

Karri Niiranen

# Ruokahalun vaikutus asetylikoliinisolujen aktiivisuuteen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

7.4.2017

Tekijä Otsikko	Karri Niiranen Ruokahalun vaikutus asetyylikoliinisolujen aktiivisuuteen
Sivumäärä Aika	33 sivua + 4 liitettä 7.4.2017
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Tutkijatohtori Teemu Aitta-aho Lehtori Tiina Soininen
<p>Ylipaino on maailmanlaajuinen ongelma. Tähän mennessä markkinoilla olleet lääkkeet ovat olleet joko teholtaan liian heikkoja tai aiheuttaneet vakavia sivuvaikutuksia. Ruokahaluun vaikuttavia tekijöitä on tutkittu laajalti jo pitkään. Tutkimusten kohteina ovat olleet verenkierron hormonit, useat amiinit ja aminohapot, joiden vaikutuksia on yleensä tutkittu tietyllä aivoalueella, usein hypotalamuksessa.</p> <p>Tämä insinööri työ oli osa suurempaa tutkimusta, jonka tavoitteena on löytää lääke ylipainon hoitoon hyödyntäen asetyylikoliinisolujen vaikutusta ruokahaluun. Tämän projektin tavoitteena oli löytää aivoalueet, joilla asetyylikoliinisolujen sekä muiden hermosolujen aktiivisuus muuttuu merkittävästi eri ruokintaryhmien välillä. Aivoalueet olivat striatum, nucleus accumbens, olfactory tubercule, septum, basal forebrain, PPT ja LDT.</p> <p>Työ aloitettiin tekemällä ruokintakokeet 18 hiirelle. Ruokintaryhmät olivat normaaliruokinta, paasto sekä paasto ja sen jälkeinen ruokinta. Hiirten aivot leikattiin 40 µm paksuiksi leikkeiksi. Leikkeet värjättiin käyttäen fluoresoivia vasta-aineita. Primaarivasta-aineina käytettiin asetyylikoliinisoluille anti-ChAT-vasta-ainetta ja solujen aktiivisuus tunnistettiin käyttäen anti-c-Fos-vasta-ainetta, joka värjää solujen tumaan muodostuvan c-Fos-proteiinin. Sekundaarivasta-aineena asetyylikoliinisoluille oli aallonpituus 488 nm:n fluoresoiva vasta-aine ja c-Fos-proteiinille aallonpituus 594 nm:n fluoresoiva vasta-aine.</p> <p>Kun leikkeet oli kuvattu fluoresenssimikroskoopilla, laskettiin solut aivoalueittain. Tilastollisena analyysinä käytettiin yksisuuntaista ANOVA -varianssianalyysiä luottamusvälillä 0,05, jolla tutkittiin, eroaako jokin ryhmistä muista tilastollisesti merkitsevästi. Mikäli aivoalueella havaittiin tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä, suoritettiin kaikkien ryhmien välinen tilastollinen analyysi Wilcoxon-Mann-Whitney-analyysillä.</p> <p>Tilastollisesti merkitsevää eroa huomattiin kahdella aivoalueella c-Fos-proteiinia sisältävien solujen määrissä. <i>Striatum</i>issa ainoastaan paastoryhmän sekä paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmän välillä oli tilastollista eroa. <i>Nucleus accumbens</i>in aivoalueella tilastollisesti merkitsevää eroa oli sekä normaaliruokintaryhmän ja paastoryhmän että normaaliruokintaryhmän ja paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmän välillä</p>	
Avainsanat	ACh, c-Fos, striatum, nucleus accumbens, olfactory tubercule, septum, basal forebrain, PPT, LDT

Author(s) Title	Karri Niiranen Effect of hunger on the activity of acetylcholine cells
Number of Pages Date	33 pages + 4 appendices 7 April 2017
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Teemu Aitta-aho, Postdoctoral Researcher Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>Obesity is a global problem. Drugs that have been brought to the market so far have either been too weak or had severe side effects. Factors that affect appetite have been studied for a long time. Research has focused on peripheral hormones, several amines and amino acids. Effects have usually been studied in one brain region, often in hypothalamus.</p> <p>This thesis was a part of a larger project to find a cure for obesity by targeting acetylcholine cells and the effects they have for appetite. The objective of this project was to identify those brain regions where activity of acetylcholine cells and other brain cells differ significantly between different feeding groups. The brain regions were striatum, nucleus accumbens, olfactory tubercle, septum, basal forebrain, PPT and LDT.</p> <p>The project started by performing feeding experiments on 18 mice. The feeding groups were <i>normal feeding</i>, <i>fasting</i> and <i>feeding after fasting</i>. The brains of the mice were dissected in 40 µm thick sections and dyed with fluorescent antibodies. Primary antibody for acetylcholine cells was the anti-ChAT antibody. Cell activity was identified by using the anti-c-Fos antibody. The c-Fos protein forms inside the cell nucleus. The secondary antibody for acetylcholine cells was a fluorescent antibody at wavelength 488 nm and, for c-Fos, at wavelength 594 nm.</p> <p>After the sections were scanned with fluorescent microscopy, cells were counted by region. For statistical analysis, the one-way ANOVA variance analysis was used with the confidence level of 0.05, Through this analysis, it was studied if there was a significant difference between feeding groups. If there was significant statistical difference between groups within brain region. The statistical analysis between all groups was done by Wilcoxon-Mann-Whitney analysis.</p> <p>Significant statistical difference in the number of cells with c-Fos-protein was detected only within two brain regions. In striatum, there was a statistical difference only between the <i>fasting</i> group and the <i>feeding after fasting</i> group. In nucleus accumbens, there was a statistical difference between the <i>normal feeding</i> group and the <i>fasting</i> group and also between the <i>fasting</i> and the <i>feeding after fasting</i> groups.</p>	
Keywords	ACh, c-Fos, striatum, nucleus accumbens, olfactory tubercle, septum, basal forebrain, PPT, LDT

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Ruokahaluun vaikuttavat tekijät	2
2.2	Asetyylikoliini ja kolinergiset hermosolut	3
2.3	Aivoalueet	5
2.3.1	<i>Striatum</i>	6
2.3.2	<i>Nucleus accumbens</i>	6
2.3.3	<i>Olfactory tubercle</i>	6
2.3.4	<i>Septum</i>	7
2.3.5	<i>Pars basalis telencephali</i>	7
2.3.6	<i>Pedunculopontinine tegmental nucleus</i>	7
2.3.7	<i>Laterodorsal tegmental nucleus</i>	9
2.4	c-Fos-proteiini ja hermosolun aktiivisuuden havainnointi	9
2.5	Tutkimusmenetelmät ja hiiret tutkimuksissa	11
3	Menetelmät	11
3.1	Hiiret ja ruokintakokeet	11
3.2	Näytteiden valmistelu	13
3.2.1	Perfusointi ja jäädytys	13
3.2.2	Kryostaattileikkaus	14
3.2.3	Vasta-ainevärjäys	14
3.3	Fluoresenssimikroskopointi, kuvankäsittely ja solujen laskenta	16
3.4	Vasta-ainevärjäysmenetelmän optimointi testivärjäyksillä	17
4	Tulokset	20
4.1	Vasta-ainevärjäysmenetelmän optimoinnin tulokset	20
4.2	Punnitustulokset	22
4.2.1	Hiirten painon muutos	22
4.2.2	Ruoan kulutus	23
4.3	Solujen laskenta	24
4.3.1	<i>Striatum</i>	25
4.3.2	<i>Nucleus accumbens</i>	26
4.3.3	<i>Olfactory tubercle</i>	27

4.3.4	<i>Septum</i>	28
4.3.5	<i>Pars basalis telencephali</i>	29
4.3.6	<i>Pedunculopontinine tegmental nucleus</i>	29
4.3.7	<i>Laterodorsal tegmental nucleus</i>	30
4.4	Tulosten vertailu muihin tutkimuksiin	31
5	Yhteenveto	32
	Lähteet	34
	Liitteet	
	Liite 1. Fluoresenssivärijäysprotokolla, ChAT ja c-Fos toimiva versio	
	Liite 2. Fluoresenssivärijäysprotokolla, ChAT ja c-Fos samaan aikaan	
	Liite 3. Fluoresenssivärijäysprotokolla, ChAT ja DAB	
	Liite 4. Tulokset	

## Lyhenteet

ACh	acetylcholine. Välittäjäaine.
AgRP	agouti-related peptide. Peptidi, joka osallistuu ruokahalun säätelyyn.
BT	basal forebrain ( <i>pars basalis telencephali</i> ). Aivoalue.
c-Fos	cellular homologue of FBJ osteosarcoma virus. Aivojen aktiivisuusleima.
c-fos	edellisen lähetti-RNA.
CART	cocaine- and amphetamine-regulated transcript. Proteiini, joka osallistuu ruokahalun säätelyyn.
ChAT	choline acetyltransferase. Asetyylikoliinia muodostava entsyymi.
EEG	elektroenkefalografia. Aivosähkökäyrä, joka muodostuu useiden hermosolujen aktiivisuudesta.
GABA	gamma-aminobutyric acid. Keskushermoston inhibitorinen välittäjäaine.
LDT	<i>laterodorsal tegmental nucleus</i> . Aivoalue.
mAChRs	muscarinic acetylcholine receptors. Muskariiniasetyylikoliinireseptorit ovat asetyylikoliinireseptoreiden alaluokka.
nAChRs	nicotinic acetylcholine receptors. Nikotiiniasetyylikoliinireseptorit ovat asetyylikoliinireseptoreiden alaluokka.
NPY	neuropeptide Y. Peptidi, joka osallistuu ruokahalun ja rasvavarastojen säätelyyn.
PBG	<i>parabigeminal nucleus</i> . Aivoalue.
PBS	phosphate-buffered saline. Fosfaattipuskuriliuos.

- PET positroniemissiotomografia. Kuvantamismenetelmä, jolla voidaan kuvata metabolisia prosesseja elimistössä.
- POMC pro-opiomelanocortin. Proteiini, joka osallistuu ruokahalun säätelyyn.
- PPT pedunculopontinine tegmental nucleus. Aivoalue.

## 1 Johdanto

Ylipainoa pidetään nykyisin maailmanlaajuisena ongelmana, ja sitä on kutsuttu jopa pandemiaksi. Ylipaino voi aiheuttaa mm. sydän- ja verisuonitauteja sekä tyypin 2 diabetesta. [1.] Monet tällä hetkellä markkinoilla olevista lääkkeistä ovat joko teholtaan heikkoja tai niiden pitkän ajan vaikutukset eivät ole tarpeeksi tasaisia. Markkinoilla on viimeisten vuosikymmenien aikana ollut useita lääkkeitä, jotka on jouduttu vetämään pois niiden aiheuttamien vakavien haittavaikutusten takia. [2.] Koska painonpudotus on hidasta ja paino palautuu helposti kuurin loputtua, tarvittaisiin lääke, jonka teho olisi tarpeeksi suuri ja tasainen, eikä sen teho heikkenisi ajan saatossa.

Asetyylikoliinisolut toimivat aivoissa hermokudosmodulaattoreina, ja ne pystyvät muokkaamaan sekä koordinoimaan suurempia hermosoluryhmiä aivoissa. Niitä esiintyy myös paljon sellaisilla aivoalueilla, jotka osallistuvat dopamiinin eritykseen (*striatum*, *nucleus accumbens*, *olfactory tubercule*, *septum*, *pars basalis telencephali* (BT), *pedunculo-pontine tegmental nucleus* (PPT) ja *laterodorsal tegmental nucleus* (LDT)). Dopamiini saa aikaan hyvänolotunteen, ja sen on osoitettu olevan tärkeässä roolissa päihdeongelmien kehittymisessä. Asetyylikoliinin (ACh) vaikutusta ruokahuuun ei ole vielä tutkittu paljoa, mutta sen osuutta Alzheimerin taudin syntyyn on tutkittu jo 1960-luvulta asti. [3.]

Tutkimuksen tarkoituksena oli tunnistaa hiirten aivoista, ennalta valituilta alueilta, poikkeavuuksia hermosolujen aktiivisuuden eroista eri kylläisyystilanteiden välillä. Työssä käytettiin apuna anti-c-Fos- ja anti-ChAT-vasta-ainevärjäyksiä. c-Fos-proteiinin värjäyksellä saatiin tietoa hermosolujen aktiivisuudesta viimeisten tuntien ajalta ja anti-ChAT-värjäyksellä pystyttiin tunnistamaan asetyylikoliinisolujen sijainti. Hiiret jaettiin kolmeen kuuden hiiren ryhmään, joilla jokaisella oli oma ruokintamalli. Ruokintamallit olivat normaaliruokinta, paasto sekä paasto ja sen jälkeinen ruokinta.



## 2 Teoria

### 2.1 Ruokahaluun vaikuttavat tekijät

Ruokahaluun vaikuttavat niin fysiologiset kuin psykologisetkin tekijät. Psykologisten vaikutusten rajaaminen on melko hankalaa, sillä monet näkö-, haju- ja makuaistit aiheuttavat fysiologisen reaktion elimistössä. Eräässä tutkimuksessa on osoitettu lyhyen näköhavainnon lisäävän halua syödä kyseistä ruokaa ja koehenkilöt myös söivät usein yli kylläisyyspisteen. Tulokset kuitenkin vaihtelivat hyvin suuresti yksilöiden välillä, mikä osoitti ylisyytymisen olevan hyvin yksilöllistä. [4.] Tästä hyvänä esimerkkinä on Pavlovin koira, joka oli ehdollistettu tuottamaan kuolaa kellon soidessa [5]. Hormonaalisista tekijöistä tärkeimmät ovat leptiini, greliini, insuliini ja tietyt neuropeptidit.

Leptiini, jota muodostuu pääasiassa rasvakudoksessa, osallistuu ruokahalunsäätelyyn vähentäen näläntunnetta. Leptiini erittyy rasvakudoksesta verenkiertoon. Se signaloi verenkierron välityksellä aivoille, erityisesti hypothalamukselle, elimistön energiavaraston määrästä. Leptiinin korkea määrä veressä kertoo aivoille rasvavarastojen olevan riittävän suuret, jolloin näläntunne pienenee ja elimistö käyttää enemmän omia rasvavarastojaan. Tämän pitkän aikavälin säätelyn ohella leptiinillä on todettu olevan myös lyhyen aikavälin vaikutusta ruokahaluun. Vatsalaukku erittää myös pieniä määriä leptiiniä, ja tämän epäillään hillitsevän syödyn ruoan määrää ja aiheuttavan kylläisyyden tunnetta. [6; 7.]

Grelinin vaikutus ruokahalun säätelyyn on päinvastainen kuin leptiinin. Greliniä erittyy vatsalaukusta ennen aterioita, mutta syöminen jälkeen sen eritysvähenee. Myös greliini vaikuttaa verenkierron välityksellä hypothalamukseen. Grelinin vaikutuksesta nälkä kasvaa ja elimistön energiavarastot suurenevat. Grelini vaikuttaa myös aivolisäkkeen kasvuhormonin eritykseen. Lyhyen aikavälin vaikutuksen lisäksi sillä on myös pitkän aikavälin vaikutuksia. Grelini osallistuu elimistön painon säätelyyn yrittämällä pitää sen vakiona. [6.]


Insuliini, jota muodostuu haiman  $\beta$ -soluissa, vaikuttaa ruokahaluun hyvin samantavalla tavalla kuin leptiini. Myös insuliini vaikuttaa hypothalamukseen signaloimalla elimistön rasvavarastojen määrästä vähentäen näläntunteen määrää. Uusien tutkimusten mukaan

insuliini ja leptiini saattavat olla osallisia hyvinvointitunteen säätelyyn, jonka jotkut ruoat saavat aikaan. [7.]

Keskushermoston hypotalamus, aivorunko ja palkitsemiskeskukset osallistuvat ruokahalun säätelyyn pääasiallisesti erittämällä neuropeptidejä. Hypotalamuksen ventromediaalinen hypotalaaminen tumake, lateraalinen hypotalaaminen tumake sekä *nucleus arcuatus* osallistuvat ruokahalun säätelyyn joko positiivisesti tai negatiivisesti. Ventromediaalinen hypotalaaminen tumake toimii ”kylläisyyskeskuksena” ja lateraalinen hypotalaaminen tumake ”nälkäkeskuksena”. *Nucleus arcuatus* toimii energisen homeostaasin ylläpitäjänä. Verenkierron hormonaaliset signaalit välittyvät sinne, koska sillä ei ole veri-ai-voestettä suojana. Sillä on kahden tyyppisiä neuroneita, jotka säatelevät näläntunnetta. Toinen näistä vähentää näläntunnetta erittämällä neuropeptidejä, pro-opiomelanokorttiinia (POMC) ja kokaiini- ja amfetamiini-säänneltyä kääntäjää (CART) ja toinen lisää näläntunnetta erittämällä neuropeptidi Y:tä (NPY) ja AgRP:tä (agouti-related peptide). [8.]

## 2.2 Asetyylikoliini ja kolinergiset hermosolut

Asetyylikoliini toimii monien synapsien ja hermopäätteiden välittäjäaineena, kuten autonomisen hermoston synapsien ja keskushermoston synapsien sekä parasympaattisten hermopäätteiden ja hermo-lihasliitosten välittäjäaineena [9]. Kuvassa 1 on asetyylikoliinin rakennekaava, molekyylipaino ja tunnistenumerot.

Kemiallinen kaava	$C_7H_{16}NO_2^+$	CAS	51-84-3	
Moolimassa	146.21 g/mol	EC Number	200-128-9	

Kuva 1: Asetyylikoliini ja sen perustiedot [10.]

Asetyylikoliinisolut ovat nystyttömiä hermosoluja (kuva 2), joiden koko voi olla 30  $\mu\text{m}$  halkaisijaltaan [11]. Ne ovat modulaattoreita, jotka muokkaavat suurempien hermosoluryhmien toimintaa sekä toimivat myös välihermosoluina [12]. Asetyylikoliinisolun reseptorit voidaan jakaa kahteen alaluokkaan, muskariini- (mAChR) ja nikotiinireseptoreihin (nAChR). Muskariinireseptorit voidaan jakaa vielä viiteen alaryhmään (M1–M5) ja nikotiinireseptorit 12 alaryhmään ( $\alpha 2$ — $\alpha 10$  ja  $\beta 2$ — $\beta 4$ ) [13].



Kuva 2: Hiiren aivokudoksen asetyylikoliinisolujen vasta-ainevärjäys, aallonpituus 488 nm. Ylhäällä anti-ChAT-vasta-ainevärjäys 1,8x suurennos, alhaalla anti-ChAT-vasta-ainevärjäys 20x suurennos.

### 2.3 Aivoalueet

Kuvassa 3 näkyy aivojen etuosasta tutkittaviksi alueiksi valittujen *striatum*, *nucleus accumbenssin*, *olfactory tuberculen*, *septumin* ja BT:n sijainnit leikkeellä sekä leikkkeen etäisyys bregmasta. Valituilla aivoalueilla esiintyy paljon asetyylikoliinisoluja.



Kuva 3: Hiiren aivoalueiden sijainnit 1) Etäisyys bregmasta 0,86 mm A) Striatum, B) Nucleus Accumbens, C) Olfactory Tubercule, D) Septum; 2) Etäisyys bregmasta 0,14 mm A) Basal Forebrain

### 2.3.1 *Striatum*

*Striatum*in tehtäviin lukeutuu motoristen liikkeiden säätely. Tähän säätelyyn osallistuvat pääasiallisesti glutamaattihermosolut ja GABAergiset solut. [14.] Asetyylikoliinisolut, joita on 1–2 % *striatum*in hermosoluista, toimivat säätelijöinä, joiden tehtävä on tasapainottaa, heikentää tai vahvistaa *striatum*iin saapuvia hermoimpulsseja [12].

*Striatum* osallistuu myös päätöksentekoon ja palkitsemisjärjestelmän toimintaan. Testeissä on pystytty osoittamaan, että eräät tehtäväorientoituneet hermosolut aktivoituvat tavoitteeseen kohdistuvan päätöksenteon yhteydessä ja pysyvät aktiivisina aina palkinnon saantiin asti. *Striatumia* on tutkittu myös monien keskushermostosairauksien yhteydessä tunnistettaessa sairauden syntyyn johtaneita syitä. Sillä on todettu olevan osuutensa ainakin Huntingtonin taudin, pakko-oiretaudin, Touretten syndrooman, monisysteemiatriofian ja Parkinsonin taudin syntyyn. [15.]

### 2.3.2 *Nucleus accumbens*

*Nucleus accumbens* voidaan jakaa kahteen osaan, ytimeen ja kuorikerrokseen. Se sijaitsee aivoissa *striatum*in ja *olfactory tuberculen* välissä. *Nucleus accumbens* osallistuu dopamiinin erityksellä ainakin oppimiseen, motivaatioon ja päihdeongelmien syntyyn. Sillä on positiivisen palkitsemisen lisäksi myös osuus vastenmielisten asioiden ennakoimisessa. Mikäli jokin asia koetaan vastenmieliseksi ja se onnistutaan välttämään, *nucleus accumbens* vapauttaa dopamiinia ja näin vahvistaa kyseistä toimintaa. [16.] Toinen esimerkki *nucleus accumbensin* vaikutuksesta ennakoivaan toimintaan on sen osallistuminen lumelääke-vaikutuksen muodostumisessa [17]. *Nucleus accumbens*issä on myös oksitosiinireseptoreita, jotka osallistuvat äidinvaistojen syntyyn. Näiden määrä vaihtelee suuresti yksilöiden väleillä [18].

### 2.3.3 *Olfactory tubercule*

*Olfactory tubercule* on kolmikerroksinen aivojen osa, joka sijaitsee *nucleus accumbensin* alapuolella. Sen kolinergiset solut sijaitsevat pääasiallisesti Callejan saarekkeissa. *Olfactory tubercule* on myös näiden saarekkeiden, jotka ovat todellisuudessa sauvamaisia rakenteita, dopamiinisolujen kautta yhteydessä *nucleus accumbensin*. *Olfactory tuberculen* tehtäviin kuuluu hajuratoja pitkin saapuvien samanaikaisten aistimusten käsittely.

Seuraamalla hermoratoja, jotka päättyvät *olfactory tuberculeen*, on pystytty päättämään, että *olfactory tuberculella* on rooli hajujen käsittelyssä. Eräässä tutkimuksessa on osoitettu, että *olfactory tubercule* osallistuu mahdollisesti joidenkin hajujen diskriminaatioon. [19.]

*Olfactory tubercule* osallistuu myös moniaistilliseen prosessiin. Sen on havaittu yhdistävän haju-, kuulo- ja näköaisteja kokonaisuuksiksi ja eräässä ihmistutkimuksessa on huomattu äänien vaikuttavan ihmisten ruoan havainnointiin *olfactory tuberculen* kautta. Sillä on havaittu olevan myös vaikutusta käyttäytymiseen. *Olfactory tuberculen* on havaittu vaikuttavan rotilla kiihottumiseen, huomiokykyyn ja jopa liikkumiskykyyn. Sillä on myös osuus keskushermoston palkitsemis- ja motivaatiokäyttäytymiseen dopamiinisolujen välityksellä sekä suuri vaikutus riippuvuuden syntyyn. [16.]

#### 2.3.4 *Septum*

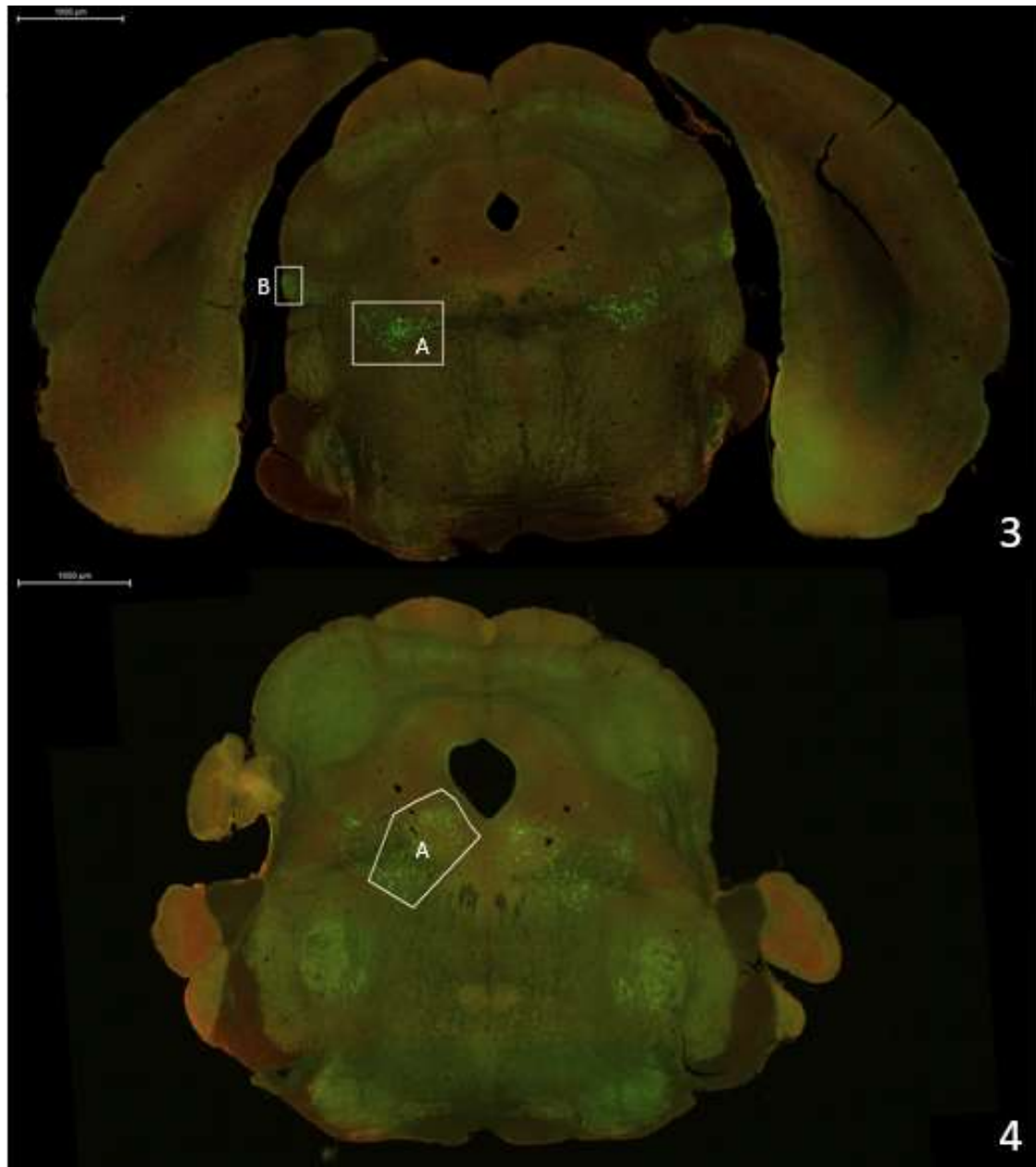
*Septumin* alueen tehtäviin kuuluu hyvinolontunteen säätely ja palkitsemisjärjestelmän avustama oppiminen. Dopamiinilla on keskeinen rooli kummassakin toiminnassa. [20.]

#### 2.3.5 *Pars basalis telencephali*

*Pars basalis telencephalista* käytetään yleisesti nimeä basal forebrain (BT). Sen eri tehtävissä ovat keskeisesti mukana asetyylikoliinisolut. Eräässä tutkimuksessa huomattiin asetyylikoliinisolujen aktivoitumisen saavan aikaan ruokahalun vähentymisen. Pitkäkestoisen (48 tuntia) aktivoimisen aikana hiirien ruokahalu pieneni huomattavasti ja lyhytkestoisella aktivoimisella ruokahalu väheni 25 %. [21.] Tutkimuksissa on myös pystytty osoittamaan, että vauriot kolinergisissä soluissa BT:n alueella saavat aikaan huomiokyvyn, keskittymisen, oppimisen ja muistin heikkenemistä [22]. BT:n asetyylikoliinisolut osallistuvat myös heräämisen ja REM-unen säätelyyn. Asetyylikoliinisolujen aktiivisuus on puolestaan erittäin vähäistä syvän unen aikana [23].

#### 2.3.6 *Pedunculopontinine tegmental nucleus*

Kuvassa 4 näkyy aivojen takaosasta tutkittaviksi alueiksi valittujen PPT:n ja LDT:n sijainnit leikkeellä sekä leikkeen etäisyys bregmasta. Kuvaan on myös merkitty *parabigeminal nucleus* (PBG), jota ei valittu lopulta mukaan.



Kuva 4: Hiiren aivoalueiden sijainnit 3) Etäisyys bregmasta -4,60 mm A) PPT, B) PBG; 4) Etäisyys bregmasta -4,96 mm A) LDT

*Pedunculopontine tegmental nucleus* (PPT) koostuu pääasiallisesti kolinergisista, glutamaati- ja GABAergisista hermosoluista. Riippuen alueesta, kolinergisia soluja on 25–75 % soluista. Ne osallistuvat vahvasti heräämisen ja REM-unen säätelyyn. [24.] PPT osallistuu myös liikkeen säätelyyn, ja sen on osoitettu olevan ainakin jossain määrin osallinen Parkinsonin taudin syntyyn. Tämä on pystytty osoittamaan kuoleman jälkeisellä ruumiinavauksella. Sillä on myös osuutensa tarkkaavaisuuteen, oppimiseen ja palkitsemisjärjestelmään. [25.]

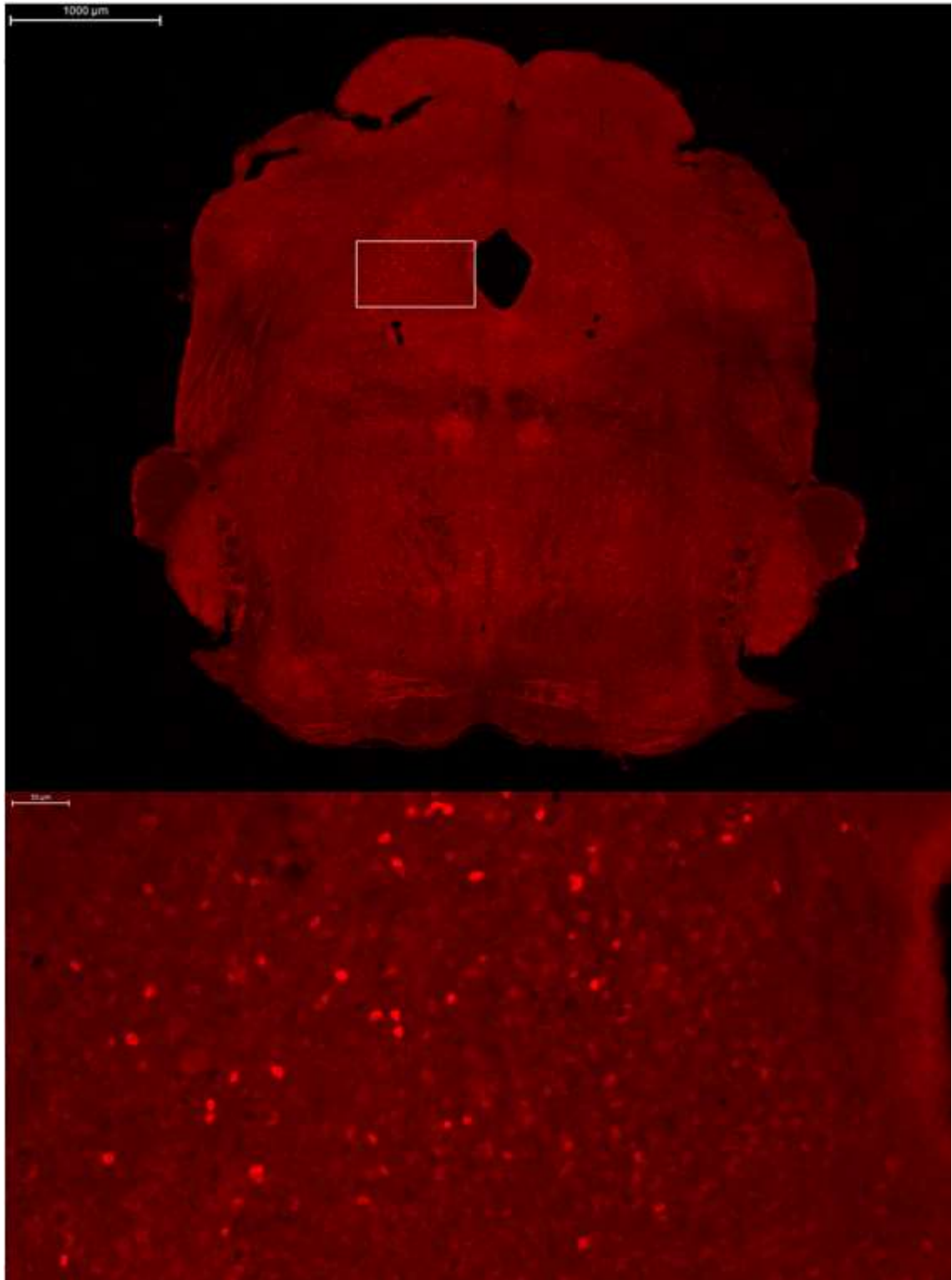
### 2.3.7 *Laterodorsal tegmental nucleus*

*Laterodorsal tegmental nucleus* (LDT) osallistuu emotionaalisen tilan säätelyyn ja toimii osana aivojen äänistä aktivoituvaa hälytysjärjestelmää [26]. Se osallistuu myös yhdessä PPT:n kanssa REM-unen säätelyyn [27].

### 2.4 c-Fos-proteiini ja hermosolun aktiivisuuden havainnointi

Proteiinia nimeltä c-Fos (cellular homologue of FBJ osteosarcoma virus) käytetään laajalti tunnistamaan hermosolun aktiivisuutta parin edellisen tunnin aikana. Kyseistä proteiinia koodaa c-fos-niminen lähetti-RNA, ja proteiini kertyy solun tumaan. Myös lähetti-RNA c-fos voidaan värjätä vasta-aineilla, mutta yleisesti käytetään c-Fos-proteiinia. Tämä johtuu lähetti-RNA:n ja proteiinin syntynopeuden erosta. Lähetti-RNA c-fos muodostuu nopeasti, ja jo 10 minuutin kuluttua geenin aktivoitumisesta se pystytään löytämään tumasta vasta-ainevärjäyksen avulla. Sen tuotannon piikki on jo 30 minuutin kohdalla, ja se laskee tämän jälkeen nopeasti. Proteiinin muodostumisessa puolestaan kestää 30 minuuttia ennen kuin se saavuttaa tarvittavan pitoisuuden tumassa, jotta se voidaan löytää (kuva 5). Sen tuotannon piikki on 30–60 minuutin kohdalla geenin aktivoitumisesta. Proteiini voidaan löytää tumasta vasta-aineita käyttämällä vielä kahdesta viiteen tuntia geenin aktivoitumisesta. Tutkijoille tämä antaa aikaa lopettaa eläimet niin, ettei ole vaaraa siitä, että nukutus aiheuttaisi aktiivisuutta tutkittavissa soluissa. [28.]





Kuva 5: Hiiren aivokudoksen c-Fos-proteiinin vasta-ainevärjäys, aallonpituus 594 nm. Ylhäällä anti-c-Fos-vasta-ainevärjäys 2x suurennos, alhaalla anti-c-Fos-vasta-ainevärjäys 15x suurennos

## 2.5 Tutkimusmenetelmät ja hiiret tutkimuksissa

Ylipainon ehkäisemiseksi on tutkittu lähes kaikkia ruokahaluun vaikuttavia amiineja (serotoniini, dopamiini, noradrenaliini ja histamiini), aminohappoja (hypotalaaminen GABA ja hypotalaaminen glutamaatti), asetyylikoliinia sekä verenkierron hormoneita (insuliini, leptiini, greliini ja peptidi YY) [29]. Hiirille tutkimuksia on suoritettu käyttämällä vasta-ainevärjäyksiä, positroniemissiotomografiaa (PET) tai elektroenkefalografiaa (EEG) ja niiltä voidaan mitata aineenvaihduntatuotteita uloshengitysilmosta tai ulosteesta. Ihmisillä tutkimuksia on suoritettu käyttäen hyväksi PET-kuvantamista ja EEG:tä. Vasta-ainevärjäyksiä ei elävillä ihmisillä voida suorittaa, koska tämä vahingoittaisi heidän aivokudostaan, mutta ruumiilla on suoritettu vasta-ainevärjäyksiä pienistä aivonäytteistä. Tutkimuksissa on käytetty hyväksi myös haastatteluja ja ruokapäiväkirjoja.

Hiiret soveltuvat ylipainon tutkimiseen hyvin, sillä niillä ylipaino aiheuttaa samanlaisia ongelmia kuin ihmisillä. Hiirillä on myös samankaltainen aivorakenne kuin ihmisillä. [30.]

## 3 Menetelmät

### 3.1 Hiiret ja ruokintakokeet

Tutkimuksessa käytetyt eläimet olivat C57BL/6J-kannan uroshiiriä, joita oli yhteensä 18. Kyseinen kanta on yleisimmin käytetty sisäsiittoinen kanta prekliinisissä tutkimuksissa. Vaikka kanta on vastustuskykyinen monille kasvaimille, ne ovat alttiita useille mutaatioille. Kanta on myös altis ruokavaliolla aiheutetulle liikalihavuudelle, tyypin 2 diabetekselle sekä valtimonkovettumataudille, jotka kaikki liittyvät lisääntyneen syömisen aiheuttamiin sairauksiin, ja siten tämä eläinmalli on validi syömisen mekanismien tutkimiseen. Kannan koko genomi on myös sekvensoitu. [31.] Taulukossa 1 on hiirten tarkemmat tiedot.

Taulukko 1: Hiiret ja ruokintaryhmä

Tunnus	Syntynyt	Ruokinta
KN001	24.2.2016	Paasto
KN002	24.2.2016	Paasto ja sen jälkeinen ruokinta
KN003	24.2.2016	Normaali
KN004	28.2.2016	Paasto
KN005	24.2.2016	Normaali
KN006	24.2.2016	Paasto ja sen jälkeinen ruokinta
KN007	24.2.2016	Normaali
KN008	24.2.2016	Paasto
KN009	24.2.2016	Normaali
KN010	23.1.2016	Normaali
KN011	23.1.2016	Paasto
KN012	23.1.2016	Paasto ja sen jälkeinen ruokinta
KN013	23.1.2016	Paasto ja sen jälkeinen ruokinta
KN014	28.2.2016	Normaali
KN015	28.2.2016	Paasto ja sen jälkeinen ruokinta
KN016	28.2.2016	Paasto ja sen jälkeinen ruokinta
KN017	1.3.2016	Paasto
KN018	1.3.2016	Paasto

Hiiret jaettiin kolmeen eri ruokintaryhmään, jotka olivat normaaliruokinta, paasto sekä paasto ja sen jälkeinen ruokinta. Normaaliruokintaryhmässä hiiret saivat jatkuvasti ruokaa. Paastoryhmässä hiiriltä otettiin ruoka pois klo 18.00 kunkin ryhmän aloituspäivänä. Hiiret olivat syömättä 26 tuntia, jonka jälkeen hiiret lopetettiin. Paaston pituudeksi valittiin 26 tuntia, koska se on hiirille pitkä aika. Hiirien painonmuutoksessa tai metabolia-arvoissa ei pitemmällä paastolla saavutettaisi juuri mitään eroa. Erään tutkimuksen mukaan hiiret kuolivat viiden päivän paaston jälkeen. Hiirille ei haluttu aiheuttaa turhaa kärsimystä. [32.] Kolmannessa ruokintaryhmässä, eli paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä, hiiriltä otettiin ruoka pois aloituspäivänä klo 18.00. Hiiret olivat syömättä 24 tuntia, jonka jälkeen ne saivat syödä kahden tunnin ajan, kunnes ne lopetettiin. Kaikilla hiirillä oli vettä saatavilla koko ajan. Ruokintakokeet suoritettiin neljässä satunnaistetussa erässä yhden viikon aikana, jotta systemaattisten virheiden määrä olisi mahdollisimman pieni. Ensimmäisen erän kokeet aloitettiin 1.6.2016 klo 18.00 ja lopetettiin seuraavana päivänä klo 20.00. Viimeinen eli neljäs erä aloitettiin 7.6.2016 klo 18.00 ja lopetettiin seuraavana päivänä klo 20.00. Kokeet aloitettiin klo 18.00 valojen sammuesssa, koska hiiret pimeäaktiivisina eläiminä syövät yöaikaan.

Hiiret punnittiin kolme kertaa kokeen aikana. Ensimmäinen punnitus tapahtui kunkin erän aloituspäivänä klo 18.00. Punnitustuloksista saatiin jokaiselle hiirelle aloituspaino. Seuraavan kerran hiiret punnittiin seuraavana päivänä klo 18.00. Kolmas punnituskerta oli juuri ennen hiirien lopetusta 26 tuntia kokeen aloituksen jälkeen klo 20.00. Myös ruoan kulutusta seurattiin punnitsemalla 24 tuntia kokeen alkamisen jälkeen niiden hiirien ruoan määrä, jotka eivät olleet paastoryhmässä. Jäljellä olevan ruoan määrä punnittiin kaksi tuntia myöhemmin. Ruoan kulutusta seurattiin vain kahdella ryhmällä, koska paastoryhmässä olleet hiiret eivät saaneet ruokaa missään vaiheessa 26 tuntia kestäneen kokeen aikana.

## 3.2 Näytteiden valmistelu

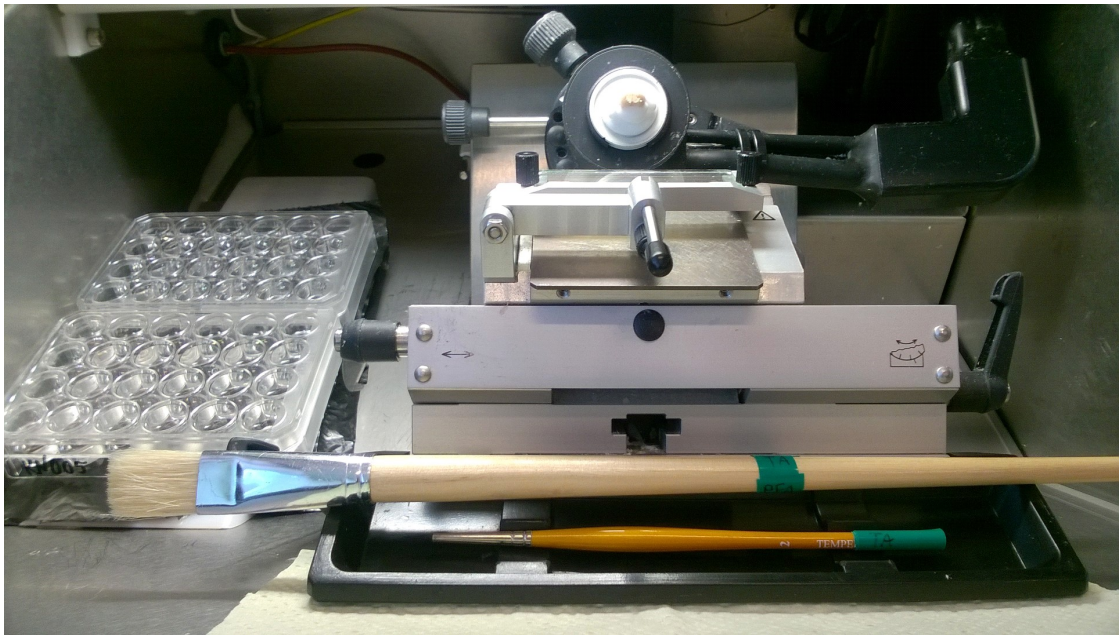
### 3.2.1 Perfusointi ja jäädytys

Ruokinnan jälkeen hiiret nukutettiin käyttäen Mebunat Vet -nukutusainetta, joka sisältää 60 mg/ml pentobarbitaalia. Kun hiiren refleksit olivat kadonneet ja syvä anestesia saavutettu, mutta sydän vielä löi, sijoitettiin pumpun syöttöneula hiiren sydämen vasempaan kammioon ja tehtiin viilto oikeaan kammioon. Näin syötettävät nesteet pääsivät kiertämään koko elimistön läpi ilman, että verisuonisto vaurioitui. Ensin hiiren suonistoon pumpattiin PBS-liuosta, jolla saatiin pestyä veret pois kudoksista. Tämän jälkeen kudoksiin syötettiin 4-prosenttista paraformaldehydiliuosta, jolla kudokset saatiin jähmettymään. Kun hiiren raajat ja häntä olivat jäykistyneet, aivot voitiin poistaa kallosta. Aivot laitettiin 4-prosenttiseen paraformaldehydiliuokseen, jonka lämpötila pidettiin lähellä 0 °C. Seuraavana päivänä aivot siirrettiin 30-prosenttiseen sukroosiliuokseen tarkoituksena poistaa aivoissa vielä ollut vesi, jotta kudokset eivät olisi vaurioituneet seuraavassa vaiheessa jääkiteiden muodostumisen vuoksi. Aivojen annettiin olla 4 °C:n lämpötilassa, kunnes ne upposivat pohjalle.

Aivojen jäädyttämiseen käytettiin kiinteää hiilidioksidia, jonka avulla saavutettiin noin -80 °C:n lämpötila. Näin aivot saatiin jäädytettyä mahdollisimman nopeasti. Ensin aivot upotettiin muutamaksi sekunniksi noin -40 °C:n isopentaaniin tarkoituksena jäädyttää aivojen pintaosa nopeasti säilyttäen näin aivojen luontainen makroskooppinen muoto. Tämän jälkeen aivot laskettiin -80-asteiselle metallilevyille, jossa aivojen annettiin olla, kunnes ne olivat jäätyneet kokonaan. Lopuksi aivot käärittiin parafiinikalvon sisälle ja ne peitettiin foliolla. Tämän jälkeen aivot säilytettiin pakastimessa -20 °C:n lämpötilassa.

### 3.2.2 Kryostaattileikkaus

Kryostaattileikkaus suoritettiin Leica CM3050S -kryostaatilla (kuva 6). Jäädetyt aivot kiinnitettiin liimaamalla näytealustaan. Alustaa pystyttiin säätämään, jotta aivot saatiin mahdollisimman suoraan. Leikkeen paksuudeksi valittiin 40 µm. Leike jäi metallialustan ja lasin väliin, jolloin se pysyi sileänä.



Kuva 6: Leica CM3050S kryostaattileikkuri

Leike siirrettiin metallilevyltä jäätymisenestoaineeseen, jossa oli 50 % PBS-liuosta, 25 % etyleeniglykolia ja 25 % glyserolia, käyttäen ohutkärkistä pensseliä. Yhdestä aivosta saatiin 96 leikettä. Koko laitteen sisätila pidettiin -20 °C:ssa.

### 3.2.3 Vasta-ainevärjäys

Värjäys aloitettiin pesemällä leikkeet kuusikuoppalevyssä PBS-liuoksella (tarkemmat ajat ja määrät liite 1:ssä). Pesu PBS-liuoksella suoritettiin aina ennen seuraavaa vaihetta, paitsi blokkauksen ja primäärivasta-aineliuotuksen välissä. Seuraavaksi leikkeet lämmitettiin eppendorffputkissa 80 °C:ksi sitraattiliuoksessa (taulukko 2). Tämän jälkeen leikkeitä liuotettiin 24-kuoppalevyssä yksi tunti blokkauслиuoksessa. Ensimmäisen päivän loppuun leikkeet siirrettiin anti-cFos-primäärivasta-aineliuokseen, jossa leikkeiden annettiin olla 4 °C:ssa 24 tuntia. Vasta-aineet (taulukko 3) laimennettiin aina blokkauслиuokseen.



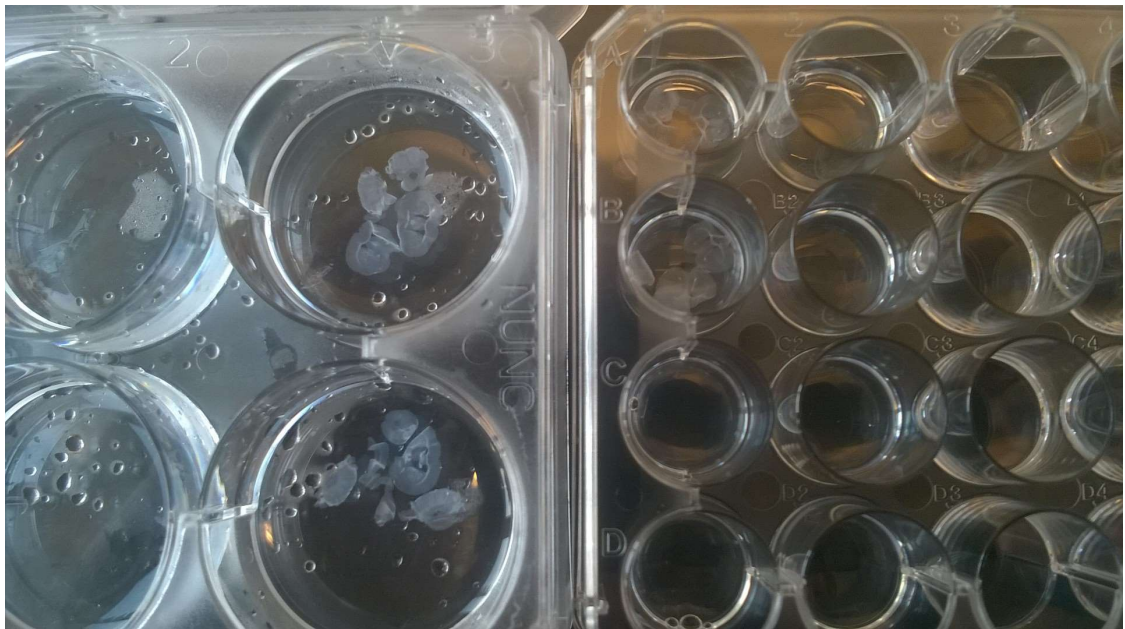
Taulukko 2: Vasta-ainevärijäyksen liuosten valmistuksessa käytetyt aineet

PBS	Blokkausliuos	Sitraattiliuos
1,3 M NaCl	3 % bovine serum albumin (BSA)	10 mM sitraatti, pH 8,5
70 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 % donkey serum	
30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3% Triton	
	PBS	

Taulukko 3: Vasta-ainevärijäyksen vasta-aineet

	cFos	ChAT
<b>Primaari</b>	rabbit anti-cFos, sc-52 Santa Cruz	goat anti-ChAT, AB144P, Millipore
<b>Sekundari</b>	donkey anti-rabbit 594, ab150076, Abcam	donkey anti-goat 488, A-11055, Life Technologies

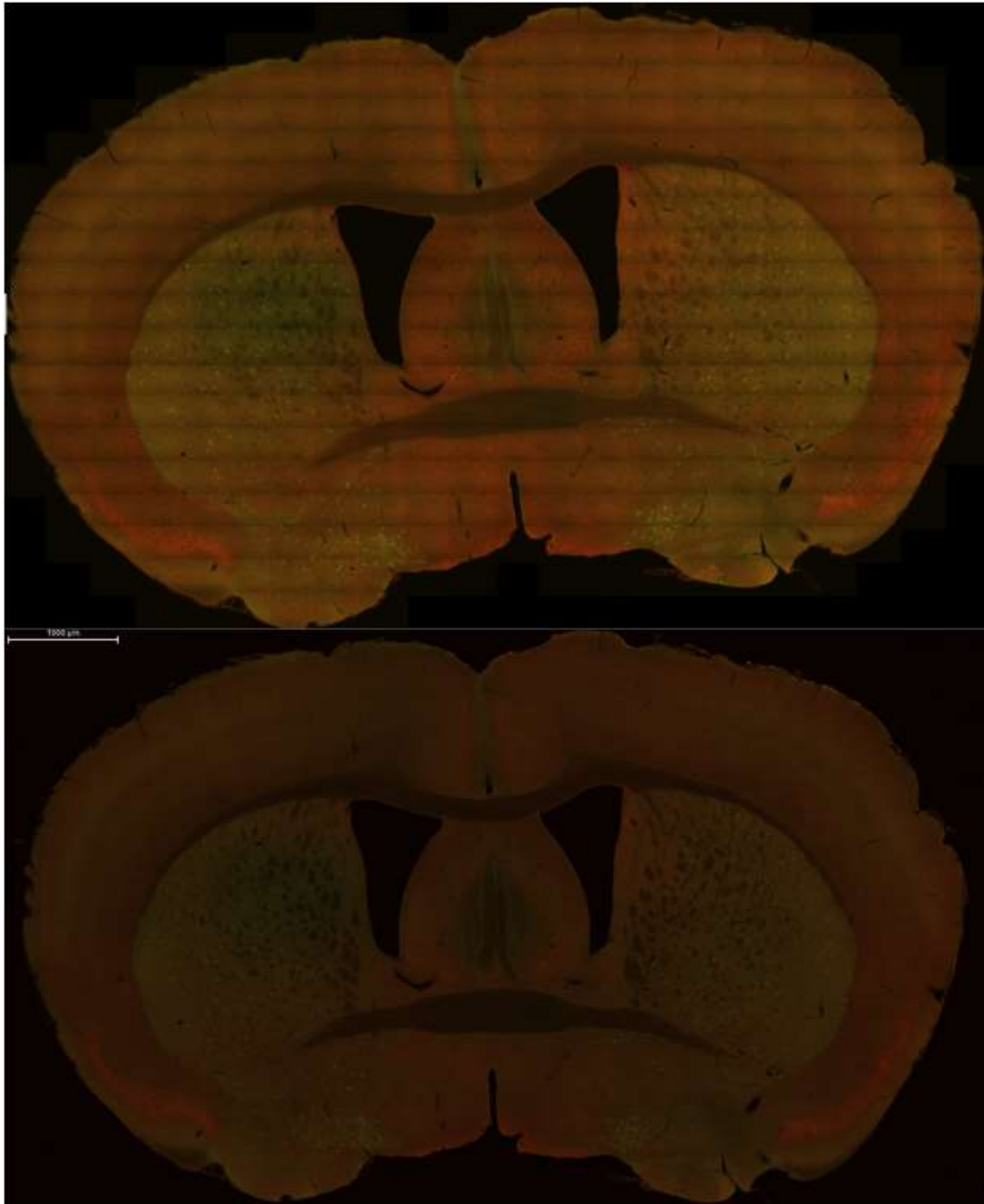
Toisena päivänä leikkeet siirrettiin pesun jälkeen anti-ChAT-primäärivasta-aineliuokseen ja niiden annettiin olla 4 °C:ssa yli yön. Kolmantena päivänä leikkeet siirrettiin pesun jälkeen 24-kuoppalevyille (kuva 7), jossa joka kuopassa oli molemmat sekundaarivasta-aineet samassa liuoksessa. Leikkeiden annettiin olla kaksi tuntia huoneenlämmössä valolta suojattuna. Kaikki inkuboinnit suoritettiin käyttäen levysekoittajaa. Viimeisenä vaiheena leikkeet siirrettiin pesun jälkeen näytelasille ja peitettiin peitinlasilla. Näyte- ja peitinlasin väliin laitettiin Calbiochemin FluorSave-kiinnitysainetta, jolla lasit saatiin kiinnittymään toisiinsa ja parantamaan näytteiden kuvaamista sekä suojaamaan fluoresoivia sekundäärivasta-aineita. Valmiit näytteet säilytettiin 4 °C:ssa valolta suojattuna.



Kuva 7: Vasemmalla 6-kuoppalevy, oikealla 24-kuoppalevy. Leikkeiden pesu suoritettiin 6-kuoppalevyllä ja muut reaktiot 24-kuoppalevyllä

### 3.3 Fluoresenssimikroskopointi, kuvankäsittely ja solujen laskenta

Leikkeet kuvattiin ensin käyttäen Zeiss Axio Imager -mikroskooppia. Kyseisellä mikroskoopilla yhden leikkeen kuvaamiseen kului aikaa noin 15 minuuttia, koska aivoleikekuva muodostuu 20-kertaisella suurennoksella lähes 300 yksittäisestä kuvasta. Lisäksi yhteen liitettyjen kuvien saumat muodostavat tummempia viivoja kokonaiskuvaan. Tämä näkyy hyvin kuvassa 8 ylhäällä.



Kuva 8: Hiiren aivokudosleikkeen vasta-ainevärjäys. Ylhäällä: Zeiss Axio Imager, kuvien liitokset näkyvissä, alhaalla: 3DHitech Panoramic 250 FLASH II, kuvan laatu tasainen.

Kuvaamisen keston ja laadun takia mikroskoopiksi valittiin Helsingin yliopiston Geenibiologian osaston 3DHistech Pannoramic 250 FLASH II digitaalinen objektilasiskanneri. Kuvien ottamiseen kulunut aika lyheni ja kuvan laadusta tuli parempi, mutta laitteen käyttö tuli taloudellisesti kalliimmaksi.

3DHistech Pannoramic 250 FLASH II:lla kuvatuista aivoleikkeistä rajattiin aivoalueet ja kopioitiin TIFF-muotoon. Aivoaluekuvat toimitettiin Biomedicum kuvantamisyksikköön tohtori Ville Rantaselle, joka suoritti solujen laskennan itse ohjelmoimallaan kuvankäsittelyohjelmalla annettujen laskentaparametrien mukaisesti.

### 3.4 Vasta-ainevärjäysmenetelmän optimointi testivärjäyksillä

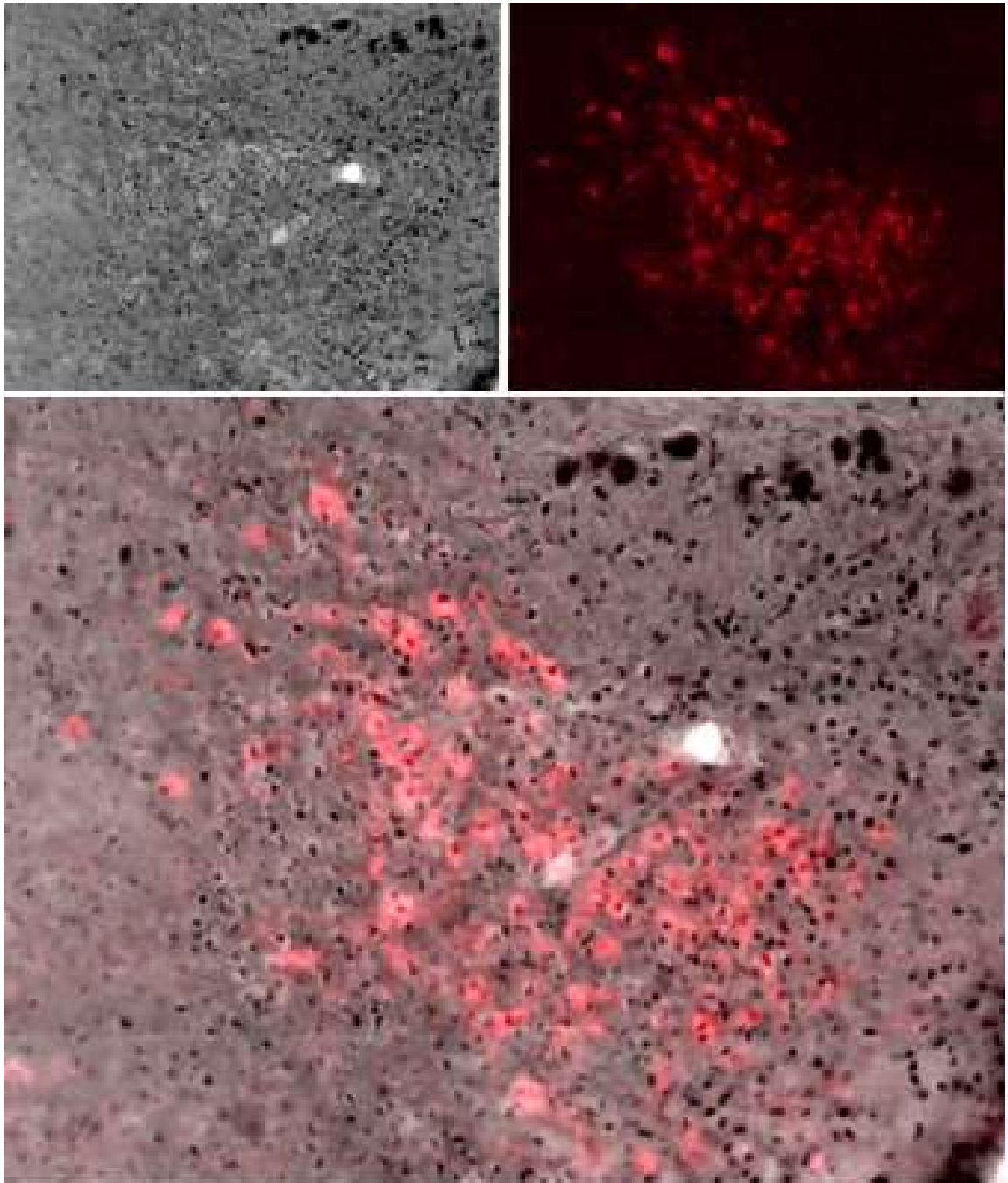
Ennen varsinaisten vasta-ainevärjäysten aloittamista testattiin vasta-ainevärjäysmenetelmää, jossa molemmat primaarivasta-aineet olivat yhtä aikaa inkuboitumassa samassa kuopassa (tarkat ohjeet sekä käytetyt reagenssit ja liuokset liite 2:ssa). Tätä oli käytetty onnistuneesti muutamassa aiemmassa tutkimuksessa. Kyseisen menetelmän toteuttaminen kesti kaksi päivää. Vasta-ainevärjäys aloitettiin pesemällä leikkeet PBS-liuoksella. Pesu PBS-liuoksella suoritettiin aina ennen seuraavaa vaihetta, paitsi blokkauksen ja primäärivasta-aineliuotuksen välissä. Tämän jälkeen näytteiden annettiin olla 30 min 80 °C:ssa sitraattiliuoksessa, jonka jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi. Seuraavaksi leikkeet laitettiin blokkauслиuokseen tunniksi. Tämän jälkeen leikkeet siirrettiin primaarivasta-aineliuokseen (goat anti-ChAT AB144P, Millipore ja rabbit anti-cFos sc-52, Santa Cruz) yön yli 4 °C:ssa. Seuraavana päivänä leikkeet siirrettiin sekundaarivasta-aineliuokseen (donkey anti-rabbit 594 ab150076, Abcam ja donkey anti-goat 488 A-11055, Life Technologies) kahdeksi tunniksi. Lopuksi leikkeet siirrettiin pesun jälkeen näytelasille ja peitettiin peitinlasilla. Näyte- ja peitinlasin väliin laitettiin Calbiochemin FluorSave-kiinnitysainetta.

Ensimmäinen vaihe oli löytää syy asetyylikoliinisolujen punaiseksi värjäytymiseen. Sen toteuttamiseksi järjestettiin testivärjäys, jossa aina yhteen kahden leikkeen kuoppaan tuli eri yhdistelmä primaari- ja sekundaarivasta-aineita. Vasta-ainevärjäys suoritettiin käyttäen samaa menetelmää (liite 2) sekä samoja vasta-aineita kuin edellisessä vaiheessa. Ainoana erona oli, ettei kaikkia vasta-aineita laitettu kaikkiin kuoppiin. Yhteen kuoppaan laitettiin asetyylikoliinisolujen primaarivasta-aine ja sille c-Fos-proteiinin sekundaarivasta-aine sekä toiseen kuoppaan päinvastoin. Lopuissa neljässä kuopassa jätettiin yksi



neljästä primaari- ja sekundaarivasta-aineesta pois, että yhdessä kuopassa oli kolme neljästä vasta-aineesta paikalla ja kaikki yhdistelmät saatiin aikaiseksi.

Toinen vaihe oli löytää toimiva menetelmä. Tällä kertaa toinen vasta-aineista ei ollut fluo-  
resoiva, vaan käytettiin nikkeliä sisältävää DAB-menetelmää. DAB-värjäyksessä (liite 3)  
tutkittava kohde muuttuu tummaksi, eikä päästä kirkaskenttämikroskopoinnissa valoa  
läpi kovin hyvin, jolloin kohde havaitaan kuvassa tummana pisteenä (kuva 9).



Kuva 9: Hiiren aivokudoksen vasta-ainevärjäys. Ylhäällä vasemmalla: DAB-vasta-ainevärjäys, ylhäällä oikealla: anti-ChAT 647 -vasta-ainevärjäys, alhaalla: yhdistelmäkuva

DAB-menetelmä aloitettiin pesemällä leikkeet. Pesu PBS-liuoksella suoritettiin myös tässä menetelmässä aina ennen seuraavaa vaihetta, paitsi blokkauksen ja primaarivasta-aineliuotuksen välillä. Tämän jälkeen leikkeiden annettiin olla yksi tunti vetyperoksidissa. Seuraavaksi leikkeet siirrettiin blokkauслиuokseen yhdeksi tunniksi, jonka jälkeen leikkeet inkuboitettiin primaarivasta-aineessa (rabbit anti-cFos sc-52, Santa Cruz), johon lisättiin kaksi tippaa biotiinia. Leikkeiden annettiin olla yön yli 4 °C:ssa. Seuraavana päivänä leikkeet inkuboitettiin sekundaarivasta-aineessa (horse biotinylated anti-rabbit BA-1100, Vector Laboratories) kaksi tuntia. Seuraavaksi leikkeitä inkuboitettiin tunnin ajan ABC-liuoksessa (Vector Laboratories). Tämän jälkeen leikkeet siirrettiin ABC-liuos kitin mukana tulleeeseen nikkelpitoiseen reagenssiin noin viideksi minuutiksi. Kesto määräytyi sen mukaan, kuinka tummiksi näytteet halusu. Seuraavaksi leikkeet blokattiin anti-ChAT-primaarivasta-ainetta varten yksi tunti. Leikkeitä inkuboitettiin primaarivasta-aineessa (goat anti-ChAT AB144P, Millipore) yön yli 4 °C:ssa. Kolmantena päivänä leikkeitä inkuboitettiin sekundaarivasta-aineessa (donkey anti-goat 647 ab150131, Abcam) kaksi tuntia, jonka jälkeen leikkeet siirrettiin näytelasille ja peitettiin peitinlasilla. Näyte- ja peitinlasin väliin laitettiin Calbiochemin FluorSave-kiinnitysainetta.

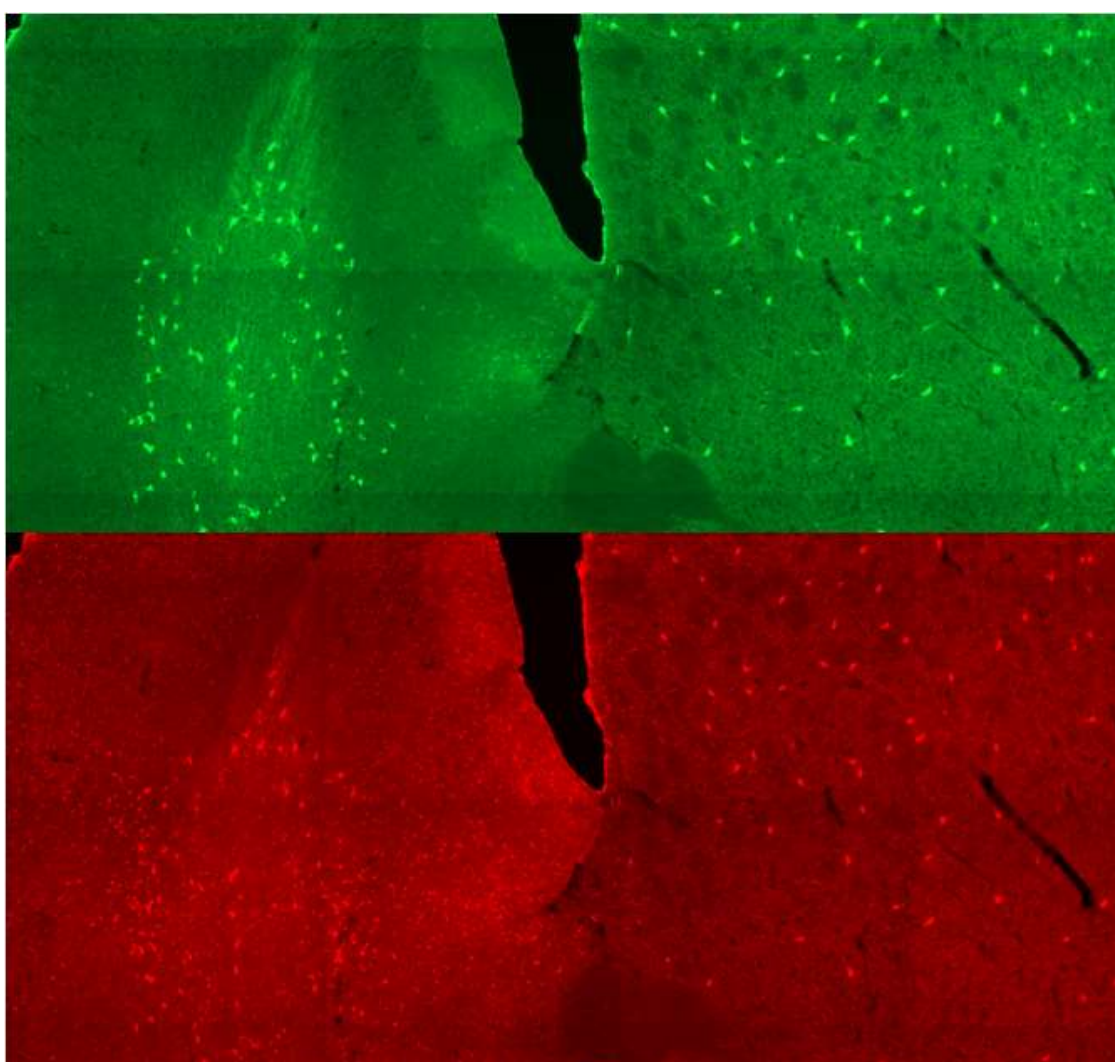
Kolmannen vaiheen testivärjäyksessä käytettiin uutta primaarivasta-ainetta c-Fos-proteiinille. Tätä vasta-ainetta oli käytetty aiemmin muutamassa kokeessa onnistuneesti. Menetelmän molemmat vasta-aineet olivat fluoresoivia, joten vaiheet olivat samat kuin ensimmäisessä vasta-ainevärjäyksessä (liite 2). Ainoa ero oli käytetyt vasta-aineet. Primaarivasta-aine asetyylikoliinisoluille oli sama, mutta c-Fos-proteiinin primaarivasta-aine oli rabbit anti-cFos PC05. Sekundaarivasta-aineet olivat donkey anti-goat 647 ab150131 asetyylikoliinisoluille ja donkey anti-rabbit 488 ab150073 c-Fos-proteiinille.

Neljännessä vaiheessa testivärjäyksenä käytettiin alkuperäisiä vasta-aineita, mutta tällä kertaa inkuboitettiin näytteet ensin c-Fos-proteiinin primaarivasta-aineessa 3–10 tuntia. Ensimmäisessä kuopassa leikkeet olivat 3 tuntia c-Fos-proteiinin primaarivasta-aineessa, jonka jälkeen leikkeet pestiin ja siirrettiin inkuboitumaan asetyylikoliinisolujen primaarivasta-aineeseen yön yli. Kaksi muuta kuoppaa olivat menetelmältään muuten samat, paitsi että näytteitä inkuboitettiin toisessa kuopassa ensin kuusi tuntia c-Fos-proteiinin primaarivasta-aineessa ja kolmannessa kuopassa 10 tuntia. Menetelmä oli lähes täysin sama kuin lopulliseen vasta-ainevärjäykseen käytetty menetelmä (liite 1). Ainoana erona oli primaarivasta-aineiden inkubointiin käytetty aika.

## 4 Tulokset

### 4.1 Vasta-ainevärjäysmenetelmän optimoinnin tulokset

Valitun menetelmän ensimmäisessä testikuvassa, jossa nähtiin molemmat vasta-aineet, huomattiin ongelma. Asetyylikoliinisolut olivat värjäytyneet sekä vihreällä että punaisella ja c-Fos-proteiini oli värjäytynyt vain punaisella. Jostakin syystä c-Fos-proteiinille tarkoitettut primaari- ja sekundaarivasta-aineet olivat värjänneet myös asetyylikoliinisolut punaisiksi (kuva10).



Kuva 10: Hiiren aivokudoksen vasta-ainevärjäys. Ylhäällä anti-ChAT 488 -vasta-ainevärjäys, kuvassa asetyylikoliinisolut värjäytyneet vihreiksi. Alhaalla anti-c-Fos 594 -vasta-ainevärjäys. Kuvassa c-Fos-proteiini ja asetyylikoliinisolut värjäytyneet punaisiksi, asetyylikoliinisolujen ei pitäisi näkyä punaisella.

Ensimmäisen vaiheen kuvista havaittiin, että asetyylikoliinisolut värjäytyivät punaisiksi ainoastaan silloin, kun primaarivasta-aineet olivat molemmat samaan aikaan paikalla ja käytettiin c-Fos-proteiinin sekundaarivasta-ainetta. Tästä pääteltiin, että c-Fos-proteiinin primaarivasta-aine tarttuu asetyylikoliinisolun primaarivasta-aineeseen eikä näin peseydy pois asetyylikoliinisolusta, ja näin c-Fos-proteiinin sekundaarivasta-aine päätyy myös asetyylikoliinisoluun.

Toisen vaiheen kuvista huomattiin, että menetelmän hyvänä puolena oli c-Fos-proteiinin erottuminen kuvasta hyvin. ChAT-värjäykseen olisi voinut myös käyttää vasta-ainetta, joka fluoresoi 647 nm:n aallonpituudella, jolla on vähemmän taustaväriä kuin 488 nm:n ja 594 nm:n aallonpituuksilla. Huonona puolena oli DAB-värjäyksen kesto sekä värjäyksessä että kuvaamisessa. Myös nikkelpitoisen reagenssin reagointiaika oli hyvin tarkka, noin minuutin tarkkuudella, muutoin näytteet tummuivat liikaa ja kuvaaminen ei olisi onnistunut kunnolla. Koska leikkeitä värjättiin 32 samalla kertaa, joista neljä leikettä oli samassa 24-kuoppalevyn kuopassa, leikkeiden nostaminen kuopista nopeassa tahdissa oli melko hankalaa ja riski näytteiden liialliseen tummumiseen oli liian suuri. Menetelmä kesti kokonaisuudessaan kolme päivää. Edellä mainittujen syiden johdosta kyseinen menetelmä ei soveltunut varsinaisten vasta-ainevärjäysten suorittamiseen. Taulukossa 4 on eri vaiheissa käytetyt vasta-aineet ja menetelmän toimivuus.

Taulukko 4: Käytetyt vasta-aineet vaiheittain ja toimivuus

Vaihe	Primaarivasta-aineet	Sekundaarivasta-aineet	Toimivuus
1	ACh: goat anti-ChAT, Millipore, AB144P c-Fos: rabbit anti-cFos, Santa Cruz, sc-52	ACh: donkey anti-goat 488, Life Technologies, A-11055 c-Fos: donkey anti-rabbit 594, Abcam, ab150076	ACh solut värjäytyivät sekä punaisella että vihreällä. Ei toiminut.
2	ACh: goat anti-ChAT, Millipore, AB144P c-Fos: goat anti-cFos, Santa Cruz, sc-52G	ACh: donkey anti-goat 647, Abcam, ab150131 c-Fos: horse biotinylated anti-goat, Vector, #BA-9500	Kesto pitempi ja kuvien laadun heikkenemisen riski. Ei toiminut.
3	ACh: goat anti-ChAT, Millipore, AB144P c-Fos: rabbit anti-cFos, PC05, Millipore	ACh: donkey anti-goat 647, Abcam, ab150131 c-Fos: donkey anti-rabbit 488, Abcam, ab150073	PC05 vasta-aine värjäsi epäsäännöllisesti ja laatu oli heikko. Ei toiminut.
4	ACh: goat anti-ChAT, Millipore, AB144P c-Fos: rabbit anti-cFos, Santa Cruz, sc-52	ACh: donkey anti-goat 488, Life Technologies, A-11055 c-Fos: donkey anti-rabbit 594, Abcam, ab150076	Ei ongelmia. Primaarivasta-aineet eri aikaan. Toimi.

Kolmannen vaiheen menetelmän kesto oli kaksi päivää, eikä siinä ollut suurta riskiä epäonnistua. Valitettavasti tämä vasta-aine ei toiminut leikkeillä toivotulla teholla, joten jouduttiin miettimään vielä neljättä menetelmää.

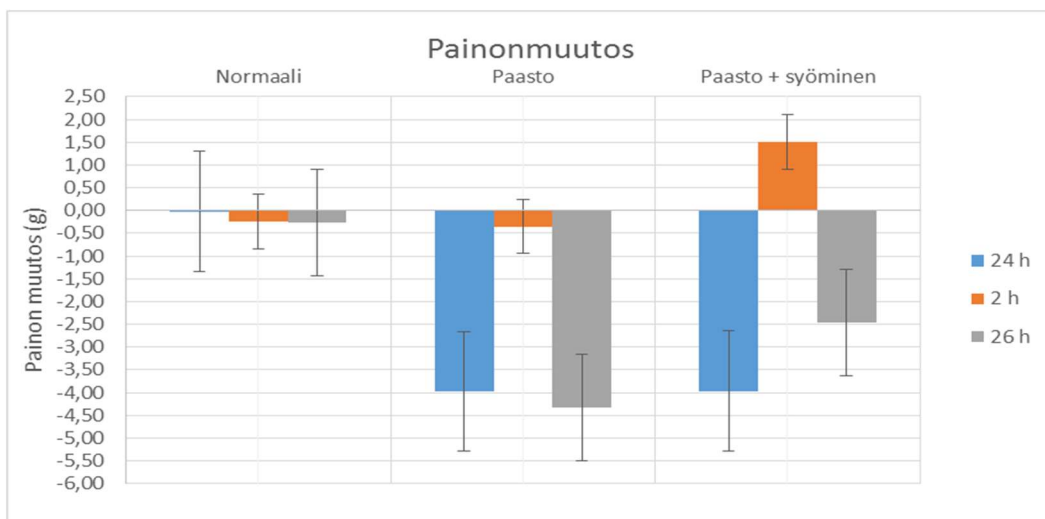
Neljännän vaiheen tulokset näyttivät sitä paremmilta, mitä pitempään leikkeet olivat c-Fos-proteiinin vasta-aineessa. Lopulta päädyttiin käyttämään menetelmää, jossa leikkeet olivat ensin c-Fos-proteiinin primaarivasta-aineessa noin 24 tuntia, jonka jälkeen näytteet pestiin ja siirrettiin asetyylikoliinisolujen primaarivasta-aineeseen inkuboitumaan yön yli.

## 4.2 Punnitustulokset

### 4.2.1 Hiirten painon muutos

Hiiret (kuusi hiirtä per ryhmä) punnittiin ennen ruokintakokeen alkua klo 18.00 juuri ennen valojen sammumista. Vaikka hiirien painojen välillä oli jonkin verran vaihtelua, se ei ollut kovin suurta. Hiirien alkupaino vaihteli välillä 26,0–33,3 grammaa. Välipunnitus tapahtui 24 tuntia myöhemmin. Punnitus tehtiin jälleen juuri ennen valojen sammumista. Tällä kertaa havaittiin jo selvää eroa painojen muutoksissa eri ryhmissä. Normaaliiruokintaryhmässä painot pysyivät melko samoina. Muutosta oli vain joitakin gramman kymmenyksiä kumpaankin suuntaan. Suurimmillaan paino muuttui tässä ryhmässä -0,6 grammaa. Paastoryhmässä sekä paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä ei havaittu silmiinpistävää eroa. Näissä ryhmissä paino laski kaikilla hiirillä ja muutos oli välillä 1,7–4,9 grammaa. Kolmas punnitus suoritettiin kaksi tuntia välipunnituksen jälkeen klo 20.00. Tällöin eroa syntyi muihin ryhmiin verrattuna ainoastaan paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä, jossa paino oli noussut kaikilla hiirillä 1,1–1,8 grammaa. Normaaliiruokinta- ja paastoryhmä olivat puolestaan laihtuneet 0,1–0,5 grammaa. Kaikki työn tarkat tulokset näkyvät liitteessä 4.

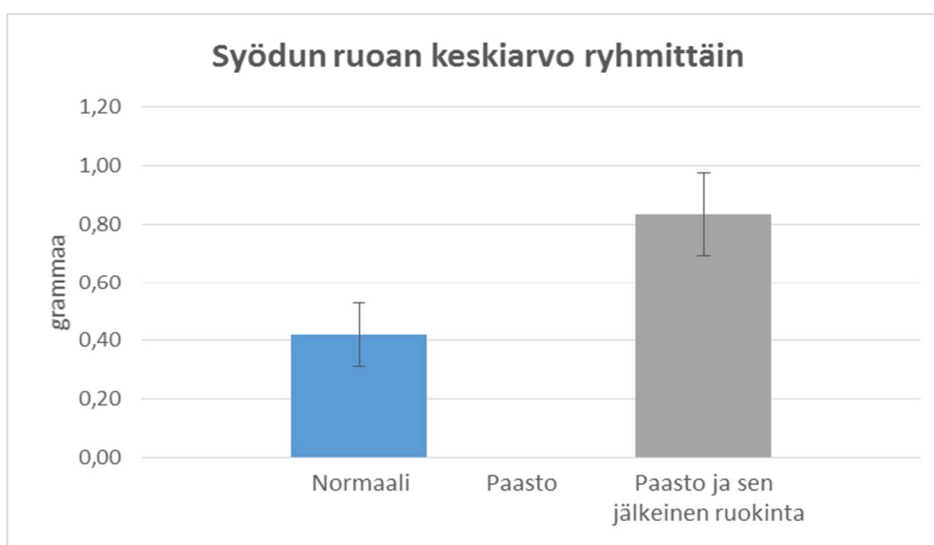
Kokonaispaino muuttui normaaliiruokintaryhmässä olleilla hiirillä alle yhden gramman, kun taas paastoryhmässä sekä paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä muutos oli noin -3...-5 grammaa. Tosin hiiri KN012 pudotti 26 tunnin aikana painoa vain 0,3 grammaa. Tämä johtui siitä, että se ei ensimmäisen 24 tunnin paaston aikana pudottanut painoa kuin 1,7 grammaa, joka oli huomattavasti vähemmän kuin muut hiiret samassa ryhmässä. Kyseinen hiiri kuitenkin söi kahden tunnin ruokinta-ajanjaksolla yhtä paljon kuin muutkin hiiret ryhmässä. Kuvassa 11 on ruokintaryhmien painonmuutosten keskiarvot.



Kuva 11: Painonmuutoksen keskiarvo (g) ryhmittäin eri aikaväleillä

#### 4.2.2 Ruoan kulutus

Ruoan määrä punnittiin ennen ja jälkeen viimeisen kahden tunnin ruokinta-ajan. Paastoryhmä ei saanut ruokaa, joten tästä ryhmästä ei ole siten ollenkaan punnitustuloksia. Normaali-ruokintaryhmässä olleet hiiret söivät kahden tunnin aikana 0,2–0,6 grammaa ruokaa, ja paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä olleet hiiret söivät samassa ajassa 0,6–1,1 grammaa ruokaa. Painon muutoksiin vaikutti myös nautitun veden määrä, jota hiiret saivat juoda halutessaan vapaasti. Veden määrän kulutusta ei seurattu, mutta lähtökohtaisesti oletettiin, ettei se vaikuta painon muutoksiin merkittävästi. Ruoan kulutuksen keskiarvot ryhmittäin ovat kuvassa 12.

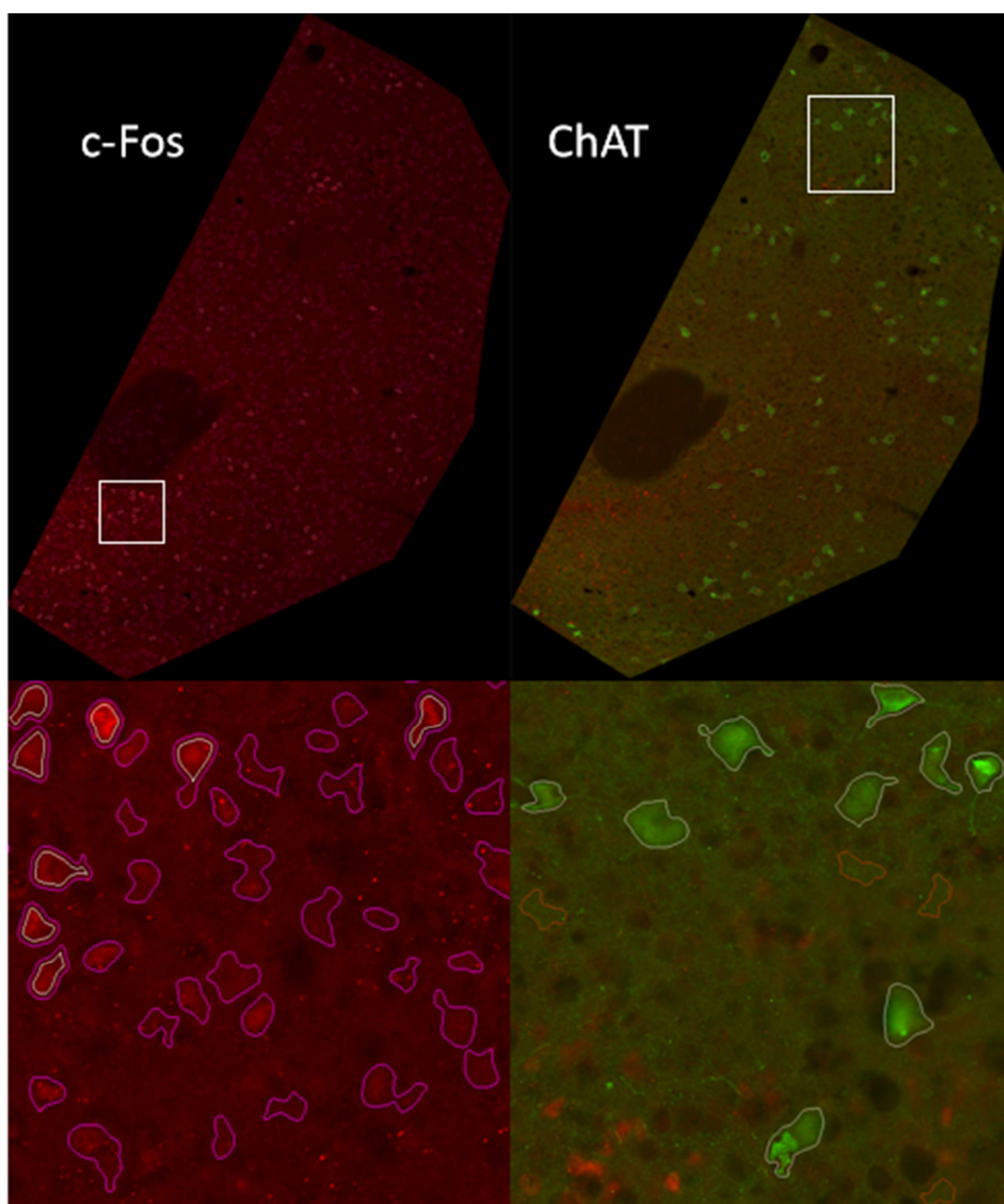


Kuva 12: Ruoankulutuksen keskiarvo (g) ryhmissä. Paastoryhmä ei saanut ruokaa kokeen aikana ollenkaan.



### 4.3 Solujen laskenta

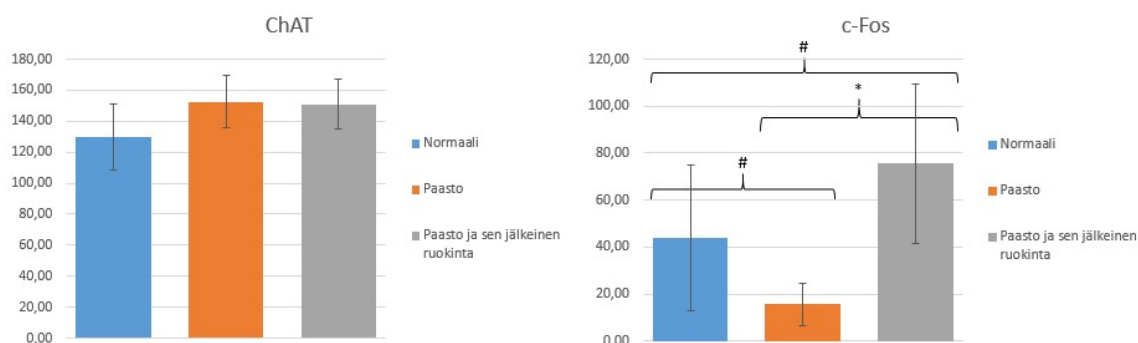
Solujen laskennassa käytettiin raja-arvoina solun kirkkautta, kokoa sekä kirkkauden suhdetta ympäröivään taustaan. Asetyylikoliinisolujen koko rajattiin kokonaisen solun suuruiseksi. Pienemmät vihreät alueet olivat todennäköisesti joko hermoratojen haarakkeita tai autofluoresoivaa taustavaloa. c-Fos proteiinin aiheuttama fluoresoiva alue rajattiin solun tumän kokoiseksi, sillä proteiini levittäytyy tumaan. Kuvassa 13 valkoisella rajatut alueet laskettiin mukaan.



Kuva 13: c-Fos- ja ChAT-solujen laskenta. Valkoisella rajatut alueet laskettu mukaan ja pinkillä (vasen) tai punaisella (oikea) värillä rajatut alueet ovat soluja, joita ei laskettu mukaan.

### 4.3.1 *Striatum*

Kuvassa 14 on vasemmalla *striatum*in asetyylikoliinisolujen keskiarvo ruokintaryhmittäin. Oikealla on c-Fos-proteiinia sisältävien solujen keskiarvo ruokintaryhmittäin ja ryhmille on suoritettu Wilcoxon-Mann-Whitney-analyysi pareittain.



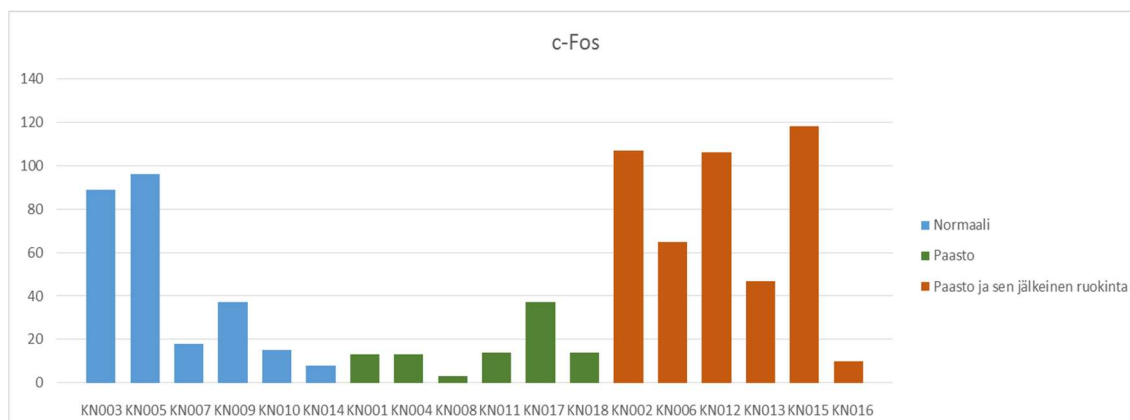
Kuva 14: *Striatum*. Solumäärien keskiarvot, vasemmalla asetyylikoliinisolut, oikealla c-Fos-proteiinia sisältävät solut. Kahden ryhmän väliset testit suoritettu Wilcoxon-Mann-Whitney-analyysillä (\* = tilastollisesti merkitsevä ero, # = tilastollisesti ei merkitsevä ero).

*Striatum*issa asetyylikoliinisolujen määrässä oli havaittavissa vaihtelua melko runsaasti eri hiiren välillä, mutta eri ruokintaryhmien välillä vaihtelu jäi melko pieneksi. Tätä osattiin odottaa, sillä oletusarvo oli, ettei 26 tuntia kestävästä ruokintakokeesta aikana asetyylikoliinisolujen määrä ehdi kasvaa merkittävästi. Tilastollinen yksisuuntainen ANOVA -analyysi myös varmisti, ettei ruokintaryhmien välillä ollut tilastollisesti merkitsevää eroa luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,188473).

*Striatum*in solujen aktiivisuudessa havaittiin selvää eroa. c-Fos-proteiinia havaittiin paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmän soluissa eniten, mutta hajonta oli suurta. Normaali-ruokintaryhmässä oli havaittavissa myös paljon hajontaa. Normaali-ruokintaryhmän vaihtelut saattavat hyvinkin johtua hiirten ruokailun ajankohdasta. Suuren soluaktiivisuuden omaavat hiiret olivat mahdollisesti syöneet juuri muutaman tunnin aikana ennen niiden lopettamista, kun taas alhaisen soluaktiivisuuden hiiret olivat syöneet useamman tunnin aikaisemmin ja olisivat ruokailleet vasta lopettamisen jälkeen. Paastoryhmässä solumäärät olivat tasaisesti alhaiset. Ryhmien väliset erot c-Fos-proteiinia sisältävien solujen määrässä pystyttiin myös osoittamaan tilastollisesti luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,02606).



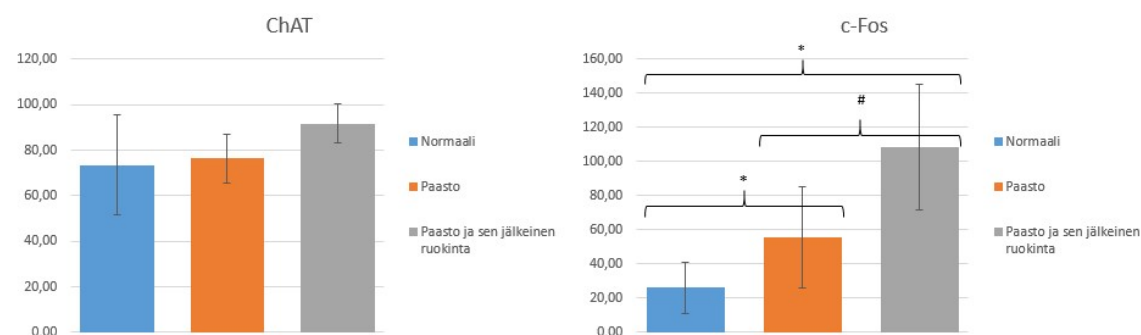
Tuloksista voitiin päätellä syömisen aiheuttavan kyseisellä alueella aktiivisuutta hermo-soluissa. Tämä oli odotettavissa, sillä *striatum* osallistuu palkitsemisjärjestelmän toimintaan vahvasti. Kuvassa 15 näkyy yksittäisten aivojen c-Fos-proteiinia sisältävien solujen määrät.



Kuva 15: c-Fos-proteiinia sisältävien solujen määrät aivoittain. Vasemmalta: 1–6 normaali, 7–12 paasto ja 13–18 paasto ja sen jälkeinen ruokinta.

#### 4.3.2 *Nucleus accumbens*

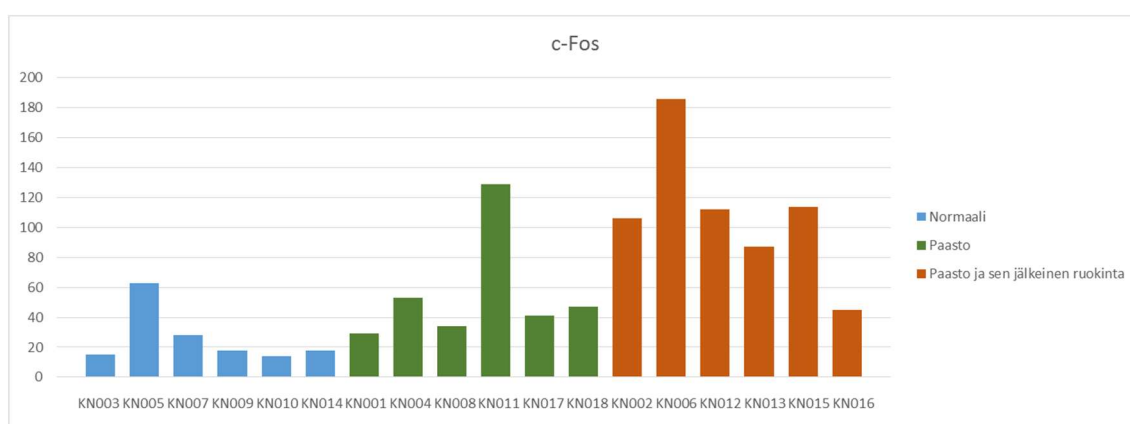
Kuvassa 16 on vasemmalla *nucleus accumbens*in asetyylikoliinisolujen keskiarvo ruokintaryhmittäin. Oikealla on c-Fos-proteiinia sisältävien solujen keskiarvo ruokintaryhmittäin ja ryhmille on suoritettu Wilcoxon-Mann-Whitney-analyysi pareittain.



Kuva 16: *Nucleus accumbens*. Solumäärien keskiarvot, vasemmalla asetyylikoliinisolut, oikealla c-Fos-proteiinia sisältävät solut. Kahden ryhmän väliset testit suoritettu Wilcoxon-Mann-Whitney-analyysillä (\* = tilastollisesti merkitsevä ero, # = tilastollisesti ei merkitsevä ero).

*Nucleus accumbens*in asetyylikoliinisolujen määrä oli lähes sama eri ruokintaryhmissä. Vaikka vaihtelua oli hieman keskiarvoissa, johtui tämä pääasiallisesti hajonnan vaihtelusta ruokintaryhmien välillä. Tilastollisesti tämä pystyttiin myös osoittamaan yksisuuntaisella ANOVALLA luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,2241).

c-Fos-proteiinia sisältävien solujen määrässä havaittiin selvää eroa eri ruokintaryhmien välillä. Vähiten niitä oli normaaliruokintaryhmässä, noin puolet enemmän paastoryhmässä, ja paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä c-Fos-proteiinia oli yli neljä kertaa enemmän kuin normaaliruokintaryhmässä. Paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmän suuri c-Fos-määrä johtuu todennäköisesti *nucleus accumbens*in osallisuudesta palkitsemisjärjestelmän toimintaan. Syy paastoryhmän suurempaan c-Fos-proteiinin määrään oli todennäköisesti alueen osuus motivaatioon sekä vastenmielisten asioiden välttelyyn. Tilastollisesti pystyttiin osoittamaan luottamusvälillä 0,05, että eri ruokintaryhmien välillä oli eroa ( $p$ -arvo = 0,003983). Kuvassa 17 näkyy yksittäisten aivojen c-Fos-proteiinia sisältävien solujen määrät.



Kuva 17: c-Fos-proteiinia sisältävien solujen määrät aivoittain. Vasemmalta: 1–6 normaali, 7–12 paasto ja 13–18 paasto ja sen jälkeinen ruokinta.

#### 4.3.3 *Olfactory tubercle*

Kuvassa 18 on vasemmalla *olfactory tubercle*n asetyylikoliinisolujen keskiarvo ruokintaryhmittäin. Oikealla on c-Fos-proteiinia sisältävien solujen keskiarvo ruokintaryhmittäin.



Kuva 18: *Olfactory tubercle*. Solumäärien keskiarvot, vasemmalla asetyylikoliinisolut, oikealla c-Fos-proteiinia sisältävät solut.

*Olfactory tuberculen* asetyylikoliinisolujen määrissä ei ollut suuria eroja, mutta silmämääräisesti paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä niiden määrä oli hieman korkeampi kuin normaaliruokintaryhmässä ja paastoryhmässä. Tilastollisesti näiden ryhmien välillä, luottamusvälillä 0,05, ei kuitenkaan ollut eroa (p-arvo = 0,795894).

c-Fos-proteiinin määrissä oli keskiarvoissa pientä eroa. Paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä proteiinia sisältäviä soluja oli lähes kaksinkertaisesti verrattuna normaaliruokintaryhmään sekä paastoryhmään, mutta ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,215779). Tämä johtui melko suuresta hajonnasta ryhmien sisällä. Mikäli hiiriä olisi ollut enemmän kuin kuusi ryhmää kohden, voisi tilastollista eroa syntyä ryhmien välille, mutta sitä ei pystytty tällä kertaa todistamaan.

#### 4.3.4 *Septum*

Kuvassa 19 on vasemmalla *septumin* asetyylikoliinisolujen keskiarvo ruokintaryhmittäin. Oikealla on c-Fos-proteiinia sisältävien solujen keskiarvo ruokintaryhmittäin.



Kuva 19: *Septum*. Solumäärien keskiarvot, vasemmalla asetyylikoliinisolut, oikealla c-Fos-proteiinia sisältävät solut.

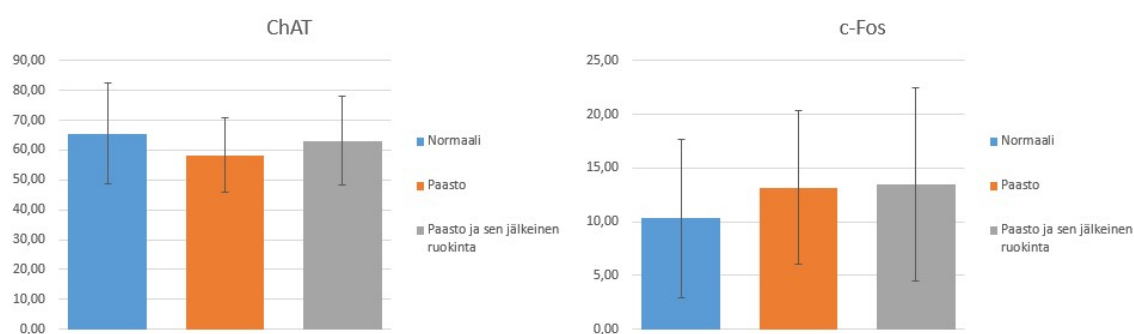
*Septumin* alueella asetyylikoliinisoluja oli keskiarvoisesti selvästi vähiten normaaliruokintaryhmän hiirillä. Paastoryhmän ja paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmän välillä ei eroa solujen määrissä suuremmin havaittu. Tilastollisesti merkitsevää eroa ei kuitenkaan havaittu ryhmien välillä luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,064395).

c-Fos-proteiinia sisältävien hermosolujen keskiarvoisissa määrissä oli silmämääräisesti merkittävää eroa. Normaaliruokintaryhmän keskiarvo oli noin 50 % pienempi kuin paastoryhmän ja paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmän. Paastoryhmän c-Fos-proteiinia

sisältävien solujen määrän olisi voinut olettaa olevan pienempi tai yhtä suuri kuin normaaliruokintaryhmän, koska kyseinen aivoalue osallistuu palkitsemisjärjestelmän toimintaan sekä hyvinolontunteen säätelyyn. Tilastollisesti ryhmien välillä ei kuitenkaan ollut merkitsevää eroa luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,165234). Tämä johtui ryhmien suuresta hajonnasta.

#### 4.3.5 *Pars basalis telencephali*

Kuvassa 20 on vasemmalla BT:n asetyylikoliinisolujen keskiarvo ruokintaryhmittäin. Oikealla on c-Fos-proteiinia sisältävien solujen keskiarvo ruokintaryhmittäin.



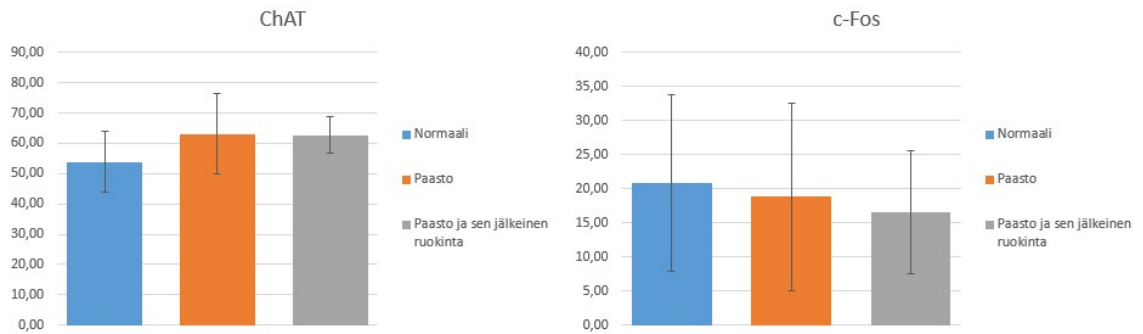
Kuva 20: Basal forebrain. Solumäärien keskiarvot, vasemmalla asetyylikoliinisolut, oikealla c-Fos-proteiinia sisältävät solut.

BT:n asetyylikoliinisolujen keskiarvot olivat lähes samansuuruiset. Yksisuuntaisella ANOVA -analyysillä ei myöskään havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,795894).

c-Fos-proteiinin määrissä ei havaittu silmämääräisesti merkittävää eroa BT:ssa eri ruokintaryhmien välillä. Pientä eroa oli havaittavissa normaaliruokintaryhmän ja paastoryhmän sekä paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmän välillä, mutta erot keskiarvoissa olivat hyvin pieniä. Tilastollisesti merkitsevää eroa ei havaittu luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,830768).

#### 4.3.6 *Pedunculopontinine tegmental nucleus*

Kuvassa 21 on vasemmalla PPT:n asetyylikoliinisolujen keskiarvo ruokintaryhmittäin. Oikealla on c-Fos-proteiinia sisältävien solujen keskiarvo ruokintaryhmittäin.



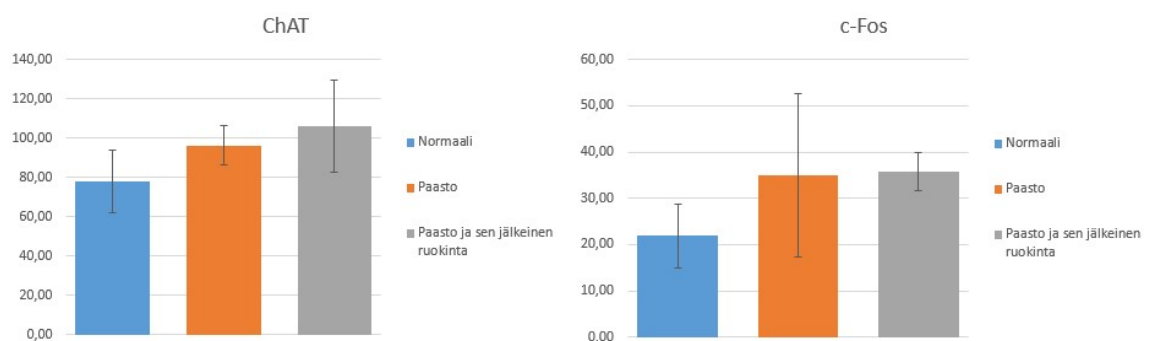
Kuva 21: PPT. Solumäärien keskiarvot, vasemmalla asetyylikoliinisolut, oikealla c-Fos-proteiinia sisältävät solut.

Asetyylikoliinisolujen keskiarvot olivat PPT:n alueella hyvin samansuuruisia. Pientä, muutaman solun eroa, oli normaaliruokintaryhmässä verrattuna kahteen muuhun ruokintaryhmään. Tilastollisesti merkitsevää eroa ei ollut ryhmien välillä luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,392496).

c-Fos-proteiinia sisältävien solujen keskiarvot olivat hyvin samansuuruiset. Suurimman keskiarvon omaavassa normaaliruokintaryhmässä oli keskimäärin 4 solua enemmän kuin pienimmän keskiarvon ryhmässä, joka oli paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmä. Tilastollisesti merkitsevää eroa ei ryhmien välillä ollut luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,882254)

#### 4.3.7 Laterodorsal tegmental nucleus

Kuvassa 22 on vasemmalla LDT:n asetyylikoliinisolujen keskiarvo ruokintaryhmittäin. Oikealla on c-Fos-proteiinia sisältävien solujen keskiarvo ruokintaryhmittäin.



Kuva 22: LDT. Solumäärien keskiarvot, vasemmalla asetyylikoliinisolut, oikealla c-Fos-proteiinia sisältävät solut.

Asetyylikoliinisolujen määrien keskiarvoissa oli hieman eroja. Vähiten soluja oli normaaliruokintaryhmän hiirillä. Toiseksi suurin solujen keskiarvo oli paastoryhmän hiirillä ja eniten soluja oli paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmän hiirillä. Ryhmien sisäinen hajonta oli kuitenkin niin suurta, ettei tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä ollut luottamusvälillä 0,05 (p-arvo = 0,10455).

c-Fos-proteiinia sisältäviä soluja löytyi keskiarvoisesti vähiten normaaliruokintaryhmässä. Ero ei kuitenkaan ollut kuin hieman yli kymmenen solua verrattuna paastoryhmään sekä paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmään, joissa oli lähes saman verran soluja. c-Fos-proteiinia sisältävien solujen hieman suurempi määrä paastonneissa ryhmissä voi johtua LDT:n osuudesta emotionaalisten tuntemusten käsittelyyn.

#### 4.4 Tulosten vertailu muihin tutkimuksiin

Eräässä tutkimuksessa hiiriä oli tutkittu kahdessa eri ryhmässä, paastoryhmässä ja paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä. Molemmat ryhmät (6 hiirtä) paastosivat 36 tuntia, jonka jälkeen paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmä sai syödä kaksi tuntia. *Nucleus accumbens*in alueella Wun ym. tutkimusryhmä havaitsi paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmän hermosoluaktiivisuuden lisääntyneen merkittävästi. Hiirillä, jotka saivat syödä paaston jälkeen, havaittiin c-Fos-proteiinia sisältäviä soluja olevan keskimäärin noin 140 kappaletta. Paastoryhmällä keskiarvo oli noin 10 solua. [33.] Tulokset ovat samansuuntaisia tässä työssä saatujen tulosten kanssa, jotka olivat paastoryhmässä keskiarvoisesti noin 55 solua ja paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä noin 115 solua.

Toisessa tutkimuksessa oli keskitytty pienempään alueeseen *septumia* kuin tässä työssä. Ryhminä oli normaaliruokintaryhmä, paastoryhmä sekä paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmä. Paasto kesti 24 tuntia ja sen jälkeinen ruokinta kaksi tuntia. Hiiriä oli 8 per ryhmä. Tulokset olivat hyvin samanlaisia kuin tässä työssä saadut. Horii-Hayashi ym. olivat saaneet c-Fos-proteiinia sisältävien solujen keskiarvoiksi normaaliruokintaryhmälle noin 5 solua, paastoryhmälle noin 10 solua ja paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmälle noin 10 solua. [34.] Keskiarvot olivat tässä työssä normaaliruokintaryhmässä noin 15 solua, paastoryhmässä noin 30 solua ja paasto ja sen jälkeinen ruokinta -ryhmässä noin 30 solua.

Muista aivoalueista ei löytynyt suoraan verrattavissa olevia tutkimuksia. Koska *septumin* ja *nucleus accumbens*sin tulokset vastasivat hyvin muiden saamia tuloksia, voidaan olettaa, ettei muillakaan alueilla ole virheellisiä tuloksia.

## 5 Yhteenveto

Eläinkokeet onnistuivat hyvin, eikä ruokintakokeiden tuloksissa ollut paljoa hajontaa. Tulokset olivat johdonmukaisia ryhmien sisällä. Näytteiden valmistelussa kuitenkin tuli ongelmia. Vaikka alku sujui hyvin ja saatiin valmiiksi ilman ongelmia, vasta-ainevärjäys ei toiminut toivotulla tavalla. Ensimmäisten koevärjäysten jälkeen havaittiin ongelma primaarivasta-aineiden osalta. Jostain syystä asetyylikoliinisolut värjäytyivät sekä anti-ChAT- sekä anti-c-Fos-vasta-aineilla, jolloin kuvien tulkitseminen olisi ollut mahdotonta. Useiden koevärjäysten jälkeen onnistuttiin löytämään toimiva protokolla, jolla saatiin kohdesolut värjäytymään ainoastaan niille tarkoitetuilla fluoresoivilla vasta-aineilla.

Seuraavana vaiheena oli saatujen leikkeiden kuvaaminen. Tässä vaiheessa ei tullut vastaan ongelmia, sillä vaihtoehtoja oli alusta asti kaksi. Kummallakin menetelmällä otettiin testikuvat ja valittiin parhaiten työhön sopiva menetelmä. Kuvien suuren määrän johdosta tähän vaiheeseen kuitenkin kului aikaa lähes kuukausi. Kuvankäsittelyvaiheessa oli työn kannalta vaikein ongelma. Solujen tunnistamisen ja laskemisen vaikeutena oli leikkeiden autofluoresoiva taustaväri, solujen epätasainen värin intensiteetti sekä solujen epäsäännölliset reunat ja koko. Solumäärät saatiin laskettua kuitenkin riittävällä tarkkuudella, jotta tilastollinen analyysi oli mahdollinen.

Asetyylikoliinisolujen keskiarvoissa ei, odotusten mukaan, löytynyt tilastollista eroa ruokintaryhmien välillä. Asetyylikoliinisoluja ei muodostunut lisää 26 tuntia kestäneen ruokintakokeen aikana missään ryhmässä. Tilastollista eroa oli c-Fos-proteiinia sisältävien solujen määrissä ruokintaryhmien välillä kahdella aivoalueella (*striatum* ja *nucleus accumbens*).

Hajonnat olivat ryhmien sisällä melko suuria ja ryhmien melko pieni koko (6) ei pienentänyt keskiarvon keskivirheen suuruutta riittävästi, jotta voitaisiin päätellä kaikkien aivoalueiden tilastollinen merkitsevyys tarkasti. Kolmelta alueelta (*olfactory tubercule*, *septum* ja LDT) saattaisi löytyä tilastollisesti merkitsevää eroa c-Fos-proteiinia sisältävien solujen määrissä, mikäli otoskoko olisi suurempi.

Asetylikoliinisolujen ja c-Fos-proteiinia sisältävien solujen kolokalisaatiota ei pystytty valitettavasti tutkimaan halutulla tavalla. Kolokalisaatiosta olisi pystytty seuraamaan asetyylikoliinisolujen suoraa aktiivisuutta. Seuraavassa vaiheessa tutkimusta kannattaa keskittyä pienemmälle alueelle, suurentaa ryhmäkokoja sekä kehittää kuvankäsittelyä. Mikäli leikkeiden määrä pysyy kohtuullisella tasolla, kannattaa kokeilla DAB-värjäystä kolokalisaation etsimiseen.

Tutkimuksia aiheesta ei ole vielä paljoa, sillä aihe on melko uusi. Kyseiset kaksi tutkimusta, joihin tässä työssä viitattiin, ovat vuosilta 2014 ja 2015.



## Lähteet

- 1 Swinburn, B. & Sacks, G. & Hall, K. & McPherson, K. & Finegood, D. & Moodie, M. & Gortmaker, S. 2011. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*, Volume 378, Issue 9793, s. 804–814.
- 2 Kang, J. & Park, C-Y. 2012. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Obesity & Metabolism Journal*, Volume 36, Issue 1, s. 13–25.
- 3 Francis, P. & Palmer, A. & Snape, M. & Wilcock, G. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, Volume 66, s. 137–147.
- 4 Fedoroff, I. & Polivy, J. & Herman, C. 1997. The Effect of Pre-exposure to Food Cues on the Eating Behavior of Restrained and Unrestrained Eaters. *Appetite*, Volume 28, Issue 1, s. 33–47.
- 5 Schultz, W. 2006. Behavioral Theories and the Neurophysiology of Reward. *Annual Review of Psychology*, Volume 57, s. 87–115.
- 6 Klok, M. & Jakobsdottir, S & Drent, M. 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews*, Volume 8, Issue 1, s. 21–34.
- 7 Figlewicz, D. 2003. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Volume 284, Issue 4, s. 882–892.
- 8 Wynne, K. & Stanley, S. & McGowan, K & Bloom, S. 2005. Appetite control. *Journal of endocrinology*, Volume 184, s. 291–318.
- 9 Asetylikoliini. 2016. Verkkodokumentti. Kustannus Oy Duodecium. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=Itt00295](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Itt00295)>, Luettu 9.9.2016.
- 10 Asetylikoliini. 18.3.2017. Verkkodokumentti. Pubchem. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetylcholine#section=Top>>, Luettu 26.3.2017.
- 11 Zhou, F-M. & Wilson, J. & Dani, J. 2002. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *Developmental Neurobiology (formerly Journal of Neurobiology)*, Volume 53, Issue 4, s. 590–605.
- 12 Chiara, G. & Morelli, M. & Consolo, S. 1994. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends in Neurosciences*, Volume 17, Issue 6, s. 228–233.

- 13 Drever, B. & Riedel, G. & Platt, B. 2011. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behavioural Brain Research*, Volume 221, Issue 2, s. 505–514.
- 14 Angulo, J. & McEwen, B. 1994. Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the corpus striatum and nucleus accumbens. *Brain Research Reviews*, Volume 19, Issue 1, s. 1–28.
- 15 Balleine, B. & Delgado, M. & Hikosaka, O. 2007. The Role of the Dorsal Striatum in Reward and Decision-Making. *Journal of Neuroscience*, Volume 27, Issue 31, s. 8161–8165.
- 16 Saddoris, M. & Cacciapaglia, F. & Wightman, R. & Carelli, R. 2015. Differential Dopamine Release Dynamics in the Nucleus Accumbens Core and Shell Reveal Complementary Signals for Error Prediction and Incentive Motivation. *The Journal of Neuroscience*, Volume 35, Issue 33, s. 11572–11582.
- 17 Scott, D. & Stohler, C. & Egnatuk, C. & Wang, H. & Koeppe, R. & Zubieta, J-K. 2008. Placebo and Nocebo Effects Are Defined by Opposite Opioid and Dopaminergic Responses. *Archives of General Psychiatry*. Volume 65, Issue 2, s. 220–231.
- 18 Olazábal, D. & Young, L. 2006. Oxytocin receptors in the nucleus accumbens facilitate “spontaneous” maternal behavior in adult female prairie voles. *Neuroscience*, Volume 141, Issue 2, s. 559–568.
- 19 Wesson, D. & Wilson, D. 2011. Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell: hedonics, sensory integration, and more? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Volume 35, Issue 3, s. 655–668.
- 20 Igelstrom, K. & Herbison, A. & Hyland, B. 2010. Enhanced c-Fos expression in superior colliculus, paraventricular thalamus and septum during learning of cue-reward association. *Neuroscience*, Volume 168, Issue 3, s. 706–714.
- 21 Herman, A. & Ortiz-Guzman, J. & Kochukov, M. & Herman, I. & Quast, K. & Patel, J. & Tepe, B. & Carlson, J. & Ung, K. & Selever, J. & Tong, Q. & Arenkiel, B. 2016. A cholinergic basal forebrain feeding circuit modulates appetite suppression. *Nature*, Volume 538, Issue 7624, s. 253–256.
- 22 Baxter, M. & Chiba, A. 1999. Cognitive functions of the basal forebrain. *Current Opinion in Neurobiology*, Volume 9, Issue 2, s. 178–183.
- 23 Lee, M. & Hassani, O. & Alonso, A. & Jones, B. 2005. Cholinergic Basal Forebrain Neurons Burst with Theta during Waking and Paradoxical Sleep. *Journal of Neuroscience*, Volume 25, Issue 17, s. 4365–4369.
- 24 Hyde, J. & Kezunovic, N. & Urbano, F. & Garcia-Rill, E. 2013. Spatiotemporal properties of high-speed calcium oscillations in the pedunculo-pontine nucleus. *Journal of Applied Physiology*, Volume 115, Issue 9, s. 1402–1414.

- 25 Jenkinson, N. & Nandi, D. & Muthusamy, K. & Ray, R. & Gregory, R. & Stein, J. & Aziz, T. 2008. Anatomy, physiology, and pathophysiology of the pedunculopontine nucleus. *Movement Disorders*, Volume 24, Issue 3, s. 319–328.
- 26 Brudzynski, S. & Iku, A. & Harness, A. Activity of cholinergic neurons in the laterodorsal tegmental nucleus during emission of 22 kHz vocalization in rats. *2011 Behavioural Brain Research*. Volume 225, Issue 1, s. 276–283.
- 27 Thakkar, M. & Portas, C. & McCarley, R. 1996. Chronic low-amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. *Brain Research*, Volume 723, Issue 1–2, s. 223–227.
- 28 Hoffman, G. & Smith, M. & Verbalis, J. 1993. c-Fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems. *Frontiers of Neuroendocrinology*, Volume 14, Issue 3, s. 173–213.
- 29 Meister, B. 2007. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiology & Behavior*, Volume 92, Issue 1–2, s. 263–271.
- 30 Lutz, A. & Woods, S. 2012. Overview of animal models of obesity. *Current protocols in pharmacology*.  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3482633/>>, Luettu 13.3.2017.
- 31 Mouse Strain Datasheet – 000664. Verkkodokumentti. The Jackson Laboratory.  
<<https://www.jax.org/strain/000664>>, Luettu 7.9.2016.
- 32 Jensen, T. & Kiersgaard, M. & Sørensen, D. & Mikkelsen, L. 2013. Fasting of mice: a review. *Laboratory animals*, Volume 47, Issue 4, s. 225–240.
- 33 Wu, Q. & Lemus, M. & Stark, R. & Bayliss, J. & Reichenbach, A. & Lockie, S. & Andrews, Z. 2014. The Temporal Pattern of cfos Activation in Hypothalamic, Cortical, and Brainstem Nuclei in Response to Fasting and Refeeding in Male Mice. *Endocrinology*, Volume 155, Issue 3, s. 840–853.
- 34 Horii-Hayashi, N. & Sasagawa, T. & Hashimoto, T. & Kaneko, T. & Takeuchi, K. & Nishi, M. 2015. A newly identified mouse hypothalamic area having bidirectional neural connections with the lateral septum: the perifornical area of the anterior hypothalamus rich in chondroitin sulfate proteoglycans. *European Journal of Neuroscience*, Volume 42, Issue 6, s. 2322–2334.

## Fluoresenssivärjäysprotokolla, ChAT ja c-Fos toimiva versio

### Antibodies

#### cFos

primary AB: rabbit anti-**cFos**, sc-52, Santa Cruz  
secondary AB: donkey anti-rabbit 594, ab150076, Abcam

#### ChAT

primary AB: goat anti-**ChAT**, AB144P, Millipore  
secondary AB: donkey anti-goat 488, A-11055, Life Technologies

-----

### FIRST DAY

\*wash 3x5 min in PBS (make sure 1xPBS when using PBS)

\*antigen retrieval, sections in eppendorfs in citrate 10 mM pH 8.5, use heatblock 80 °C (15 min)

\*let cool to room temp BEFORE washing

\*wash 3x5 min in PBS

\*blocking 1 h in RT in blocking solution:  
3% BSA/10% donkey serum/0.3% Triton/in PBS

\*Primary antibodies dilution  
1:500 rabbit anti-cFos, sc-52, Santa Cruz

\*incubate 24 h in +4°C

dilute these antibodies in blocking solution (prepared above)

-----

## **SECOND DAY**

\*wash 3x5 min in PBS

\*Primary antibody dilution  
1:100 goat anti-ChAT, Millipore, AB144P

\*incubate o/n in +4°C

dilute these antibodies in blocking solution (prepared above)

-----

## **THIRD DAY**

\*wash 3x5 min in PBS

\*Secondary antibodies dilution  
1:1000 donkey anti-rabbit 594, ab150076, Abcam  
1:1000 donkey anti-goat 488, A-11055, Life Technologies

\*incubate 2h in RT (NOTE! protect from light)

\*wash 3x5min in PBS

\*mount on microscopic slides and coverslip

**Blocking solution calculations:**

3 % BSA	→ 0.15 g
10 % donkey serum	→ 0.5 ml
0.3 % Triton	→ 15 µl
PBS	→ add to 5 ml

**Primary antibodies dilution calculations:**

c-Fos:

rabbit anti-cFos 1:500	→ 1 µl
blocking solution	→ 500 µl

ChAT:

goat anti-ChAT 1:100	→ 5 µl
blocking solution	→ 500 µl

**Secondary antibodies:**

donkey anti-rabbit 594 1:1000	→ 0.5 µl
donkey anti-goat 488 1:1000	→ 0.5 µl
blocking solution	→ 500 µl

## Fluoresenssivärjäysprotokolla, ChAT ja c-Fos samaan aikaan

### Antibodies

#### cFos

primary AB: rabbit anti-**cFos**, sc-52, Santa Cruz

secondary AB: donkey anti-rabbit 594, ab150076, Abcam

#### ChAT

primary AB: goat anti-**ChAT**, AB144P, Millipore

secondary AB: donkey anti-goat 488, A-11055, Life Technologies

### FIRST DAY

\*wash 3 x 5 min in PBS (make sure 1xPBS when using PBS)

\*antigen retrieval, sections in eppendorfs in citrate 10 mM pH 8.5, use heatblock 80 °C (30 min)

\*let cool to room temp BEFORE washing

\*wash 3x5min PBS

\*blocking 1 h in RT in blocking solution:  
1% BSA/Donkey serum 10%/0.3% Triton/in PBS

\*Primary antibodies dilution  
1:100 goat anti-ChAT, AB144P, Millipore  
1:500 rabbit anti-cFos, sc-52, Santa Cruz  
dilute these antibodies in blocking solution (prepared above)

\*incubate o/n in +4°C

### SECOND DAY

\*wash 3x5min in PBS

\*Secondary antibodies dilution  
1:1000 donkey anti-goat 488 A-11055, Life Technologies  
donkey anti-rabbit 594, ab150076, Abcam

\*incubate 2h in RT (NOTE! protect from light)

\*wash 3x5min

\*mount on microscopic slides and coverslip

**Solution calculations:**

For one well

**Blocking solution calculations:**

3 % BSA	→ 0.15 g
10 % donkey serum	→ 0.5 ml
0.3 % Triton	→ 15 µl
PBS	→ add to 5 ml

**Primary antibodies dilution calculations:**

rabbit anti-cFos 1:500	→ 1 µl
goat anti-ChAT 1:100	→ 5 µl
blocking solution	→ 500 µl

**Secondary antibodies dilution calculations:**

donkey anti-rabbit 594 1:1000	→ 0.5 µl
donkey anti-goat 488 1:1000	→ 0.5 µl
blocking solution	→ 500 µl



**Fluoresenssivärjäysprotokolla, ChAT ja DAB****FIRST DAY**

\*wash 3 x 5 min in PBS (make sure 1xPBS when using PBS)

\*antigen retrieval, citrate 10 mM pH 8.5 (30 min)

\*let cool to room temp BEFORE washing

\*wash 3 x 5 min in PBS (make sure 1xPBS when using PBS)

\*endoperoxidase quenching with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 h in RT

\*wash 3 x 5 min in PBS

\*blocking 1 h in RT in blocking solution:

3% BSA/10% horse serum/0.3% Triton/in PBS + avidin 2 tippaa / 500 µl

\*Primary antibody dilution

1:500 rabbit anti-cFos sc-52 + biotin 2 tippaa / 500 µl

\*incubate o/n in +4°C

**SECOND DAY – part one (cFos secondary)**

\*wash 3 x 5min in PBS

\*Secondary antibody dilution

1:200 horse biotinylated anti-rabbit, Vector cat#BA-1100

\*incubate 2h in RT (NOTE! protect from light)

(prepare ABC solution (2 microL A + 2 microL B + 500 microL PBS)

let incubate 30 min in dark)

\*wash 3 x 5 min in PBS

\*incubate ABC solution 1h in RT- protect from light!

\*wash 3 x 5 min

\*DAB reaction with nickel (vetokaapissa!), time determined by user

\*wash 3 x 5min

### **SECOND DAY – part two (ChAT primary)**

\*blocking 1 h in RT in blocking solution:

1% BSA / 10% donkey serum / 0.3% Triton / in PBS

\*Primary antibody dilution

1:100 goat anti-ChAT, Millipore AB144P

\*incubate o/n in +4°C

### **THIRD DAY – (ChAT secondary)**

\*wash 3 x 5 min in PBS

\*Secondary antibody dilution

1:1000 donkey anti-goat 488 A-11055, Life Technologies

\*incubate 2h in RT (NOTE! protect from light)

\*wash 3x5min

\*mount on microscopic

**Example volume calculations:**

When sections from one set of sections (for one well):

**cFos - solutions**

*1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for endoperoxidase quenching*

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → 0.1 ml

PBS → 10 ml

*cFos - Blocking solution to reduce non-specific binding*

3%BSA → 0.15 g

10% horse serum → 500 µl

0.3% Triton → 15 µl

PBS → add to 5 ml

*cFos - Primary antibody, cat# sc-52*

rabbit anti-cFos 1:500 → 1 µl

blocking solution → 500 µl

*cFos – Secondary antibody, cat#BA-1100*

horse anti-rabbit 1:200 → 2.5 µl

blocking solution → 500 µl

**ChAT – solutions**

*ChAT - Blocking solution to reduce non-specific binding*

1%BSA → 0.05 g

10% donkey serum → 500 µl

0.3% Triton → 15 µl

PBS → add to 5 ml

*ChAT - Primary antibody, cat# AB144P:*

goat anti-ChAT 1:100

→ 5  $\mu$ l

blocking solution

→ 500  $\mu$ l

*Secondary antibody, cat# 150131*

donkey anti-goat 1:1000 647

→ 0.5  $\mu$ l

blocking solution

→ 500  $\mu$ l

## Tulokset

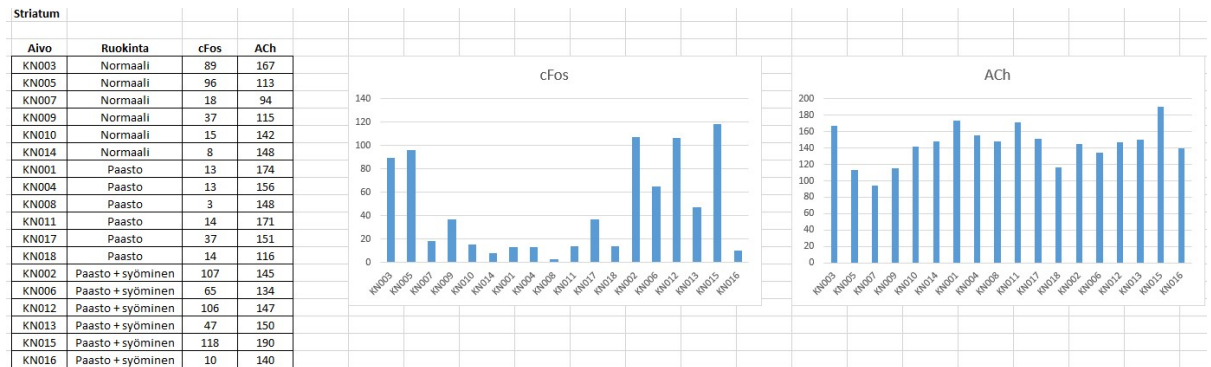
Painonmuutos ja tilastollinen analyysi

Tunnus	Ruokinta	24h	2h	26h	ruoka
KN003	Normaali	-	-	-0,3	-0,2
KN005	Normaali	0,3	-0,4	-0,1	-0,4
KN007	Normaali	-0,6	-0,2	-0,8	-0,3
KN009	Normaali	-0,4	-0,4	-0,8	-0,5
KN010	Normaali	0,3	-0,1	0,2	-0,3
KN014	Normaali	0,3	-0,1	0,2	-0,6
KN001	Paasto	-	-	-4,5	-
KN004	Paasto	-	-	-4,8	-
KN008	Paasto	-2,9	-0,5	-3,4	-
KN011	Paasto	-4,9	-0,1	-5	-
KN017	Paasto	-3,6	-0,4	-4	-
KN018	Paasto	-4,5	-0,4	-4,9	-
KN002	Paasto + syöminen	-4,8	1,5	-3,3	-0,7
KN006	Paasto + syöminen	-4,9	1,1	-3,8	-0,7
KN012	Paasto + syöminen	-1,7	1,4	-0,3	-0,6
KN013	Paasto + syöminen	-3,3	1,7	-1,6	-1
KN015	Paasto + syöminen	-4,6	1,8	-2,8	-1,1
KN016	Paasto + syöminen	-4,5	1,5	-3	-0,9
	<b>Keskiarvot (g)</b>	<b>24 h</b>	<b>2 h</b>	<b>26 h</b>	<b>Ruoka</b>
	Normaali	-0,02	-0,24	-0,26	-0,42
	Paasto	-3,98	-0,35	-4,33	-
	Paasto + syöminen	-3,97	1,50	-2,47	-0,83

Anova: yksisuuntainen	24 h						
<b>YHTEENVETO</b>							
<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>			
normaali	5	-0,1	-0,02	0,197			
paasto	5	-15,9	-3,18	3,767			
paasto ja sen jälkeinen ruokinta	6	-23,8	-3,96667	1,566667			
<b>ANOVA</b>							
<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>	
Luokkien välissä	45,96816667	2	22,98408	12,61298	0,000902199	3,805565253	
Ryhmissä	23,68933333	13	1,822256				
Yhteensä	69,6575	15					
Anova: yksisuuntainen	2 h						
<b>YHTEENVETO</b>							
<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>			
normaali	5	-1,2	-0,24	0,023			
paasto	4	-1,4	-0,35	0,03			
paasto ja sen jälkeinen ruokinta	6	9	1,5	0,06			
<b>ANOVA</b>							
<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>	
Luokkien välissä	11,54733333	2	5,773667	143,7427	4,1384E-09	3,885293835	
Ryhmissä	0,482	12	0,040167				
Yhteensä	12,02933333	14					
Anova: yksisuuntainen	26 h						
<b>YHTEENVETO</b>							
<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>			
normaali	6	-1,6	-0,26667	0,206667			
paasto	6	-26,6	-4,43333	0,386667			
paasto ja sen jälkeinen ruokinta	6	-14,8	-2,46667	1,662667			
<b>ANOVA</b>							
<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>	
Luokkien välissä	52,13777778	2	26,06889	34,66608	2,37539E-06	3,682320344	
Ryhmissä	11,28	15	0,752				
Yhteensä	63,41777778	17					

## Solumäärät ja tilastolliset analysit

### Striatum



Anova: yksisuuntainen c-Fos

YHTEENVETO				
Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	263	43,83333	1518,167
Paasto	6	94	15,66667	127,0667
Paasto + syöminen	6	453	75,5	1788,3

ANOVA							
Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen	
Luokkien välissä	10752,33333		2	5376,167	4,697348	0,02606	3,6823203
Ryhmissä	17167,66667		15	1144,511			
Yhteensä	27920		17				

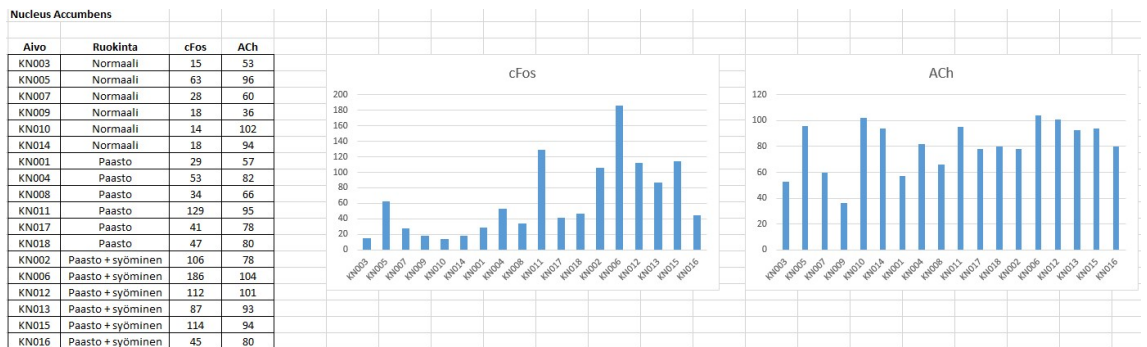
Anova: yksisuuntainen ACh

YHTEENVETO				
Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	779	129,83333	729,3667
Paasto	6	916	152,6667	434,2667
Paasto + syöminen	6	906	151	396,8

ANOVA							
Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen	
Luokkien välissä	1944,333333		2	972,1667	1,869032	0,188473	3,6823203
Ryhmissä	7802,166667		15	520,1444			
Yhteensä	9746,5		17				

### Nucleus accumbens



Anova: yksisuuntainen c-Fos

YHTEENVETO				
Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	156	26	353,2
Paasto	6	333	55,5	1371,1
Paasto + syöminen	6	650	108,3333	2109,867

ANOVA							
Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen	
Luokkien välissä	20880,77778		2	10440,39	8,168963	0,003983	3,6823203
Ryhmissä	19170,83333		15	1278,056			
Yhteensä	40051,61111		17				

Anova: yksisuuntainen ACh

YHTEENVETO				
Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	441	73,5	749,5
Paasto	6	458	76,33333	175,4667
Paasto + syöminen	6	550	91,66667	113,8667

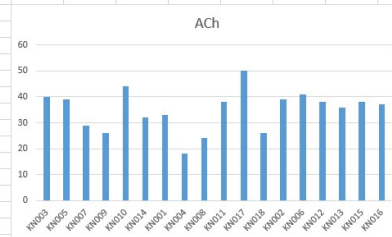
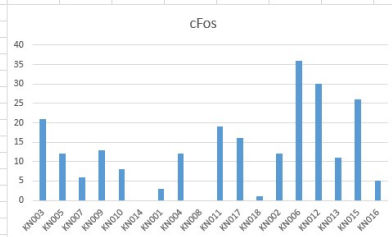
  

ANOVA							
Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen	
Luokkien välissä	1146,333333		2	573,1667	1,655222	0,2241	3,6823203
Ryhmissä	5194,166667		15	346,2778			
Yhteensä	6340,5		17				

## Olfactory tubercle

Olfactory Tubercle

Aivo	Ruokinta	cFos	ACh
KN003	Normaali	21	40
KN005	Normaali	12	39
KN007	Normaali	6	29
KN009	Normaali	13	26
KN010	Normaali	8	44
KN014	Normaali	8	32
KN001	Paasto	3	33
KN004	Paasto	12	18
KN008	Paasto	3	24
KN011	Paasto	19	38
KN017	Paasto	16	50
KN018	Paasto	1	26
KN002	Paasto + syöminen	12	39
KN006	Paasto + syöminen	36	41
KN012	Paasto + syöminen	30	38
KN013	Paasto + syöminen	11	36
KN015	Paasto + syöminen	26	38
KN016	Paasto + syöminen	5	37



Anova: yksisuuntainen

c-Fos

YHTEENVETO				
Ryhvät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	5	60	12	33,5
Paasto	5	51	10,2	62,7
Paasto + syöminen	6	120	20	152,4

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	305,1375	2	152,5688	1,729503	0,215779	3,8055653
Ryhmissä	1146,8	13	88,21538			
Yhteensä	1451,9375	15				

Anova: yksisuuntainen

ACh

YHTEENVETO				
Ryhvät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	210	35	49,6
Paasto	6	189	31,5	131,1
Paasto + syöminen	6	229	38,1667	2,966667

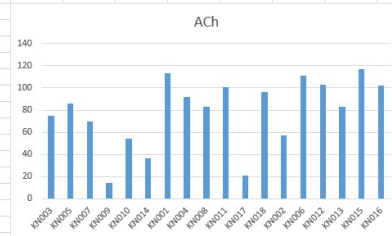
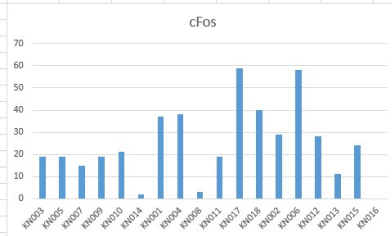
ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	133,4444444	2	66,72222	1,089837	0,36147	3,6823203
Ryhmissä	918,3333333	15	61,22222			
Yhteensä	1051,777778	17				

## Septum

Septum

Aivo	Ruokinta	cFos	ACh
KN003	Normaali	19	75
KN005	Normaali	19	86
KN007	Normaali	15	70
KN009	Normaali	19	14
KN010	Normaali	21	54
KN014	Normaali	2	36
KN001	Paasto	37	113
KN004	Paasto	38	92
KN008	Paasto	3	83
KN011	Paasto	19	101
KN017	Paasto	59	21
KN018	Paasto	40	96
KN002	Paasto + syöminen	29	57
KN006	Paasto + syöminen	58	111
KN012	Paasto + syöminen	28	103
KN013	Paasto + syöminen	11	83
KN015	Paasto + syöminen	24	117
KN016	Paasto + syöminen	10	102



Anova: yksisuuntainen

c-Fos

YHTEENVETO				
Ryhvät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	95	15,83333	49,76667
Paasto	6	196	32,66667	372,2667
Paasto + syöminen	5	150	30	296,5

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	966,7745098	2	483,3873	2,053119	0,165234	3,7388918
Ryhmissä	3296,166667	14	235,4405			
Yhteensä	4262,941176	16				

Anova: yksisuuntainen

ACh

YHTEENVETO				
Ryhvät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	335	55,83333	724,9667
Paasto	6	506	84,33333	1061,467
Paasto + syöminen	6	573	95,5	487,9

ANOVA

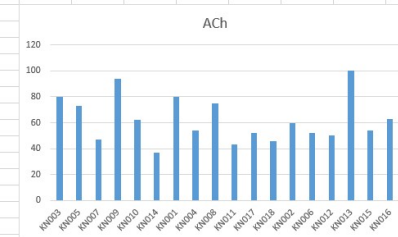
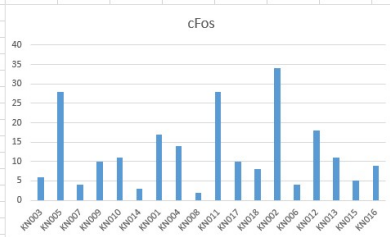
Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	5020,777778	2	2510,389	3,311373	0,064395	3,6823203
Ryhmissä	11371,66667	15	758,1111			
Yhteensä	16392,44444	17				



## Pars basalis telencephali

### Basal Forebrain

Aivo	Ruokinta	cFos	ACh
KN003	Normaali	6	80
KN005	Normaali	28	73
KN007	Normaali	4	47
KN009	Normaali	10	94
KN010	Normaali	11	62
KN014	Normaali	3	37
KN001	Paasto	17	80
KN004	Paasto	14	54
KN008	Paasto	2	75
KN011	Paasto	28	43
KN017	Paasto	10	52
KN018	Paasto	8	46
KN002	Paasto + syöminen	34	60
KN006	Paasto + syöminen	4	52
KN012	Paasto + syöminen	18	50
KN013	Paasto + syöminen	11	100
KN015	Paasto + syöminen	5	54
KN016	Paasto + syöminen	9	63



Anova: yksisuuntainen

c-Fos

#### YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	62	10,33333	85,06667
Paasto	6	79	13,16667	79,36667
Paasto + syöminen	6	81	13,5	125,9

#### ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	36,33333333		2	18,16667	0,187715	0,830768
Ryhmissä	1451,666667		15	96,77778		3,6823203
Yhteensä	1488		17			

Anova: yksisuuntainen

ACh

#### YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	393	65,5	449,1
Paasto	6	350	58,33333	238,6667
Paasto + syöminen	6	379	63,16667	349,7667

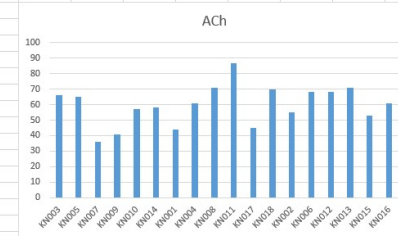
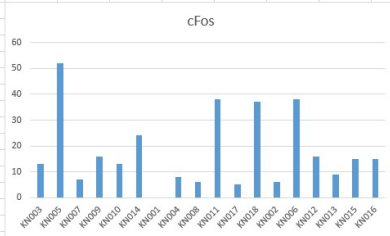
#### ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	160,3333333		2	80,16667	0,2318	0,795894
Ryhmissä	5187,666667		15	345,8444		3,6823203
Yhteensä	5348		17			

## Pedunculopontine tegmental nucleus

### PPT

Aivo	Ruokinta	cFos	ACh
KN003	Normaali	13	66
KN005	Normaali	52	65
KN007	Normaali	7	36
KN009	Normaali	16	41
KN010	Normaali	13	57
KN014	Normaali	24	58
KN001	Paasto	44	44
KN004	Paasto	8	61
KN008	Paasto	6	71
KN011	Paasto	38	87
KN017	Paasto	5	45
KN018	Paasto	37	70
KN002	Paasto + syöminen	6	55
KN006	Paasto + syöminen	38	68
KN012	Paasto + syöminen	16	68
KN013	Paasto + syöminen	9	71
KN015	Paasto + syöminen	15	53
KN016	Paasto + syöminen	15	61



Anova: yksisuuntainen

c-Fos

#### YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	125	20,83333	263,7667
Paasto	5	94	18,8	292,7
Paasto + syöminen	6	99	16,5	126,7

#### ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	56,39607843		2	28,19804	0,126403	0,882254
Ryhmissä	3123,133333		14	223,081		3,7388918
Yhteensä	3179,529412		16			

Anova: yksisuuntainen

ACh

#### YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Normaali	6	323	53,83333	156,5667
Paasto	6	378	63	275,6
Paasto + syöminen	6	376	62,66667	56,26667

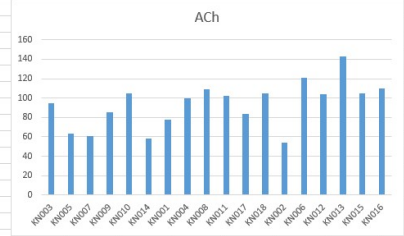
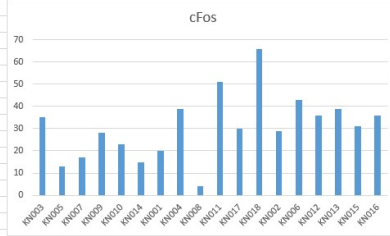
#### ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	324,3333333		2	162,1667	0,996042	0,392496
Ryhmissä	2442,166667		15	162,8111		3,6823203
Yhteensä	2766,5		17			

## Laterodorsal tegmental nucleus

LDT

Aivo	Ruokinta	cFos	ACh
KN003	Normaali	35	95
KN005	Normaali	13	63
KN007	Normaali	17	61
KN009	Normaali	28	85
KN010	Normaali	23	105
KN014	Normaali	15	58
KN001	Paasto	20	78
KN004	Paasto	39	100
KN008	Paasto	4	109
KN011	Paasto	51	102
KN017	Paasto	30	84
KN018	Paasto	66	105
KN002	Paasto + syöminen	29	54
KN006	Paasto + syöminen	43	121
KN012	Paasto + syöminen	36	104
KN013	Paasto + syöminen	39	143
KN015	Paasto + syöminen	31	105
KN016	Paasto + syöminen	36	110



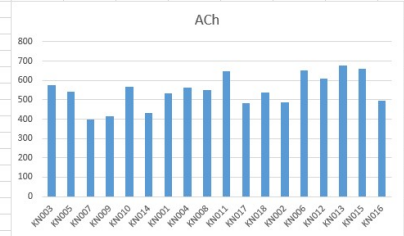
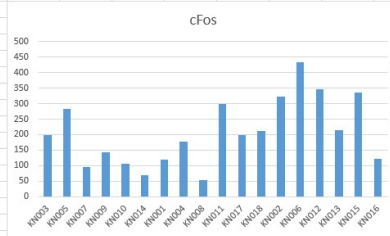
Anova: yksisuuntainen		c-Fos			
YHTEENVETO					
	Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
	Normaali	6	131	21,83333	72,16667
	Paasto	6	210	35	488,8
	Paasto + syöminen	6	214	35,66667	26,26667
ANOVA					
	Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F
	Luokkien välissä	730,3333333	2	365,1667	1,865528
	Ryhmissä	2936,166667	15	195,7444	0,189003
	Yhteensä	3666,5	17		3,6823203

Anova: yksisuuntainen		ACh			
YHTEENVETO					
	Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
	Normaali	6	467	77,83333	396,1667
	Paasto	6	578	96,33333	153,8667
	Paasto + syöminen	6	637	106,1667	863,7667
ANOVA					
	Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F
	Luokkien välissä	2483,444444	2	1241,722	2,634861
	Ryhmissä	7069	15	471,2667	0,10455
	Yhteensä	9552,444444	17		3,6823203

## Kokonaismäärät aivoittain

Kokonaismäärät aivoittain

Aivo	Ruokinta	cFos	ACh
KN003	Normaali	198	576
KN005	Normaali	284	541
KN007	Normaali	95	397
KN009	Normaali	142	415
KN010	Normaali	105	566
KN014	Normaali	70	431
KN001	Paasto	119	535
KN004	Paasto	177	563
KN008	Paasto	52	552
KN011	Paasto	300	646
KN017	Paasto	198	481
KN018	Paasto	213	539
KN002	Paasto + syöminen	323	488
KN006	Paasto + syöminen	433	650
KN012	Paasto + syöminen	346	611
KN013	Paasto + syöminen	215	676
KN015	Paasto + syöminen	336	662
KN016	Paasto + syöminen	121	496



Anova: yksisuuntainen		c-Fos			
YHTEENVETO					
	Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
	Normaali	6	894	149	6353,6
	Paasto	6	1059	176,5	7170,7
	Paasto + syöminen	6	1774	295,6667	12156,67
ANOVA					
	Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F
	Luokkien välissä	72936,11111	2	36468,06	4,260127
	Ryhmissä	128404,8333	15	8560,322	0,034266
	Yhteensä	201340,9444	17		3,6823203

Anova: yksisuuntainen		ACh			
YHTEENVETO					
	Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
	Normaali	6	2926	487,6667	6699,067
	Paasto	6	3316	552,6667	2890,667
	Paasto + syöminen	6	3583	597,1667	7110,567
ANOVA					
	Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F
	Luokkien välissä	36391	2	18195,5	3,268594
	Ryhmissä	83501,5	15	5566,767	0,066339
	Yhteensä	119892,5	17		3,6823203

## Wilcoxon-Mann-Whitney-analyysi

```
'na = nucleus accumbens, str = striatum, koko = koko aivo, N = normaali, P = paasto, PS = paasto ja ruokinta'
> strN <- c(89, 96, 18, 37, 15, 8)
> strP <- c(13, 13, 3, 14, 37, 14)
> strPS <- c(107, 65, 106, 47, 118, 10)
> naN <- c(15, 63, 28, 18, 14, 18)
> naP <- c(29, 53, 34, 129, 41, 47)
> naPS <- c(106, 186, 112, 87, 114, 45)
> kokon <- c(198, 284, 95, 142, 105, 70)
> kokoP <- c(119, 177, 52, 300, 198, 213)
> kokoPS <- c(323, 433, 346, 215, 336, 121)
> wilcox.test(naN,naP, correct=FALSE)

    wilcoxon rank sum test

data:  naN and naP
w = 5, p-value = 0.03704
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

warning message:
In wilcox.test.default(naN, naP, correct = FALSE) :
cannot compute exact p-value with ties
> wilcox.test(naN,naPS, correct=FALSE)

    wilcoxon rank sum test

data:  naN and naPS
w = 1, p-value = 0.006392
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

warning message:
In wilcox.test.default(naN, naPS, correct = FALSE) :
cannot compute exact p-value with ties
> wilcox.test(naP,naPS, correct=FALSE)

    wilcoxon rank sum test

data:  naP and naPS
w = 7, p-value = 0.09307
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
> wilcox.test(strN,strP, correct=FALSE)

    wilcoxon rank sum test

data:  strN and strP
w = 28.5, p-value = 0.09098
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

warning message:
In wilcox.test.default(strN, strP, correct = FALSE) :
cannot compute exact p-value with ties

> wilcox.test(strN,strPS, correct=FALSE)

    wilcoxon rank sum test

data:  strN and strPS
w = 9, p-value = 0.1797
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
> wilcox.test(strP,strPS, correct=FALSE)

    wilcoxon rank sum test

data:  strP and strPS
w = 5, p-value = 0.03671
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

warning message:
In wilcox.test.default(strP, strPS, correct = FALSE) :
cannot compute exact p-value with ties
> wilcox.test(kokon,kokoP, correct=FALSE)

    wilcoxon rank sum test

data:  kokon and kokoP
w = 13.5, p-value = 0.4704
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

warning message:
In wilcox.test.default(kokon, kokoP, correct = FALSE) :
cannot compute exact p-value with ties
> wilcox.test(kokon,kokoPS, correct=FALSE)

    wilcoxon rank sum test

data:  kokon and kokoPS
w = 4, p-value = 0.02597
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
> wilcox.test(kokoP,kokoPS, correct=FALSE)

    wilcoxon rank sum test

data:  kokoP and kokoPS
w = 5, p-value = 0.04113
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```