



TEKNIIKAN JA LIIKENTEEN TOIMIALA

Laboratorioala

Tutkimuspainotteinen

OPINNÄYTETYÖ

**LEPTIININ JA LEPTIININRESEPTORIN IMMUNOHISTOKEMIALLINEN
KUVANTAMINEN ROTAN AIVOISTA**

**Työn tekijä: Sini Hämäläinen
Työn valvoja: Tiina Soininen
Työn ohjaaja: Atso Raasmaja**

Työ hyväksytty: __. __. 2006

Tiina Soininen, lehtori



ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Farmasian tiedekunnan Farmakologian ja toksikologian osastolle. Haluan kiittää osaston esimiestä professori Raimo Tuomista sekä opinnäytetyöni ohjaajaa yliopistolehtori Atso Raasmajaa ja minua työtapoihin perehdyttäneitä laboratorioanalyttikko Ritva Ala-Kuljua. Lisäksi haluan kiittää työni valvojaa lehtori Tiina Soinista.

Helsingissä 10.11.2006

Sini Hämäläinen

OPINNÄYTEYÖN TIIVISTELMÄ

Tekijä: Sini Hämäläinen

Työn nimi: Leptiin ja leptiinireseptorin immunohistokemiallinen kuvantaminen rotan aivoista

Päivämäärä: 10.11.2006

Sivumäärä: 42 s. + 6 liitettä

Koulutusohjelma: Laboratorioala

Suuntautumisvaihtoehto: Tutkimuspainotteinen

Työn valvoja: lehtori Tiina Soininen

Työn ohjaaja: yliopiston lehtori, FT Atso Raasmaja

Tässä opinnäytetyössä kehitettiin menetelmät leptiin ja leptiinireseptorin immunohistokemialliseksi kuvantamiseksi rotan aivoista. Menetelmät kehitettiin Helsingin yliopiston Farmasian tiedekunnan Farmakologian ja toksikologian osaston tarpeisiin.

Leptiini on adiposyytien tuottama hormoni, jonka erittyminen verenkiertoon korreloi elimistön rasvavarastojen koon kanssa. Verenkierrosta leptiini kulkeutuu aivoihin ja hypotalamukseen, jossa se vaikuttaa syömisen ja energia-aineenvaihdunnan säätelyyn sitoutumalla leptiinireseptoriin. Leptiini kiihdyttää energia-aineenvaihduntaa ja vähentää syömistä ja energian varastointia.

Immunohistokemiallista kuvantamista voidaan käyttää yhdisteiden määrittämiseen kudoksista. Immunohistokemia perustuu antigeeninä toimivan yhdisteen ja vasta-aineen muodostamaan kompleksin, ja soveltuu sekä kvalitatiivisiin että kvantitatiivisiin analyyseihin. Haluttu yhdiste paikannetaan siihen spesifisesti sitoutuvalla vasta-aineella. Antigeeni-vasta-aine-kompleksi voidaan detektoida erilaisilla leimoilla, jotka tuottavat esimerkiksi värillisen yhdisteen. Värjättyjä kudokset tarkastellaan mikroskooppisesti.

Työssä tarkasteltiin primääristen vasta-aineiden pitoisuuksien sekä DAB-reaktion keston vaikutusta leptiin ja leptiinireseptorin immunohistokemialliseen kuvantamiseen. Menetelmät optimoitiin tarkastelemalla värjättyjä leikkeitä valomikroskooppisesti ja mittaamalla leikkeiden optiset tiheydet. Saatujen tulosten pohjalta laadittiin menetelmäohjeet proteiinin määrittämiseksi.

Leptiin ja sen reseptorin spesifinen määrittäminen rotan aivoista onnistui hyvin ja menetelmät niiden määrittämiseksi saatiin pystytettyä. Menetelmiä on tarkoitus käyttää ruokahalun säätelyn fysiologisten ja farmakologisten mekanismien tutkimiseen.

Avainsanat: leptiini, leptiinireseptori, immunohistokemia, rotta, aivot, hypotalamus

ABSTRACT

Name: Sini Hämäläinen	
Title: Immunohistochemical Imaging of Leptin and Leptin Receptor in Rat brain Sections	
Date: 10 November 2006	Number of pages: 42 + 6 appendixes
Department: Laboratory Sciences	Study Programme: Research
Instructor: Tiina Soininen, Lecturer	
Supervisor: Atso Raasmaja, Ph.D	
<p>The aim of this work was to develop an immunohistochemical analysis of leptin and leptin receptors in rat brain sections. These methods were developed for the purposes of the Division of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki.</p> <p>Leptin is an adipocyte-derived hormone that is secreted to blood circulation, and the amount of leptin correlates with the fat content. Leptin is carried via the bloodstream to the brain where it regulates food intake and energy metabolism by binding to the leptin receptor in the hypothalamus. Leptin increases energy expenditure, and reduces food intake and energy storage.</p> <p>The immunohistochemical staining can be used for determination of specific compounds in tissues and organs. Immunohistochemistry is based on a reaction between antigen and antibody. Immunohistochemistry can be used for quantitative and qualitative analysis. Target compounds are localized with specific antibodies. For visual detection the antigen-antibody -complex needs different labels that produce for example stained compound. The tissues can be analysed with a microscope.</p> <p>This study focused on determining the effect of concentrations of primary antibodies and DAB colour reactions on immunohistochemical imaging of leptin and leptin receptor. The intensity of staining was estimated microscopically and measured as optical densities. The experimental procedures for the determination of leptin and leptin receptors could be then optimised based on these measurements.</p> <p>In this work, leptins and leptin receptors were found in several areas such as the hypothalamus. These immunohistochemical methods and protocols will be used to study the physiological and pharmacological role of leptin and leptin receptors in the regulation of food intake and energy metabolism.</p>	
Keywords: leptin, leptin receptor, immunohistochemistry, rat, brain, hypothalamus	

SISÄLLYS

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

LYHENNELUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	TEORIAOSA	1
2.1	Leptiini	1
2.1.1	<i>Leptiinin erittyminen</i>	2
2.1.2	<i>Leptiinin rakenne</i>	2
2.2	Leptiinireseptori	3
2.2.1	<i>Solunulkoinen domeeni</i>	3
2.2.2	<i>Solunsisäinen domeeni ja sen viestintä</i>	4
2.2.3	<i>Esiintymisalueet</i>	5
2.3	Leptiinin vaikutukset	6
2.3.1	<i>Melanokorttiinijärjestelmä ja pro-opiomelanokorttiini</i>	7
2.3.2	<i>CART-neuropeptidi</i>	7
2.3.3	<i>Neuropeptidi Y</i>	8
2.3.4	<i>Agouti-sukuinen peptidi</i>	8
2.3.5	<i>Leptiinin vaikutus kilpirauhasen toimintaan</i>	8
2.4	Immunohistokemia	9
2.4.1	<i>Immuniteetti</i>	9
2.4.2	<i>Antigeeni ja vasta-aine</i>	10
2.4.3	<i>Monoklonaalinen ja polyklonaalinen vasta-aine</i>	10
2.4.4	<i>Nimeäminen</i>	11
2.5	Immunohistokemiallisen määrityksen perusteet	12
2.5.1	<i>Fiksaatio</i>	12
2.5.2	<i>Antigeeni-vasta-aine-kompleksin visualisointi</i>	13
2.5.3	<i>Epäspesifin värjäytymisen estäminen</i>	15
2.5.4	<i>Immunohistokemialliset menetelmät</i>	15
3	MENETELMÄT	17
3.1	Materiaalit	18
3.1.1	<i>Vasta-aineet ja seerumi</i>	18
3.1.2	<i>Vectastain® Elite ABC Kit</i>	18
3.1.3	<i>Eläimet</i>	18
3.2	Aivojen fiksaus perfuusiolla	18
3.3	Aivojen leikkaus kryostaatilla	19

3.4	Immunohistokemiallinen menetelmä	20
3.4.1	<i>Leptiin ja leptiinireseptorin immunohistokemiallinen määrittäminen</i>	20
3.4.2	<i>Vectastain® Elite ABC Kit</i>	22
3.4.3	<i>Immunohistokemiallinen menetelmä</i>	23
3.4.4	<i>Aivoleikkeiden värjäys</i>	25
3.5	Aivoleikkeiden tutkiminen	27
3.5.1	<i>Kuvaaminen Stereo Investigator -ohjelmalla</i>	27
3.5.2	<i>Optisen tiheyden mittaaminen Image Pro Plus -tietokoneohjelmalla</i>	27
4	TULOKSET	28
4.1	Leptiin kuvantaminen	28
4.1.1	<i>Primäärinen vasta-aine</i>	28
4.1.2	<i>DAB-reaktioaika</i>	29
4.1.3	<i>Spesifinen värjäytyminen</i>	31
4.2	Leptiinireseptorin kuvantaminen	33
4.2.1	<i>Primäärinen vasta-aine</i>	33
4.2.2	<i>DAB-reaktioaika</i>	34
4.2.3	<i>Leikkeiden värjäytyminen</i>	35
4.3	Leptiinin menetelmien optinen tiheys	37
4.3.1	<i>Konsentraatiovasteen vaikutus optiseen tiheyteen</i>	37
4.3.2	<i>DAB-reaktioajan vaikutus optiseen tiheyteen</i>	38
4.3.3	<i>Optinen intensiteetti -päätelmät</i>	40
5	YHTEENVETO	41
	VIITTELUETTELO	42

LIITTEET

Liite 1.	Perfuusioliuokset
Liite 2.	Objektilasien kelatointi
Liite 3.	Leptiinireseptorin konsentraatiomäärittäminen
Liite 4(3).	Leptiinireseptorin DAB-reaktioaikamäärittäminen
Liite 5(4).	Leptiinin immunohistokemiallinen kuvantaminen (monoklonaalisella vasta-aineella) rotan kiinnitetystä aivokudosleikkeestä (DAB-värireaktio)
Liite 6(4).	Leptiinireseptorin immunohistokemiallinen kuvantaminen (monoklonaalisella vasta-aineella) rotan kiinnitetystä aivokudosleikkeestä (DAB-värireaktio)

LYHENNELUETTELO

ABC	Avidiini-biotiini-kompleksi
Arc	Arcuate nucleus
BMI	Painoindeksi
CNS	Keskushermosto
DAB	3',3 - diaminobentsidiini tetrahydrokloridi
DMH	Dorsomediaalinen tumake
JAK	Janus kinaasi
LR	Leptiinireseptori
LRa	Leptiinireseptorin lyhyt muoto
LRb	Leptiinireseptorin pitkä muoto
LHA	Lateraalinen hypotalamus
MC	Melanokorttiinijärjestelmä
α -MSH	α -melanosyyttejä stimuloiva hormoni
NPY	Neuropeptidi Y
PBS	0,9 % natriumkloridi 0,1 M fosfaattipuskurissa
POMC	Pro-opiomelanokortiini
PVH	Paraventrikulaarinen tumake
RCA	Retrokiasmaattinen alue
SOCS	Sytokiiniviestinnän estäjä
STAT	Viestiä muokkaava ja transkription aktivoiva entsyymi
VMH	Ventromediaalinen tumake

1 JOHDANTO

Leptiinillä ja leptiinireseptorilla tiedetään olevan keskeinen tehtävä syömisen ja energia-aineenvaihdunnan säätelyssä. Leptiini on adiposyyttien tuottama peptidihormoni. Se on sytokiini, jonka erittyminen vereen korreloi elimistön rasvamäärän kanssa. Leptiini kulkeutuu verenkierron välityksellä aivoihin yli veri-aivoesteen, missä se vaikuttaa reseptorinsa välityksellä neuropeptidien mRNA-ekspressioon hypotalamuksessa. Hypotalamuksella tiedetään olevan keskeinen rooli ruokahalun ja energia-aineenvaihdunnan säätelyssä.

Immunohistokemiallista kuvantamista voidaan käyttää yhdisteiden määrittämiseen kudoksista. Menetelmä perustuu antigeenina toimivan yhdisteen ja vasta-aineen muodostamaan kompleksiin ja soveltuu sekä kvalitatiivisiin että kvantitatiivisiin analyyseihin. Haluttu proteiini paikannetaan siihen spesifisesti sitoutuvalla vasta-aineella. Antigeeni-vasta-aine-kompleksi voidaan detektoida erilaisilla leimoilla, jotka tuottavat esimerkiksi värillisen yhdisteen. Värjättyjä kudokset tarkastellaan mikroskooppisesti.

Tämän työn tavoitteena on kehittää menetelmät leptiinin ja leptiinireseptorin immunohistokemialliseksi kuvantamiseksi rotan aivoista. Kehitetyt menetelmät perustuvat eräiden muiden proteiinien immunohistokemiallisiin määrittäytisiin Farmakologian ja toksikologian osastolla (Helsingin Yliopisto, Farmasian tiedekunta).

2 TEORIAOSA

Tämän työn teoreettisessa osassa paneudutaan selvittämään leptiinin ja leptiinireseptorin rakennetta ja vaikutusmekanismeja sekä aivoalueita, joilla ne esiintyvät. Lisäksi tässä osassa esitellään käytetty immunohistokemiallinen menetelmä ja sen periaatteet.

2.1 Leptiini

Leptiini on adiposyyttien tuottama ja erittämä peptidihormoni, joka löydettiin vuoden 1994 lopulla. Leptiinin identifiointi avasi kokonaan uuden näkökulman adiposyyttien erittämien tekijöiden roolista energiatasapainon säätelyssä perustuen lähes kaikkialla esiintyviin leptiinireseptoreihin. Leptiinin on

osoitettu vaikuttavan laajalti keskushermostossa ja perifeerisillä alueilla fysiologisiin toimintoihin. Leptiini osallistuu elimistön rasvavarastojen koon säätelyyn, insuliiniviestintään, glukoositasapainoon ja luunmuodostukseen. Lisäksi se vaikuttaa muun muassa rasvahappotasapainoon, lisääntymiseen ja seksuaaliseen kehitykseen, immuunivasteeseen, angiogeneesiin sekä haavojen paranemiseen. Leptiini vaikuttaa spesifisiin metaboliareitteihin monimutkaisten patofysiologisten prosessien välityksellä. [1,2,3.]

Lihavuus on saavuttanut lähes epidemian mittasuhteet teollistuneissa valtioissa, aiheuttaen huomattavaa sairastuneisuutta ja kuolleisuutta sekä lisäten riskiä sairastua muun muassa tyypin 2 diabetekseen, sydän- ja verisuonisairauksiin, erilaisiin kasvaimiin ja metaboliseen oireyhtymään. Elimistön leptiinipitoisuuden on havaittu korreloivan läheisesti painoindeksin (BMI) kanssa. [1,2.]

Leptiini vaikuttaa painoon vähentämällä syömistä ja energian varastointia sekä lisäämällä energian kulutusta aktivoimalla sympaattista hermostoa ja säätelemällä endokriinistä toimintaa. Tällainen on tyypillistä hypotalamiselle toiminnalle, mikä yhdistää autonomisen-, endokriinisen- ja käyttäytymisvas-teen. On osoitettu, että leptiini vaikuttaa hypotalamuksen välityksellä homeostaasin ylläpitämiseen. [4,5.]

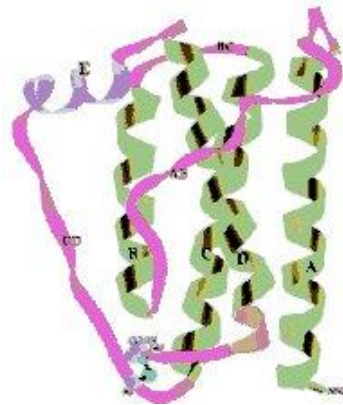
2.1.1 *Leptiinin erittyminen*

Leptiini on pääasiallisesti adiposyyttien tuottama hormoni. Leptiinin tuotanto korreloi kehon rasvavarastojen (triglyseridit) koon kanssa ja siksi leptiinin aluksi ajateltiin vaikuttavan vain kylläisyyteen. Adiposyytit erittävät leptiiniä verenkiertoon, mutta eivät ole hormonin ainoa lähde. Esimerkiksi istukasta, vatsan limakalvoilta ja maitorauhasepiteelistä erittyy myös pieniä määriä leptiiniä, millä saattaa olla paikallisia parakriinisia vaikutuksia. Vatsassa leptiinin erittymistä säätelee ravitsemuksellinen tila ja muut hormonit, vaikka leptiinin fysiologista roolia ruokahalun paikallisessa säätelyssä ei ole identifioitu. [1.]

2.1.2 *Leptiinin rakenne*

Leptiini on *ob*-geenin koodaama monitehoinen 16 kDa kokoinen peptidihormoni. Leptiini kuuluu tertiäärirakenteensa perusteella pitkäketjuisten helikaalisten sytokiiniinien ryhmään. Se on 167 aminohaposta rakentuva haarautumaton ja glykolysoimaton polypeptidi, jonka kaksikerroksinen tertiäärirakenne perustuu neljään antiparalleeliin α -heliksiin ja muun muassa niitä yhdistäviin

kahteen ristisidokseen (kuva 1). Lisäksi kahden kysteiniitähteen välinen disulfididisidos (Cys⁹⁶ ja Cys¹⁴⁶) leptiinin karboksiterminaaliosassa on osoittautunut tärkeäksi rakenteen laskostumiselle ja reseptoriin sitoutumiselle. Leptiinillä on lyhyt puoliintumisaika (muutama minuutti). [2,3.]



Kuva 1. Leptiinin rakenne [6.]

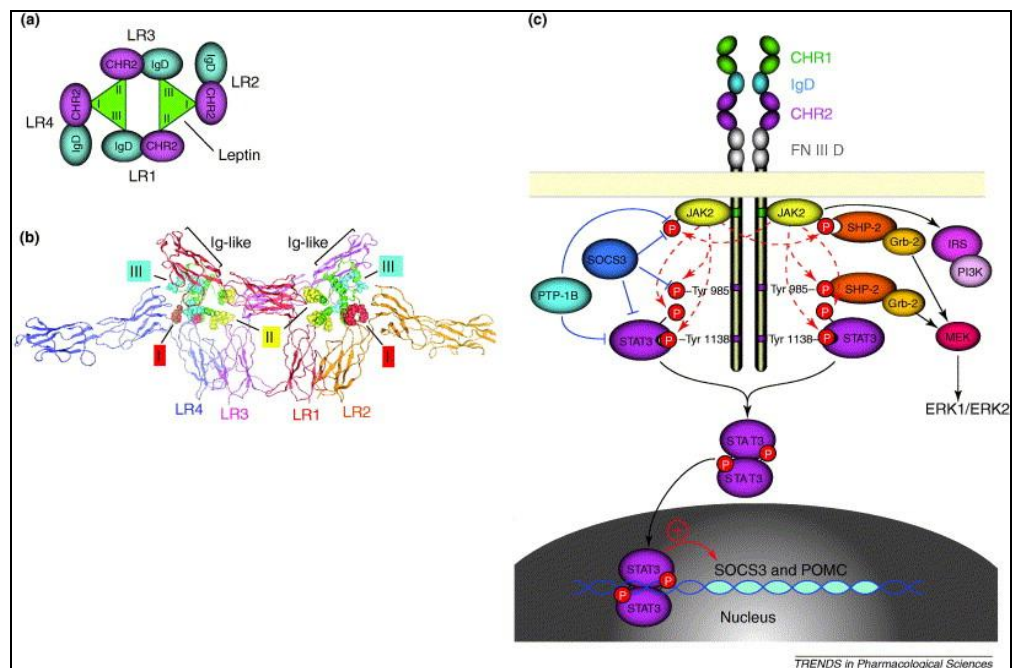
2.2 Leptiinireseptori

Leptiinireseptori (LR) on *db*-geenin koodaama proteiini, joka kuuluu sytokiinireseptorien ensimmäiseen luokkaan. Leptiinireseptorilla on yhden kerran solukalvon läpäisevä domeeni. Leptiinireseptorista on identifioitu kuusi erilaista isoformia: LRa, LRb, LRc, LRd, LRe ja LRf. Leptiinireseptoreilla on identtiset solunulkoiset leptiinin sitoutumisdomeenit, jotka ovat yli 800 aminohappoa pitkiä, ja 34 aminohaposta koostuvat solun läpäisevät domeenit, mutta ne eroavat solunsisäisten domeenien laskostumisen ja pituuden perusteella. Leptiinireseptorit luokitellaan kolmeen ryhmään: lyhyisiin, pitkiin ja membraanin sisäisiin. Leptiinireseptorin pitkä muoto (LRb) vastaa leptiinin tunnetuimpien vaikutuksien välittämisestä. LRb signaloi solunsisäisen osansa kautta neljän entsyymin välityksellä, joita ovat JAK-STAT (*Janus kinase - signal transduction and activator of transcription*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PI3K (*phosphatidylinositol 3'-kinase*) ja AMPK (*adenosine-monophosphate-activated kinase*). Leptiinireseptorin Lyhyt muoto (LRa) saattaa liittyä leptiinin kuljetukseen aivojen veri-aivoesteen läpi. Leptiinireseptoreja on löydetty monen tyyppisistä soluista ja kudoksista [2,5.]

2.2.1 Solunulkoinen domeeni

Leptiinireseptorin solunulkoinen osa sisältää useita domeeneja. Nämä domeenit ovat N-terminaalinen CRH (*cytokine receptor homologous*) 1 -domeeni, Ig (immunoglobuliini) -kaltainen domeeni, CRH2-domeeni ja kaksi

fibronektiini III tyyppin domeenia. CRH2- ja Ig-domeenit osallistuvat leptiinin sitoutumiseen ja ovat välttämättömiä reseptorin aktivaation kannalta. Leptiini sitoutuu kolmella kohdalla reseptoriinsa (I, II, III). Leptiini ja leptiinireseptori sitouvat kompleksiksi (kuva 2a), jossa on kaksi leptiini-molekyyliä ja neljä leptiinireseptori-molekyyliä. Tässä kompleksissa leptiinin sitoutumiskohta I on vuorovaikutuksessa yhden LR-ketjun CRH2-domeenin kanssa, sitoutumiskohta II on vuorovaikutuksessa toisen LR-ketjun CRH2-domeenin kanssa, ja sitoutumiskohta III kolmannen LR-ketjun Ig-domeenin kanssa. Näiden yhteisvaikutus johtaa leptiinireseptorin aktivaatioon. [5.]



Kuva 2. Leptiinireseptorin rakenne ja viestintä. (a) Leptiini-leptiinireseptori-kompleksin malli. (b) Nauhamalli leptiini-leptiinireseptori-kompleksista. (c) LR dimeerin rakenne ja LR:n liittyvä viestintä. [5.]

2.2.2 Solunsisäinen domeeni ja sen viestintä

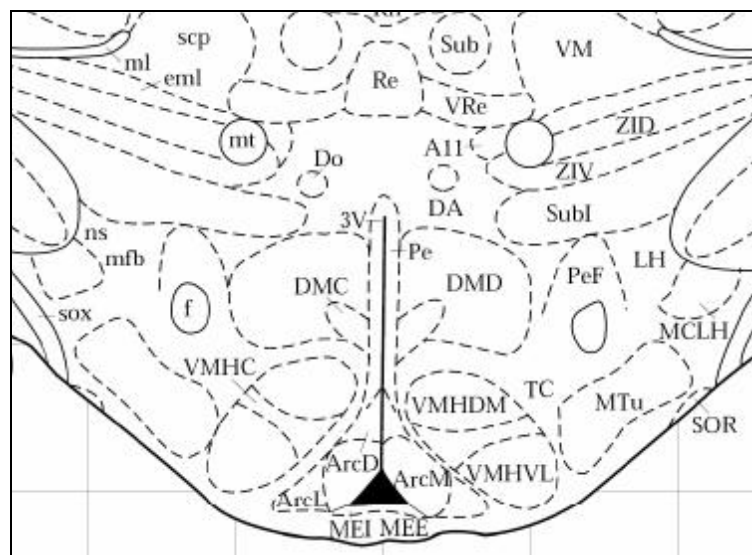
Leptiinireseptorilla (LRb) itsellään ei ole sisäistä entsymaattista aktiivisuutta, ja siksi leptiinireseptorin välittämät signaalit riippuvat JAK2-entsyymistä (tyrosiinikinaasi). Reseptorin aktivaation aikana (kuva 2c) leptiinireseptorien solunsisäisiin domeeneihin kiinnittyneet JAK2-entsyymit fosforyloivat toisensa sekä domeenien Tyr985- (tyrosiini), Tyr1138- ja luultavasti myös Tyr1077-aminohappotähteet. Nämä tyrosiinit muuttuvat SH2-domeenin sisältäville viestimolekyyleille vastaanottavaisiksi, kuten STAT3:lle (*signal transduction and activators of transcription-3*). STAT3-molekyylit sitoutuvat fosfotyrosiini 1138:in ja tulevat vuorostaan fosforyloituiksi, minkä jälkeen ne dimeroituvat

ja vaeltavat tumaan, jossa ne osallistuvat geenien ilmentymisen säätelyyn. LRb:n signalointi kolmen muun entsyymin välityksellä perustuu myös JAK2-entsyymin aktivaatioon.

STAT3:n aktivaatio johtaa SOCS3:n (*suppressor of cytokine signaling-3*) ekspressioon. SOCS3 sitoutuu JAK2-entsyymeihin ja leptiinireseptorin Tyr985:iin defosforyloiden ne, mikä inhiboi LR:n viestintää. Näin sisäinen tasapaino säilyy negatiivisen palautevaikutuksen avulla. [1,2,4,5.]

2.2.3 Esiintymisalueet

Leptiinireseptorien pitkää muotoa (LRb) esiintyy useissa hypotalamuksen tumakkeissa, kuten arcuate nucleuksessa (Arc), josta leptiini säätelee syömiskäyttäytymistä (kuva 3). Reseptoria esiintyy kauttaaltaan Arc:ssa, jossa leptiini säätelee eri neuropeptidien ekspressiota alueesta riippuen. Lisäksi yksi syömiskäyttäytymisen kannalta tärkeä hypotalaminen alue on lateraalinen hypotalamus (LHA). LRb:ta esiintyy myös muun muassa paraventrikulaari- (PVH), ventromediaali- (VMH), dorsomediaali- (DMH) ja ventraalisessa premamillaaritumakkeissa sekä retrokiasmaattisella alueella (RCA). Leptiinireseptoreiden hypotalamiset esiintymisalueet tukevat hypoteesia, jonka mukaan leptiini vaikuttaa hypotalamuksen kautta fysiologiaan. Lisäksi reseptoreja esiintyy esimerkiksi aivolisäkkeessä ja munasarjoissa sekä istukassa. [1,7,8.]



Kuva 3. Hypotalamus. Arc:n alueet sijaitsevat 3. aivokammion (3V) ympärillä. (Kuvassa myös LHA=LH, DMH=DM) [9.]

2.3 Leptiinin vaikutukset

Leptiini säätelee adiposyyteissä triglyseridien varastointia ja käyttöönottoa. Toisaalta rasvasolujen triglyseridipitoisuus säätelee leptiinin ekspressiota ja erittymistä. Verenkierrossa olevan leptiinin määrä korreloi lihavuuden asteen kanssa. Leptiini kulkee verenkierron välityksellä hypotalamukseen, missä se viestittää energiavarastojen koosta. [2,3,7.]

Toisaalta leptiinin fysiologiset vaikutukset perustuvat sen säätelemien hermoratojen toimintaan. Leptiini vaikuttaa syömisen pitkän tähtäimen säätelyyn. Se ylittämää veri-aivoesteen ja sitoutuu leptiinireseptoreihinsa muun muassa Arc:ssa ja LHA:ssa. Hypotalamus sisältää myös alueita, joissa veri-aivoestettä ei ole. [1.]

Arc:n spesifiset neuronit säätelevät ruokahalua ja lisääntymistä. Sen neuronit ovat herkkiä laajalle kirjolle hormoneita ja ravintoaineita, kuten leptiinille, insuliinille, sukupuolihormoneille ja glukoosille. Leptiini vaikuttaa Arc:n eri alueilla eri neuropeptidien ekspressioon. Arc:n ventromediaalisen alueen (ArcM) neuroneissa leptiini inhiboi neuropeptidi Y:n (NPY) ekspressiota ja Arc:n ventrolateraalisen alueen (ArcL) neuroneissa se ekspressoii pro-opiomelanokorttiin (POMC) tuottoa sitoutumalla reseptoreihinsa (LRb). Kumpikin edellisistä vaikutuksista inhiboi syömistä ja nopeuttaa energiankulutusta. Leptiini vaikuttaa siis Arc:n kautta neuropeptidien ekspressioon, mikä mahdollistaa energiavarastojen pitkän aikavälin säätelyyn. Leptiini vaikuttaa Arc:ssa POMC:n lisäksi myös muihin melanokorttiinijärjestelmän (MC) neuropeptideihin, kuten α -MSH:n (*α -melanocyte-stimulating hormone*) ekspressioon. MC-järjestelmä vaikuttaa ruokahalun säätelyyn ja neuroendokriiniseen toimintaan yhdessä muiden järjestelmien kanssa. MC-järjestelmän kautta välittyy useita signaaleja, jotka vaikuttavat energiatasapainoon. [1,7,10.]

Leptiini vaikuttaa hypotalamiseen järjestelmään säädellen endokriinistä ja autonomista toimintaa. Leptiini aktivoi CART- ja POMC-neuroneja. Hypotalamuksen Arc:ssa leptiini saa aikaan näiden anorektisten neuropeptidien mRNA-ekspression. Mediaalisen Arc:n NPY/AgRP (*Agouti related protein*)-neuronit ovat puolestaan leptiinin negatiivisesti säätelemiä, mikä tarkoittaa kyseisten neuropeptidien mRNA-ekspression inhibointia. [4,7.]

Molemmat Arc:n neuronipopulaatiot hermottavat useita alueita, kuten sympaattisia preganglionaarisia neuroneja selkäytimessä, hypotalamuksen paraventrikulaaritumakkeen (PVH) neuroneja ja lateraalihypotalamuksen (LHA) MCH (*Melanin-concentrating hormone*)-neuroneja sekä oreksiinisia neuroneja. Näiden neuronien välittämät vaikutukset ovat todennäköisesti tärkeitä sisäerityksen ja käyttäytymisen säätelyn kannalta. [4.]

2.3.1 Melanokortiinijärjestelmä ja pro-opiomelanokortiini

MC-järjestelmä säätelee energiatasapainoa ja välittää signaaleja useilta hormoneilta, ravintoaineilta ja afferenteilta (tuovilta) neutraaleilta palautteilta hermostosta ja verenkierrasta. Hypotalamuksessa tämä POMC:iin liityvä systeemi säätelee painoa. POMC on myös aivolisäkkeen etulohkon tuottama peptidi, josta syntyy pilkkoutumalla muun muassa kortikotropiini, lipotropiini ja endorfiinit. Leptiini säätelee POMC-ekspressiota. [4.]

Leptiini aktivoi neuroneja, jotka ilmentävät POMC ja α -MSH mRNA-ekspressiota. MC4R ja MC3R (*Melanocortin receptors 3 and 4*) ovat melanokortiinien reseptoreja. MCR4 mRNA-ekspressiota on runsaasti useilla hypotalamuksen alueilla, kuten PVH:ssa ja LHA:ssa, jotka liittyvät pro-TRH:n (tyreoliberiini; tyrosiinin vapauttaja hormoni) mRNA-ekspressioon. [4,8.]

Melanokortiinijärjestelmä on tärkeä ruokahalun säätelijä ja sen neuropeptidien tiedetään vähentävän ruokahalua. Sekä α -MSH- että POMC-neuroneja on löydetty Arc:n lateraalisesta osasta, missä leptiinireseptorin mRNA-ekspressiota ilmenee runsaasti. Leptiinin ruokahalua pienentävät vaikutukset ja sympaattisen hermoston aktivaatio välittyvät ainakin osittain melanokortiinijärjestelmän välityksellä. [1,4,7,10.]

2.3.2 CART-neuropeptidi

CART-neuroneja on löydetty koko keskushermostosta (CNS) kuten Arc:n ja RCA:n alueelta. CART-peptidit häivyttävät näläntunteen. Kuten POMC, CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) mRNA-tason ekspressio on leptiinin indusoimaa. Hypotalaminen CART-järjestelmä saattaa osallistua keskeisesti syömisen ja painon säätelyyn. Tätä hypoteesia tukien leptiini aktivoi CART-neuroneja RCA:ssa ja lateraalisessa Arc:ssa. Lisäksi RCA:n ja Arc:n CART-neuronit ilmentävät POMC mRNA-ekspressiota. Lep-

tiinin indusoima CART-neuronien aktivaatio johtaa näläntunteen heikkene-
miseen. [4.]

2.3.3 *Neuropeptidi Y*

Neuropeptidi Y (NPY) on aivoissa yleisesti syntetisoitu välittäjäaine. NPY säätelee painoa lisäämällä syömistä ja vähentämällä energiankulutusta. Lisäksi greliini, NPY-reseptorin endogeeninen ligandi, saattaa stimuloida syömistä osittain Arc:n NPY-neuronien kautta. NPY on osallisena myös vuorokausirytmiiin, seksuaalisiin toimintoihin ja verenpaineeseen. Neuropeptidi Y on keskushermostossa vaikuttava oreksigeeninen peptidi, jota esiintyy korkeina pitoisuuksina hypothalamuksen Arc:ssa. Leptiini inhiboi NPY-neuroneja, mikä vähentää syömistä ja parantaa energiankulutusta. Leptiini indusoi SOCS3 mRNA-ekspression NPY-neuroneissa, mikä viittaa siihen, että leptiinireseptorit sitoutuvat NPY-neuroneihin, jolloin ne inhiboituvat leptiinin vaikutuksesta. Y1 ja Y5 NPY-reseptorien mRNA-ekspressiota esiintyy PVH:ssa, jossa ne säätelevät todennäköisesti pro-TRH:ta yhdessä POMC:n kanssa. [1,4,10,11.]

2.3.4 *Agouti-sukuinen peptidi*

Suurin osa Arc:n NPY-neuroneista tuottaa myös AgRP:a. Funktionaalisesti AgPR vaikuttaa, kuten NPY edistäen energian ottoa ja pienentäen energiankulutusta, joskin erilaisella mekanismilla. AgRP on α -melanosyyttejä stimuloivan hormonin (α -MSH) antagonistiksi, joka sitoutuu melanokortiinireseptori 4 – alayksikköön (MCR4). Leptiini inhiboi AgRP:n mRNA-ekspressiota kontrolloiden sen tuottoa. [11.]

2.3.5 *Leptiinin vaikutus kilpirauhasen toimintaan*

Leptiiniin reagoivien POMC- ja NPY-neuronien vaikutuskohteena PVH:ssa on tyreoliberiini (pro-TRH), joka on tyreotropiinin vapauttajahormoni. MC4R mRNA-ekspressiota tapahtuu samoissa PVH:n soluissa, joissa tapahtuu pro-TRH mRNA-ekspressiota. NPY Y1 ja Y2 reseptorien mRNA-ekspressiota tapahtuu myös samoissa PVH:n osissa. Ne saattavat jopa ilmetä samoissa PVH:n neuroneissa, jolloin niiden yhteisvaikutukset saattaisivat säädellä pro-TRH mRNA-ekspressiota neuroneissa. NPY:llä on antagonistinen vaikutus PVH:n neuroneihin. Tämä vaikutus saattaa johtua presynaptisesta vaikutamisesta inhibiittori välineuronien kanssa, enemmänkin kuin suorasta postsy-

naptisesta mekanismista. Jotkut leptiinin vaikutukset saattavat siis johtua leptiiniin reagoivien neuronien heijastuksesta Arc:sta PVH:n neuroneihin. [4.]

Tyreoliberiini on hypotalamuksen erittämä hormoni, joka stimuloi aivolisäkkeen tyreotropiinin (TSH) eritystä. Tyreotropiini säätelee kilpirauhashormonien eritystä, jotka lisäävät muun muassa lämmöntuotantoa ja sympaattisen hermoston aktiivisuutta.

2.4 Immunohistokemia

Ensimmäinen immunohistokemiallinen määrittäminen tehtiin 1940-luvun alussa. Albert H. Coons ryhmineen leimasi vasta-aiheen fluoresoivalla isosyanaatilla ja liitti sen suoraan antigeeniin. Pian tämän jälkeen käyttöön otettiin stabiilimpi isosyanaatti, joka oli helpommin liitettävissä vasta-aineeseen. Fluoresoivia leimoja käytetään paljon vielä nykyäänkin, mutta niiden rinnalle on kehitetty myös muun muassa kulta- ja entsyymileimat. Myös menetelmät ovat kehittyneet spesifisemmiksi. [12.]

Leptiinin ja leptiinireseptorin määrittämiseen käytetään ABC-menetelmää. Menetelmässä primäärinen vasta-aine tunnistaa antigeenin, minkä jälkeen biotiinilla leimattu sekundäärinen vasta-aine liitetään primääriseen vasta-aineeseen. Kolmannen kerroksen muodostaa avidiini-biotiini-kompleksi, johon on liitetty peroksidaasientsyymi. Kompleksiin liitetty peroksidaasi käyttää substraattinaan vetyperoksidia, jonka kanssa se muodostaa hapettuneen kompleksin. Tämän kompleksin reagoitessa 3, 3'-diaminobentsidiinin (DAB) kanssa ja edelleen hapettuneen DAB:n reagoitessa objektilasin kelatiinin kanssa syntyy polymerisoitunut liukenematon ruskea saostuma, joka on tarkasteltavissa mikroskoopilla.

2.4.1 Immunitaetti

Immunitaettia eli elimistön kykyä suojautua taudinaiheuttajia vastaan käytetään hyväksi immunohistokemiassa. Vasta-ainevälitteinen immunitaetti kuuluu elimistön humoraalisiin puolustusmekanismeihin taudinaiheuttajia vastaan. Immunitaetin saa aikaan antigeenin tunnistus, mikä johtaa reaktioon, jonka seurauksena antigeeni eliminoidaan. Lymfosyytit ovat vastuussa antigeenin tunnistamisesta. Kukin lymfosyytti (T- tai B-solu) tunnistaa vain yhden tietyn antigeenin spesifisten antigeeni reseptoreidensa välityksellä. Immunijärjestelmä tunnistaa spesifisesti tuhansia antigeenejä, jolloin tietyn

antigeenin tunnistava lymfosyytipopulaatio on hyvin pieni osa koko populaatiosta. Riittävä immuunivaste aikaansaadaan antigeenin sitoutuessa sitä tunnistaviin lymfosyytteihin, mikä johtaa lymfosyytien nopeaan lisääntymiseen ja aktivaatioon. Jo muutamassa päivässä lymfosyyttejä on riittävästi immuunivasteen aikaansaamiseksi eli elimistö kykenee eliminoimaan patogeenin. Antigeeni siis selektoi spesifisen antigeenia sitovan lymfosyyttikloonin.

Immuunijärjestelmä tuottaa vasta-aineita, jotka voivat tunnistaa suuren määrän erilaisia antigeeneja jo ennen niiden kohtaamista. Immuunijärjestelmä ei siis tiedä ennalta, mitä vasta-aineita yksilö tarvitsee elämänsä aikana. Vaikka suurta osaa tuotetuista vasta-aineista ei koskaan tarvita, on erilaisten vasta-aineiden olemassaolo tärkeää infektiokykyisten mikro-organismien suuren lukumäärän ja muuntelukyvyn takia.

2.4.2 *Antigeeni ja vasta-aine*

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat B-solujen tuottamia humoraalisia yhdisteitä antigeenien epitooppeja vastaan. Ne ovat proteiineja, jotka pystyvät spesifisesti tunnistamaan tietyn antigeenin ja sitoutumaan siihen. Vasta-aineet aktivoivat yhden tai useamman elimistön puolustusmekanismeista. Kaikissa vasta-aineissa on tarttumiskohta, paratooppi, joka sitoutuu antigeenin epitooppiin. Näiden kahden välille syntyneet sidokset ovat reversiibeileitä ja ei-kovalenttisia ja ne ovat verrattavissa entsyymi-substraatti-interaktioon. Sidoslujuutta kutsutaan affiniteetiksi; kun sidos on pysyvä, affiniteetti on voimakas. Immunohistokemiassa affiniteetin tulee olla tarpeeksi voimakas, että vasta-aine ei irtoa antigeenista, kun kudosta huudellaan värjäysprosessin eri vaiheiden välillä.

2.4.3 *Monoklonaalinen ja polyklonaalinen vasta-aine*

Spesifejä vasta-aineita tuotetaan immunisaatiolla. Siinä koe-eläimeen injektoidaan halutun vasta-aineen antigeenia, jolloin immuunijärjestelmän epitoopille spesifiset B-lymfosyytit alkavat tuottaa vasta-ainetta antigeenia vastaan. Jokainen B-lymfosyytin solulinja tuottaa vasta-ainetta, joka on spesifinen yhdelle epitoopille.

Antigeenin ilmaannuttua elimistöön paikalle kerääntyy useita B-lymfosyyttejä, joista jokainen tuottaa vasta-ainetta yhdelle antigeenin epitoopille. Seerumi, jota saadaan immunisoidusta koe-eläimestä, sisältää siis

useita eri vasta-aineita kyseiselle antigeenille sekä muille antigeeneille. Vasta-ainetta, joka on peräisin useista eri B-soluista samalle antigeenille, kutsutaan polyklonaaliseksi vasta-aineeksi.

Monoklonaaliset vasta-aineet ovat spesifejä vain yhdelle epitoopille. Niitä tuotetaan eristämällä immunisoidun eläimen pernasta antigeenispesifejä B-lymfosyyttejä. B-solusolulinja yhdistetään myeloomasolulinjan kanssa (paha-laatuinen B-lymfosyyttien syöpä) parantamalla solukalvojen läpäisevyyttä eli permeabiliteettia. Saadut hybridoomat lisääntyvät nopeasti ja rajattomasti ja tuottavan suuren määrän vasta-aineita. Hybridoomista on mahdollista eristää se, joka tuottaa halutulle epitoopille spesifistä vasta-ainetta.

Immunohistokemian kannalta katsottuna monoklonaalinen vasta-aine on spesifisempi, mutta ei välttämättä yhtä herkkä kuin polyklonaalinen vasta-aine. Jos monoklonaalinen vasta-aine on spesifinen sekvenssille, jota esiintyy useammassa kuin yhdessä yhdisteessä, lopputulos voi olla sama kuin käytettäisiin polyklonaalista vasta-ainetta. Antigeenin epitooppi on myös voinut esimerkiksi fiksaatiossa joutua asemaan, jossa monoklonaalinen vasta-aine ei pysty sitoutumaan siihen. Eräät monoklonaaliset vasta-aineet siis reagoivat vain tuoreiden tai jäädytettyjen kudosten kanssa. [13.]

2.4.4 Nimeäminen

Tuotetun vasta-aineen nimestä selviää yhdiste, jota vastaan vasta-aine on tuotettu sekä eläin, jossa se on tuotettu. Esimerkiksi vuohen anti-hiiri-leptiini (anti-mouse Leptin Antibody) on vuohessa hiiren leptiiniä vastaan tuotettu vasta-aine (IgG). Tuoteselosteesta selviää onko aine poly- vai monoklonaalinen ja mistä eläimestä käytetty immunogeeni on peräisin. Immunogeenin alkuperä on syytä selvittää ennen värjäyksen aloittamista, sillä antigeenien rakenteessa saattaa esiintyä eroja eri lajien välillä. Esimerkiksi ihmisen leptiini-proteiinia vastaan tuotettu vasta-aine ei välttämättä toimi, kun halutaan määrittää rotan leptiini-proteiinia, koska vasta-aine saattaa tunnistaa ihmisen proteiinista juuri sen kohdan, joka on erilainen rotan vastaavassa proteiinissa. Tämäkin tosin ilmoitetaan yleensä tuoteselosteessa yhdessä suositeltavien käyttöpitoisuuksien kanssa.

2.5 Immunohistokemiallisen määrittelyn perusteet

Seuraavaksi esitetyt immunohistokemiallisen määrittelyn perusteet perustuvat BIOS Scientific:n vuonna 1997 julkaisemaan *Introduction to immunocytochemistry* -kirjaan [13.]

Immunohistokemialliset määrittelyt ovat *in situ* -määrittelyksiä, mikä tarkoittaa, että haluttuja yhdisteitä tutkitaan siellä missä ne ovat, tässä tapauksessa kudoksissa. Määrittelyä varten kudokset tulee ensin kiinnittää eli fiksatoida. Fiksation tarkoituksena on pitää kaikki komponentit paikallaan. Fiksation jälkeen kudoksesta leikataan ohuita viipaleita, mikä mahdollistaa tulosten tarkastelun mikroskooppilla. Vasta-aine-antigeeni-kompleksin muodostamiseksi ja sen visualisoimiseksi on useita menetelmiä. Käytettäessä suoraa menetelmää vasta-aineen sitoutumiskohta identifioidaan leimaamalla vasta-aine ja detektoimalla se. Toinen tapa on käyttää leimattua sekundääristä vasta-ainetta, joka sitoutuu primääriseen vasta-aineeseen. Tätä menetelmää kutsutaan epäsuoraksi ja se vähentää epäspesifiä värjäytymistä. Myös käytökelpoisia leimoja on useita. Epäspesifisen värjäytymisen estämiseksi endogeeniset (kudoksen omat) entsyymit ja muut epäspesifiä sitoutumista aiheuttavat yhdisteet blokataan eli salvataan ennen vasta-aineen lisäämistä.

Jotta immunohistokemiallinen määrittely onnistuisi, täytyy antigeenin säilyä kudoksessa muuttumattomana. Värjäytymisen tulee olla spesifiä ja riittävän herkkää sekä epäspesifinen värjäytyminen estää. Lisäksi vasta-aineiden ominaisuuksien tulee olla tiedossa ja leimauksen sekä detektoinnin toimia.

2.5.1 Fiksaatio

Fiksaation tarkoituksena on kiinnittää kudoksen komponentit luonnollisille paikoilleen. Fiksatiivin, kiinnitykseen käytettävän aineen, pitää estää solujen kutistuminen ja turpoaminen sekä diffuusio ja yhdisteiden liukeneminen. Kutistuminen ja turpoaminen johtuvat osmoosista eli aineen siirtymisestä puoliläpäisevän kalvon, tässä tapauksessa solukalvon, läpi suuremmasta pitoisuudesta pienempään. Fiksatiivi estää myös antigeenia liukenemasta, vaihtamasta paikkaa ja muuttamasta konformaatiota. Jos antigeenin konformaatio muuttuu, epitooppi saattaa siirtyä paikkaan, jossa se ei enää ole vasta-aineen tavoitettavissa.

Fiksatiivit toimivat muodostamalla sidoksia kudoksen komponenttien välille, tai saostamalla proteiineja. Immunohistokemiallisesti oikean fiksaatiivin valinta

on tärkeää. Valintaan vaikuttavat määritettävän antigeenin sijainti, molekyyli-rakenne sekä fiksatiivin toimintamekanismi. Kudos on tarkoitus fiksata niin kevyesti kuin mahdollista säilyttäen kuitenkin antigeeni liukenemattomana. Ristisidoksia muodostavia fiksatiiveja ovat esimerkiksi paraformaldehydi ja glutaraldehydi. Lisäksi on olemassa saostavia fiksatiiveja, yhdistelmäfiksatiiveja sekä jäädytys, missä kudokset fiksataan jäädyttämällä ne nopeasti.

Ristisidoksia muodostavat fiksatiivit

Ristisidoksia muodostaviin fiksatiiveihin kuuluvat formaliini, joka formaldehydin vesiliuos, ja glutaraldehydi sekä paraformaldehydiliuos. Ne muodostavat hydroksimetyleenisiltoja vierekkäisten proteiinien pääteryhmien välille. Fiksatu proteiinit säilyttävät antigeenisuutensa, jos ristisidokset eivät vaikuta siihen aminohapposekvenssiin, johon vasta-aine sitoutuu. Ristisidoksia muodostavat fiksatiivit ovat välttämättömiä, silloin kun halutaan fiksata pieniä proteiineja, kuten bioaktiivisia neuropeptidejä. Nämä peptidit ovat niin pieniä, että ne eivät saostu kuten isommat proteiinit. Tällöin liukenemista ei voida estää saostavilla fiksatiiveilla.

Fiksaation tehokkuuteen vaikuttaa formaliiniliuoksen pH. Alhaisessa pH:ssa formaldehydi on reaktiivisessa $^+CH_2(OH)$ -muodossa, kun taas korkeammas- sa pH:ssa vallitsevana muotona ovat vähemmän reaktiiviset $CH_2(OH)$ -ryhmät. Täten formaliini tai paraformaldehydiliuos, joka on puskuroitu pH 7:ään tai suuremmaksi, on miedompi fiksatiivi, ja näin ollen immunohistokemian kannalta suositeltavampi.

Formaliini läpäisee kudoksen nopeammin kuin glutaraldehydi, mutta fiksaus ei tapahdu yhtä nopeasti kuin glutaraldehydillä. Joskus on mielekästä käyttää näiden kahden seosta. Ristisidoksia muodostuu sitä enemmän mitä kauemmin kudosta on pidetty fiksatiivissa. Tämä luonnollisesti vaikuttaa fiksaatiotehokkuuteen, vaikka osa sidoksista onkin reversiibeilejä ja katkaistavissa pesemällä näytettä vedellä tai puskuriliuksella.

2.5.2 Antigeeni-vasta-aine-kompleksin visualisointi

Yhden reaktion komponentin tulee kantaa leimaa, jotta immunohistokemiallinen reaktio pystytään havaitsemaan. Ensimmäinen käytetty leima, joka oli liitetty vasta-aineeseen, oli väriaine. Värjäyksen tulos oli kuitenkin liian vaalea visualisoitavaksi. Ensimmäiset käyttökelpoiset leimat olivat fluoresoivia.

Fluoresoivat leimat aktivoidaan emittoimaan näkyvää valoa virittämällä ne spesifisellä aallonpituudella. Muita leimoja ovat esimerkiksi entsyymileimat ja kolloidinen kulta. Entsyymileimat reagoivat sekä substraatin että kromogeenin kanssa. Kultaleimausta käytetään elektronimikroskooppisessa immunohistokemiassa.

Entsyymileimat

Entsyymileimat ovat eniten käytettyjä leimoja immunohistokemiassa. Niitä ovat muun muassa peroksidaasi, alkaalinen fosfataasi, glukoosioksidaasi ja β -D-galaktosidaasi, joista käytetyimpiä ovat peroksidaasi ja alkaalinen fosfataasi. Entsyymimenetelmässä vasta-aine, tai esimerkiksi käytetty avidiini-biotiini-kompleksi on leimattu jollakin entsyymillä. Kun entsyymiin annetaan reagoida substraatin ja kromogeenin, väriä tuottavan yhdisteen, kanssa syntyy värillinen lopputuote, joka on havaittavissa valomikroskoopilla sekä kvalitatiivisesti, että kvantitatiivisesti.

Peroksidaasin aktiivisuus on suurimmillaan pH 5:ssä, mutta immunohistokemian kannalta paras tulos saadaan, kun reaktion pH on 6,0 – 7,6, jolloin reaktio hidastuu. Peroksidaasin substraattina toimii vetyperoksidi (H_2O_2), jonka kanssa se muodostaa hapettuneen peroksidaasi/ H_2O_2 -kompleksin. Peroksidaasin kanssa kromogeeninä käytetään 3,3'-diaminobentsidiiniä (DAB), joka toimii elektronin luovuttajana ja hapettuu itse reagoidessaan hapettuneen peroksidaasi/ H_2O_2 -kompleksin kanssa värilliseksi ruskeaksi tuotteeksi, joka muodostaa polymerisoituneen liukenemattoman ruskean saostuman yhdessä kelatiinin kanssa. Käytetyt objektilasit on kelatinoitu. DAB:n kanssa työskennellessä tulee ottaa huomioon aineen karsinogeenisyys. [12.]

Biotiini

Tässä yhteydessä voidaan leimaksi mainita myös biotiini. Se on pieni B-vitamiineihin kuuluva molekyyli, jota voidaan eristää munan keltuaisesta. Vasta-aineisiin on helppo liittää paljon biotiinimolekyyliä ja sitä voidaan käyttää kaikkien edellä mainittujen leimojen yhteydessä. Biotiini ei yksin muodosta näkyvää lopputuotetta, mutta se voidaan liittää avidiiniin tai peroksidaasi leimattuun avidiini-biotiini-kompleksiin (ABC), joka voidaan detektoida DAB:lla. Biotiini voi toimia myös haptereena, jolloin se voidaan paikallistaa antibiootilla.

2.5.3 Epäspesifin värjäytymisen estäminen

Epäspesifistä värjäytymistä voivat aiheuttaa endogeeniset entsyymit, hydrofobiset reaktiot ja vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen. Sitä voidaan estää erilaisilla käsittelyillä ja detergentin (pinta-aktiivinen aine) lisäyksillä. Endogeeniset entsyymit tulee salvata, kun käytetään leimoina entsyymejä, joita on myös kudoksessa. Peroxisomeissa ja makrofageissa esiintyvä peroksidaasi ja sen kaltainen punasoluissa esiintyvä katalaasi aiheuttavat epäspesifiä värjäytymistä, kun leimauksessa käytetään peroksidaasia. Katalaasi ja endogeeninen peroksidaasi salvataan vetyperoksidilla ja metanolilla. Vetyperoksidi toimii peroksidaasin substraattina ja metanoli inhiboi peroksidaasia, millä mahdollistetaan endogeenisen peroksidaasin loppuun kulumisen. Käsittely tehdään lisäämällä vetyperoksidi ja metanoli huuhtelupuskuriin ennen peroksidaasilla leimatun reagenssin lisäystä.

Normaaliseerumin lisääminen kudokseen ennen primäärisen vasta-aineen lisäystä, ja sen aikana, estää myös epäspesifistä sitoutumista. Normaaliseerumi sisältää luonnollisia vasta-aineita ja proteiineja, jotka sitoutuvat estäen varauksista ja hydrofobisista reaktioista johtuvaa epäspesifiä sitoutumista. Normaaliseerumin tulee olla samasta eläimestä tuotettua kuin sekundäärisen vasta-aineen, koska samassa eläimessä tuotettu seerumi estää primäärisen vasta-aineen epäspesifiä sitoutumista eikä voi toimia antigeeninä saman lajin vasta-aineille. Seerumi, joka on tuotettu samassa eläimessä, kun primääri vasta-aine, estäisi primäärisen vasta-aineen epäspesifiä sitoutumista hyvin lisäten samalla sekundäärisen vasta-aineen sitoutumismahdollisuuksia ja näin ollen taustan värjäytymistä.

Epäspesifiset sidokset ovat heikompia kuin oikeat antigeeni-vasta-ainesidokset. Niitä voidaan estää myös detergentin, kuten Triton X-100 lisäyksellä samaan liuokseen, jolla vasta-aine tuodaan kudokseen. Detergentit myös rikkovat lipideistä koostuvaa solumembraania, jolloin vasta-aineet läpäisevät sen paremmin.

2.5.4 Immunohistokemiaaliset menetelmät

Immunohistokemiaaliset reaktiot tapahtuvat puskuriliuoksessa, jonka tehtävänä on stabiloida vasta-aineita ja estää kudosta vahingoittumasta. Pusku-reista käytetyimpiä ovat PBS (*Phosphate-buffered saline*), jonka pH on 7,0 -

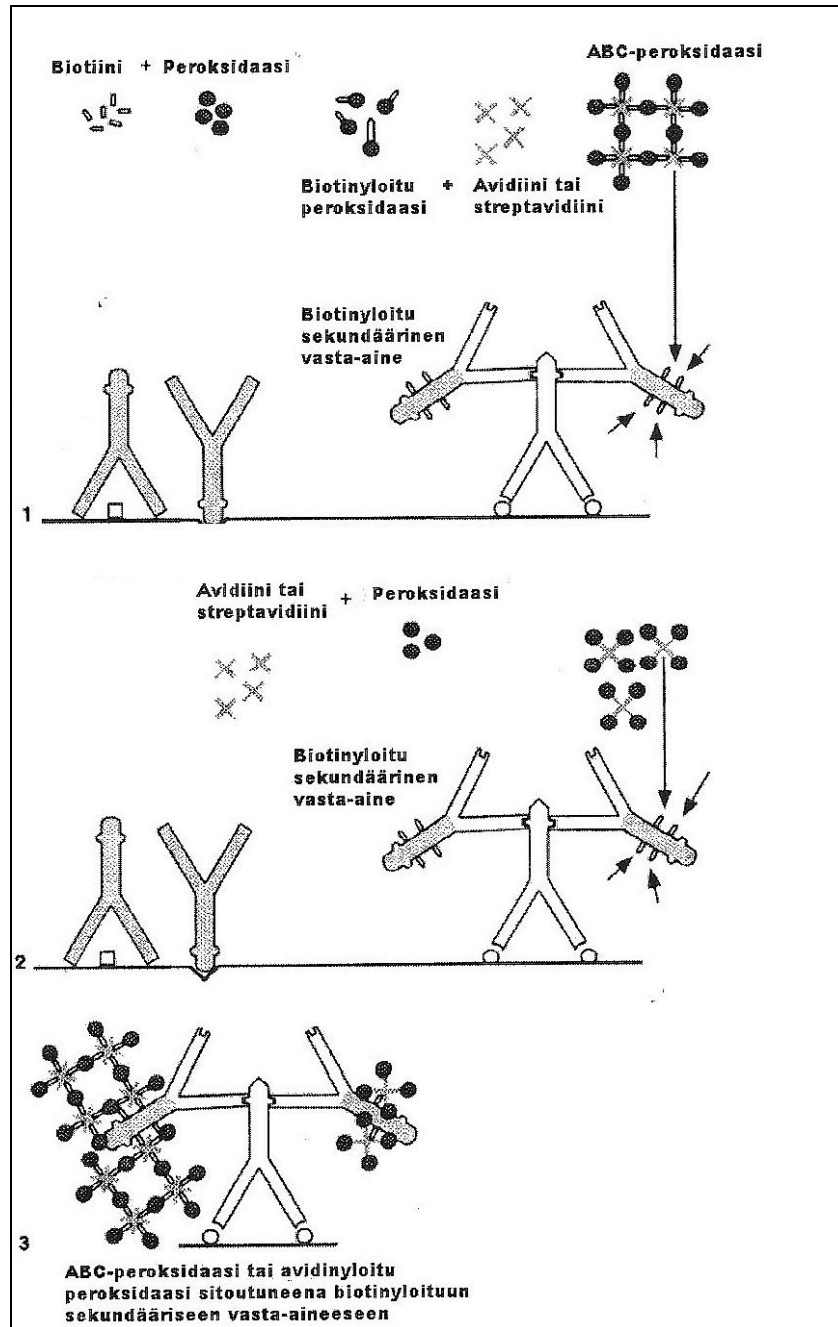
7,4 ja TBS, jonka pH on 7,6 (*Tris-buffered saline*). Kun pH on yli 7, vasta-aineet eivät irtoa kudoksesta, mikä on vaarana matalammassa pH:ssa.

Konsentraatio, jossa vasta-aineita käytetään, määritetään inkubaatioajan, -lämpötilan ja käytettävän menetelmän mukaan. Inkuboinnin aikana vasta-aine reagoi antigeeninsa kanssa. Lyhyessä ajassa vain osa vasta-aineista ehtii reagoida, jolloin tarvitaan suurempi konsentraatio. Pidemmässä inkubaatioajassa konsentraatiota voidaan pienentää. Vasta-aineiden inkubaatiolämpötilat vaihtelevat 4 °C:sta 37 °C:een. Sitoutuminen on nopeampaa korkeammassa lämpötilassa, jolloin myös epäspesifinen sitoutuminen kasvaa. Tämä tulee ottaa huomioon määrittäessä sopivaa vasta-ainekonsentraatiota, joka yleensä on monoklonalisilla vasta-aineilla pienempi kuin polyklonalisilla. Mitä herkempää menetelmää käytetään sitä pienempi pitoisuus riittää hyvään lopputulokseen.

ABC-menetelmä

Avidiini on suuri glykoproteiini (68 kDa), jolla on poikkeuksellisen korkea affiniteetti, lähes irreversiibeli, ja neljä sitoutumiskohtaa useissa kudoksissa esiintyvälle pienelle vitamiinille, biotiinille. Jokaisessa biotiinimolekyylissä on yksi sitoutumiskohta avidiinille ja siihen voidaan lisäksi liittää vasta-aine sekä leima, kuten peroksidaasi. Myös avidiiniin on mahdollista liittää leima ja sitä käytetään paikantamaan biotinyloitu sekundäärinen vasta-aine.

ABC-menetelmässä (kuva 4) leimaamaton primäärinen vasta-aine paikannetaan biotinyloidulla sekundäärisellä vasta-aineella. Biotinyloituun sekundääriseen vasta-aineeseen liitetään avidiini-biotiini-kompleksi. Kompleksi on valmistettu antamalla ylimäärän avidiinia reagoida biotiinin kanssa, jolloin avidiinista jää osa biotiinin sitoutumiskohdista vapaaksi reagoimaan sekundääriseen vasta-aineeseen liitetyn biotiinin kanssa. Kompleksin biotiiniin on liitetty peroksidaasileima, joka reagoessaan substraattinsa ja DAB:n kanssa muodostaa yhdessä kelatiinin kanssa polymerisoituneen liukenemattoman ruskean saostuman. Tämä saostuma voidaan detektoida valomikroskooppilla.



Kuva 4. ABC-menetelmä [12.]

3 MENETELMÄT

Menetelmät osiossa määritettiin leptiini-hormonia ja leptiinireseptoria rotan aivoleikkeistä immunohistokemiallisin menetelmin. Ensinnä esitetty käytetty materiaalit ja eläinten esikäsittely, minkä jälkeen esitetään käytetty menetelmä.

3.1 Materiaalit

Käytetyistä materiaaleista on esitetty käytetyt vasta-aineet, ABC-kitti sekä eläimet.

3.1.1 Vasta-aineet ja seerumi

- Primäärinen vasta-aine: Vuohessa tuotettu monoklonaalinen vasta-aine (IgG) hiiren leptiinille (Goat Anti-mouse Leptin Antibody) (Cat. AF498, R&D Systems, Immuno diagnostic oy).
 - § Kantaliuoksen pitoisuus 1 mg/ ml.
 - § Säilytys -80 °C:ssa.
- Primäärinen vasta-aine: Vuohessa tuotettu monoklonaalinen vasta-aine (IgG) hiiren leptiinireseptorille (Goat Anti-mouse Leptin R Antibody) (Cat. AF497, R%D Systems, Immuno diagnostic oy).
 - § Kantaliuoksen pitoisuus 1 mg/ ml.
 - § Säilytys -80 °C:ssa.
- Sekundäärinen vasta-aine: Hevosessa tuotettu biotinyloitu vasta-aine (IgG) vuohen vasta-aineelle (Biotinylated Anti-Goat IgG [H+L]) (Cat. BA-9500, Vector Laboratories, Inc.).
 - § Kantaliuoksen pitoisuus 1,5 mg/ ml.
 - § Säilytys -20 °C:ssa.
- Normaaliseerumi: Hevosen normaaliseerumi (Normal Horse Serum) (Cat. S-2000, vector Laboratories, Inc.).
 - § Säilytys +4 °C:ssa.

3.1.2 Vectastain® Elite ABC Kit

- Cat. PK-6100, Vector Laboratories Inc. Burlingame

3.1.3 Eläimet

Määrittäksessä käytettiin kolmea Wistar (valikoimattomia) -naarasrottaa (Hki). Rotat lopetettiin täysikasvaisina ja aivonäytteet otettiin talteen. Rottia pidettiin laboratorio-olosuhteissa 12 tunnin yö-päivä-syklissä 24 tunnin vuorokausirytmillä vakioidussa lämpötilassa (23 ± 2 °C).

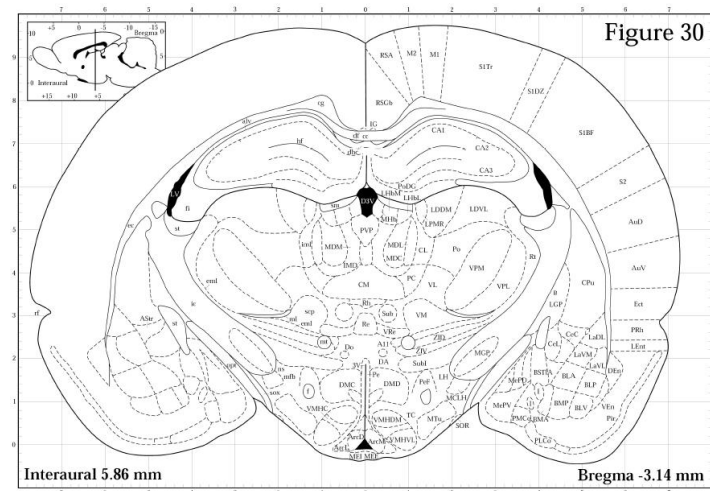
3.2 Aivojen fiksaus perfuusiolla

Perfuusiossa rotat nukutettiin antamalla niille pentobarbitaalia lähes kuolettava määrä (1,667 ml x massa (kg)) injektiona vatsaonteloon. Rotan nukahdettua se asetettiin jäihin. Anestesian syvyys tarkistettiin kokeilemalla eläi-

men varvasrefleksejä, joita ei tässä anestesian syvyydessä tule olla. Sydämen tuli kuitenkin lyödä. Rintalasta avattiin ja sydämen vasempaan kammioon työnnettiin tiputusletkuun yhdistetty injektioneula, josta virtasi lämmitettyä PBS-liuosta. PBS:n annettiin virrata noin 5 minuutin ajan, tai kunnes sydämen oikeaan eteiseen tehdystä viillosta ulos tuleva neste oli veren sijasta kirkasta. PBS oli lämmitettyä veren hyytymisen estämiseksi, jolloin veri poistui paremmin. Tämän jälkeen perfuusiota jatkettiin 4 % paraformaldehydiliuoksella (PFA) noin 15 minuutin ajan. PFA:n tarkoituksena oli fiksata aivot. Aivot irrotettiin ja niitä jälkifiksattiin neljän tunnin ajan 4 % PFA:ssa. Aivoja säilytettiin 20 % sakkaroosiliuoksessa aivoleikkeiden viipalointiin asti. Perfuusion suorittamiseen tarvittiin kaksi henkilöä, joista toinen nukutti rotat ja irrotti aivot ja toinen perfusoi. Käytettyjen liuosten valmistusohjeet esitetään liitteenä (Liite 1).

3.3 Aivojen leikkaus kryostaatilla

Rottien aivoista tehtiin leikkeitä (kuva 5) immunohistokemiallista määrittystä varten viipaloimalla ne kryostaatilla (Leica CM3050; Leica Nilomark Oy), joka on kylmälaite. Kammion lämpötilan tuli olla käytettäessä noin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, jolloin aivot jäätyivät ja ne pysyivät koossa viipaloitaessa. Pikku-aivojen poiston jälkeen aivot kiinnitettiin näytepidikkeeseen Tissue-Tek® O.C.T™ Compound:lla (Sakura Finetechnical, Europe), joka jäätyy $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, ja niiden annettiin jäätyä kryostaatin kammiossa noin 10 minuutin ajan ennen viipaloinnin aloittamista. Leikkeen paksuudeksi valittiin $40\text{ }\mu\text{m}$ ($0 - 60\text{ }\mu\text{m}$) ja terä säädettiin leikkauskulmaan 5 ($0 - 10$). Leikkeet kerättiin 24-kuoppalevyille niin, että jokaiseen kuoppaan tuli kolme leikettä aina 24 leikkeen välein. Kuopat oli täytetty säilytyspuskurilla ($0,5\text{ M PB}$, johon on lisätty etyleeniglykoli ja glyserolia), joka estä leikkeiden jäätyvän niiden säilytyslämpötilassa (n. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Keräys aloitettiin rotan aivoatlaan kohdasta 11 ja lopetettiin kohtaan 44, mikä tarkoitti lähes koko aivoja. Kohteena oli hypothalamus, jonka alueita esiintyy aivoatlaan kohdissa 18 - 39. Kuva 5 on aivoatlaan kohdasta 30. [9.]



Kuva 5. Rotan aivot [9.]

3.4 Immunohistokemiallinen menetelmä

Immunohistokemiallisella menetelmällä määritetään leptiini ja leptiinireseptori rotan aivoista. Käytetty menetelmä perustuu ABC-kittiin.

3.4.1 Leptiinin ja leptiinireseptorin immunohistokemiallinen määrittäminen

Immunohistokemiallisten määrittysten huuhtelut, inkubaatiot ja ABC-reaktio tehtiin kohdassa 3.4.3 esitetyn prosessin mukaisesti. Leikkeet huuhdeltiin aina reagenssien vaihdon yhteydessä PBS-liuoksella. Huuhtelu poisti reagoimattomat yhdisteet inkubaatioliuoksista. Leikkeitä huuhdeltiin aina kolme kertaa 10 minuutin ajan ravistelijassa. Käytettyjen vasta-aineiden, kuten muidenkin reagenssien inkubaatioajat oli todettu sopiviksi suoritettaessa immunohistokemiallisia määrittäksiä laboratorio-olosuhteissa. Primääristen vasta-aineiden inkubaatioaika oli 18 tuntia laboratorion lämpötilassa (noin 23 °C). Aikaisempien tutkimuksien pohjalta primäärisiä vasta-aineita tuli huuhdella yön yli [7,8,12], mutta menetelmiä optimoitaessa haluttiin tarkka inkubaatioaika, jolloin saadut tulokset olivat paremmin verrattavissa toisiinsa. Biotinyloidun sekundäärisen vasta-aineen inkubaatioaika oli 2 tuntia, ja sen pitoisuus inkubaatioliuoksessa oli todettu aikaisempien määrittäksien nojalta sopivaksi [7,8,12]. Inkubaatioaikoja ei jouduttu näiden määrittäksien aikana muuttamaan, koska ne sopivat hyvin suoritettuihin määrittäksiin ja työaikoihin, ja käytettävien primääristen vasta-aineiden pitoisuudet säädettiin näihin olosuhteisiin sopiviksi. Avidiini-biotiini-kompleksin liittäminen biotinyloituun vasta-aineeseen suoritettiin kitin ohjeita soveltaen määrittäksiin sopiviksi.

Kehitettäessä sopivaa menetelmää lehtiin ja lehtiinireseptorin immunohistokemialliseksi kuvantamiseksi Wistar-rottien aivoista, keskityttiin primäärisen vasta-aineiden pitoisuuksien optimointiin inkubaatioajan pysyessä 18 tunnissa, mikä helpotti määrityksen jakamista kahteen työpäivään. Primäärisen vasta-aineen pitoisuuden optimoinnin lisäksi katsottiin DAB-reaktion keston vaikutusta leikkeiden värjäytymiseen.

Aivoleikkeiden tuli olla kussakin määrityksestä aina samasta rotasta vierekkäiset aivoleikkeet, koska yksilöiden välillä saattoi olla eroja, vaikka määritettiinkin samaa kantaa. Lisäksi niiden tuli sisältää hypothalamuksen alueita [9.] Määrityksiin otettiin aina 2 rinnakkaista näytettä kutakin optimointiolosuhdetta kohti sekä lisäksi yhden leikkeet primäärisiksi ja sekundäärisiksi kontrolliksi optimointiolosuhteita kohti, jotta pystyttiin havainnoimaan vasta-aineiden aiheuttamaa taustan nousua leikkeissä värjäamisprosessissa aikana.

Primäärisen vasta-aineen konsentraatio-määrityksissä primääriset kontrollit tehtiin jokaiselle primäärisen vasta-aineen pitoisuudelle ja lisäksi tehtiin yksi sekundäärinen kontrolli, koska sekundäärisen kontrollin pitoisuus pysyi jokaisessa määrityksessä samana. Sopivaa DAB-reaktioaikaa määritettäessä tehtiin jokaiselle reaktioajalle oma primäärinen ja sekundäärinen kontrolli, jotta nähtiin jokaisen DAB-reaktioajan vaikutus vasta-aineisiin. Kontrollien avulla pystyttiin tarkastelemaan niistä johtuvaa epäspesifistä sitoutumista.

Määritykset suoritettiin muovisissa 30 ml:n koepurkeissa. Yhdessä koepurkissa oli aina rinnakkaiset leikkeet samalle optimointiolosuhteelle, kuten primäärisen vasta-aineen pitoisuudelle. Ainoastaan primäärisen vasta-aineen inkubaatio suoritettiin 24-kuoppalevyllä. Koepurkeissa inkubaatitilavuus oli 1 ml ja 24-kuoppalevyllä 300 µl, millä säästettiin primäärisiä vasta-aineita. Kaikki liuokset tehtiin aina PBS-liuokseen leikkeiden olosuhteiden optimoimiseksi. Tärkeintä oli leikkeiden vapaa liikkuminen näyteastioissa, millä taattiin vasta-aineiden ja reagenssien pääsy lähelle leikkeitä, mikä mahdollisti yhdisteiden reagoimisen kudoksissa. Näytteet siis pidettiin koko määrityksen suorituksen ajan PBS:ään tehdyissä liuoksissa ravistelijassa nopeudella 300 rpm lukuun ottamatta DAB (3,3'-diaminobentsidiini tetrahydrokloridi; Sigma)-reaktion suorittamista, joka lyhyen keston takia suoritettiin kädessä ravistellen. DAB-reaktio suoritettiin vetokaapissa sen karsinogeenisyyden takia. Koepurkit suljettiin korkein inkubaatioiden ajaksi. Huuhtelut suoritettiin avonaisissa koepurkeissa. Leikkeet laitettiin aina ennalta liuoksilla täytettyihin as-

tioihin ja niitä siirreltiin astioiden välillä varovasti ohuilla pensseleillä, jolloin hauraat leikkeet säilyivät ehjinä.

Primäärinen vasta-aine

Sopivaa primäärisen vasta-aineen pitoisuutta optimoitaessa lähdettiin liikkeelle valmistajan antamista suosituksista. Suosituksen mukaan primäärisen vasta-aineen pitoisuuden tuli olla määritysliuoksessa 5 - 15 µg/ ml. Vasta-aineen suhteellisen korkean hinnan takia lähdettiin oitis suunnittelemaan pitoisuutta pienemmäksi, jotta saataisiin aikaan taloudellisesti kannattavampia määrityksiä. Määrityksissä lähdettiin liikkeelle siitä, että alin valmistajan suosittelema pitoisuus otettiin vahvimaksi. Siitä lähdettiin sopivin sarjoin kokeilemaan pienempiä pitoisuuksia. Samalla määrityskerralla kokeiltiin aina useampia pitoisuuksia, koska määritysolosuhteiden välillä tiedettiin olevan satunnaisvaihtelua.

DAB-reaktioaika

DAB-reaktion keston vaikutusta leikkeiden värjäytymiseen kokeiltiin primääristen vasta-aineiden eri pitoisuuksille. DAB:n pitoisuus reaktioliuoksissa oli 0,5 g/ l ja reaktion keston vaikutusta kokeiltiin inkubaatioajoilla 30, 45, 60, 90 ja 120 sekuntia, minkä jälkeen ne huuhdeltiin välittömästi PBS-liuoksissa DAB:n poistamiseksi.

3.4.2 *Vectastain® Elite ABC Kit*

Vectastain® Elite ABC Kit on menetelmä, jossa käytetään avidiini-biotiini-kompleksia ja siihen liitettyä peroksidaasi-entsyymiä. Se on laajalti hyväksytty yhdeksi kaikkein sensitiivisimmistä immunoperoksidaasi-menetelmistä. Kitti perustuu biotiinin ja avidiinin ominaisuuksiin, ja se on valmistettu paikallistamaan histologisesti tärkeitä antigeeneja ja muita tekijöitä tiheistä kudoksista, kuten aivoista. Elite ABC-kittiä käytetään antigeeniin liitetyn leimaamattoman primäärisen vasta-aineen ja siihen liitetyn biotinyloidun sekundäärisen vasta-aineen detektoimiseen kudoksista. Biotinyloituun sekundäärisen vasta-aineeseen liitetään ABC-kompleksi, joka sisältää kompleksoituneen avidiinin ja biotinyloidun piparjuuriperoksidaasin, minkä annetaan reagoida substraatin ja kromogeenin kanssa. Kaikki nämä tekijät yhdessä muodostavat suuren makromolekyylisen kompleksin sopivassa inkubaatioajassa.

Vectastain® Elite ABC Kit sisältää aviidiini- ja biotinyloidun piparjuuriperoksidaasi -reagenssit, jotka on erityisesti valmistettu muodostamaan kompleksi immunoperoksidaasivärjäyksessä. Aviidiinin ja biotinyloidun piparjuuriperoksidaasin muodostama kompleksi sisältää useita biotinyloituja piparjuuriperoksidaasimolekyylejä aviidiinin sitoutuneina.

ABC-kompleksi muodostetaan sekoittamalla aviidiini ja biotinyloitu piparjuuriperoksidaasi PBS-liuokseen laimennettuina. Lopullinen tarkasteltava makromolekyylinen kompleksi pysyy stabiilina useiden tuntien ajan.

Menetelmässä poikettiin kitin ohjeesta. Kitin ohjeen mukaan aviidiinia (reagent A) ja biotinyloitua piparjuuriperoksidaasia (reagent B) lisätään molempia kaksi tippaa 5 ml:aan PBS-liuosta. Määrityksessä molempia reagensseja lisättiin vain yksi tippa.

3.4.3 Immunohistokemiallinen menetelmä

1. Leikkeitä huuhdeltiin kolmesti 10 minuuttia PBS-liuoksissa säilytyspuskurin poistamiseksi.
2. Endogeeniset entsyymit salvattiin liuoksella, joka sisälsi 10 % metanolia ja 3 % vetyperoksidia PBS-liuoksessa. Salpausreaktion kesto oli viisi minuuttia.
3. Leikkeitä huuhdeltiin kolmesti 10 minuuttia PBS-liuoksessa. Huuhtelun tarkoituksena oli poistaa leikkeistä metanoli ja vetyperoksidi.
4. Esi-inkubaatiossa leikkeitä inkuboitiin yksi tunti 2 % normaaliseerumia (Normal Horse Serum; NHS) ja 0,3 % Triton X-100:aa sisältävässä PBS-liuoksessa.
5. Primäärisen vasta-aineen inkubaatiossa leikkeitä inkuboitiin 18 tuntia (yön yli). Inkubaatioliuos sisälsi primäärisen vasta-aineen lisäksi 2 % normaaliseerumia (NHS) ja 0,3 % Triton X-100 PBS-liuoksessa.
6. Leikkeitä huuhdeltiin kolmesti 10 minuuttia PBS-liuoksessa. Huuhtelun tarkoituksena oli poistaa reagoimattomat vasta-aineet.
7. Sekundäärisen vasta-aineen inkubaatiossa leikkeitä inkuboitiin 2 tuntia 0,3 % Triton X-100 sisältävässä PBS-liuoksessa. Sekundääristä vasta-aineen (Biotinylated Horse-anti-goat) laimennos oli inkubaatioliuoksessa 1:200 (eli noin 7,5 µg/ml).

8. ABC-reaktioliuoksen valmistus. Valmistettiin ennen PBS-huuhtelun aloittamista. Liuos valmistettiin ABC-kitistä (PK-6100, Vectastain® Elite ABC Kit) lisäämällä aina 5 ml PBS-liuosta kohden ensin 1 tippa reagenssia A ja 1 tippa reagenssia B. Reagenssien lisäyksien välillä liuos sekoitettiin hyvin, jotta reagenssit liukenivat tasaisesti PBS-liuokseen. ABC-kitti sisältää avidiinia ja biotinyloitua piparjuuriperoksidaasia, jotka muodostavat liuoksen reagoivan kompleksin. ABC-liuoksen komponenttien tuli antaa reagoida keskenään 30 minuutin ajan, huuhtelun ajan, ennen inkubaation aloittamista.
9. Leikkeitä huuhdeltiin kolmesti 10 minuuttia PBS-liuoksessa reagoimattoman sekundäärisen vasta-aineen poistamiseksi.
10. ABC-reaktiossa (PK-6100, Vectastain® Elite ABC Kit) leikkeitä inkuboitiin 1 tunnin ajan Avidiini-biotiini-kompleksin liittämiseksi biotinyloituun vasta-aineeseen.
11. Leikkeitä huuhdeltiin kolmesti 10 minuutin ajan PBS-liuoksessa reagoimattomien ABC-liuoksen komponenttien poistamiseksi.
12. DAB-reaktio suoritettiin inkuboimalla leikkeitä 30–120 sekuntia 0,5 g/l DAB-reagenssia sisältävissä liuoksissa, joihin oli lisätty 0,001 % vetyperoksidia. DAB:lla paikannettiin kudoksesta antigeeni-vasta-aine-ABC-kompleksin piparjuuriperoksidaasi, jolloin muodostui silmällä havaittava ruskea sakka leikkeisiin. DAB-käyttöliuos valmistettiin 5,0 g/l DAB:a sisältävästä kantaliuoksesta tekemällä siitä 10-kertainen laimennos PBS-liuokseen. Liuokseen lisättiin 0,001 % vetyperoksidia substraatiksi juuri ennen käyttöä. Reaktion jälkeen leikkeitä huuhdeltiin nopesti 2 kertaa PBS-liuoksissa. DAB-kantaliuos valmistetaan liuottamalla 0,5 g DAB:a 100 ml:aan tislattua vettä.

Jokaiseen värjäykseen otettiin mukaan primäärinen ja sekundäärinen kontrollileike kutakin optimointiolosuhdetta kohti, jotka osoittivat kummankin vasta-aineen toimivuuden reaktioissa. Primääristä kontrollia inkuboitiin vain primäärisessä vasta-aineessa ja sekundääristä kontrollia vain sekundäärisessä vasta-aineessa. Toinen inkubaatio suoritettiin aina muuten samassa liuoksessa kuin vasta-aineinkubaatio, mutta ilman vasta-ainetta. Kummassakaan näytteessä ei saanut esiintyä spesifiä värjäytymistä sekä taustan kasvun tuli olla vähäistä.

Varsinaisen värjäyksen jälkeen leikkeet siirrettiin kelatinoituille (Liite 2) objektilaseille (Superfrost®) PBS-liuoksen kautta ja annettiin kuivua yön yli. Leikkeiden kuivuttua ne dehydratoitiin alkoholisarjalla, jossa ne upotettiin ensin tislattuun veteen ja sitten eripitoisiin alkoholiliuoksiin, ja lopuksi ksyleeniin. Heti dehydratoinnin jälkeen leikkeet vielä kiinnitettiin. Nämä työn vaiheet mahdollistivat leikkeiden säilymisen.

13. Leikkeiden dehydratointi:

- | | |
|------------------|-----------|
| 1. Tislattu vesi | 1 x 1 min |
| 2. 70 % etanoli | 1 x 2 min |
| 3. 96 % etanoli | 2 x 2 min |
| 4. 99 % etanoli | 2 x 5 min |
| 5. Ksyleeni | 1 x 5 min |

14. Leikkeiden kiinnitys. Lasit peitettiin peitinlaseilla, jotka kastettiin ensin ksyleeniin. Objektilasin päälle tiputettiin pieni määrä Pertex-kiinnitysainetta (Pertex mounting medium; HistoLab, #00801) ja peitinlasi painettiin sen päälle. Mahdolliset ilmakuplat poistettiin painelemalla peitinlasia kevyesti pinseteillä. Kiinnitysaineen annettiin kuivua muutaman päivän.

3.4.4 Aivoleikkeiden värjäys

Värjäyksissä käytettiin primäärinä vasta-aineina vuohessa tuotettuja monoklonaalisia vasta-aineita (IgG) hiiren leptiinille ja leptiinireseptorille. Vasta-aineet oli valmistettu käyttämällä immunogeeneinä hiiren rekombinanttiproteiineja, jotka oli tuotettu gramnegatiivisissa bakteereissa. Sekundäärinen vasta-aine oli biotinyloitu hevosessa tuotettu vasta-aine (IgG) vuohen vasta-aineelle (IgG) (H+L). Seerumina käytettiin hevosen normaaliseerumia.

Taulukosta 1 nähdään värjäysprosessien eteneminen. Värjäykset aloitettiin valmistajan suosittelemalla alhaisimmalla primäärisen vasta-aineen pitoisuudella (5 µg/ml) immunohistokemialliseen määrittelyyn. Lisäksi katsottiin leptiinin ja sen reseptorin esiintymistä eri aivoalueilla. Kohteena oli kuitenkin hypothalamuksen eri alueet, koska niiden tiedettiin liittyvän oleellisesti ruokahalun säätelyyn ja energiatasapainoon. Spesifinen värjäytyminen aivoalueilla havaittiin heti, ja siitä saatiin hyvät lähtökohdat määrittelyjen optimoimiseksi.

Optimointikohteita olivat immunohistokemiallisen määrityksen primäärisen vasta-aineen pitoisuus ja DAB-reaktion kesto.

Taulukko 1. Leptiin ja leptiinireseptorin immunohistokemiallisten menetelmien optimointi.

Proteiini	Aivot	Määrityksen laatu	Primäärisen vasta-aineen pitoisuus [$\mu\text{g/ml}$]	DAB-reaktion kesto [s]
LR	Rotta 2	Esiintyvyys eri ai-voalueilla	5,0	30
<u>LR</u>	Rotta 2	DAB-vaste	5,0	30, 60 ja 120
<u>Leptiini</u>	Rotta 2	DAB-vaste	5,0	30, 60 ja 120
Leptiini	Rotta 2	Esiintyvyys eri ai-voalueilla	5,0	30
Leptiini	Rotta 1	Konsentraatiovaste	0,2, 0,5, 2,0, ja 5,0	30
<u>Leptiini</u>	Rotta 3	DAB-vaste	2,0	30, 45, 60 ja 120
Leptiini	Rotta 3	Konsentraatiovaste	1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0	30
Leptiini	Rotta 3	Konsentraatiovaste	1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0	30
<u>Leptiini</u>	Rotta 2	Konsentraatiovaste	1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0	30
Leptiini	Rotta 1	Konsentraatio- ja DAB-vaste	1,0, 2,0, 3,0 ja 4,0	30, 45 ja 60
<u>LR</u>	Rotta 1	Konsentraatiovaste	1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0	45
LR	Rotta 1	DAB-vaste	3,0	30, 45, 60, 90 ja 120

Määritykset aloitettiin leptiinireseptorista, josta päädyttiin testaamaan leptiiniä. Määrityksissä vaihdettiin primäärisen vasta-aineen pitoisuutta ja DAB-reaktioiden kestoja ja katsottiin niiden vaikutusta värjäytymisiin. Määrityksien edetessä todettiin leptiin ja leptiinireseptorin immunohistokemiallisen kuvantamisen olevan lähellä toisiaan. Määrityksien tulokset antoivat viitteitä toistensa onnistumisesta. Työssä keskityttiin kokeilemaan alhaisempia primäärisen vasta-aineen pitoisuuksia, koska ne silmämääräisesti tarkasteltuna näyttivät antavan hyviä tuloksia. Lisäksi DAB-reaktioajan kasvattaminen näytti tuottavan parempia tuloksia alhaisemmilla pitoisuuksilla.

Taulukosta 1 nähdään määrityksien eteneminen ja onko määrityksen kohteena ollut leptiini vai leptiinireseptori. Lisäksi määrityksiin käytettyjen rottien aivot on esitetty. Seuraavaksi taulukossa on esitetty määrityksen laatu eli onko niiden tarkoitus ollut määrittää proteiinien esiintymisalueita, primäärisen vasta-aineen sitoutumista antigeeneihin, vai testata DAB-reaktion vaiku-

tusta värjäytymiseen. Määrityksessä käytetyt primääristen vasta-aineiden pitoisuudet ja DAB-reaktioajat on esitetty omissa sarakkeissaan. Valomikroskooppisiin tarkasteluihin Stereo Investigatorilla valittiin määrityksien kannalta edustavimmat värjäykset, mitkä on esitetty taulukossa alleviivattuina. Näitä värjäyksiä käsitellään tuloksissa tarkemmin.

3.5 Aivoleikkeiden tutkiminen

Valittujen määrityksien aivoleikkeitä tarkasteltiin lähemmin kuvaamalla ne valomikroskooppiin liitettyllä Stereo investigator-ohjelmalla. Lisäksi kuvatuista leikkeistä määritettiin optiset tiheydet.

3.5.1 Kuvaaminen Stereo Investigator -ohjelmalla

Värjäysprosessien suorittamisen jälkeen valittiin koko määrityksiä parhaiten edustavimmat aivoleikkeet, joiden värjäytymistä lähdettiin tarkastelemaan. Ne kuvattiin valomikroskoopilla, johon oli liitetty stereotaso (Lep Biopoint 2 Ludl Electronic Products 995201, Lep MAC5000, 73005020 DS-System) ja tietokehojelma (Mbf Stereoinvestigat™ 6 1995–2005 MicrobrightField.Inc, Stereo Investigator Confocal virtual Slice MRI). Stereo Investigator -ohjelma mahdollisti leikkeiden tutkimisen x, y, z -koordinaatistossa. Siinä mikroskoopilla päästiin kulkemaan kudosten sisään ja tarkastelemaan sekä määrittämään haluttuja tekijöitä. Menetelmien optimoinnin kannalta oli tärkeää tarkastella proteiinien spesifistä värjäytymistä aivokudoksissa. Työssä käytettiin 10-kertaisesti suurentavaa mikroskoopin linssiä.

3.5.2 Optisen tiheyden mittaaminen Image Pro Plus -tietokoneohjelmalla

Kuvaamisen jälkeen mitattiin värjäytymisen optinen tiheys (Image-Pro Plus. version 3. Ink Novell®) leikkeistä, joista oli määritetty leptoniä. Tiheyksien avulla pystyttiin vertailemaan tarkasti konsentraatioiden ja DAB-reaktioiden vaikutuksia ja värjäytymisen suuntaa leikkeissä. Lisäksi sillä voitiin tarkastella spesifistä ja epäspesifistä värjäytymistä sekä kontrollien aiheuttamaa taustaa. Lisäksi eri määrityksien tuloksia pystyttiin vertaamaan luotettavasti toisiinsa. Leikkeiden optisten tiheyksien mittaaminen ja vertaaminen mahdollisti leptonin ja leptiinreseptorin immunohistokemiallisen määrityksen menetelmien optimoinnit, minkä perusteella laadittiin lopulliset immunohistokemialliset värjäysmenetelmät osaston käyttöön.

4 TULOKSET

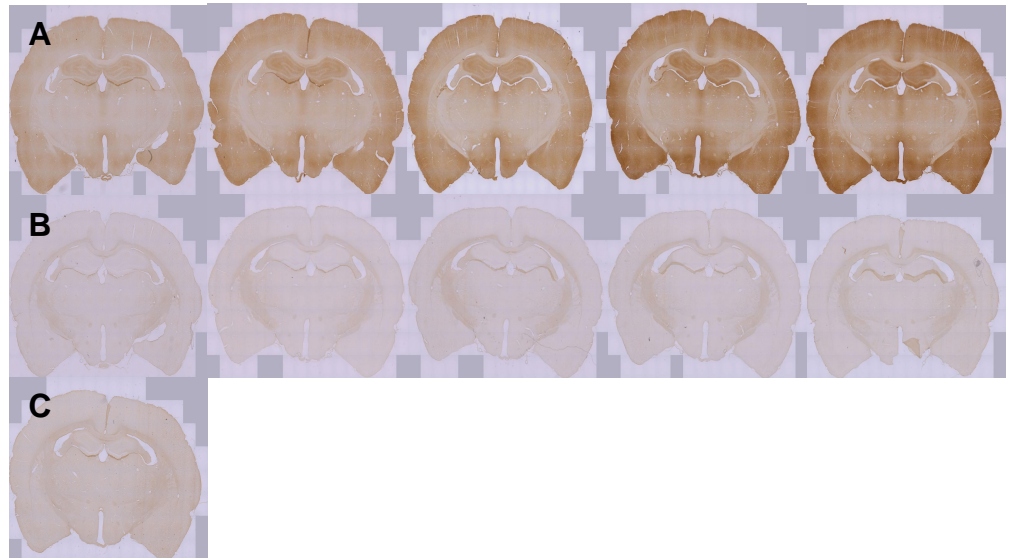
Värjäyksien perusteella todettiin, että leptiin ja leptiinireseptorin immunohistokemiallinen kuvantaminen Wistar-rottien aivoista onnistuu. Käytetyt menetelmät tuottivat hyviä tuloksia. Seuraavista kuvasarjoista nähdään primääristen vasta-aineiden sitoutuminen sekä DAB-reaktioajan vaikutus värjäytymiseen. Lisäksi kuvista oli tarkasteltavissa spesifinen sitoutuminen myös kvantitatiivisesti, mikä yhdessä optisen tiheyden mittausten kanssa johti lopullisten immunohistokemiallisten menetelmien pystyttämiseen.

4.1 Leptiinin kuvantaminen

Leptiinin värjäysmenetelmästä esitetään ensin primäärisen vasta-aineen pitoisuuden vaikutus värjäytymiseen, minkä jälkeen esitetään DAB-reaktion vaikutus värjäytymiseen sekä primäärisen vasta-aineen pitoisuuksilla 2 µg/ml että 5 µg/ml. Mukaan on liitetty kontrollit, joista nähdään vasta-aineista aiheutuva epäspesifinen sitoutuminen.

4.1.1 Primäärinen vasta-aine

Määrittely, jossa katsottiin primäärisen vasta-aineen pitoisuuden vaikutusta leptiinin immunohistokemialliseen kuvantamiseen, suoritettiin vasta-aineen pitoisuuksilla 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0 µg/ml (kuva 6A). DAB-reaktioaika oli määrityksessä 30 sekuntia. Leikkeet on esitetty kuvasarjoissa pienimmästä pitoisuudesta lähtien. Epäspesifisen värjäytymisen kontrollinäytteet ovat kuvan kohdissa B ja C.

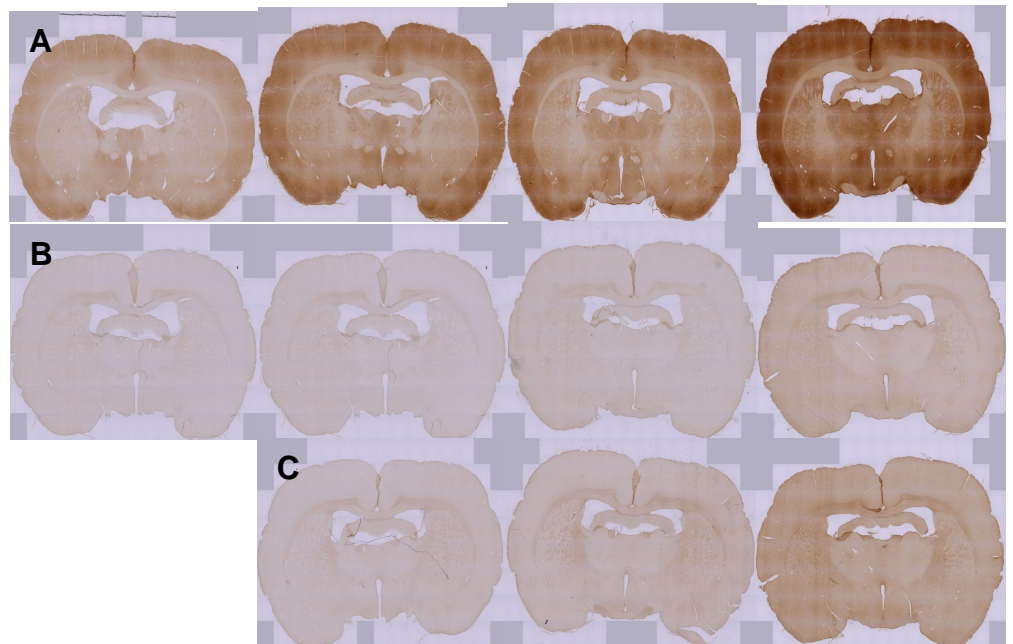


Kuva 6. Primäärisen vasta-aineen vaikutus leptiin immunohistokemialliseen kuvantamiseen primäärisen vasta-aineen pitoisuuksilla 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0 µg/ ml. DAB-reaktioaika 30 sekuntia. (A) Määrittys, (B) primääriset kontrollit ja (C) sekundäärinen kontrolli.

4.1.2 DAB-reaktioaika

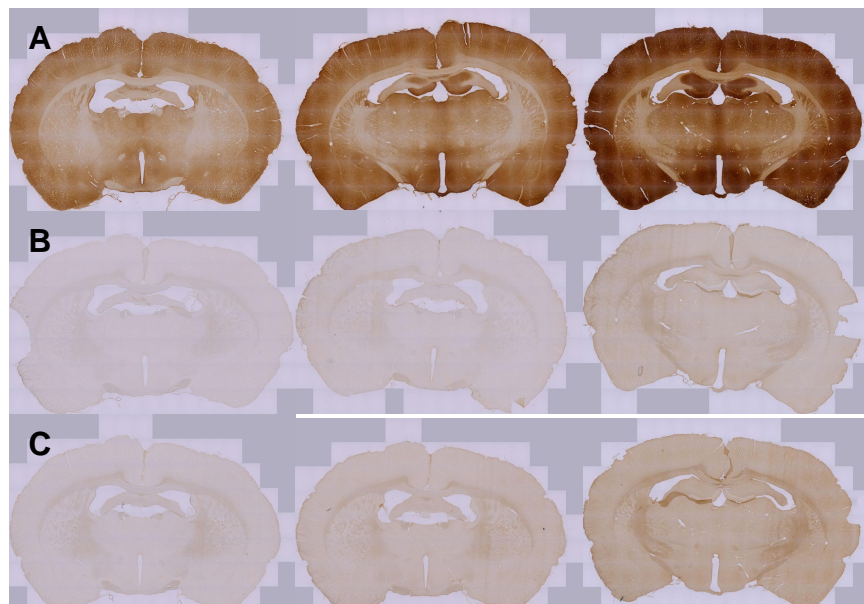
Määrittäykset, joissa katsottiin DAB-reaktioajan vaikutusta leptiin värjäytymiseen, suoritettiin primäärisen vasta-aineen pitoisuuksilla 2 µg/ ml ja 5 µg/ ml. DAB-reaktioajat olivat 2 µg/ ml -pitoisuudelle 30, 45, 60 ja 120 sekuntia, ja 5 µg / ml -pitoisuudelle 30, 60 ja 120 sekuntia. Värjätyt leikkeet on esitetty kuvasarjoissa (kuva 7A ja 8A) lyhyimmästä reaktioajasta lähtien. Epäspesifisen värjäytymisen kontrollinäytteet ovat kuvien kohdissa B ja C. Kontrollit esittävät vasta-aineista johtuvaa epäspesifiä sitoutumista. Kontrollien kuvasarjoista nähdään, että DAB-reaktion pituus ei saa ylittää 60 sekuntia, koska silloin tausta kasvaa liikaa, mikä häiritsee määrittystä.

Kuvan 7 kuvasarjoista nähdään DAB-reaktion pituuden vaikutus leikkeiden värjäytymiseen, kun primäärisen vasta-aineen pitoisuus on 2 µg/ ml. Sekundäärisiä kontrolleja esittävästä kuvasarjasta (7C) puuttuu kuva, joka esittää 30 sekunnin DAB-reaktioaikaa, koska leike oli päässyt ilman kanssa tekemisiin ja mennyt kuvaamiskelvottomaksi.



Kuva 7. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinin immunohistokemialliseen kuvantamiseen primäärisen vasta-aineen pitoisuudella 2 µg/ ml. DAB-reaktioajat 30, 45, 60 ja 120 sekuntia. (A) Määritys, (B) Primääriset kontrollit ja (C) sekundääriset kontrollit (DAB-reaktioajat 45, 60 ja 120 s).

Kuvan 8 kuvasarjoista nähdään DAB-reaktioajan vaikutus leikkeiden värjäytymiseen, kun primäärisen vasta-aineen pitoisuus on 5 µg/ ml.



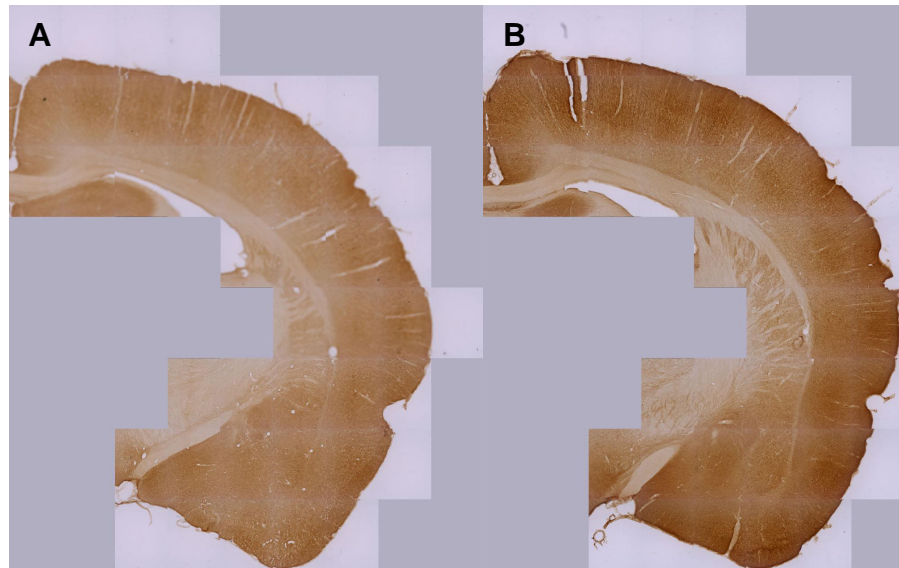
Kuva 8. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinin immunohistokemialliseen kuvantamiseen primäärisen vasta-aineen pitoisuudella 5 µg/ ml. DAB-reaktioajat 30, 60 ja 120 sekuntia. (A) Määritys, (B) Primääriset kontrollit ja (C) sekundääriset kontrollit.

4.1.3 *Spesifinen värjäytyminen*

Tässä osiossa keskitytään vertaamaan keskenään määrytyksien kahta leikkettä, joissa on käytetty primäärisen vasta-aineen pitoisuutena 5 µg/ ml. Tämän pitoisuuden havaittiin olevan ainoa pitoisuus, joka aiheutti kvantitatiivisesti havaittavaa spesifistä sitoutumista värjäytyissä aivoleikkeissä näissä olosuhteissa. Vertailussa käytetään primäärisen vasta-aineen pitoisuusmäärytyksen (kuva 6A; 5 µg/ ml, 30 s) ja DAB-reaktioaika määrytyksen (kuva 8; 5 µg/ ml, 60 s) leikkeitä, joita vertaillaan toisiinsa. Kuvat ovat eri määrytyksistä, joten ne eivät ole täysin verrattavissa keskenään, mutta niistä nähdään DAB-reaktioajan vaikutus spesifiseen värjäytymiseen. Kuvat ovat isompia ja tarkempia kuin koko aivoleikkeistä otetut kuvat ja niissä esitetään hypotalamuksen lisäksi alueita, joissa huomattiin esiintyvän spesifistä värjäytymistä kuvaamisen aikana. Nämä aivojen alueet ovat hippokampus ja cortex eli aivokuori.

Aivokuoren värjäytyminen

Kuvan 9 kohdissa A ja B esitetään DAB-reaktioajan vaikutus leikkeiden spesifiseen värjäytymiseen aivokuoressa. Kuvasta nähdään, että 60 sekunnin DAB-reaktiolla saadaan kvantitatiivisempia tuloksia. Tämä on havaittavissa, kun verrataan aivokuorten alaosa tosiinsa. Leike on 30 sekunnin DAB-reaktiolla lähes tasaisesti värjäätynyt, mutta 60 sekunnin reaktiossa huomataan eriasteista värjäytymistä, mikä osoittaa 60 sekunnin DAB-reaktion olevan parempi vaihtoehto menetelmään, jossa lehtiä kuvannetaan immunohistokemiallisesti.



Kuva 9. Aivokuori. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinin immunohistokemialliseen kuvantamiseen. (A) Primääriseen vasta-aineen pitoisuus -määrityksen aivokuori vasta-aineen pitoisuudella 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. DAB-reaktioaika 30 sekuntia. (B) DAB-reaktioaika -määrityksen aivokuori vasta-aineen pitoisuudella 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. DAB-reaktioaika 60 sekuntia.

Hippokampuksen värjäytyminen

Kuvan 10 kohdissa A ja B esitetään DAB-reaktioajan vaikutus leikkeiden spesifiseen värjäytymiseen hippokampuksessa. Molemmista on havaittavissa spesifistä värjäytymistä hippokampuksen alueella, mutta kohdassa B värjäytyminen on selkeämpää.

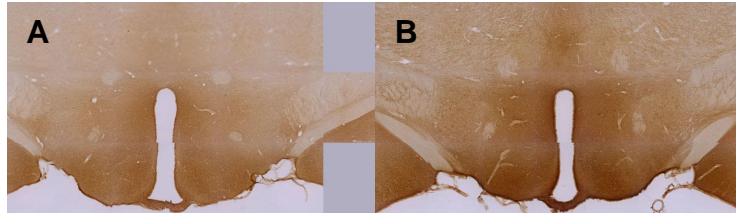


Kuva 10. Hippokampus. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinin immunohistokemialliseen kuvantamiseen. (A) Primääriseen vasta-aineen pitoisuus -määrityksen hippokampus vasta-aineen pitoisuudella 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. DAB-reaktioaika 30 sekuntia. (B) DAB-reaktioaika -määrityksen hippokampus vasta-aineen pitoisuudella 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. DAB-reaktioaika 60 sekuntia.

Hypotalamuksen värjäytyminen

Kuvasta 11 nähdään DAB-reaktioajan vaikutus leikkeiden spesifiseen värjäytymiseen hypotalamuksessa. Kohdista A ja B on molemmista havaittavissa spesifistä värjäytymistä ja hypotalamus on selkeästi erottunut. Kuitenkin kohdasta B värjäytyminen on havaittavissa kvantitatiivisemmin ja kuvasta havaitaan värjäytymisen olevan tummempaa kolmannen aivokammion vie-

reiseltä alueelta ja aivan leikkkeen alaosaan, joissa Arc:n alueet sijaitsevat (vertaa kuvaan 3).



Kuva 11. Hypotalamus. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinin immunohistokemialliseen kuvantamiseen. (A) Primäärisen vasta-aineen pitoisuuden määrittämisen hypotalamus vasta-aineen pitoisuudella 5 µg/ ml. DAB-reaktioaika 30 sekuntia. (B) DAB-reaktioaika määrittämisen hypotalamus vasta-aineen pitoisuudella 5 µg/ ml. DAB-reaktioaika 60 sekuntia.

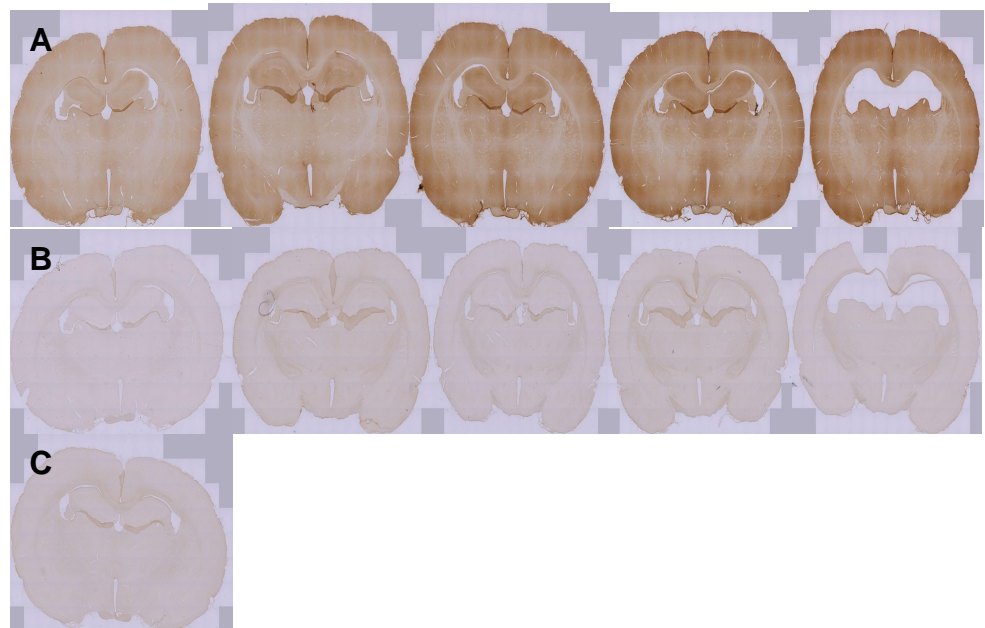
Edellä esitettyjen kuvien perusteella tultiin siihen johtopäätökseen, että leptiinin immunohistokemiallinen kuvantaminen rotan aivoista onnistuu parhaiten primäärisen vasta-aineen pitoisuudella 5 µg/ ml ja 60 sekunnin DAB-reaktioajalla käytetyissä määritysolosuhteissa.

4.2 Leptiinireseptorin kuvantaminen

Leptiinireseptorin värjäyksessä esitetään ensin primäärisen vasta-aineen konsentraation vaikutus värjäytymiseen (kuva 12), minkä jälkeen esitetään DAB-reaktioajan vaikutus (kuva 13). Mukaan on liitetty kontrollit, joista nähdään vasta-aineista aiheutuva epäspesifinen sitoutuminen.

4.2.1 Primäärinen vasta-aine

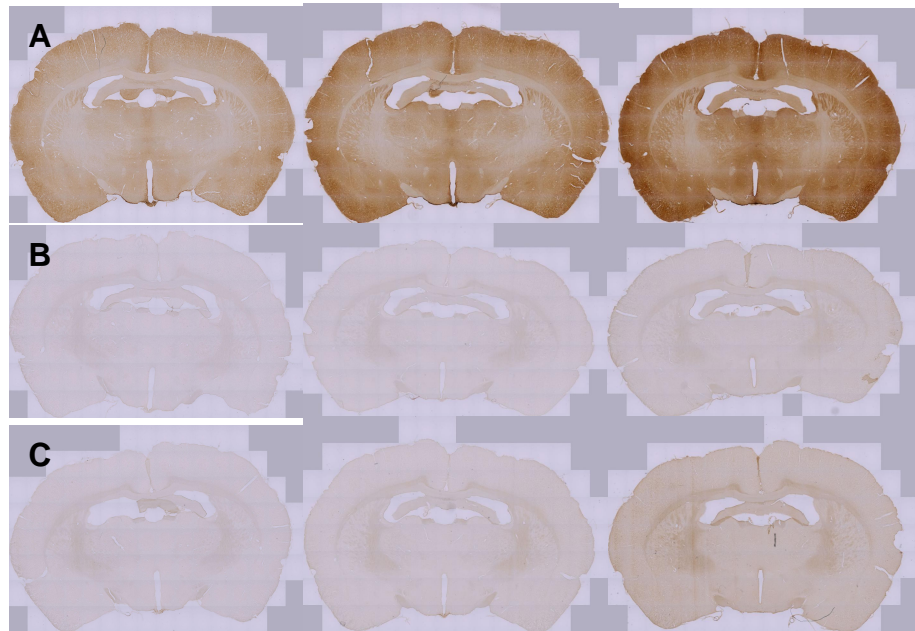
Määrittäminen, jossa katsottiin primäärisen vasta-aineen pitoisuuden vaikutusta leptiinireseptorin immunohistokemialliseen kuvantamiseen, suoritettiin primäärisen vasta-aineen pitoisuuksilla 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0 µg/ ml (kuva 12A). DAB-reaktioaika oli määrittämisessä 45 sekuntia. Leikkeet on esitetty kuvasarjoissa pienimmästä pitoisuudesta lähtien. Epäspesifisen värjäytymisen kontrollinäytteet ovat kuvan kohdissa B ja C. Kuvasta huomataan, että primäärisen vasta-aineen pitoisuus ei 45 sekunnin DAB-reaktiolla vaikuta epäspesifiseen sitoutumiseen kontrolleissa.



Kuva 12. Primäärisen vasta-aineen vaikutus leptiinireseptorin immunohistokemialliseen kuvantamiseen primäärisen vasta-aineen pitoisuuksilla 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 5,0 µg/ ml. DAB-reaktioaika 45 sekuntia. (A) Määrittäminen, (B) primääriset kontrollit ja (C) sekundäärinen kontrolli.

4.2.2 DAB-reaktioaika

Määrittäminen, jossa katsottiin DAB-reaktioajan vaikutusta leptiinireseptorin värjäytymiseen, suoritettiin primäärisen vasta-aineen pitoisuudella 5 µg/ ml. DAB-reaktioajat olivat 30, 60 ja 120 sekuntia. Värjätyt leikkeet on esitetty kuvassa 13 (A) lyhyimmästä reaktioajasta lähtien. Epäspesifinen värjäytyminen näkyy kontrolleista, jotka ovat kuvan kohdissa B ja C.



Kuva 13. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinireseptorin immunohistokemialliseen kuvantamiseen primäärisen vasta-aineen pitoisuudella 5 µg/ml. DAB-reaktioajat 30, 60 ja 120 sekuntia. (A) Määritys, (B) primääriset kontrollit ja (C) sekundääriset kontrollit.

4.2.3 Leikkeiden värjäytyminen

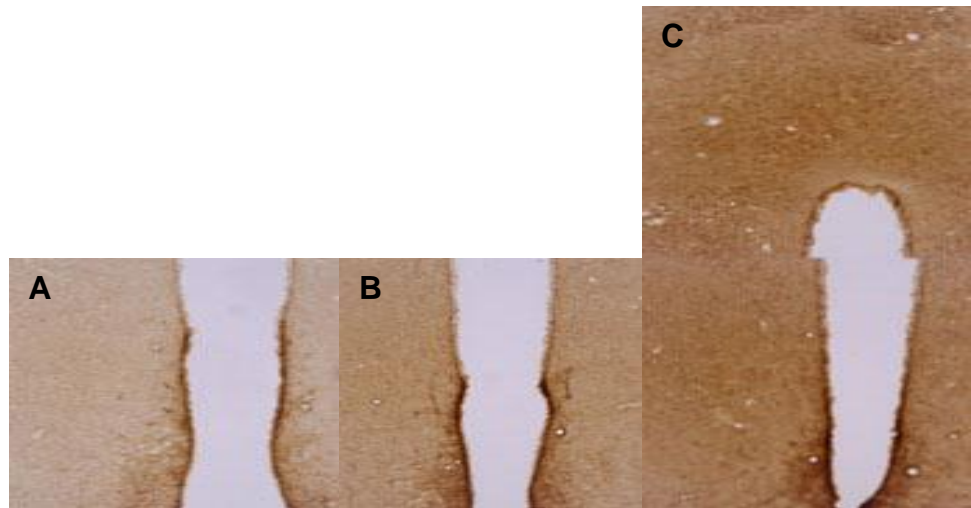
Verrattaessa leptiinireseptorin immunohistokemiallista värjäytymistä leptiinin värjäytymiseen näytti ensin siltä, että leptiinireseptorin värjäysmenetelmä ei toimisi yhtä hyvin, tai sitä ei esiintyisi leikkeissä yhtä paljon. Tarkasteltaessa samoja leikkeitä mikroskoopilla hypothalamuksen alueelta 3. aivokammion vierestä (kuvat 14 ja 15), havaittiin, että vaaleampi värjäytyminen johtuu leptiinireseptorin erilaisesta esiintymisestä aivokudoksessa. Leptiinireseptorin sitoutuminen on pistemäistä eli se saattaa esiintyä tietyissä neuroneissa tai soluryhmissä voimakkaammin kuin toisissa. Lisäksi kuvista on havaittavissa rihmoja, jotka saattaisivat olla hermoratoja. Etenkin kuvan 15 kohdasta C nähdään, että leptiinireseptoria esiintyy voimakkaimmin Arc:n alueilla (vertaa kuvaan 3).

Seuraavien kuvien leikkeissä on primäärisen vasta-aineen pitoisuus 5 µg/ml, koska sen todettiin, kuvien perusteella, olevan paras pitoisuus leptiinireseptorin immunohistokemialliseen kuvantamiseen. Tämä pitoisuus oli ainut joka näytti antavan kvantitatiivisesti tarkasteltavia tuloksia. Kuva 14 on leptiinireseptorin primäärisen vasta-aineen pitoisuus -määrityksestä (vertaa kuvaan 12A) ja siinä DAB-reaktioaika on 45 sekuntia.



Kuva 14. Leptiinireseptorin esiintyminen hypotalamuksessa 3. aivokammion vieressä primäärisen vasta-aineen pitoisuus -määrityksessä. Primäärisen vasta-aineen pitoisuus 5 µg/ ml. DAB-reaktioaika 45 sekuntia. (Suurempi kuva liitteessä 3.)

Kuva 15 on DAB-reaktioaika -määrityksestä ja siinä DAB-reaktioajat olivat 30, 60 ja 120 sekuntia (vertaa kuvaan 13A). Kuvat on esitetty jpg-muodossa, ja niistä on tarkemmat tiff-kuvat liitteissä 3 ja 4 (1,2 ja 3), mistä leptiinireseptorin esiintymistä voidaan tarkastella.



Kuva 15. Leptiinireseptorin esiintyminen hypotalamuksessa 3. aivokammion vieressä DAB-reaktioaika -määrityksessä. Primäärisen vasta-aineen pitoisuus 5 µg/ ml. DAB-reaktioajat 30, 60 ja 120 sekuntia. (Liite 4, s. 1 - 3)

Näiden kuvien perusteella leptiinireseptorin sitoutuminen on selkeimmin havaittavissa kuvan 15 kohdasta C. Kuvan perusteella 120 sekunnin DAB-reaktioaika on paras leptiinireseptorin kuvantamiseen tällä menetelmällä, kun primäärisen vasta-aineen pitoisuutena käytetään 5 µg/ ml. Vertailtaessa leptiinin DAB-reaktioaika -määritystä ja leptiinireseptorin DAB-reaktioaika -määritystä toisiinsa primäärisen vasta-aineen pitoisuudella 5 µg/ ml havaitaan, että kontrollit aiheuttavat lähes yhtä tummaa epäspesifistä värjäytymistä leptiinimäärityksen DAB-reaktioajalla 60 sekuntia (kuva 8) ja leptiinireseptorimäärityksen DAB-reaktioajalla 120 sekuntia (kuva 13). Leptiinireseptorin määritykseen käytettävää 120 sekunnin DAB-reaktioaikaa on yleensä pidetty liian pitkänä, mutta tälle vasta-aineelle tällä menetelmällä se näyttää toimi-

van parhaiten. Jo 30 sekunnin DAB-reaktioaikakin näyttää antavan tarkasteltavia tuloksia, kuten kuvan 15 kohdasta A on havaittavissa. Kuitenkin katsottaessa kuvaa 13, jossa esitetään DAB-reaktioaikasarja, huomataan, että 30 sekunnin DAB-reaktioaika ei anna tarpeeksi selkeää tulosta. Liitteistä 3 ja 4 nähdään vielä kyseiset kuvat tarkempina, jolloin leptiinireseptorin värjäytyminen nähdään selkeämmin. Edellä esitettyjen kuvien perusteella tultiin siihen tulokseen, että leptiinireseptorin immunohistokemiallinen kuvantaminen onnistuu parhaiten primäärisen vasta-aineen pitoisuuden ollessa 5 µg/ml ja DAB-reaktioajan ollessa 120 sekuntia käytetyissä määritysolosuhteissa.

4.3 Leptiinimenetelmien optinen tiheys

Optisen tiheyden mittaaminen otettiin tueksi osoittamaan leptiinin immunohistokemiallisen kuvantamisen onnistumista sekä osoittamaan menetelmän optimoitavien kohtien vaikutus värjäytymiseen. Optinen tiheys on mitattu edellä esitetyistä kuvasarjoista (kuvat 6, 7 ja 8). Primäärisen vasta-aineen pitoisuuden (kuva 6A) ja DAB-reaktioajan (kuvat 7A ja 8A) vaikutukset immunohistokemiallisen värjäytymisen optiseen tiheyteen osoitetaan kuvaajilla. Kuvaajista on tarkasteltavissa optimoitavien olosuhteiden muutoksien vaikutus määritykseen. Optinen tiheys eli absorbanssi $[A]$ kuvaa valon imeytymistä aineeseen ja tiheys on mitattu hypotalamuksesta, värjäytymistä edustavasta kohdasta. Kuvaajissa esitetään optisen tiheyden muutos sekä suoraan kuvasta että tausta vähennettynä, jolloin saadaan värjäytymisen spesifisen optinen tiheys ja pystytään minimoimaan värjäyksistä johtuvaa vaihtelua. Tausta on mitattu alueelta, jolla ei pitäisi esiintyä leptiinin spesifistä sitoutumista. Optista tiheyttä käytetään vain leptiinimenetelmän optimoimiseen, koska leptiinin värjäytyminen on tasaista ja leptiinireseptorin esiintyminen pistemäistä aivokudoksissa.

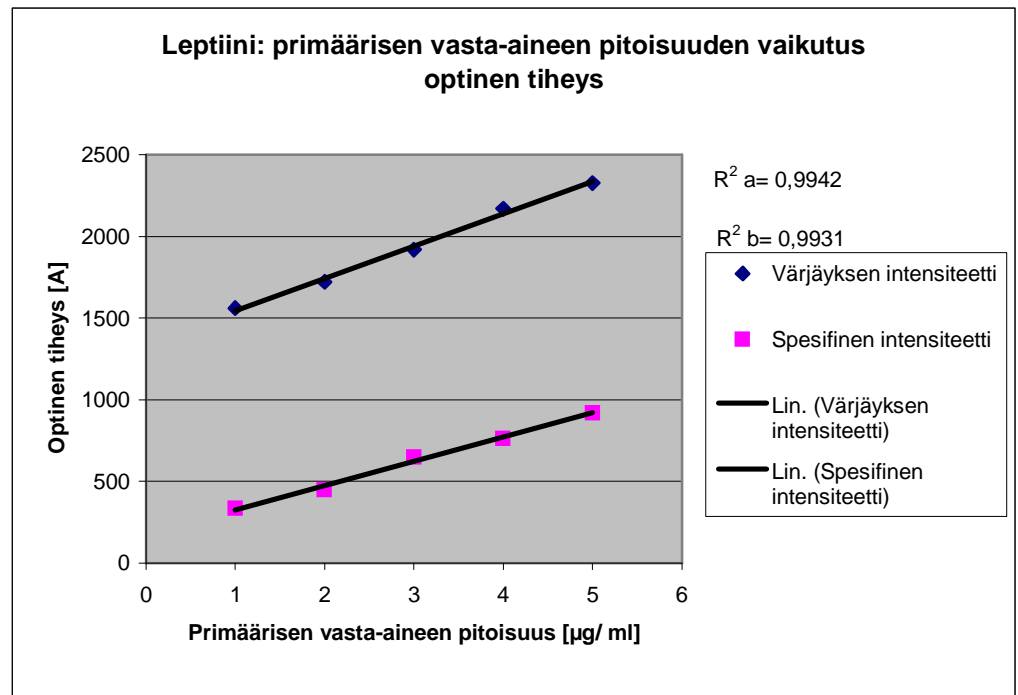
4.3.1 Konsentraatiovasteen vaikutus optiseen tiheyteen

Taulukosta 2 nähdään primäärisen vasta-aineen pitoisuuden vaikutus värjäytymisen optiseen tiheyteen, kun DAB-reaktioaika on 30 sekuntia. Taulukossa on ilmoitettu myös taustan tiheys sekä värjäyksen spesifinen optinen tiheys.

Taulukko 2. Primäärisen vasta-aineen pitoisuuden vaikutus leptiinimäärityksen optiseen tiheyteen.

c(µg/ml)	Optinen tiheys [A]	taustan tiheys [A]	spesifinen tiheys [A]
1	1560,4	1227,7	332,7
2	1720,9	1271,6	449,2
3	1918,9	1269,1	649,9
4	2171,0	1410,2	760,8
5	2328,3	1409,7	918,6

Taulukosta 2 nähdään, että taustan tiheys ei merkittävästi muutu primäärisen vasta-aineen pitoisuuksien vaikutuksesta. Kuvassa 16 on esitetty värjäyksen optinen tiheys ja spesifinen tiheys primäärisen vasta-aineen funktiona.



Kuva 16. Primäärisen vasta-aineen pitoisuuden vaikutus leptiinin värjäytymisen optiseen tiheyteen.

Taulukosta 2 ja kuvaajista (kuva 16) nähdään, että värjäyksen tiheys paranee lineaarisesti käytettäessä korkeampia primäärisen vasta-aineen pitoisuuksia, mikä ilmenee korrelaatiokertoimen suuruutena. Tämän perusteella 5 µg/ml on paras primäärisen vasta-aineen pitoisuus käytetyistä pitoisuuksista leptiinin immunohistokemialliseksi kuvantamiseksi, mikä osoittaa kuvien tarkastelun johtaneen oikeaan tulokseen.

4.3.2 DAB-reaktioajan vaikutus optiseen tiheyteen

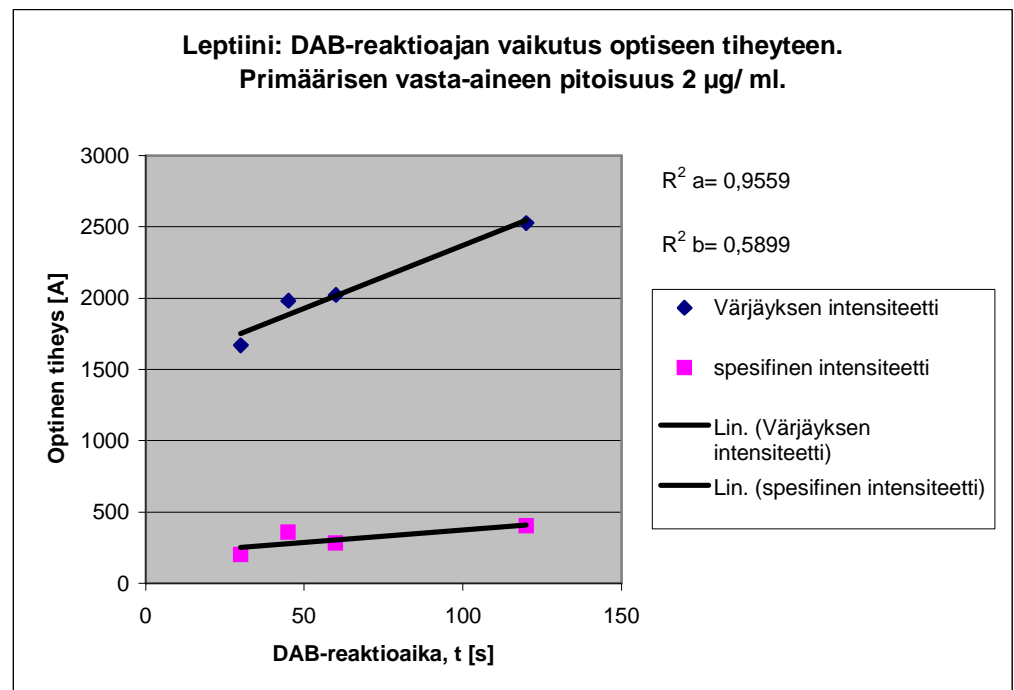
Taulukoissa 3 ja 4 on esitetty DAB-reaktioajan vaikutus leikkeiden värjäytymisen optiseen tiheyteen primäärisen vasta-aineen pitoisuuksilla 2 ja 5 µg/ml. Taulukoissa on lisäksi esitetty taustan tiheys sekä spesifinen tiheys.

Taulukosta 3 nähdään, että värjäyksen optinen tiheys kasvaa reaktioajan kasvaessa primääriseen vasta-aineen pitoisuudella 2 µg/ ml. Taulukosta on myös nähtävissä, että taustan tiheys kasvaa 120 sekunnin kohdalla verrattessa muiden reaktioaikojen aiheuttamaan taustan tiheyteen. Lisäksi taulukosta nähdään, että DAB-reaktioaika ei vaikuta merkittävästi spesifiseen värjäytymiseen primääriseen vasta-aineen pitoisuudella 2 µg / ml, mikä osoittaa pitoisuuden olevan liian pieni.

Taulukko 3. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinimäärityksen optiseen tiheyteen. Primääriseen vasta-aineen pitoisuus 2 µg / ml.

t/DAB(s)	Optinen tiheys	taustan tiheys	spesifinen tiheys
30	1668,8	1468,7	200,1
45	1981,1	1622,1	359,0
60	2021,4	1737,8	283,7
120	2526,7	2124,5	402,2

Kuvaajista nähdään (Kuva 17), että määrittäksessä leikkeiden optinen tiheys kasvaa lähes lineaarisesti, mutta spesifinen tiheys ei, mikä osoittaa, että DAB-reaktioajan kasvattaminen ei paranna määrittäksen laatua tällä primääriseen vasta-aineen pitoisuudella.



Kuva 17. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinin värjäytymisen optiseen tiheyteen primääriseen vasta-aineen pitoisuudella 2 µg/ ml.

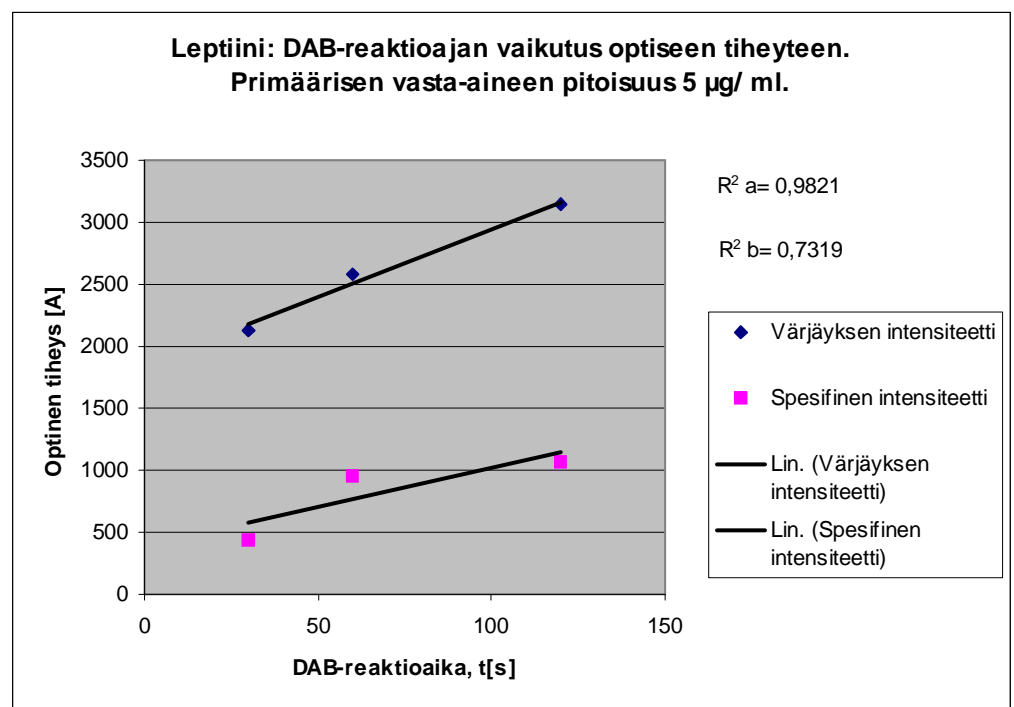
Taulukosta 4 nähdään, että värjäyksen optinen tiheys kasvaa DAB-reaktioajan kasvaessa primääriseen vasta-aineen pitoisuudella 5 µg/ ml. Taulukosta nähdään myös, että taustan intensiteetti kasvaa huomattavasti 120

sekunnin kohdalla 30 ja 60 sekunnin reaktioihin verrattuna, missä taustan intensiteetti pysyy lähes muuttumattomana. Lisäksi nähdään, että DAB-reaktioaika vaikuttaa spesifiseen värjäytymiseen tällä primääriseen vasta-aineen pitoisuudella (5 µg/ml), mitä ei ollut havaittavissa pienemmillä pitoisuuksilla.

Taulukko 4. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinimäärityksen optiseen tiheyteen. Primääriseen vasta-aineen pitoisuus 5 µg/ml.

t/DAB(s)	Optinen tiheys	taustan tiheys	spesifinen tiheys
30	2131,7	1689,9	441,8
60	2586,8	1628,0	958,8
120	3140,0	2067,9	1072,2

Kuvaajista (kuva 18) on havaittavissa, että värjäytymisen intensiteetti kasvaa lähes lineaarisesti. Kuvaajasta nähdään myös, että värjäytyminen on spesifistä värjäytymistä. Taulukon 4 ja kuvan 18 perusteella voidaan todeta, että DAB-reaktio vaikuttaa spesifiseen värjäytymiseen 60 sekuntiin asti, minkä jälkeen spesifinen sitoutuminen ei enää merkittävästi kasva.



Kuva 18. DAB-reaktioajan vaikutus leptiinin värjäytymisen optiseen tiheyteen primääriseen vasta-aineen pitoisuudella 5 µg/ml.

4.3.3 Optinen intensiteetti -päätelmät

Optisen tiheyden mittaukset tukevat leikkeistä otettujen kuvien tarkasteluista saatuja tuloksia siitä, että leptiinin immunohistokemiallisessa kuvantamisessa tulee käyttää primääriseen vasta-aineen pitoisuutena 5 µg/ml. Lisäksi 60

sekunnin DAB-reaktiaika on määrittämisen kannalta sopivin, koska tämän ajan jälkeen spesifinen värjäytyminen ei enää parane.

5 YHTEENVETO

Tässä opinnäytetyössä kehitettiin immunohistokemialliset menetelmät leptiinin ja leptiinireseptorin kuvantamiseksi rotan aivoista. Leptiinin ja sen reseptorin spesifinen määrittäminen aivokudoksista onnistui hyvin ja menetelmät niiden määrittämiseksi saatiin pystytettyä. Menetelmät saatiin optimoitua sopiviksi suoritettaessa määrittämiä laboratorio-olosuhteissa.

Leptiinin immunohistokemialliseksi kuvantamiseksi rotan aivoista käytetään menetelmää, jossa primäärisen vasta-aineen (AF498, R&D Systems) pitoisuus on 5,0 µg / ml ja DAB-reaktion kesto on 60 sekuntia. Menetelmäohje esitetään liitteessä 5.

Leptiinireseptorin immunohistokemialliseksi kuvantamiseksi rotan aivoista käytetään menetelmää, jossa primäärisen vasta-aineen (AF497, R&D Systems) pitoisuus on 5 µg/ ml ja DAB-reaktion kesto on 120 sekuntia. Menetelmäohje esitetään liitteessä 6.

Leptiiniä ja leptiinireseptoria esiintyy samanaikaisesti tietyillä aivoalueilla odotusten mukaisesti. Värjäysten spesifisyys ja paikallistuminen niille alueille, joilla leptiiniä ja leptiinireseptoria tiedetään esiintyvän, tukee sitä johtopäätöstä, että pystytetyillä värjäysmenetelmillä voidaan määrittää leptiinihormonia ja sen reseptoria.

Menetelmiä on tarkoitus käyttää ruokahalun säätelyn fysiologisten ja farmakologisten mekanismien tutkimisessa Helsingin Yliopiston Farmasian tiedekunnan Farmakologian ja toksikologian osastolla.

VIITELUETTELO

- [1] Cohen Jr., M. Michael, Role of Leptin in regulating Appetite, Neuroendocrine Function, and Bone Remodeling. *American Journal of Medical Genetics* 140A (2006), s. 515-524.
- [2] Frühbeck, G., Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochem. J* 393 (2006), s. 7-20.
- [3] Lo, Kin-Ming, Zhang, Jinyang, Sun, Yaping, Morelli, Bo, Lan, Yan, Lauder, Scott, Brunkhorst, Beatrice, Webster, Gordon, Hallakou-Bozec, Sophie, Doraré, Lilliane, Gillies, Stephen D., Engineering a pharmacologically superior form of leptin for the treatment of obesity. *Oxford Journals, Life Sciences, PEDS*, Volume 18, Number 1 (2005), s. 1-10.
- [4] Elmquist, JK, Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *International Journal of Obesity* 25, suppl 5 (2001), s. S78-S82.
- [5] Peelman, Frank, Couturier, Cyril, Dam, Julie, Zabeau, Lennart, Tavernier, Jan, Jockers, Ralf, Techniques: new pharmacological perspectives for the leptin receptor. *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.27 No.4 (2006)
- [6] Tolonen, Matti, *Leptiini - monivaikutteinen lihavuushormoni* [online-tietokanta].20.3.2006 [viitattu 1.9.2006]. Saatavissa: <http://www.biovita.fi/suomi/terveyssivut/leptiini.html>.
- [7] Funahashi, Hisayuki, Yamada, Shuori, Kageyama, Haruaki, Takenoya, Fumiko, Guan, Jian-Lian, Shioda, Seiji, Co-existence of leptin- and orexin-receptors in feeding-regulating neurons in the hypothalamic arcuate nucleus – a triple labeling study. *Peptides* 24 (2003), s. 687-694.
- [8] Elias, Carol F., Kelly, Joseph F., Lee, Charlotte E., Ahima, Rexford S., Drucker, Daniel J., Saper, Clifford B., Elmquist, Joel K., Chemical Characterization of Leptin-Activated Neurons in the Rat Brain. *The Journal of Comparative Neurology* 423 (2000), s. 261-281.
- [9] Paxinos, G. – Watson, C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fourth Edition. USA: Academic press. 1998.
- [10] Cone, RD, Cowley, MA, Butler, AA, Fan, W, Marks, DL, Low, MJ, The arcuate as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity* 25, Suppl 5 (2001), s. S63-S67.
- [11] Wang, Hongqin, Storlien, Len H., Huang, Xu-Feng, Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptors, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282 (2002), s. E1352-E1359.
- [12] Ala-Kulju, Ritva, *Dopamiinihermojen immunohistokemiallinen kuvantaminen, DAT-proteiinin määrittäminen rotan aivoleikkeistä*. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu. Laboratorioala. Turku. 2006.
- [13] Polka, J. M. - Van Noorden, S, *Introduction to Immunocytochemistry*. United States of America: BIOS Scientific Publishers. Second edition. 1997.

PERFUUSIOLIUKOKSET**- 0,1 M fosfaattipuskuri pH 7,4 (4°C) (=PB)**

1. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 35,6 g/ 2,0 l Ti-H₂O
2. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 13,8 g/l Ti-H₂O

1. liuoksen pH säädetään 2. liuksella 7,4:ään samalla pH-mittarilla.
Magneettisekoitus.

- 0,9 % NaCl fosfaattipuskurissa (=Phosphate buffered saline =PBS)

1000 ml:aan fosfaattipuskuria (PB) liuotetaan 9 g natriumkloridia (NaCl). Säilytetään jääkaapissa (4 °C).

- 20 % paraformaldehydiliuos

100 g paraformaldehydia sekoitetaan noin 300 ml:aan tislattua vettä. Lämmitetään 60 - 70 °C. 1 M NaOH-liuosta lisätään tipoittain kunnes liuos tulee kirkaaksi. Lisätään tislattua vettä 500 ml:aan ja suodatetaan ruskeaan pulloon. Säilytetään jääkaapissa (4 °C).

- 4 % paraformaldehydiliuos

20 % kantaliuosta laimennetaan fosfaattipuskurilla juuri ennen käyttöä.

- 20 % sukroosiliuos fosfaattipuskurissa

200 g sakkaroosia liuotetaan 1,0 l:aan fosfaattipuskuria (PB).

OBJEKTILASIEN KELATINOINTI

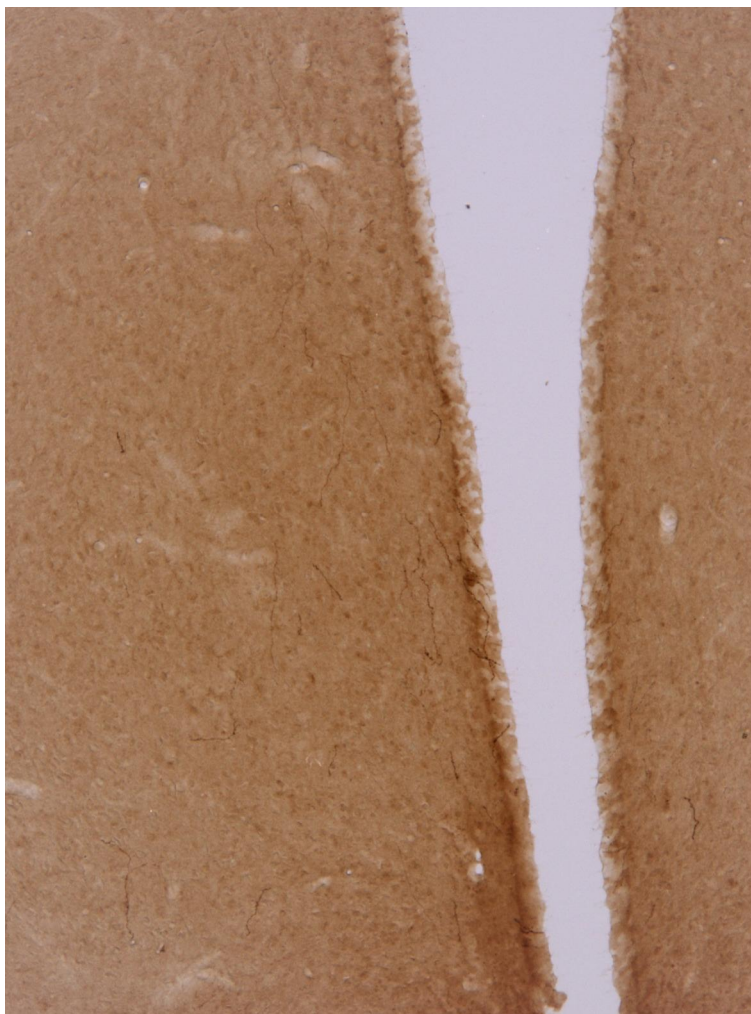
Objektilasit (Superfrost) päällystetään kelatiinilla, jotta leikkeet pysyvät laseilta dehydratoinnin aikana. DAB-värjätyt leikkeet polymerisoituvat kelatinoituille objektilaseille.

- Kelatiiniliuos:
 - o 5,0 g kelatiinia
 - o 0,5 g kaliumkromisulfaattia ($K_2Cr_2O_7 \cdot 2 H_2O$)
 - o 500 ml H_2O
 - o Kelatiini ja kaliumkromisulfaatti liuotetaan 500 ml:aan noin 60 - 70 °C:sta tislattua vettä koko ajan sekoittaen. Liuos suodatetaan kuumana objektilasitelineiden altaisiin.

- Levyjen päällystys: Puhtaat objektilasit upotetaan objektilasitelineissä 50 °C:een kelatiiniliuokseen. Telineitä pidetään altaissa 30 sekunnin ajan, jonka jälkeen ne jätetään kuivumaan huoneenlämpöön yöksi.
 - o Jos kelatiiniliuos on liian lämmintä, lasille tulee liian vähän kelatiinia ja leikkeet irtoavat värjäyksessä.

LEPTIINIRESEPTORIN KONSENTRAATIOMÄÄRITYS (TIFF.-KUVA)

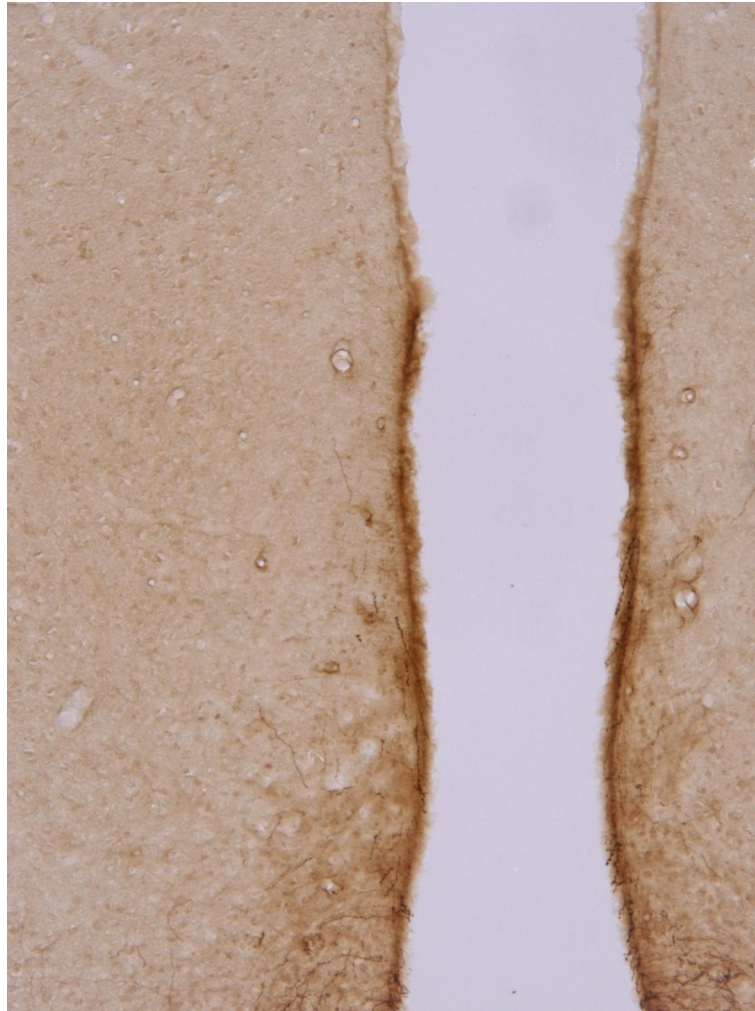
- Primäärisen vasta-aineen pitoisuus 5 µg/ml
- DAB-reaktio 45 sekuntia



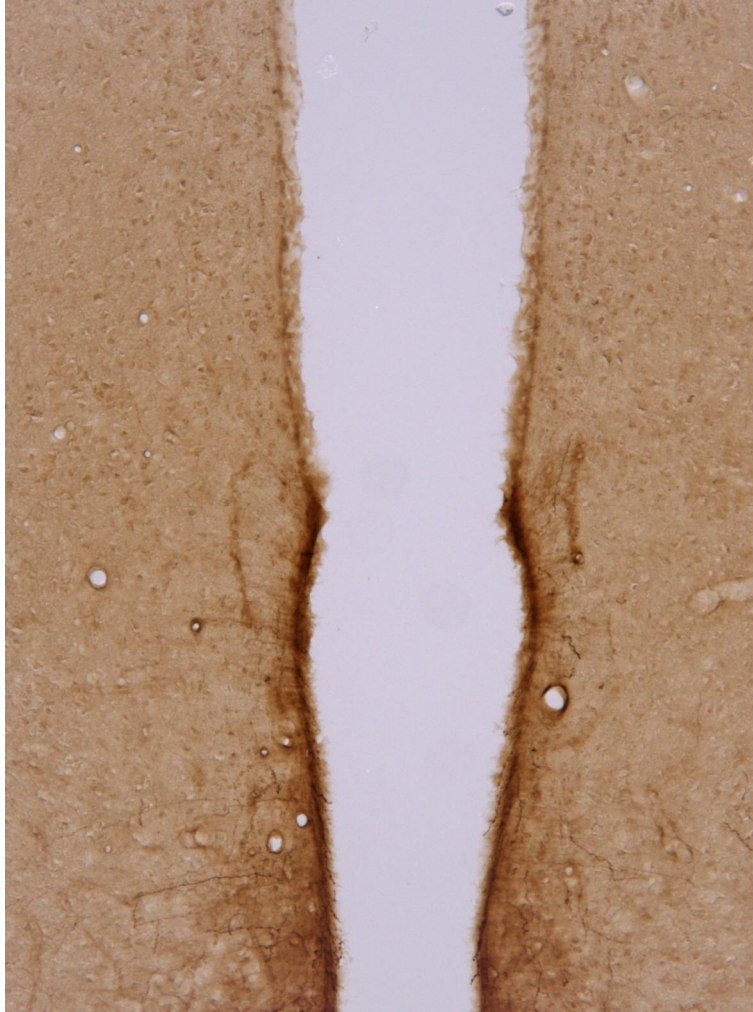
Kuva 19. Leptiinireseptori. Primäärisen vasta-aineen konsentraatio 5 µg/ml. Vertaa kuvaan 14.

LEPTIINIRESEPTORIN DAB-REAKTIOAIKAMÄÄRITYS (TIFF. – KUVAT)

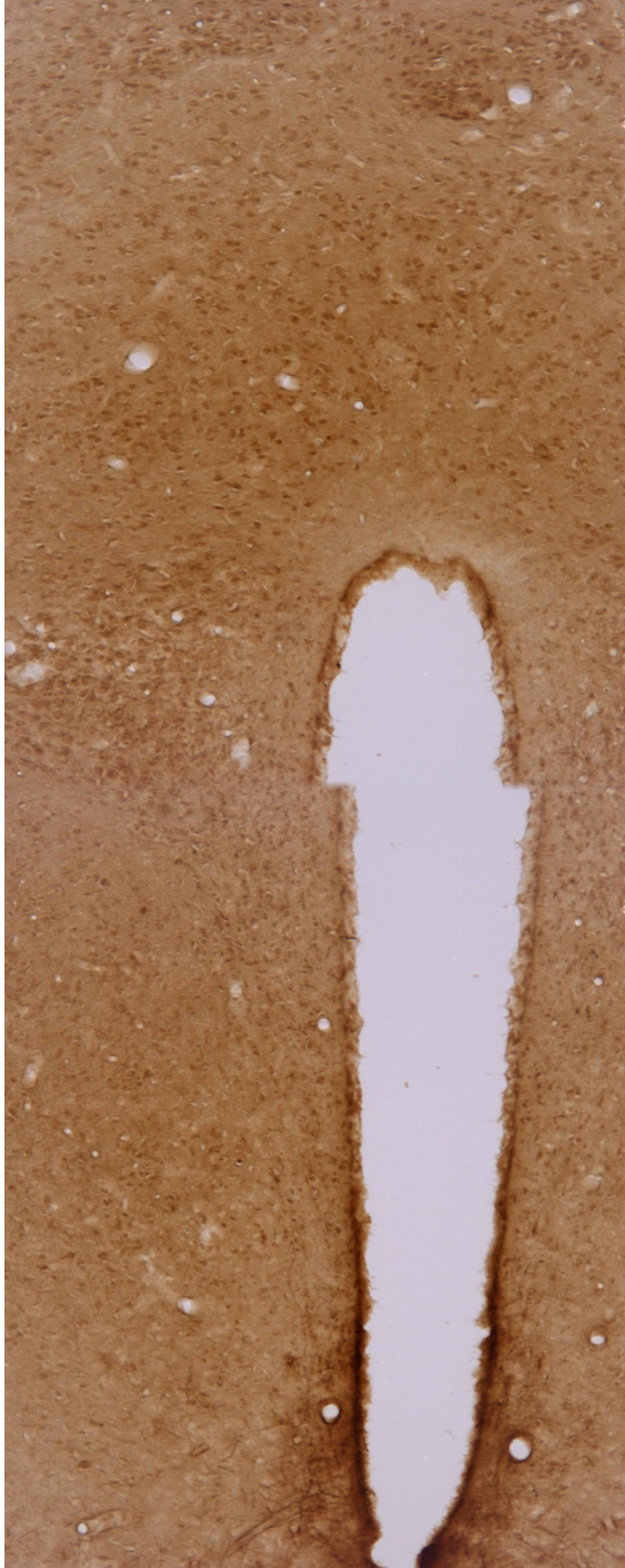
- DAB-reaktio 30, 60 ja 120 sekuntia
- Primäärisen vasta-aineen pitoisuus 5 µg/ ml



Kuva 1. Leptiinireseptori. DAB-reaktion pituus 30 sekuntia. Vertaa kuvaan 15a.



Kuva 2. Leptiniireseptori. DAB-reaktion pituus 60 sekuntia. Vertaa kuvaan 15b.



Kuva 3. Leptiinireseptori. DAB-reaktio 120 sekuntia. Vertaa kuvaan 15c.

LEPTIININ IMMUNOHISTOKEMIALLINEN KUVANTAMINEN (MONOKLONAALISELLA VASTA-AINEELLA) ROTAN KIINNITETYSTÄ AIVOKUDOSLEIKKEESTÄ (DAB-VÄRIREAKTIO)**Turvallisuus:**

Lue DAB:n (3', 3 -diaminobentsidiini tetrahydrokloridi) käyttöturvallisuustiedote.

Tarvikkeet:

- Ravistelija: nopeus 300 rpm
- 30 ml koepurkki
- 24-kuoppalevy
- Siveltimiä

Reagenssit:

- Metanoli
- 30 % vetyperoksidi
- Normaaliseerumi: Hevosen normaaliseerumi (Normal Horse Serum; Vector Laboratories, S-2000)
- Primäärinen vasta-aine: Vuohessa tuotettu vasta aine (IgG) hiiren leptiinille (goat-anti-mouse Leptin; R&D Systems, AF498). Kantaliuoksen pitoisuus 1,0 mg/ ml.
- Sekundäärinen vasta-aine: Biotinyloitu hevosesessa tuotettu vasta-aine (IgG) vuohen vasta-aineelle (IgG) (Biotinylated horse-anti-goat; Vector, BA-9500). Kantaliuoksen pitoisuus 1,5 mg/ ml.
- ABC-kitti (Vector Elite Kit, PK-6100)
- PBS (0,9 % NaCl fosfaattipuskurissa; Phosphate buffered saline)
- Triton X-100 (Sigma X-100; käyttöliuos 10% Triton X-100 PBS-liuoksessa)
- DAB (Sigma; 3', 3-diaminobentsidiini tetrahydrokloridi)
- Etanoli
- Ksyleeni (Xylen)
- Pertex-kiinnitysaine (Pertex mounting medium [Histolab, #00801])

Muuta huomioitavaa:

- Menetelmä kehitettiin kahdelle leikkeelle.
- Määritettävistä leikkeistä tulee tehdä primäärinen ja sekundäärinen kontrolli.
- Primäärinen kontrolli ei sisällä sekundääristä vasta-ainetta
- Sekundäärinen kontrolli ei sisällä primääristä vasta-ainetta
- Kontrolleiksi riittää yhdet leikkeet määritystä kohden. Kontrollileikkeet inkuboidaan muuten samoissa liuoksissa kuin varsinaiset leikkeet, mutta ilman vasta-aineita.
- Menetelmässä käytetään 30 ml:n purkkeja sekä 24-kuoppalevyä primäärisen vasta-aineen inkubaatioon. Käytettävän liuoksen tilavuus on viallissa 1 ml ja 24-kuoppalevyllä 300 µl.
- Inkuboinnit suoritetaan astiat suljettuina. Huuhtelut avonaisissa astioissa.
- Kaikki menetelmän liuokset valmistetaan PBS-liuokseen, koska se stabiloi vasta-aineita.
- Kaikki menetelmän kohdat suoritetaan ravistelijassa (300 rpm) lukuun ottamatta DAB-reaktiota, mikä suoritetaan vetokaapissa kädesä ravistellen.
- Leikkeiden siirtoon purkkien välillä käytetään siveltimiä.
- Määritys suoritetaan huoneenlämmössä (RT).

Menetelmän toteutus:

1. Jäätymisenestoaineesta otetut leikkeet tulee huudella 3 x 10 min PBS-liuoksessa säilytyspuskurin poistamiseksi.
 - Leikkeet siirretään PBS-liuosta sisältävän petri-maljan kautta vialleihin.
 2. Endogeenisten entsyymien sammutus: 10 % metanoli + 3 % vetyperoksidi PBS-liuoksessa.
 - Esim.: 1 ml: 100 µl MeOH, 100 µl 30 % H₂O₂, 800 µl PBS
 - H₂O₂ juuri ennen käyttöä
- Inkuboi 5 minuuttia ravistelijassa*
3. Huuhtele 3 x 10 min PBS-liuoksella.

4. Esi-inkubointi: 2 % Hevosen normaali seerumi (NHS) + 0,3 % Triton X-100 PBS-liuoksessa.

- Esim.: 1 ml: 20 µl NHS, 30 µl 10 % Triton X-100, 950 µl PBS

Inkuboi 1 tunti huoneenlämmössä

5. Primäärinen vasta-aine: AF498 1:200 (5 µg/ ml) + 2 % NHS + 0,3 % Triton X-100 PBS-liuoksessa.

- Esim.: 300 µl: 1,5 µl AF498, 300 µl esi-inkubointi-puskuria

- Laitetaan myös primääriin kontrolliin.

- Sekundääriseen kontrolliin laitetaan esi-inkubointi-puskuria.

Inkuboi 18 tuntia

6. Huuhtelee 3 x 10 minuuttia PBS-liuoksella.

7. Sekundäärinen vasta-aine: BA9500 1:200 (7,5 µg/ ml) + 0,3 % Triton X-100 PBS-liuoksessa.

- Esim.: 1 ml: 5 µl BA9500. 30 µl 10 % Triton X-100, 1 ml PBS

- Sekundäärisen vasta-aineen pitoisuudeksi laimennoksessa tulee 7,25 µg / ml, jos ei kompensoida.

- Laitetaan myös sekundääriseen kontrolliin.

- Primääriseen kontrolliin liuosta, jossa on 0,3 % Triton X-100 PBS:ssä.

Inkuboi 2 tuntia

8. ABC-liuoksen valmistus (Vector Elite Kit)

- Esim.: 5 ml: Lisää 1 tippa reagenssia A 5 ml:aan PBS-liuosta, sekoita. Lisää 1 tippa reagenssia B liuokseen ja sekoita uudelleen.

- Valmistettava 30 minuuttia ennen käyttöä

- Valmista liuos juuri ennen PBS-huuhtelua

9. Huuhtelee 3 x 10 min PBS-liuoksella.

10. ABC-reaktio (Vectoe Elite Kit, PK-6100)

Inkuboi 1 tunti ravistelijassa

11. Huuhtelee 3 x 10 min PBS-liuoksella.

12. DAB-reaktio

- DAB-kanta-liuos (5 g/ l H₂O MilliQ)
- Käyttöliuos (0,5 g/ l), 5 ml:
 - 500 µl DAB-kantaliuosta, 4,5 ml PBS, 5 µl 30 % H₂O₂
 - H₂O₂ juuri ennen käyttöä
- DAB-reaktion pituus 60 sekuntia
- Huuhtelee heti kahdesti PBS-liuosella (1,5 ml/vialli) ja siirrä PBS:a sisältäviin vialleihin
 - Leikkeitä voidaan säilyttää + 4 °C useita tunteja, mutta se ei ole suositeltavaa.

13. Leikkeiden siirto objektilaseille

- Kaada leikkeet purkeista PBS-liuosta sisältävälle petrimaljalle
 - 1 purkki kerrallaan
 - Käytä ohuita siveltimiä leikkeiden oikomiseen ja asettamiseen objektilasille
- Anna kuivua yön yli

14. Leikkeiden dehydratointi ja kiinnitys:

- Dehydratointi
 - MQ 1x 1 min
 - 70 % EtOH 1x 2 min
 - 96 % EtOH 2x 2 min
 - 99 % EtOH 2x 5 min
 - Ksyleeni 1x 5 min
- Kiinnitys Pertex mounting mediumilla (Histolab, #00801)
- Kiinnitys heti dehydratoinnin jälkeen
 - Kastele peitinlasi ksyleenissä ja paina se odjektilasin päälle, johon on lisätty tippa pertexiä.
 - Poista varovasti pinseteillä painellen mahdolliset ilmakuplat.
 - Anna kuivua muutamia vuorokausia.
- Muitakin ksyleeniä sisältäviä kiinnitysaineita voidaan käyttää.

LEPTIINIRESEPTORIN IMMUNOHISTOKEMIALLINEN KUVANTAMINEN (MONOKLO- NAALISELLA VASTA-AINEELLA) ROTAN KIINNITETYSTÄ AIVOKUDOSLEIKKEES- TÄ (DAB-VÄRIREAKTIO)

Turvallisuus:

Lue DAB:n (3', 3 -diaminobentsidiini tetrahydrokloridi) käyttöturvallisuustie-
dote.

Tarvikkeet:

- Ravistelija: nopeus 300 rpm
- 30 ml koepurkki
- 24-kuoppalevy
- Siveltimeä

Reagenssit:

- Metanoli
- 30 % vetyperoksidi
- Normaaliseerumi: Hevosien normaaliseerumi (Normal Horse Serum; Vector Laboratories, S-2000)
- Primäärinen vasta-aine: Vuohessa tuotettu vasta aine (IgG) hiiren leptiinireseptorille (goat-anti-mouse Leptin R; R&D Systems, AF497). Kantaliuoksen pitoisuus 1,0 mg/ ml.
- Sekundäärinen vasta-aine: Biotinyloitu hevosessa tuotettu vasta-aine (IgG) vuohen vasta-aineelle (IgG) (Biotinylated horse-anti-goat; Vector, BA-9500). Kantaliuoksen pitoisuus 1,5 mg/ ml.
- ABC-kitti (Vector Elite Kit, PK-6100)
- PBS (0,9 % NaCl fosfaattipuskurissa; Phosphate buffered saline)
- Triton X-100 (Sigma X-100; käyttöliuos 10% Triton X-100 PBS-liuoksessa)
- DAB (Sigma; 3', 3-diaminobentsidiini tetrahydrokloridi)
- Etanoli
- Ksyleeni (Xylen)
- Pertex-kiinnitysaine (Pertex mounting medium [Histolab, #00801])

Muuta huomioitavaa:

- Menetelmä kehitettiin kahdelle leikkeelle.
- Määritettävistä leikkeistä tulee tehdä primäärinen ja sekundäärinen kontrolli.
- Primäärinen kontrolli ei sisällä sekundääristä vasta-ainetta
- Sekundäärinen kontrolli ei sisällä primääristä vasta-ainetta
- Kontrolleiksi riittää yhdet leikkeet määritystä kohden. Kontrollileikkeet inkuboidaan muuten samoissa liuoksissa kuin varsinaiset leikkeet, mutta ilman vasta-aineita.
- Menetelmässä käytetään 30 ml:n purkkeja sekä 24-kuoppalevyä primäärisen vasta-aineen inkubaatioon. Käytettävän liuoksen tilavuus on viallissa 1 ml ja 24-kuoppalevyllä 300 µl.
- Inkuboinnit suoritetaan astiat suljettuina. Huuhtelut avonaisissa astioissa.
- Kaikki menetelmän liuokset valmistetaan PBS-liuokseen, koska se stabiloi vasta-aineita.
- Kaikki menetelmän kohdat suoritetaan ravistelijassa (300 rpm) lukuun ottamatta DAB-reaktiota, mikä suoritetaan vetokaapissa kädesä ravistellen.
- Leikkeiden siirtoon purkkien välillä käytetään siveltimiä.
- Määritys suoritetaan huoneenlämmössä (RT).

Menetelmän toteutus:

1. Jäätymisenestoaineesta otetut leikkeet tulee huudella 3 x 10 min PBS-liuoksessa säilytyspuskurin poistamiseksi.
 - Leikkeet siirretään PBS-liuosta sisältävän petri-maljan kautta vialleihin.
 2. Endogeenisten entsyymien sammutus: 10 % metanoli + 3 % vetyperoksidi PBS-liuoksessa.
 - Esim.: 1 ml: 100 µl MeOH, 100 µl 30 % H₂O₂, 800 µl PBS
 - H₂O₂ juuri ennen käyttöä
- Inkuboi 5 minuuttia ravistelijassa*
3. Huuhtele 3 x 10 min PBS-liuoksella.

4. Esi-inkubointi: 2 % Hevosen normaali seerumi (NHS) + 0,3 % Triton X-100 PBS-liuoksessa.

○ Esim.: 1 ml: 20 µl NHS, 30 µl 10 % Triton X-100, 950 µl PBS

Inkuboi 1 tunti huoneenlämmössä

5. Primäärinen vasta-aine: AF497 1:200 (5 µg/ ml) + 2 % NHS + 0,3 % Triton X-100 PBS-liuoksessa.

○ Esim.: 300 µl: 1,5 µl AF497, 300 µl esi-inkubointi-puskuria

○ Laitetaan myös primääriin kontrolliin.

○ Sekundääriseen kontrolliin laitetaan esi-inkubointi-puskuria.

Inkuboi 18 tuntia

6. Huuhtelee 3 x 10 minuuttia PBS-liuoksella.

7. Sekundäärinen vasta-aine: BA9500 1:200 (7,5 µg/ ml) + 0,3 % Triton X-100 PBS-liuoksessa.

○ Esim.: 1 ml: 5 µl BA9500. 30 µl 10 % Triton X-100, 1 ml PBS

- Sekundäärisen vasta-aineen pitoisuudeksi laimennoksessa tulee 7,25 µg / ml, jos ei kompensoida.

○ Laitetaan myös sekundääriseen kontrolliin.

○ Primääriseen kontrolliin liuosta, jossa on 0,3 % Triton X-100 PBS:ssä.

Inkuboi 2 tuntia

8. ABC-liuoksen valmistus (Vector Elite Kit)

○ Esim.: 5 ml: Lisää 1 tippa reagenssia A 5 ml:aan PBS-liuosta, sekoita. Lisää 1 tippa reagenssia B liuokseen ja sekoita uudelleen.

○ Valmistettava 30 minuuttia ennen käyttöä

○ Valmista liuos juuri ennen PBS-huuhtelua

9. Huuhtelee 3 x 10 min PBS-liuoksella.

10. ABC-reaktio (Vectoe Elite Kit, PK-6100)

Inkuboi 1 tunti ravistelijassa

11. Huuhtelee 3 x 10 min PBS-liuoksella.

12. DAB-reaktio

- DAB-kanta-liuos (5 g/ l H₂O MilliQ)
- Käyttöliuos (0,5 g/ l), 5 ml:
 - 500 µl DAB-kantaliuosta, 4,5 ml PBS, 5 µl 30 % H₂O₂
 - H₂O₂ juuri ennen käyttöä
- DAB-reaktion pituus 120 sekuntia
- Huuhtelee heti kahdesti PBS-liuosella (1,5 ml/vialli) ja siirrä PBS:a sisältäviin vialleihin
 - Leikkeitä voidaan säilyttää + 4 °C useita tunteja, mutta se ei ole suositeltavaa.

13. Leikkeiden siirto objektilaseille

- Kaada leikkeet purkeista PBS-liuosta sisältävälle petrimaljalle
 - 1 purkki kerrallaan
 - Käytä ohuita siveltimiä leikkeiden oikomiseen ja asettamiseen objektilasille
- Anna kuivua yön yli

14. Leikkeiden dehydratointi ja kiinnitys:

- Dehydratointi
 - MQ 1x 1 min
 - 70 % EtOH 1x 2 min
 - 96 % EtOH 2x 2 min
 - 99 % EtOH 2x 5 min
 - Ksyleeni 1x 5 min
- Kiinnitys Pertex mounting mediumilla (Histolab, #00801)
- Kiinnitys heti dehydratoinnin jälkeen
 - Kastele peitinlasi ksyleenissä ja paina se odjektilasin päälle, johon on lisätty tippa pertexiä.
 - Poista varovasti pinseteillä painellen mahdolliset ilmakuplat.
 - Anna kuivua muutamia vuorokausia.
- Muitakin ksyleeniä sisältäviä kiinnitysaineita voidaan käyttää.