

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Patologia

2013

Minna Grönroos

MAKSAKUDOSNÄYTTEIDEN HISTOLOGINEN VERTAILU VILLITYYPIN JA HSD17 β 13- POISTOGEENISEN HIIREN VÄLILLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikka | Patologia

Toukokuu 2013 | 39 + 9

Sanna Virtanen, Leena Strauss, Marion Adam

Minna Grönroos

MAKSAKUDOSNÄYTTEIDEN HISTOLOGINEN VERTAILU VILLITYYPIN JA HSD17B13- POISTOGEENISEN HIIREN VÄLILLÄ

Hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17 β (HSD17 β) entsyymit ovat monitoiminen proteiiniiryhmä, jotka esimerkiksi aktivoivat steroidihormoneja. HSD17 β -entsyymit ovat myös potentiaalinen ryhmä uusia kohdemolekyylejä kehitettäessä lääkeaineita hormonaalisiin sairauksiin, kuten rinta- ja eturauhassyöpiin. Hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17 β tyyppi 13 (HSD17 β 13) on uusin löydetty HSD17 β -entsyymien tyyppi, jonka uskotaan olevan maksaspesifinen ja vaikuttavan solujen rasva-aineenvaihduntaan, mutta sen toimintaa ei tarkalleen vielä tunneta.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää HSD17 β 13-geenin poistamisen vaikutuksia hiiren maksakudoksen histologiaan. Tutkimuksessa verrattiin villityyppien ja HSD17 β 13-poistogeenisten koe-eläinhiirten maksakudosnäytteitä, joista valmistettiin histologisin menetelmin parafiinileikkeitä. Leikkeille suoritettiin kolme eri histologista värjäystä. Tutkimuksessa oli mukana sekä uros- että naarashiiriä.

Tuloksissa suurimmalla osalla HSD17 β 13-poistogeenisistä uroksista havaittiin runsaasti maksasoluihin kerääntynyttä rasvaa sekä vähäisiä leukosyyttikertymiä. Villityypin uroksilla ei ollut havaittavissa merkittävää maksasolujen rasvoittumista. Naarailla ero villityypin ja HSD17 β 13-poistogeenisen kannan välillä ei ollut yhtä selkeä kuin uroksilla. Molemmilla naaraskannoilla oli urokseen verrattaessa enemmän leukosyyttikertymiä. Tutkimus osoitti, että HSD17 β 13-entsyymillä saattaa olla yhteyttä maksakudoksen rasva-aineenvaihduntaan.

ASIASANAT:

Maksakudos, Hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17 β , histologia, poistogeeninen hiiri

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science | Pathology

May 2013 | 39 + 9

Sanna Virtanen, Leena Strauss, Marion Adam

Minna Grönroos

COMPARISON OF LIVER TISSUE SAMPLES OF WT AND HSD17B13 KO MICE BY HISTOLOGICAL METHODS

17 β hydroxysteroid dehydrogenases (HSD17 β) enzymes belong to a large, multifunctional group of proteins that affects among other things the biological activity of steroid hormones. HSD17 β enzymes are a group of potential target molecules in development of new drugs for hormonal diseases, such as breast and prostate cancers. 17 β hydroxysteroid dehydrogenases type 13 (HSD17 β 13) is a new family member of the HSD17 β enzymes. It is liver specific, and it might affect the lipid metabolism, but its specific function is still unknown.

The aim of this study was to examine how the HSD17 β 13 gene removal effects on the histology of the mouse liver tissue. The study compared liver tissue samples of wild type (WT) and HSD17 β 13 knockout (KO) mice using histological methods. Liver tissues were embedded in paraffin, sectioned and slides were stained with three different histological stainings. The study included both male and female mice.

The results showed that most of the HSD17 β 13 KO males had high levels of fat in the liver cells and some leukocyte infiltration in the liver. In WT males there was no significant fat accumulation in the liver cells. In females the difference between WT and HSD17 β 13 KO mice was not as clear as in males. In general, there were more leukocytes in the both female groups as compared to the males. The study showed that HSD17 β 13 enzyme might be associated with liver tissue lipid metabolism.

KEYWORDS:

Liver tissue, 17 β hydroxysteroid dehydrogenases, histology, KO mice

SISÄLTÖ

SANASTO	5
1 JOHDANTO	6
2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA	7
2.1 HSD17 β	7
2.2 HSD17 β 13	9
2.3 Geenimuunnellut hiiret	10
2.4 Hiiren maksa	11
2.5 Histologiset menetelmät	13
2.5.1 Näytteiden keruu	13
2.5.2 Näytteiden fiksointi ja kuljetus	14
2.5.3 Valu ja leikkuu	15
2.5.4 Värjäys	15
3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE	18
4 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	19
4.1 Metodiset ratkaisut	19
4.2 Eettisten näkökohtien tarkastelu	21
4.3 Tutkimuksen kokeellinen osuus	23
5 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	25
6 POHDINNAT	33
6.1 Tutkimuksen yleinen pohdinta	33
6.2 Tutkimustulosten pohdinta	34
6.3 Jatkotutkimusaiheet	36
LÄHTEET	37

LIITTEET

- Liite 1. Toimeksiantosopimus
- Liite 2. Tutkimuksessa käytetyt hiiret
- Liite 3. Strain Detail Sheet - Hiirikanta
- Liite 4. HE-värjäysprotokolla parafiinileikkeille
- Liite 5. PAS-värjäysprotokolla parafiinileikkeille
- Liite 6. Weigert van Gieson -värjäysprotokolla parafiinileikkeille

KUVAT

Kuva 1. HSD17 β -entsyymit vaikuttavat steroidihormonien aktiivisuuteen.	7
Kuva 2. HSD17 β 13-geenin ilmentyminen ihmisen kudoksissa.	9
Kuva 3. HSD17 β 13-geenin ilmentyminen hiiren kudoksissa.	10
Kuva 4. Hiiren maksa verrattuna ihmisen maksaan.	12
Kuva 5. Villityypin naaras ja HSD17 β 13-poistogeeninen naaras.	26
Kuva 6. Villityypin uros ja HSD17 β 13-poistogeeninen uros.	27
Kuva 7. HSD17 β 13-poistogeenisen naaraan maksakudos.	28
Kuva 8. Muutoskohta HSD17 β 13-poistogeenisen naaraan maksakudoksessa.	29
Kuva 9. HSD17 β 13-poistogeenisen uroksen maksakudos.	30
Kuva 10. Muutoksia HSD17 β 13-poistogeenisen uroksen maksakudoksessa.	31
Kuva 11. Osoitus glykogeenin esiintymisestä hiiren maksakudoksessa.	32
Kuva 12. Yleiskuvat tutkimuksessa käytetyistä värjäyksistä.	35

SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys
HE	Hematoksyliini-eosiini -värjäys
HOZ	Homozygous, homostykootti hiirikanta
HSC	HS-solut, hepatic stellate cells, perisinusoidaaliset tähtisolut, esiintyy hepatosyyteissä, Dissen tilassa
HSD17 β	Hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17 β
HSD17 β 11	Hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17 β tyyppi 11
HSD17 β 13	Hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17 β tyyppi 13
KO mice	Knockout mice, poistogeeninen hiirikanta
PAS	Periodic acid Schiff -värjäys
SCDR8	Short-chain dehydrogenases/reductase 8, lyhytketjuinen dehydrogenaasi/reduktaasi tyyppi 8
SCDR9	Short-chain dehydrogenases/reductase 9, lyhytketjuinen dehydrogenaasi/reduktaasi tyyppi 9
Van Gieson	Weigert van Gieson -värjäys
WT	Wild-type, villityypin hiirikanta

1 JOHDANTO

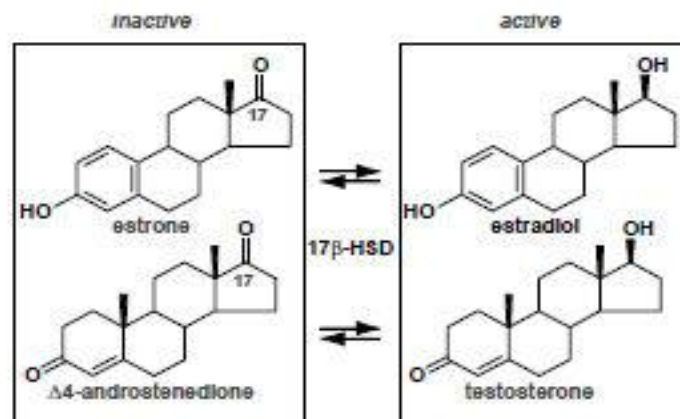
Hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17β entsyymit vaikuttavat pääasiallisesti steroidihormonien biologiseen aktiivisuuteen joko lisäten tai vähentäen niiden toimintaa (Mindnich, Möller & Adamski 2004). Kyseinen proteiiniyryhmä on suuri kiinnostuksen kohde lääketeollisuudelle etsittäessä uusia hormonihoidokeinoja mm. rintasyövän hoitoon. Uusin löydetty HSD 17β -entsyymiryhmän tyyppi on hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17β tyyppi 13 eli HSD 17β 13. HSD 17β 13-entsyymin geeni on ensimmäisen kerran eristetty ihmisen maksakudoksesta vuonna 2007.(Liu ym. 2007.) HSD 17β 13-entsyymin fysiologista tehtävää ei vielä tarkalleen tunneta.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, minkälaisia vaikutuksia HSD 17β 13-geenin poistolla oli hiiren maksakudoksen histologiaan. Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla kahden hiirikannan, villityypin ja HSD 17β 13-poistogeenisen hiiren maksakudosnäytteitä. Kudosnäytteet valmistettiin normaalein histologisin menetelmin ja värjättiin HE-, Van Gieson- ja PAS-värjäyksillä. HE-värjäyksellä osoitettiin maksan histologista rakennetta. Van Gieson -värjäyksellä etsittiin tietoa mahdollisesta fibroosista eli arpeutumisesta, jota esiintyy esimerkiksi tulehduksen vaikutuksesta (Mäkinen, Carpén, Kosma, Lehto, Paavonen & Stenbäck 2012). PAS-värjäys antoi tietoa esimerkiksi siitä, milloin hiiri oli viimeksi syönyt.(Aho 1999.) Tutkimuksessa oli mukana 9-kuukauden ikäisiä poistogeenisiä ja villityypin hiiriä, sekä uroksia että naaraita.

2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 HSD17 β

Hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17 β eli HSD17 β on selkärangaisilla ja selkärangattomilla eläimillä esiintyvä monitoiminen proteiiniyryhmä. Vuonna 2004 tunnettiin 12 erilaista HSD17 β -entsyymiä. (Mindnich ym. 2004.) Yleisesti entsyymien tehtävänä on nopeuttaa merkittävästi aineenvaihduntareaktioita (Nienstedt, Hänninen, Arstila & Björkqvist 2009). HSD17 β -entsyymit säätelevät pääasiassa steroidihormonien biologista aktiivisuutta. Esimerkiksi joidenkin HSD17 β -entsyymien vaikutuksesta estroni muuttuu estradioliksi ja androsteenidioni testosteroniksi. (Mindnich ym. 2004.)



Kuva 1. HSD17 β -entsyymit vaikuttavat steroidihormonien aktiivisuuteen (Mindnich ym. 2004).

HSD17 β -entsyymit kuuluvat kahteen proteiiniin suurperheeseen; lyhytketjuiseen dehydrogenaasi/reduktaasiin ja aldo-ketoreduktaasiin (Oppermann, Salim, Hult, Eissner & Jornvall 1999; Penning 2003), tosin vain HSD17 β tyyppi 5 kuuluu aldo-ketoreduktaasi ryhmään (Mindnich ym. 2004). Lyhytketjuiset dehydrogenaasi/reduktaasit (SCDR, short-chain dehydrogenase/reductase) ovat suuri joukko toiminnallisia proteiineja. Ne lisäävät esimerkiksi sokeriaineenvaihduntaa

ja ovat näin mukana solujen sisäisissä ja solujen välisissä signaalireiteissä. (Liu ym. 2007.)

Vuonna 1953 Ryan ja Engel havaitsivat monissa ihmisen kudoksissa estroni- ja estradiolihydrideitä. Tämän jälkeen Langer ja Engel (1958) löysivät ihmisen istukasta HSD17 β -entsyymin. Tutkimuksia jatkettiin monilla nisäkkäillä, linnuilla, matelijoilla ja jyrsijöillä (Mindnich ym. 2004). Jopa tietyistä bakteerikannoista, hiivalajeista (Mindnich ym. 2004), etanalajeista (Le Guellec ym. 1987) ja osterilajeista (Le Curieux-Belfond, Moslemi, Mathieu & Seralini 2001) on löydetty HSD17 β -entsyymejä, jotka vaikuttavat todennäköisesti monin eri tavoin hormonitoimintoihin (Mindnich ym. 2004).

HSD17 β -entsyymit ovat tärkeä HSD-entsyymien ryhmä, koska ne ovat mukana mm. estrogeenien ja androgeenien aktivoimisessa (Liu ym. 2007), mutta niillä on osoitettu olevan merkittävä rooli myös rasva- ja sappiaineenvaihdunnassa. Ne kykenevät muokkaamaan hormonien sekä rasva- ja sappihappojen pitoisuuksia. (Mindnich ym. 2004.)

Androgeeneilla ja estrogeeneilla on osoitettu olevan merkittävä rooli hormonaalisissa rinta- ja eturauhassyövissä (Castagnetta, Carruba & Traina 1997; Gunnarsson, Olsson & Stal 2001; Vihko ym. 2002) ja hermosolujen sairauksissa (Liu ym. 2007). HSD17 β mutaatioita on löydetty monien sairauksien taustalta (Mindnich ym. 2004). Jos HSD17 β -geenissä ilmenee mutaatiota, se voi mm. aiheuttaa miehille virilisaatiota eli mieshormonin puutetta (Lindqvist, Hughes & Andersson 2001). He ym. (2002) esittivät tutkimuksessaan mahdollisuuden, että HSD17 β 10-entsyymin runsas esiintyminen häiritsisi steroidihormonien vaikutuksia hippokampukseen ja sitä kautta steroidihormonit olisivat yksi mahdollinen tekijä Alzheimerin taudin taustalla.

2.2 HSD17 β 13

Liu ym. (2007) eristivät ihmisen maksasta SCDR9 geenin (Short-chain dehydrogenases/reductase 9), jonka huomattiin olevan rakenteeltaan samanlainen kuin SCDR8, joka tunnetaan myös nimellä hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17 β tyyppi 11 eli HSD17 β 11. SCDR9 on uusin löydetty HSD17 β -entsyymityyppi; hydroksisteroidi dehydrogenaasi 17 β tyyppi 13. HSD17 β 13 on kartoitettu kromosomiin 4q22.1 UCSC genomitietokannalla (UCSC 2012). HSD17 β 11 sijaitsee samassa kromosomissa kuin HSD17 β 13 sekä ihmisellä, hiirellä ja rotalla. On siis mahdollista, että HSD17 β :n tyypit 11 ja 13 ovat peräisin samasta geenistä. Tämän takia HSD17 β 13:sta saattaa olla samanlaisia tehtäviä kuin tyyppi 11:sta. (Liu ym. 2007).

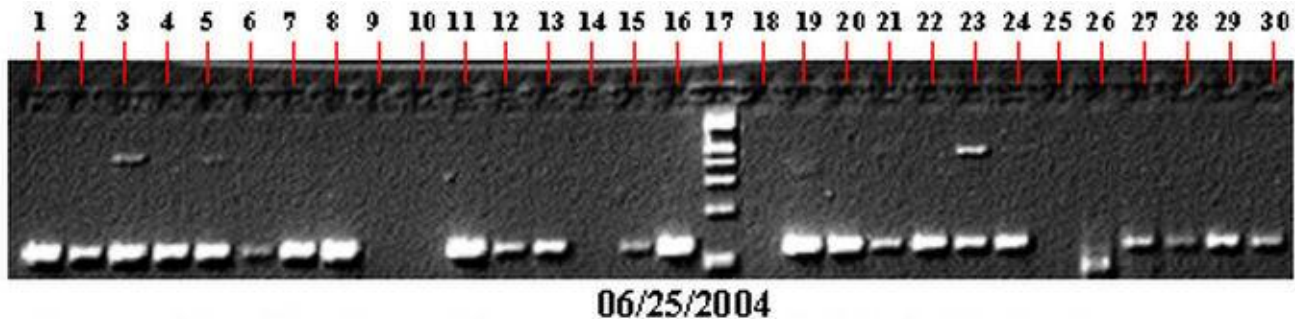


Kuva 2. HSD17 β 13-geenin ilmentyminen ihmisen kudoksissa.

1. Maha 2. Kohtu 3. Maksa 4. Perna 5. Munasarja 6. Paksusuoli 7. Luuydin 8. Munuainen 9. Aivo 10. Keuhko 11. Lihas 12. Haima 13. Virtsarakko 14. Kives 15. Eturauhanen 16. Sydän 17. Kateenkorva 18. Paksusuoli (Liu ym. 2007.)

Kuten kuvassa 2 osoitetaan, HSD17 β 13-geeni ilmentyy ihmisellä eniten maksakudoksessa, vähäisesti myös mm. luuytimessä, munasarjoissa ja keuhkokuksessa, mutta ei esimerkiksi paksusuolen tai haiman kudoksissa (Liu ym. 2007). Kuvassa 3 on esitetty HSD17 β 13-geenin ilmentyminen hiiren eri kudoksissa. Kuvasta nähdään, että hiirellä HSD17 β 13-geeniä löytyy monesta eri kudoksesta, kuten maksasta, mahasta ja aivoista. Hiirellä HSD17 β 13-geeniä ei

löydy yhtään luu- tai lihaskudoksesta ja keuhkokudoksessakin sen esiintyminen on vähäistä.(Lexicon Pharmaceuticals 2010.)



Kuva 3. HSD17 β 13-geenin ilmentyminen hiiren kudoksissa.

1. Aivot 2. Selkäydin 3. Silmä 4. Kateenkorva 5. Perna 6. Keuhko 7. Munuainen
8. Maksa 9. Lihas 10. Luu 11. Maha ja suolisto 12. Sydän 13. Rasva 14-23.
Kontrolleja ym. 24. Eturauhanen 25-30. Muut (Lexicon Pharmaceuticals 2010.)

HSD17 β 13-entsyymiä on löydetty sileästä solulimakalvostosta lipidipisaroiden muodostumisen yhteydessä. HSD17 β 13-entsyymi saattaisi tämän pohjalta olla mukana rasva-aineenvaihdunnassa. (Horiguchi, Araki & Motojima 2008.) Toinen tutkimus osoitti, että HSD17 β 13-entsyymi sijaitsee sytoplasmassa, mutta ei solulimakalvostolla (Liu ym. 2007). Sen rooli ja sijainti ovat vielä osittain epäselviä.

2.3 Geenimuunnellut hiiret

1900-luvun alkupuolelta lähtien hiiristä on jalostettu satoja erilaisia geenimuunneltuja kantoja (Koe-eläin keskus, KEK 2009). Geenimuunnellulla hiirellä tarkoitetaan hiirtä, jonka perimää on muokattu siten, että haluttu geenimuunnos periytyy jälkeläisille (Strauss 29.10.2012). Näin on saatu kehitettyä erilaisia tautimalleja ihmisillä esiintyviin sairauksiin. Hiiret ovat yleisesti käytössä olevia koe-eläimiä, koska niiden geeneistä yli 80 % on samoja kuin ihmisellä.(KEK 2009.)

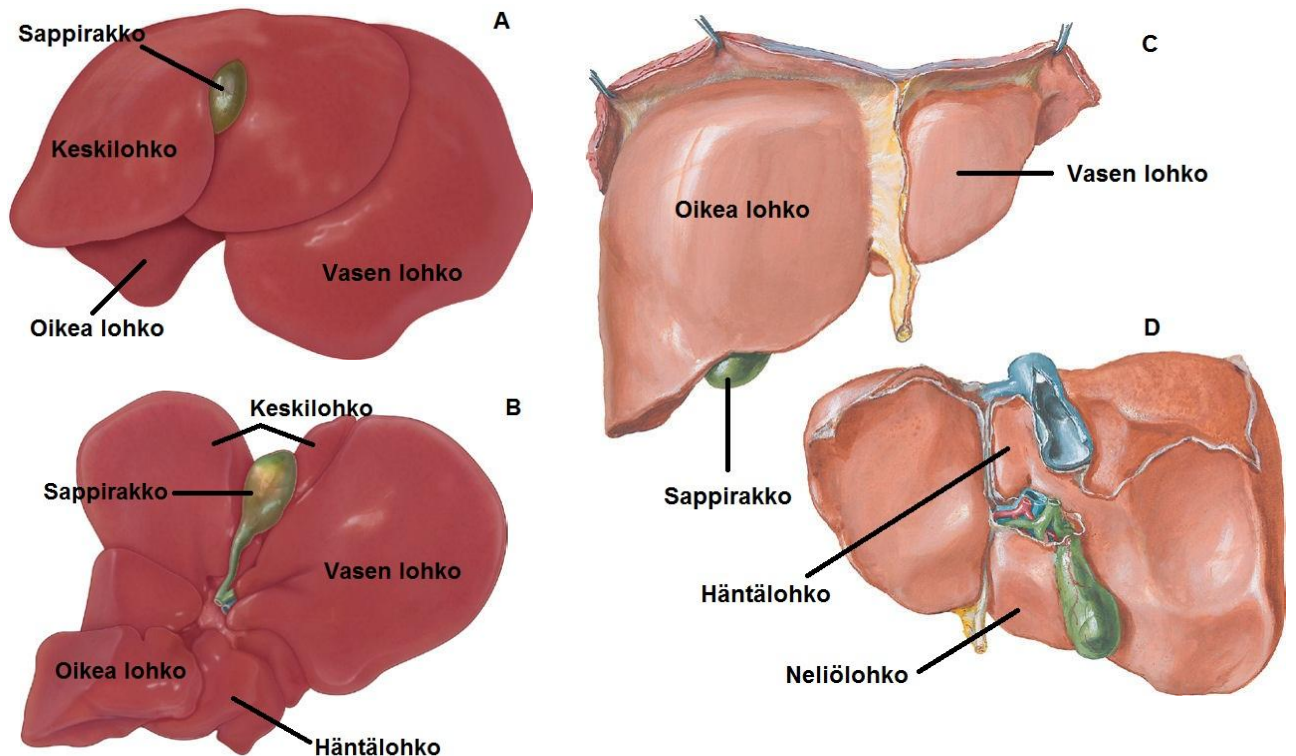
Villityypin hiirellä tarkoitetaan normaalia, tervettä hiirikantaa, jonka genomia ei ole muunneltu. Poistogeeniseltä eli knockout hiireltä (Terminologian tietokannat 2012) on geneettisen muuntelun seurauksena tuhottu geeni tai tehty se toimintakyvyttömäksi. Poistogeeniset hiiret paritetaan strategialla jolla tuotetaan joko homostygoottisia tai heterostykoottisia kantoja, jolloin hiirillä on perimässään haluttu geenimuunnos. Heterostykoottien perimässä geenin toinen alleeli on normaali ja toinen tuhottu, kun taas homostykooteilla molemmat geenin alleelit on tuhottu. (Nagy, Gertsenstein, Vintersten & Behringer 2003; Strauss 29.10.2012.)

Poistogeenisten hiirimallien käyttö auttaa tutkijoita ymmärtämään erilaisia geneettisiä tauteja ihmisellä ja kehittämään hoitomuotoja geneettisiin sairauksiin (The Jackson Laboratory 2012). Kyseisten geenitutkimusten tekemisellä on mahdollisuus etsiä vastauksia moniin biologisesti tärkeisiin kysymyksiin (Kere 2002). Tässä tutkimuksessa poistogeeniseltä hiirikannalta oli poistettu HSD17 β 13-geeni.

2.4 Hiiren maksa

Sekä hiirellä että ihmisellä maksa on monitoiminen elin. Se säätelee esimerkiksi proteiinien tuotantoa ja varastoi ravinnosta glukoosia. Hiiren maksa painaa keskimäärin 6 % hiiren kokonaispainosta eli noin 2 grammaa. Maksa on hiiren ruumiin kokoon verrattuna suurempi elin kuin ihmisellä. Fysiologiset tehtävät ja verenkierto ovat samanlaisia molemmilla lajeilla, mutta morfologian suhteen ihmisen ja hiiren välillä on eroja. (Rogers & Dintzis 2012.)

Hiiren maksa jakautuu neljään lohkoksi: oikea, vasen, keski- ja häntälohko (Kuva 4). Vasen lohko on suurin ja useimmin käytetyin osa histologisissa näytteissä. Ihmisen maksa on jaoteltu myös neljään lohkoksi (Kuva 4), joista suurin on oikea lohko. (Rogers & Dintzis 2012.)



Kuva 4. Hiiren maksa edestä (A) ja takaa (B) verrattuna ihmisen maksaan (C ja D) (Rogers & Dintzis 2012).

Maksa koostuu hepatosyyteistä eli maksasoluista, jotka ovat järjestäytyneet rakenteellisesti lobuluksiin. Lobulusten keskellä on keskuslaskimo ja reunoilla porta-alueet. Maksa- ja endoteelisolujen väleissä, vaaleilla alueilla sijaitsee Dissen tila, jossa kiertää lymfaneste sekä sinuisodit eli hiussuonet. Dissen tilassa sijaitsee myös perisinusoidaalisia tähtisoluja (HS-solut, hepatic stellate cells), joiden tehtävänä on tuottaa ja varastoida A-vitamiinia. (Rogers & Dintzis 2012; Autio-Harmainen 2012.) Ihmisellä HS-solut alkavat maksasairauksien yhteydessä tuottaa kollageeneja. Tästä seurauksena syntyy hiussuonien seinämiä heikentävää fibroosia eli sidekudoksen arpeutumista (Terminologian tietokannat 2012). (Autio-Harmainen 2012.)

Etsittäessä maksasta fibroosia tarvitaan histologian erikoisvärjäyksiä. Esimerkiksi Masson trikromi -värjäyksellä saadaan esiin kollageeni hiiren maksasairauksien yhteydessä (Rogers & Dintzis 2012). Toinen mahdollinen erikoisvärjäys

on Weigert van Gieson, jossa mahdollinen fibroosi värjäytyy punaiseksi (Aho 1999). Ilman erikoisvärjäksiä fibroosia voi olla vaikeaa tunnistaa maksakudoksesta. Samoin kuin HS-soluja on vaikea tunnistaa pelkällä hematoksyliini-eosiini-värjäyksellä.(Rogers & Dintzis 2012.)

Kun hiiriä käytetään tautimalleina, on muistettava että, esimerkiksi maksakirroosi ei ilmene hiirellä samalla tavalla kuin ihmisellä, vaikka se aiheuttaakin vakavia vaurioita maksakudokseen. Poikkeavuuksista huolimatta samankaltaisuuksia hiiren ja ihmisen maksakudosten välillä on paljon.(Rogers & Dintzis 2012.)

2.5 Histologiset menetelmät

2.5.1 Näytteiden keruu

Turun koe-eläinkeskuksessa on käytössä ELLI-järjestelmä, joka on reaaliaikainen eläinkirjanpitojärjestelmä. Tutkijalla on omat henkilökohtaiset tunnukset joilla hän pääsee tarkastelemaan omia eläimiään. ELLI-järjestelmän eläinhuulla tutkija hakee omista eläimistään sopivat yksilöt lopetettaviksi esimerkiksi iän ja sukupuolen perusteella. Jokaisella eläimellä on oma ID eli tunnus kuten HOZ 18 tai WT 23.(KEK 2009.)

Koe-eläinten käsittelyssä huolehditaan asianmukaisista työtavoista ja suojavaatetuksesta hyvän laboratorion käytännön mukaisesti. Hyvään laboratorionkäyttöön kuuluu asianmukainen suojavaatetus (suojatakki, hengitysmaski, kenkä- ja hiussuoja sekä suojakäsineet). Tämän lisäksi kaikki toiminta tapahtuu vetokappissa, koska fiksatiivina eli kudosten kiinnitysaineina käytetään haitallisia aineita, kuten formaliinia. Koe-eläinhiiristä kudokset kerätään voimassa olevan protokollan mukaan, joka on tarkoitettu hiirille tehtävään preparointiin ja histologisten näytteiden keruuseen. Hiiren lopetus suoritetaan tiiviissä muovilaatikossa, jonne johdetaan hiilidioksidia. Tämän jälkeen hiiren kuolema on varmistettava esimerkiksi verenlaskulla eli poistamalla ruiskulla kaiken veren.(Antal ym. 2007.)

Kudokset vaativat asianmukaisen käsittelyn ja preparoinnissa on toimittava nopeasti, koska välittömästi kuoleman jälkeen kudoksissa alkaa tapahtua muutoksia. Hiiri ja tietyt kudokset punnitaan, kuten sydän, maksa ja haima. Kudokset otetaan talteen leikkaamalla. Esimerkiksi maksan vasemmasta lohkosta leikataan saksilla noin puolet ja asetetaan se punnituksen jälkeen formaliiniin. Tämän jälkeen keskilohkosta leikataan palanen nestetyyppien mahdollisia myöhempiä RNA-töitä ja jääleikkeitä varten. Yleensä muutkin kudokset kerätään talteen vaikka tutkimus alustavasti keskittyisi vain tiettyyn kudokseen. Näin varmistetaan, että kudoksia on tarpeeksi mahdollisiin jatkotutkimuksiin ja hiirestä saadaan talteen kaikki mahdollinen hyöty. Lopuksi hiiri sekä muut jätteet hävitetään asianmukaisella tavalla. (Antal ym. 2007.)

2.5.2 Näytteiden fiksointi ja kuljetus

Näytteet kiinnitetään eli fiksoidaan, koska sillä estetään kudoksen hajoaminen. Kudokset myös samalla kiinteytyy, jolloin sen käsittely jatkossa helpottuu. Erilaisia kiinnitteitä ovat aldehydit (kuten formaldehydi ja glutaraldehydi), hapettavat aineet (kuten kromihappo) ja muut kiinnitysaineet, kuten etikkahappo, metyylialkoholi ja pikriinihappo. Yleisimmin histologian laboratorioissa käytössä on formaldehydi, joka on väritön kaasu. Kaupallisena liuoksena sitä kutsutaan formaliiniksi, jota käytetään 10 % liuoksena kudoksien fiksaatioon. Tavallisesti vuorokauden mittainen formaliinifiksaatio on todettu riittäväksi. Kudospalat asetetaan identifioituihin näytekasetteihin, ja käsitellään fiksaation jälkeen vetokaapissa. (Hopwood 1990; Aho 1999; Kiernan 1999.)

Kasetoiduille kudospaloille tehdään kuduskuljetus. Kuduskuljetuksen tarkoituksena on imeyttää kudoksen sisälle parafiinia, jotta sitä voitaisiin jatkossa työstää. Kudokset voidaan kuljettaa joko käsin tai koneellisesti. Kuljetus jakautuu kolmeen osaan: dehydraatio, kirkastus ja parafiini-infiltraatio. (Gordon 1990; Aho 1999; Kiernan 1999.) Dehydointi tarkoittaa nousevaa alkoholisarjaa, jossa kudokset ensin ovat 70 % etanolissa ja siitä nousevasti eri alkoholipitoisuuksissa aina absoluuttiseen alkoholiin saakka eli korvataan kudoksen vesi alkoholilla.

Kirkastuksessa poistetaan näytteestä mahdollinen alkoholi, koska se ei ole liukoinen parafiinin kanssa. Kirkastukseen yleisesti käytetään ksyleeniä, joka on liukoinen sekä alkoholin että parafiinin kanssa. Kirkastuksen jälkeen kudoksen sisälle imeytetään sulaa parafiinia.(Gordon 1990; Aho 1999.)

2.5.3 Valu ja leikkuu

Kuljetuksen jälkeen kudospalat valetaan petausaineeseen eli parafiiniin. Parafiini on mineraaliöljypohjainen hiilivetyseos, jonka sulamispiste on 54 – 58 °C. Kudospala siirretään metalliseen valumuottiin haluttu leikkauspinta alaspäin ja päälle valutetaan sulaa parafiinia. Valumuotin päälle asetetaan reiällinen kasetti, josta käy ilmi kudospalan tiedot. Tämän jälkeen muotti siirretään kylmälevylle jähmettymään.(Aho 1999.)

Jähmettyneestä parafiiniblokista tehdään leikkeitä mikrotomin avulla. Laboratoriokäytössä on rotaatiomikrotomeja, joissa veitsi pysyy paikallaan ja kudosis näytepään mukana ylös-alas. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää liukumikrotomia, jossa veitsi liikkuu ja näytepää pysyy paikallaan. Yleisimmin käytössä on kertakäyttöveitsiä.(Gordon & Bradbury 1990; Aho 1999; Kiernan 1999.) Parafiiniblokista leikataan 4 µm paksuisia leikkeitä, jotka siirretään siveltimien avulla kylmävesialtaaseen, josta ne poimitaan identifioidulle objektilasille. Tämän jälkeen leikkeet suoristetaan lämminvesihauteessa ja siirretään kuivumaan pystysuunnassa. Valmiit lasit kiinnitetään lämpökaapissa (+ 37 °C) yön yli tai vaihtoehtoisesti ennen värjäystä + 60 °C lämpökaapissa tunnin ajan.(Gordon & Bradbury 1990; Aho 1999.)

2.5.4 Värjäys

Erilaisia värjäysmenetelmiä on histologiassa monia. Värjäykset voidaan suorittaa koneellisesti tai käsityönä. Värjäytymiseen vaikuttavat erilaiset fysiologiset ja kemialliset tekijät, kuten mm. erilaiset sidostyypit, pääasiassa hydrofobiset sidokset ja Van der Waalsin voimat.(Aho 1999; Kiernan 1999.)

Värjäyksissä käytetään yleensä peittausainetta joka kiinnittää värin kudokseen. Peittausaine saattaa olla ennen väriä, värin kanssa tai väriliuoksen jälkeen, riippuen värjäysmenetelmästä. (Aho 1999; Kiernan 1999.) Happamat värit värjäävät kudoksen emäksiset osat, kuten soluliman ja emäksiset värit värjäävät happamat osat, kuten tumien nukleiinihapot (Aho 1999).

Ennen värjäysliuoksia leikkeistä poistetaan ksyleeni eli leikkeet rehydroidaan laskevalla alkoholisarjalla. Värjäyksen jälkeen lasit dehydroidaan, jolloin niistä poistetaan vesi ja laitetaan tilalle ksyleeni, jotta saadaan leikkeet päällystettyä ksyleenipohjaisella aineella ja peitinlaseilla. (Aho 1999; Kiernan 1999.) Tässä tutkimuksessa kudokset värjättiin kolmella eri värjäysmenetelmällä; Hematoksyliini-eosiini, Weigert van Gieson ja Periodic acid Schiff -värjäyksillä.

Hematoksyliini-eosiini eli HE-värjäys on patologian laboratoriossa yleisesti käytössä oleva histologisten kudokset värjäävä menetelmä (Mäkinen ym. 2012). Värjäys koostuu kahdesta eri väristä: hematoksyliinistä ja eosiinista. Hematoksyliini ei itsessään ole väri, vaan sen hapetustuote, hemateiini. Hapetusmenetelmän perusteella erotellaan eri hematoksyliinit toisistaan. Hematoksyliini-eosiini värjäyksessä käytetään Delafieldin hematoksyliiniä, joka on kypsytetty hapettamalla sitä luonnollisin menetelmin valossa ja ilmassa 3-4 kk. Delafieldin hematoksyliini on pitkäikäinen ja soveltuu myös ruston värjäämiseen. Hematoksyliiniä käytetään yleisesti tumavärinä. Värjäysmenetelmä on regressiivinen eli kudokset ylivärjätään ja ylijäämä erotellaan happoalkoholissa. (Stevens 1990; Aho 1999.) Hematoksyliini värjää tumat ensin punertavaksi ja se sinistyy vesijohtovedessä, joka on heikosti alkalinen liuos. Eosiini värjää sytoplasman ja soluliman punertavaksi. (Stevens 1990; Aho 1999; Kiernan 1999.) Yleisin eosini on Eosin Y, joka on ksantiiviväri ja liukenee alkoholiin. Tämän takia differentaatio eli erottelu on aloitettava suoraan absoluuttisesta alkoholista, jotta vältetään värin liika poistuminen. (Stevens 1990; Aho 1999.)

Weigert van Gieson -värjäys on sidekudosvärjäys. Sidekudos koostuu soluista ja soluväliaineesta, joka on muodostunut säikeisistä proteiineista, pääasiassa kollageenista ja lima-aineista. (Aho 1999.) Weigertin rautahematoksyliini toimii tumavärinä (Stevens 1990). Van Gieson -liuoksen väriaineina toimii pikriinihap-

po ja hapan fuksiini. Pikriinihappo värjää lihaksen, soluliman, punasolut ja fibriinin kellertäviksi. Värjäyksen perusteella on helppo erottaa sileä lihaskudos muista sidekudosrakenteista. Fuksiini värjää sidekudoksen kollageenit punaisiksi.(Aho 1999; Kiernan 1999.) Myös mahdollinen arpikudos värjäytyy punaiseksi. Oleellinen onnistuminen värjäykselle on matala pH ja saturoitu pikriinihappo.(Aho 1999.)

Periodic acid Schiff eli PAS-värjäys luokitellaan hiilihydraattivärjäkseksi (Aho 1999). PAS-värjäyksellä osoitetaan kudokset limaa-aineita ja glykogeeneja (Aho 1999; Mäkinen ym. 2012). Värjäyksessä ylijodihappo hapettaa hiili-hiili sidoksen, jolloin muodostuu dialdehydejä ja aldehydit reagoivat emäksiseen fuksiiniin. Schiffin reagenssin kanssa reagoivat natriummetabisulfiitti ja suolahappo, jolloin ne muodostavat voimakkaan punaisen reaktiotuotteen.(Cook 1990; Aho 1999.) Glykogeeneja esiintyy erityisesti mm. maksassa ja emättimen levyepiteelissä sekä tietyissä kasvainsoluissa (Aho 1999).

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla villityypin hiiren ja HSD17 β 13-poistogeenisen hiiren maksakudosnäytteitä, jotka oli värjätty kolmella eri histologisella värjäysmenetelmällä. Kaikki tutkitut hiiret olivat 9-kuukauden ikäisiä, mukana sekä uroksia että naaraita.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, mitä muutoksia maksakudoksessa on tapahtunut HSD17 β 13-geenin poistamisen seurauksena eli mitä vaikutuksia HSD17 β 13-entsyymillä on hiiren maksakudoksen histologiaan.

Tutkimustehtävät:

1. Villityypin hiiristä ja HSD17 β 13-poistogeenisistä hiiristä valmistettiin maksakudosnäytteet histologisin menetelmin
2. Näytteet värjättiin HE- , Van Gieson ja PAS- värjäysmenetelmillä
3. Villityypin ja HSD17 β 13-poistogeenisen hiiren, sekä uros- ja naaras hiiren, maksakudosnäytteitä vertailtiin keskenään sekä havainnoitiin mahdollisia muutoseroja maksan histologisessa rakenteessa

4 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Tutkimuksen käytännön osuus suoritettiin lokakuusta 2012 helmikuuhun 2013 välisenä aikana Turun yliopiston Tautimallinnuskeskuksessa, fysiologian laitoksella ja osittain myös Turun oikeuslääketieteen laitoksen puolella. Tutkimus oli osa laajempaa Turun yliopiston Tautimallinnuskeskuksen projektia. Tutkimuksen ohjaajina toimi Turun yliopistolta HSD17 β 13-projektin tutkijatohtori ja Turun yliopiston erikoistutkija. Tutkimuksen ohjaajana toimi Turun ammattikorkeakoulusta Sanna Virtanen. Tutkimukselle tehtiin toimeksiantosopimus Turun yliopiston kanssa (Liite 1). Tutkimuksen aineistona käytettiin Turun yliopiston Tautimallinnuskeskuksen koe-eläinhiiristä preparoituja maksakudospaloja. Hiiret lopetti ja preparoi tutkimuksen ohjaaja. Maksakudosnäytteistä valmistettiin histologisin menetelmin parafiiniblokkeja, joista leikattiin objektilaseille tarvittava määrä ja leikkeet värjättiin.

4.1 Metodiset ratkaisut

Kvalitatiivinen eli laadullinen tutkimus tarkoittaa joukkoa erilaisia tulkinnallisia tutkimuskäytänteitä (Metsämuuronen 2001). Laadullisen tutkimuksen toiseksi yleisin käytössä oleva tiedonkeruumenetelmä on havainnointi. Havainnointi on perusteltu menetelmä, kun tutkittavasta asiasta tiedetään hyvin vähän. (Tuomi & Sarajärvi 2004.) Metodi tarkoittaa tutkimustekniikkaa ja metodologia oppia tiedonhankinnan menetelmistä. Laadullinen tutkimus oli sopiva metodi kun esimerkiksi oltiin kiinnostuneita vertailemaan kahta erilaista kudostyyppiä havainnoiden niiden eroja mikroskoopissa. (Metsämuuronen 2001.) Vertailu oli osana tieteellistä perusmetodia, ja vertailua voitiin tehdä oman tutkimusaineiston osien välillä (Vilka 2006). Laadullisessa tutkimuksessa oli luonnollista kerätä aineisto, jota voitiin tarkastella monesta eri näkökulmasta (Alasuutari 1999). Tässä tutkimuksessa vertailtiin villityypin hiiriä ja poistogeenisiä hiiriä toisiinsa. Lisäksi katsottiin, onko eroa naaraiden ja urosten välillä.

Tutkimuksessa oli valittuna tietty kohdejoukko tarkoituksenmukaisesti (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007). Laadullisessa tutkimuksessa ei ollut tärkeää kuinka suuri tutkimusaineiston koko oli, vaan sen laatu merkitsi enemmän. Tutkimuksessa tuli ilmi kriteerit, joiden perusteella tutkimusaineisto oli koottu ja rajattu tiettyyn pisteeseen tutkimuksen tavoitteiden kannalta. Tutkimustulosten pohdinnassa käy ilmi, oliko valitut kriteerit toimivia. Tutkimusaineisto oli monipuolinen ja paljon materiaalia jäi jatkotutkimuksiin.(Vilkkä 2005.)

Laadullisessa tutkimuksessa varauduttiin jo ennen tutkimuksen alkua, että tutkimusongelmat saattoivat muuttua tutkimuksen edetessä. Tutkimuksessa oli myös viitteitä kuvailevaan tutkimukseen, koska kysyimme miten tai minkälainen tietty asia oli.(Hirsjärvi ym. 2007.) Tuloksia tulkittaessa mahdolliset muutokset olivat subjektiivisen tarkastelun kohteena eli tutkijan kokemuksesta riippuvaa (Aho 1999). Tämän takia kudosnäytteiden tarkastelu suoritettiin yhdessä ohjaajien kanssa.

Laadullinen tutkimus koostui kahdesta vaiheesta; havaintojen pelkistämisestä ja tulosten tulkinnasta. Havaintojen pelkistämällä kiinnitettiin huomio vain oleellisiin asioihin. Tutkimusta tarkasteltiin vain tietystä näkökulmasta.(Alasuutari 1999.) Tutkijan tuli luottaa tuloksissa omiin havaintoihin. Havainnointi oli tutkimuksen kriittisin kohta, koska havainnointi on aina valikoivaa. Valikointi voi olla joko myönteistä, jolloin havaitsemme uusia asioita tai kielteistä, jolloin havainnointi keskittyy jo tuttuihin asioihin. Tällöin voivat tärkeät uudet havainnot jäädä huomiotta. Tieteellisessä tutkimuksessa oli siis tukeuduttava luotettaviin havaintoihin ja tiedostaa mahdolliset virhelähteet.(Vilkkä 2006.) Tutkija nojasi todisteensa havaintoaineistoon, eikä omiin lähtökohtiin. Tutkimuksen tuloksia tarkasteltiin kokonaisuutena. Tuloksia tarkasteltaessa oli hyvän käytännön mukaista viitata teoreettiseen viitekehykseen.(Alasuutari 1999.) Raportoinnissa havainnot pyrittiin esittämään totuudenmukaisesti (Metsämuuronen 2001). Lähtökohtana oli todellisuuden kuvaaminen ja pyrkimyksenä löytää tosiasioita (Hirsjärvi ym. 2007). Tieteellisessä tutkimuksessa yleisenä edellytyksenä on järjestelmällisyys ja täsmällisyys, jota tässä tutkimuksessa noudatettiin (Vilkkä 2005).

4.2 Eettisten näkökohtien tarkastelu

Eettiset ongelmat tässä tutkimuksessa painottuivat koe-eläinten käyttöön. Tutkimuksen tekijä suoritti Koe-eläinkeskuksen järjestämän koulutuksen eläinten käyttämisestä tutkimuksissa ja on pätevä työskentelemään hiirillä ja rotilla. Tutkimuksen tekijä oli käynyt tutustumassa koe-eläinkeskuksen tiloihin ja oli mukana hiirien preparoinnissa.

Eläinkokeeksi katsotaan tutkimustarkoituksessa tehtäviä toimenpiteitä, jotka aiheuttavat eläimille neulanpistoon verrattavaa kipua tai haittaa. Koe-eläintoiminnassa pyritään aina aiheuttamaan eläimelle mahdollisimman vähän haittaa ja tutkimukset pyritään suorittamaan mahdollisimman pienellä eläinmäärällä. Eläinkoe tulee korvata vaihtoehtoisella menetelmällä aina, kun se on mahdollista. (KEK 2009; KEK 2012.)

Kaikki eläinkokeissa käytettävät eläimet merkitään asianmukaisin menetelmin. Tässä tutkimuksessa hiiret olivat korvamerkattuja eli korvat oli rei'itetty ammattilaisen toimesta. Tutkimuksessa olleet hiiret lopetettiin hyväksyttävällä menetelmällä < 70 % hiilidioksidilla, ja kuolema varmistettiin verenlaskulla. (Maa- ja metsätalousministeriön asetus 36/EEO/2006.)

Eläinkokeiden tekeminen on luvanvaraista toimintaa ja eläinkokeelle oli näin oltava valtioneuvoston asettaman eläinlupakomitean lupa (KEK 2012). Tämän tutkimuksen koe-eläinlupa oli nimellä ”2012-TCDM, TCDM gm-kantojen ylläpito”. Koe-eläimet joiden perimää on muunneltu jollain tavalla, ovat eläinsuojeluviranomaisten lisäksi myös geenitekniikkalautakunnan valvonnan alaisia (KEK 2009). Geenitekniikalla tarkoitetaan esimerkiksi elävään organismiin mikroinjektion avulla siirrettyä muunneltua perintöainesta (Geenitekniikkalaki 377/1995; Valtioneuvoston asetus geenitekniikasta 928/2004).

Tutkimuksen suorittajalla oli eläinlupakomitean pätevyys suorittaa eläinkokeita (KEK 2012). Tutkijan ammattietiikkaan kuului myös eläinten hyvinvoinnin huomioon ottaminen (Pietarinen 2002). Koe-eläinlaitoksessa oli asianmukaiset tilat ja niissä noudatettiin lakien ja säädösten mukaisia pitopaikkavaatimuksia

(Maa- ja metsätalousministeriön asetus 36/EEO/2006). Turussa toimiva koe-eläin keskus noudattaa lisäksi Turun yliopiston laatu politiikkaa, ja se oli läpäissyt viranomaisten GLP- eli Good Laboratory Practice - tarkastuksen vuonna 2012 (KEK 2012).

Tässä tutkimuksessa noudatettiin hyvää tutkimusetiikkaa. Hyvällä tutkimusetiikalla tarkoitetaan hyvää tieteellistä käytäntöä sekä käytännön toteutuksessa että kirjoittamisprosessissa. Hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen tutkija noudatti eettisesti oikeita tiedonhankintamenetelmiä ja perusteli tietonsa oman alansa tieteellisiin julkaisuihin sekä muihin asianmukaisiin lähteisiin viittaen. (Vilkkä 2005; Hirsjärvi ym. 2007.)

Koko tutkimusprosessin aikana noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä (Tuomi & Sarajärvi 2004; Niiniluoto 2002). Hyvällä tieteellisellä käytännöllä pyrittiin rehellisyyteen ja vilpin torjuntaan. Yleiseen oikeudenmukaisuuteen, sekä tiedon hankkimisen ja soveltamisen vastuullisuuteen, keskityttiin huolella. Tämä takasi koko prosessin laadun. Laadun takeena kaikki vaiheet oli suunniteltu etukäteen ja dokumentoitu. (Niiniluoto 2002; Pelkonen & Louhiala 2002.)

Tutkijan osuus tutkimuksen käytännön toteutuksessa oli suuri, minkä hän koki edukseen. Tutkija leikkasi itse kaikki tutkimuksessa käytetyt maksakudokset sekä suoritti kaikki värjäykset alusta asti värjäysprotokollien mukaisesti. Tämä vähensi mahdollisia virhelähteitä, koska tekijä oli koko tutkimuksen ajana sama. Tutkija sai huolellisen perehdytyksen värjäysprotokollien suorittamiseen käsivärjäyksillä, mutta koska kyseessä oli käsityö, oli virheiden mahdollisuus aina olemassa. Tutkija oli merkannut koko tutkimuksen tekemisen ajan muistiin kaiken tekemisensä päiväkirjan muodossa. Päiväkirja lisäsi tutkimuksen luotettavuutta, koska sieltä voitiin tarkistaa tehdyt työt. Tutkimuksen luotettavuutta lisäsi myös se, että tutkimuksen ohjaaja oli lopettanut ja preparoinut kaikki tutkimuksessa käytetyt hiiret. Näin varmistettiin tasalaatuisuus näytteenottotilanteessa, koska tutkijalla ei ollut siihen tarvittavaa kokemusta.

4.3 Tutkimuksen kokeellinen osuus

Tätä tutkimusta varten kerättiin maksakudosnäytteitä 46 hiireltä (Liite 2). Hiiret olivat iältään 9-kuukautisia. Villityypin hiiriä oli yhteensä 21 kpl, joista uroksia 12 kpl ja naaraita 9 kpl. HSD17 β 13-poistogeenisiä hiiriä oli yhteensä 25 kpl, joista uroksia 12 kpl ja naaraita 13 kpl. Hiirikantana käytettiin Lexicon 129/SvEvBrd-kantaa, joka oli ostettu Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC) yhtiöltä (Liite 3). HE-värjäys suoritettiin kaikille maksakudoksille (n=46). Van Gieson- ja PAS-värjäykset suoritettiin kahdelletoista maksakudokselle (n=24).

Maksakudokset preparoitiin suoraan fiksaatiiviin. Fiksaatiivina käytettiin 10 % formalinia. Yön yli fiksoituneet maksakudokset kasetoitiin. Kasetit merkittiin huolella Turun Yliopiston toimintaperiaatteiden mukaisesti. Tämän jälkeen kasetit siirrettiin 70 % etanoliin odottamaan kuduskuljetusta. Kudosten kuljetus suoritettiin Turun oikeuslääketieteen laitoksen kuduskuljetusautomaatilla (Pathcentre Tissue Processor, Shandon).

Kuljetuksen aikana kudospaloista poistettiin vesi dehydraatiolla ja ne kirkastettiin ksyleenillä. Lopuksi niiden sisälle imeytettiin sulaa parafiinia. Kuljetuksen jälkeen kudospalat valettiin metallisiin valumuotteihin parafiiniblokeiksi. Valu suoritettiin Turun oikeuslääketieteen laitoksen valukoneella (Tissue-Tek TEC 5, Sakura, EM E-2 5230).

Parafiiniblokeista leikattiin 4 μ m:n paksuisia leikkeitä automaattisella rotaatiomikrotomilla (Leica RM 2165). Mikrotomin veitsenä käytettiin kertakäyttöistä teräsveistä. Leikkeitä siirrettiin kolme kappaletta yhdelle objektilasille. Jokaiselle tehdylle värjäykselle leikattiin omat kudokset omille lasseille. Yhteensä tutkimukseen tuli tarkasteltavaksi 70 värjättyä lasia.

Ennen värjäyksiä aloittamista leikkeet kiinnitettiin + 60 °C lämpökaapissa tunnin ajan. Tämän jälkeen kaikille leikkeille suoritettiin parafiinin poisto eli rehydraatio laskevalla alkoholisarjalla, jolloin kudokseen imeytettiin parafiinin tilalle vesi. Värjäyksiä suoritettiin kolme erilaista; HE-, van Gieson- ja PAS-värjäykset. Värjäykset suoritettiin käsin Turun yliopiston fysiologian laitoksen värjäysproto-

kollien mukaan (Liitteet 4-6). Jokaiseen värjäykseen kului yksi työpäivä. Värjäyksien lopuksi leikkeisiin imeytettiin takaisin ksyleeni nousevalla alkoholisarjalla eli dehydraatiolla. Kaikki värjätyt lasit päällystettiin peitinlaseilla. Värjätyt lasit annettiin kuivua 1-2 päivää vetokaapissa.

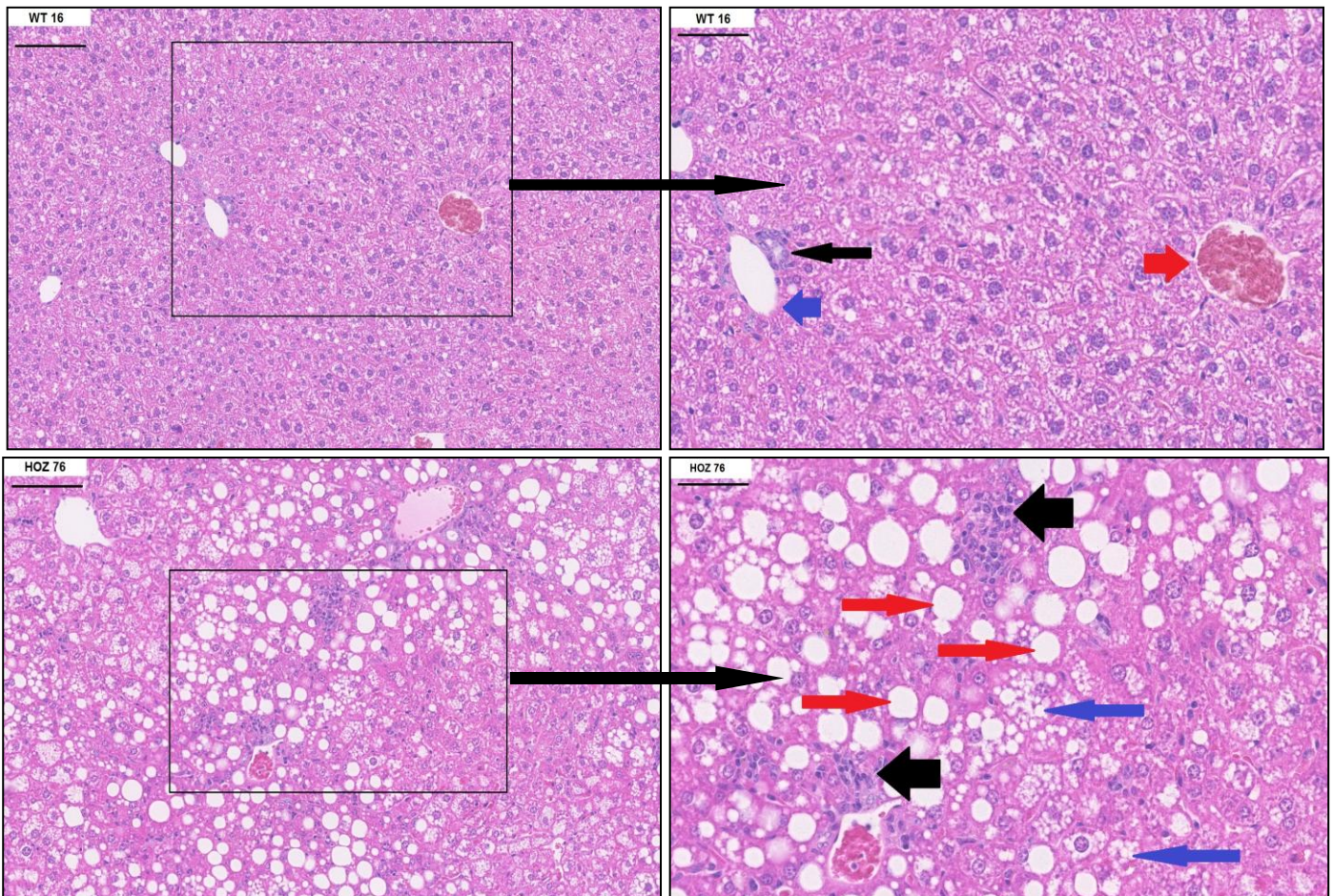
Kudosnäytteet mikroskojoiitiin yhdessä ohjaajien kanssa. Kaikista kudosnäytteistä valittiin 8 eri hiiren näytteet, jotka skannattiin digitaalisella väriskannerilla (Pannoramic 250 3D Histech, Algol diagnostics). Skannattavat näytteet valittiin sen perusteella, että ne antaisivat kattavan kuvan tutkimuksen tuloksista. Tutkimuksen tekijä yhdessä ohjaajan kanssa rajasi halutut kuvat lopulliseen tuotokseen.

5 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

Tässä tutkimuksessa oli tarkoituksena vertailla kahden hiirikannan, villityypin ja HSD17 β 13-poistogeenisen hiiren maksakudosnäytteitä, jotka oli värjätty kolmella eri värjäysmenetelmällä. Tavoitteena oli löytää mahdollisia histologisia poikkeamia villityypin ja poistogeenisen hiiren välillä, sekä mahdollisesti myös uros-ten ja naaraiden välillä. Tuloksissa kävi ilmi, että lähes kaikilta hiiriltä löytyi maksakudoksesta leukosyyttejä, jotka viittaisivat tulehdukseen. Lisäksi suurimmalla osalla hiiristä oli todettavissa rasvamaksa eli steatoosi.

Steatoosi eli rasvamaksa todetaan hepatosyytteihin kertyneestä rasvasta. Rasva voi olla pieni- tai suuripisaraista. Rasvamaksa liitetään ihmisellä usein runsaaseen alkoholinkäyttöön, mutta maksan rasvoittumisen syynä saattaa olla myös esimerkiksi 2.tyypin diabetes tai metabolinen oireyhtymä. Ihmisillä todettava Non-alkoholi-steatohepatiitti (NASH) eli rasvamaksatulehdus aiheuttaa rasvamaksan lisäksi fibroosia eli arpeutumista.(Autio-Harmainen 2012.)

Kuvassa 5 nähdään terveen villityypin naaraan (WT 16) maksakudos sekä HSD17 β 13-poistogeenisen naaraan (HOZ 76) rasvainen ja tulehtunut maksakudos. Kuvien rajatut alueet on suurennettu, jotta nähtäisiin tarkemmin maksan rakenne. Villityypin naaraan maksan rakenne oli normaali ja sieltä erotettiin selkeästi porta-alue, jossa sijaitsivat porttilaskimo (sininen nuoli) ja sappitiehyt (musta nuoli). Kuvassa oikealla näkyy keskuslaskimo (punainen nuoli). HSD17 β 13-poistogeenisen naaraan maksakudoksesta nähtiin selkeästi leukosyyttikertymiä (mustat nuolet), jotka viittaisivat tulehdukseen sekä isopisaraiset (punaiset nuolet) että pienipisaraiset (siniset nuolet) rasvat. Leukosyyteistä voitiin paikoitellen osa tunnistaa granulosityteiksi, jotka viittaisivat akuuttiin tulehdukseen, mutta joukossa oli runsaasti myös lymfosyyttejä, jotka enteilisivät kroonista tulehdusta.

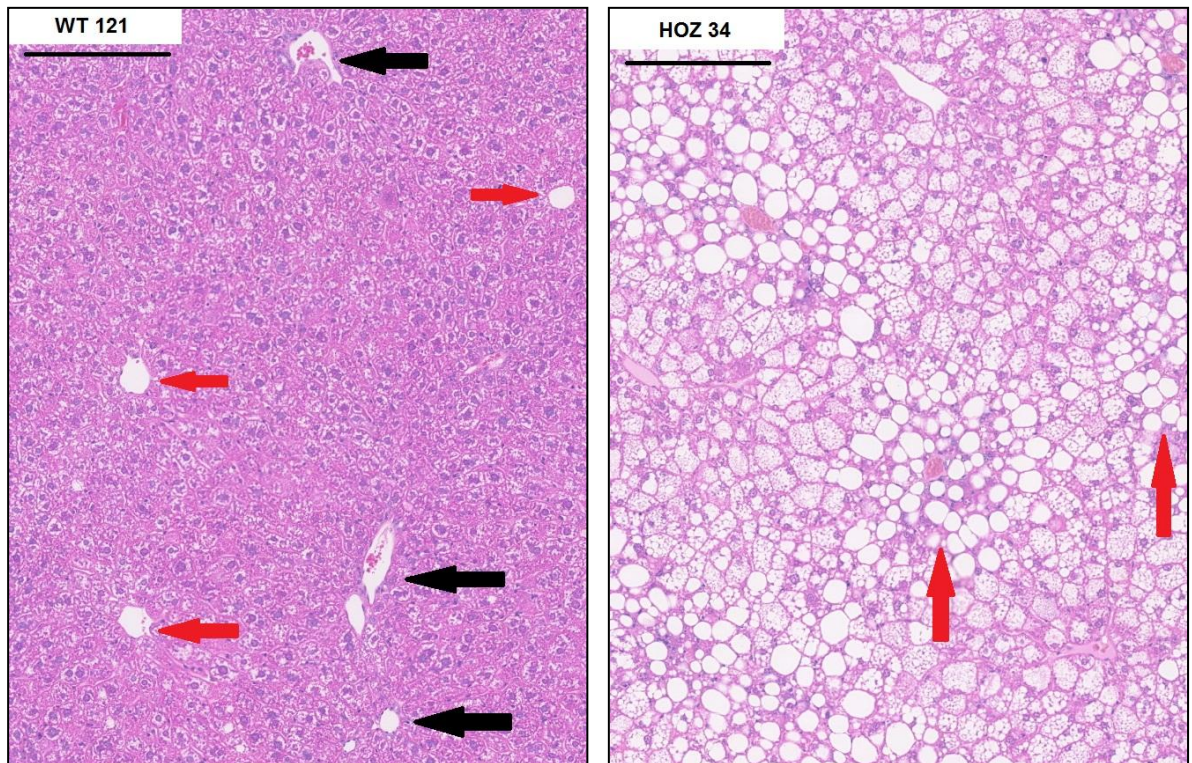


Kuva 5. Villityypin naaras (WT 16) yllä ja HSD17 β 13-poistogeeninen naaras (HOZ 76) alla. HE-värijäys, mittajanat 100 μ m ja 50 μ m.

Tarkemmissa tutkimuksissa molemmilta hiirikannan naarailta löytyi maksasolujen rasvoittumista ja leukosyyttejä. Vain muutamalla naaraalla ei ollut kumpaakaan löydöstä. Tutkimus osoitti, että naarailla ei ollut suurta eroa villityypin ja HSD17 β 13-poistogeenisen kannan välillä.

Kuvassa 6 verrataan villityypin urosta (WT 121) ja HSD17 β 13-poistogeenista urosta (HOZ 34). Kuvassa olevan villityypin uroksen maksakudos oli normaali. Sieltä oli erotettavissa selkeästi porta-alueet (mustat nuolet) ja keskuslaskimot (punaiset nuolet). Yhtään leukosyyttikertymää ei löytynyt. HSD17 β 13-poistogeenisen uroksen maksasolujen sisälle oli kertynyt rasvaa, kuten punaiset

nuolet osoittavat. Maksan histologista rakennetta oli vaikea erottaa runsaan rasvan joukosta.

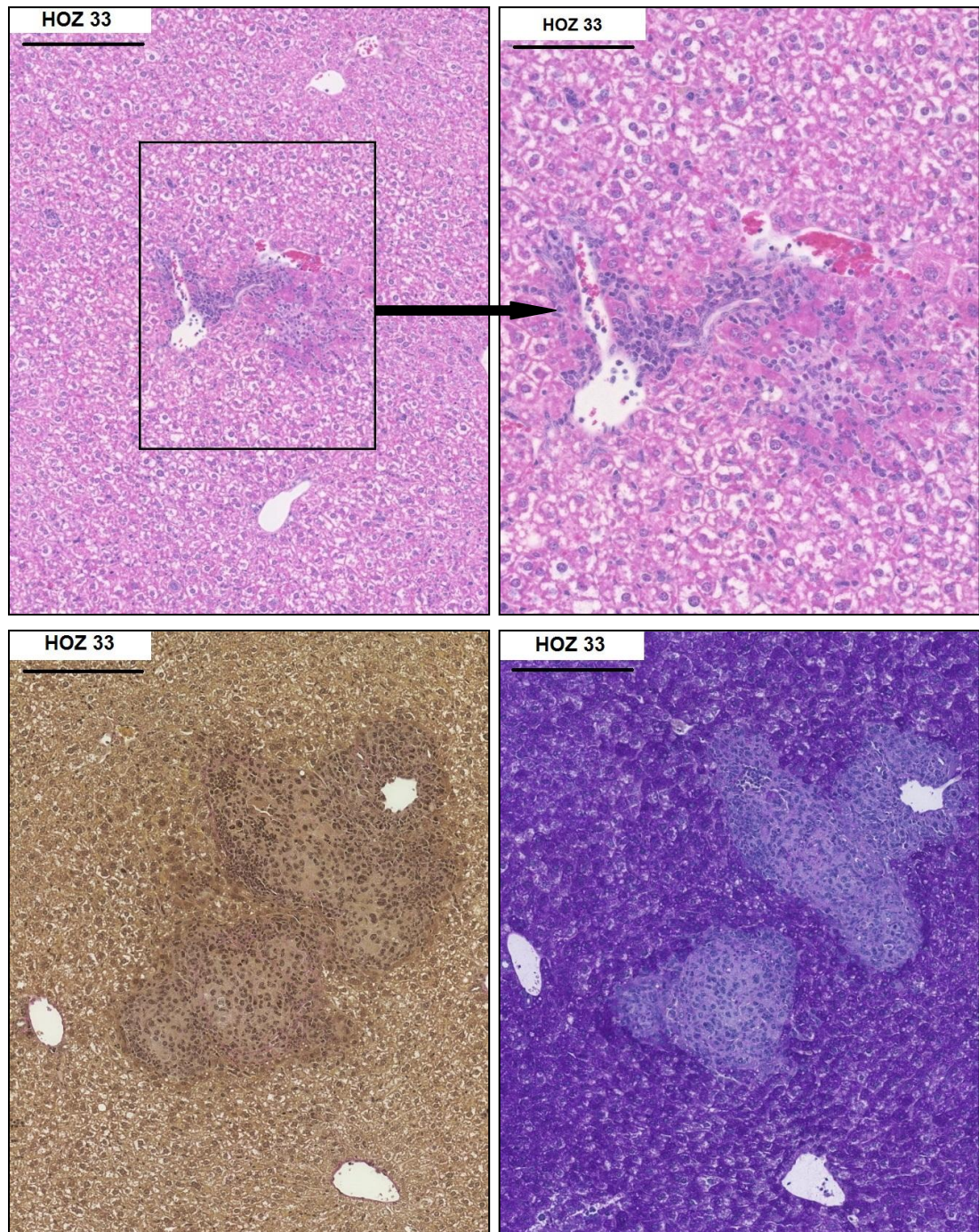


Kuva 6. Villityypin uros (WT 121) vasemmalla ja HSD17 β 13-poistogeeninen uros (HOZ 34) oikealla. HE-värjäys, mittajana 200 μ m.

Uroksia tarkasteltaessa ero villityypin ja poistogeenisen välillä oli havaittavissa selkeästi. Villityypin uroksilla vain muutamalla havaittiin maksasoluissa rasvaa tai leukosyyttikertymiä. HSD17 β 13-poistogeenisillä uroksilla suurimmalla osalla oli maksasoluihin kerääntynyttä rasvaa. Rasvapisarat olivat uroksilla suurempia ja runsaampia kuin naarailla. Kuitenkin uroksilla havaittiin kokonaisuudessaan vähemmän leukosyyttejä kuin naarailla.

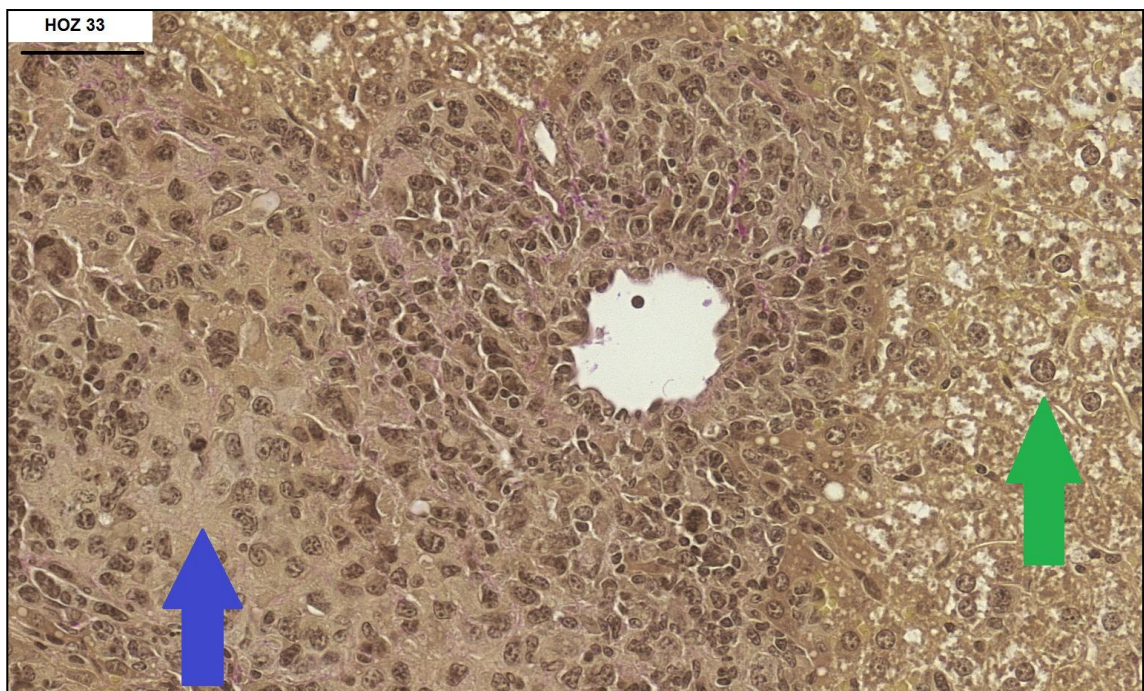
Yhdellä HSD17 β 13-poistogeenisellä naaraalla (HOZ 33) havaittiin selkeä muutoskohta maksakudoksessa. Kuvassa 7 nähdään sama muutoskohta kaikilla kolmella tutkimuksessa käytetyllä värjäyksellä. Lisäksi HE-värjäyksestä on rajattu muutoskohta suuremmalle suurennokselle. Muutoskohdassa oli havaittavissa

runsaasti leukosyyttejä. Tämän naaraan maksasoluissa ei havaittu rasvaa muutokohdasta huolimatta.



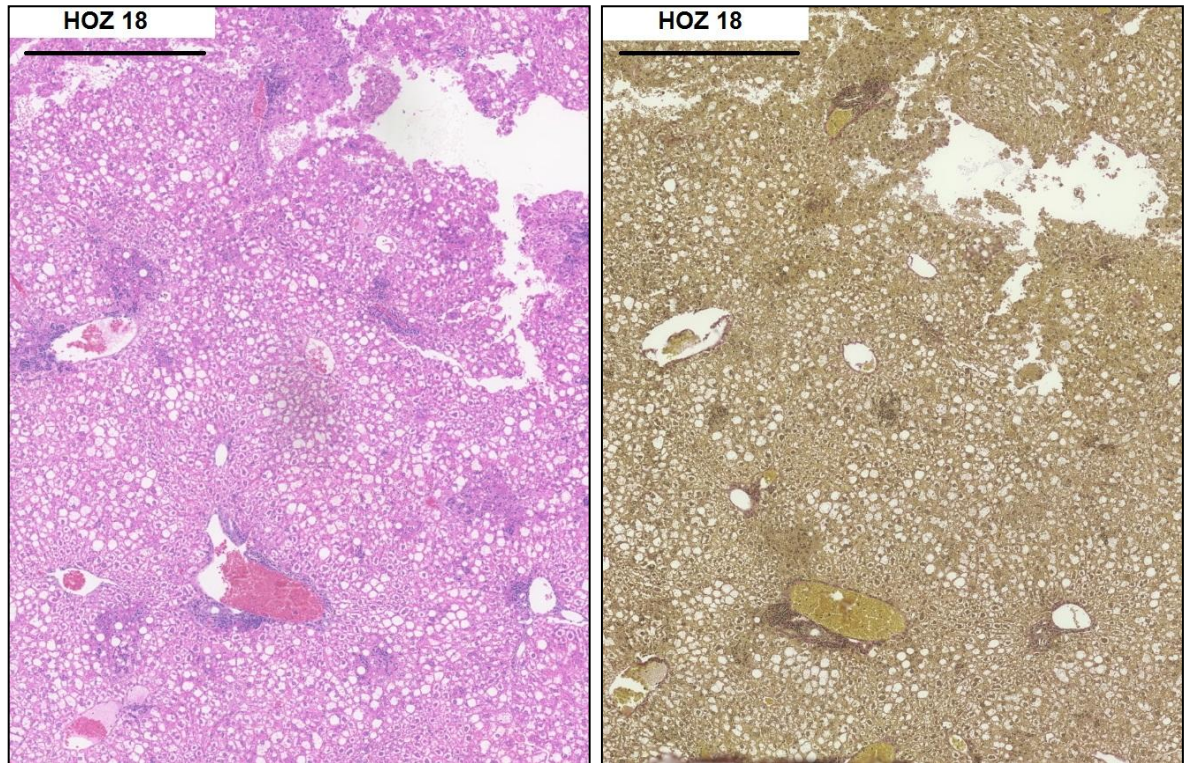
Kuva 7. HSD17 β 13-poistogeenisen naaraan (HOZ 33) maksakudoksessa havaittu muutoskohta, jossa näkyy tulehdussoluja ja nekroosia. HE-, van Gieson- ja PAS-värjäykset, mittajanat 200 μ m ja suurennos 100 μ m.

Kuvassa 8 on kuvan 7 muutoskohtaosoitus suuremmalla suurennoksella. Kuvassa oikealla näkyi vielä terveitä hepatosyyttejä (vihreä nuoli). Vasemmalla solut olivat jo täysin tuhoutuneita ja kudoksessa näkyy nekroosia (sininen nuoli). Nekroosi johtuu palautumattomasta soluvauriosta, jossa solujen ohjelmoitu solukuolema ei ole aktivoitunut (Naukkarinen & Kosma 2012).



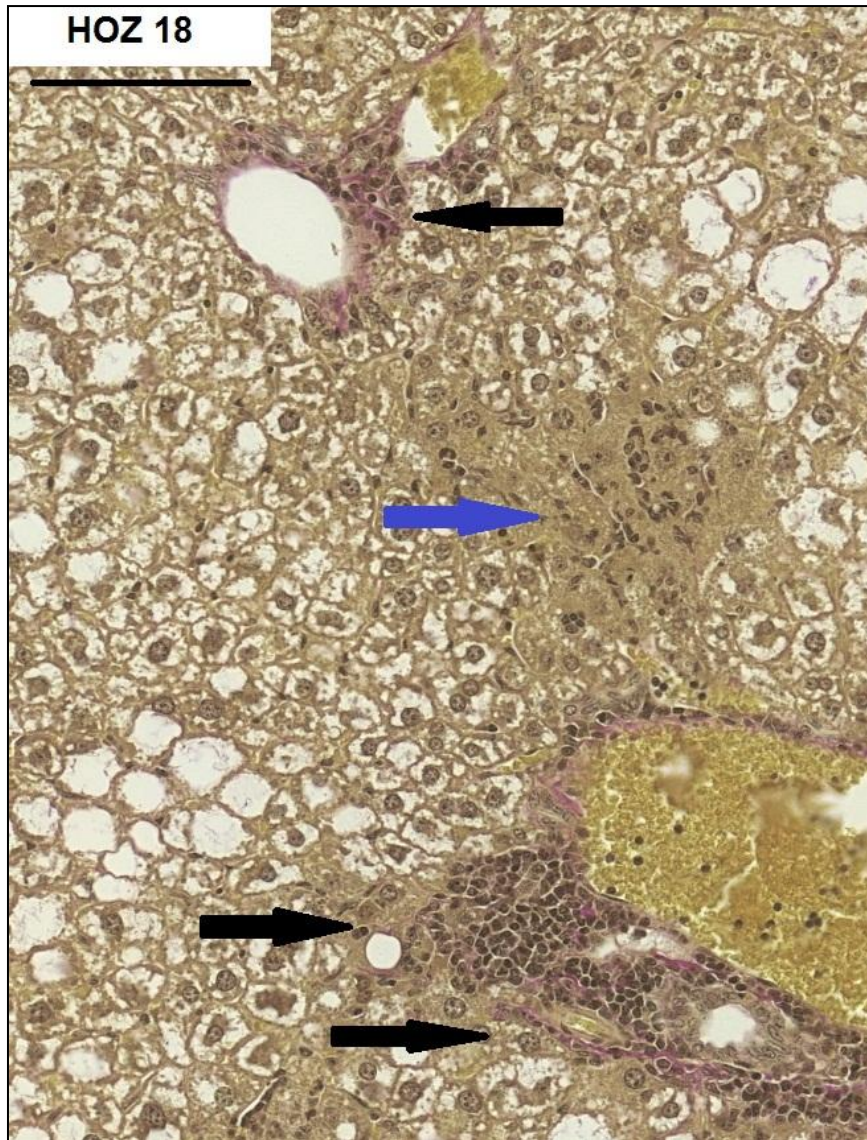
Kuva 8. Muutoskohta HSD17 β 13-poistogeenisen naaraan (HOZ 33) maksakudoksessa. Van Gieson -värjäys, mittajana 50 μ m.

Uroksista yhdellä HSD17 β 13-poistogeenisellä (HOZ 18) hiirellä havaittiin myös muista poiketen maksakudoksessa runsaasti sekä leukosyyttejä että rasvaa (Kuva 9).



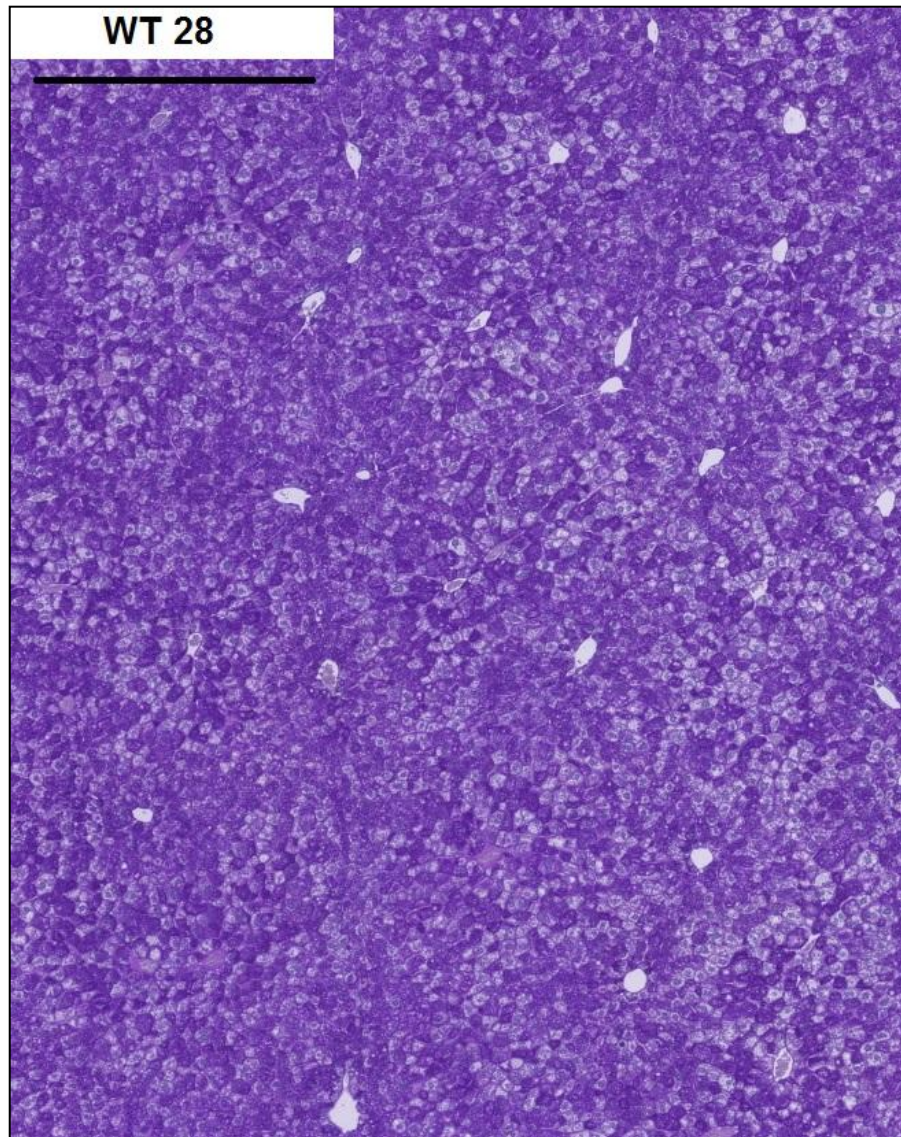
Kuva 9. HSD17 β 13-poistogeenisen uroksen (HOZ 18) maksakudos. HE- ja van Gieson -värjäys, mittajana 500 μ m.

Van Gieson-värjäyksessä huomattiin myös mahdollisesti kehittymässä olevaa fibroosia kyseisellä HSD17 β 13-poistogeenisellä uroksella (Kuva 10). Kaikista tutkimuksessa mukana olleista hiiristä (n=46) vain kyseisellä uroksella (HOZ 18) oli selkeästi fibroosia havaittavissa.



Kuva 10. Muutoksia HSD17 β 13-poistogeenisen uroksen (HOZ18) maksakudoksessa. Van Gieson-värjäys, mittajana 100 μ m.

Värjäyksessä vaaleanpunaisella värjäytynyt kollageeni oli normaalia suonien reunoilla, mutta kuten kuva osoittaa, vaaleanpunaiset säikeet olivat levinneet suonien reunoja pidemmälle (mustat nuolet) leukosyyttien väleihin. Lisäksi tällä uroksella havaittiin esiintyvän vähäisesti myös nekroosia (sininen nuoli).



Kuva 11. Osoitus glykogeenin esiintymisestä hiiren maksakudoksessa aterian jälkeen. PAS-värjäys, mittajana 500 μ m.

Kuvassa 11 näkyy PAS-värjäyksen osoittamana, että hiiri oli syönyt äskettäin. Solujen sytoplasmat olivat värjäytyneet erittäin tumman violeteiksi. Tämä tarkoittaa solujen sisältävän runsaasti glykogeenia (Aho 1999). Hiiren ravinnon glukoosi varastoituu maksasoluihin glykogeenina ja se vapautuu, kun energiatasapaino sitä tarvitsee (Solunetti 2006). Jos hiiri ei olisi syönyt, sytoplasmoissa olisi havaittavissa huomattavasti vaaleampia alueita eli vähemmän glykogeenia.

6 POHDINNAT

6.1 Tutkimuksen yleinen pohdinta

Tutkimuksen aihe oli tutkijalle aiemmin täysin vieras. Tutkija oli perillä tutkimuksessa käytettävistä histologisista menetelmistä, joiden ansiosta tutkimusta oli hyvä lähteä työstämään. Teoreettisen pohjan rakentaminen perustui lähes ainoastaan englanninkieliseen lähdemateriaaliin. Itse HSD17 β 13-entsyymistä tutkimuksia oli vielä melko vähän, mutta tutkija löysi runsaasti tietoa muista HSD17 β -ryhmän entsyymeistä. Vieraskielisen lähdemateriaalin käyttö tutkijalle vieraaseen aiheeseen liittyen toi haastetta, mutta ohjaajat avustivat tekstien ymmärtämisessä. Haastetta toi myös tutkimuksen ohjaajan kanssa englanniksi kommunikoiminen. Lopulta sekä vieraskielinen materiaali että vieraalla kielellä kommunikointi osoittautuivat tutkijasta arvokkaaksi kokemukseksi ja hyödyksi tulevaisuudessa.

Tutkimuksen metodisiin ja eettisiin ratkaisuihin oli saatavissa runsaasti materiaalia ja niistä pyrittiin käyttämään hyödyksi tuoreimpia ja luotettavimpia lähteitä. Tutkimuksen aikana suoritettu koe-eläinkurssi toi arvokasta tietoa ja taitoa, joka auttoi tutkijaa niin itse tutkimuksen käytännön osuuden ymmärtämisessä, kuin myös raportin kirjoittamisen osuudessa.

Valmiin tuotoksen teksti tarkistutettiin kahdella ohjaajalla mahdollisten asiavirheiden välttämiseksi. Tutkija koki teoretiedon kirjoittamisen ajoittain vaikeaksi vieraan aiheen ja vieraskielisen lähdemateriaalin takia, mutta vastapainona tutkimuksen kokeellisen osuuden ja tutkimustulosten kirjoitus sujui reippaasti hyvin tehdyn pohjatyön vuoksi. Tutkija koki edukseen saadessaan työskennellä kolmen eri ohjaajan kanssa, jotka auttoivat avartamaan näkökulmia eri suuntiin. Tutkija koki, että tutkimuksen tekeminen kasvatti hänen kykyään sekä tuottaa tieteellistä tekstiä että oman erikoisalansa osaamista ja ammattitaitoa.

6.2 Tutkimustulosten pohdinta

Tutkimuksessa käsiteltiin yhteensä 46 hiiren maksakudosnäytteitä, joista 12 hiirelle tehtiin 3 eri värjäystä. Näytemäärä oli 70 ja tutkimuksen tekijä yhdessä ohjaajiansa kanssa koki näytemäärän hyväksi ja kattavaksi, eikä tämän vuoksi näytemäärää lähdetty karsimaan. Kaikkia tässä tutkimuksessa käytettyjä näytteitä käytetään kokonaisuudessaan tutkimuksen ohjaajan kirjoittamaan kansainväliseen julkaisuun.

Naarailla ei havaittu huomattavaa eroa villityypin ja HSD17 β 13-poistogeenisen kannan välillä, kun taas uroksilla ero oli selkeämpi. HSD17 β 13-poistogeenisten urosten maksasoluissa oli huomattavasti enemmän rasvapisaroita ja maksakudoksessa leukosyyttikertymiä kuin villityyppiurosten. Saattaa olla, että HSD17 β 13-entsyymien poissaolo vaikuttaa voimakkaammin urospuolisilla hiirillä kuin naarailla.

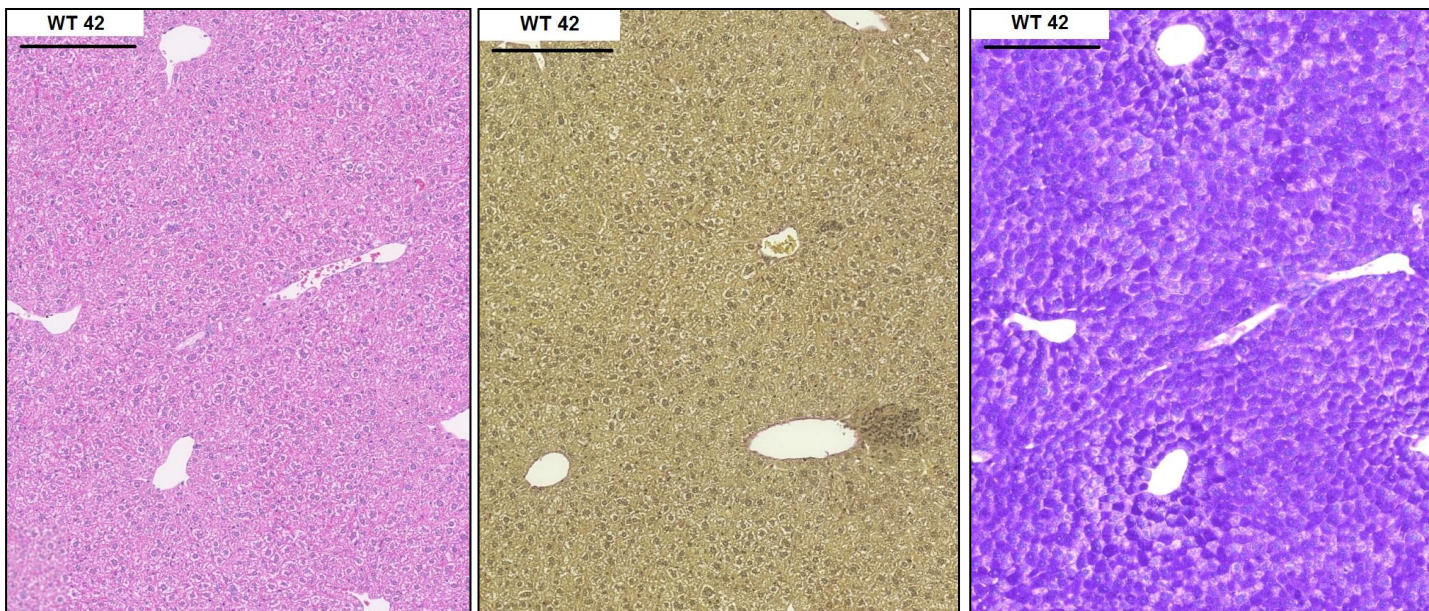
Steatoosi eli rasvamaksa oli mielenkiintoinen histologinen löytö HSD17 β 13-poistogeenisiltä hiiriltä, koska Horiguchi ym. (2008) osoittivat HSD17 β 13-entsyymien liittyvän rasva-aineenvaihduntaan.

Tässä tutkimuksessa mukana olleet hiiret olivat kaikki iältään 9-kuukautisia. Tämän vuoksi oli vaikeaa sanoa, johtuivatko jotkin muutokset iästä, koska eri-ikäisiä hiiriä ei verrattu keskenään.

HSD17 β -entsyymien fysiologiset toiminnot tekevät niistä kiinnostavia lääketeollisuudelle, ja uuden potentiaalisen HSD17 β -entsyymityypin löytäminen voisi auttaa tunnistamaan uusia kohteita lääkkeiden kehittämisessä (Liu ym. 2007). Tämän tyyppisille entsyymeille on mahdollista kehittää inhibiittoreita, jotka estävät entsyymien toimintaa. Tämä kyseinen toimintamekanismi on tärkeää lääkeaineiden kehittämisessä. (Solunetti 2006.) Esimerkiksi HSD17 β -inhibiittoreita voitaisiin kehittää hormonaalisiin rinta- ja eturauhassyöpiin uusiksi hoitomuodoiksi (Duax, Ghosh & Pletnev 2000; Hoffren, Murray & Hoffmann 2001). HSD17 β 13-entsyymi voisi olla kiinnostava lääkekehittelyn kohde, koska kyseisen entsyymien

avulla olisi mahdollista kehittää hoitomuotoja maksan sairauksiin. Tutkimuksilla voisi lisäksi selvittää mahdollisia syitä maksakudoksen rasvoittumiseen.

Tutkimuksessa käytettiin kolmea histologiassa yleisesti tehtävää perusvärjäystä; HE-, van Gieson- ja PAS- värjäyksiä. Värjäykset onnistuivat kokonaisuudessaan hyvin (Kuva 12). Tuloksia tarkasteltaessa havaittiin, että PAS-värjäys ei olisi ollut välttämätön, koska värjäys ei antanut minkäänlaista uutta tietoa tai erilaista näkökulmaa tuloksiin. PAS-värjäys värjää glykogeeneja ja siten osoitti lähinnä vain sitä, milloin hiiri oli viimeksi syönyt. Van Gieson- ja HE-värjäykset puolestaan osoittautuivat hyviksi määriteltäessä histologisia muutoksia hiiren maksakudoksessa.



Kuva 12. Yleiskuvat tutkimuksessa käytetyistä värjäyksistä. Villityypin naaras (WT 42). HE-, van Gieson- ja PAS-värjäykset, mittakaava 200µm.

Värjäyksien värit onnistuivat hyvin. Ainoastaan van Gieson -värjäyksen punainen fuksiini olisi voinut olla kirkkaampi. Kaikki 12 van Gieson -menetelmällä värjättyä maksakudosnäytettä olivat kuitenkin värjäykseltään identtisiä ja siksi luotettavia vertailla keskenään.

6.3 Jatkotutkimusaiheet

Jatkotutkimuksena voisi tutkia eri-ikäisien hiiren maksakudoksen histologiaa. Voisi selvittää, löytyykö nuoremmilta hiiriltä mahdollisia muutoksia maksakudoksessa, ja onko tuolloin havaittavissa eroa urosten ja naaraiden välillä. Samalla voisi enemmänkin vertailla urosten ja naaraiden välisiä eroja ja selvittää vaikuttaako HSD17 β 13-geenin poissaolo enemmän vain toiseen sukupuoleen.

Lisäksi tutkimusta voisi laajentaa tekemällä erilaisia värjäyksiä maksakudoksille. Esimerkiksi todella rasvaisiksi havaituille maksakudoksille voisi tehdä Oil Red O- rasvavärjäyksen preparoinnin yhteydessä jäädytetyistä maksakudospaloista. Näin saataisiin selville todellinen rasvan määrä hiiren maksasoluissa. Tässä tutkimuksessa tehtiin vain kolme histologista värjäystä parafiinileikkeille.

Jatkotutkimuksissa voisi pyrkiä myös selvittämään molekyylibiologisilla menetelmillä tarkemmin, mihin molekyylimekanismeihin HSD17 β 13-entsyymin puuttuminen vaikuttaa.

Jatkotutkimuksena voitaisiin tarkastella myös muita kudoksia, kuten esimerkiksi munuaista tai keuhkoa, joissa on jo aiemmin havaittu HSD17 β 13-geenin esiintymistä sekä ihmisellä että hiirellä (Liu ym. 2007; Lexicon Pharmaceuticals 2010). Vaihtoehtoisesti voisi myös tutkia kiveksiä ja munasarjoja, joista voisi todeta mahdollisia urosten ja naaraiden välisiä eroja.

LÄHTEET

- Aho H. 1999. Histologiset menetelmät patologiassa. Turun yliopisto. Kliinis-teoreettinen laitos. Patologia. Turku. 6, 23, 26-28, 35-37, 39, 46-48
- Alasuutari P. 1999. Laadullinen tutkimus. 3. uudistettu painos. Vastapaino. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä. 38-40, 44, 51, 84
- Antal C. Teletin M. Wendling O. Dgheem M. Auwerx J. & Mark M. 2007. Tissue Collection for Systematic Phenotyping in the Mouse. Curret protocols in molecular biology. 29A.4.1-29A.4.23. Wiley Interscience. John Wiley & Sons.Inc.
- Autio-Harmainen H. 2012. Maksa, sappirakko ja haima. Teoksessa Mäkinen M. Carpén O. Kosma V-M. Lehto V-P. Paavonen T. & Stenbäck F. (toim.) 2012. Patologia. Helsinki. Duodecim. 717-718, 729-730
- Castagnetta LA. Carruba G. & Traina A. ym. 1997. Endocrinology. 138. 4876-4882
- Cook H.C. 1990. Carbohydrates. Teoksessa Bancroft J.D, Stevens A. & Turner D.R (toim.) Theory and practice of histological techniques. 1990. Third edition. Churchill Livingstone. New York. 187
- Duax WL. Ghosh D. & Pletnev V. 2000. Vitam Horm. 58. 121-148
- Geenitekniikkalaki 377/1995
- Gordon K.C. 1990. Tissue processing. Teoksessa Bancroft J.D, Stevens A. & Turner D.R (toim.) Theory and practice of histological techniques. 1990. Third edition. Churchill Livingstone. New York. 44-54
- Gordon K.C & Bradbury P. 1990. Microtomy and paraffin sections. Teoksessa Bancroft J.D, Stevens A. & Turner D.R (toim.) Theory and practice of histological techniques. 1990. Third edition. Churchill Livingstone. New York. 71-77
- Gunnarsson C. Olsson B.M. & Stal O. 2001. Abnormal expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in breast cancer predicts late recurrence. Cancer Res. 61, 8448–8451
- He X.Y. Wen G.Y. Merz G. Lin D. Yang Y.Z. Mehta P. Schulz H. & Yang S.Y. 2002. Abundant type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the hippocampus of mouse Alzheimer's disease model. Brain Res. Mol. Brain Res. 99, 46-53
- Hirsjärvi, S. Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. Tutki ja kirjoita. 13. osin uudistettu painos. Keuruu. Tammi. 23-26, 122-125, 130, 134-135, 156-158
- Hoffren Am. Murray CM & Hoffmann RD. 2001. Curr Pharm Des. 7. 547-566
- Hopwood D. 1990. Fixation and fixatives. Teoksessa Bancroft J.D, Stevens A. & Turner D.R (toim.) Theory and practice of histological techniques. 1990. Third edition. Churchill Livingstone. New York. 21-22, 33
- Horiguchi Y. Araki M. & Motojima K. 2008. 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase type 13 is a liver-specific lipid droplet-associated protein. Biochemical and biophysical reaserch communication. 370 (2008). 235-238

Kere J. 2002. Geenitutkimuksen erityisiä ongelmia. Teoksessa Karjalainen S. Launis V. Pelkonen R. Pietarinen J. (toim.) Tutkijan eettiset valinnat. 2002. Gaudeamus-kirja. Tammer-Paino. Tampere. 138

Kiernan J.A. 1999. Histological & Histochemical methods. Theory and practice. Third edition. Butterworth-Heinemann. Reed Elsevier plc group. England. 1-2, 6-8, 11-26, 62-64, 109, 146-148

Koe-eläin keskus. KEK. 2009. Turun yliopisto. Viitattu: 7.2.2013 www.animalcenter.utu.fi

Koe-eläin keskus. KEK 2012. Turun yliopisto. Viitattu: 7.4.2013. www.animalcenter.utu.fi

Langer L.J. & Engel L.L. 1958. Human placental estradiol – 17beta; dehydrogenase. I. Concentration. Characterization and assay J. Biol. Chem 233. 583-588

Laki koe-eläintoiminnasta 62/2006

Le Curieux-Belfond O. Moslemi S. Mathieu M. & Seralini G.E. 2001. Androgen metabolism in oyster *Crassostrea gigas*: evidence for 17beta-HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 78, 359-366

Le Guellec D. Thiard M.C. Remy-Martin J.P. Deray A. Gomot L. & Adessi G.L.. 1987. In vitro metabolism of androstenedione and identification of endogenous steroids in *Helix aspersa*. Gen.Comp. Endocrinol. 66. 425-433

Lexicon Pharmaceuticals. 2010. MMRC@UCDAVIS. RT-PCR WT-Expression analysis. Viitattu: 5.3.2013. Lexicon Pharmaceuticals Inc. http://mmrrc.mousebiology.org/phenotype/Genentech/ENZ717N1/Expression/WT_Panel/Internal_Level_I/popups/ENZ717N1-Expression-WT_Panel-imageViewer-2408.html

Lindqvist A. Hughes I.A. & Andersson S. 2001. Substitution mutation C268Y causes 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. J.Clin. Endocrinol. Metab. 86, 921–923

Liu S. Huang C. Li D. Ren W. Zhang H. Qi M. Li X. & Yu L. 2007. Molecular cloning and expression analysis of a new gene for short-chain dehydrogenase/reductase 9. Acta Biochimica Polonica. vol. 54 no.1/2007. 213-218

Maa- ja metsätalousministeriön asetus nro 36/EEO/2006

Metsämuuronen J. 2001. Laadullisen tutkimuksen perusteet. Metodologia-sarja 4. 2.korjattu painos. International Methelp Ky. Viro. 9, 11, 14, 61

Mindnich R. Möller G. & Adamski J. 2004. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Molecular and Cellular Endocrinology. 218 (2004) 7-20

Mäkinen M. Carpén O. Kosma V-M. Lehto V-P. Paavonen T. & Stenbäck F. (toim.) 2012. Patologia. Helsinki. Duodecim. 1204, 1206,1216

Nagy A. Gertsenstein M. Vintersten K. & Behringer R. 2003. Manipulating the Mouse Embryo, a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour. New York. 320

Naukkarinen A. & Kosma V-M. 2012 Soluvaurio ja nekroosi. Teoksessa Mäkinen M. Carpén O. Kosma V-M. Lehto V-P. Paavonen T. & Stenbäck F. (toim.) 2012. Patologia. Helsinki. Duodecim. 141

Nienstedt W. Hänninen O. Arstila A. & Björkqvist S-E. 2009. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 18., uudistettu painos. Helsinki. WSOY. 29

Niiniiluoto I. 2002. Tieteen tunnuspiirteet. Teoksessa Karjalainen S. Launis V. Pelkonen R. Pietarinen J. (toim.) Tutkijan eettiset valinnat. 2002. Gaudeamus-kirja. Tammer-Paino. Tampere. 40

Oppermann U. Salim S. Hult M. Eissner G. & Jornvall H. 1999. Regulatory factors and motifs in SDR enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 463, 365-371

Penning T.M. 2003. Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. *Hum. Reprod. Update* 9. 193-205

Pelkonen R. & Louhiala P. 2002. Ihminen lääketieteellisen tutkimuksen kohteena. Teoksessa Karjalainen S. Launis V. Pelkonen R. Pietarinen J. (toim.) Tutkijan eettiset valinnat. 2002. Gaudeamus-kirja. Tammer-Paino. Tampere. 127

Pietarinen J. 2002. Eettiset perusvaatimukset tutkimustyössä. Teoksessa Karjalainen S. Launis V. Pelkonen R. Pietarinen J. (toim.) Tutkijan eettiset valinnat. 2002. Gaudeamus-kirja. Tammer-Paino. Tampere. 63

Rogers A. & Dintzis R. 2012. Liver and Gallbladder. Teoksessa Treuting P. Dintzis S. Frevent C. Liggitt D. & Montine K. *Comparative Anatomy and Histology, a Mouse and Human Atlas.* 2012 Elsevier. USA. 193-199

Ryan K.J. & Engel L.L. 1953. The interconversion of estrone and estradiol by human tissue slices. *Endocrinology* 52, 287-291

Solunetti. 2006. Entsyymi-inhibiittorit. *Solubiologia*. Viitattu: 5.3.2013. www.solunetti.fi Sijainti: Etusivu > Koostumus > Proteiinit > Proteiinien tehtävä > Entsyymit > Entsyymi-inhibiittorit

Solunetti. 2006. Glykogeenin rakenne. *Solubiologia*. Viitattu: 26.4.2013. www.solunetti.fi Sijainti: Etusivu > Koostumus > Hiilihydraatit > Glykogeeni

Stevens A. 1990. The haematoxylin. Teoksessa Bancroft J.D, Stevens A. & Turner D.R (toim.) *Theory and practice of histological techniques.* 1990. Third edition. Churchill Livingstone. New York. 107, 111, 113

Strauss L. 29.10.2012. Transgeeniset kannat, geneettinen laadunvalvonta, alkioiden pakastaminen. Koe-eläinkurssi. Powerpoint-esitys.

Terminologian tietokannat. 2012. Lääketieteen termit. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu: 27.11.2012. www.terveysportti.fi

The Jackson laboratory. 2012. Viitattu: 23.11.2012. www.jax.org Sijainti: Home > Research and resources > Collaborative research programs > KOMP

Tuomi J. & Sarajärvi A. 2004. Laadullinen tutkimus ja sisällönanalyysi. 1-3.painos. Gummerus Kirjapaino Oy. Tammi. Jyväskylä. 83, 129

UCSC Genome bioinformatics. 2012. Viitattu: 21.11.2012. www.genome.ucsc.edu


Valtioneuvoston asetus geenitekniikasta 928/2004

Vihko P. Harkonen P. Oduwale O. Torn S. Kurkela R. Porvari K. Pulkka A. & Isomaa V. 2002. 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenases and cancers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 119-122

Vilka H. 2005. Tutki ja kehitä. Tammi. Keuruu. 28-30, 126-127

Vilka H. 2006. Tutki ja havainoi. Tammi. Vajaakoski. 13-14, 25, 37-38, 83, 87

1



**OPINNÄYTETYÖN
TOIMEKSIANTOSOPIMUS**

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi MINNA GRÖNROOS

Osoite [REDACTED]

Puhelin koti [REDACTED] Puhelin työ [REDACTED]

Sähköposti minna.gronroos@students.turkuamk.fi

Koulutusohjelma BIOANALYTIKKA

OPINNÄYTETYÖ

Aihe/ työnimi VILLITYYPIN JA HSD17B13 -POISTOLEENISEN
HIREN KUDOSNÄYTTEIDEN VERTAILU
HISTOLOGISIN MENETELMIN

Aikataulu LOKAKUU 2012 - HUHTIKUU 2013

TOIMEKSIANTAJA

Organisaatio Turun Yliopisto

Työn ohjaaja / yhteyshenkilö Heena Strauss

Osoite Känämykkyä 10

Puhelin [REDACTED] Sähköposti heena@utu.fi

OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja [Signature] SANNA VIRTANEN

Puhelin [REDACTED] Sähköposti sanna.virtanen@turkuamk.fi

Turun ammattikorkeakoulu
Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791
sposti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

2

OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT

OHJAUS JA VASTUUT

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajaorganisaation näkökulmasta.

OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle eli opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevaa oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkki-osta ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoelmiin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammattisalaisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määrättyjä tietoja, vaan ne jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.

Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa esiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljätoista (14) päivää ennen aiottua julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määritellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisältyvät liike- tai ammattisalaisuudet, joita ei julkaista.

OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETTYLLÄ TAVALLA

30.11.2012

Opiskelija

30.11.2012

Toimeksiantaja

LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

Tulosta lomake

Turun ammattikorkeakoulu
Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791
sposti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi

Tutkimuksessa käytetyt hiiret

Villityypin hiiret

ID	sukupuoli
WT 30	f
WT 36	f
WT 57	f
WT 99	f
WT 42	f
WT 16	f
WT 107	f
WT 98	f
WT 10	f
WT 74	m
WT 80	m
WT28	m
WT 23	m
WT 121	m
WT 14	m
WT 75	m
WT 60	m
WT 82	m
WT 47	m
WT 26	m
WT 25	m

f = naaras

m = uros

Hsd17b13-poistogeeniset hiiret

ID	sukupuoli
HOZ 46	f
HOZ 108	f
HOZ 33	f
HOZ 65	f
HOZ 35	f
HOZ 15	f
HOZ 58	f
HOZ 67	f
HOZ 9	f
HOZ 76	f
HOZ 78	f
HOZ 66	f
HOZ 84	f
HOZ 95	m
HOZ 18	m
HOZ 78	m
HOZ 86	m
HOZ 73	m
HOZ 51	m
HOZ 59	m
HOZ 63	m
HOZ 24	m
HOZ 34	m
HOZ 38	m
HOZ 120	m

Strain Detail Sheet - Hiirikanta

Availability & Fees

Strain Name: B6;129S5-*Hsd17b13tm1Lex/Mmcd*

Stock Number: 032367-UCD

Other Names:

Hsd17b13

UNQ497

Gene Details:

Gene Symbol: Hsd17b13

Name: hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13

Alteration at locus: Knockout

Genetic Alterations:

The Hsd17b13 gene consists of 7 exons. Coding exons 1 and 2 were targeted (NCBI accession BC019427.1) by homologous recombination.

Genotype Determination:

• Donor's PCR

ES Cell Line: Lexicon 129/SvEvBrd

Strain Description

Phenotype:

Phenotypic analysis of the F2 mice indicates this mutation has no notable phenotype.

Phenotypic data provided by Lexicon Genetics, Inc.

Strain Type: Non-inbred Knockout

Founder genetic background: B6;129S5

Strain genetic background: B6;129S5

Strain Development:

Targeted or gene trap mutations are generated in strain 129/SvEvBrd derived embryonic stem (ES) cells. The chimeric mice are bred to C57BL/6J albino mice to generate F1 heterozygous animals. These progeny are intercrossed to generate F2 wild type, heterozygous, and homozygous mutant progeny. On rare occasions, for example when very few F1 mice are obtained from the chimera, F1 heterozygous mice are crossed to 129/SvEvBrd x C57BL/6 hybrid mice to yield additional heterozygous animals for the intercross to generate the F2 mice. Mice are archived at the sib-mated generation F2. Recovery will be performed using C57BL/6J donors unless otherwise requested.

Research Applications

• Cell biology

Strain Origin

Donor: Genentech, Inc.

Primary Reference:

Tang T, Li L, Tang J, Li Y, Lin W, Martin F, Deanna Grant D, Solloway M, Parker L, Weilan Ye W, Forrest W, Ghilardi N, Oravec T, Platt KA, Rice DS, Han-

sen GM, Abuin A, Eberhart DE, Godowski P, Holt KH, Peterson A, Zambrowicz BP, de Sauvage FJ. A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. Nat Biotechnol. 2010 July; 28 (7):749–755. (Medline PMID: 20562862)

Colony and Husbandry Information

Appearance

Coat color:

Other:

Breeding

MMRRC Breeding System: Backcross or Sib-mating

Breeding Scheme(s):

- Wild-type female x Heterozygous male
- Heterozygous female x Heterozygous male
- Homozygous female x Homozygous male

Generation: F2

Overall Breeding Performance: Fair

Reproductive Statistics

Viability and

Fertility Female Male

Homozygotes are viable: Yes Yes

Homozygotes are fertile: Yes Yes

Heterozygotes are fertile: Yes Yes

Age

Reproductive

Decline:

Unknown Unknown

Average litter size:

Recommended wean age: 3 weeks

Special Considerations

Health Status Report

Mice recovered from a cryo-archive will have health surveillance performed on the resuscitated animals.

Order Request Information

Availability Level:

Limited quantities of breeder mice (recovered litter) are available from a cryoarchive; recovered litter usually available to ship in 3 to 4 months.

Conditions of Distribution:

Licensing is required for this strain. Please complete the Genentech Lexicon Agreement and provide it at the time your order is placed.

MMRRC:032367-UCD Detail

<http://www.mmrrc.org/strains/32367/032367.html> 22/03/2011

HE-värjäysprotokolla parafiinileikkeille

Esikäsittely

- Ennen värjäystä pidä leikkeitä tunti + 60 °C
- Anna jäähtyä hetki

Värjäys

- Rehydraatio
(Ksyleeni 3 x 5min. + ABS 2 x yht. 5min. + 96 % 2 x yht. 5min. + 70 % huuhtelu)
- dH₂O x 3 huuhtelu
- Hematoksyliini (Delafield) 15 min.
- H₂O 3 x huuhtelu + 10 min.
- Happoalkoholi 1min.
(250ml 70 % EtOH + 2,5ml 37 % HCl)
- dH₂O 3 x huuhtelu + 10 min.
- Eosiini 2 min.
- Dehydraatio alkaen ABS 2 x huuhtelu + Ksyleeni 3 x 5 min.

Päällystys

- Pertex

Värjäyksessä käytetyt reagenssit ja aineet:

- Ksyleeni (OY FF-Chemicals Ab)
- 37 % Suolahappo, HCl (Hydrochloric acid 37 %, Sigma-Aldrich)
- Delafielin hematoksyliini (Hematoxylin solution according to Delafield, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich)
- Eosiini (Eosin solution, Reagen)
- Pertex (Mounting medium for light microscopy, Algol Pharma Oy, Histolab)

PAS-värjäysprotokolla parafiinileikkeille

Esikäsitteily

- Ennen värjäystä pidä leikkeitä tunti + 60 °C
- Anna jäähtyä hetki

Värjäys

- Rehydraatio
(ksyleeni 3 x 5min. + ABS 2 x yht. 5min. + 96 % 2 x yht. 5min. + 70 % huuhtelu)
- dH₂O x 3 huuhtelu
- 1 % Periodihappo 10 min.
(2,5g periodihappo + 250ml dH₂O)
- H₂O juoksevana 10 min.
- dH₂O x 1 huuhtelu
- Schiffin reagenssi 45 min.
- Kuuma H₂O 10 min.
- dH₂O x 1 huuhtelu
- Hematoksyliini (Mayer) 5 min.
- H₂O juoksevana 10 min.
- dH₂O x 1 huuhtelu
- Dehydraatio
(70 % huuhtelu + 96 % 2 x yht. 5min. + ABS 2 x yht. 5 min. + Ksyleeni 3 x 5 min.)

Päällystys

- Pertex

Värjäyksessä käytetyt reagenssit ja aineet:

- Ksyleeni (OY FF-Chemicals Ab)
- Schiffin reagenssi (Schiff´s reagenz, MERCK)
- Mayerin hematoksyliini (Mayer´s hematoxylin, MERCK, VWR international)
- Pertex (Mounting medium for light microscopy, Alcol Pharma Oy, Histolab)

Weigert van Gieson -värjäysprotokolla parafiinileikkeille

Esikäsittely

- Ennen värjäystä pidä leikkeitä tunti + 60 °C
- Anna jäähtyä hetki

Värjäys

- Rehydraatio
(Ksyleeni 3 x 5min. + ABS 2 x yht. 5min.+ 96 % 2 x yht. 5min. + 70 %
huuhtelu)
- Weigert working solution 20 min.
(A+B 1:1 [100ml+100ml])
- H₂O x 1 min.
- Differentiaatio 0,75 % happoalkoholilla 5 sek.
(ABS 200ml + HCl 1,5ml)
- H₂O 5 min.
- dH₂O x 1 huuhtelu
- Van Gieson solution 2min.
- dH₂O nopea huuhtelu
- Dehydraatio alkaen ABS 2 x huuhtelu + Ksyleeni 3 x 5 min.

Päällystys

- Pertex

Värjäyksessä käytetyt reagenssit ja aineet:

- Ksyleeni (OY FF-Chemicals Ab)
- Weigert working solution
 - A (Weigert A, Weigert hematoxylin, Reagena)
 - B (Weigert B, Weigert hematoxylin, Reagena)
- Van Gieson solution (Van Gieson´s solution, Reagena)
- Pertex (Mounting medium for light microscopy, Alcol Pharma Oy, Histolab)