimintameka- nismeja tai erilaisten sairauksien syitä. Hiiren genomi muistuttaa ihmisgenomia ja tämän takia hiirille tehtyjen tutkimusten perusteella voi myös tehdä jonkinlai- sia päätöksiä, miten vastaavat mekanismit toimisivat myös ihmisellä. On ollut tapauksia, kun hiirillä onnistuneesti testatut lääkkeet eivät ole kuitenkaan toimi- neet ihmisillä. Laboratoriohiirelle voidaan myös suorittaa erilaisia kokeita, jotka auttavat ymmärtämään paremmin aivotoiminnan mekanismeja, mm. voidaan

tutkia hermosolujen muistin liittyvän biokemiallisen toiminnan mahdollisia mekanismeja. Kun hiiri saa koetilanteessa uuden kokemuksen esim. lievän sähköiskun voidaan keksiä, millä tavalla se kokemus olisi sille merkittävä. Niitä neuronipopulaatioita/molekyylejä, jotka aktivoituvat kokemuksen tallentamiseksi osana muistia, voidaan tutkia mm. immunohistokemian avulla. Nykyisin on kehitetty työkaluja myös elävien hiirten hermosolujen toiminnan tutkimiseen ja solujen aktivaation säätelyyn. Optogenetiikka on esimerkki tällaisesta työkalusta.

6.2 Poistogeeniset hiiret

Poistogeeniset hiiret, joita kutsutaan myös tyrmäyshiiriksi, ovat geneettisesti modifioituja hiiriä, joista on tyrmätty eli inaktivoitu tietty geeni (kromosomin osa). Geeni voidaan mm. poistaa tai sen paikalle voidaan asettaa tietynlaisista nukleotideista (DNA:n rakenneyksikkö) koostuva rakenne. Sammuttamalla geenin toiminta voidaan tutkia sillä ollutta roolia elimistössä (tietty geeni koodaa jotakin proteiinia). Ehdollisissa tyrmäyshiirissä geenin toiminta on sammutettu vain tietyistä kudoksista/soluista. Ehdollisena tyrmäyshiirimallina voidaan käyttää esim. ns. floksaus-mallia ja tällaisten hiirten jalostamiseen käytetään cre/lox-järjestelmää (kuva 13).

Cre-rekombinaasi (tyrosiinirekombinaasientsyymi), joka on johdettu bakteriofagista P-1, on entsyymi joka pystyy tunnistamaan tiettyjä emäsparijärjestyksiä, joita kutsutaan loxp:eiksi (locus of X-over P1). Lisäämällä nämä lox-sivustot kohdegeenin molemmille puolille cre-rekombinaasin vaikutuksen aloitus- ja lopetuspaikkoihin, cre-rekombinaasi pystyy liittymään siihen kohtaan DNA:ta ja muokkaamaan kohdegeenin toimintaa. Modifioimalla hiirten kantasoluja tietty siirtogeeninen hiiri pystyy ilmentämään cre-rekombinaasia, kun taas toisella hiirellä kohdegeeni on "floksettua" eli merkitty loxp:eilla. Kun tällaisia hiiriä paritellaan, niin jälkeläisillä cre-rekombinaasi pystyy löytämään loxp-kohdat, ja näin estämään geenin toiminnan. Jotta cre-geeni olisi aktiivinen vain tietyn tyyppisissä soluissa, se toimii soluspesifisen promoottorin (tietty DNA:n emäsjärjestys, johon proteiinit sitoutuvat ennen transkription alkamista) läsnä ollessa. [61.] Cre-rekombinaasin tehokkuutta haluttuihin floksattuihin geeneihin pystyy

seuraaman esim. reportterigeenien avulla, joiden synteesi riippuu siitä, onko kohdegeenin toiminta estynyt. Reportterigeeneinä toimivat usein fluoresoivat proteiinit, kuten tdTomato (punaisella fluoresoiva proteiini).

7 Materiaalit ja menetelmät

7.1 Tutkimushiiret

Tutkimuksessa analysoitiin ja verrattiin kahden eri hiiriryhmän aivoja. Ryhmään A kuului linjaspesifisiä villityypin (wt = wild type) uroskontrollihiiriä (SST^{cre}/wt; TrkB^{wt}/wt). Ryhmään B kuuluvilla uroshiirillä oli spesifisesti poistettu TrkB-reseptori, somatostatiinia ilmentävistä soluista (interneuronit). Poistogeeniset hiiret (SST-TrkB-hCKO, SST^{cre}/cre; TrkB^{flx}/wt; Rosa26^{tdT}/wt) oli tuotettu Jacksonin laboratoriossa. CKO-lyhenteellä tarkoitetaan sitä, että tietty geeni on poistettu vain tietyn tyyppisistä soluista (ehdollinen tyrmäys). Tämän tyyppiset poistogeeniset hiiret tuotettiin parittelemalla cre-rekombinaasia ekspressoivasta naarashiirilinjasta (SST-interneuronit) homotsygoottisesti (SST^{cre}/cre: 013044, Jackson Laboratory) urosten kanssa yhdistetystä heterotsygoottisesta linjasta, joka kantaa heterotsygoottista floksattua TrkB:tä (TrkB^{flx}/flx).

Molempien genotyypin uroshiiriin injektointiin diatsepaamia vatsaontelon sisäisesti (10 mg/kg i.p.). Kaksi tuntia injektoiden jälkeen (farmakologinen stimulatio), hiiret nukutettiin syvästi pentobarbitaalilla (120 mg/kg, i.p.) ja perfusoidiin (hiirestä poistetaan veri) intrakardiaalisesti (sydämensisäisesti) 1 x PBS:llä, jota pumpataan veren tilalle, (pH 7,6), jota seurasi 4-prosenttinen PFA (paraformaldehydiliuos). Leikatut aivot jälkikäsiteltiin 4-prosenttisessä PFA:ssa, 4 °C:ssa 24 tunnin ajan ja säilytettiin sitten 1 x PBS:ssä 0,03-prosenttisellä NaN₃:lla +4 °C:ssa.

7.2 Immunohistokemiallisen analyysin vaiheita

Immunohistokemialliseen analyysiin kuuluu erilaisia vaiheita, esim. näytteiden esikäsitelyyn voi kuulua fiksausta tai niiden leikkaamista ohuiksi kudospaloiksi.

Värjäykseen kuuluu varsinaisen värjäyksen lisäksi esim. leikkeiden pesua. Värjäykseen voi kuulua pituudeltaan erilaisia inkubointiaikoja, riippuen värjäysprotokollasta. Ennen leikkeiden peittämistä peitinlasilla mikroskooppilasille voidaan lisätä erilaisia reagensseja jne. Tästä seuraa se, että erilaisten menetelmien ja protokollien toimivuus voidaan analysoida värjäyksen jälkeen, ja voi pohtia, voisiko jotain kohtaa optimoida.

7.3 Leikkaus

Ennen varsinaista leikkausta aivopuoliskolle oli tehtävä esikäsittely. Ensiksi piti varovaisesti ottaa ja laittaa aivot paperille, falcon-putkesta (1xPBS+0,03 % NaN_3). Aivojen kanssa työskennellessä on syytä muistaa varovaisuus eli esim. laboratoriospatulaa käytettäessä tehdään helliä vierittäviä liikkeitä, kun aivoja käsitellään ja siirretään. Seuraavaksi piti käsin leikata terällä 1/3 pikkuaivoista (cerbellum) ja pieni osa aivojen esikuoresta (olfactory), jotta olisi tasaisempi pinta varsinaista leikkausta varten. Tutkimusta varten aivot oli myös leikattava kahdeksi aivopuoliskoiksi (vasen ja oikea aivopuoli) keskiviivaa pitkin. Nämä leikkaukset tehtiin käsin, terää käyttämällä. Oli erityisen tärkeää, että leikkaukset olivat mahdollisimman suoria.

Tämän lisäksi valmistettiin agarია, koska aivopuolisko piti olla agarkuution sisällä leikkauksen aikana. Agar tukee ja suojaa aivojen rakennetta leikkauksen yhteydessä. Agarliuosta varten punnittiin 1 gramma agarjauhetta ja lisättiin erlenmeyriin 30 ml ultrapuhdasta vettä. Erlenmeyer laitetaan mikroaaltouuniin pyörimään ja kun kuplia alkoi muodostua, tarkistettiin, että agar olisi liuennut liuokseen (tarvittaessa voi kuumentaa lisää). Agarliuoksen annettiin hieman viilentyä (pitäisi olla tarpeeksi lämmin mutta ei polttava, kun käyttää). Sen jälkeen liuosta kaadettiin varovasti monikalvoväyn kuopassa, cerbellum-puoli alaspäin, olevan aivopuoliskon päälle siten, että se peittyi kokonaan. Sen jälkeen levy laitettiin jääkaappiin, jotta agar kiinteytyisi. Lopuksi leikattiin varovaisesti terällä ylimääräistä agarია pois aivojen ympäriltä, varmistaen samalla, että agar peittäisi aivoja riittävästi joka suunnasta. Tämän jälkeen agarkuutio oli valmiina

leikkaukseen. Mallikuutio (kuution sisällä kokonaiset harjoitusaiivot) on esitetty kuvassa 13.



Kuva 13. Hiiren aivot agarkuution sisällä.

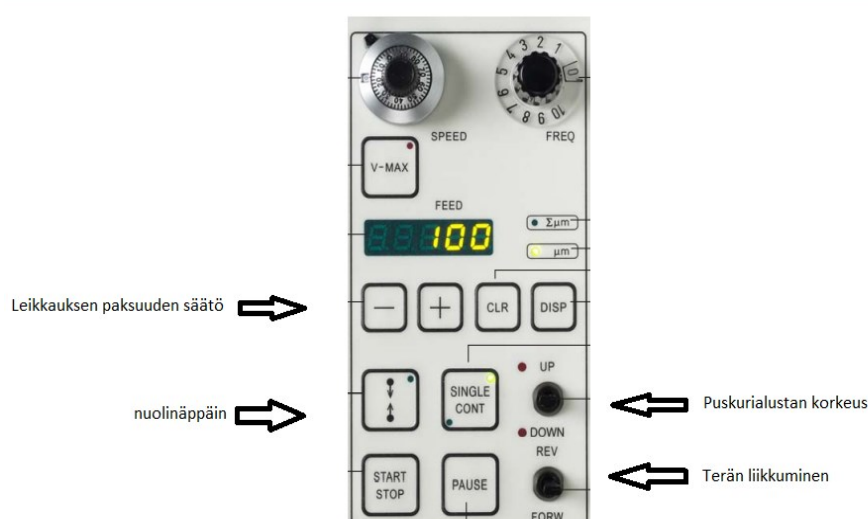
Varsinainen leikkaus suoritettiin käyttämällä Vibratomea (mallina Leica, VT 1000 S). Vibratomea käytettäessä on muistettava turvallisuus, koska terä on erittäin terävä. Kuvassa 14 näkyy Vibratome ja sen vieressä musta laatikko, jonka sisällä on teräteline.



Kuva 14. Vibratome ennen laitteen kasaamista. Kuvassa laatikon lisäksi näkyy mm. puskuriliuos, terät ja liima.

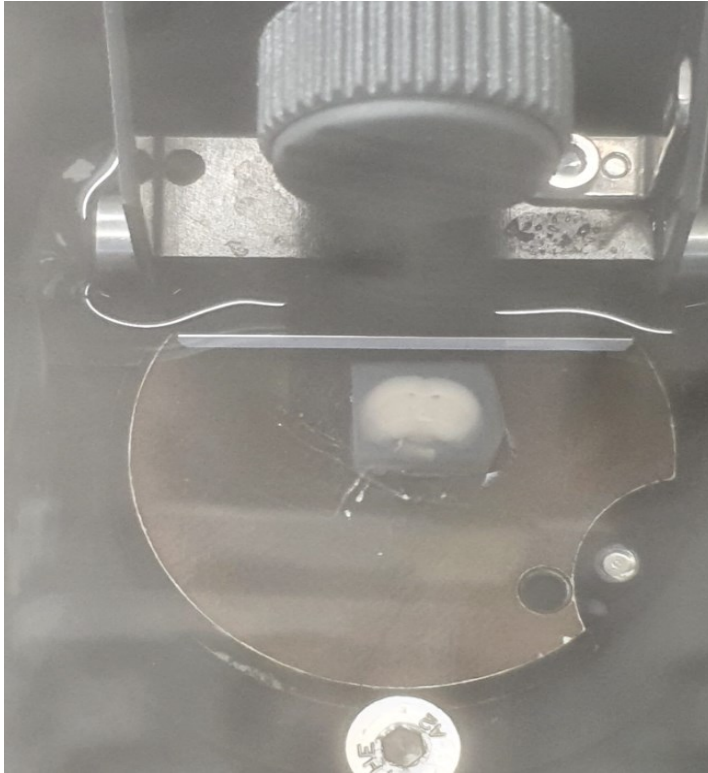
Vibratome kasattiin eli laitettiin laatikko paikalleen, laatikon sisälle pienelle metallilevyllä liimattiin aivopuolisko ja kiinnitettiin teräteline omaan paikkaan mustan ruuvien avulla (terä laitetaan telineeseen tylppä puoli sisälle päin). Kun aivot olivat hyvin kiinnittyneet alustaan, kaadettiin laatikkoon 1xPBS-fosfaattipuskuria, niin että aivot peittyisivät liuoksella.

Vibratome käyttää tietyllä taajuudella tärisevää ja samalla liikkuvaa terää ohuiden aivokudosleikkeiden leikkaamiseen. Vibratomen säätösystemi ja osa sen toiminnoista on kuvassa 15.



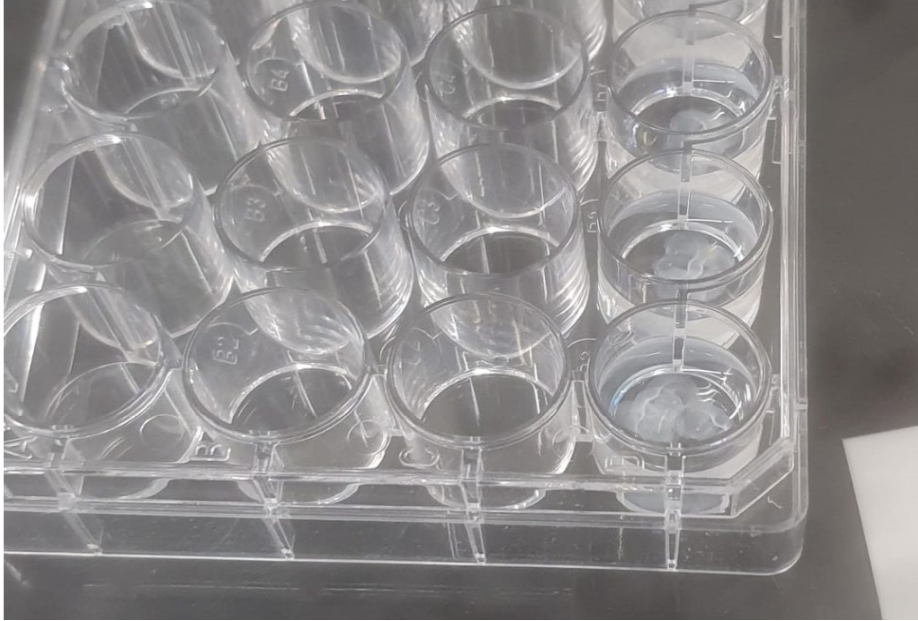
Kuva 15. Osa Vibratomen säätösystemin toiminnoista

Säätösystemin avulla pystyi säätämään leikkauspaksuuden. Tutkimuksessa leikattiin 40 μm :n paksuisia leikkeitä. Terän nopeus oli 500 ja värähtelytaajuus 7. FORW-kytkintä painamalla terä liikkuu eteenpäin vaakasuunnassa. Nuolinäppäimen avulla pystyi säätämään terän rajanpysäytysasennot, eli terän leikkaus aloitus- ja lopetuskohdat. Jos säädetty amplitudi on toimiva, single cont -näppäimen avulla pystyi tekemään terän liikkumisen automatisoiduksi (yksittäisillä kerroilla aloitus start-painikkeesta). Terän liikkumisen aloituspaikka kannattaa valita siten, että olisi jonkin verran etäisyyttä agarkuutioon ja niin, että toisella puolella kuutiota se pysähtyisi ja palaisi takaisin lähtöpaikalleen leikattuaan kokonaisen leikepalan. Kuvassa 16 on leikkeiden leikkaus käynnissä.



Kuva 16. Aivoleikkeiden leikkaus Vibratomella.

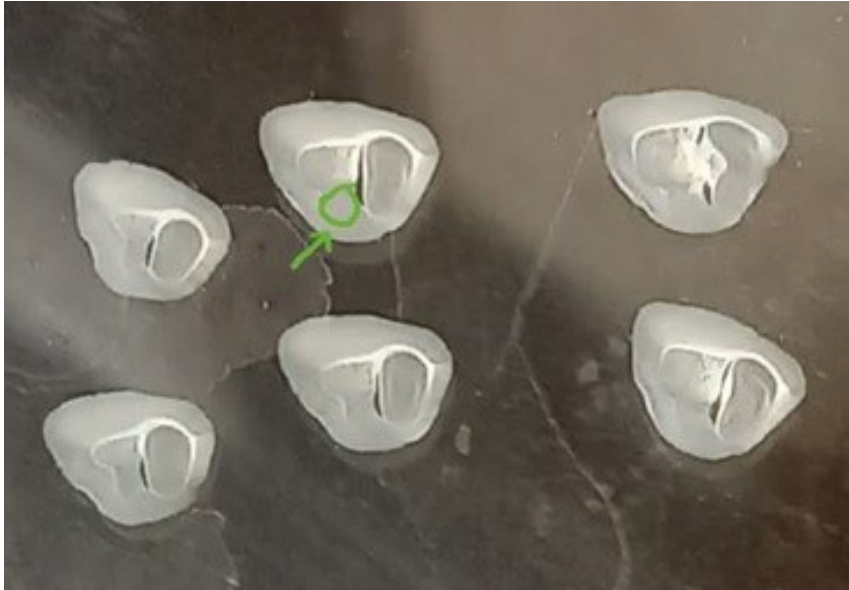
Leikkauksen aikana aivopuoliskoon ilmestyy erilaisia aivokuviota, ja niistä voi päätellä, miltä kerrospaksuudesta/kerrossyvyydestä leike leikataan kussakin vaiheessa. Apuna voi tarvittaessa käyttää mm. Paxinosin ja Watsonin -hii-riaivoatlaksia. Leikkeet kerätään siveltimillä talteen vuorotellen monikalvovyn kuoppiin ja niistä kannattaa tarvittaessa petrimaljassa erottaa varovaisesti tart-
tunut agar siveltimillä. Koloihin ennen leikkausta on pipetoitu 1,5 ml 1xPBS:ää + 0,03-prosenttista NaNO_3 (natriumatsidi) -liuosta. Pieni määrä natriumatsidia käytetään mikrobikontaminaation välttämiseksi, että leikkeet säilyisivät pidem-
pään liuoksessa. Kuvassa 17 on leikkeitä monikalvovyllä. Leikkauksen loput-
tua suljettiin levyn kansi, käärittiin levy parafilmillä ja säilytettiin se $+4^\circ \text{C}$:ssa. Tutkimuksessa kudosisälsi myös valoherkkiä proteiineja, joten levy käärittiin foliolla ennen jääkaappiin laittoa.



Kuva 17. Leikatut aivoleikkeet monikalvovyn koloissa (1xPBS ja 0,03-prosenttinen NaN_3 liuos).

7.4 Leikkeiden pesu

Tutkimuksessa oli tarkoitus valita 6 leikettä/per aivo, jotka vastaisivat kerrossyvyydeltään parhaiten 3,25—2,52 mm:n syvyyttä (leikepaksuus kaikilla leikkeillä sama, 40 μm). Ensimmäiseksi otettiin kaikki leikkeet yhdestä monikalvo-kuopasta ja erotettiin siveltimellä värjättävät 6 leikettä muiden joukosta. Kuvassa 18 on yhden tutkimusaivon leikkeet valittuna värjäykseen. Yhdessä leikkeessä on merkitty vihreällä, työn kannalta tärkeäksi osoittautuneen, amygdalan alueen sijainti.



Kuva 18. Tutkimusta varten valitut yhden aivon aivoleikkeet.

Värjäyksen ensimmäiseen vaiheeseen kuuluu leikkeiden pesu. Siinä aivoleikkeet laitetaan 6-kuoppaiseen levyyn. Ensimmäiseen koloon lisättiin 1xPBS:ää (phosphate buffering saline) liuosta ja kahteen muuhun PBS-T-liuosta (jos on 3 pesukertaa, jokaisella pesukerralla leikkeet siirretään siveltimellä uusiin koloihin). PBS:ää käytetään paljon biologisten näytteiden säilömiseen, kuljettamiseen ja pesuun, koska puskuriliuoksena se ylläpitää pH:n tasoa vakiona. Liuoksen valmistukseen punnitaan eri määrä erilaisia suolayhdisteitä esim. natriumkloridia ja natriumvetyfosfaattia, jotka liuotetaan tiettyyn määrään tislattua vettä. 1xPBS on laimea suolaliuos, joka toimii pesupuskuriliuoksen lisäksi usein nesteinä, joka voi stabiloida solukalvon rakennetta. Nestettä voidaan käyttää myös leikkeiden säilytyspaikkana, kun leikkeitä asetetaan mikroskooppilasille yksi kerrallaan. Puhtaassa 1xPBS:ssä voi välillä myös puhdistaa sivellintä värjäyksen aikana, kontaminaation estämiseksi. 1x-vahvuinen PBS tarkoittaa esim. sitä, että 1 litran pullossa on 900 ml MilliQ-vettä ja 100 ml 10x vahvuista PBS-liuosta eli 1x kertaisessa liuoksessa reagenssien konsentraatioiden vahvuus on kymmenen kertaa pienempi, se on laimennettu (molaarisuus, 1xPBS-vahvuus 0,01 M, 10xPBS:n on 0,1M).

PBS-T on viskoosimpaa liuosta verrattuna PBS:ään ja sisältää lisäkomponenttina Tritonia (0,3 %), joka voi myös joskus auttaa solukalvon avaamisessa, jotta primääri vasta-aine pääsisi solujen sisälle varsinaisen värjäyksen aikana. Triton X-100 on ioniton pinta-aktiivinen aine. Se ei ionisoidu vedessä, ja sillä on muiden pinta-aktiivisten aineiden tavoin vettä hylkivä ja veden kanssa reagoiva osa. Analyysin laadukkuuden varmistamiseksi pesuvaihe on tärkeä osa värjäystä ja se suoritetaan yleensä muutaman kerran värjäyksen eri vaiheissa.

7.5 Värjäys

Värjäys tapahtui fluoresenssivärjäysprotokollan mukaan (liite 1) ja epäsuoraa värjäysmetodia käyttäen. Valittujen aivojen leikkeiden värjäykseen kuuluu kaksi värjäyspäivää. Ennen primäärin vasta-aineen lisäämistä suoritetaan estovaihe. Blokkaukseen valmistetaan erityinen estoliuos. Se sisältää BSA:ta (perusseerumia), joka on pohjaltaan naudan (albumiinin) seerumia. Se on liuoksen peruskomponentti, ja välillä immunohistokemiassa pelkkä BSA saattaa riittää inkubointiin. Tutkimuksessa BSA:n lisäksi estoliuokseen kuului myös aasin seerumia. Seerumina estoliuoksessa suositellaan käyttämään BSA:n lisäksi sellaista seerumia, mistä toisena päivänä lisättävä sekundäärinen vasta-aine on valmistettu. Seerumi ei saisi olla peräisin lajista, jossa primäärinen vasta-aine on kasvatettu, koska silloin sekundäärinen aine ei enää sitoutuisi yhtä hyvin primääriin vasta-aineeseen. Estovaiheen tarkoituksena oli välttää primäärin vasta-aineen epäspesifistä sitoutumista leikkeen eri osiin. Estoliuokseen lisättyjen seerumien laimentamista varten pipetoitiin falcon-putkeen (osana estoliuosta) myös PBS-T:tä. Ravistajan avulla pystyi sekoittamaan komponentit, ja liuos oli valmis.

Estoliuoksen valmistamisen tärkeänä osana oli laskea, kuinka paljon eri reagensseja on pipetoitava liuokseen, jotta se olisi toimiva. Tässä aputyökaluna on laboratorioanalyyseissa monesti liuosten valmistamisessa käytetty työkaava: $c_1V_1 = c_2V_2$, jossa c on konsentraatio ja V tilavuus. Estoliuokseen oli tarkoitus saada 3-prosenttinen BSA:n pitoisuus ja 10-prosenttinen aasin seerumin pitoisuus, jota varten lisättiin 10-prosenttista BSA:n liuosta ja 100-prosenttista aasin seerumia. Estoliuosta valmistettiin kerralla 1 000 µl, sillä yhteen

monikalvolevykuoppaan oli pipetoitava 500 µl liuosta, ja kun yhden värjäysker-
ran aikana värjättiin kahden eri aivon leikkeitä, niin liuosta pipetoitiin kahteen eri
kuoppaan. Esim. BSA:lle pipetoitava määrä on laskettu kuvassa 19.

Kaava $c_1V_1=c_2V_2$		Alkuperäisen liuoksen BSA:n osuus	Pipetoitava määrä	Estoliuoksen BSA:n osuus	Estoliuoksen kokonaismäärä
	Lopullinen liuosmäärä	c_1	V_1	c_2	V_2
	1000 µl	10 %	x	3 %	1000
	tuntematon eli $x=V_1$?	$V_1=c_2V_2/c_1$			
		$3*1000/10$	BSA:n pipetoitava määrä 300 µl		

Kuva 19. Pipetointimäärän laskeminen BSA:lle estoliuoksen valmistamista var-
ten.

Eston kesto oli 1 tunti, jolloin levyllä olevat leikkeet inkuboituvat ravistelijan
avulla (kierrosnopeus 15 rpm). Primäärisenä vasta-aineena, joka sitoutuisi spe-
sifisesti, korkealla affiniteetilla (sitoutumisvahvuus) solujen sisällä olevaan c-
Fosiin toimi Rabbit anti-cFos, ab 190289, Abcam. Sen laimennussuhde estoliu-
okseen nähden oli 1:2000. Se tarkoitti 0,5 µl:n pipetoimista 1 000 µl:n estoliuok-
seen. Pipetoitava määrä on pieni, joten pitäisi yrittää seurata, onnistuiko pipetti
pipetoimaan kyseisen määrän falcon-putkeen. Kun leikkeet oli siirretty vaadittui-
hin koloihin (koloissa vasta-aine + estoliuosta), levyn kansi käärittiin parafilmillä
ja laitettiin foliolla varustettuna kylmähuoneeseen (+4 °C) inkuboitumaan yön yli.
Seuraavana päivänä pesujen jälkeen leikkeet siirrettiin 2 tunniksi sekundääristä
vasta-ainetta sisältäviin koloihin. Sekundäärisenä vasta-aineena toimi Alexa
Fluor® 594 Donkey antirabbit Ig G(H+L) Invitrogen (Eugene, Oregon). Sen lai-
mennussuhde oli työssä 1:500 estoliuokseen nähden, eli sitä lisättiin 1 000 µl:n
liuokseen 2 µl.

Värjäyksen viimeiseen vaiheeseen kuului varovainen leikkeiden asettaminen si-
veltimellä mikroskooppilasille. Tarvittaessa leikettä voi avata siveltimellä vierittä-
misyhteyden jälkeen (yrittämättä olla hajottamatta sitä), jos se on mennyt hie-
man lyttyyn. Leikkeiden annettiin kuivua lasilla valolta suojattuna (noin 25–30
min), minkä jälkeen objektilasille lisättiin 2 tippaa kiinnitysainetta haalistumisen
estämiseksi ja fluoroforin tehokkuuden säilymiseksi, ennen peitinlasin laittoa.

Kiinnitysaine jättää pienen kerrostuman objekti- ja peitinlasin väliin, mikä auttaa pitämään leikkeet pidempään kosteina, että ne eivät kuivuisi.

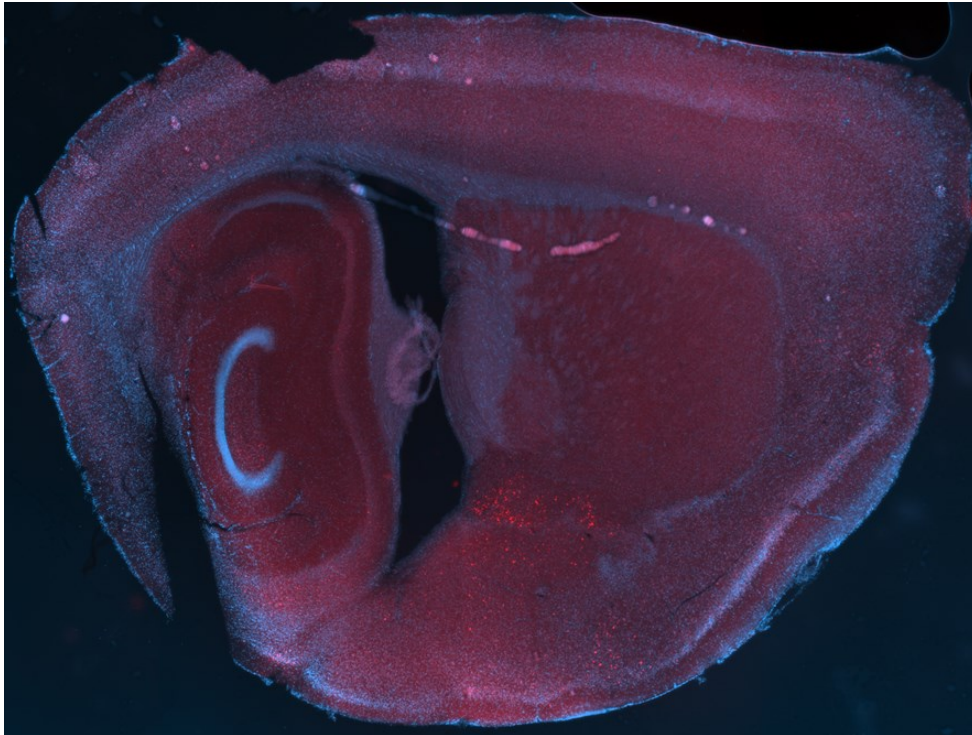
7.6 Mikroskopointi

Mikroskopointi suoritettiin Zeiss Axio Imager -fluoresenssimikroskoopilla. Mikroskooppilasilla oli 5 tai 6 leikettä, ja tehtävänä oli ottaa kaikista leikkeistä yleiskuvan (engl. overview) 5x-suurenoksella ja lisäksi valita 3—4 leikettä, jotka olisivat lähimpänä kerrossyvyydeltään (paksuustasot) sivukoordinaatteja 3,25—2,52 mm. Sen jälkeen, kun nämä leikkeet oli valittu, tarkoituksena oli löytää tietty aivoalue, josta löytyisi eniten värjäytyneitä soluja. Ennen kuvien ottoa oletuksena oli, että eniten c-Fos aktiivisuutta löytyisi suunnilleen amygdalan alueelta, mikä osoittautui oikeaksi, kun leikkeitä tutkittiin ensin okulaarien ja sitten kameran tietokoneelle välittämän kuvaruudun kautta. Mikroskopoinnin aikana löydettiin amygdalan alue halutuista leikkeistä, kohdennettiin kameran tarkennus siihen alueeseen, ja otettiin kuvat 10x-suurenoksella.

Kuvien ottoa varten oli käytettävä mikroskoopin yhteydessä olevaa ZEN pro -ohjelmaa (tietokoneella). Ohjelman avulla voitiin valita tiettyjä tekniikoita, joilla pystyy ottamaan kuvia näytteestä. Ohjelman avaamisen ja mikroskooppilasin asettamisen jälkeen ensimmäiseksi oli asennettava älykäs asetus -toiminnolla (engl. smart set up) ohjelmaan oikeat värikanavat, joita haluaa käyttää fluoresenssikuvantamisessa. Työssä käytettiin AF594- ja DAPI-kanavia, sekundääri vasta-aine fluoresoi noin 594 nanometrin aallonpituudella ja DAPI:n kanava (fluoresoi sinisen värin valon aallonpituuksilla) toi leikkeille sinistä taustaväriä.

Tile-moodin avulla pystyi ottamaan panoraamakuvat leikkeistä. Mikroskoopin yhteydessä olevasta kosketusnäytöstä pystyi asettamaan tarvittavat suodatin/heijastuskuutiot kuvien ottoa varten. Työssä käytin 49 DAPI -suodatinkuutiota ja 64 HE mPlum -kuutiota, joka käy AF 594 -kanavalle. Tuomalla leikkeen live-tilaan, niin että se näkyisi tietokoneen näytöltä, ja painamalla lisäasetukset toimintoa pääsee ottamaan kuvia tile-moodilla. Seuraavaksi oli tehtävä tarkennuskartta, koska mikroskooppilasi ei ollut välttämättä suorassa ja kartan avulla

pystyi rajata alueen ja tässä tapauksessa oli tarkoitus rajata kokonainen leike kerrallaan. Liikuttamalla joystickiä sivuttain/ylös pystyttiin rajata alue niin, että kaikki leikkeen sivut/reunat mahtuisivat kuvaan. Lopuksi tarkenettiin fokusta suunnilleen amygdalan kohdalta ja painettiin, aseta virta -toiminto (koska se alue oli tärkeä). Kun alue on rajattu oikein, otettiin pois päältä live-ohjelma ja Tile- valikosta ennen kuvien ottoa tarkistettiin vaihtoehtoista ja katsottiin esim., että stitching during acquisition -toiminto on päällä. Tarkennusreferenssikanavana toimi DAPI-kanava (tasainen signaali leikkeen alueella). 5x-objektiivin kuvakentässä se tarkoitti leikkeiden kohdalla joko 4 x 3 tai 3 x 3 mosaiikkikuvia (yksittäisiä kuvia tietyistä osista leikettä), joiden perusteella näytölle ilmestyi yksi kuva kokonaisesta leikkeestä (kuva 20).



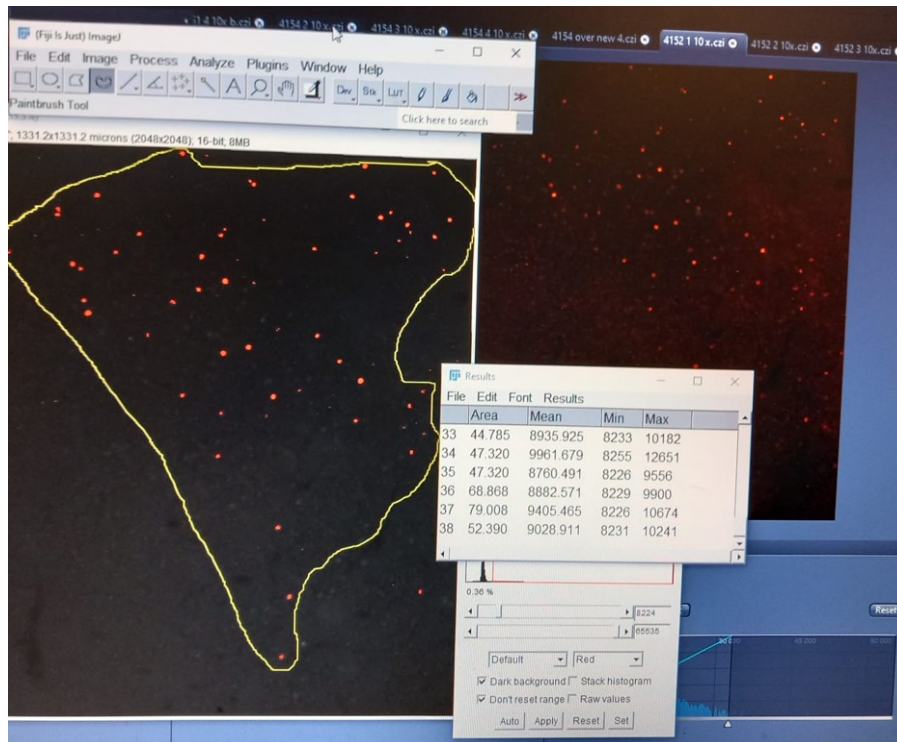
Kuva 20. Panoraamakuva tutkimusaivon leikkeestä. C-Fos-solujen aktiivisuus näkyy varsinkin manteliumakkeen alueella (punaiset pisteet).

Kuvan tiedoista voi esim. nähdä, minkälaisella valotusajalla kuva on otettu. Mikroskooppi kykenee myös automatisoidusti valitsemaan sopivan valotusajan ja jos näyttää siltä, että kuva on selkeä, pystyy jatkossa valitsemaan samat parametrit seuraaviin kuviin, uudelleenkäyttötoiminnon avulla. 10x-suurennoksen

napsahduskuvat otettiin käyttämällä tarkennuskanavana 64 HE-mPlum suodatinkuutiota. Kuvat oli otettu samoilla valotusajoilla ja kuvien ottamiseen käytettiin Zeiss Axio Imager-mikroskoopin Hamamatsu Orca Flash 4.0LT -kameraa.

7.7 Solujen laskenta

Mikroskooppikuvia analysoitiin visuaalisesti ZEN lite 3.1-ohjelmalla kuvien ollessa CZI. tiedostomuodossa (mikroskoopin kuvamuoto) ja sen lisäksi Fiji ImageJ-ohjelman avulla. Molemmilla hiiriryhmillä suurin c-Fosin aktivoituminen tapahtui mantelimumakkeen alueella, jossa näkyi selkeästi eniten värjäytyneitä soluja. Muiden aivoalueiden aktiivisia soluja analysoitiin vain silmämääräisesti leikkien kokonaiskuvista. Mantelimumakkeen alueella olevien aktiivisten solujen määrää yritettiin verrata sekä yleiskuvien että 10x-suurenuskuvien perusteella. Yleiskuvista laskettiin solujen määrä käsin, käyttäen apuna erilaisia zoomauksia ja mm. käyttäen samoja pikselien intensiteettitietoja (histogrammin arvoja, jossa on tietyt parametrit kirkkaan ja tumman signaalin arvoille). 10x-suurenoksen kuvista solumäärien laskuun, käsilaskun lisäksi, käytettiin aputyökaluna ImageJ-analyysiohjelmaa. Ohjelmaa hyödyntävät solujen laskentatyökaluna esim. aivotutkijat omissa tutkimuksissaan (kuvassa 21).



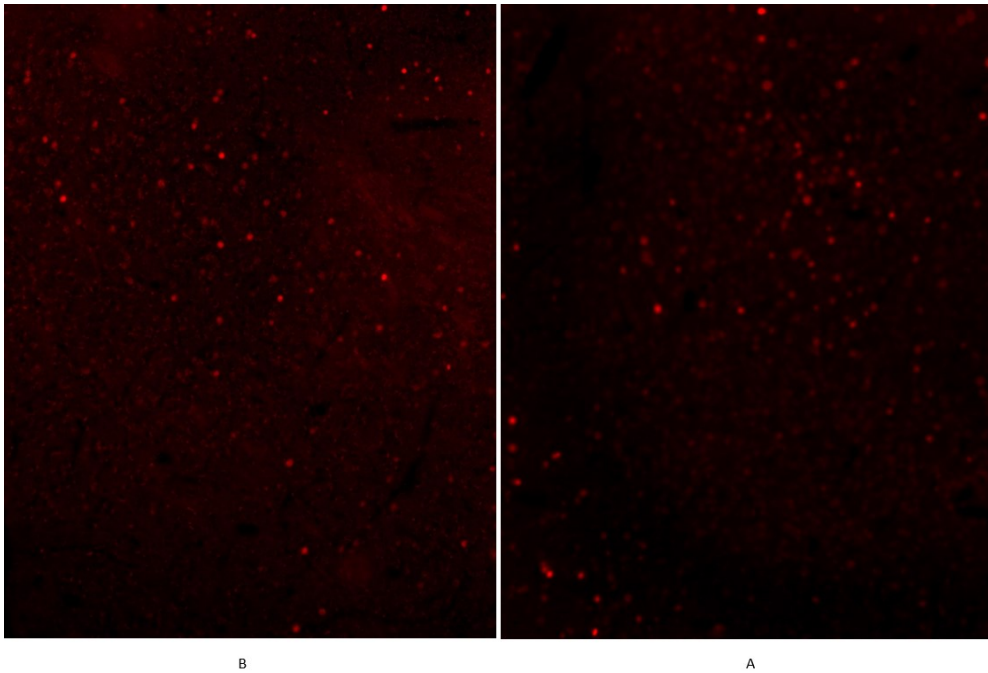
Kuva 21. Solujen laskemista Fiji ImageJ-ohjelman avulla.

Ohjelma pystyy avaamaan kuvan (valitsemalla oikeat asetukset), johon on ennen sitä esim. asennettu tietyt histogrammiarvot ZEN-ohjelmalla. Lisäksi ImageJ:llä pystyy piirtämään ja rajaamaan alueen, josta haluaa laskea solut. Pitää myös asettaa omat kynnsarvot (threshold) ja joissakin laskentamodeissa käytettiin samoja kynnsarvoja, vaikka solumäärä-ei aina vastannutkaan joidenkin leikkeiden kohdalla tarkasti CZI. muodossa olevan kuvan solumäärää. Asettamalla joitain analyysiin liittyviä asetuksia (mm. partikkelien koko), ohjelma analysoi partikkelien määrän ja antaa solujen lukumäärän tulosruudun muodossa. Tutkimuksessa solumäärät laskettiin yhteensä 10 eri tavalla jokaisen aivon 3 leikkeestä (aivojen lkm. 5) ja niistä koottiin dataa ensin Exceliin, ja sieltä eri tavoin laskettuja keskiarvoja verrattiin, kahden hiiriryhmän kesken, GraphPrismPad 9.5.1-ohjelmalla. Ohjelmalla pystyy luomaan tieteellisiä graafeja tai kaavioita tilastollisen datan havainnollistamiseen.

8 Tulokset ja pohdinnat

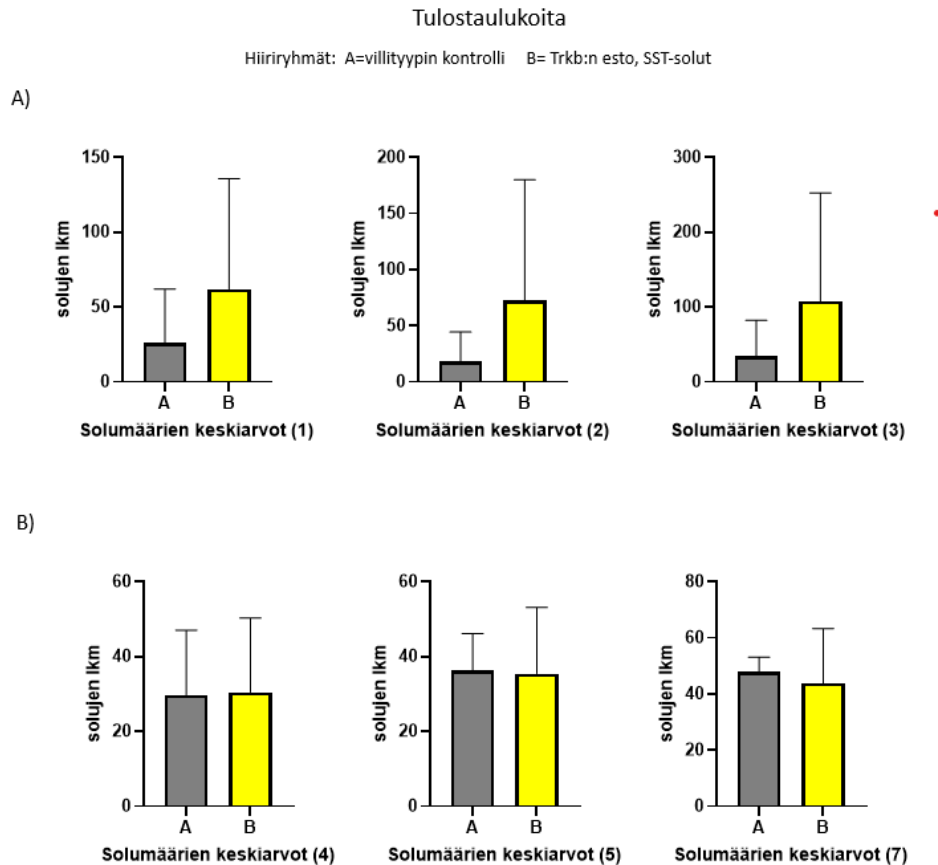
Molemmilla hiiriryhmillä suurin aktiivisuus tapahtui mantelitumakkeen alueella, mikä tukee havaintoja siitä, että se on yksi aivoalueista, missä tapahtuu aktiivisia muutoksia, reaktiona diatsepaamin käytölle. Muilla aivoalueilla solujen aktiivisuus ei ollut yhtä suurta. Joitakin yksittäisiä soluja tai varsin pieniä solukeskitymiä löytyi joistakin molempien hiiriryhmien leikkeistä (mm. aivokuoren alueella), mutta visuaalisesti arvioiden kuvista oli vaikea havaita, että olisi suurta eroa c-Fos-aktiivisuudessa ryhmien välillä.

Mantelitumakkeen alue on aivokomponenttina olennainen tekijä emotionaalisten ärsykkeiden muistimekanismeissa, ja näyttöä siltä, että se reagoi myös eniten diatsepaamin kaltaisten lääkeaineiden käyttöön, ainakin niiden ensimmäisen käytön aikana, jolloin yhdiste vaikuttaa aivotoimintaan sille uutena kokemuksena (fos-geenien aktivoituminen ja c-Fosin synteesi). Molemmilla hiiriryhmillä aktiivisuus alueella vaihteli jonkin verran aivojen ja yksittäisten leikkeiden välillä (kuvassa 22 näkyy hiiriryhmien leikkeitä), ja tätä aktiivisuutta yritettiin vertailla ryhmien kesken, laskemalla soluja eri tavoin.



Kuva 22. Manteliumakkeen alue 10x-suurennoksella (leike B- ja leike A-ryhmästä). Histogrammin arvot antavat tässä näkyville soluille tumman taustan.

Tulokset eivät olleet yksiselitteisiä. Niissä laskentametoodeissa, joissa oli käytetty samoja histogrammi- ja kynnsarvoja kaikille leikkeille, enemmän soluja oli ryhmässä B (poistogeeniset hiiret, kuten alla olevassa kuvassa 23 näkyy).



Erilaisilla laskutavoilla laskettujen solumäärien vertailua kahden hiiriryhmän välillä. (A) Näissä taulukoissa solujen määriä on vertailtu samojen histogrammi- ja kynnsarvojen perusteella. Taulukossa 1 on esim. käsin laskettu 10x kuvista, kun taas taulukoissa 2 ja 3 solumääriä on analysoitu ImageJ:n avulla. B) Taulukoissa 4 ja 5 soluja on laskettu leikkien yleiskuvien perusteella (käyttämällä kahta eri suuruista zoomausta), ja lisäksi taulukossa 5 on myös 10x kuvien keskiarvo mukana. Taulukossa 7 solumäärät on laskettu 10x kuvista ImageJ-ohjelman avulla. Taulukoissa 4,5 ja 7 on käytetty erilaisia histogrammi- ja kynnsarvoja, erilaisille aivoleikkeille.

Kuva 23. C-Fos-aktiivisten solujen määrät hiiriryhmillä A ja B, tilastollisen datan perusteella.

Kun laskentametodina käytettiin erilaisia histogrammi- ja kynnsarvoja (esim. mikroskooppikuvissa Best fit-toimintoa, silloin ohjelma valitsee kullekin leikelle optimoidut intensiteettitiedot automatisoidusti). Solujen määrä oli hieman isompi A-ryhmässä verrattuna B:hen (kuva 23). Ero solujen määrissä ei kuitenkaan ollut kovin suuri, jos vertaa ylempien taulukoiden arvoihin, jossa B-ryhmässä näyttäisi olevan selkeästi enemmän soluja, ollen toisessa tapauksessa-kin melkein samaa luokkaa. Yleiskuvien perusteella lasketut solumäärät olivat

melkein samoja molemmissa ryhmissä, mutta niissäkin oli käytetty erilaisia histogrammien arvoja, mikä saattaa tehdä niistä tuloksista hieman epätarkempia.

Kaikkien taulukoiden perusteella voi tehdä johtopäätöksen, että tällä aivojen kerrospaksuudella, ja ottaen huomioon pienen otannan, vaikuttaisi siltä, että TrkB-reseptorin inaktivoiminen ei ainakaan vähentäisi paljon c-Fosin aktiivisuutta SST-soluissa, uroshiirillä. Fos-geenien aktiivisuus näkyisi säilyvän tai jopa lisääntyvän BDNF:n vaikuttaessa vähemmän plastisuuteen. Tästä voisi seurata, että diatsepaamista kehittyvän toleranssin taustalla voi olla BDNF/TrkB- kompleksin toiminnan lisäksi ehkä muitakin tekijöitä, joita voisi tarkastella ja jotka saattaisivat myös vaikuttaa toleranssin kehittymiseen.

Tutkimuksen tuloksiin saattoi vaikuttaa myös muita epävarmuustekijöitä, pienen tulosjoukon lisäksi. Työntekijän kokemattomuudesta tai huolimattomuudesta johtuvat virheet esim. värjäyksen tai mikroskopoinnin aikana (esim. joissakin mikroskooppikuvissa, manteliumakkeen alue ei ollut aivan kameran fokuksessa). Teoreettisen tiedon omaksuminen joistakin immunohistokemiallisen analyysin laadukkuuteen liittyvistä asioista tutkimuksen edetessä (minkä takia joitakin hyviä neuvoja/tekniikoita ei pystynyt hyödyntämään tasapuolisesti kaikille analysoiduille näyteaivoille/leikkeille saattoi vaikuttaa tulosten luotettavuuteen.

9 Päätelmät

Luotettavampien tulosten saamiseksi on kerättävä enemmän havainnointidataa. Lisäksi on tärkeä tutkia leikkeitä syvimmistä aivojen kerrospaksuuksista (alle 2,52 mm:n paksuuksilta). Niissä leikkeissä saattaisi ero solujen määrissä alkaa näkymään selkeämmin jompaankumpaan suuntaan ja saattaisi ehkä tulla dataa, jonka perusteella c-Fosin aktiivisuus esim. vähenee ehdollisesti tyrmätyillä hiirillä SST-soluissa. Tämä puoltaisi TrkB:n roolia diatsepaamin toleranssin kehityksessä näissä soluissa. C-Fosin tasojen eroja voisi tutkia lisäksi naarashiirillä (tutkimuksessa uroshiiret) ja myös vertailla hiiriryhmien kesken tilanteessa, jossa jotkut hiiret eivät ole saaneet ollenkaan diatsepaamia. Toleranssiin

johtavien tekijöiden löytäminen antaisi mahdollisuuden kehittää diatsepaamin kaltaisia täsmälääkkeitä, joiden avulla potilas pystyisi pidempiä aikoja käyttämään samankokoisia lääkannoksia hoidon aikana.

Tärkeänä asiana on myös tutkia asiaa hyödyntämällä tutkimuksissa muita neuroplastisuusmarkkereita (mm. NCAM, PSA-NCAM, Δ FosB). Näillä markkereilla on oma roolinsa plastisuustekijöinä. Jos diatsepaamin aiheuttaman riippuvuuden tai toleranssin taustalla on plastisuudesta johtuva mukautuminen, niin tutkimalla erilaisia markkereita voidaan tehdä enemmän johtopäätöksiä, kuinka suuri plastisuuden muutos on tapahtunut esim. TrkB-reseptorin tyrmäämisen ansiosta. Erilaisille hermosolujen markkereille on olemassa omia spesifisiä primäärisiä vasta-aineita, joiden avulla pystyy tekemään esim. immunohistokemiallista analyysiä ja tutkimaan mm. mikroskooppikuvista vastaavia solumääriä. Tällaisiin tutkimuksiin valitut hiirilinjat olisivat samoja (kontrolli- ja poistogeeniset hiiret). Hiirten kokemukset saattaisivat olla hieman erilaisia verrattuna c-Fosin analysoimista varten tarkoitettuihin hiiriin (tässä tutkimuksessa), sillä ne perfusoiitiin 2 tuntia diatsepaami-injektion jälkeen, jolloin c-Fosin ilmentyminen on voimakkaimmillaan.

Työssä käytetty värjäysprotokolla ja käytetyt vasta-aineet olivat aika toimivia, ja oli selkeästi tapahtunut primäärisen vasta-aineen ja c-Fosin sitoutumista. Joistakin soluista oli kuitenkin vaikea päätellä, oliko kyseessä c-Fos-värjäytynyt solu vai ei (vaikka solu erottui taustasta). Osittain tämä saattoi johtua siitä, että ennen peitinlasin laittoa lisättiin protokollan mukaan kaksi tippaa kiinnitysainetta, joka sisälsi DAPI:a, mutta tippojen koko jäi aika pieneksi. Siksi monissa leikkeissä ei ollut tapahtunut kunnollista solujen tumien värjäytymistä DAPI:lla, mikä olisi saattanut helpottaa c-Fos-solujen identifioimista. DAPI:n tehtävänä oli antaa leikkeille sinistä taustaväriä. Suosituksena on laittaa jatkossa riittävä määrä kiinnitysainetta mikroskooppilasille mm. seuraamalla, että tippojen koko olisi riittävä tai lisäämällä kolmannen tipan objektilasille. Kun asettaa peitinlasia, pitäisi kiinnittää huomiota siihen, että kiinnitysaine peittäisi varmasti kaikki objektilasilla olevat aivoleikkeet.

Lähteet

- 1 Wafford, Keith A. 2005. GABA_A receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Current Opinion in Pharmacology*. Vol. 5, Issue 1, s. 47—52.
- 2 Allison, C. & Pratt, J. A. 2003. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 98, Issue 2, s. 171—195.
- 3 de Vos, Cato M. H.; Mason, Natasha L. & Kuypers, Kim P.C. 2021. Psychedelics and Neuroplasticity: A Systematic Review Unraveling the Biological Underpinnings of Psychedelics. *Front. Psychiatry, Sec. Psychopathology*. Vol. 12.
- 4 Interneurons. Verkkoaineisto. Physiopedia. <<https://www.physio-pedia.com/Interneurons>>. Luettu 25.9.2023.
- 5 Alves de Medeiros, Magda; Reis, Luis Carlos. & Mello, Luiz Eugênio. 2005. Stress-Induced c-Fos Expression is Differentially Modulated by Dexamethasone, Diazepam, and Imipramine. *Neuropsychopharmacology*. Vol. 30, s. 1246—1256.
- 6 Huopaniemi, Laura; Keist, Ruth; Randolph, Ann; Certa, Ulrich. & Rudolph, Uwe. 2004. Diazepam-induced adaptive plasticity revealed by $\alpha 1$ GABA_A receptor-specific expression profiling. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 88, s. 1059—1067.
- 7 Tompa, Rachel. 2022. Why is the human brain so difficult to understand? We asked 4 neuroscientists. Verkkoaineisto. Allen Institute. <<https://alleninstitute.org/news/why-is-the-human-brain-so-difficult-to-understand-we-asked-4-neuroscientists/>>. Luettu 10.3.2023.
- 8 Lines, Justin; Covelo, Ana; Gomez, Ricardo; Liu, Lan. & Araque, Alfonso. 2017. Synapse-Specific Regulation Revealed at Single Synapses Is Concealed When Recording Multiple Synapses. *Front. Cell. Neurosci. Sec. Cellular Neurophysiology*. Vol. 11.
- 9 Jehkonen, Mervi & Saunamäki, Tiia. Valintakoemateriaalit: Aivojen keskeiset rakenteet kognitiivisissa ja psyykkisissä toiminnoissa. Jyväskylän yliopisto.

- 10 Aivotoiminnan biokemiaa. Verkkoaineisto. HUS. <<https://www.biomag.hus.fi/braincourse/L4.html>>. Luettu 11.3.2023.
- 11 Allen, Mary J.; Sabir, Sarah. & Sharma, Sandeep. GABA Receptor. 2023. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526124>>. Luettu 5.3.2023.
- 12 Ochoa-de la Paz, Lenin D.; Gullias-Cañizo, Rosario; Ruíz-Leyja, Estela D’Abril; Sánchez-Castillo, Hugo. & Parodí, Jorge. 2021. The role of GABA neurotransmitter in the human central nervous system, physiology, and pathophysiology. *Rev. mex. neurocienc.* Vol. 22, no. 2.
- 13 Nutt, David J. & Malizia, Andrea L. 2001. New insights into the role of the GABA_A-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *The British Journal of Psychiatry.* Vol. 179, Issue 5.
- 14 Koulu, Markku & Mervaala, Eero. 2013. *Farmakologia ja toksikologia.* 9. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Medicina Oy.
- 15 Vashcinkina, Elena; Panhelainen, Anne; Aitta-aho, Teemu & Korpi, Esa R. 2014. GABA_A receptor drugs and neuronal plasticity in reward and aversion: focus on the ventral tegmental area. *Front. Pharmacol. Sec. Neuropharmacology.* Vol. 5.
- 16 Lalive, AL.; Rudolph, U.; Lüscher, C. & Tan, KR. 2011. Is there a way to curb benzodiazepine addiction? *Swiss Med Wkly.* Vol. 141, No. 4142.
- 17 Jahn, Reinhard. & Fasshauer, Dirk. 2012. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature.* Vol. 490, s. 201—207.
- 18 Atula, Sari. 2023. *Epilepsia aikuisella.* Verkkoaineisto. Lääkärikirja Duodecim. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00012>> Luettu 23.4.2023.
- 19 Types of neurons. Verkkoaineisto. Queensland Brain Institute. <<https://qbi.uq.edu.au/brain/brain-anatomy/types-neurons>>. Luettu 3.4.2023.
- 20 Rudy, Bernado; Fishell, Gordon; Lee, SooHyun. & Leffler, Jens Hjerling. 2011. Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100 % of Neocortical GABAergic Neurons. *Dev Neurobiol.* Vol. 71, Issue 1, s. 45—61.
- 21 Halabisky, Brian; Shen, Fran; Huguenrad, John R. & Prince, David A. 2006. Electrophysiological Classification of Somatostatin-Positive Interneurons in Mouse Sensorimotor cortex. *Journal of neurophysiology.* Vol. 96, Issue 2.

- 22 Scheyltjens, I. & Arckens, L. 2016. The Current Status of Somatostatin-Interneurons in Inhibitory Control of Brain Function and Plasticity. *Neural Plasticity*. Vol. 2016.
- 23 Foqaca, Manoela V. & Duman, Ronald S. 2019. Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions. *Front. Cell. Neurosci, Sec. Cellular Neurophysiology*. Vol. 13.
- 24 Calcaterra, Nicholas E. & Barrow, James C. 2014. Classics in Chemical Neuroscience: Diazepam (Valium). *ACS Chem Neurosci*. Vol. 5, Issue 4, s. 253—260.
- 25 Diazepam. 2022. Dhaliwal, Jaberpreet S; Rosani, Alan & Saadabadi, Abdolreza. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537022/#:~:text=When%20administered%20intravenously%2C%20diazepam%20has,of%20more%20than%2012%20hours>>. Päivitetty 3.9.2022. Luettu 5.9.2023.
- 26 Riss, J.; Cloyd, J.; Gates, J. & Collins, S. 2008. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurologica Scandinavica*. Vol. 118, Issue 2, s. 69—86.
- 27 Nuss, P. & Gauthier, I. 2015. Neuropsychiatric Disease and Treatment Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. Vol. 2015, Issue 11, s. 165—175.
- 28 Longone, P.; Impagnatiello, F.; Guidotti, A. & Costa, E. 1996. Reversible Modification of GABA_A Receptor Subunit mRNA Expression During Tolerance to Diazepam-induced Cognition Dysfunction. *Neuropharmacology*. Vol. 35, Issues 9—10, s. 1465—1473.
- 29 Bateson, A. N. 2002. Basic Pharmacologic Mechanisms Involved in Benzodiazepine Tolerance and Withdrawal. *Current Pharmaceutical Design*. Vol. 8, Issue 1, s. 5—21.
- 30 Vinckers, Christiaan H. & Berend, Olivier. 2012. Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA_A Receptor Modulators? Special issue. *Receptor Subtypes: Novel Targets for Novel Medicines. Advanced in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 2012.
- 31 Phosphorylation. Verkkoaineisto. ThermoFisher. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html>> Luettu 24.5.2023.

- 32 Guy-Evans, Olivia. 2023. An Easy Guide To Neuron Anatomy With Diagrams. Verkkoaineisto. <<https://www.simplypsychology.org/neuron.html>>. Päivitetty 26.10.2023. Luettu 28.10.2023.
- 33 Jovanovic, Jasmina N.; Thomas, Philip; Kittler, Josef T.; Smart, Trevor G. & Moss, Stephen J. 2004. Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Fast Synaptic Inhibition by Regulating GABA_A Receptor Phosphorylation, Activity, and Cell-Surface Stability. *Journal of Neuroscience*. Vol. 24, Issue 2, s. 522—530.
- 34 Citri, Ami. & Malenka, Robert C. 2007. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. Vol. 33, s. 18—41.
- 35 Eagleman, David. 2007. 10 Unsolved Mysteries Of The Brain. Verkkoaineisto. Discovermagazine. <<https://www.discovermagazine.com/mind/10-unsolved-mysteries-of-the-brain>>. Päivitetty 12.5.2023. Luettu 3.6.2023.
- 36 Gulyaeva, Natalia. 2017. Molecular Mechanisms of Neuroplasticity: An Expanding Universe. *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology. Biochemistry (Moscow)*. Vol. 82, No. 3, s. 237—242.
- 37 Brigadski, Tanja. & Leßmann, Volkmar. 2020. The physiology of regulated BDNF release. *Cell Tissue Res*. Vol. 382, Issue 1, s. 15—45.
- 38 Kauer, Julie A. & Malenka, Robert C. 2007. Synaptic plasticity and addiction. *Nat. Rev. Neurosci*. Vol. 8, s. 844—858.
- 39 Cattaneo, A.; Cattane, N.; Begni, V.; Pariante, C.M. & Riva, N.A. 2016. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Translational Psychiatry*. Vol. 6, Issue 11.
- 40 Mou, L.; Heldt, S. A. & Resler, K.I. 2011. Rapid brain-derived neurotrophic factor-dependent sequestration of amygdala and hippocampal GABA_A receptors via different tyrosine receptor kinase B-mediated phosphorylation pathways. *Neuroscience*. Vol. 176, s. 72—85.
- 41 Licata, Stephanie C.; Shinday, Nina M.; Huizenga, Megan N.; Darnell, Shayna B.; Sangrey, Gavin R.; Rudolph, Uwe.; Rowlett, James K. & Sadri-Vakilil, Ghanzaleh. 2013. Alterations in Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Mouse Hippocampus Following Acute but Not Repeated Benzodiazepine Treatment. *PloS One*. Vol. 8, Issue 12.
- 42 Binder, Devin K. & Scharfman, Helen E. 2004. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*. Vol. 22 s.123—131.

- 43 Meiss, Susanne; Endres, Thomas; Munsch, Thomas. & Lessmann, Volkmar. 2019. Impact of Chronic BDNF Depletion on GABAergic Synaptic Transmission in the Lateral Amygdala. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 20, Issue 17.
- 44 Bell-Horner, Cathy L.; Dohi, Quynh Ngyen; Dillon, Glenn H. & Singh, Me-haryan .2006. ERK/MAPK Pathway Regulates GABA_A Receptors. November 2006. Department of Pharmacology and Neuroscience, University of North Texas Health Science. *Journal of Neurobiology*. Vol. 66, Issue 13, s. 1467—1474.
- 45 Binder, Devin K.; Croll, Susan D.; Gall, Christine M. & Scharfman, Helen E. 2001. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends in Neuroscineces*. Vol. 24, Issue 1, s. 47—53.
- 46 Structural Basis of the Regulation of Cell Adhesion in Brain Development and Disease. 2005. Verkkoaineisto. ESRF. <<https://www.esrf.fr/User-sAndScience/Publications/Highlights/2005/SCM/SCM4>>. Luettu 2.6.2023.
- 47 Muller, E.; Wang, C.; Skibo, G.; Cremer, H.; Calaora, V.; Rougon, G. & Kiss, J. Z. 1996. PSA–NCAM Is Required for Activity-Induced Synaptic Plasticity. *Neuron*. Vol. 17, Issue 3, s. 413—422.
- 48 Cerdá, Héctor. 2019. Induction of neuronal plasticity during adulthood. role of cortical interneurons and plasticity-related molecule. PhD Program in Neurosciences. University of Valencia.
- 49 Nestler, Eric J.; Barrot, Michel. & Self, David. 2001. Δ FosB: A sustained molecular switch for addiction. *PNAS*. Vol.98, Issue 20, s. 11042—11046.
- 50 TrkB: Docking for Neurotrophins and Beyond. 2012. Verkkoaineisto. Novusbio.<<https://www.novusbio.com/antibodnews/antibodies/trkb-docking-for-neurotrophins-and-beyond>>Luettu 13.5.2023.
- 51 Malenka, Robert C. & Bear, Mark F. 2004. LTP and LTD. *Cell Press*. Vol. 44, Issue 1, s. 5—21.
- 52 Chaudhuri, A.; Zangenehpour, Shahin; Rahbar-Dehgan.; F. & Ye, Fengchun. 2000. Molecular maps of neural activity and qui-escence. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. Vol. 60, Issue 3, s. 403—410.
- 53 Improve your c-Fos Experiment with the Monoclonal Recombinant Rabbit anti-c-Fos Antibody 226 008. Verkkoaineisto. SYSY. <<https://www.sysy.com/resources/featured-product/recombinant-rabbit-c-fos-antibody>>. Luettu 4.8.2023.

- 54 Filipkovski, Robert Kuba; Knapska, Ewelina. & Kaczmarek, Leszek. 2006. c-Fos and Zif268 in Learning and Memory—Studies on Expression and Function. Springer Science+Business Media, LLC. Nencki Institute, Warsaw, Poland.
- 55 How to Prepare your Specimen for Immunofluorescence Microscopy. 2022. Verkkoaineisto. Leica microsystems. <<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/how-to-prepare-specimen-for-immunofluorescence-microscopy/>>. Luettu 13.8.2023.
- 56 Detection and amplification systems. Verkkoaineisto. abcam. <<https://www.abcam.com/en-fi/technical-resources/guides/ihc/detection-and-amplification-systems#chromogenicdetectioninihc>>. Luettu 15.8.2023.
- 57 How to choose and use antibodies. Verkkoaineisto. abcam. <<https://www.abcam.com/en-fi/technical-resources/guides/antibody-basics/how-to-choose-and-use-antibodies>>. Luettu 15.8.2023.
- 58 Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals. Oppimateriaali. University of California.
- 59 Fluorophores for Confocal Microscopy. Verkkoaineisto. Olympus lifescience.< <https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/primer/techniques/confocal/fluorophoresintro/>> Luettu 16.8.2023.
- 60 Lichtman, Jeff. & Conchello, Jose Angel. 2006. Fluorescence Microscopy. Nature Methods. Vol. 2, Issue 12, s. 910—919.
- 61 Hansson, Göran K. 2007. Gene Modification in Mice. The Nobel Prize in Physiology or Medicine. Advanced information.
- 62 Song, Chang-geng.; Kang, Xin.; Yang, Fang.; qing Du, Wan.; Zhang, Jia-jia.; Liu, Long.; Kang, Jun-jun.; Jia, Ning.; Yue, Hui.; Fan, Lu-yu.; Wu, Sheng-xi.; Jiang, Wen. & Gao, Fang. 2020. Endocannabinoid system in the neurodevelopment of GABAergic interneurons: implications for neurological and psychiatric disorders. Reviews in the Neurosciences. Vol. 32, Issue 8.
- 63 Structure & Deep Data of Diazepam (C₁₆H₁₃N₂O). Identification of Diazepam Chemical Compound. Verkkoaineisto. Chemical compounds deep data source. <<https://www.molinstincts.com/structure/Diazepam-cstr-CT1001220865.html>>. Luettu 23.9.2023.
- 64 Kowian´ski, Przemysław.; Lietzau, Grazyna.; Czuba, Ewelina. & Was´kow, Monika. 2017. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain

Signaling and Synaptic Plasticity. Cellular and Molecular Neurobiology. Vol. 38, s. 579—593.

- 65 Grigoriadis, Agamemon E.; Wang, Zhao-Qi. & Wagner, Erwin F .1993. c-fos Oncogene Expression In Cartilage And Bone Tissues Of Transgenic And Chimeric Mice. Cellular and Molecular Biology of Bone. s. 497—537.
- 66 12th Microbiology: Chapter 2 : Microscopy. Fluorescence Microscope. Verkkoaineisto. Brainkart. < https://www.brainkart.com/article/Fluorescence-Microscope_40957/ >. Luettu 23.8.2023.
- 67 Panhelainen, Anne E. & Korpi, Esa R. 2012. Evidence for a role of inhibition of orexinergic neurons in the anxiolytic and sedative effects of diazepam: A c-Fos study. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. Vol. 101, Issue 1, s. 115—124.

C-Fos staining protocol (fluorescent Alexa 594)

First day

- 1) 1x 5 min PBS wash and 2 x 5 min PBS-T wash (6 well plate→ the brain sections).
- 2) Blocking solution (the components are added to the falcon-tube)
If prepared 1000 µl solution, add:
300 µl BSA (3 %)
100 µl Donkey serum (10 %)
600 µl PBS-T
- 3) Add 500 µl blocking solution in one well (use 24- well plate) and put all sections of one brain into same well.
- 4) Incubate them 1 h in RT (RT=Room Temperature)
- 5) Add 0,50 µl of primary antibody per 1000 µl blocking solution (1:2000 rabbit anti-cFos ab 190289, Abcam), if prepared 2000 µl solution, add 1 µl primary antibody (blocking solution + antibody is pipetted into the falcon tube).
- 6) Is pipetted 500 µl (Blocking solution + primary antibody) in empty well (use 24-well plate) and let's move all the brain slices into that well.
- 7) Incubate them 24 h (+4°C). If sections contain light-sensitive molecules, wrap the disc with foil.

Second day

- 1) 3 x 10 min PBS-T wash (6 well plate)
- 2) Blocking solution 1 ml (1 ml=1000 µl)
0,3 ml BSA
0,1 ml Donkey serum
0,6 ml PBS-T
- 3) Is Pipetting 1 µl secondary antibody into a Falcon tube, if preparing 1000 µl blocking solution (1:500 Alexa Fluor® 594 Donkey antirabbit Ig G(H+L) Invitrogen. Add 500 µl of this solution are pipetted into the well, and then let's put brain sections into that well.

- 4) Incubate 2 h in RT (Note protect from light!)
- 5) 2 x 10 min PBS-T wash (6 well plate)
1 x 10 min PBS wash
- 6) Mounting section for the microscope slide. (Mounting media: Vectashield® Antifade Mounting Medium With DAPI, Burlingame, USA)

