



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Ville Talikka

# Morfiinin vaikutus hiirien cFos-eritykseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja Kemiantekniiikka

Insinööriyö

22.10.2018

Tekijä Otsikko	Ville Talikka Morfiinin vaikutus hiirien cFos-eritykseen
Sivumäärä Aika	19 sivua + 0 liitettä 22.10.2018
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	Kemiantekniikka
Ohjaajat	Dosentti Teemu Aitta-Aho Lehtori Carola Fortelius
<p>Tämän insinöörityön tavoite oli selvittää kuinka morfiini vaikuttaa aivojen eri alueissa ja cFos-geenin eritykseen. Joissain koe-eläimissä morfiinin käyttö lisää aktiivisuutta, kun toisissa eläimissä se luo lamaantumisen. Tutkimuksen tiedolla on tarkoitus syventää tietoa, kuinka opiaattien käyttö vaikuttaa käytökseen ja kuinka se näkyy aivoissa. Työ suoritettiin Farmakologian osastolla Helsingin yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa.</p> <p>Lopputuloksena työssä havaittiin vaikutuksia kahdella aivo-alueella: makaavassa tumakkeessa ja hypotalamuksessa. Vaikutus näkyy alueilla, jotka säätelevät mm. ruokahalua sekä tunnetiloja, ja vahvin vaikutus näkyy dopamiinikeskuksessa.</p> <p>Jatkotoimenpiteenä suorittaa kokeita kroonisen käytön vaikutuksesta cFos-geenin eritykseen ja miten käyttö vaikuttaa eläimen käytökseen ja ruokahaluun. Aivoleikkeitä jäi myös ylimäärin, joten tutkimuksessa käytettyjen koe-eläinten näytteille voitaisiin suorittaa lisää kuva-analyysejä.</p>	
Avainsanat	cFos, immunohistokemia, aivot, addiktio, morfiini, opiaatti

Author Title	Ville Talikka The effects of morphine in mice cFos-expression.
Number of Pages Date	19 pages + 0 appendices 22 october 2018
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio- and Chemical Engineering
Professional Major	Chemical Engineering
Instructors	Teemu Aitta-Aho, Professor Carola Fortelius Senior Lecturer
<p>The goal of this bachelor's thesis is to find how morphine consumption affects different areas in the brain and how it affects the production of cFos-gene. In some test animals' morphine usage increases activity while in others it creates a stagnating effect. The purpose of the information in this thesis is to deepen the knowledge of opiate usage affecting behavior and how it can be seen in the brain. The mentor for this Bachelor's thesis was Teemu Aitta-Aho, and the experiments were done in the Department of Pharmacology, which is part of the Faculty of Medicine of the University of Helsinki.</p> <p>The results of the thesis indicated effects of morphine consumption in two areas of the brain, in hypothalamus and <i>nucleus accumbens</i>. These effects can be seen in areas that control mental states such as hunger and emotions. The strongest effect was found in the dopamine center.</p> <p>As follow-up research, experiments about the effect of chronic use on the production of cFos-gene and the effects on behavior and appetite could be conducted. Many brain slices remained unused; thus, further analysis could be performed on the test animals used in this thesis.</p>	
Keywords	cFos, immunohistochemistry, brains, addiction, morphine, opiate

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	1
2.1	Hermoston tehtävät	1
2.1.1	Aivojen hermoston rakenne ja toiminta	2
2.1.2	Keskiaivon tehtävät	2
2.2	Morfiini ja muut opioidit	3
2.3	cFos-proteiini hermosolun aktiivisuuden markkerina	3
2.4	Addiktion vaikutus cFos-proteiinin tuottoon	3
2.5	Tal1-transkriptiotekijä	4
2.6	Työssä käytetyt tutkimusmenetelmät	4
2.6.1	Vasta-aineväryäys (immunohistokemia)	4
2.6.2	Fluoresenssi-mikroskopia	5
2.6.3	Kuva-analyysi tietokoneella	5
3	Materiaalit ja menetelmät	6
3.1	Kokeellinen osa	6
3.2	Hiirien morfiinikäsittely	6
3.2.1	Näytteiden esikäsittely	6
3.2.2	Näytteiden leikkaus	7
3.3	Vasta-aineväryäys	8
3.4	Vasta-aineen optimointi	9
3.5	Mikroskopointi	9
3.6	Solujen analyysi	10
4	Tulokset	11
5	Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset	18
6	Yhteenveto	18
	Lähteet	19

## Lyhenteet

cFos      Aktivointimarkkeri

PBS      Fosfaattipuskuroitu salini

PFA      Paraformialdehydi 4-prosenttinen-liuos PBS:ssä

GABA      Gamma-aminovoihappo

BSA      Bovine serum albumin, proteiinikonsentraatti, joka on johdettu lehmästä

## 1 Johdanto

Opiaatteja ja morfiinia käytetään hyvin paljon lääkkeenä. Ehkä tunnetuin opiaatti on morfiini, jota on jo vuosia käytetty kipulääkkeenä, mutta myös väärinkäytetty huumausaineena. Nautittuna morfiini vähentää kipua ja aiheuttaa käyttäjälleen euforian tunteen. Runsas morfiinin käyttö kasvattaa toleranssia aineelle, samalla lisäten psykologisen riippuvuuden efektejä. Tämän takia esimerkiksi lääkekäytössä morfiinin annosta aletaan pienentämään vieroitushoidon muodossa sen sijaan, että lääkintä lopetetaan kerralla.

Tämän insinööriyön tavoite oli selvittää kuinka morfiini vaikuttaa aivojen eri alueissa ja cFos-geenin eritykseen. Joissain koe-eläimissä morfiinin käyttö lisää aktiivisuutta, kun toisissa eläimissä se luo lamaantumisen. Tutkimuksen tiedolla on tarkoitus syventää tietoa, kuinka opiaattien käyttö vaikuttaa käytökseen ja kuinka se näkyy aivoissa. Työ suoritettiin Farmakologian osastolla Helsingin yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa.

## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Hermoston tehtävät

Ihmisen hermosto koostuu kolmesta osasta: aivoista, selkäytimestä ja ääreishermostosta. Keskushermosto vastaa ihmisen toiminnassa kaikessa kuten käytöksessä, muistissa, aisteissa sekä liikkeessä. Koko hermosto kattaa kaiken hermokudoksen ihmiskehossa, kyseinen hermokudos kantaa informaatiota kehon osien välillä. Koordinaatio tapahtuu selkäytimen ja aivojen välillä, ja nämä yhdessä muodostavat keskushermoston. Informaatio eli impulssit kulkevat hermojen välillä kanavaa pitkin, jota kutsutaan synapsiksi. Synapsi kommunikoi toisen vastaanottavan solun kanssa. Synapsin ja solun välillä on pieni väli, joka luo viivettä signaalin lähetyksen ja vastaanoton välille. Synapsissa sähköinen signaali muuttuu kemialliseksi ja sitten taas sähköiseksi. [1;2;3.]

### 2.1.1 Aivojen hermoston rakenne ja toiminta



Kuva 1. Eri osien sijainti aivoissa. [4.]

Täysikasvuisen aivot sisältävät noin  $10^{11}$  hermosolua tai neuronia. Kuten kuva 1 havainnollistaa, aivot on jaettu kuuteen eri osaan: isot aivot, väliaivot, pikkuaivot, keskiaivot, aivosilta ja ydinjatke. Isot aivot muodostavat suurimman osan aivoista ja ne säätelevät mm. motoriikkaa ja mielialaa. Isot aivot vastaavat myös aisteista ja puheen muodostamisesta. Väliaivot toimivat aistinimpulssien välityskeskukseksi. Väliaivot vastaavat myös vuorokausirytmistä, syömisestä, juomisesta ja ruumiin lämpötilasta. Pikkuaivot vastaavat asennoista ja lihaksista. Keskiaivot toimivat kuulon ja talamuksen signaalien välittäjänä. Aivosilta toimii myös signaalien välittäjänä. Tämän lisäksi aivosilta hallitsee hengitystä ja sen rytmiä. Ydinjatke hallitsee myös osaa hengitystä mutta myös sydäntä ja verenkiertoa. [1;2.]

### 2.1.2 Keskiaivon tehtävät

Keskiaivot toimivat kuulon ja talamuksen signaalien välittäjänä. Keskiaivoissa sijaitsee myös monia refleksikeskuksia sekä keskuksia, jotka kontrolloivat silmiä ja päätä stimulaatioon reagoiessa. Keskiaivon muita tehtäviä on mm. palkkion tunteminen, liikkeiden muodostus, uni, näkö, kuulo, lämmön hallinta ja kiihottuminen. [2.]

## 2.2 Morfiini ja muut opioidit

Morfiini on opioidi, jota käytetään kipulääkkeenä sairaaloissa. Morfiini valmistetaan joko syntetisoimalla tai unikkokasvista. Morfiinilla voi lääkittää kroonista kipua tai akuuttia kipua. Morfiinin muita vaikutuksia ovat mm. ruokahalun väheneminen, eroottisten halujen väheneminen, hengityslama, ummetus, pupillien pieneneminen, ahdistuksen väheneminen ja rauhoittava vaikutus isoilla annoksilla. Morfiini vaikuttaa suoraan keskushermostossa. Morfiinilla kuten muillakin opioideilla on addiktoiva vaikutus, joka aiheuttaa fyysisiä ja psyykkisiä oireita. Morfiinin jatkuva käyttö myös lisää vastustuskykyä aineen vaikutukselle, joten kroonisten käyttäjien tulee nauttia aina suurempia annoksia. Vieroitusoireisiin kuuluu mm. ahdistusta, rauhattomuutta, yliherkkyttä, hengityksen lisääntymistä ja värinää. [5;6.]

## 2.3 cFos-proteiini hermosolun aktiivisuuden markkerina

cFos on proteiini, jota erittyy aivoissa stimuloinnin aikana. Tämän takia se on erinomainen kartoittamaan hermojen aktiivisuutta aivoissa. cFos-geeni löydettiin 1980-luvun alussa, jonka jälkeen sitä on käytetty hyvin paljon hermosolujen tutkimuksessa. cFos-geeni on myös oivallinen markkeri, sillä sen määrä on hyvin pieni tilassa, jossa ei ole stimulaatiota, joten se on lähes täydellinen kvantitatiivisessa arvioinnissa. Muutosten alueilla geenin erityis kasvaa, kun samaan aikaan muuttumattomilla alueilla erityis ei muutu tai on nolla. cFos-geenin ainoa rajoite on sen puoliintumisaika 90–100 min, joten geenien määrään voi vaikuttaa mahdollinen inhimillinen hitaus näytteiden keräysvaiheessa. [7.]

## 2.4 Addiktion vaikutus cFos-proteiinin tuottoon

Marokossa on tehty tutkimus [8], jossa on testattu ohentimien höyryjen inhalaation vaikutusta aivojen cFos-tuotantoon. Kokeessa hiiret jaettiin kolmeen eri ryhmään akuuttiin, sub-kroonisiin ja kroonisiin käyttäjiin. Akuutit hiiret pääsivät testeihin 24 tunnin päästä inhalaatiosta, sub-krooniset pääsivät kuuden viikon käytön jälkeen ja krooniset



pääsivät 12 viikon käytön jälkeen. Hiiret hengittivät ohentimia joiden konsentraatiot olivat 300 ja 600 ppm. Tutkimuksen tuloksien mukaan kroonisten ja sub-kroonisten koe-eläimien aivoissa erittyi huomattavasti enemmän cFos-proteiinia verrattuna koe-eläimiin, jotka olivat vain akuutissa käytössä. [8.]

## 2.5 Tal1-transkriptiotekijä

Tal1 (T-solujen akuutti lymfosyyttinen leukemiaproteiini 1) säätelee inhibitorisia ja stimuloivia neuroneja aivoissa. Tal1-transkriptorit lisäävät GABA:n määrää ja hiljentävät glutamaattien toimintaa. GABA on aivojen välittäjäaine, joka toimii inhibiittorina ja vaimentaa tai vähentää aivojen toimintaa käskemällä hermosoluja. GABA:n voidaan siis sanoa olevan aivojen jarruttaja-aine. Jossain neuroneissa GABA:n vaikutus voi olla päinvastainen. Näiden monoamiidien vajaatoiminta on liitetty skitsofreniaan, addiktioon, masennukseen ja Parkinsonin tautiin. [9.]

## 2.6 Työssä käytetyt tutkimusmenetelmät

### 2.6.1 Vasta-ainevärjäys (immunohistokemia)

Immunohistokemia on metodi, jolla voidaan tunnistaa tiettyjä antigeenejä (proteiini tai aminohappoyhdisteitä) parafiinifiksatus kudoksesta tai soluista. Yleisimmin immunohistokemiaa käytetään kasvainten luokitukseen lääketieteessä. Tämän lisäksi sillä voidaan mm. värjätä ja tutkia aivoleikkeitä. Immunohistokemiassa markkereina toimivat primääri- ja sekundääri vasta-aine, jotka ovat yleensä fluorosoivia ja heijastavat valoa kirkkaasti mikroskoopin alla. Markkerit voivat toimia joko spesifisti tai epäspesifisti ja yleensä värjäyksessä pyritään mahdollisimman spesifiin värjäykseen (esim. aivoissa värjäytyvät kirkkaasti vain aktivoituneet solut). Värjäyksen onnistumiseen vaikuttaa hyvin paljon inhimilliset tekijät, sillä se on monivaiheinen prosessi. Vasta-aineita valitessa on otettava huomioon, mitä ollaan värjäämässä ja mistä eläimestä. Yleensä kannattaa valita markkinoilla pidempään ollut vasta-aine, sillä siitä on yleensä enemmän käytännön ohjeita saatavilla verrattuna uudempaan juuri markkinoille tulleetseen. [10.]

### 2.6.2 Fluoresenssi-mikroskopia

Fluoresenssi-mikroskopia on avain työkalu solujen tutkimisessa, sillä se mahdollistaa spesifien lipidien, proteiinien tai ionien havainnollistamiseen. Fluorosoidut solut absorboivat valon energiaa (fotoneita) ja emittoivat sen ulos heikompana signaalina (energiahävikki), emittoituneen valon vahvuus riippuu alkuperäisen valon aallonpituudesta. Moderneilla mikroskoopeilla onnistuu myös tietokoneavusteinen kuvaus ja itse mikroskoopin ohjaus. Mikroskoopilla on mahdollista ottaa kuvasarjoja isoja alueita kuvattaessa. Tämä mahdollistaa kuvauksen automatisoinnin ja monen näytteen kuvaamisen kerralla. Kuvaamisen nopeus riippuu kameran valotusajasta ja kuvattavan alueen koosta. Isosta kuvasta on helppo rajata tutkittava alue jälkepäin kuvankäsittelyllä, sillä jokainen pienempi kuva isossa sarjassa omaa saman kuvan resoluution. Kuvan laatuun vaikuttaa kameran resoluutio sekä mikroskoopin tarkennuksen taso, yleensä soluja laskettaessa riittää 5- tai 10-kertainen tarkennus. [11.]

### 2.6.3 Kuva-analyysi tietokoneella

Solujen laskeminen tietokoneella on tärkeä prosessi, sillä se nopeuttaa huomattavasti solujen laskemista verrattuna tavalliseen ns. silmämääräiseen klikkeri-laskemiseen. Analyysin tarkkuus ei kärsi siirryttäessä silmämääräisestä laskemisesta tietokoneavusteiseen laskemiseen. Erityisesti tietokoneavusteinen lasku nopeuttaa prosessia, jos laskettavien solujen määrä on sadoissa tai tuhansissa. Tunnetuin solujen laskemiseen käytetty ohjelma on ImageJ tai sen paranneltu versio Fiji (lyh. Fiji is just ImageJ), molemmat ohjelmat ovat Java-pohjaisia avoimen lähetekoodin ohjelmia. Kuvat voidaan analysoida suoraan kuvasta tai prosessoimalla kuvat mustavalkoisiksi. Kuvasta algoritmi löytää automaattisesti solut ja laskee niiden määrän ja tarvittaessa myös pinta-alan. Jos kuvassa sattuu olemaan kohinaa sen voi eliminoida säätämällä joko kuvan raja-arvoja tai asettamalla solulle minimikoko pikseleissä. [12.]

### 3 Materiaalit ja menetelmät

#### 3.1 Kokeellinen osa

Aivonäytteiden prosessointi on monivaiheinen työ. Ennen kuin leikkeet voidaan analysoida, on aivot prosessoitava, leikattava ja värjättävä.

#### 3.2 Hiirien morfiinikäsittely

Hiirille annosteltiin morfiinia (Yliopiston apteekki) 20 mg/kg vatsakalvon onteloon ja osalle hiiristä annosteltiin saliinia. Koe-eläimiä oli yhteensä 20 kpl. Kahden tunnin kuluttua hiiret nukutettiin, leikattiin ja aivot perfusoiittiin. Hiiren leikkaus aloitetaan nukuttamalla hiiri ja anestesian vaivuttua hiiri kiinnitetään alustaan. Eläimen rinta avataan ja sydämen vasempaan kammioon asennettiin liuospumpun neula. Samalla sydämen oikeaan kammioon tehtiin viilto, josta veri pääsee ulos. Viiltojen jälkeen pumppu laitettiin päälle ja veri poistui suonistosta. Tämä tappoi hiiren. Veren poistuttua hiireen alettiin pumppaamaan PFA:ta (paraformaldehydi) joka jähmettää kudokset ja ns. "fiksaa" hiiren jähmeäksi. Fiksauksen jälkeen hiiren pää irrotettiin ja päänahka poistettiin, jolloin hiiren kallo tuli esille. Kalloon tehtiin saksilla viilto silmien väliin ja molemmille sivuille, jolloin kallon yläosa irtosi ja aivoihin pääsi käsiksi. Tämän suoritti dosentti Teemu Aitta-Aho.

##### 3.2.1 Näytteiden esikäsittely

Aivot perfusoiittiin PBS:llä (fosfaattipuskuroitu saliini) ja paraformaldehydillä (4-prosenttinen liuos PBS:ssä, Fisher Scientific). Tämän jälkeen aivot pidettiin samassa paraformaldehydiliuoksessa yön yli. Sitten paraformaldehydiliuos korvattiin 30%:lla sukroosiliuoksella (Fisher Scientific) pakastussuojauksen vuoksi. Aivot olivat sukroosissa, kunnes ne vajosivat pohjaan. Tämän jälkeen aivot pakastettiin -20 °C:seen odottamaan leikkausta. Tämän työn osion suoritti Teemu Aitta-Aho.

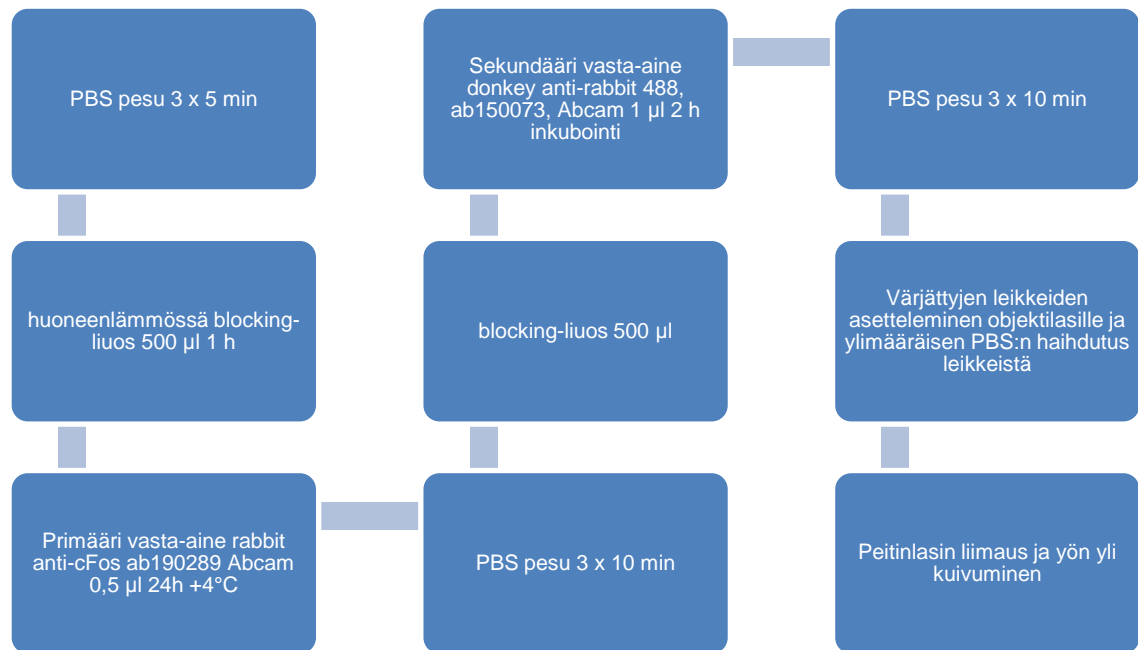
### 3.2.2 Näytteiden leikkaus

Värjäystä varten näytteet on leikattava 40µm:n paksuisiksi kryostaatilla. Näytteet leikataan pakastettuina ja kryostaatin lämpötila on -20 °C:seen. Aluksi aivot asetettiin jalustalle TissueTEK:illä (valmistaja: Sakura) joka on huoneenlämmössä nestemäistä mutta jähmettyy kylmissä lämpötiloissa kovaksi. Jalusta asetettiin kryostaattiin kiinni, minkä jälkeen leikkaaminen aloitettiin. Aivoista jäi leikkaamatta etuaivot ja aivon takaosa. Näytteet kerättiin järjestyksessä vasemmalta oikealle 4 x 6-kokoiselle kuoppalevyille. Näin jokaiseen kuoppaan tulee eri osia aivoista eivätkä kaikki aivon osat täten keskity yhteen kuoppaan. Kuoppalevyn kuopat on täytetty etyleeniglykolista ja sukroosista valmistettuun jäätymisenesto-nesteeseen. Valmiit kuoppalevyt sinetöitiin parafilmillä ja säilöttiin pakastimeen -20 °C:seen.



Kuva 2. Kryostaatti näytteiden leikkaukseen. Leica CM3000

### 3.3 Vasta-ainevärjäys



Kuva 3. Vuokaavio vasta-ainevärjäyksen prosessin vaiheista. Vuokaavio sisältää ainemäärät, pesuajat sekä inkubaation ajat.

Vasta-ainevärjäys oli kaksi päivää kestävä prosessi, jossa leikkeet pestään, värjätään ja lopuksi asetellaan lasille. Pesu suoritetaan PBS-liuoksella, joka on fosfaattipuskuroitua saliniin. Pesun käytetään yksinkertaista PBS:ää, joka laimennetaan kymmenenkertaisesta konsentraatiosta. Toinen värjäyksessä tarvittava aine on blocking-liuos, joka on valmistettu 3% BSA:sta, 10% donkey serumista, 0,3% Tritonista ja PBS:ää käyttäen.

Ensimmäisenä päivänä näytteet pestään ensiksi PBS-liuoksessa 3 x 5 min 2 x 3-kuoppalevyssä. PBS pesun tarkoituksena on poistaa pakkasen esto nesteestä ja TissueTEK:in jäänteet. Näytteitä otettiin pakkasesta ja jokaisesta aivosta värjättiin kaksi kuopallista näytettä. Pesun jälkeen näytteet asetetaan 4 x 6-kuoppalevyille 500µl blocking-liuokseen tunnin ajaksi. Blocking-liuoksen jälkeen lisätään primääri vasta-aine suhteessa 0,5µl primääri ja 500µl blocking-liuos ja näytteet jätetään inkuboitumaan parafilm-sinetillä +4°C:n lämpötilaan 24 tunnin ajaksi. Pesu, blocking-liuos ja inkuboituminen suoritetaan kuoppalevyjen ravistajassa.

Toinen päivä alkaa 3 x 10 minuutin pesulla, jonka jälkeen näytteet inkuboituvat kaksi tuntia sekundääri vasta-aineessa suhteella 1µl sekundääri ja 500µl blocking-liuos valolta suojattuna. Inkuboinnin jälkeen leikkeet pestään vielä 3 x 10 min PBS-liuoksessa, jonka jälkeen näytteet asetetaan lasille ja lasit suljetaan näyteliimalla ja päällyslasilla.

### 3.4 Vasta-aineen optimointi

Oikean sekundääri- ja primäärivasta-aineyhdistelmän löytämiseen meni useita kokeiluja ennen kuin löytyi oikeat aineet, joilla saatiin selkeitä kuvia. Eri vasta-aineita kokeiltiin viittä erilaista yhdistelmää ennen kuin löytyi oikea vasta-aine, joka ei aiheuttanut voimakasta taustavärjäystä. Taustavärjäyksen takia vasta-aineet eivät olleet kelvollisia kuvaukseen ja solujen analyysiin. Taulukkoon 1 on koottu kokeillut vasta-aineyhdistelmät ja niiden toimivuus.

Taulukko 1. Eri vasta-aineyhdistelmät, joita kokeiltiin.

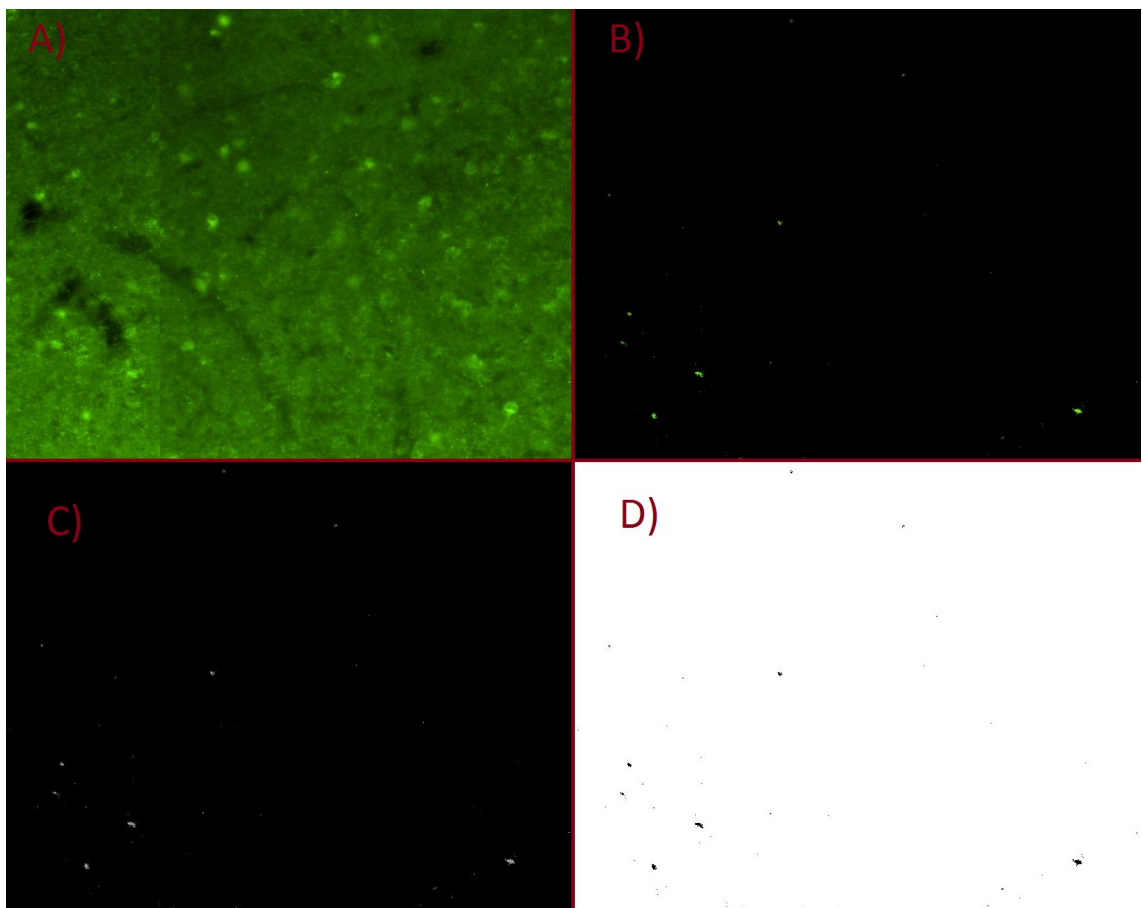
Yritys	Primääri vasta-aine	Sekundääri vasta-aine	Toimivuus
1	mouse anti-cFos ab208942 Abcam	donkey anti-mouse 647, A-31571, Fisher	Ei
2	mouse anti-cFos ab208942 Abcam	donkey anti-mouse 488,A21202, Fisher	Ei
3	mouse anti-cFos ab208942 Abcam	Mouse on Mouse HRP Polymer	Ei
4	mouse anti-cFos ab208942 Abcam	donkey anti-mouse 647, A-31571, Fisher	Ei
5	rabbit anti-cFos, ab190289, Abcam	donkey anti-rabbit 488, ab150073	Kyllä

### 3.5 Mikroskopointi

Näytteiden kuvaus suoritettiin Zeiss Axiomager -mikroskoopilla kymmenkertaisella tarkennuksella. Kamerana toimi Hamamatsu Orca R2. Kuvaus suoritettiin kuvaamalla haluttu leike kokonaan, sillä tarkasteltava alue voitiin myöhemmin rajata kokonaisesta kuvasta. Aivo näytteet näkyvät kuvissa vihreänä ja aktivoituneet solut ovat värjäytyneet kirkkaan vihreäksi. Valitettavasti kaikista aivoista ei saatu kuvaa halutuista alueista leikkausvaiheessa sattuneista inhimillisistä virheistä johtuen kuten aivojen murtumisesta leikkausvaiheessa tai värjäyksen aikana revenneistä näytteistä.

### 3.6 Solujen analyysi

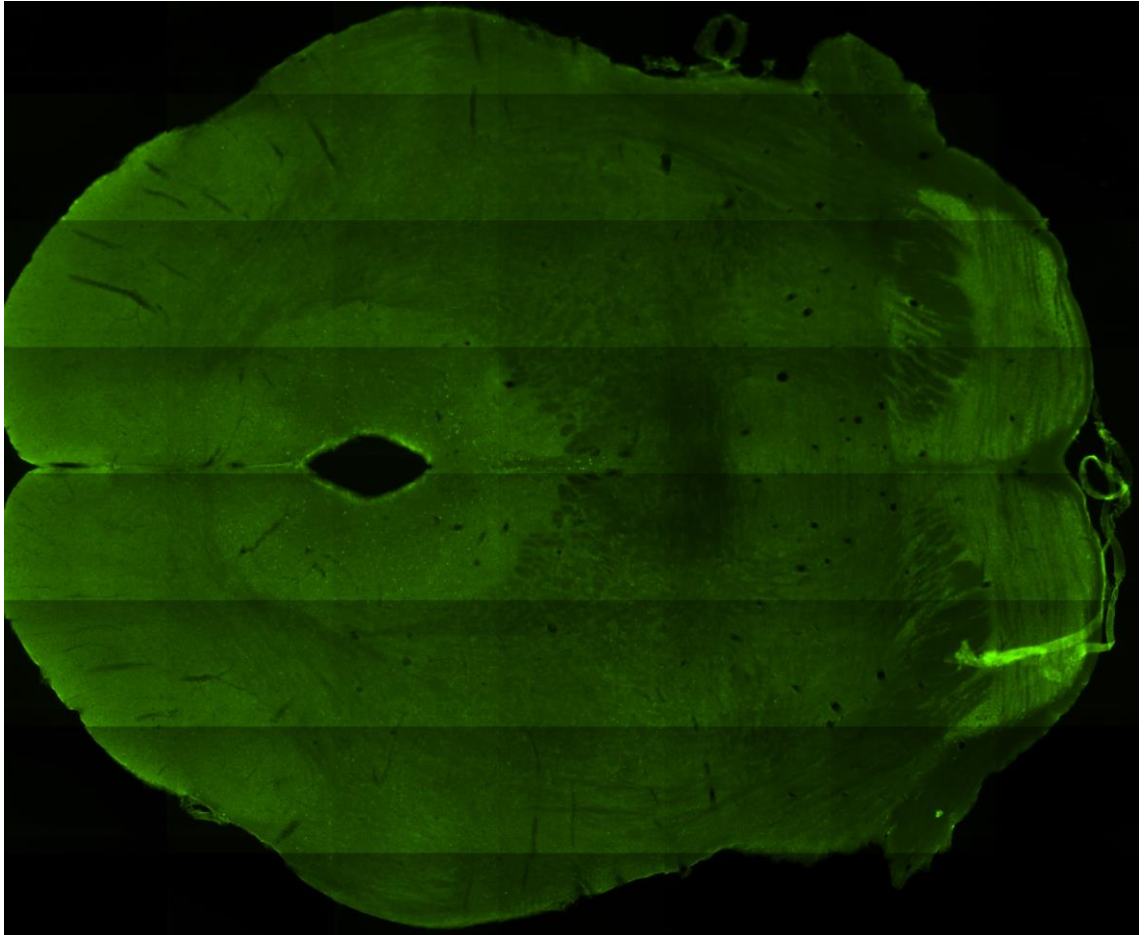
Solujen laskenta suoritettiin tietokoneavusteisesti ohjelmilla Zen Pro ja Fiji. Aluksi tarkasteltavat alueet rajattiin ja kontrasti säädettiin siten, että kuvassa näkyi pelkät laskettavat solut ja tallennettiin .tiff-tiedostona. Tämä suoritettiin Zen Pro-ohjelmalla. Solujen laskenta suoritettiin Fiji-ohjelmalla, kuvan prosessointi aloitettiin asettamalla kuva 8-bittiseksi, minkä jälkeen kuvan raja-arvo -toiminnolla säädettiin kuvan tausta valkoiseksi ja laskettavat solut mustaksi. Kyseinen prosessi on havainnollistettu kuvassa 4. Prosessoinnin jälkeen solut laskettiin cell counter -toiminnolla, pikselin minimikooksi säädettiin 4 x 4 pikseliä, joka eliminoi mahdollisen sumun laskennan mukaan. Lopuksi laskettujen solujen määrä merkittiin ylös Excel-taulukkoon. Kuitenkaan kaikissa näytteissä ei välttämättä ollut värjäytyneitä soluja, mikä tarkoitti sitä, että aktiivisuutta ei ole ollut kyseisellä alueella ja nämä alueet tarkistettiin mutta päädyttiin lopputulokseen, että helpommin pääsee merkitsemällä ne nolleksa taulukossa.





Kuva 4. Mikroskooppikuvan prosessointi. A) Koko leikkeen kuvasta rajattu tutkittava kohta B) Rajatusta kohteesta säädetty kontrasti, jolla näkyy pelkät solut C) Kuva säädetty mustavalkoiseksi eli 8-bittiseksi D) Kuvan raja arvot säädetty että ne näkyvät mustana valkoisella taustalla minkä jälkeen solulaskuri voi laskea solujen määrän.

#### 4 Tulokset



Kuva 5. Aivo leike mikroskoopin alla, värjätty toimivalla vasta-aineyhdistelmällä. Leikkeessä on pendunkulopontinen tegmentaali tumake ja keskiaivoharmaa.

Tulokset taulukoitiin Exceliin, jonka jälkeen niille tehtiin varianssianalyysi IBM:n SPSS-ohjelmalla. Taulukossa 2 näkyy jokaisen koe-eläimen injektio, genotyyppi sekä aivoalueen solumäärä.



Taulukko 2. Aivokuvista digitaalisesti laskettujen solujen määrä. Sinisellä merkityt ovat alueita, joista ei löytynyt aktiivisuutta. Punaisella merkityt ovat alueita, joita ei löytynyt näytteistä.

Nro	Tyyppi	Ravinto	F14	F19-1	F19-2	F30	F42-1	F42-2	F42-3	F42-4	F42-5	F58-1	F58-2	F69-1	F69-2
3981	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3990	ko	s	94	0	0	0	0	0	0	0	108	0	0	0	32
3992	wt	m	Ei ole	Ei ole	Ei ole	14	0	0	0	0	98	0	0	0	0
3993	wt	s	41	16	40	0	0	0	0	31	64	0	0	20	12
3994	ko	s	83	0	0	0	44	0	31	34	60	0	0	52	85
3995	ko	s	32	25	14	10	38	43	6	6	120	29	34	19	42
4002	wt	s	Ei ole	7	0	40	0	44	67	45	28	0	13	23	59
4003	ko	s	77	Ei ole	Ei ole	21	0	21	13	16	72	0	0	0	57
4004	ko	m	Ei ole	0	0	52	7	20	0	22	27	0	0	12	10
4078	wt	s	64	Ei ole	Ei ole	20	15	7	3	9	31	10	45	51	16
4079	wt	s	59	26	1	56	Ei ole	Ei ole	Ei ole	Ei ole	Ei ole	Ei ole	Ei ole	40	74
4080	ko	m	37	19	25	30	26	14	27	17	49	0	14	15	75
4081	ko	m	Ei ole	17	20	9	0	0	0	14	47	0	8	0	25
4707	wt	s	79	0	0	67	5	2	0	13	62	0	0	0	17
4708	ko	m	139	20	19	12	10	3	4	26	69	0	0	47	67
4709	ko	m	105	Ei ole	Ei ole	12	24	9	0	23	51	14	38	24	126
4710	wt	m	149	38	Ei ole	Ei ole	12	17	10	12	146	19	15	30	103
4713	ko	m	Ei ole	Ei ole	Ei ole	14	0	0	0	0	11	0	0	35	110
4714	wt	m	58	39	18	32	0	10	25	29	47	0	32	32	61
4715	wt	m	Ei ole	Ei ole	Ei ole	0	Ei ole	Ei ole	Ei ole	Ei ole	Ei ole	Ei ole	Ei ole	35	16

Alueet merkittiin aluksi hiiren aivo atlas kirjan sivujen mukaan lyhenteellä F (figure) ja sitä vastaavalla numeroinnilla kirjassa.

Taulukko 3. Aivoalueiden koodinimet ja niiden tieteelliset nimet.

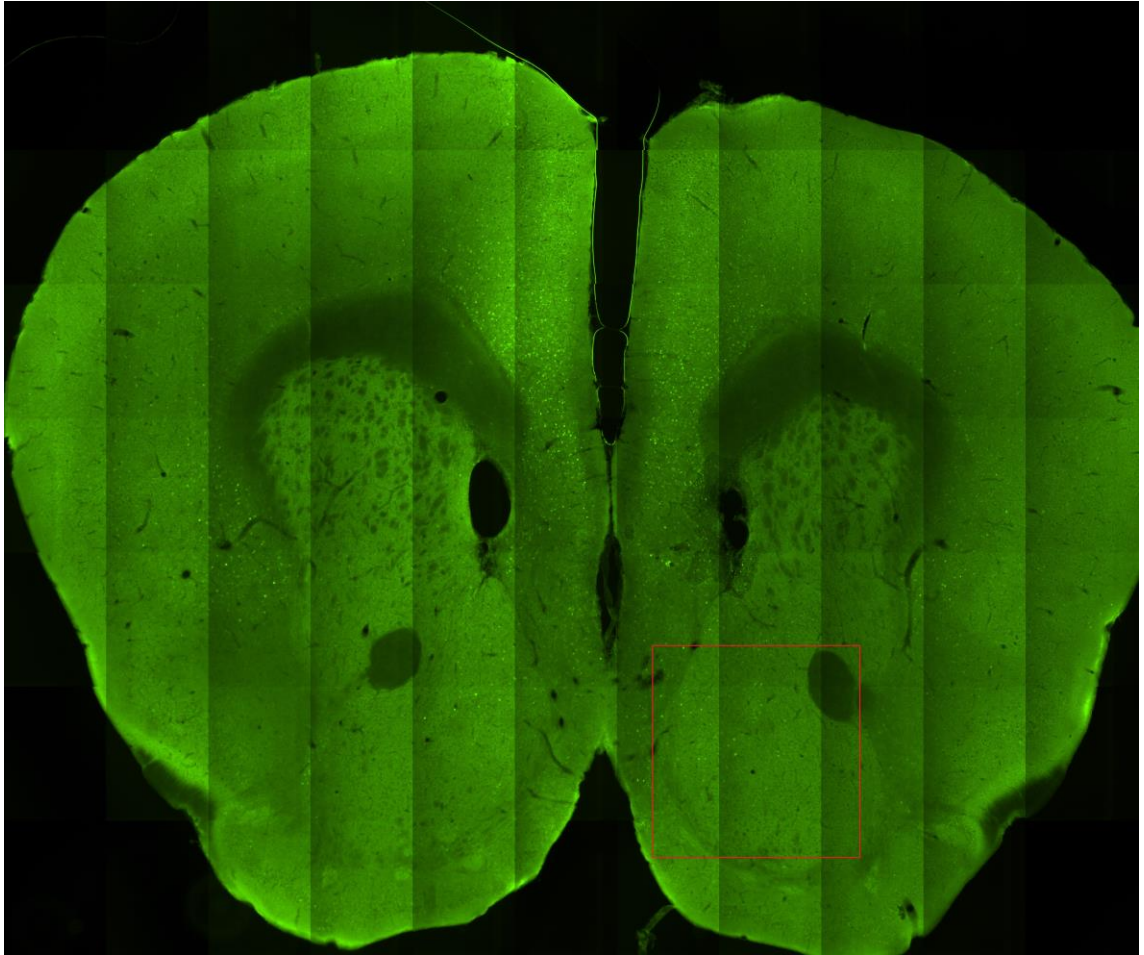
Käännökset	
F14	Etuaivokuori
F19-1	Makaava tumake
F19-2	Piriforminen aivokuori
F30	Etuaivojen pohjaosa
F42-1	Basolateraalinen mantelitumake
F42-2	Mantelitumakkeen keskusosa
F42-3	Dentate gyrus
F42-4	Habenula
F42-5	Hypotalamus
F58-1	Musta tumake
F58-2	Ventraalinen tegmentaali tumake
F69-1	Pendunkulopontinen tegmentaali tumake
F69-2	Keskiaivoharmaa

Varianssianalyysi IBM SPSS-ohjelmalla

Taulukko 4. IBM SPSS-ohjelman P-testin tulokset. Vihreällä merkityt ovat alueita, joilla löytyy eroa morfiinin käyttäjissä.

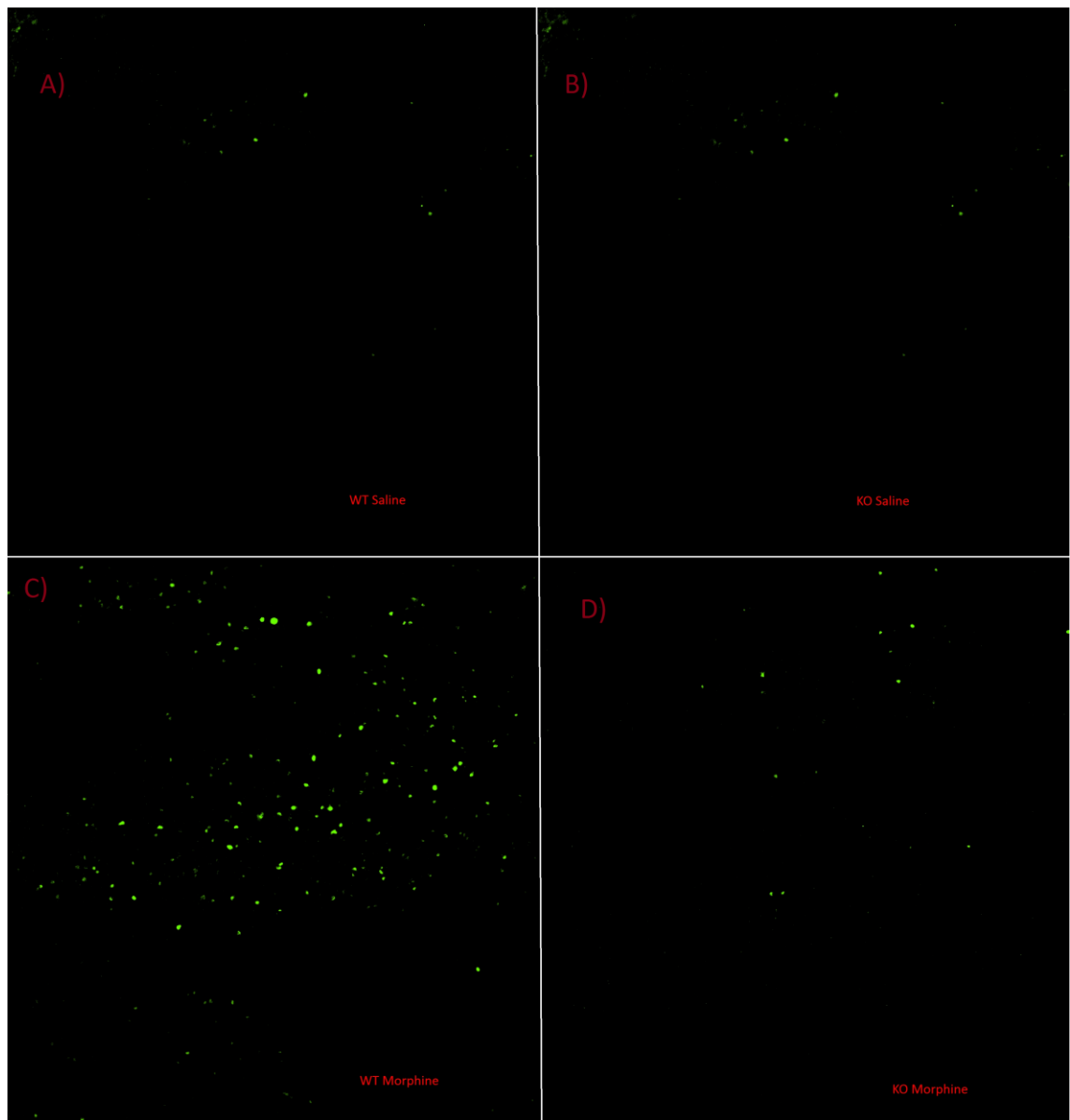
Aivoalue	P-genotyyppi	P-morfiini	Yhteistekijä
Etuaivokuori	0.983	0.166	0.644
Makaava tumake	0.05	0.032	0.136
Piriforminen aivokuori	0.709	0.358	0.859
Etuaivojen pohjaosa	0.245	0.693	0.082
Basolateraalinen mantelitumake	0.133	0.478	0.566
Mantelitumakkeen keskusosa	0.928	0.425	0.793
Dentate gyrus	0.556	0.502	0.938
Habenula	0.604	0.571	0.324
Hypotalamus	0.708	0.915	0.004
Musta tumake	0.937	0.908	0.361
Ventraalinen tegmentaalin tumake	0.509	0.879	0.985
Pendunkulopontinen tegmentaali tumake	0.852	0.728	0.953
Keskiaivoharmaa	0.121	0.832	0.761

Solulaskennan tuloksille suoritettiin varianssianalyysi IBM SPSS -ohjelmalla. P-testin tuloksista etsittiin alueet, joissa P-arvo on pienempi tai yhtä suuri kuin 0,05. Jos yksittäisen tekijän P-arvo oli suurempi kuin 0,05, katsottiin yhteistekijän P-arvoa. Tulosten selkeyttämiseksi ne sijoitettiin erilliseen Excel-taulukkuun.



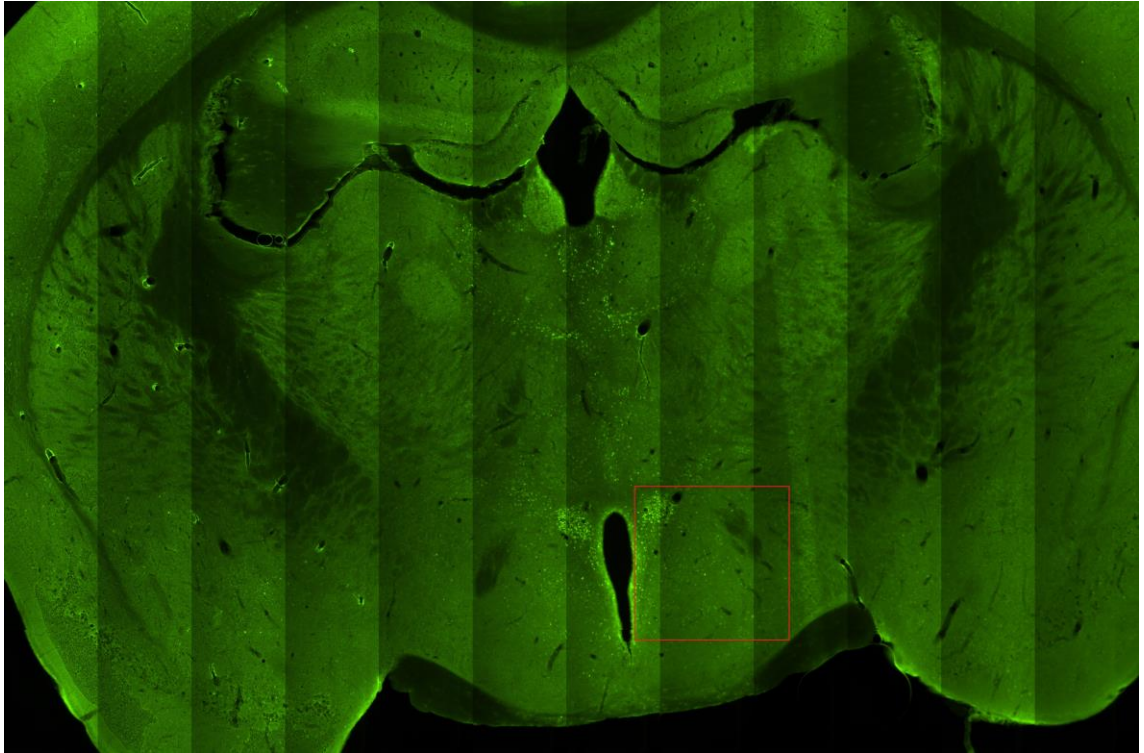
Kuva 6. Mikroskooppikuva aivoalueesta, josta löytyvät makaava tumake ja piriforminen aivokuori. Punaisella rajattu alue on makaava tumake.

Makaava tumake on ensimmäinen alue, jossa näkyy eroa morfiinia saaneessa hiirissä. Varianssia on genotyypin P-arvossa sekä morfiinin P-arvossa.



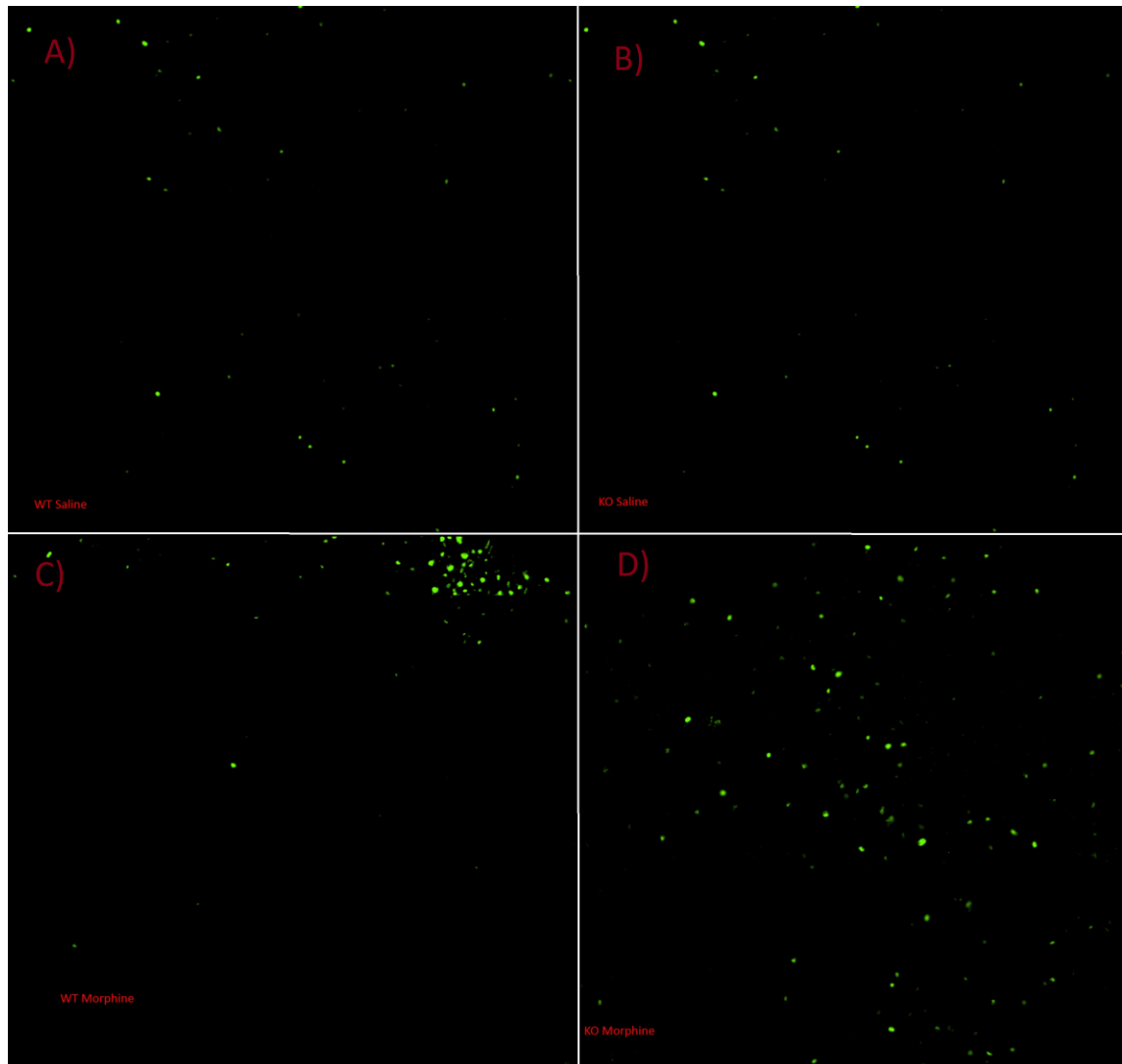
Kuva 7. Aktiivisuus erot makaavassa tumakkeessa eri genotyypeillä ja injektioilla. A) Villityyppi saliiini B) Knockout saliiini C) Villityyppi morfiini D) Knockout morfiini

Aktiivisuuden erot näkyvät erityisen selvästi villityyppien välillä. Villityyppien ero on havainnollistettu kuvassa 7 osissa A) saliiini ja C) morfiini. Eroa kuitenkin näkyi myös knockouttien välillä. Knockouttien ero on havainnollistettu kuvassa 7 osissa B) saliiini ja D) morfiini.



Kuva 8. Mikroskooppikuva aivo alueesta, josta löytyvät basolateraalinen mantelitumake, mantelitumakkeen keskusosa, dentate gyrus, habenula ja hypothalamus. Punaisella rajattu alue on Hypotalamus.

Hypotalamus on toinen alue, josta löytyi eroja morfiinia saaneissa hiirissä. Ero löytyi genotyypin ja morfiinin yhteisvaikutuksen P-arvosta.



Kuva 9. Aktiivisuus erot Hypotalamuksessa eri genotyypeillä ja injektioilla. A) Villityyppi saliini B) Knockout saliini C) Villityyppi morfiini D) Knockout morfiini

Aktiivisuuden erot näkyvät erityisen selvästi knockouttien välillä. Knockouttien ero on havainnollistettu kuvassa 9 osissa B) saliini ja D) morfiini. Ero kuitenkin oli myös nähtävissä villityyppien välillä. Villityyppien ero on havainnollistettu kuvassa 9 osissa A) saliini ja C) morfiini.

## 5 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Näytteiden leikkaus ja kuvaaminen olivat työn aikaa vievimmat osiot ja tämän lisäksi aikaa vei oikeiden vasta-aineiden löytäminen värjäystä varten. Solujen analysointi onnistui näppärästi tietokoneella.

Ongelmia todennäköisesti aiheutti neljässä ensimmäisessä käytetty primääri vasta-aine mouse anti-cFos ab208942 Abcam, oletimme, että ongelma olisi sekundäärisissä vasta-aineissa. Mutta onnistuneessa värjäyksessä käytimme primääri vasta-aineena rabbit anti-cFos, ab190289:ää, (Abcam) ja sekundäärinä donkey anti-rabbit 488, ab150073:a.

Alueet, joissa löytyy merkittäviä eroja solujen aktiivisuudessa, ovat makaava tumake ja hypotalamus.

## 6 Yhteenveto

Insinööriyössä selvitettiin morfiinin vaikutusta eri aivon alueissa ja tarkemmin cFos-geenin eritykseen eri aivon alueilla. Työssä leikattiin ja värjättiin 20 koe-eläimen aivot. Osalle eläimistä oli injektoitu saliniinia ja osalle morfiinia.

Työn tuloksissa havaittiin eroja cFos-geenin erityksessä kahdella aivon alueella. Morfiinin vaikutuksesta saatiin riittävä kuva spesifeistä vaikutusalueista. Havaintoja voidaan käyttää tulevilla aivotutkimuksissa, sillä aivot ja niiden toiminta ovat jatkuvan tutkimuksen alla.

Jatkotutkimuksena kokeita voitaisiin tehdä muun muassa kroonisen käytön vaikutuksesta cFos-geenin eritykseen sekä käyttäytymiseen. Myös cFos-geenin erityksen erot eri genotyyppien välillä on yksi mahdollinen tutkimuskohde.

## Lähteet

- 1 Farley, Alistair; Johnstone, Carolyn; Hendry, Charles & McLafferty, Ella. 2014. Nervous system part 1. Nursing standard.
- 2 Farley, Alistair; Johnstone, Carolyn; Hendry, Charles & McLafferty, Ella. 2014. Nervous system part 2. Nursing standard.
- 3 Farley, Alistair; Johnstone, Carolyn; Hendry, Charles & McLafferty, Ella. 2014. Nervous system part 3. Nursing standard.
- 4 Ilmoniemi, Risto. Aivojen rakenne ja toiminta. Verkkoaineisto Helsingin yliopisto. <<https://www.biomag.hus.fi/braincourse/L1.html>> Luettu 23.10.2018
- 5 Weeks, James JR. 1962 Experimental Morphine Addiction: Method for Automatic Intravenous Injections in Unrestrained Rats. Science Vol. 138, Issue 3537.
- 6 Kim, Juhwan; Ham, Suji; Hong, Heeok; Moon, Changjong & Im; Heh-In. 2016. Brain Reward Circuits in Morphine Addiction. Molecules and cells.
- 7 Perrin-Terrin, Anne-Sophie; Jeton, Florine; Pichon, Aurelien; Frugière, Alain; Richalet, Jean-Paul; Bodineau, Laurence & Voituren Nicolas. 2016. The c-FOS Protein Immunohistological Detection: A Useful Tool as a Marker of Central Pathways Involved in Specific Physiological Responses InVivo and ExVivo. Journal of Visualized Experiments.
- 8 Malloul, Hanaa; Bennis, Mohammed & Ba-M'hamed, Saadia. 2018. Positive reinforcement and c-Fos expression following abuse-like thinner inhalation in mice: Behavioural and immunohistochemical assessment. EJN.
- 9 Lahti, Laura; Haugas, Maarja; Tikker, Laura; Airavaara, Mikko; Voutilainen, Merja H.; Anttila, Jenni; Kumar, Suman; Inkinen, Caisa; Salminen, Marjo & Partanen, Juha. 2016. Differentiation and molecular heterogeneity of inhibitory and excitatory neurons associated with midbrain dopaminergic nuclei. Development.
- 10 Ward, Jerrold M. & Rehg, Jerold E. 2014. Rodent Immunohistochemistry: Pitfalls and Troubleshooting. Veterinary Pathology.
- 11 Sanderson, Michael J.; Smith, Ian; Parker, Ian & Bootman. Martin D. 2014. Fluorescence Microscopy. Cold Spring Harbor Protocols.
- 12 Grishagin, Ivan V. 2015. Automatic cell counting with ImageJ. Analytical Biochemistry.