



**TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioalan koulutusohjelma**

**OPINNÄYTETYÖ**

**APOPTOOSIN DETEKTOINTI DIABEETTISEN HIIRIMALLIN MUNUAISLEIKKEISTÄ**

**Työn tekijä: Kirsi Keski-Mattinen  
Työn ohjaajat: Mervi Hyvönen  
Tiina Soininen**

**Työ hyväksytty: \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . 2010**

**Tiina Soininen  
lehtori**

## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Haartman-instituutissa patologian osastolla dosentti Sanna Lehtosen tutkimusryhmässä. Haluan kiittää käytännön työn opastuksesta laborantti Niina Ruohoa ja koko tutkimusryhmää mukavasta ja kodikkaasta ilmapiiristä.

Erityisesti haluan kiittää käytännön neuvoista tutkimusjohtaja Sanna Lehtosta ja myös kirjallisesta ohjauksesta ja joustavuudesta opinnäytetyöni ohjaajaa tutkija (LL) Mervi Hyvöstä.

Lämpimät kiitokset viisaista neuvoista ja opastuksesta opinnäytetyötäni ohjanneelle opettajalle lehtori (FL) Tiina Soiniselle.

Haluan myös kiittää ystäviäni kotona ja koulussa, jotka tukivat ja kannustivat minua työn aikana.

Helsingissä 7.11.2010

Kirsi Keski-Mattinen

## TIIVISTELMÄ

**Työn tekijä:** Kirsi Keski-Mattinen

**Työn nimi:** Apoptoosin detektointi diabeettisen hiirimallin munuaisleikkeistä

**Päivämäärä:** 7.11.2010

**Sivumäärä:** 34 s.

**Koulutusohjelma:**

Laboratorioala

**Työn ohjaaja:** LL Mervi Hyvönen

**Työn ohjaaja:** FL Tiina Soininen

Tämä opinnäytetyö tehtiin Sanna Lehtosen tutkimusryhmässä Helsingin yliopiston Haartman-instituutin patologian osastolla. Tavoitteena oli löytää ja optimoida apoptoosin detektointimenetelmä hiiren munuaisleikkeille.

Munuaisleikkeet olivat peräisin diabeettisesta E1-DN-hiirimallista ja sen verrokkiryhmästä. E1-DN-hiiret sopivat erittäin hyvin hyperglykemian pitkäaikaisvaikutusten, kuten diabeettisen nefropatian, tutkimiseen. Diabeettinen nefropatian ensiasteessa valkuaisia vuotaa virtsaan ja tauti voi lopulta johtaa munuaisten vajaatoimintaan. Komplikaation histopatologiset muutokset, joissa lisääntyneellä apoptoosilla on oma roolinsa, tapahtuvat pääosin munuaiskeräsessä.

Apoptoosin kvantitatiivinen detektointi on erittäin hankalaa prosessin nopeuden takia. Solu käy apoptoosin läpi parissa tunnissa häviten lopulta jälkiä jättämättä. Apoptoosi on geneettisesti ohjelmoitu solukuolema, joka pystytään tunnistamaan sen morfologisista erikoispiirteistä, DNA:n pilkkoutumisesta ja spesifisten apoptoosia säätelevien proteiinien ilmentymisestä. Tässä opinnäytetyössä apoptoottisten solujen detektointiin käytettiin TUNEL-tekniikkaa ja apoptoosiin liittyvän kaspasi-3-proteiinin immunohistokemiallista värjäystä.

TUNEL-tekniikan validoinnissa käytiin läpi useita menetelmän modifikaatioita huonon signaalin, taustavärjäytymisen ja tulosten vaihtelevuuden takia. Menetelmän optimointi tapahtui pääosin permeabilisoinnissa proteaasi- ja lämpökäsittelyä käyttäen. Muutokset eivät ratkaisseet ongelmia, ja kokeiltavaksi otettiin toinen apoptoosin detektointitapa, kaspasi-3-proteaasin havainnointi immunohistokemiallisilla menetelmillä. Menetelmässä testattiin immunofluoresenssi ja -peroksidaasileimausta, joista immunoperoksidaasivärjäykset antoivat parhaimmat ja toistettavimmat tulokset. Optimoitua immunoperoksidaasivärjäystä päädyttiin käyttämään diabeettisten hiirien ja niiden verrokkiryhmän apoptoosin analysoinnissa. Tulosten mukaan diabeettisten E1-DN-hiirten glomeruluksissa on keskimäärin enemmän apoptoosia kuin verrokeissa. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että korkealla verensokerilla on yhteys glomerulussolujen apoptoosin määrän kanssa.

**Avainsanat:** Diabeettinen nefropatia, apoptoosi, TUNEL, aktivoitunut kaspasi-3

## ABSTRACT

<b>Name:</b> Kirsi Keski-Mattinen	
<b>Title:</b> Detection of apoptosis in diabetic mouse kidney samples	
<b>Date:</b> 7 November 2010	<b>Number of pages:</b> 34 pages
<b>Department:</b> Laboratory Sciences	
<b>Instructor:</b> Mervi Hyvönen	
<b>Supervisor:</b> Tiina Soininen	
<p>This graduate study was made in Sanna Lehtonen's research group in the Department of Pathology, Haartman Institute, University of Helsinki. The purpose of the study was to find a way to detect apoptosis from mouse kidney sections.</p> <p>Kidney samples were taken from a diabetic mouse model E1-DN and a control group. These mice are overtly hyperglycemic but still viable and are therefore an excellent animal model to study long-term consequences of hyperglycemia, such as diabetic nephropathy. Histopathological changes in diabetic nephropathy take place mainly in glomerulus. They can lead to albuminuria and finally can cause end stage renal disease. It is known that the increased rate of apoptosis in glomeruli and tubuli has a role in the development of diabetic nephropathy.</p> <p>Quantitative detection of apoptosis is difficult because the apoptotic process is extremely rapid. A cell may undergo apoptosis and disappear within 1 or 2 hour. Apoptosis is a gene-driven mode of cell death that can be identified by distinct morphological features, endonuclease initiated DNA degradation and by the involvement of specific apoptosis-regulating proteins. In this thesis apoptotic cells were detected using terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) and immunohistochemistry staining of apoptosis related protease caspase-3 detection.</p> <p>Several modification and validating steps were made in TUNEL technique because of the weak signal, background staining and variation between results. The changes in procedure were mainly in permeabilization by using proteinase treatment and heat induced antigen retrieval. Unfortunately these changes did not give the desired results, and therefore another apoptosis detection method, immunohistochemistry staining of caspase-3 protease, was taken in use. These stainings with ABC labeling had good repeatability and quality, and caspase-3 immunohistochemistry stainings were used for the analysis of apoptosis in diabetic and control mice. This study shows that E1-DN homozygous mice have more apoptotic cells in glomeruli than the normal mice. These results indicate that high blood sugar is associated with higher amount of apoptotic cells in glomeruli.</p>	
<b>Keywords:</b> Diabetic nephropathy, apoptosis, TUNEL, activated caspase-3	

## SISÄLLYS

### ALKULAUSE

### TIIVISTELMÄ

### ABSTRACT

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>DIABEETTINEN NEFROPATIA</b>	<b>2</b>
2.1	Munuaiset ja virtsatiet	2
2.2	Apoptoosi ja sen merkitys komplikaatiossa	4
<b>3</b>	<b>APOPTOOSIN DETEKTOINTIMENETELMÄT</b>	<b>6</b>
3.1	TUNEL-tekniikka	6
3.2	Kaspaasi-3:n immunohistokemiallinen detektointi	7
<b>4</b>	<b>KUDOSVÄRJÄYKSET</b>	<b>9</b>
4.1	Histologiset näytteet	9
4.2	Värjäysmenetelmät	9
4.3	Fiksaus	10
4.4	Permeabilisointi	11
4.5	Puskurit	12
4.6	Vasta-aineet	12
4.7	Havainnointi	13
4.8	Taustavärjäys ja kiinnitys	14
4.9	Kontrollit	15
<b>5</b>	<b>MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>15</b>
5.1	Diabeettinen hiirimalli E1-DN	15
5.2	Fragmentoituneen DNA:n osoittaminen	16
5.3	Aktiivisen kaspaasi-3-proteaasin osoittaminen	19
<b>6</b>	<b>TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU</b>	<b>21</b>
6.1	DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System –menetelmän testaus	21
6.2	Kaspaasi 3:n osoittaminen immunofluoresenssi- ja peroksidaasivärjäyksillä	25
<b>7</b>	<b>YHTEENVETO</b>	<b>32</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>33</b>

## 1 JOHDANTO

Pitkäaikaiseen diabetekseen liittyy usein munuaissairaus eli nefropatia, jonka syntymekanismit ovat vielä suurelta osin tuntemattomia. Tärkeässä asemassa siinä oletettavasti ovat diabetekseen liittyvät metaboliset ja hemodynaamiset muutokset yhdessä perinnöllisen alttiuden kanssa. Lisäviä riskitekijöitä ovat huono glukoositasapaino, kohonnut verenpaine, tupakointi, miesukupuoli ja dyslipidemia eli rasva-aineenvaihdunnan häiriö. Kolmannekselle tyypin 1 diabeetikoista kehittyy nefropatia diabeteksen kestätyä 15 - 20 vuotta. Tyypin 2 diabetesta sairastavilla nefropatiaa esiintyy arviolta 20 - 30 prosentilla, mutta määrä on selvästi lisääntymässä, sillä aiemmin tyypin 2 diabeetikot menehtyivät sydän- ja verisuonisairauksiin ennen kuin heillä todettiin merkkejä munuaisvauriosta. Nykyään he elävät pidempään parantuneen hoidon myötä ja nefropatia ehtii kehittyä. Tämän vuoksi diabeettinen nefropatia on yhä kasvava ongelma ja maassamme jo nyt yleisin dialyysihoidon johtava sairaus.

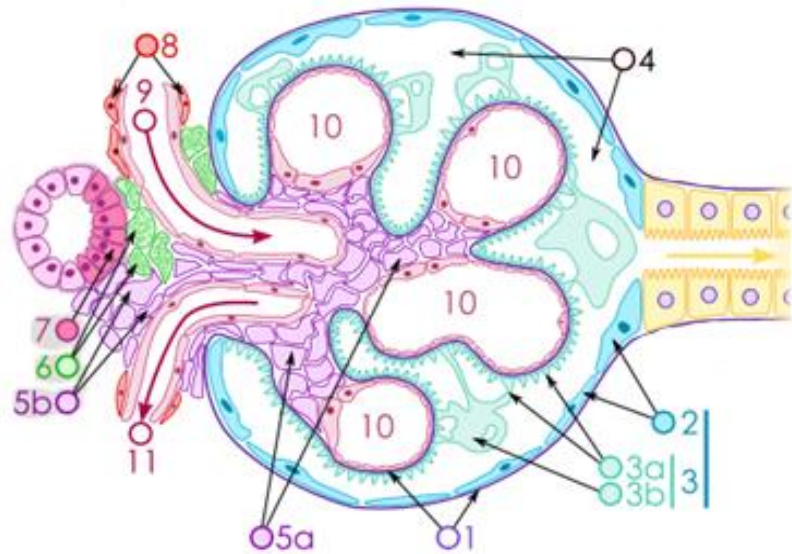
Diabeettisen hiirimallin avulla pystytään tarkastelemaan korkean verensokerin aiheuttamia molekulaarisia ja morfologisia muutoksia munuaisissa. Munuaissoluissa tiedetään tapahtuvan apoptoosia diabeettisen nefropatian kehittyessä. Opinnäytetyössä tarkoituksena oli löytää ja optimoida menetelmä, minkä avulla voidaan detektoida apoptoosissa olevat solut diabeettisen hiirimallin munuaisleikkeistä.

## 2 DIABEETTINEN NEFROPATIA

Diabeetisessa nefropatiassa tyypillistä on albumiinin erittyminen virtsaan, kohonnut verenpaine sekä munuaistoiminnan huononeminen. Tärkein varhainen diagnostinen merkki on virtsanäytteestä havaittava mikroalbuminuria 20 - 200 µg/min. Tällöin munuaisen toiminta on vielä normaali ja sen säilyttämiseksi hoito olisi jo tässä vaiheessa käynnistettävä. Hoidossa ja sairauden ehkäisyssä kulmakiviä ovat hyvä glukoositasapaino, matala verenpaine, tupakoimattomuus sekä muiden sydän- ja verisuonitautien riskitekijöiden vähentäminen. Komplikaation edetessä kehittyy usein nefroottinen oireyhtymä, jonka oireita ovat turvotus, dyslipidemia ja proteinuria yli 3 g/vrk. Kun glomerulussuodos eli puhdistuma laskee alle 10 ml/min, tarvitsee potilas dialyysihoitoa ja mahdollisesti munuaisen siirron. [1; 2.]

### 2.1 Munuaiset ja virtsatiet

Munuaiset säätelevät kehon neste-, suola- ja happo-emästasapainoa. Ne poistavat solujen aineenvaihdunnassa syntyvien kuona-aineiden lisäksi vieraita ainesosia, kuten myrkkyjä ja lääkeaineita. Ne erittävät myös entsyymejä ja hormoneja. Anatomisesti munuainen on monimutkainen elin, joka koostuu useista erilaisista erittäin erikoistuneista soluista, muodostaen hyvin organisoidun kolmiulotteisen rakenteen. Munuaisen toiminnallinen yksikkö on nefroni, joita munuaisessa on miljoona kappaletta. Nefronin rakenne voidaan jakaa munuaiskeräseen ja munuaistiehyeseen. Munuaiskeräsen (glomerulus) koostuu keräsen kapselista (Bowmanin kapseli) ja sen sisäpuolella olevasta hiussuonikeräsestä. Munuaiskeräsessä muodostuu alkuvirtsa, joka kulkeutuu munuaistiehyihin (tubulus). Kuvassa 1 on glomerulus, jossa veri kulkee pienten hiussuonien läpi ja kohtaa suodatinjärjestelmän. Tämän muodostavat verisuonen seinämän kolmikerroksinen rakenne: endoteelisolut, glomeruluksen tyvikalvo (glomerular basement membrane eli GBM), podosyyttien jalkalisäkkeet ja välihila (slit diaphragm) niiden välillä. Podosyytit ovat suuria soluja, joiden lonkeromaiset jalkalisäkkeet kiertyvät kapillaarien ympärille peittäen ne. Vetoketjumaisesti vieretysten sijaitsevien podosyyttien jalkalisäkkeiden välillä on erityinen liitosrakenne, välihila, joka yhdistää solut. [3; 4.]



Kuva 1. Glomerulus, 1= tyvikalvo (GBM), 2= bowmanin kapseli, 3a= podosyytin jalkalisäkkeet, 3b= podosyytti, 4= virtsatila, 5a/b= mesangiaalisolut, 6= juxtaglomerularaari solut, 7= makula, 8= myosyytit, 9= "tuojasuoni", 10= hiussuonet, 11= "viejäsuoni". Mukailten lähde [5].

Suodattimen läpäisevät vesi- ja muut pienet molekyylit, jättäen verenkiertoon suurimman osan proteiineista ja veren solut. Molekyylien koon ja muodon lisäksi läpäisevyyteen vaikuttaa niiden varaus. Endoteeli- ja epiteelisolujen pinnat, sekä tyvikalvo ja välihila sisältävät runsaasti negatiivisesti varautuneita glykoproteiineja, jotka hylkivät anionisia molekyylejä. Tämä on tärkeää erityisesti plasman proteiinien osalta, sillä ne ovat valtaosin negatiivisesti varautuneita. [3; 4.]

Albumiiniuriaan johtavat patologiset muutokset diabeettisessa nefropatiassa tapahtuvat pääosin glomeruluksessa. Muutokset vaihtelevat diabetestyyppien välillä ja yksilöittäin. Tyypin 1 diabeteksessa muutoksia glomeruluksessa ovat podosyyttien vähentyminen, tyvikalvon paksuuntuminen, mesangiumin fibroosi ja mesangiaalisolujen lisääntyminen. Tyypin 2 diabeteksessa muutoksissa on enemmän vaihtelua yksilöiden välillä, eivätkä muutokset aina ole yhtä selkeitä kuin tyypin 1 diabeteksessa. Yhden tai useamman glomeruluksen suodatinjärjestelmän osan vahingoittuminen johtaa proteinuriaan. Podosyyttien roolin ymmärtäminen diabeettisessa nefropatiassa on lisääntynyt vuosien saatossa, vaikka kokonaan podosyyttivaurion mekanismeja ei vielä ymmärretä. Tiedetään kuitenkin, että diabeetikoilla podosyyttien jalkalisäkkeiden leveys kasvaa ja välihilassa tapahtuu muutoksia, jotka aiheuttavat

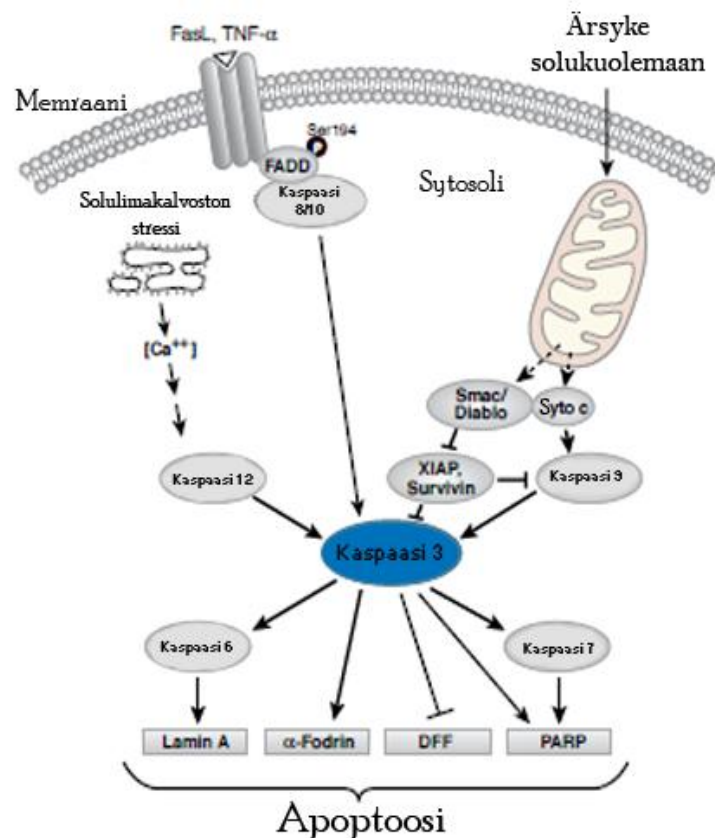


proteiinien erittymisen virtsaan. Varsinkin tyypin 1 diabeteksessa podosyyttien irtoaminen GBM:sta vaikuttaisi olevan aikainen tapahtuma. Podosyytit eivät merkittävästi uusiudu, joten niiden määrän vähetessä lisää alueita GBM:sta jää paljaaksi ja proteiiniuria pahenee. Podosyyttien irtoamisella GBM:sta apoptoosin, nekroosin tai adhesiivisuuden menetyksen johdosta voi olla tärkeä rooli useissa proteinurisissa sairauksissa. [6.]

## 2.2

### Apoptoosi ja sen merkitys komplikaatioissa

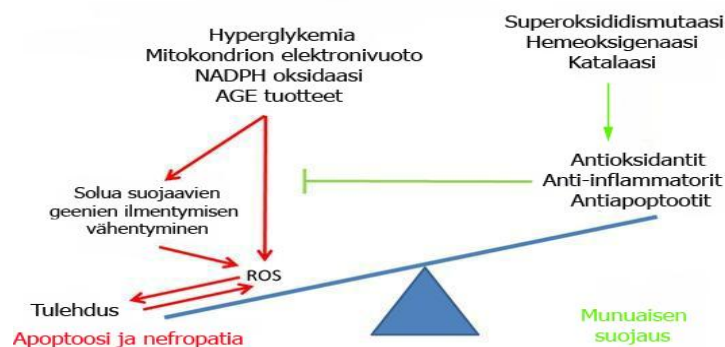
Apoptoosi on jokaisen solun geeneihin ohjelmoitu nopea yhdestä kahteen tuntiin kestävä hallittu tapahtuma. Apoptoosin avulla elimistö hävittää tarpeettomat ja elinkelvottomilta vaikuttavat solut. Apoptoosissa solu kutistuu, kromatiini pakkautuu tiiviisti tumakalvoa vasten ja soluseinä muuttuu poimukseksi. Endonukleasientsyymi pilkkoo DNA:n 180 – 200 emäsparin pätkiin ja soluseinämän poimut kuroutuvat erilleen. Solu pilkkoutuu solukalvon ympäröimiksi pieniksi rakkuloiksi ja lopulta ympäröivät solut ja makrofagit nielevät rakkulat sisäänsä tuhoten ne. Tulehdusreaktio ei käynnisty, eikä tästä jää kudokseen pysyviä jälkiä. Apoptoosi voi käynnistyä monien erilaisten reittien kautta, mutta solun hajoamisen mekanismit ovat aina samat, kuva 2.



Kuva 2. Kaspaasi-3:n vaikutusreitit apoptoosissa. Mukailten lähde [9].

Solunsisäinen säätely tunnetaan vasta osittain ja siinä on kudiskohtaisia eroja. Apoptoosin sisäisesti käynnistävä signaali on mitokondriosta irtoava hengitysketjun entsyymi sytokromi-c. Apoptoosin ulkoisesti käynnistävät signaalit ovat kuolemaa aiheuttavat ligandit kuten Fas tai  $TNF\alpha$ , jotka reagoivat plasmamembraanilla sijaitsevan kuolemanreseptorin kanssa aiheuttaen apoptoottisten proteiinien ketjureaktion. Solussa on monia proteiineja estämässä tai onkogeenejä tehostamassa näitä apoptoosin signaalireittejä. Pääasiassa prosessia säätelevät niin kutsutut kysteiiniriippuvaliset aspartaatti-proteaasit, kaspasit [7]. Kaspasit voivat aktivoida ohjelmoidun solukuoleman kolmella erilaisella mekanismilla: kuolemanreseptorin, apoptosomin muodostumisen tai isoentsyymi B reaktiotien kautta. Kaspasit toimivat ketjussa pilkkoen toisiaan ja muita apoptoosia sääteleviä proteiineja aktiiviseen muotoon esiasteistaan. Tämä ketju johtaa proteolyysiin, kromatiinin kondensaatioon ja DNA:n pilkkoutumiseen luoden lopulta apoptoottisen ilmiön. [8.]

Apoptoottista solukuolemaa tavataan diabeettisessa nefropatiassa, mutta sen roolia ei täysin tunneta. Diabeettisessa nefropatiassa korkea verensokeri eli hyperglykemia johtaa mitokondriaalisen elektronien siirtoketjun ylikuormittumiseen. Näin pääsee muodostumaan vahingollisia vapaita radikaaleja (ROS). Koholla oleva verensokeri aiheuttaa myös valkuaisaineiden ja rasvojen sokeroitumisesta muodostuvia myrkyllisiä glykosylaation lopputuotteita eli AGE- (advanced glycosylation endproducts) tuotteita. Näiden tiedetään aiheuttavan soluvaurioita ja apoptoosia glomerus- ja tubulussoluissa. Diabeettista nefropatiaa sairastavilla on myös havaittu solukuolemaan liittyvien geenien säätelyssä muutoksia. Kuvassa 3 on esitettyä munuaisia suojaavien ja apoptoosia aiheuttavien mekanismien tasapaino. [7; 10.]



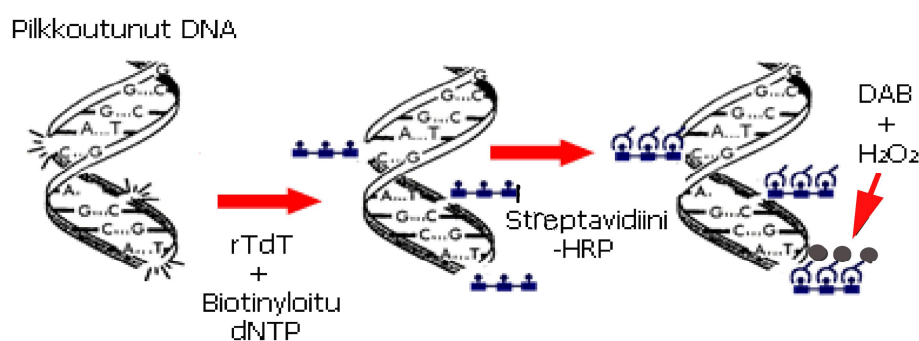
Kuva 3. Tasapaino apoptoottisuuden ja munuaisia suojaavien mekanismien välillä. Mukailleen lähdettä [7].

### 3 APOPTOOSIN DETEKTOINTIMENETELMÄT

Apoptoottinen solu voidaan tunnistaa kudisleikkeestä sen morfologisten ominaisuuksien perusteella käyttäen hematoksyliini-eosiiniväryäystä (HE), mutta sen määrä jää helposti aliarvioiduksi todellisesta määrästä [11]. Morfologisia ominaisuuksia on kuitenkin vaikea havaita tulehtuneesta kudoksesta, jossa on mahdollisesti myös lisääntyviä ja nekroottisia alueita. Näistä syistä apoptoosin havainnointitapoja on kehitetty useita erilaisia. Yleisimmin käytetty tapa on pilkkoutuneita DNA -fragmentteja tunnistava TUNEL. Immunohistokemian avulla voidaan tunnistaa apoptoosissa toimivia proteiineja, kuten kaspaseja ja myös niiden aktivoitumisesta aiheutuvia pilkottuja tuotteita, kuten esimerkiksi sytokeratiini 18 ja poly-ADP-riboosipolymeraasin pilkottuja osia. Havaintomenetelmää valittaessa on myös huomioitava apoptoosin vaihe, johon mahdollinen havaintomenetelmä perustuu. Esimerkiksi käytettäessä immunohistokemiallista menetelmää, kaspaseja tunnistamalla, havainnointi perustuu apoptoosin alkuvaiheeseen. DNA -fragmentteja tunnistavassa tekniikassa kyseessä on jo pitkälle edennyt apoptoosi. [9; 12.]

#### 3.1 TUNEL-tekniikka

Apoptoosissa pilkkoutuneen DNA:n 180 - 200 emäsparin kokoiset kappaleet havainnoidaan käyttämällä TUNEL-tekniikkaa. Siinä terminaalinen deoksinukleotiditransferaasientsyymi (TdT) katalysoi DNA:n emäsparikappaleiden 3'-OH päähän biotinyloidun deoksinukleosidi-5'-trifosfaatin. Signaalin havaitsemiseksi biotiiniin liitetään piparjuuriperoksidaasilla leimattu streptavidini, joka detektoidaan käyttämällä peroksidaasisubstraattia, vetyperoksidia katalyyttinä ja 3,3'-diaminobentsidiinitetrahydrokloridia (DAB) kromogeeninä. Tämä kromogeeni muodostaa ruskean värisen lopputuotteen, joka ei liukene etanoliin tai muihin orgaanisiin liuottimiin, kuva 4. [13; 14, s. 173.]



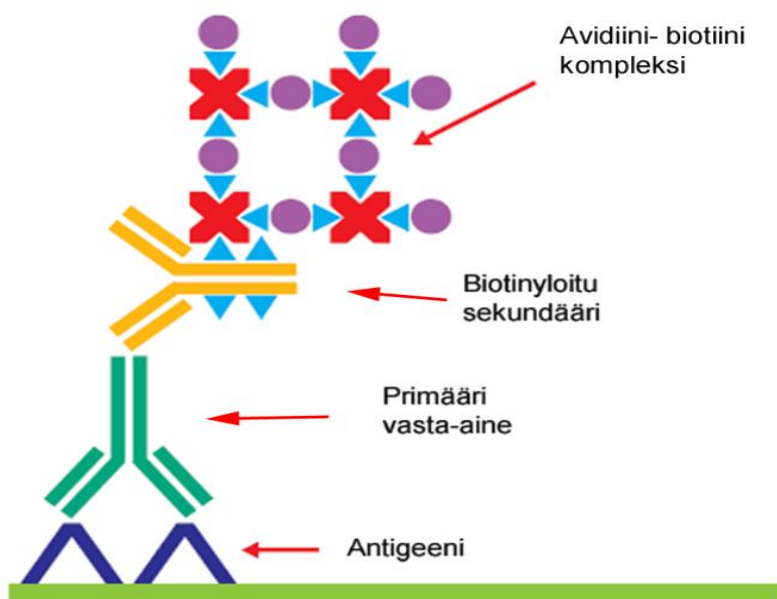
Kuva 4. TUNEL-tekniikka, mukailten lähdettä [15].

TUNEL-tekniikan tulokset ovat paljolti riippuvaisia oikeasta TdT-entsyymin konsentraatiosta, fiksausolosuhteista ja esikäsittelymenetelmistä [9]. Entsyymien konsentraatio vaikuttaa signaali-taustasuhteeseen. Kudoksen fiksaus-  
uksen ollessa liian vahva, keskeneräinen tai viivästynyt muodostuu värjäyk-  
sessä paljon epäspesifistä värjäytymistä. Myös kudoksen proteaasikäsittely  
ja endogeenisen peroksidaasin esto  $H_2O_2$ :lla ennen biotinyloidun nukleotidin  
liittämistä aiheuttavat DNA:n pilkkoutumista ja sitä kautta epäspesifistä lei-  
mautumista [16]. TUNELissa ongelmana on myös DNA-pätkien havainnointi  
alkuvaiheisesta nekroosista, mitoosista, autolyysisesta kudoksesta ja tran-  
skriptioaktiivisista soluista. Monessa tutkimuksessa, jossa TUNEL-tekniikkaa  
on käytetty, suositellaankin sitä käytettävän apoptoosin detektoinnin lisäteknii-  
kkanä. [11; 12.]

### 3.2

#### **Kaspaasi-3:n immunohistokemiallinen detektointi**

Apoptoosin tärkeinä välittäjinä toimivat kaspaasit, joista kaspaasi-3 katalysoi  
spesifisiä katkaisukohtia moneen soluproteiiniin. Kaspaasi-3:n aktivoivat  
yleensä muut kaspaasit, joiden vaikutusreitit ovat havainnollistettuina kuvas-  
sa 2 sivulla 4. Kaspaasi-3 vaikuttaa usean proteiinin pilkkoutumiseen, kro-  
matiinin pakkautumiseen, DNA:n pilkkoutumiseen ja tuman toimintakyvyn  
lopulliseen romahtamiseen. Kun kaspaasi-3 on pilkkoutunut apoptoosin alet-  
tua, siitä esille tullut peptidipää toimii epitooppina, jota ei normaaleissa so-  
luissa esiinny [12]. Tämän havainnointi kudoksesta immunohistokemiallisilla  
menetelmillä antaa spesifistä ja tärkeää tietoa kudoksen solujen apoptoosis-  
ta jo ennen kuin apoptoosin morfologiset piirteet ovat esillä. Apoptoosin de-  
tektoinnissa käytetty kaspaasi-3-vasta-aine tunnistaa vain kaspaasi-3:n pilk-  
koutuneet 17 ja 19 kDa:n kokoiset, apoptoosiaktiiviset osat. Vasta-  
aineleimauksessa käytetään joko immunofluoresenssia tai immunoperoksi-  
daasia. ABC-tekniikassa, kuvassa 5, antigeeniin sitoutuneeseen primääri-  
vasta-aineeseen sitoutuu biotiinilla konjugoitu sekundäärivasta-aine, joka  
havainnoidaan avidiini-biotiini-peroksidaasikompleksin avulla.



Kuva 5. ABC -detektointimenetelmän rakenne, mukailten lähdettä [17].

Menetelmässä primäärivasta-aineeseen on lopulta sitoutunut useampi peroksidaasimolekyylä ja tästä syystä herkkyys lisääntyy. Peroksidaasientsyymi hapettaa kromogeenina toimivan 3-amino-9-etyyli-karbatsolin eli AEC:n punaiseksi lopputuotteeksi. Immunofluoresenssissa sekundäärivasta-aine on leimattu fluorokromilla, joka emittoi valoa sille ominaisella aallonpituudella, kun siihen kohdistetaan valoa xenon-, halogeeni- tai elohopeahöyrylampulla. [9; 10; 17, s. 22 - 56.]

Aktivoidun kaspasi-3:n detektointi immunohistokemiallisilla menetelmillä toimii hyvin formalinifiksoiduissa ja parafiiniin valetuissa leikkeissä. Edes pitkittyneellä fiksauksella ei vaikuttaisi olevan vaikutusta värjäyksen tasoon. Detektointi ei tarvitse mitään erikoista esikäsittelyä vaan peruslämpökäsittely riittää. Kaspasi-3-proteaasi sijaitsee solun sytosolissa, mutta sitä on havaittu myös tumassa, kun kyseessä on solun alkuvaiheinen apoptoosi. Huomioitava on kuitenkin, että vaikka kaspasi-3 esiintyy yleensä apoptoosissa, sen läsnäolo apoptoosin aikaansaamiseksi ei ole välttämätön kaikissa soluissa. [9; 18.]

## 4 KUDOSVÄRJÄYKSET

### 4.1 Histologiset näytteet

Suurin osa nykypäivän diagnostiikasta ja terapeuttisista päätöksistä perustuu pienten kudoskoepalojen arviointiin. Laboratoriot käyttävät koepaloja histologiseen ja molekulaariseen testaukseen, jolloin niiden käsittelyn täytyy olla sopivaa sekä morfologiselle diagnostiikalle että immunohistokemialle. Näytteen koolla on väliä sen säilyvyyden takia, ja sen olisi suositeltavaa olla vähintään parin senttimetrin kokoinen ja neljän millimetrin paksuinen. Näytteen ottamisesta lähtien on tärkeää, että näyte käsitellään niin, että se säilyttää mahdollisimman luonnollisen rakenteensa ja tilansa. Säilyvyyden takia se laitetaan nopeasti yleensä joko 10 % puskuroituun formaliniin tai jäädytetään nestetyypessä -195 °C:seen. Tällä tavalla lopetetaan solujen aineenvaihdunta, estetään autolyysi, tapetaan patogeeniset mikro-organismit ja kovetetaan kudokset. Fiksatiivilla kestää sitä kauemmin tunkeutua kudokseen mitä suurempi näyte on ja nopea fiksaatio olisi tärkeää tasaisen säilyvyyden saavuttamiseksi. [4; 17, s. 29.]

### 4.2 Värjäysmenetelmät

Kudosleikenäyte mikroskooppilasilla on usein väritön ja tarvitsee värjäyksen mikroskooppisen tarkastelun mahdollistamiseksi. Värjäysmenetelmää valittaessa on pidettävä mielessä tulosten luotettavuus, vertailukelpoisuus ja näytteestä johtuvat mahdolliset rajoitukset. Tärkeintä on huomioida, mitä leikkeestä halutaan havaita. Esimerkiksi katsotaanko kudosten leikkeistä sen morfologiaa vai halutaanko tarkastella jotakin molekyyliä, sen sijaintia ja aktiivisuutta. Menetelmiä molempia varten on useita, ja niistä on monia eri variaatioita, jotka voivat olla jopa laboratoriokohtaisia. Tunnetuin ja varmaan eniten käytetty kudovärjäystapa on hematoksyliini-eosiinivärjäys (HE). Sen avulla näytteeseen luodaan morfologinen yleiskatsaus. Hematoksyliini, kationimetallikompleksi, värjää anioniset biopolymeerit, kuten DNA:n, RNA:n ja glykosaminoglykaanit siniseksi. Eosiini, anioninen väri, värjää taas kationiset proteiinit punaiseksi. Muita yleisesti käytettyjä värjäysmenetelmiä eri tarkoituksiin ovat muun muassa Periodic Acid-Schiff-, azan-, alcian blue-, paraaldehydifuksiini- ja faulgen-värjäysmenetelmät. Immunohistokemiallinen värjäystekniikka tarjoaa tavan tutkia tautien kulkua ja biologiaa havainnoimalla kudoksissa ilmentyviä molekyyliä. Tutkittava molekyyli tunnistetaan sille

spesifisellä vasta-aineella. Detektointimenetelmä riippuu pitkälti tutkittavan molekyylin määrästä ja sijoittumisesta näytteessä. Antigeenin sijoittuessa pienelle alueelle, ominaisen rakenteensa paljastaen, vasta-aineen sitoutuminen on helppoa ja signaali voimakkaampaa. Kudosnäytteessä hajallaan oleva antigeeni on vaikea havaita, vaikka sitä olisi paljon. Immunohistokemiassa jokainen värjäysmetodi eri antigeenille on optimoitava erikseen. [14, s. 155; 19.]

### 4.3 Fiksaus

Kudosnäytteiden fiksaus on usein erittäin haitallinen antigeenin rakenteelle. Ideaalisessa fiksauksessa antigeeni jää liikkumatta ja säilyttää sekundäärisen tai tertiäärisen rakenteensa, sekä solun luonnollinen rakenne säilyy. Mikään fiksaus ei tähän pysty, aina vähän epitooppeja jää naamioiduksi tai niiden morfologia on muuttunut fiksauksen jäljiltä. Fiksauksen lopputulokseen vaikuttaa valitun aineen lisäksi siihen käytetty aika ja lämpötila. Toistettavuuden takia fiksaus olisi suoritettava aina samalla tavalla. [17, s. 27.]

Formaliinilla fiksausaika vaihtelee kudoksen koon mukaisesti, yleensä 12 tuntia on riittävä. Ylifiksaus aiheuttaa tarpeettoman suuria muutoksia kudoksen negatiiviseen varaukseen heikentäen immunohistokemiallisten metodien käyttömahdollisuuksia. Formaldehydi säilyttää kudoksessa solujen ja solunulkoisen rakenteen reagoimalla proteiinien aminoryhmien kanssa muodostaen lysiinitähteiden välille ristisidoksia, mutta ei kuitenkaan muuta niiden kolmiulotteista rakennetta. Se on hyvä fiksatiivi etenkin pienille molekyyleille, kuten hormoneille, mutta ei kuitenkaan reagoi lipidien kanssa, mikä tekee siitä huonon fiksaustavan solumembraaneille. Kudosleikkeitä varten kudos täytyy kovettaa juoksevalla vahalla, jonka avulla morfologia säilytetään ja kudos voidaan leikata 3 – 10 µm paksuisiksi leikkeiksi. Kudosnäyte ensin pestään ja vesi poistetaan nousevalla etanolisarjalla ja lopuksi näyte käsitellään ksyleenillä tai tolueenilla, joka poistaa etanolin näytteestä. Tämän jälkeen kudospala valetaan sulatettuun parafiiniin, joka jäähtyessään kovettuu niin, että sitä voi veitsenterällä leikata mikrotomissa. Leikkeet asetetaan jo valmiiksi adhesiiviselle tai gelatiini/poly-L-lysiini-käsitellyille mikroskooppilaslle. Valitettavasti näytteestä häviää paljon tietoa kun ne valetaan parafiiniblokkiin. Pienet proteiinit ja nukleiinihapot, kuten siirtäjä-RNA, häviävät käsittelyssä. Neutraalit lipidit yleensä liukenevat orgaanisiin liuottimiin ja makromolekyylit voivat hajota niille epäsopivan pH:n takia. [4; 17, s. 29 - 36; 20.]

Kudoksen jäädytys on kaikkein hellävaraisin tapa säilyttää kudoksen rakenne ja antigeenit hyvänä, minkä takia sitä käytetäänkin eniten tutkittaessa molekyyliä. Valitettavasti jääleikkeestä on kuitenkin vaikea havainnoida morfologiaa ja se vaatii myös kylmäsäilytyksen kudoksenäytteille (- 70 °C) ja näyteleikkeille (- 20 °C). Jääleikkeiden fiksatiivina käytetään usein alkoholipohjaisia fiksatiiveja, kuten asetonia ja metanolia. PFA-fiksaus toimii kuitenkin joillekin antigeeneille paremmin ja on yleensä fiksausmetodia valittaessa mukana. Jääleikkeiden leikkaamiseen käytetään lämpötilasäädelyä kryostaattia ja ne asetetaan myös lopuksi adhesiivisille mikroskooppilaseille. [20; 14, s. 161.]

#### 4.4 Permeabilisointi

Kudosleikkeen esikäsittelyn tarve riippuu siitä, kuinka helposti vasta-aine pääsee kiinnittymään antigeeniin. Värjäys onnistuu vain, jos kudos antaa vapaan reitin vasta-aineelle solujen jokaiseen rakenteeseen. Joissakin tapauksissa antigeenien naamiointia voidaan poistaa proteaasi- ja lämpökäsittelyllä tai niiden yhdistelmällä, mutta nekään eivät aina auta ja niillä ylikäsittely voi tuhota antigeenin. Proteaasikäsittely etsaa kudosta ja paljastaa näin piiloutuneen antigeenin. Näitä proteolyttisiä entsyymejä on useita, joista yksi yleisesti käytetty on proteinaasi K. Se digestoi solukalvon proteiineja ja inaktivoi endogeenisiä nukleaaseja. Proteinaasi K -käsittely, kuten muutkin proteinaasit, täytyy optimoida kudoksen- ja antigeenikohtaisesti. Muunneltavia tekijöitä ovat entsyymin pitoisuus, inkubointilämpötila ja -vaikutusaika. [17, s. 73.]

Lämpökäsittelyssä leikkeet ovat puskurissa, joka kuumennetaan veden kiehumisasteelle. Käsittelyssä muunneltavina tekijöinä ovat käytetty puskurin lämpötila, vaikutusaika ja lämpötilan nostoon käytetty laite. Lämpökäsittelyssä hyväksi havaitut puskurit ovat sitraatti (pH 6), EDTA (pH 8) ja TRIS-HCl -puskurit (pH 1 – 10). Optimilämpötilaa ei ole, vaikkakin tiedetään että se on lähellä veden kiehumispistettä. Lämmitysaika on kymmenestä minuutista tuntiin riippuen lämpötilasta ja antigeenistä. Lämmitykseen käytetään yleisimmin mikroaaltouunia, mutta myös autoklaaveja, höyrykeitin, painekattiloita ja vesihauteita. Lämmityksen jälkeinen jäähdytys yleensä tapahtuu hiljalleen 20 – 30 minuutissa huoneenlämmössä. Lämpökäsittelyn tarkkaa mekanismia ei tunneta, mutta sen oletetaan purkavan formaliinin muodostamat hiili-typikkaksoissidokset peruuttamattomien metyleenisiltojen jäädessä vielä



kudokseen. Lämpökäsittelyn on todettu oikein toteutettuna olevan kuitenkin tehokkaampi kuin proteaasikäsittelyn. [17, s. 41 - 44.]

#### 4.5 Puskurit

Yleisimmät leikepesuissa käytetyt puskurit ovat PBS eli 0,9 % natriumkloridi 0,1 M fosfaattipuskurissa (pH 6,9 - 7,5) ja TBS eli 0,8 % natriumkloridi; 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, (pH 7,2 – 8,0). Trisiä eli hydroksimetyyliaminomeetaaniamia käytetään immunohistokemiassa vähentämään epäspesifisen taustavärin muodostumista. Tris ei omaa puhtaana puskuriominaisuuksia, mutta yhdistettynä suolojen kanssa se puskuroi pH-alueella 7,0 – 9,0. Detergentin, Tween 20, lisäämisellä puskuriin vähennetään myös taustaa poistamalla epäspesifistä leimautumista. PBS vähentää paremmin autofluoresenssia kuin TBS ja se on edullisempi. Se aiheuttaa kuitenkin myös epäspesifistä taustaa ja vähentää joidenkin monoklonaalisten vasta-aineiden kohdalla niiden sitoutumiskapasiteettia. Koska vasta-aine-antigeenisidokset ovat peruuttavissa, ne voivat joskus irrota toisistaan pesujen yhteydessä. Sidoksen pysyvyys vaihtelee vasta-aineiden välillä, mutta purkautumiselle suotuisia olosuhteita pesujen aikana tulisi välttää. Näitä ovat korkeat suolakonsentraatiot, korkea lämpötila ja alhainen pH. [17, s. 82 - 84.]

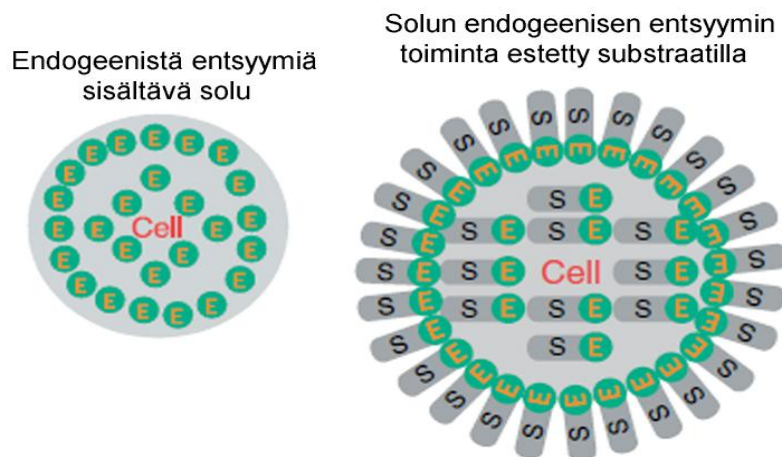
#### 4.6 Vasta-aineet

Antigeeni-vasta-ainereaktion affiniteetti vaihtelee laajasti. Mitä suurempi affiniteetti sidoksella on, sitä pienempi vasta-aineen vaikutusaika tarvitaan, mikä käytännössä tarkoittaa konsentraatioltaan pienempää vasta-ainelaimennosta. Vasta-aineliuoksen konsentraatiota säädetään myös sen vaikutusajan (20 min – 24 h) ja lämpötilan (+ 4 – 37 °C) mukaisesti. Pidemmällä vaikutusajalla löydetään usein kustannustehokkaampi tasapaino vasta-aineen ja antigeenin välillä. Optimaalisen vaikutusajan löydyttyä se on säilytettävä toistettavuuden takia vertailtavissa näytteissä. Yleensä vasta-aineen koolla, muodolla ja konjugaatilla ei ole merkitystä. Tärkeä tekijä on vasta-aineen spesifisyys. Kudisleikkeistä on vaikea todeta mahdolliset ristireaktiot, joten värjäyksiä katsoessa on varovaisesti pääteltävä, ovatko tulokset antigeenin läsnäolosta vai ei toivotusta ristireaktiosta johtuvia. Vasta-aineen ominaisuudet, eli mono- vai polyklonaalinen vasta-aine, sen puhdistus- ja tuotantotapa, sekä valmistajan spesifisyystestaukset, on huomioitava tuloksia tulkittaessa. Primääri- ja sekundääri-vasta-aineen epäspesifistä si-

toutumista estetään käsittelemällä näytekudos sen eläimen seerumilla, missä sekundäärivasta-aineet on tuotettu tai muulla vastaavalla blokkauspuskurilla. [17, s. 7 - 10.]

#### 4.7 Havainnointi

Vasta-aineen leimaustapa valitaan näytekudoksen mukaan, jotta vältetään mahdollisimman hyvin epäspesifiseltä värjäytymisellä. Endogeenistä peroksidaasiaktiivisuutta on monissa kudoksissa. Tämä ominaisuus on esimerkiksi hemoglobiinilla veressä, myosiineilla lihaksessa, sytokromilla valkosoluisissa ja katalaaseilla maksassa ja munuaisissa. Käytettäessä peroksidaasileimausta on estettävä endogeenisen peroksidaasin aktiivisuus ennen primäärivasta-aineen sitoutumista, kuva 6.



Kuva 6. Solun endogeenisen entsyymin tukkiminen eli blokkaus. Mukailten lähdettä [14].

Joissakin tapauksissa entsyymin blokkaava reagenssi voi muuttaa antigeenin epitooppia, jolloin on parempi antaa primäärivasta-aineen ensin sitoutua reaktion varmistamiseksi. Peroksidaasin blokkaukseen käytetään 0,3 – 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-käsittelyä 3 – 30 minuutin ajan laimennettuna puskuriiin tai metanoliin. Metanolin käyttö ei ole suositeltavaa, mikäli tutkitaan solun pintaproteiineja. Endogeenisen alkaalisen fosfataasin, jota löytyy muun muassa munuaisesta, osteoblasteista, endoteelisoluista, neutrofiileistä ja istukasta, estämiseen käytetään 5 mM levamisolea yhdessä kromogeenin substraatin kanssa. Toinen estämiskeino on käyttää heikkoa happoa ennen primääriin käyttöä. Proteiinien ja entsyymien on huomattu myös sitovan biotiinia kudokseen maksassa, munuaisessa ja imukudoksissa endogeenisen avidiini-sitomisaktiiviteetin (EABA) takia. EABA:n estämiseen käytetään sarjoittaista

avidiinikäsittelyä ennen värjäysprotokollaa. Endogeenisten aktiveettien esto voi vaikeuttaa tai jopa estää vasta-aineen sitoutumista, ja siksi on enemmän suositeltavaa vaihtaa havainnointimenetelmää taustavärjäytymisen välttämiseksi. [17, s. 119 - 122.]

Kudosnäytteessä muun muassa elastiset kuidut, lipofuskiini, kollageeni, rasva, hormonit, keratiini ja vitamiini A voivat autofluoresoida. Myös fiksauksessa käytetyt vapaat aldehydit aiheuttavat fluoresenssiä. Autofluoresenssin huomaa parhaiten leikkeistä, joita ei ole käsitelty ollenkaan fluorokromeilla. Autofluoresenssin poistamiseksi voidaan kudos käsitellä glysiinillä, ammoniumkloridilla tai natriumboorihydraatilla. Fluoresenssin havainnointi vaikuttaa hävittävästi fluorokromiin, jolloin fluoresenssin intensiteetti häviää valolle altistumisen johdosta. Aktivoitunut fluorofori voi myös reagoida hapen kanssa menettäen intensiteettiään. Fluoresenssin häviämistä minimoidaan käyttämällä oikeanlaista kiinnitysainetta, kuten Mowiolia. [17, s. 57.]

#### **4.8 Taustavärjäys ja kiinnitys**

Yleensä immunohistokemiavärjäyksien lisäksi leikkeelle tehdään taustavärjäys morfologian havaitsemiseksi ja solujen erottamiseksi. Yleisemmin taustaväreinä käytetään hematoksyliiniä, metyyliivihreää ja nopeaa punaista (fast red). Hematoksyliiniä ja metyyliivihreää käytetään mustien ja ruskeiden kromogeenien kanssa. Taustaväriä valittaessa on huomioitava käytetyn kromogeenin liukoisuus etanoliin. Saman ominaisuuden perusteella valitaan kiinnitysaine. Suositujia kaupallisia vesiliukoisia kiinnitysaineita ovat Gelvatol ja Mowiol. Veteen liukenemattomista kiinnitysaineista mainittakoon DPX. Immunofluoresenssissa morfologian havainnointiin käytetään tumavärjäystä, esimerkiksi Hoechst 3342 -fluorokromia. Se sitoutuu DNA:han ja emittoi valoa sinisen värin aallonpituudella. Sitä käytetään vasta-aineen havainnoinnin yhteydessä, kun sekundääriin konjugoitu fluorokromi emittoi valoa toisella aallonpituudella. Näin pystytään kudoksesta havaitsemaan paremmin vasta-aineen osoittaman molekyylin sijainti. [17, s. 183.]

#### 4.9 **Kontrollit**

Kudoskontrolleja on olemassa negatiivisia, positiivisia ja luontaisia kontrolleja, joiden avulla yritetään löytää värjäystekniikkaan oikeat olosuhteet. Positiivisten kontrollien avulla voidaan arvioida värjäysmenetelmän toimivuus. Positiivisesti värjäytynyt negatiivinen kudoskontrolli kertoo vasta-aineen epäspesifisyydestä tai epäspesifisestä taustavärjäytymisestä. Negatiivisena kontrollina monoklonaalisille vasta-aineille käytetään epäspesifistä immunoglobuliinia samanlaisissa laimennusolosuhteissa tai pelkkää vastaainelaimennospuskuria. Polyklonaalisille vasta-aineille negatiivisena kontrollina käytetään ei-immunisoidun eläimen seerumia samasta eläinlajista, jossa vasta-aine on tuotettu. Laimennusolosuhteiden tulisi olla myös vastaavat. Endogeenisen entsyymin aiheuttama värjäytyminen voidaan todeta värjäämällä leike pelkästään substraatilla. [17, s. 113 - 116.]

### 5 **MATERIAALIT JA MENETELMÄT**

#### 5.1 **Diabeettinen hiirimalli E1-DN**

Transgeeninen hiirimalli on luotu tutkimukseen, jossa tutkittiin epidermaalisen kasvutekijän (EGF) reseptorin rooleja haiman  $\beta$ -solujen toiminnassa. Haiman  $\beta$ -solut säätelevät veren glukoositasoa erittämällä insuliinia. Toimivan EGF-reseptorin puute vaikuttaa toiminnallisten  $\beta$ -solujen määrään. Hiirillä  $\beta$ -solujen määrä lisääntyy vielä syntymän jälkeen. E1-DN -hiirillä tätä ei kuitenkaan tapahdu ja niille kehittyy diabetes. Hyperglykemia homotsygoottisilla E1-DN -hiirillä alkaa noin kaksi viikkoa syntymän jälkeen ja uroshiirillä verensokeriarvot ovat korkeammat kuin naarashiirillä. Myös heterotsygoottisilla hiirillä on alentunut insuliinivaste vatsaontelonsisäisissä glukoositesteissä johtuen pienemmästä  $\beta$ -solumassasta. E1-DN -hiiret ovat selkeästi hyperglykemisia, joten ne sopivat erittäin hyvin hyperglykemian pitkäaikaisvaikutusten, kuten diabeettisen nefropatian, tutkimiseen. [21.]

Näytteinä käytettiin E1-DN -hiirien munuaisten 5  $\mu$ m parafiini- ja jääleikkeitä, jotka oli kerätty vuosien 2007 - 2008 aikana. Näytteet on jaettu neljään ikäryhmään, taulukko 1, joissa on näytteitä homotsygoottisesta, heterotsygoottisesta ja normaalista eli villi tyypin hiirestä.

Taulukko 1. E1-DN -hiiret

Ryhmä	Ikä (vko)	Homotsygootti (kpl)		Heterotsygootti (kpl)		Villityyppi (kpl)	
		jääleike	parafiinileike	jääleike	parafiinileike	jääleike	parafiinileike
1	10 - 14	4	-	2	-	5	-
2	noin 20	6	6	3	2	2	2
3	40 - 50	3	7	3	3	5	5
4	yli 55	3	4	3	4	5	5

Protokollien testauksessa käytettiin pääasiassa homotsygoottisten hiirten kudokset leikkien oletuksena niiden sisältävän eniten apoptoottisia soluja. Useamman hiirileikkeen samanaikaisessa testauksessa käytettiin myös heterotsygoottisia näytteitä ja positiivisten kontrollien luonnissa villityyppiä. Testaukseen käytettiin myös mahdollisimman monen hiiren leikkeitä, sillä näytemäärät olivat rajalliset ja tarkoituksena ei ollut käyttää loppuun jotain hiirityyppiä.

## 5.2

### Fragmentoituneen DNA:n osoittaminen

Fragmentoituneen DNA:n osoittamisessa käytettiin Promega DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System Kitiä (Cat. G7130). Parafiinileikkeillä testattiin taulukossa 2 esitetty protokolla. Proteinaasi K permeabilisointia vaihdeltiin 10 - 30 vaikutusajalla huoneenlämmössä sekä + 30 °C:ssa ja lämpökäsittelyä 350 W - 380 W:n tehoilla 5 - 5,5 min vaikutusajalla. Lämpökäsittelyn yhteydessä kokeiltiin myös biotiinin blokkausta. Biotinyloidun nukleotidin ja peroksidaasin blokkauksen yhteydessä testattiin pidempiä vaikutusaikoja 1 - 1,5 tuntiin ja 3 - 10 minuuttiin.

Parafiinileikkeille kokeiltiin myös taulukossa 2 esitettyjen PFA-fiksausten vähentämistä ja pois jättämistä seuraavasti:

- Ensimmäinen PFA-fiksausaika 5 min
- Ensimmäinen PFA-fiksaus poissa
- Ensimmäinen PFA-fiksaus poissa ja proteinaasi K inkubointi + 37°C
- PFA-jälkifiksaus poissa.

Proteinaasi K -käsittelyaika kaikille leikkeille oli 20 minuuttia.

Taulukko 2. DeadEnd Colorimetric TUNEL System Technical Bulletin [13] perustuva protokolla parafiinileikkeille

<b>Esikäsitteily</b>	Parafiinin poisto alkoholisarjalla	
	3 x ksyleeni	8 min
	2 x 99 % Etanoli	3 min
	96 % Etanoli	3 min
	70 % Etanoli	3 min
	50 % Etanoli	3 min
	30 % Etanoli	3 min
	H <sub>2</sub> O	3 min
	0,85 % NaCl	5 min
<b>Pesu</b>	PBS 5 min	Mikroaaltouunikuuminen 350 W - 380 W 5 – 5,5 min 10 mM Sitraattipuskuri
<b>Fiksaus</b>	4 % PFA 15 min	
<b>Pesu</b>	PBS 5 min	
<b>Permeabilisointi</b>	20 µg/ml proteinaasi K 10-30 min RT - + 30 °C	2 x PBS 5 min
		Biotiinin blokkaukset: 0,1 mg/ml Avidiini 15 min RT
		3 x PBS 2 min
<b>Pesu</b>	2 x PBS 5 min	0,1 mg/ml Biotiini 15 min RT
<b>Jälkifiksaus</b>	4 % PFA 5 min	3 x PBS 3 min
<b>Pesu</b>	2 x PBS 5 min	
<b>Tasapainotus</b>	Tasapainotuspuskuri 5 - 10 min	
<b>Biotinyloidun nukleotidin liittämisen</b>	rTdT-reaktio seos 1 - 1,5 h 37 °C	
<b>Reaktion lopetus</b>	SSC 15 min RT	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>Endogeenisen peroksidaasin blokkaukset</b>	0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3-10 min	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>SA-HRP liittämisen</b>	Streptavidin HRP 30 min RT	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>Värjäys</b>	DAB liuos 9 - 16 min	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>Taustavärjäys</b>	Hematoxylin/Eosin, 30 s/1 min	
<b>Pesu</b>	Juokseva hanavesi 10 min	
<b>Kiinnitys</b>	Immunomount	

Jääleikkeillä testattiin taulukon 3 mukaisesti proteinaasi K permeabilisointia 10 - 20 µg/ml pitoisuuksina 4 - 15 min RT inkubointiaikoina, sekä PFA fiksausta detergentti Triton X-100 permeabilisoinnilla.

*Taulukko 3. DeadEnd Colorimetric TUNEL System Technical Bulletin [13] perustuva protokolla jääleikkeille*

<b>Esikäsittely /Fiksaus</b>	0,85 % NaCl 5 min	4 % PFA 25 min
	PBS 5 min	
<b>Fiksaus</b>	4 % PFA 15 min	
<b>Pesu</b>	2 x PBS 5 min	2 x PBS
<b>Permeabilisointi</b>	10 - 20 µg/ml proteinaasi K 4 - 15 min RT	0,2 % Triton X-100 5 min
<b>Pesu</b>	2 x PBS 5 min	2 x PBS 5 min
<b>Jälkifiksaus</b>	4 % PFA 5 min	
<b>Pesu</b>	2 x PBS 5 min	
<b>Tasapainotus</b>	Tasapainotuspuskuri 5 - 10 min	
<b>Biotinyloidun nukleotidin liittäminen</b>	rTdT reaktio seos 1 - 1,5 h 37 °C	
<b>Reaktion lopetus</b>	SSC 15 min RT	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>Endogeenisen peroksidaasin blokkauus</b>	0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3-10 min	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>SA-HRP liittäminen</b>	Streptavidin HRP 30 min RT	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>Värjäys</b>	DAB liuos 4 - 14 min	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>Taustavärjäys</b>	Hematoxylin 30 s	
<b>Pesu</b>	Juokseva hanavesi 10 min	
<b>Kiinnitys</b>	Immunomount	

Luonnollisen positiivisen kontrollin puuttuessa kontrolli tehtiin DNA:ta fragmentoivalla (7 - 10 U/ml) DNAasi-käsittelyllä taulukossa 2 ja 3 esitettyjen menetelmien esikäsittelyn jälkeen siirtyen suoraan tasapainotusvaiheeseen. Positiivisen kontrollin erilaiset testausolosuhteet on esitetty taulukossa 4. Negatiivinen kontrolli saatiin jättämällä biotinyloidun nukleotidin liittämistä rTdT-entsyymi pois.

Taulukko 4, Positiivisen kontrollin testausolosuhteet

<b>Dnase I pitoisuus U/ml</b>	<b>Inkubointiaika (min)</b>	<b>Lämpötila</b>
7	10	RT
10	12	RT
10	15	+ 30 °C
10	20	RT

### 5.3

#### **Aktiivisen kaspasi-3-proteasin osoittaminen**

Immunofluoresenssidetektoinnissa käytettiin taulukossa 5 esitettyjä menetelmiä. Näytteinä käytettiin ryhmän 4 viiden eri hiiren jääleikkeitä (taulukko 1 s.16). Primäärivasta-aineena käytettiin 1:200 – 1:2000 laimennoksena ChemMatessa Cell Signaling Technologyn Cleaved Caspase-3 (Asp175) kanissa tuotettua polyklonaalista vasta-ainetta. Sekundäärivasta-aineena käytettiin 2 µg/ml AlexaFluor 555 aasissa tuotettua anti-kani-vasta-ainetta.

Taulukko 5. Immunofluoresenssivärjäysprotokollat 2 % paraformaldehydi- ja asetonifiksauksella

<b>Fiksaus</b>	2 % PFA 30 min RT	Asetoni 10 min -20°C
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>Permeabilisointi</b>	0,1 % Triton X-100 10 min RT	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 5 min	
<b>Blokkaus</b>	CAS-block 30 min RT	
<b>Primaari</b>	α-Caspase-3 (rb pAb) $\frac{1}{n}$ + 4 °C	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 10 min	
<b>Sekundääri</b>	AlexaFluor 555 aasi-α-kani (1:1000) + 2 µM Hoechst 33342 1 h RT	
<b>Pesu</b>	3 x PBS 10 min	
<b>Kiinnitys</b>	Mowiol	



Entsyymi-immunohistokemiallisessa menetelmässä, taulukossa 6, käytettiin Vector Laboratoriesin Vectastain ABC (rabbit IgG) Kitiä ja ImmPACT AEC peroxidase substrate -reagenssia [22]. Primäärivasta-aineena käytettiin Cell Signaling Technologyn Cleaved Caspase-3 (Asp175) kanissa tuotettua polyklonaalista vasta-ainetta 1:100 – 1:1000 laimennoksena ChemMatessa. Näytteinä testauksessa käytettiin taulukon 1 (s. 16) ryhmien 2 – 4 kymmenen eri hiiren parafiinileikkeitä.

Taulukko 6. Vectastain ABC -metodissa käytetty protokolla

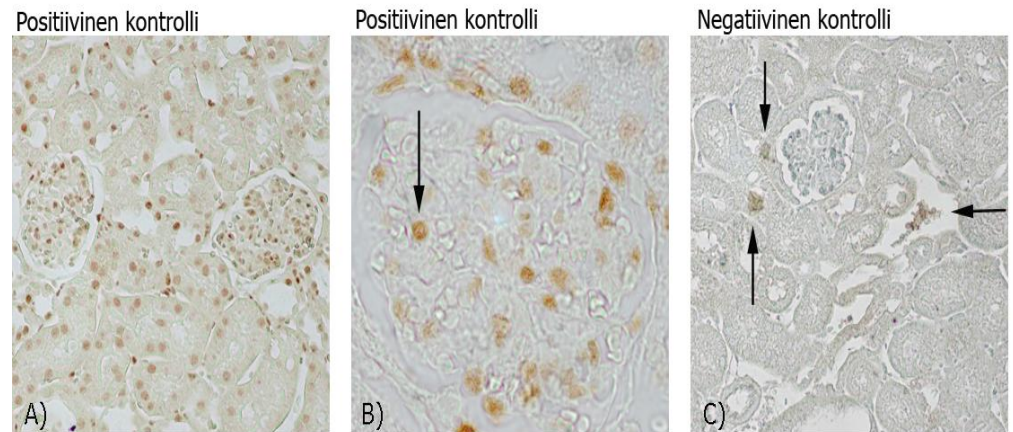
	<b>Parafiinileike</b>
<b>Esikäsittely</b>	Parafiinin poisto alkoholisarjalla
	3 x Ksyleeni 8 min
	2 x 99 % Etanoli 3 min
	96 % Etanoli 3 min
	70 % Etanoli 3 min
	50 % Etanoli 3 min
	30 % Etanoli 3 min
	2 x H <sub>2</sub> O 3 min
<b>Permeabilisointi</b>	Mikroaaltouunikuuminen 90 - 100 °C 1 mM EDTA/10 mM Tris pH 8,0 15 min
<b>Pesu</b>	2 x TBS 5 min
<b>Endogeenisen peroksidaasin blokkaus</b>	1 - 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 - 20 min
<b>Pesu</b>	3 x TBS 5 min
<b>Blokkaus</b>	10 % FBS TBS:ssä / CAS-block 1 h RT
<b>Pesu</b>	3 x TBS 5 min
<b>Primääri</b>	$\alpha$ -Caspase-3 (rb pAb) o/n + 4 °C
<b>Pesu</b>	3 x TBS 5 min
<b>Sekundääri</b>	Vuohi- $\alpha$ -kani vasta-aine (1:200) + Vuohen seerumia (1:40) TBS:ssä 50 min RT
<b>Pesu</b>	3 x TBS 5 min
<b>Avidiini-biotiini-HRP:n liittäminen</b>	Avidiini (1:50) + Biotiini-HRP (1:50) TBS:ssä 45 min RT
<b>Pesu</b>	3 x TBS 5 min
<b>Kromogeeni</b>	AEC-värjäys 11 - 15 min
<b>Pesu</b>	Juokseva hanavesi 20 min
<b>Kiinnitys</b>	Immunomount

Optimoitu entsyymi-immunohistokemiallinen värjäysprotokolla toteutettiin ryhmien 2 - 4 kaikkien hiirten kahdelle parafiinileikkeelle, taulukko 1 (s. 16).

## 6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

### 6.1 DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System –menetelmän testaus

Spesifisen tumavärjäytymisen tunnistamiseksi positiivinen kontrolli tehtiin käyttämällä DNAasi-käsittelyä. Negatiivisten kontrollien avulla seurattiin tumavärjäytymisten luotettavuutta. Kuvassa 7 A ja B on esitetty positiivisten kontrollien spesifinen tumavärjäytyminen.



*Kuva 7. TUNEL-värjäyksen kontrollit. (A ja B) Leikkeissä DNAasi käsittely: 10 U/ml DNase I 15 min + 30 °C, ei taustavärjäystä. (C) Negatiivinen kontrolli proteinaasi K-käsitellylle parafiinileikkeille. Kuvissa (A) 40x, (B) 100x, (C) 20x mikroskooppisuus leikkeestä.*

Parafiinileikkeiden positiivisissa kontrolleissa kaikki tumat värjäytyivät ruskeiksi osoittaen värjäyksen toimivuuden. Voimakas positiivinen kontrolli saatiin aikaan parafiinileikkeelle 10 U/ml DNasi käsittelyllä 15 min + 30 °C:ssa, kuva 7 A ja B. Kuvassa 7 B on nuolella osoitettu yksi monista positiivisista tumavärjäytymisistä. Negatiivisissa kontrolleissa ei ollut spesifistä tumavärjäytymistä, mutta joissain oli havaittavissa nuolilla osoitettua ruskeaa alueita värjäytymistä, kuva 7 C.

Parempi positiivinen kontrolli olisi ollut luonnollinen näyte, jossa tiedetään olevan apoptoottisia soluja, sillä DNAasi-käsitellyn leikkeen perusteella ei voida sanoa kuin että kitti toimii. Sen perusteella ei voi kuitenkaan tietää, ovatko olosuhteet optimaaliset todellisten apoptoottisten solujen tunnistamiseen.

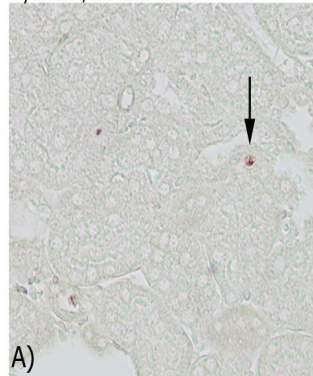
## Permeabilisointi ja fiksausolosuhteiden testaus

Permeabilisointi aloitettiin TUNEL-kitin ohjeiden mukaisesti matalalla proteinaasi K-käsittelyllä kokeilemalla saman mikroskooppilasin kahdelle leikkeelle eri vaikutusaikaa, taulukko 7 ja kuva 8.

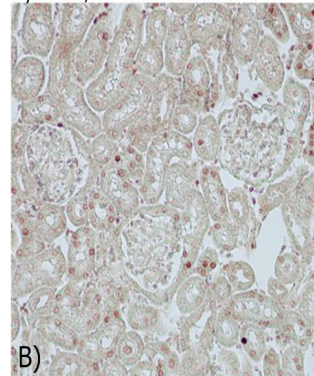
Taulukko 7. Proteinaasi K vaikutusajan ja lämpötilan testaustulokset

Näytteet (ryhmä ja kpl)	Vaikutusaika (min)	Lämpötila	Tulos
Ryhmä 3 3 x 2	11	RT	neg
Ryhmä 2 1	11	RT	neg
Ryhmä 3 1	12	RT	neg
Ryhmä 3 2 x 2	14	RT	neg
Ryhmä 2 1	15	RT	neg
Ryhmä 3 1	15	RT	epäspesifinen
Ryhmä 2 2 x 2	30	RT	pos/neg
Ryhmä 3 2	30	RT	heikko pos
Ryhmä 4 1	30	RT	epäspesifinen
Ryhmä 2 2 x 2	20	+ 30°C	neg

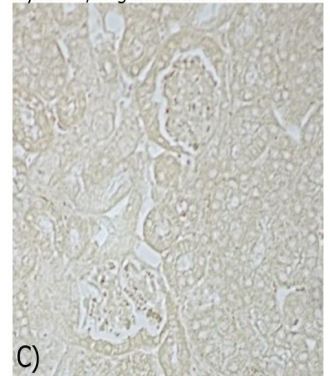
Ryhmä 3, 30 min vaikutusaika



Ryhmä 4, 30 min vaikutusaika



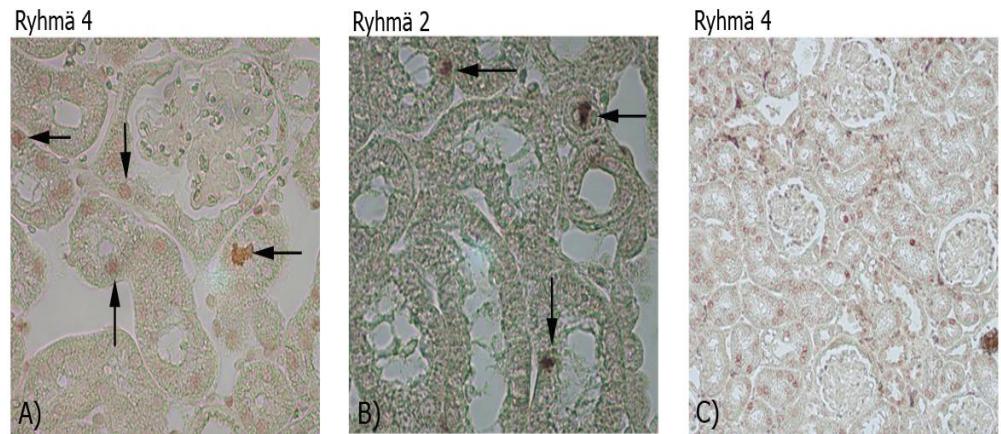
Ryhmä 4, negatiivinen kontrolli



Kuva 8. TUNEL-värjäys proteinaasi K 20 µg/ml permeabilisoinnilla (A) ryhmän 3 ja (B ja C) 4 parafiinileikkeille 30 min vaikutusajalla. (C) Ryhmän 4 leikkeen negatiivinen kontrolli. Kuvissa (A) 40x ja (B ja C), 20x mikroskooppisuurennois leikkeestä.

Tulokset eivät olleet johdonmukaisia permeabilisoinnin vaikutusajan suhteen. Spesifistä värjäytymistä löytyi muutamista 30 min vaikutusajan leikkeistä, mutta saman käsittelyn tuloksissa oli myös runsasta epäspesifistä värjäytymistä ja myös negatiivisia leikkeitä. Tulokset eivät olleet toistettavia kaikille leikeryhmille. Proteinaasi K -käsittely ei selvästi sopinut kaikille näyteleikkeille, ja syy siihen voi löytyä leikkeiden varastointi- tai formaliinifiksausajojen eroista.

Yhtenäisen permeabilisointitavan ja luotettavien tulosten saamiseksi kokeiltiin Promegalta neuvottua lämpökäsittelyä, jossa leikkeet lämpökäsiteltiin mikroaaltouunissa [16]. Testauksessa käytettiin ryhmän 4 kolmen eri hiiren leikkeitä rinnakkaisleikkeiden kera. Leikkeissä vahvasti värjäytyneet tumat olivat morfologialtaan omituisen muotoisia, kuva 9 A.



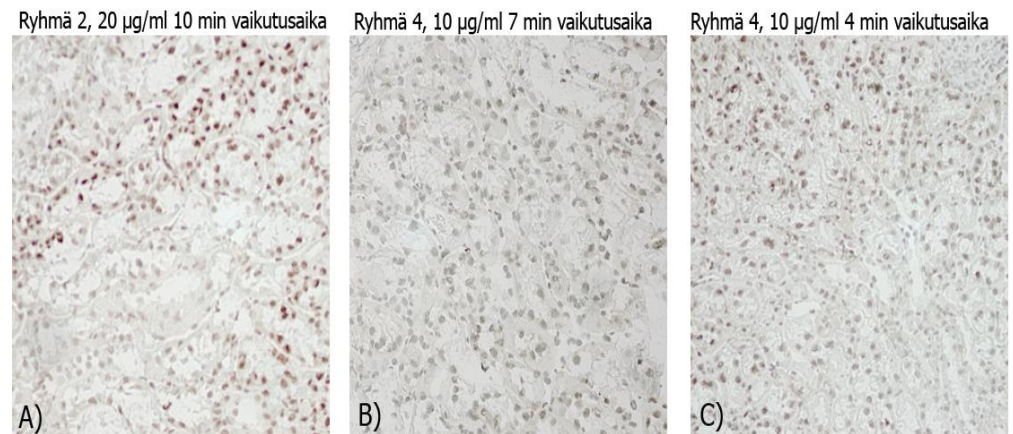
Kuva 9. TUNEL-värjäys, joissa permeabilisointina käytetty mikroaaltouunilämpökäsittelyä 5 min ryhmän 4 eri hiirien leikkeille. (A) Noin . 370 W teholla käsitelty leike. (B ja C) Leikkeiltä blokattu biotiini ennen lämpökäsittelyä. Kuvissa (A ja B) 40x ja (C) 20x mikroskooppisuurennoa leikkeestä.

Toistetun värjäyksen tulos vaikutti erittäin herkältä lämpötilakäsittelyn pienille muutoksille. Lämpökäsittelyn yhteydessä kokeiltiin, tiedettävästi munuaisista löytyvän, endogeenisen biotiinin blokkausta ryhmien 2, 3 ja 4 leikkeille rinnakkaisleikkeiden kera. Yhdestä leikkeestä löytyi useampikin spesifiseltä värjäytymiseltä vaikuttava tuma, mutta myös morfologisesti arveluttavaa värjäytymistä, kuva 9 B. Ryhmän 4 leikkeissä oli runsaasti paikallisia epäspesifisiä värjäytymisalueita, jotka havainnollistettu kuvassa 9 C. Lämpökäsittelyn optimoimista olisi voinut jatkaa pidemmälle, mutta myös sen varhaiset tulokset viittaavat leikkeiden erilaisuuteen.

Värjäysmenetelmässä käytettiin valmistajan ohjeen mukaan parafiinileikkeille PFA-fiksausta ennen ja jälkeen permeabilisoinnin. Huomio kiinnittyi tähän, sillä osassa muiden valmistajien TUNEL-kittien ohjeistuksissa sitä ei ollut. Tästä syystä kokeiltiin myös PFA-fiksausten muutosten vaikutusta värjäytymiseen ryhmän 3 ja 4 eri hiirien kahdelle rinnakkaisleikkeelle: Kaikista näistä leikkeistä löytyi värjäytymää, joka vaikutti suurimmaksi osaksi epäspesifiseltä. Tulokset eivät vaikuttaneet niin luotettavilta, että kokeiluja tällä saralla olisi kannattanut jatkaa.



Jääleikkeitä käyttämällä vältettiin parafiiniblokkien fiksauksesta ja permeabilisoinnista johtuvat erot, mutta kohdattiin toisenlainen ongelma permeabilisoinnin parissa. Tuloksena oli voimakas epäspesifinen tumien värjäytyminen, vaikka proteinaasi K:n käsittelyaika vähennettiin 4 minuuttiin ohjeistuksen 10 minuutista ja pitoisuuskin puolitettiin, kuvassa 10.



*Kuva 10. TUNEL värjäys proteinaasi K permeabilisoinnilla (A) ryhmän 2 ja (B ja C) 4 hiirien leikkeille, kuvattu 20x mikroskooppisuurenoksella. (A) Proteinaasi K 20 µg/ml käsittely 10 min RT. (B) Proteinaasi K 10 µg/ml käsittely 7 min. (C) Proteinaasi K 10 µg/ml käsittely 4 min.*

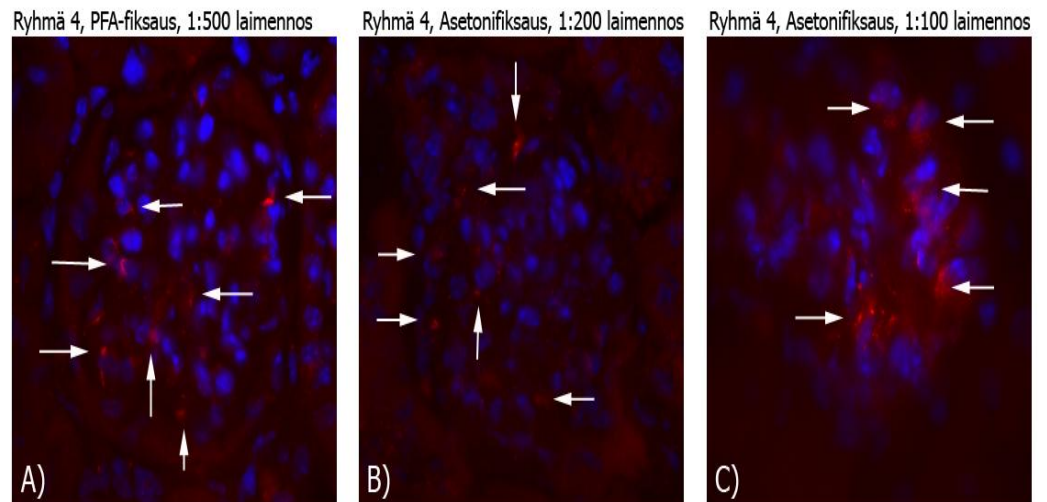
Leikkeissä esiintyi värjäytymäraitoja, jotka luultavasti johtuivat leikkeen paksuuseroista. Proteinaasi K -käsittely oli liian voimakas, joten protokolla vaihdettiin valmistajan soluille tarkoitettuun protokollaan (taulukko 3 s. 18). Värjäys tehtiin ensimmäiseksi ryhmän 1, 2 hiirien leikkeille. Negatiiviset tulokset ja vahvat värjäytymiserot leikkeen taustassa loivat epäilyksen spesifisen tumavärjäytymisen onnistumisesta. Soluprotokollaa kokeiltiin vielä myös ryhmän 4 leikkeille, pidentäen samalla DAB-värjäysaika 5 minuutista 14 minuuttiin, jolloin tuloksena oli kaikkien tumien epäspesifinen värjäytyminen.

Jääleikkeille tehtyjen TUNEL-värjäyksien perusteella voidaan todeta lopullisen värjäytymisen riippuvan paljon leikkeestä. Värjäytymiserot leikkeiden välillä ja pelkästään leikkeen sisällä olivat suuria. Osa vanhemmista leikkeistä ei kestänyt värjäystä vaan irtoili lasilta, minkä vuoksi niistä oli vaikea tulkitä mitään. Luotettaviin tuloksiin ei päästy jääleikkeiden avulla.

## 6.2

**Kaspaasi 3:n osoittaminen immunofluoresenssi- ja peroksi-  
daasivärjäyksillä**

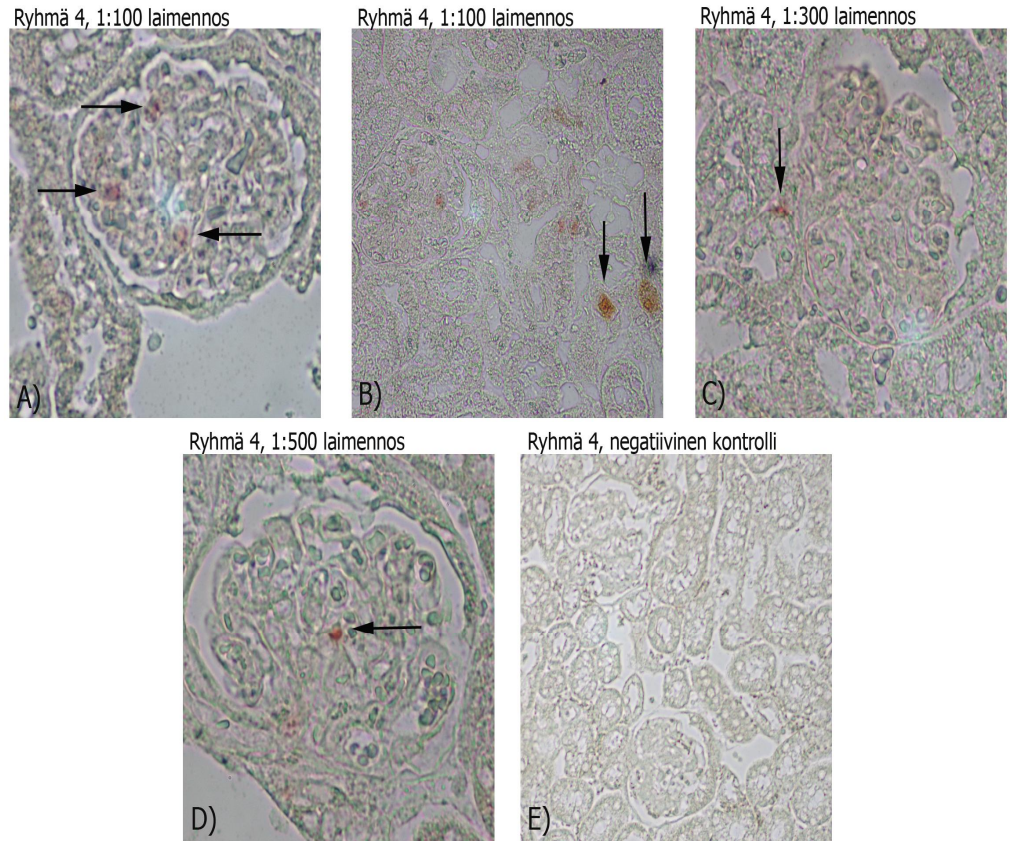
Immunofluoresenssivärjäystä kaspaasi-3 vasta-aineella kokeiltiin sekä PFA-että asetonifiksatuille ryhmän 4 homotsygoottisille jääleikkeille. Asetonifikaation yhteydessä kokeiltiin viittä eri vasta-ainelaimennossuhdetta. PFA-fiksauksen yhteydessä kokeiltiin kolmea eri vasta-ainelaimennossuhdetta. Tumavärjäyksenä käytettiin Hoechst 33342 -reagenssia, jotta glomerulukset voidaan tunnistaa leikkeestä. 1:100-, 1:200-, 1:500-vasta-ainelaimennoksista löytyi värjäytymää kummallakin fiksaustavalla, kuva 11. Immunofluoresenssivärjäykset mikroskoipoitiin Zeiss Axiophot 2-mikroskoopilla.



*Kuva 11. Kaspaasi-3-vasta-ainevärjäys immunofluoresenssileimauksella ryhmän 4 jääleikkeille 63x mikroskooppisuurennoksella. (A) PFA-fiksatus ja (B ja C) asetonifiksatus leikkeissä nähdään punaisena kaspaasi-3-värjäys ja sinisenä tumaväri. Mahdolliset apoptoottiset solut merkitty nuolilla. (A) 1:500-vasta-ainelaimennoksella. (B) 1:200-vasta-ainelaimennoksella. (C) 1:100-vasta-ainelaimennoksella.*

Yleisesti katsottuna PFA-fiksaus vaikutti paremmalta kuin asetonifiksatus. Negatiivinen kontrolli tehtiin molempien fiksauksien yhteydessä ja tuloksissa näkyi ainoastaan sininen Hoechst 33342 -tumavärjäytyminen. Fluoresenssivärjäyksen perusteella oli kuitenkin hankalaa laskea, kuinka monta apoptoottista solua on glomeruluksessa, koska leikkeen morfologia ei erotu selkeästi.

Vasta-ainevärjäyksen ABC-menetelmässä optimoitiin sopiva vasta-ainepitoisuus ryhmän 4 leikkeille. Kokeiltavat laimennossuhteet olivat 1:100, 1:300, 1:500 ja 1:1000, kuva 12.



*Kuva 12. Kaspasi-3-vasta-ainevärjäykset ABC-leimauksella ryhmän 4 leikkeille eri laimennossuhteilla. (A, C, D) Nuolilla merkitty spesifinen värjäytyminen ja (B) epäspesifinen ruskea värjäytyminen. (A ja B) Vasta-ainelaimennossuhde oli 1:100. (C) Vasta-ainelaimennossuhde oli 1:300. (D) Vasta-ainelaimennossuhde oli 1:500. (E) Negatiivinen kontrolli. Kuvissa (A, C ja D) 40x ja (B ja E) 20x mikroskooppisuuslupaus.*

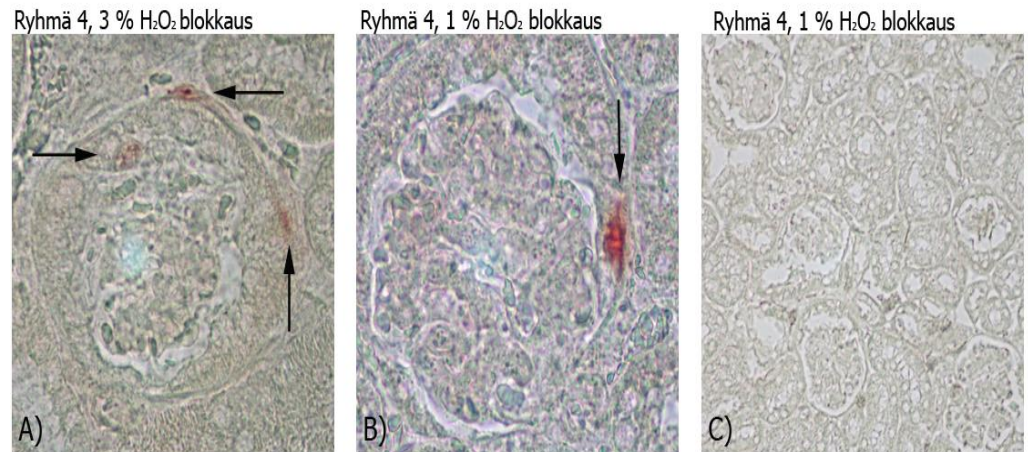
Laimennossuhteen 1:100 leikkeissä oli runsaasti positiivista värjäytymää. Leikkeissä oli myös rusehtavaa taustavärjäytymistä, kuva 12 B. Suuremman laimennossuhteen leikkeissä värjäytyminen oli vähäisempää, ja laimennoksen 1:500 leikkeessä oli myös havaittavissa epäspesifistä reunaefektiä. Laimennoksessa 1:1000 ei enää ollut mainittavaa värjäytymistä.



Taustavärjäytymisen poistamiseksi endogeenisen peroksidaasin blokkausta tehostettiin nostamalla  $H_2O_2$ -käsittelyn pitoisuutta 3 % ja aikaa 20 minuuttiin. Taustan vähentämiseksi kokeiltiin myös käsittelyä 10 % naudan sikiön seerumilla (FBS) kaupalliseen CAS-block-reagenssiin verrattuna. Vastainelaimennussuhteina käytettiin 1:200 ja 1:400. Värjäykset tehtiin ryhmän 4 leikkeille, joista osa oli vanhempia ja osa tuoreempia näytteitä.

- Kolmen eri hiiren kahdella leikkeellä 1 %  $H_2O_2$ -käsittely 20 min
- Kolmen eri hiiren kahdella leikkeellä 3 %  $H_2O_2$ -käsittely 20 min

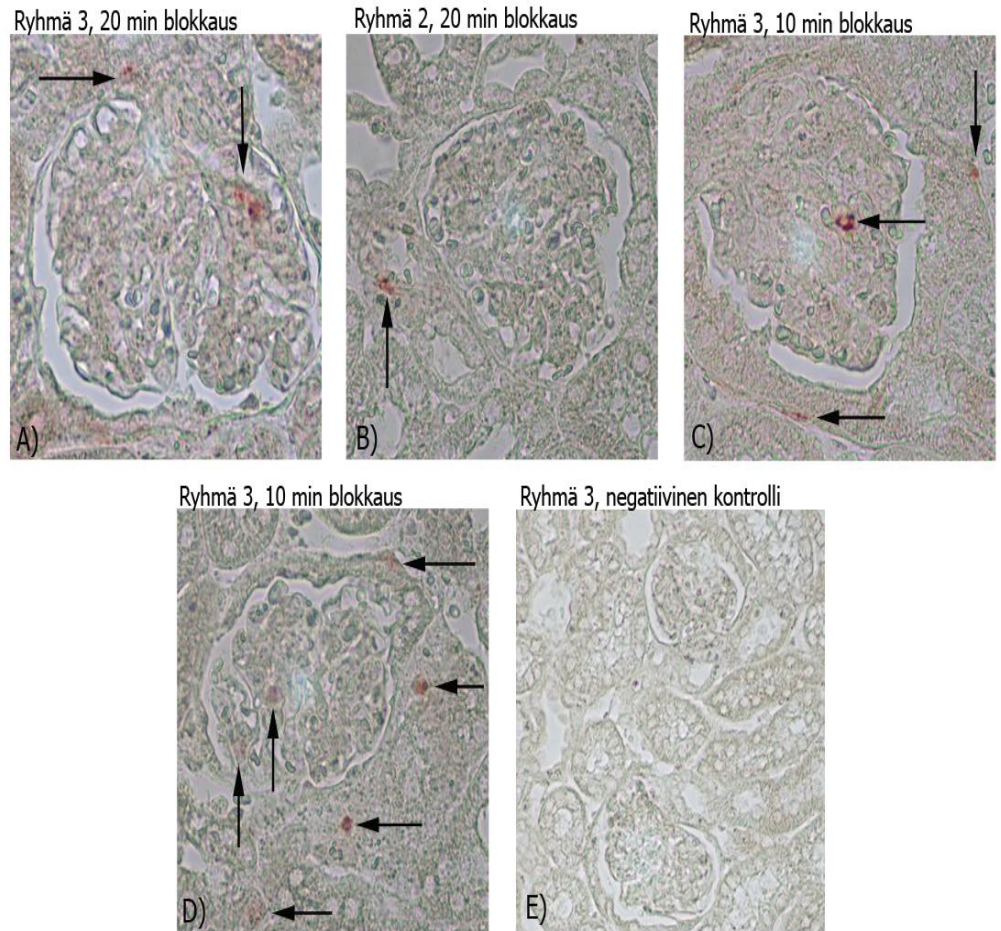
Vain uudemmilta leikkeiltä oli löydettävissä positiivista värjäytymää (kuva 13), vaikka edellisellä värjäyskerralla vanhoissakin näytteissä oli useita positiivisia värjäytyimiä.



*Kuva 13. Kaspaasi-3-vasta-ainevärjäys ABC-leimauksella 1:200 vastainelaimennoksella ryhmän 4 leikkeille. (A) 3 %  $H_2O_2$ - ja CAS-block-käsittely. (B) 1 %  $H_2O_2$ - ja FBS-blokkauk. (C) 1 %  $H_2O_2$ - ja FBS-blokkauk. Kuvissa (A ja B) 40x ja (C) 20x mikroskooppisuurenos.*

Mahdollisesti peroksidaasin pidennetty blokkauk oli haitallinen vasta-aineen sitoutumiselle vanhemmissa näytteissä. Värjäytistä leikkeistä pystyttiin kuitenkin havainnoimaan, että 1:200-laimennos oli parempi. Ennen suurempia sarjavärjäyksiä varmistettiin, että värjäysprotokolla toimii kaikille leikkeille, kun endogeenisen peroksidaasin estossa käytetään 1 %  $H_2O_2$ -liuosta 10 – 20 minuutin vaikutusajalla. Testauksessa käytettiin ryhmien 2 - 4 neljän eri hiiren leikkeitä rinnakkaisvärjäyksiä kera. Ryhmän 3 ja 2 leikkeistä löytyi positiivisia värjäytyimiä, kuten myös edellisessä värjäyksessä negatiiviseksi jääneen ryhmän 4 hiiren leikkeistä, kuva 14.





Kuva 14. Kaspasi-3-vasta-ainevärijäys ABC-leimauksella ryhmän 3 (A) ja 2 (B) hiirileikkeille peroksidaasin estokäsittelyn kestäessä 20 min, sekä ryhmän 3 (C) ja 4 (D), leikkeille peroksidaasin estokäsittelyn kestäessä 10 min. (E) Negatiivinen kontrolli.

Peroksidaasin blokkauksen vaikutusajalla ei ollut vaikutusta taustavärijäytymiseen ja kaspasi-3-vasta-ainevärijäyksellä pystytään detektoimaan apoptoottisia soluja kaikista neljästä hiirileikeryhmästä.

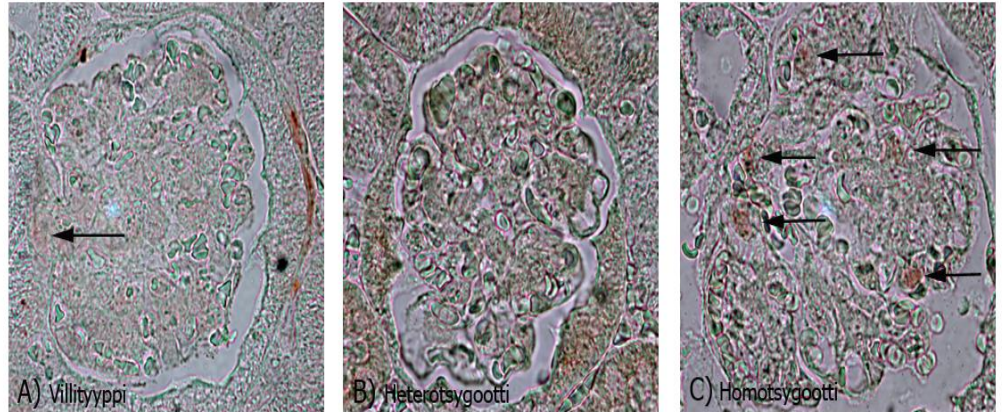
Kaikkien hiirien kahdelle rinnakkaiselle leikkeelle tehtiin värijäysprotokollan (taulukko 6 s. 20) mukainen värijäys noudattaen seuraavia optimoituja olosuhteita:

- Endogeenisen peroksidaasin blokkauks 1 %  $H_2O_2$ -käsittelyllä 10 min RT
- Epäspesifisen vasta-aineen sitoutumisen blokkauks  
10 % FBS TBS:ssä 1 h RT
- Primäärivasta-aineen laimennossuhde 1:200
- AEC-värijäyksen kesto 15 min.

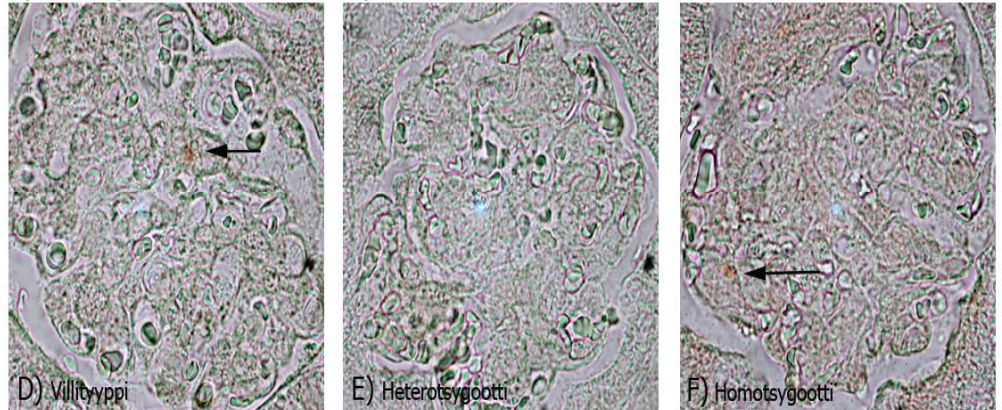


Jokaisen hiiren kahdesta leikkeestä valittiin toinen, ja siitä kuvattiin kymmenen sattumanvaraisesti valittua glomerulusta 100x suurennoksella, kuva 15.

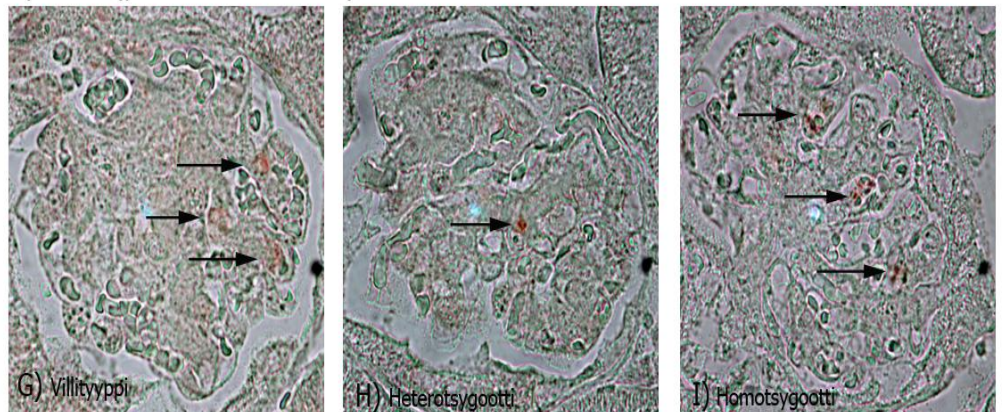
Ryhmä 2 (noin 20 vko vanhat hiiret)



Ryhmä 3 (40 - 50 vko vanhat hiiret)

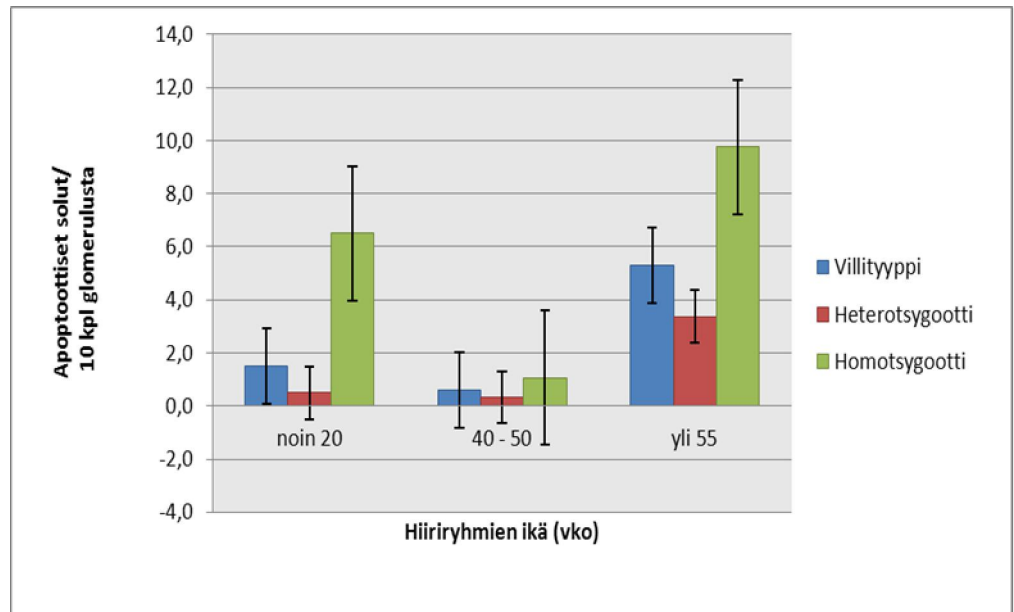


Ryhmä 4 (yli 55 vko vanhat hiiret)



Kuva 15. Esimerkkikuvat tulosten analysointiin käytetyistä glomeruluksista, kuvattu 100x mikroskooppisuurennoksella. Vaakasuoraan kuvat ovat ikäryhmittäin ja pystysuoraan hiirityypeittäin. Nuolilla on merkitty apoptoottiset solut.

Kymmenestä glomeruluksen kuvasta kaksi henkilöä laski erikseen apoptoottiset solut. Kuvassa 16 on esitetty apoptoottisten solujen määrä hiiren genotyypin ja ikäryhmän mukaan.



Kuva 16. Pylväsdiagrammi apoptoottisten glomerulussolujen määrästä hiiren genotyypin ja iän mukaan. Pylväät osoittavat ryhmän keskiarvon ja viivat keskivirheen.

Tulosten perusteella todettiin apoptoosia olevan määrällisesti, diabeettisten hiirten glomeruluksissa, selvästi enemmän 20 viikon iässä. Tässä iässä niille myös kehittyi merkittävä albumiiniuria. Vain genotyypiltään homotsygoottisilla E1-DN-hiirillä on pysyvästi kohonnut verensokeritaso, joten heterotsygoottiset ja villityypin hiiret analysoitiin yhdessä verrokkiryhmänä, taulukko 8.

Taulukko 8. Ryhmäkohtaiset tulokset (apoptoottista solua/10 glomerulusta) ja hiirityyppien välisten erojen tilastollinen merkitsevyys T-testillä (merkitsevä ero < 0,05 > ei merkitsevää eroa)

	Villityyppi ja Heterotsygootti	Homotsygootti
Noin 20 vkon ikäiset hiiret		
Keskiarvo	1	6,5
Keskihajonta	0,8	4,1
T-testi		0,02
40 - 50 vkon ikäiset hiiret		
Keskiarvo	0,5	1,1
Keskihajonta	0,6	1,2
T-testi		0,29
Yli 50 vkon ikäiset hiiret		
Keskiarvo	4,4	9,8
Keskihajonta	2,9	2,7
T-testi		0,01

Myös iäkkäiden, yli 55 viikon ikäisten hiirten ryhmässä diabeettisilla hiirillä todettiin glomerulussolujen apoptoosia merkitsevästi enemmän kuin verro-keilla. Keskimmaisessä ikäryhmässä ei todettu eroa diabeettisten hiirten ja verrokkien välillä, mikä voi kuvastaa tasaantumisvaihetta podosyyttivaurion kehittymisessä. Apoptoosin määrän glomeruluksissa todettiin kasvavan iäk-käissä hiirissä kaikissa hiirityypeissä. Tämän tutkimuksen tulokset osoittavat, että kohonneella verensokerilla on yhteys apoptoosin määrään glomeruluk-sissa.

## 7 YHTEENVETO

Apoptoosin todellista määrää näytteessä on todella vaikea määrittää, sillä solut käyvät apoptoosin läpi nopeasti eivätkä lopulta jätä jälkeä kudokseen. Sattumanvaraista vaihtelua tuovat myös näytteenottohetki ja tutkittavan leikkeen kohta kudoksesta. Tämän vuoksi apoptoosin määrää voidaan verrata vain täsmälleen samalla tavalla käsiteltyjen ja analysoitujen näytteiden välillä. E1-DN -hiirimallin ja sen verrokkiryhmän näyteleikkeiden kohdalla TUNEL-tekniikalla ei onnistuttu täyttämään näitä vaatimuksia. TUNEL-tekniikka on todella herkkä pienillekin protokollan vaihtelutekijöille, ja siksi se oli liian epäluotettava. TUNEL-tekniikan optimointi olisi vaatinut luonnollisen positiivisen kontrollin ja täysin samalla tavalla säilötyt ja leikatut näytteet. Immuno-peroksidaasivärjäyksissä huomattiin myös leikekohtaisia värjäytymiseroja endogeenisen peroksidaasin estoa optimoitaessa. Nämä erot onnistuttiin kuitenkin korjaamaan ja luotettava värjäysprotokolla luomaan kaikille neljälle hiiriryhmälle. Immunofluoresenssilla kaspasasi-3-vasta-ainevärjäykset onnistuivat myös, mutta apoptoosin kvantitatiivinen arvioiminen sytosolisesta värjäytymästä oli vaikeampaa kuin peroksidaasivärjäyksestä. Tästä syystä parhaimmaksi apoptoosin detektointimenetelmäksi diabeettisessa hiirimallissa valittiin kaspasasi-3-immunoperoksidaasivärjäys ABC-leimauksella. Värjäykset kaikille näiden neljän ikäryhmän hiirten parafiinileikkeille tehtiin optimoiduilla vaihtelutekijöillä taulukon 6 (s. 20) mukaisesti. Leikkeistä laskettiin apoptooppiset solut sattumanvaraisesti valituista kymmenestä glomeruluksesta. Tuloksien perusteella diabeettisten hiirten glomeruluksissa on keskimääräisesti enemmän apoptoosia kuin verrokeissa. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että korkealla verensokerilla on yhteys glomerulusolujen apoptoosin määrän kanssa.

## VIITELUETTELO

- [1] Groop, P. & Forsblom, C.. *Diabeettinen nefropatia*. Kandidaattikustannus Oy. [verkkodokumentti, viitattu 23.6.2010]. Saatavissa: [http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Diabeettinen\\_nefropatia](http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Diabeettinen_nefropatia).
- [2] Metsärinne, K.. *Diabeettinen nefropatia*. Duodecim. [verkkodokumentti, viitattu 23.6.2010]. Saatavissa: <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo93974.pdf>.
- [3] Greenberg, A.. *Primer on kidney diseases, 5 th edition*. Philadelphia: National Kidney Foundation. 2009.
- [4] Ross, M. & Wojciech, P.. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. Lippincott Williams & Wilkins. 2006.
- [5] Patton, K.. *Urinary System*. Lion Den. [verkkodokumentti, viitattu 27.7.2010]. Saatavissa: <http://www.theaprofessor.org/image-urinary.html>.
- [6] Fioretto, P. & Mauer, M.. *Histopathology of diabetic nephropathy*. [verkkodokumentti, viitattu 27.7.2010]. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2746982/pdf/nihms22358.pdf>.
- [7] Wagener, F. A. ym. *The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney*. [verkkodokumentti, viitattu 2.8.2010]. Saatavissa: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2773115/pdf/10495\\_2009\\_Article\\_359.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2773115/pdf/10495_2009_Article_359.pdf).
- [8] Duan, W. R. ym. *Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts*. John Wiley & Sons, Ltd. John Wiley & Sons, Ltd. [verkkodokumentti, viitattu 2.8.2010]. Saatavissa: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1289/pdf>.
- [9] *Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody #9661*. Cell Signaling Technology. [verkkodokumentti, viitattu 24.8.2010]. Saatavissa: <http://www.cellsignal.com/pdf/9661.pdf>.
- [10] Lorzym, C. ym. *The death ligand TRAIL in diabetic nephropathy*. [verkkodokumentti, viitattu 2.8.2010]. Saatavissa: <http://jasn.asnjournals.org/cgi/reprint/19/5/904>.
- [11] Garrity, M. M. ym. *Identifying and quantifying apoptosis: navigating technical pitfalls*. [verkkodokumentti, viitattu 27.6.2010]. Saatavissa: <http://www.nature.com/modpathol/journal/v16/n4/pdf/3880776a.pdf>.
- [12] Jerucym, J. ym. *Immunohistochemical expression of activated caspase-3 as a marker of apoptosis in glomeruli of human lupus nephritis*. [verkkodokumentti, viitattu 27.6.2010]. Saatavissa: <http://www.ajkd.org/article/S0272-6386%2806%2900952-8/abstract>.

- [13] Promega. *DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System instructions for use of products G7130 and G7360*. Promega Corporation. [verkkodokumentti, viitattu 23.6.2010]. Saatavissa: <http://www.promega.com/tbs/tb199/tb199.pdf>.
- [14] Harlow, E. & Lane, D.. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1999.
- [15] Pheonix Flow Systems. *Apo-BrdU TUNEL Assay*. [verkkodokumentti, viitattu 2.9.2010]. Saatavissa:<http://www.phnxflow.com/apobrdu.html>
- [16] Negoescu, A. ym. *TUNEL: Improvement and evaluation of the Method for In situ Apoptotic Cell Identification No. 2*. Biomedica. 1997.
- [17] Editor Hey, M.. *Pathology Education guide: Immunohistochemical Staining Methods*. Dako. [verkkodokumentti, viitattu 25.8.2010]. Saatavissa: [http://pri.dako.com/08002\\_25may06\\_ihc\\_guide\\_book.pdf](http://pri.dako.com/08002_25may06_ihc_guide_book.pdf).
- [18] Portera, A. & Jänicke, R.. *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. Cell Death and Differentiation. [verkkodokumentti, viitattu 2.9.2010]. Saatavissa: <http://www.nature.com/cdd/journal/v6/n2/pdf/4400476a.pdf>.
- [19] Horobin, R. W. & Bancroft, J. D. *Troubleshooting histology stains*. New York:Churchill Livingstone. 1998.
- [20] Arstila P. ym. *Immunological methods*. Helsinki: Helsingin yliopisto, Haartman-instituutti, bakteriologian ja immunologian osasto. 2009.
- [21] Miettinen, P. ym. *Downregulation of EGF Receptor Signaling in Pancreatic Islets Causes Diabetes Due to Impaired Postnatal -Cell Growth*. [verkkodokumentti, viitattu 8.8.2010]. Saatavissa: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/55/12/3299.full.pdf+html>.
- [22] Vector Laboratories. *Vectastain ABC Kit*. [verkkodokumentti, viitattu 8.8.2010]. Saatavissa: <http://www.reactolab.ch/vectorpdf/PK6100.pdf>.