

NEUROGENEESI AMYOTROFISESSA LATERAALISKLEROOSISSA

Samppa Kontro

Tutkielma

Lääketieteen koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

A.I.V.-instituutti

Joulukuu 2013

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma

KONTRO SAMPPA K.: Neurogeneesi amyotrofisessa lateraaliskleroosissa

Opinnäytetutkielma, 35 sivua, 2 liitettä (2 sivua)

Tutkielman ohjaajat: Professori Jari Koistinaho ja FT Eveliina Pollari

Joulukuu 2013

Asiasanat: Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS), neurogeneesi, doublecortin, nestin, IL-33

Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS) on parantumaton etenevä keskushermoston rappeumasairaus. Taudin syntymekanismi on toistaiseksi selvittämättä, mutta sen uskotaan johtuvan useiden perintö- ja ympäristötekijöiden yhteisvaikutuksesta. ALS:iin ei ole tällä hetkellä parantavia hoitoja saatavilla, ja keinot vaikuttaa taudin etenemiseenkin ovat rajalliset. Uusia lähestymistapoja hoitoon tarvitaan kipeästi. Monissa keskushermoston rappeumasairauksissa on havaittu hermosolujen uudismuodostusta, joka korjaa sairauden aiheuttamia vaurioita. Viitteitä neurogeneesistä on löydetty myös ALS:ssa, mutta tulokset ovat olleet ristiriitaisia

Tämän opinnäytetyön kirjallisessa osassa käsitellään amyotrofisen lateraaliskleroosin diagnostiikkaa, hoitoa ja patofysiologiaa. Lisäksi selvitetään tutkimustietoa neurogeneesin osalta Parkinsonin taudissa, Alzheimerin taudissa ja ALS:ssa.

Työn kokeellisessa osassa tutkittiin ALS:n hiirimallin avulla spontaania neurogeneesia sekä IL-33-lääkehoidon vaikutuksia neurogeneesin määrään selkäytimessä vertailemalla keskenään villityypin (WT) ja SOD1-mutaatiota kantavia hiiriä. Lisäksi katsottiin, onko IL-33-hoidolla vaikutusta neurogeneesiin kummassakaan ryhmässä. Neurogeneesin merkkiaineina käytettiin doublecortinia ja nestiniä.

Tulokset vahvistivat olettamusta, että selkäytimessä tapahtuu spontaania neurogeneesiä, mutta sairastuminen ALS:iin ei kuitenkaan näyttänyt lisäävän sitä. Myöskään IL-33-hoidolla ei näyttänyt olevan vaikutusta neurogeneesin määrään. Sukupuolien välisiä tilastollisesti merkitseviä eroja ei tullut ilmi. Jatkotutkimuksia tarvitaan IL-33-hoidon mahdollisuuksista vaikuttaa ALS:n kulkuun.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences

School of Medicine

Medicine

KONTRO SAMPPA: Neurogenesis in amyotrophic lateral sclerosis

Thesis, 35 pages, 2 appendixes (2 pages).

Supervisors: Jari Koistinaho, Professor, Eveliina Pollari, Dr.

December 2013

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), neurogenesis, doublecortin, nestin, IL-33

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable progressing degenerative disease of the central nervous system (CNS). Though both hereditary and environmental factors seem to have effect on ALS onset, the pathogenesis of the disease is still poorly understood. At the moment there is no cure for ALS and methods for delaying the symptoms are also limited. New perspectives of cure are urgently needed. The neurogenesis has been detected in number of degenerative CNS diseases and it is part of the process repairing damages in the CNS. There is also some evidence about neurogenesis in ALS but final arguments are absent.

The diagnostics, treatment and pathophysiology of ALS are discussed in the literature part of the thesis. Neurogenesis in Parkinson disease, Alzheimer's disease and ALS are also reviewed. Spontaneous and IL-33 induced neurogenesis in spinal cord in ALS mouse model was studied in experimental part of the thesis. The rate of neurogenesis in wild type mice and SOD1 mutated mice and IL-33 treated mice was compared. Nestin and doublecortin were used as markers of neurogenesis.

Spontaneous neurogenesis in spinal cord was confirmed by the study, though it was not increased in ALS mice. Neurogenesis was not increased by IL-33 treatment either. The difference between sexes in the rate of neurogenesis was not significant. More studies to solve potentiality and mechanism of IL-33 in treatment of ALS are still needed.

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO	6
2. AMYOTROFINEN LATERAALISKLEROOSI.....	8
2.1 Oireet.....	8
2.2 Esiintyvyys.....	9
2.3 Diagnostiikka	9
2.4 Hoito.....	9
2.5 Patofysiologia.....	10
2.6 ALS:n tautimallit.....	13
3. NEUROGENEESI ERÄISSÄ DEGENARATIIVISISSÄ AIVOSAIRAUKSISSA	14
3.1 Yleistä neurogeneesistä	14
3.2 ALS	14
3.2.1 Neurogeneesi.....	14
3.3 Alzheimerin tauti.....	15
3.3.1 Patofysiologia.....	15
3.3.2 Neurogeneesi.....	16
3.4 Parkinsonin tauti.....	16
3.4.1 Patofysiologia.....	16
3.4.2 Neurogeneesi.....	17
4. INTERLEUKIINI-33	18
5. TUTKIMUSOSIO.....	20
5.1 Tavoitteet.....	20
5.2 Aineisto ja menetelmät.....	20
5.2.1 Doublecortin-värjäys.....	21
5.2.2 Nestin-värjäys.....	22
5.2.3 Kuvaus ja tilastollinen analyysi.....	22
6. TULOKSET	23
7. POHDINTA	28
8. KIRJALLISUUS	31
LIITTEET	36

LYHENTEET

ALS	Amyotrofinen lateraaliskleroosi
APP	Amyloidiprekursoriproteiini
BDNF	Aivoperäinen hermokasvutekijä (Brain-derived neurotrophic factor)
DCX	Doublecortin
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
ELLA	Valtakunnallinen koe-eläinlautakunta
FALS	familiaalinen amyotrofinen lateraaliskleroosi
FUS	Fused in sarcoma
IL-33	Interleukiini-33
IL-1Racp	IL-1R avustava proteiini (IL-1R accessory protein)
MPTP	1-metyyli-4-fenyyli-1,2,3,6-tetrahydropyridiini
NGS	Normaali vuohen seerumi (Normal goat serum)
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (Phosphate buffered saline)
PBST	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos lisättynä tween20 (Phosphate buffered saline with tween20)
PFA	Paraformaldehydi
RNA	Ribonukleiinihappo
SALS	sporadinen amyotrofinen lateraaliskleroosi
SIGIRR	Ig IL-1R-liittyvä molekyyli (IL-1R-related molecule)
SOD1	Cu-Zn-superoksidi dismutaasi
TDP43	Tar DNA-binding protein
TGF	Muunteleva kasvutekijä (Transforming growth factor)
WT	Villityyppi

1. JOHDANTO

Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS) on etenevä vakava keskushermoston rappeumasairaus, jossa tahdonalaisten lihasten toiminta aluksi heikkenee ja myöhemmin loppuu kokonaan (Silani ym. 2011). ALS:n hoitoon ei ole käytettävissä nykyisin kuin yksi lääke, rilut-soli, joka ei paranna tautia, mutta jossain määrin hidastaa sen etenemistä (Sommer 2006). Tämän vuoksi uusia hoitokeinoja ALS:iin sairastuneille kaivataan kipeästi.

Aikaisemmin arveltiin, että kaikki hermosolut ovat muodostuneet sikiön kehityksen aikana ennen syntymää, eikä uusia enää aikuisiällä muodostu. Tämä väite on kuitenkin osoitettu vääräksi useaan kertaan eri tutkimuksissa (Abdipranoto ym. 2008). On myös havaittu, että erilaiset neurologiset sairaudet, kuten Parkinsonin tauti ja Alzheimerin tauti, lisäävät elimistön omaa spontaania neurogeneesiä (Abdipranoto ym. 2008, Winner ym. 2011). Elimistö yrittää korjata sairauksien keskushermostossa aiheuttamia tuhoja synnyttämällä uusia hermosoluja kuolleiden tilalle. Elimistön oman neurogeneesin kiihdyttäminen lääkeaineilla saattaisi tarjota uusia mahdollisuuksia hoitaa keskushermoston rappeumasairauksista kärsiviä potilaita.

Interleukiini-33 (IL-33) on sytokiini, jolla on yhteyksiä useisiin erilaisiin biologisiin toimintoihin (Christophi ym. 2012). IL-33:n on huomattu vaikuttavan eri tavalla erilaisissa kudoksissa. Tietyissä tilanteissa se näyttäisi olevan osana sairauksien patogeneesiä, kun taas toisaalla sillä voi olla sairaudelta suojaavia vaikutuksia (Schmitz ym. 2005). On havaittu, että ALS:a sairastavilla veren IL-33-pitoisuudet ovat alentuneet, mikä viittaisi sen puutteen olevan mukana tautiprosessissa (Lin ym. 2012).

Opinnäytetyössäni tarkastelen, lisääkö ALS:iin sairastuminen spontaania neurogeneesiä hiirten selkäytimissä verrattuna terveisiin hiiriin ja onko IL-33-hoidolla vaikutusta neurogeneesin määrään. Samalla selvitän, onko sukupuolien välillä eroa neurogeneesin määrässä ja lääkehoidon tehossa. Neurogeneesiä osoittamaan voidaan käyttää doublecortin- ja nestin-proteiineja, koska niitä tuottavat hermoston kantasolut sekä nuoret hermosolut (von Bohlen und Halbach 2011). Nestin on hyvä merkkiaine osoittamaan uusien hermosolujen syntymistä, koska sen ilmentyminen alkaa hävitä 11 vuorokautta solun syntymän jälkeen (von Bohlen und Halbach 2007). Solujen syntymän jälkeen erilaistumisvaiheessa nestinin

ilmentyminen loppuu. Solut alkavat pian tämän jälkeen tuottaa doublecortinia ja sen ilmentyminen jatkuu solujen kypsymisen ajan. Ajallisesti päällekkäistä esiintymistä merkkiaineilla ei ole (Couillard-Despres ym. 2005). Käyttämällä kahta merkkiainetta on mahdollista saada selville eri kehitysvaiheessa olevien hermosolujen esiintyminen. Tutkimus antaa uutta tietoa elimistön kyvystä korvata tuhoutuneita hermosoluja ALS:iin sairastuneilla ja mahdollisesti IL-33-hoidon vaikutusmekanismista ja mahdollisuuksista sairauden hoidossa.

2. AMYOTROFINEN LATERAALISKLEROOSI

2.1 Oireet

Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS) on harvinainen neurologinen sairaus, joka ilmenee liikehermojen eli lihaksia hermottavien hermosolujen tuhoutumisena aivokuoren, aivorungon ja selkäytimen alueella (Kiernan ym. 2011). Liikehermosolujen rappeutuminen ilmenee tautiin sairastuneella tahdonalaisten lihasten heikkenemisenä ja halvaantumisenä, mikä johtaa lopulta kuolemaan yleensä 1–5 vuoden kuluttua diagnoosista (Carlesi ym. 2011, Kiernan ym. 2011, Silani ym. 2011).

Sairauden ensimmäinen oire on usein perifeeristen ylä- tai alaraajali hasten heikkous (Silani ym. 2011). Monet potilaat saattavat tuntea heikkouden lisäksi myös lihasnykäyksiä (faskikulaatiota) tai kramppeja raajojen lihaksissa. Faskikulaatiota voi esiintyä raajojen lisäksi myös kielessä (Somer 2006). Liikehermosolujen toiminnan lakkaaminen johtaa kohdesolun kuolemaan, mistä seuraa tahdonalaisten lihasten surkastuminen kyseisen liikehermosolun hermotusalueella (Silani ym. 2011). Solujen kuolema ilmenee lihasten atrofiana eli lihasmassan vähenemisenä, joka saattaa näkyä jo ennen kuin varsinainen lihasheikkous tulee ilmi. Varsinkin kämmenten pienten lihasten kato on tyypillistä taudille (Somer 2006). Osalla potilaista tauti alkaa niin sanotuilla bulbaarioireilla, joita ovat kaulan ja kurkun alueen lihaksiston oireet, kuten nielemisvaikeudet ja puheen tuoton ongelmat. Myöhemmin nielemisvaikeudet johtavat syljen valumiseen suusta lähes kaikilla potilailla (Somer 2006). Raajojen lihasoireet ilmenevät näillä potilailla joko samaan aikaan tai viimeistään 1–2 vuoden kuluttua bulbaarioireiden alkamisesta (Silani ym. 2011). Bulbaarioireilla alkava ALS etenee yleensä nopeammin kuin taudin perifeerisillä lihasoireilla alkava muoto (Somer 2006). Alle viidellä prosentilla potilaista tauti alkaa suoraan hengitysongelmilla ilman bulbaari- tai raajaoireita. Taudin edetessä hengityksen vajaatoimintaa esiintyy kaikissa tautimuodoissa, ja se on yleensä yhdessä muiden sydän- ja keuhkokomplikaatioiden kanssa ALS-potilaiden välitön kuolinsyy (Somer 2006, Silani ym. 2011).

2.2 Esiintyvyys

Suomessa amyotrofiseen lateraaliskleroosiin sairastuu vuosittain noin 150 henkilöä (Laaksovirta 2007). Sairauden esiintyvyys Suomessa on korkeimpia maailmassa, minkä arvelaan johtuvan suomalaisen geeniperimän homogeenisyydestä (Laaksovirta ym. 2010). Suomessa esiintyvyys on jopa kaksinkertainen muihin länsimaihin verrattuna (Cronin ym. 2007, Laaksovirta ym. 2010). Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa ALS:n ilmaantuvuus on noin 5/100 000 (Silani ym. 2011). Eri tutkimuksissa on kuitenkin paljon vaihtelua ja ilmaantuvuudeksi on saatu vaihtelevia lukuja välillä 2–16/100 000 (Kiernan ym. 2011). Sairaudesta on jonkin verran yleisempi miehillä kuin naisilla (McCombe ja Henderson 2010). Useissa tutkimuksissa on kuitenkin huomattu, että ero sukupuolten välillä ei ole kovin suuri (Logroscino ym. 2008). Nuorena sairastuneista miesten osuus näyttäisi kuitenkin olevan suurempi (McCombe ja Henderson 2010). Myös taudinkuva vaihtelee sukupuolen mukaan siten, että naisilla tauti alkaa useammin bulbaarioireilla, kun taas miehillä ensioireena on yleensä perifeerinen lihasheikkous.

2.3 Diagnostiikka

ALS:n diagnostiikassa on oltava hyvin huolellinen, koska diagnoosin saaminen poikkeuksetta järkyttää sekä potilasta että hänen omaisiaan (Kiernan ym. 2011). ALS:n diagnostiikka perustuu sekä kliiniseen että EMG-tutkimukseen, joissa saadaan usein merkkejä faskikulaatiosta ja muista lihasongelmista (Somer 2006). Raajaongelmien erotusdiagnostiikassa on tärkeää poissulkea muut lihasheikkoutta aiheuttavat sairaudet, kuten polymyosiitti. Tämän lisäksi on erotettava muut liikehermosolujen sairaudet, kuten spinaalatrofiat. Bulbaarioirein alkavassa ALS:ssa tulee erotusdiagnostiikassa huomioida muut aivorunkoperäisiä oireita aiheuttavat sairaudet, joita voivat olla aivoverenkiertohäiriöt, kasvaimet sekä selkädintä painavat prosessit (Somer 2006).

2.4 Hoito

ALS:n hoitoon on saatavilla vain yksi lääke, rilutsoli (Rilutek®) (Somer 2006). Rilutsoli pidentää potilaiden elinaikaa keskimäärin vain noin kolme kuukautta, mutta se ei vaikuta taudin oireisiin. ALS:n hoidossa onkin keskityttävä muihin tukitoimiin, joita ovat fysio-

rapia, lihasjäykkyyden lievittäminen oireenmukaisilla lääkkeillä, kuten titaanidiinillä tai baklofeenillä, sekä hengitys-, ravitsemus- ja puheongelmien hoito. Fysioterapia keskittyy lihasten voimien ylläpitoon ja harjoitteluun, jolla estetään nivelten jäykistymistä. Ravitsemusongelmien hoito käsittää nielemisvaikeuksista kärsivän potilaan ravinnon saannin turvaamisen esimerkiksi mahalaukkuavanteen avulla. Alkuvaiheessa nielemistä voidaan myös helpottaa ruoan koostumukseen vaikuttamalla. Runsasta syljen eritystä voidaan vähentää lääkehoidolla, esimerkiksi käyttämällä skopolamiinia ja amitriptyliiniä. Tarvittaessa suuta ja nielua voidaan tyhjentää mekaanisesti imun avulla (Laaksovirta 2008). Puhevaikeuksia hoidetaan apuvälineillä puheterapeutin ohjeiden perusteella.

Potilaan kokemia hengitysvaikeuksia voidaan helpottaa ajoittaisen nenäventilaation avulla (Sommer 2006). Myöhemmässä vaiheessa, kun nenäventilaatio ei enää riitä, voidaan käyttää apuna hengityskonetta, jonka pitkäaikaisesta käytöstä pitää keskustella potilaan ja omaisten kanssa (Laaksovirta 2008). Toiveet hengityskoneen käytöstä on kirjattava selkeästi potilaan tietoihin. Hyvän palliatiivisen eli oireenmukaisen hoidon saatavuudella on suuri merkitys potilaan elämän laatuun (Bede ym. 2011). Viimeistään hengitysongelmien alkaessa on potilaan kanssa aiheellista keskustella hoidon terminaalivaiheen toivomuksista, jotka on syytä kirjata sairaskertomukseen (Sommer 2006). Palliatiivinen hoito tulisi toteuttaa kiinteässä yhteistyössä erikoissairaanhoidon ja perusterveydenhuollon kanssa (Bede ym. 2011). Potilaiden ja omaisten tulisi olla varhaisessa vaiheessa yhteydessä yksikköön, jossa on erikoistuttu palliatiiviseen hoitoon ja jossa on mahdollisuudet antaa asianmukaista hoitoa terminaalivaiheessa.

2.5 Patofysiologia

Tarkkaa tietoa ALS:n perussyystä ei ole, mutta syiden uskotaan olevan monitekijäiset (Kiernan ym. 2011). Arvellaan, että mukana vaikuttamassa on useita sekä geneettisten että molekylaaristen polkujen interaktioita. Solutasolla mekanismeja on yhdistetty muun muassa mitokondrioiden toiminnan häiriöihin, solujen oksidatiiviseen stressiin, eksitoksisuuteen, mutaatioiden seurauksena erilaisten proteiinien toiminnan ongelmiin ja toksisuuteen sekä deoksiribonukleiinihapon (DNA) ja ribonukleiinihapon (RNA) poikkeavaan aineenvaihduntaan (Bento-Abreu ym. 2010, Deng ym. 2011, Naganska ja Matyja 2011). Mitokondrioiden kautta tapahtuva hermosolujen kuolema on liitetty SOD1-proteiinin mutaati-

oiden vaikutuksiin niiden aineenvaihdunnassa (Federico ym. 2012). Tämän on katsottu johtavan kalsiumaineenvaihdunnan häiriöihin ja lopulta apoptoosiin. Mitokondrioihin on liitetty myös Tar DNA-binding protein (TDP43) ja Fused in sarcoma proteiinien (FUS) mutaatiot (Bento-Abreu ym. 2010). SOD1-proteiinia käsitellään tarkemmin myöhemmin tässä kappaleessa familiaalisen amyotrofisen lateraaliskleroosin (FALS) patofysiologian yhteydessä. Eksitoksisuus liittyy keskushermoston välittäjäaineen glutamaatin aineenvaihdunnan häiriöihin hermosolujen vietinvälityksessä (Bento-Abreu ym. 2010). Glutamaatin liiallinen määrä tai hermosolun liiallinen herkkyys glutamaatille voi johtaa hermosolun kuolemaan. Liikehermosolut ovat erityisen herkkiä tälle ilmiölle. Hermokudoksen muiden solujen, kuten astrozyttien ja mikroglia-solujen, osuuteen taudissa on myös kiinnitetty huomiota (Raibon ym. 2008). Varsinkin mikroglia-soluilla näyttäisi olevan osuutta taudin kulkuun. Mikroglia-solut vastaavat keskushermoston immuunipuolustuksesta ja niiden määrän on huomattu lisääntyvän jo paljon aikaisemmin kuin ALS:n oireet ilmaantuvat (Alexianu ym. 2001). Mikroglia-solujen aktivaatio näyttäisi muuttavan muiden hermotukisolujen, kuten astrozyttien ja oligodentrosyyttien, toimintaa ja sekoittavan niiden ja hermosolujen välisen viestinnän, mikä johtaa hermosolujen tuhoutumiseen (Raibon ym. 2008). Yksityiskohtaiset mekanismit tapahtumasarjassa eivät kuitenkaan ole vielä tiedossa, mutta esimerkiksi glutamaatilla, erilaisilla kasvutekijöillä ja sytokiineillä on osuutta asiaan.

ALS esiintyy satunnaisena eli sporadisena (SALS) muotona, jota on noin 90 prosenttia kaikista ALS-tapauksista sekä perinnöllisenä eli familiaalisena (FALS) muotona (Laaksovirta 2007, Kiernan ym. 2011). Familiaaliseksi muodoksi ALS on perinteisesti luokiteltu silloin, kun sairastuneella on todettavissa sairastunut verisukulainen (Laaksovirta 2007). Kliiniseltä kavaltaan ja hoidon toteutuksen osalta sporadinen ja familiaalinen muoto eivät eroa toisistaan (Laaksovirta 2007). Tutkimuksessa keskitytään FALS:n patofysiologian selvittämiseen, koska ajatellaan, että patofysiologia on samanlainen sekä familiaalisessa että sporadisessa muodossa (Bento-Abreu ym. 2010).

Sporadisen muodon aiheuttajia on tutkittu, mutta tulokset ovat olleet melko heikot (Bento-Abreu ym. 2010). Altistaviksi tekijöiksi on epäilty ympäristömyrkyjä, kuten β -N-metyyliamino-l-alaniinia. Myös muutamia muita yhdistäviä tekijöitä on löydetty, mutta ne eivät ole vahvistuneet myöhemmissä tutkimuksissa. On hyvin mahdollista, että sporadisen muodon taustalla on erilaisia geenivirheitä, jotka lopulta saavat taudin puhkeamaan.

TDP43 ja FUS ovat RNA:a sitovia proteiineja, joiden mutaatiot on liitetty sporadisen ALS:n puhkeamiseen (Naganska ja Matyja 2011). Aihe vaatii kuitenkin vielä jatkotutkimuksia.

ALS:iin on yhdistetty useita geenimutaatioita vuosien varrella (Van Den Bosch 2011). Tärkeimpänä voidaan pitää mutaatioita kromosomissa 21 sijaitsevassa Cu, Zn-superoksidi dismutaasi (SOD1) -geenissä. Noin kahdessa prosentissa ALS-tapauksista löytyy kyseisiä mutaatioita. Tämän merkittävän yhteyden osoitti Rosen kumppaneineen (1993). SOD1-proteiinin tehtävä solussa on neutralisoida solun normaaleja aineenvaihduntatuotteita, kuten erilaisia vapaita radikaaleja (Bento-Abreu ym. 2010, Naganska ja Matyja 2011). Erilaisia SOD1-mutaatioita tunnetaan nykyisin toista sataa (Naganska ja Matyja 2011). Useiden tutkimusten mukaan ALS:a ei aiheuta SOD1-proteiinin puutos vaan luultavasti se saa mutaation yhteydessä toksisia entsyymaattisia ominaisuuksia. Tutkimuksia on tehty SOD1-poistogeenisillä hiirillä, jotka ovat toistuvasti olleet terveitä, mikä puhuu vahvasti toksisuusteorian puolesta (Turner ja Talbot 2008). Toksisuuden tarkkaa mekanismia ei kuitenkaan vielä tiedetä (Naganska ja Matyja 2011). Muita harvinaisempia sairaudelle altistavia mutaatioita esiintyy geneissä, jotka koodaavat alsinia (ALS2), senataksiinia (ALS4), spataksiinia (ALS5), vesikkeliin kytkettyä kalvoproteiini B:tä (VAPB, ALS8), angiogeeniinia (ALS9) tai optineuriinia (ALS12) (Van Den Bosch 2011). TDP43 ja FUS on myös vahvasti liitetty FALS:n patogeneesiin (Ito ja Suzuki 2011). Melko uutena merkittävä löydöksenä voidaan pitää C9orf72-geeniin liittyviä havaintoja (Turner ym. 2013). Kyseiseen geeniin liittyvien yhteyksien löytymisen toivotaan avaavan uusia mahdollisuuksia tutkia ALS:n patofysiologiaa. C9orf72-geeni näyttäisi yhdistävän ALS:n ja otsaohimolohkodementian yhteisen tekijään TDP43:n kautta. TDP43:n osalta tunnetaan lähes 30 erilaista mutaatiota, jotka liittyvät ALS:iin, Alzheimerin tautiin ja otsaohimolohkodementiaan (Huey ym. 2012). Tämä yhteys osoittaa sairauksien olevan merkittävästi linkittyneitä toisiinsa. Lisäksi on useita muita genejä, jotka on liitetty ALS:iin. Monissa tapauksissa ei kuitenkaan ole varmaa, liittyvätkö kyseiset variaatiot tai mutaatiot merkittävästi sairauden puhkeamiseen (Ito ja Suzuki 2011).

2.6 ALS:n tautimallit

Taudeille altistavia geneettisiä tekijöitä on tunnistettu ja paikannettu useissa erilaisissa keskushermoston rappeumasairauksissa (Harvey ym. 2011). Esimerkiksi Alzheimerin taudissa, Parkinsonin taudissa ja ALS:ssa tämä on mahdollistanut eläinmallien kehittämisen sairauksien syntymekanismien ja hoitokeinojen tutkimista varten. ALS:ssa yleisesti käytössä oleva eläinmalli on siirtogeeniset SOD1-hiiret, jotka yli-ilmentävät ihmisessä esiintyvää mutatoitunutta SOD1-geeniä (Van Den Bosch 2011). Siirtogeenisillä hiirillä ilmenee lihasheikkoutta ja halvaantumista, mikä johtaa lopulta eläimen kuolemaan mallintaen sairauden kulkua ihmispotilaissa. Alkuperäisen mutantin G93A:n lisäksi on kehitetty useita muita mutaatiomalleja, joita ovat esimerkiksi G37R, G85R ja D90A. Uusilla malleilla on samanlaiset ominaisuudet kuin alkuperäisellä G93A-mutantilla. Yhteensä oirekuviltaan lähes identtisiä hiirilinjoja on ainakin 13 erilaista (Harvey ym. 2011, Van Den Bosch 2011). Siirtogeenisiä hiirimalleja on kehitetty myös muiden mutaatioiden, kuten ALS6:n ja ALS10:n, tutkimiseksi (Van Den Bosch 2011). Toisena eläinmallina on käytetty SOD1-siirtogeenisiä rottia. Rotat eroavat hiiristä taudinkuvassa siten, että sairauden eteneminen on niissä paljon nopeampaa. Myös seeprakalamallit vaikuttavat lupaavilta (Kabashi ym. 2011).

3. NEUROGENEESI ERÄISSÄ DEGENARATIIVISISSÄ AIVOSAIRAUKSISSA

3.1 Yleistä neurogeneesistä

Neurogeneesillä tarkoitetaan uusien hermosolujen muodostumista olemassa olevista kantasoluista (Abdipranoto ym. 2008). Neurogeneesiin kuuluu useita vaiheita, kuten jakautuminen, erilaistuminen, kypsyminen, vaellus ja lopulta liittyminen osaksi toiminnallista hermokudosta (Faigle ja Song 2013). Havainnot hermoston neurogeneesistä aikuisilla ovat antaneet viitteitä elimistön kyvystä korjata keskushermostoon syntyneitä vaurioita (Abdipranoto ym. 2008). Neurogeneesin määrä aivoissa on rajoittunut, ja se näyttää keskittyneen aivojen supraventrikulaariselle sekä hippokampuksen gyrus dentatuksen alueelle (O'Keefe ym. 2009, Enciu ym. 2011). Selkäytimessä uusia hermosoluja on havaittu varsinkin keskuskanavan ympärillä (Chi ym. 2006). Molemmissa aivojen osissa uusien hermosolujen muodostuminen näyttää liittyvän hyvin samanlaisiin mekanismeihin ja kasvutekijöihin, vaikka eri alueiden solujen alatyypit ja toiminnat vaihtelevatkin (Faigle ja Song 2013). Neurogeneesillä vaikuttaa olevan suuri merkitys vanhenemisen aiheuttamissa keskushermoston rappeumasairauksissa, kuten Parkinsonin taudissa ja Alzheimerin taudissa (Winner ym. 2011). Neurogeneesiä voidaan havainnoida erilaisten nuorten hermosolujen ja niiden kantasolujen tuottamien aineiden avulla (von Bohlen und Halbach 2011). Eri proteiinien tuotanto rajoittuu tarkasti määrättyyn ikään solun elinkaaressa, eikä niitä tuoteta solun kypsymisen jälkeen. Kyseisten aineiden osoittaminen keskushermostossa vasta-aineiden avulla voidaan tulkita uusien hermosolujen muodostumiseksi (von Bohlen und Halbach 2007).

3.2 ALS

3.2.1 Neurogeneesi

ALS-tautimallina käytetyissä hiirissä, jotka yli-ilmentävät mutatoitunutta SOD1-geeniä, on todettu tapahtuvan neurogeneesiä (Thompson ym. 2008). Kuitenkin eri tutkimuksissa on saatu vaihtelevia tuloksia siitä, onko neurogeneesi lisääntynyt merkittävästi ALS-hiirissä

verrattuna villityypin (WT)-hiiriin. Liun ja Martinin (2006) tutkimuksessa ei löydetty merkitsevää eroa neurogeneesin määrässä SOD1-hiirten ja WT-hiirten välillä lumbaarisen selkäytimen, motorisen ja sensorisen aivokuoren, hajukäämin tai gyrus dentatuksen alueilla. Toisaalta Lee ja kumppanit (2011) osoittivat nestin-värjäyksellä selvän lisääntymisen hermoston kantasolujen määrässä lumbaalisen selkäytimen alueella SOD1-hiirillä verrattuna WT-hiiriin. Myös Chi ja kumppanit (2006) saivat samansuuntaisia tuloksia nestin-värjäyksissä. Heidän tutkimuksissaan kantasolujen jakaantuminen lisääntyi hermosoludegeneraation seurauksena selkäytimen keskuskanavan ympärillä. Degeneraatio lisäsi myös kantasolujen vaellusta muualle selkäyttimeen. Tulokset antavat viitteitä siitä, että elimistö yrittää korjata hermoston solujen tuhoutumista lisäämällä uusien hermosolujen tuotantoa. Tämä antaisi mahdollisuuden kehittää hoitoja, jotka tehostavat neurogeneesiä keskushermoston rappeumasairauksissa.

3.3 Alzheimerin tauti

3.3.1 Patofysiologia

Alzheimerin tauti on yleisin yksittäinen sairaus, joka johtaa dementiaan, ja lisäksi Alzheimerin taudilla katsotaan olevan osuutta Lewyn kappale -taudissa ja aivohalvauksen jälkeisessä dementiaassa (Erkinjuntti ym. 2006). Alzheimerin tauti johtuu aivojen hermosolukadosta, joka aiheuttaa dementialle tyypilliset oireet (Salawu ym. 2011). Tyypillisesti hermosolut ovat vähentyneet sisemmässä ohimolohkossa (entorinaalisessa kuorikerroksessa ja hippokampuksessa) sekä etuaivoalueelta kuorikerrokselle johtavissa ratayhteyksissä (Erkinjuntti ym. 2006). Vaurioiden aiheuttamia häiriöitä tapahtuu useissa hermovälittäjäainejärjestelmissä, mutta suurin merkitys lienee kuitenkin asetyylikoliinilla (Erkinjuntti ym. 2006, Salawu ym. 2011). Taudille on myös tyypillistä amyloidiplakit aivoissa, amyloidin kertyminen aivoverisuonten seinämään sekä hermosäievyhdet, joissa tau-proteiinit ovat hyperfosforyloituneet (Erkinjuntti ym. 2006, Zhao ja Ratka 2011). Nykyisin Alzheimerin taudin perimmäisenä syynä pidetään juuri amyloidiplakkien kertymistä, jonka aiheuttaa amyloidiprekursoriproteiinin (APP) poikkeuksellinen pilkkoutuminen (Zhao ja Ratka 2011). Muita prosessiin vaikuttavia tekijöitä ovat oksidatiivinen stressi ja vapaat radikaalit, mitokondrioiden toimintahäiriöt, tulehdusreaktiot, geneettiset tekijät, ympäristö-

tekijät ja apoptoosi. Nämä edellä mainitut syyt yhdessä johtavat hermosolujen toimintahäiriöihin ja lopulta niiden tuhoutumiseen

3.3.2 Neurogeneesi

Alzheimerin taudissa on eläinmallien avulla osoitettu tapahtuvan muutoksia neurogeneesin määrässä sairastuneilla eläimillä (Winner ym. 2011). Tulokset ovat kuitenkin vaihdelleet tutkittaessa erilaisia geenimutaatioita kantavia eläimiä (Enciu ym. 2011). Tutkimuksissa on osoitettu sekä lisääntynyttä että vähentyneitä neurogeneesia koe-eläinten keskushermostossa (Winner ym. 2011). Ihmisillä tehdyissä tutkimuksissa aivoista on löydetty lisääntyneitä määriä nuorten hermosolujen ilmentämiä merkkiaineita, kuten doublecortinia (Enciu ym. 2011). Merkkiaineiden yhteys lisääntyneeseen neurogeneesiin on kuitenkin kyseenalaistettu, koska niiden spesifisyyttä Alzheimerin tautiin ei ole pystytty varmentamaan (Lazarov ja Marr 2010). Viimeaikaisissa tutkimuksissa onkin havaittu selkeää neurogeneesin määrän väheneminen keskushermostossa Alzheimerin taudin eläinmalleissa (He ym. 2013). Alzheimerin taudille tyypillisten amyloidiplakkien on osoitettu selvästi olevan yhteydessä vähentyneeseen neurogeneesiin sairastuneilla hiirillä (Hamilton ja Holscher 2012). Tällä hetkellä ajatellaankin, että sairaudelle on tyypillistä neurogeneesin väheneminen keskushermostossa. Useilla Alzheimerin taudin patogeneesissä mukana olevilla tekijöillä on myös yhteys neurogeneesin säätelyyn (Lazarov ja Marr 2010). Tärkeimpinä voidaan mainita APP ja sen metaboliitit, jotka ovat merkittävästi mukana vaikuttamassa hermoston kantasolujen jakaantumiseen ja erilaistumiseen.

3.4 Parkinsonin tauti

3.4.1 Patofysiologia

Parkinsonin taudin syntymekanismi on vielä epäselvä (Kaakkola ja Marttila 2006, Lindsay ym. 2010). Parkinsonin tautia esiintyy jonkin verran suvuittain ja muutamia sairauteen liittyviä geenimutaatioita on pystytty tunnistamaan (Lindsay ym. 2010). Geenimutaatiot kuitenkin selittävät vain pienen osan Parkinsonin taudin tapauksista (Kaakkola ja Marttila 2006). Lisäksi tiedetään, että MPTP (1-metyyli-4-4fenyyli-1,2,3,6-tetrahydropyridiini)

aiheuttaa Parkinsonin taudille tyypillisiä oireita sekä ihmisille että eläimille. Parkinsonin taudin perimmäisenä syynä pidetään aivojen substantia nigra eli mustatumakkeiden ja niistä lähtevien striatumiin eli aivojuovioon johtavien nigrostriataalisten ratojen neuronien vähitellen tapahtuvaa tuhoutumista. Arvellaan, että tauti oirehtii ensimmäisen kerran, kun striatumin dopamiinipitoisuus on laskenut 60–80 prosenttia alkuperäisestä tasosta. Jäljelle jääneissä hermosoluissa mustatumakkeen alueella havaitaan usein Lewyn kappaleita (Lindsay ym. 2010). Tämä ei kuitenkaan ole spesifinen löydös Parkinson taudille, vaan sitä esiintyy myös Lewyn kappale -dementiassa. Huomattavaa on, että dementiassa Lewyn kappaleita esiintyy mustatumakkeiden lisäksi isoivokuoren alueella toisin kuin Parkinsonin taudissa (Kaakkola ja Marttila 2006).

3.4.2 Neurogeneesi

Parkinsonin taudissa on ajateltu, että substantia nigra alueella olisi hermoston kantasoluja, jotka toimisivat lähteenä neurogeneesille (Abdipranoto ym. 2008). Tietyissä malleissa on osoitettu, että vauriot mustatumakkeen alueella kiihdyttäisivät kantasolujen jakautumista ja erilaistumista dopamiinia tuottaviksi hermosoluiksi. Havainnot ovat kuitenkin toistaiseksi kiistanalaisia. Toisissa tutkimuksissa on myös saatu viitteitä solujen jakautumisen kiihtymisestä, mutta ei kuitenkaan erilaistumisesta dopaminergisiksi soluiksi. Solujen neurogeneesiin vaikuttamista pidetään lupaavana kohteena tutkittaessa uusia hoitomahdollisuuksia Parkinsonin taudissa (O’Keefe ym. 2009). Parkinsonin taudin eläinmalleissa on osoitettu, että neurogeneesiä voidaan stimuloida hermoston kantasolujen jakautumista ja erilaistumista kiihdyttävillä hoidoilla (Abdipranoto ym. 2008). Muutoksia on saatu aikaan erilaisilla kasvutekijöillä, joita ovat esimerkiksi muunteleva kasvutekijä (TGF) ja aivoperäinen hermokasvutekijä (BDNF) (Geraerts ym. 2007). Samanlaisia vaikutuksia on havaittu myös joillain dopamiinireseptoriagonisteilla.

4. INTERLEUKIINI-33

Inteleukiini-33 (IL-33) on IL-1-sytokiini-perheen äskettäin löydetty jäsen, joka kuvattiin ensimmäisen kerran vuonna 2005 (Schmitz ym. 2005, Kurowska-Stolarska ym. 2011). Myöhemmin IL-33 on liitetty useisiin erilaisiin biologisiin toimintoihin (Christophi ym. 2012). Se toimii sekä sytokiininä että tumassa transkription säätelijänä sitoutuessaan DNA-molekyylisiin (Kurowska-Stolarska ym. 2011). IL-33:a esiintyy useissa eri kudoksissa, joissa se voi vaikuttaa eri tavoin (Schmitz ym. 2005). Suuria pitoisuuksia IL-33:n lähetti-RNA:a löytyy mahasta, keuhkoista, selkäytimestä, aivoista ja iholta, kun taas pernassa, haimassa munuaisessa ja sydämessä pitoisuudet ovat selvästi pienempiä. IL-33:n vapautuminen kudoksiin näyttäisi kuitenkin liittyvän useimmiten solutuhoon, eikä niinkään aktiivisen eritykseen (Kurowska-Stolarska ym. 2011). IL-33:a pidetäänkin immuunisysteemin hälyttäjänä, jos solutuhua ilmenee esimerkiksi trauman tai infektion seurauksena. Vaikutukset sytokiininä IL-33 saa aikaan pääosin sitoutumalla ST2-reseptorikompleksiin (Han ym. 2011). ST2-reseptori sijaitsee solukalvolla ja muodostaa kompleksin joko IL-1R-avustajaproteiinin (IL-1Racp) kanssa tai Ig IL-1R-liityvän molekyylin (SIGIRR) kanssa. ST2-reseptorista on myös liukoinen muoto sST2, joka sitoo IL-33:n solukalvon ulkopuolella ja toimii negatiivisena säätelijänä. ST2-SIGIRR-kompleksi näyttäisi toimivan myös IL-33:n negatiivisena säätelijänä, kun taas IL-1Racp:n kanssa muodostettu kompleksi vaikuttaa signaaliketjun välityksellä. Signaalipolku etenee Toll/IL-1-reseptorin kautta, mikä johtaa useiden erilaisten proteiinikinaasien aktivaatioihin. Toll/IL-1-reseptori on yhteinen joidenkin muidenkin IL-1-perheen jäsenten kanssa.

Proteiinikinaasien toiminta eri kudoksissa voi olla erilainen. Myös IL-33:lla vaikuttaisi olevan erilaisia merkityksiä eri tautitiloissa. Keskushermostossa IL-33:n pääasialliset kohdesolut voisivat olla astrosyytit ja mikroglia-solut (Yasuoka ym. 2011). Tähän viittaa se, että hermosoluissa ei ole havaittu olevan ST2-reseptoria, vaan pelkkä IL-1Racp (Yasuoka ym. 2011, Andre ym. 2005). IL-33 vaikuttaa mikroglia-soluihin kiihdyttämällä niiden jakautumista (Yasuoka ym. 2011). Keskushermostossa MS-taudin, hypoksian ja verisuonivaurioiden eläinmalleissa IL-33 näyttäisi lisäävän vauriota ja olevan osana patogeneesiä (Christophi ym. 2012, Han ym. 2011). Kuitenkin toisaalta on huomattu, että IL-33 aktivoi mikroglia-soluja ja säätelee niiden fagosytoosia. Mikroglia fagosytoivat β -amyloidia, joten Alzheimerin taudissa IL-33:lla voisi olla hermostoa suojaava vaikutus (Han ym. 2011).

Keskushermoston ulkopuolella suojaavia ja myönteisiä vaikutuksia on havaittu sydämessä tapahtuvissa prosesseissa, sepsiksessä, rasvakudoksessa ja kudoksissa, joissa tulehdusreaktio on aktivoitunut (Kurowska-Stolarska ym. 2011). Myös keskushermoston ulkopuolella IL-33 saattaa joissakin sairauksissa aiheuttaa niiden pahenemista. Tällaisia sairauksia ovat astma ja allergiat, joissa IL-33 aiheuttaa tulehdusreaktion pahenemista. Haavainen paksusuolentulehdus sekä keuhkojen ja nivelten tulehdukset voivat myös pahentua IL-33:n vaikutuksesta. Mahassa ja keuhkoissa voi ilmetä epiteelikudoksen liikakasvua.

ALS:iin sairastuneilla henkilöillä on havaittu matalampia veren IL-33-tasoja terveisiin verrattuna (Lin ym. 2012). Havainnosta voitaisiin päätellä, että IL-33:lla olisi suojaava vaikutus ALS:ssa. IL-33:n määrät vaihtelevat eri sairauksissa, joten selvittelyjä on syytä jatkaa muiden vielä tutkimattomien tautien kohdalla. Tärkeää olisi myös ymmärtää, mihin vaikutukset perustuvat. IL-33:n puutokset tai liiallinen esiintyminen on teoriassa mahdollista korjata farmakologisesti. Hankalaksi hoidon tekee IL-33:n arvaamaton käyttäytyminen ja vaikea ennustettavuus koko elimistön kannalta. Vaikutukset näyttäisivät olevan kudosspesifisiä ja riippuvaisia mahdollisesti myös kudoksen tulehduksellisesta tilanteesta (Han ym. 2011). IL-33:n rooli voi vaihdella myös sen mukaan, saako se kudoksessa vasteen aikaan tuman ja proteiinkinaasien kautta vai vapaana muotona sytokiininä (Kurowska-Stolarska ym. 2011). Jos sairauksien oireiden ja syiden yhteys IL-33:n toimintaan saadaan osoitettua, se on merkittävä askel kohti aineen terapeuttista käyttöä.

5. TUTKIMUSOSIO

5.1 Tavoitteet

ALS:n hoidossa on käytettävissä vain oireita helpottavia hoitomuotoja, mutta taudin kulua hidastavia hoitovaihtoehtoja on pystytty kehittämään vain rajoitetusti (Sommer 2006). Kantasolututkimuksen edistyminen ja menetelmien kehittyminen ovat antaneet aiheutta tutkia kantasoluhoitojen mahdollisuutta myös rappeuttavissa keskushermoston sairauksissa, kuten ALS:ssa, jossa on myös pyritty kantasolujen avulla korvaamaan sairauden takia tuhoutuneita hermosoluja (Pandya ym. 2012). Toinen vaihtoehto olisi tehostaa lääkaineilla elimistössä jo valmiina olevien hermosolujen esiasteiden kypsymistä. Tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää, onko WT- ja ALS-tautimallin hiirillä selkäytimessä spontaania neurogeneesiä ja lisääkö ALS:iin sairastuminen sitä. Lisäksi selvitettiin, onko pitkäaikaisella IL-33-hoidolla vaikutusta neurogenesin määrään selkäytimessä ja onko hiirillä sukupuolten välisiä eroja neurogenesissä ja vasteessa lääkehoitoon.

5.2 Aineisto ja menetelmät

Tutkimuksessa käytetty hiirikanta oli hankittu Jackson Laboratoriolta. Hiiret oli tuotettu ja kasvatettu Kuopiossa koe-eläinkeskuksessa. Tutkimus suoritettiin Itä-Suomen yliopiston koe-eläinkeskuksessa valtakunnallisen koe-eläinlautakunnan (ELLA) luvalla. Hiiret jaettiin eri ryhmiin satunnaisesti, kuitenkin siten, että samasta poikueesta saatiin eläimiä eri ryhmiin. WT-kontrollit olivat saman kannan ei-siirtogeenisiä hiiriä samoista poikueista, joista siirtogeeniset hiiret olivat peräisin. Tutkimuksessa käytettävät hiiret yli-ilmensivät ihmisen mutatoitua SOD1-G93A-geeniä, joka aiheuttaa ALS:n kaltaisen sairauden. Hiirillä ilmeni motorisia oireita 15–18 viikon ikäisinä ja niiden elinikä oli noin 24–27 viikkoa. Hiiriä oli lääkitty interleukiini-33:lla (Recombinant Mouse IL-33, BioLegend, San Diego, Ca), joka oli laimennettu fosfaattipuskuroituun natriumkloridiliuokseen (PBS, phosphate buffered saline). IL-33 oli annosteltu intraperitoneaalisesti kahdesti viikossa 12 viikon iästä alkaen annoksella 0,5 µg/hiiri. Lääkitys oli keskeytetty 20 viikon iässä ja hiiret oli lopetettu 22-viikkoisina. Lopetuksen yhteydessä hiiret oli perfusoitu heparinisoidulla saliinilla, minkä jälkeen selkäytimet oli kerätty ja fiksoitu 24 tunnin ajan 4 prosenttisessa PFA:ssä (paraformaldehydi) ja valettu parafiiniin. Selkäytimestä oli leikattu viiden mikrometrin paksuisia

leikkeitä. Kutakin värjäystä varten oli jokaisesta eläimestä otettu kymmenen leikettä 200 µm:n välein, jolloin ne kattoivat kahden millimetrin matkan lumbaarista selkäydintä. Näytteistä tehtiin kaksi värjäystä erilaisilla hermosolujen esiasteen merkkiaineilla, doublecortinilla ja nestinillä. Puskureiden valmistus on esitetty liitteessä 1. Doublecortin (DCX)-värjäyksessä oli 14 WT-kontrollihiirtä (8 ♀), kolme IL-33-hoidettua WT-hiirtä (3 ♀) 13 mSOD1-siirtogeenistä hiirtä (6 ♀) ja kymmenen IL-33-hoidettua mSOD1-siirtogeenistä hiirtä (5 ♀). Nestin-värjäyksessä oli 12 WT-kontrollihiirtä (7 ♀), kolme WT- IL-33-hoidettua hiirtä (3 ♀), 13 mSOD1-siirtogeenistä hiirtä (6 ♀) ja kymmenen IL-33-lääkittyä mSOD1-siirtogeenistä hiirtä (5 ♀). Aineistossa ei ollut mukana urospuolisia IL-33-hoidettuja WT-hiiriä, koska ne menehtyivät ennen 20 viikon ikää.

5.2.1 Doublecortin-värjäys

Näytteet deparafinoitiin laskevan alkoholisarjan avulla (liite 2). Parafiinin poistamisen jälkeen näytteitä inkuboitiin ensin viisi minuuttia PBS:ssa ja sitten viisi minuuttia huoneenlämpöisessä sitraattipuskurissa. Sitraattikeitto tehtiin 83 °C 0,05 M sitraattipuskurissa, pH 6.0 (liite 1). Sitraattikeittoa jatkettiin 15 minuutin ajan ja näytteitä jäähdytettiin 15 minuuttia huoneenlämmössä. Jäähdytyksen jälkeen näytteet pestiin PBST:llä 3 x 5 minuuttia. Seuraavaksi tehtiin blokkaukset PBST:hen laimennetulla 10 prosenttisella NGS:lla (Normal goat serum) yhden tunnin ajan jatkuvasti sekoittaen. Värjäys aloitettiin lisäämällä doublecortin vasta-aineliuosta (Rabbit polyclonal anti-doublecortin, Cell signaling, 4604), joka oli laimennettu 1:200 5 prosenttiseen NGS:iin. Näytteiden annettiin inkuboitua yö yli koko ajan sekoittaen. Seuraavana aamuna näytteet pestiin PBST:llä 3 x 5 minuuttia. Toisessa vaiheessa laitettiin fluoresoivaa sekundaari vasta-aineliuosta (Alexa Fluor goat anti rabbit 568, Molecular Probes), joka oli laimennettu 1:200 5 prosenttiseen NGS:iin ja näytteitä inkuboitiin kaksi tuntia valolta suojattuna. Tämän jälkeen näytteet pestiin PBST:llä 3 x 5 minuuttia ja kuivattiin. Lopuksi näytteet peitettiin Vector mounting medium -aineella (Vectashield mounting medium with DAPI, Vector), joka värjää solujen tumat DAPI-värillä. Näytteet säilytettiin valolta suojattuna +4 °C:ssa.

5.2.2 Nestin-värjäys

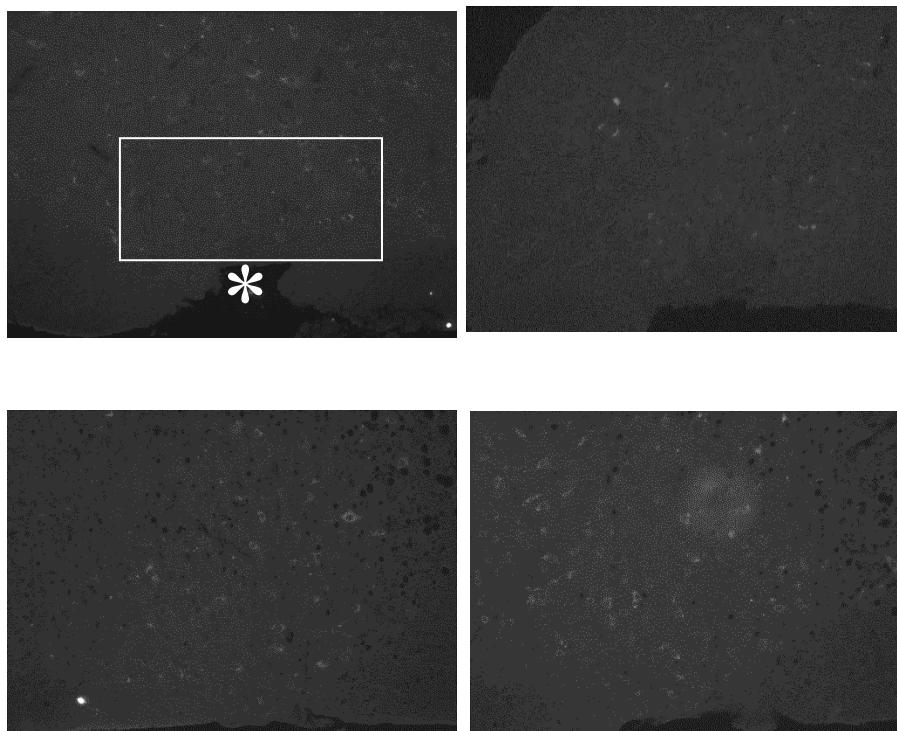
Näytteille tehtiin deparaffinointi ja sitraattikeitto kuten doublecortin-värjäyksessä. Seuraavassa vaiheessa blokattiin endogeeniset peroksidaasit inkuboimalla näytteitä 30 minuutin ajan metanoliliuoksessa, jossa oli 0,3 prosenttia vetyperoksidia (liite 1). Tämän jälkeen näytteet pestiin PBST:llä 3 x 5 minuuttia. Seuraavaksi tehtiin blokkaukset PBST:hen laimennetulla 10 prosenttisella NGS:llä yhden tunnin ajan jatkuvasti sekoittaen. Seuraavassa vaiheessa lisättiin nestin-vasta-aineliuosta (Rabbit polyclonal anti-nestin, Abcam), joka oli laimennettu 1:500 5 prosenttiseen NGS:ään ja näytteiden annettiin inkuboitua yön yli koko ajan sekoittaen. Seuraavana aamuna näytteet pestiin PBST:llä 3 x 5 minuuttia. Toisessa vaiheessa laitettiin vasta-aineliuosta (Biotynylated anti-rabbit, made in goat, IgG, Vector), joka oli laimennettu 1:200 5 prosenttiseen NGS:ään. Näytteitä inkuboitiin kaksi tuntia, minkä jälkeen näytteet pestiin PBST:ssä 3 x 5 minuuttia. Pesun jälkeen lisättiin ABC-reagentti (Vector elite kit, A 1:200 ja B 1:200 liotettuna PBS:ään, valmistettu 30 minuuttia ennen käyttöä) ja näytteitä inkuboitiin liuoksessa kaksi tuntia ja huuhdottiin PBST:llä 3 x 5 minuuttia. Värjäys suoritettiin lisäämällä Ni-Dab väriaine-0,075 prosenttista vetyperoksidi-liuosta jokaiseen näytteeseen ja annettiin värin vaikuttaa seitsemän minuuttia. Värjäytymisen pysäytettiin siirtämällä näytteet tislattuun veteen. Lopuksi näytteet pestiin tislatussa vedessä 2 x 10 minuuttia, minkä jälkeen ne kuivattiin nousevan alkoholisarjan (liite 2) avulla ja peitettiin Depex:illä.

5.2.3 Kuvaus ja tilastollinen analyysi

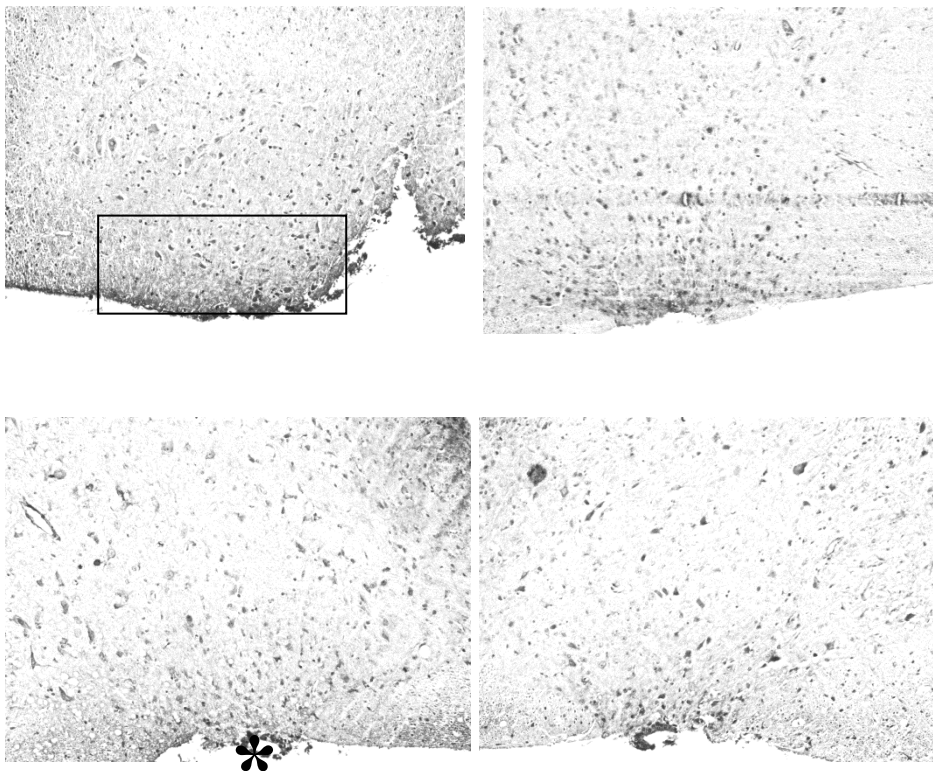
Näytteet kuvattiin Olympus BX51 -mikroskoopilla ja tallennettiin digitaaliseen muotoon. Kuvista analysoitiin värjäytyneiden solujen osuus selkäytimen keskuskanavan ympäriltä, Image Pro® plus 6.0 -ohjelmalla. Tulokset analysoitiin GraphPad Prism -ohjelmalla käyttäen yksisuuntaista ANOVA:a ja post hoc -testinä Bonferronia. Tuloksien tarkastelussa poistettiin korkeintaan yksi arvo hiirtä kohden Outlier-testin perusteella, jos arvo poikkesi merkittävästi muista tuloksista. Poikkeavien arvojen rajaaminen perustuu Grubbsin testiin, joka määrittää sallitun poikkeaman.

6. TULOKSET

Tutkimuksessa selvitettiin, tapahtuuko hermosolujen uudismuodostusta hiirten selkäytimissä ja kiihdyttääkö sairastuminen ALS:iin sitä. Lisäksi tutkittiin, onko IL-33-hoidolla vaikutusta uudismuodostuksen määrään. Värjäyksissä saatiin esille sekä doublecortin- että nestin-positiivisia hermosoluja selkäytimen alueella. Doublecortin on epäkypsien neuronien ilmentämä proteiini sikiön ja aikuisen hermokudoksessa (von Bohlen und Halbach 2011). DCX:n ilmentyminen alkaa pian solun jakautumisen jälkeen ja jatkuu 2–3 viikkoa, kunnes solu kypsyy neuroniksi. Myös nestin on proteiini, jota nuoret hermoston kantasolut tuottavat, eikä sitäkään esiinny kypsissä hermosoluissa (von Bohlen und Halbach 2007). Nestiniä on tavattu myös nuorissa hematopoeettisissa soluissa. Näiden merkkiaineiden esiintyminen kudoksessa viittaa uusien kypsyttömien hermosolujen läsnäoloon. Analyysi tehtiin selkäytimen keskuskanavan ympäriltä, sillä tällä alueella on aiemmin havaittu neurogeneesiä (Chi ym. 2006). Nestin-positiivisten solujen määrä suhteessa koko näytteen pinta-alaan oli prosentuaalisesti suurempi kuin doublecortin-positiivisten solujen. Doublecortin-positiiviset solut levittäytyivät tasaisemmin selkäytimen alueelle (kuva 1), kun taas nestin-värjäytyminen oli voimakkainta keskuskanavan lähistöllä (kuva 2). Värjäytyneiden solujen määrä oli kuitenkin melko vähäinen molemmissa värjäyksissä.



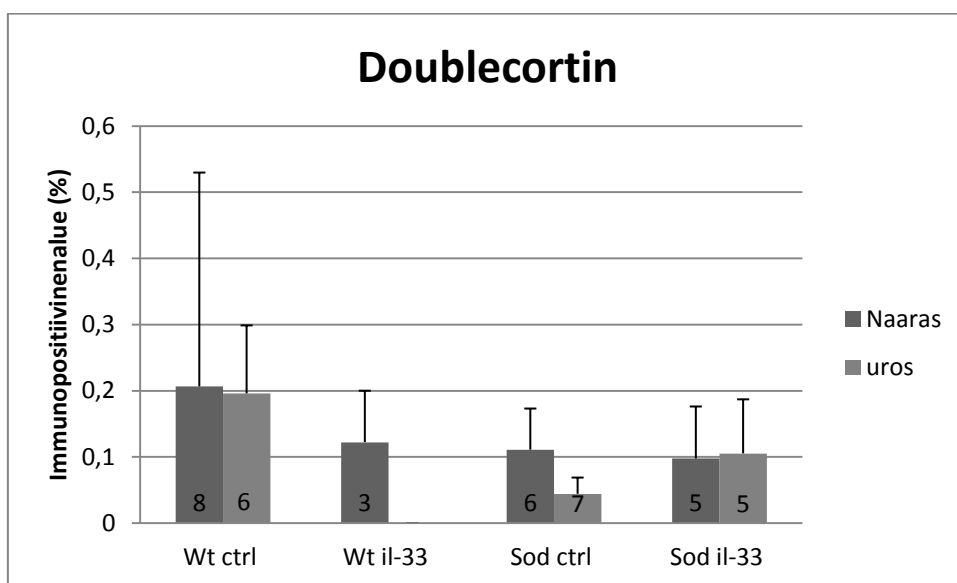
Kuva 1. Esimerkkikuvat doublecortin-värjäyistä selkäydinnäytteistä naarashiiristä. WT, jota on hoidettu IL-33-lääkkeellä (vas. ylh.), WT-kontrolli (oik. ylh.), siirtogeeninen mSOD1-hiiri, jota hoidettu IL-33-lääkkeellä (vas. alh.) ja siirtogeeninen mSOD1-hiiri kontrolli (oik. alh.). Doublecortin-positiiviset solut näkyvät vaaleina tasaisesti levittäytyneinä koko selkäytimen alueelle. Ensimmäisessä kuvassa on rajattuna analysointialue.*Keskuskanava. Suurennos 10-kertainen.



Kuva 2. Esimerkkikuvat nestin-värjätystä selkäydinnäytteistä naarashiiristä. WT, jota on hoidettu IL-33-lääkkeellä (vas. ylh.), WT-kontrolli (oik. ylh.), siirtogeeninen mSOD1-hiiri, jota hoidettu IL-33-lääkkeellä (vas. alh.), siirtogeeninen mSOD1-hiiri kontrolli (oik. alh.). Nestin-positiiviset solut näkyvät tummempina ja ne painottuvat keskuskanavan ympärille. Ensimmäisessä kuvassa on rajattuna analysointialue.* Keskuskanava. Suurennos 10-kertainen.

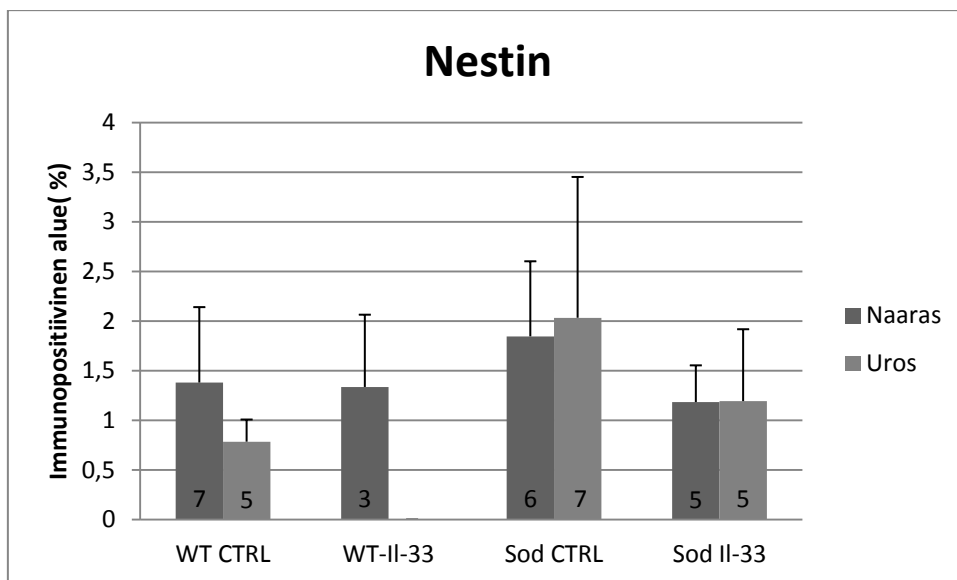
Tutkimuksessa vertailtiin spontaanin neurogeneesin määrää sairailta (SOD1- mutaatio) ja terveillä hiirillä. Lisäksi tarkasteltiin, oliko IL-33-hoidolla vaikutusta neurogeneesin määrään edellä mainituissa ryhmissä sekä sukupuolten välisiä eroja spontaanin neurogeneesin ja IL-33-hoidon vaikutusten suhteen.

Doublecortin-värjäyksessä ei saatu merkitseviä eroja ($p < 0.05$) minkään tutkittujen ryhmien välille (kuva 3). DCX-värjäyksessä tulee esille, että neurogeneesi voi olla runsaampaa naaraspuolisilla hiirillä. Ero tuli esille molemmissa kontrolliryhmissä, varsinkin mSOD1-hiirillä. Ero ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevä, koska vaihtelu oli suurta.



Kuva 3. Doublecortin-positiivisten solujen prosentuaalinen osuus analysoidulla alueella lumbaalisen selkäytimen keskuskanavan ympärillä. Tutkimuksessa ei ollut mukana IL-33-hoidettuja WT-uroshiiriä. Hiirien lukumäärä on merkitty pylväisiin. Arvot ovat esitetty muodossa keskiarvo + SD.

Nestin-värjäyksessä ei myöskään saatu esille merkitseviä eroja kyseisten ryhmien välille (kuva 4). Nestin-värjäyksen osalta on nähtävissä lisääntymistä neurogeneesissä SOD1-hiirillä verrattuna WT-hiiriin, ilman lääkettä olevissa ryhmissä, mutta erot eivät ole tilastollisesti merkitseviä.



Kuva 4. Nestin-positiivisten solujen prosentuaalinen määrä analysoidulla alueella lumbaalisen selkäytimen keskuskanavan ympärillä. Tutkimuksessa ei ollut mukana IL-33-hoidettuja WT-uroshiiriä. Hiiren lukumäärä on merkitty pylväisiin. Arvot on esitetty muodossa keskiarvo + SD.

7. POHDINTA

Tutkimuksen tarkoitus oli selvittää, esiintyykö ALS:n sairastuneilla hiirillä spontaania neurogeneesiä enemmän kuin terveillä hiirillä. Aiempien tutkimusten perusteella on saatu viitteitä hermoston korjaavista toimista rappeuttavissa aivosairauksissa (Abdipranoto ym. 2008). Parkinsonin taudissa ja Alzheimerin taudissa on saatu selviä todisteita kiihtyneestä neurogeneesistä sekä ihmisillä että eläimillä tehdyissä tutkimuksissa ja selvitetty jopa erilaisia molekyyilejä, jotka voisivat toimia myös tulevaisuudessa farmakologisena hoitona kyseisissä sairauksissa (Abdipranoto ym. 2008, Winner ym. 2011). Lisäksi tutkittiin, olisiko IL-33-hoidolla mahdollisesti neurogeneesiä lisäävä vaikutus ja onko hiirten sukupuolella merkitystä hoidon vasteen kannalta. Seerumin IL-33-tason on todettu olevan vähentynyt ALS:iin sairastuneilla terveisiin verrattuna, joten voidaan olettaa, että sillä on mahdollisesti merkitystä sairauden kulun kannalta (Lin ym. 2012). IL-33 vaikuttaa keskushermostossa mikroglia-soluihin lisäämällä niiden jakaantumista sekä sytokiinien ja kemokiinien eritystä (Han ym. 2011). Mikroglia eivät kuitenkaan itse tuota IL-33:sta toisin kuin astrocytyt, mutta IL-33:n kohde-reseptori kuitenkin löytyy sekä mikroglia- että astrocyteista. IL-33:n vaikutukset elimistössä kuitenkin vaihtelevat eri kudoksissa. Vaikutukset voivat olla erilaisia eri tautitiloissa, jopa saman kudostyyppin sisällä (Christophi ym. 2012, Han ym. 2011). Näyttäisi siltä, että IL-33 voi pahentaa tai parantaa sairauden tilaa elimistä ja sen kudosten tulehduksellisesta tilanteesta riippuen.

Tämän tutkimuksen tulokset vahvistavat aikaisempia näkemyksiä spontaanin neurogeneesin esiintymisestä keskushermostossa. Näyttöä neurogeneesin lisääntymisestä ALS:iin sairastuneilla hiirillä ei kuitenkaan saatu ja tulokset ovat edelleen ristiriitaisia. IL-33-hoito ei tämän tutkimuksen perusteella vaikuta sairauteen lisäämällä neurogeneesiä selkäytimessä. IL-33:n käyttö lääkkeenä ja mahdollisten positiivisten vaikutusten mekanismien selvittäminen vaativat vielä paljon lisätutkimuksia. Hiirten sukupuolella ei näyttäisi olevan vaikutusta neurogeneesin määrään. Kuitenkin nestin-ryhmässä WT-kontrollihiirillä ja doublecortin-ryhmässä mSOD1-siirtogeenisillä kontrollihiirillä neurogeneesin määrä naarailta oli yli kaksinkertainen verrattuna uroksiin. Hajonta oli kuitenkin niin suuri, että tästä ei voida tehdä johtopäätöksiä. Tutkimus ei anna edelleenkään varmuutta hermosolujen käyttäytymisestä ALS:n tautimallin hiirissä, joista aikaisemmissakin tutkimuksissa on saatu ristiriitaisia tuloksia (Chi ym. 2005, Liu ja Martin 2006, Thompson ym. 2008, Lee ym. 2010). Tämän taustalla voivat olla mahdollisesti erilaiset mutaatiot tai yksilölliset erot hiirten välillä.

Jatkotutkimuksissa tulisi selvittää, onko neurogeneesi yhteydessä johonkin hiirien ominaisuuteen, joka olisi tutkitusta kannasta riippuvainen. Myös neurogeneesin lisääminen farmakologisia menetelmiä käyttämällä vaatii uusien lääkkeiden kokeilemista ja niiden vaikutusten selvittämistä. Sytokiinien lisäksi erilaisten hermoston kasvutekijöiden vaikutuksia neurogeneesissä tulisi selvittää.

Kun tutkitaan keskushermoston rappeumasairauksia ja niihin liittyvää hermosolujen uudismuodostusta, on hyvä huomioida hermoston luonnollinen tuhoutuminen iän myötä. Tutkimalla eri-ikäisiä hiiriä olisi mahdollista nähdä, onko neurogeneesin määrä riippuvainen iästä ja onko aikaisemmin aloitetulla tai pidempään jatkuvilla hoidolla merkitystä neurogeneesin määrään. Hiirien tarkastelu useammassa ikäryhmässä ja eripituisilla sairastavuusjaksoilla voisi antaa tietoa taudin kehittymisestä ja hermosolujen käyttäytymisestä taudin edetessä. Suurempien eläinryhmien tutkiminen voisi mahdollisesti pienentää hajontaa, jolloin erot tulisivat paremmin esille.

Tutkimuksessa analysoitiin neurogeneesin määrää keskustakanavan lähistöllä olevalta alueelta. Koko selkäytimen alueen tarkastelu voisi antaa erilaisia tuloksia, vaikkakin värjäytyminen on silmämääräisesti katsottuna melko vähäistä näytteiden reuna-alueilla. Sitraattikeittoaikaa voisi jatkotutkimuksissa vielä optimoida. DCX-värjäyksessä pidempi sitraattikeittokäsittely voimistaa värjäytymistä ja mahdollisesti tarkentaa tuloksia. Doublecortin- ja nestin-värjäysten perusteella uusia hermosoluja esiintyy koko selkäytimen alueella. Tähän viittaa se, että nestinin ilmentäminen loppuu 11 vuorokauden kuluttua solujen syntymästä (von Bohlen und Halbach 2007). Värjäytyminen voi johtua joko uusien hermosolujen syntymisestä tai mahdollisesti niiden vaeltamisesta keskustakanavasta laajemmalle. Chi ja kumppanit (2006) löysivät tutkimuksissaan lisääntyntä neurogeneesiä ja lisääntyntä vaellusta keskustakanavasta pois päin ALS-tautimallin hiirillä. On myös mahdollista, että tutkimuksessani olleiden hiirien selkäytimet olivat vaurioituneet ennen hiirten lopettamista. Selkäydinvaurioiden seurauksena glia-solut voivat alkaa uudelleen tuottaa nestin-proteiinia (von Bohlen und Halbach 2011). Doublecortinia voi joskus ilmentyä myös kypsissä astro-syyteissä. Tämä voi selittää osaltaan koko selkäytimen alueelta löytyviä doublecortin-positiivisia soluja.

Kontrollihiirten ryhmissä doublecortin-värjäyksessä näyttäisi, että SOD1-mutaatio aiheuttaa neurogeneesin vähentymistä, kun taas nestin-värjäyksen tulokset antavat päinvastaisen tuloksen. Hiiret oli valittu sattumanvaraisesti, joten erot eivät voi olla peräisin hiirten käsit-

telystä. Tähän voi liittyä värjäysprosessiin liittyvä tekijä, joka mahdollisesti sitoo virheellisesti toista vasta-ainetta, eikä näin ole totuudenmukainen neurogeneesin suhteen. Voi olla myös mahdollista, että toinen vasta-aine sitoutuu johonkin normaalisolun osaan, josta ei ole tarkempaa tietoa.

Hiirimalleilla tehdyt tutkimukset ja niistä saadut tulokset eivät ole suoraan sovellettavissa ihmisten hoitoon. Mallien tärkeimpänä tehtävänä on ohjata tutkimusta oikeaan suuntaan ja luoda teoreettiset perusteet ihmiskokeita varten. Eläinmallien käyttäminen vaikeiden tautien ja niiden hoitojen tutkimuksessa on kuitenkin ensisijaisen tärkeää, koska sen lähemmäksi ihmismallia ei toistaiseksi ole mahdollista päästä.

8. KIRJALLISUUS

Abdipranoto A, Wu S, Stayte S, Vissel B. The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008;7(2):187-210.

Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 2001;57(7):1282-9.

Andre R, Lerouet D, Kimber I, Pinteaux E, Rothwell NJ. Regulation of expression of the novel IL-1 receptor family members in the mouse brain. *J Neurochem* 2005;95(2):324-30.

Bento-Abreu A, Van Damme P, Van Den Bosch L, Robberecht W. The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 2010;31(12):2247-65.

Bede P, Oliver D, Stodart J ym. Palliative care in amyotrophic lateral sclerosis: a review of current international guidelines and initiatives. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82(4):413-8.

Carlesi C, Pasquali L, Piazza S ym. Strategies for clinical approach to neurodegeneration in Amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol* 2011;149(1):151-67.

Chi L, Ke Y, Luo C, Li B, Gozal D, Kalyanaraman B, Liu R. Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells* 2006;24(1):34-43.

Christophi GP, Gruber RC, Panos M, Christophi RL, Jubelt B, Massa PT. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 2012;142(3):308-19.

Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S ym. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2005;21(1):1-14.

Cronin S, Hardiman O and Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* 2007;68(13):1002-7.

Deng HX, Chen W, Hong ST ym. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 2011;477(7363):211-5.

- Enciu AM, Nicolescu MI, Manole CG, Mureşanu DF, Popescu LM, Popescu BO. Neuroregeneration in neurodegenerative disorders. *BMC Neurol* 2011;23;11:75.
- Erkinjuntti T, Rinne J, Alhainen K, Soininen H. Muistihäiriöt ja dementia. Kirjassa: Soinila S, Kaste M. Somer H. toim. *Neurologia*, 2. Uudistettu painos. Helsinki: Duodecim 2006; 365-72.
- Faigle R, Song H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(2):2435-48.
- Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci* 2012;322(1-2):254-62.
- Geraerts M, Krylyshkina O, Debyser Z, Baekelandt V. Concise review: therapeutic strategies for Parkinson disease based on the modulation of adult neurogenesis. *Stem Cells* 2007;25(2):263-70.
- Hamilton A, Holscher C. The effect of ageing on neurogenesis and oxidative stress in the APP(swe)/PS1(deltaE9) mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2012;1449:83-93.
- Han P, Mi WL, Wang YQ. Research progress on interleukin-33 and its roles in the central nervous system. *Neurosci Bull* 2011;27(5):351-7.
- Harvey BK, Richie CT, Hoffer BJ, Airavaara M. Transgenic animal models of neurodegeneration based on human genetic studies. *J Neural Transm* 2011;118(1):27-45.
- He N, Jin WL, Lok KH, Wang Y, Yin M, Wang ZJ. Amyloid- β 1-42 oligomer accelerates senescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2. *Cell Death Dis* 2013;4:e924.
- Huey ED, Ferrari R, Moreno JH ym. FUS and TDP43 genetic variability in FTD and CBS. *Neurobiol Aging* 2012;33(5):1016.
- Ito D, Suzuki N. Conjoint pathologic cascades mediated by ALS/FTLD-U linked RNA-binding proteins TDP-43 and FUS. *Neurology* 2011;77(17):1636-43.
- Kaakkola S, Marttila R. Liikehäiriöt. Kirjassa: Soinila S, Kaste M. Somer H. toim. *Neurologia*, 2. Uudistettu painos. Helsinki: Duodecim 2006; 216-26.

- Kabashi E, Brustein E, Champagne N, Drapeau P. Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(3):335-45.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC ym. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2011;377(9769):942-55.
- Kurowska-Stolarska M, Hueber A, Stolarski B, McInnes IB. Interleukin-33: a novel mediator with a role in distinct disease pathologies. *J Intern Med* 2011;269(1):29-35.
- Laaksovirta H. Yleiskatsaus Perheittäin esiintyvä ja periytyvä amyotrofinen lateraaliskleroosi (FALS ja SOD1-ALS). *Suomen Lääkärilehti* 2007;62(26):2555-8.
- Laaksovirta H. Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS). Kirjassa: Kunnamo I, Alenius H, Hermanson E, Jousimaa J, Teikari M, Varonen H. toim. Lääkärin käsikirja, 9. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim 2008;1335-7.
- Laaksovirta H, Peuralinna T, Schymick JC ym. Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome-wide association study. *Lancet Neurol* 2010;9(10):978-85.
- Lazarov O, Marr RA. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol* 2010;223(2):267-81.
- Lee JC, Jin Y, Jin J ym. Functional neural stem cell isolation from brains of adult mutant SOD1 (SOD1(G93A)) transgenic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice. *Neurol Res* 2011;33(1):33-7.
- Lin CY, Pfluger CM, Henderson RD, McCombe PA. Reduced levels of interleukin 33 and increased levels of soluble ST2 in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol* 2012;249(1-2):93-5.
- Lindsay K, Bone I, Fuller G. Parkinsonin tauti. Kirjassa *Neurology and neurosurgery illustrated*, 5. painos. Elsevier 2010; 364-8.
- Liu Z, Martin LJ. The adult neural stem and progenitor cell niche is altered in amyotrophic lateral sclerosis mouse brain. *J Comp Neurol* 2006;497(3):468-88.
- Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O ym. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(1):6-11.

- McCombe PA, Henderson RD. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend Med* 2010;7(6):557-70.
- Naganska E, Matyja E. Amyotrophic lateral sclerosis - looking for pathogenesis and effective therapy. *Folia Neuropathol* 2011;49(1):1-13.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson ym. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;4(362): 59–62.
- O'Keefe GC, Barker RA, Caldwell MA. Dopaminergic modulation of neuro-genesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle* 2009;8(18):2888-94.
- Pandya RS, Mao LL, Zhou EW ym. Neuroprotection for amyotrophic lateral sclerosis: role of stem cells, growth factors, and gene therapy. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2012;12(1):15-27.
- Raibon E, Todd LM, Möller T. Glial cells in ALS: the missing link? *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2008;19(3):441-59.
- Salawu FK, Umar JT, Olokoba AB. Alzheimer's disease: a review of recent developments. *Ann Afr Med* 2011;10(2):73-9.
- Silani V, Messina S, Poletti B, Morelli C, Doretto A, Ticozzi N, Maderna L. The diagnosis of Amyotrophic lateral sclerosis in 2010. *Arch Ital Biol* 2011;149(1):5-27.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, ym. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23(5):479-90.
- Somer H. Amyotrofinen lateraaliskleroosi. Kirjassa: Soinila S, Kaste M. Somer H. toim. *Neurologia, 2. Uuudistettu painos*. Helsinki: Duodecim 2006; 496-8.
- Thompson A, Boekhoorn K, Van Dam AM, Lucassen PJ. Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? *Genes Brain Behav* 2008;7(1):28-42.
- Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 2008;85(1):94-134.
- Turner MR, Hardiman O, Benatar M ym. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2013;12(3):310-22.

Van Den Bosch L. Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biomed Biotechnol* 2011;ID348765.

von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 2007;329(3):409-20.

von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 2011;345(1):1-19.

Winner B, Kohl Z, Gage FH. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2011;33(6):1139-51.

Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Production and functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Res* 2011;1385:8-17.

Zhao B, Ratka A. Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuro-molecular Med* 2011;13(4):223-50.

LIITTEET

Liite 1

Puskurien valmistus

0,1 M PB = 22,6 ml 1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ja 77,4 ml 1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ja tislattua vettä 1000 ml asti. pH säädetty 7,4: ään.

0,1 M PBS = 22,6 ml 1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ja 77,4 ml 1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ja tislattua vettä 1000 ml asti. pH säädetty 7,4: ään. Lisätty 90 g NaCl.

0,01 M PBST= 100 ml 0,1 M PBS liuotetaan tislattuun veteen 1000 ml:ksi liuosta. pH säädetty 7,4: ään. Lisätty 0,5 ml Tween20.

0,05 M Sitraattipuskuri = 14,7 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ liuotetaan tislattuun veteen 1000 millilitraksi liuosta. pH säädetty 6,0:aan

Vetyperoksidi-metanoliliuos = 0,3 % $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (1ml 30 % H_2O_2 ja 99 ml CH_3OH)

Liite 2

Deparaffinointi

Laskeva alkoholisarja:

ksyleeni	3 x 5 minuuttia
absoluuttinen etanoli	2 x 5 minuuttia
95 % etanoli	5 minuuttia
90 % etanoli	2 minuuttia
70 % etanoli	5 minuuttia
50 % etanoli	5 minuuttia
tislattu vesi	1 minuutti
fosfaattipuskuri (PB)	1 minuutti
fosfaattipuskurisuolaliuos (PBS)	5 minuuttia.

Kuivaus:

50 % etanoli	1 minuutti
70 % etanoli	1 minuutti
95 % etanoli	1 minuutti
100 % etanoli	1 minuutti
Ksyleeni	2 x 1 minuuttia.