

LuK-tutkielma

**Perimän ja liikunnan vaikutus neurogeneesiin
hippokampuksen pykäläpoimussa**

Martta K. Keskitalo, Lauri. P. Kuussalo ja Amiira E. Nissinen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

23.11.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia

Keskitalo M., Kuussalo L. Perimän ja liikunnan vaikutus neurogeneesiin
ja Nissinen A.: hippokampuksen pykäläpoimussa
LuK-tutkimussuunnitelma: 15 s.
Tutkielman ohjaajat: FM Elina Mäkinen ja FT Jonna Nykky
11/2021

Hakusanat: HCR-rotat, jyväissolu, Ki-67-vasta-aine, LCR-rotat

Ihmisten merkittävimpinä ja maailmanlaajuisesti yleistyvänä terveysriskeinä pidetään ylipainoa sekä erilaisia metabolisia sairauksia, joiden on ikääntymisen tavoin havaittu heikentävän aivojen terveyttä ja kognitiivisia toimintoja. Elintapojen, esimerkiksi fyysisen aktiivisuuden, lisäksi myös perimä vaikuttaa yksilön aivoterveysteen sekä alttiuteen sairastua kyseisiin elintapasairauksiin. Hippokampus on aivojen ohimolohkossa sijaitseva kognitiivisista toiminnoista, kuten muistista, oppimisesta ja tunteiden säätelystä vastaava rakenne. Vaikka perimällä ja elintavoilla voi olla haittavaikutuksia aivoterveysteen, voi hippokampuksen plastisuutta ja täten myös kognitiivisia toimintoja mahdollisesti edistää lisäämällä neurogeneesiä eli uusien hermosolujen syntyä hippokampuksessa. Tässä LuK-tutkielmassa tutkittiin perityn juoksukapasiteetin ja liikunnan vaikutusta aikuisiän hippokampaaliseen neurogeneesiin valikoidusti jalostetun rottamallin avulla. Tutkittavat joko hyvän tai huonon perityn juoksukapasiteetin omaavat rotat jaettiin juokseviin ja liikkumattomiin ryhmiin, jotta voitiin selvittää kuinka aerobinen liikunta lisää neurogeneesiä. Liikkumattoman ryhmän avulla saatiin myös tietoa siitä, kuinka pelkkä peritty juoksukapasiteetti vaikuttaa neurogeneesiin. Lisäksi huonon perityn juoksukapasiteetin rotat olivat perimältään alttiita ylipainolle ja metabolisille sairauksille. Rottien aivoleikkeiden uudet hermosolut värjättiin immunohistokemiallisin menetelmin solujen Ki-67-proteiiniin sitoutuvalla vasta-aineella. Värjätyt solut laskettiin sekä kuvattiin valomikroskoopilla, ja solulaskujen tulokset analysoitiin tilastollisin menetelmin. Tutkimuksen tulosten mukaan jokaisella rottaryhmällä ilmeni neurogeneesiä, mutta ainoastaan huonon perityn juoksukapasiteetin omaavien rottien liikkuvan ryhmän uusien jakautuneiden hermosolujen määrä oli tilastollisesti merkitsevä verrattuna liikkumattomaan ryhmään. Tulokset osoittivat, että aerobisella liikunnalla voitiin edistää neurogeneesiä rottien huonosta peritystä aerobisesta kunnosta huolimatta. Käytetty rottamalli oli metabolisten sairauksien suhteen polygeeninen, jonka vuoksi tässä tutkimuksessa saatu tulos liikunnan vaikutuksesta neurogeneesiin luo pohjaa myös ihmisille soveltuviin lisätutkimuksiin.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Cell and Molecular Biology

Keskitalo M., Kuussalo L. and Nissinen A.: The effects of physical exercise and genetics on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus
Bachelor of Science Thesis: 15 p.
Supervisors: MSc Elina Mäkinen and PhD Jonna Nykky
11/2021

Keywords: granule cell, HCR-rats, Ki-67 antibody, LCR-rats

Metabolic diseases and obesity are considered as a global emerging health risk for humans. Like aging, these risks have been shown to have a reducing effect on brain health and cognitive functions. In addition to lifestyle choices, such as physical exercise, genetics can have an impact on the susceptibility to these lifestyle related diseases and also on brain health. Hippocampus, a structure located in the temporal lobe of the brain, is responsible for learning, memory, and emotional regulation. Even though genetics and lifestyles can have a debilitating effect on brain health, it could still be possible to promote hippocampal plasticity, and therefore cognitive functions, by increasing neurogenesis, the formation of new neurons in the hippocampus. In this Bachelor's thesis the effect of inherited running capacity and exercise on adult hippocampal neurogenesis was studied by using a selectively bred rat model. These rats with either high or low inherited running capacity were divided into running and sedentary groups to determine how aerobic exercise induces neurogenesis. The sedentary group provided information on how the inherited running capacity alone affects neurogenesis. The rats with low inherited running capacity were also more prone to obesity and metabolic diseases. New divided neurons in the rat hippocampus were stained immunohistologically with Ki-67 antibody and counted under a light microscope. The results of cell counts were analyzed by statistical methods. Each rat group showed signs of neurogenesis but the only statistically significant result was shown between running and sedentary rat groups with low inherited running capacity, where the running group had more new neurons in the hippocampus. Our results indicated that neurogenesis can be promoted by aerobic exercise, despite the low inherited running capacity. The used rat model was metabolically polygenic, thus, the result provides valuable information for further research on humans.

SISÄLLYSLUETTELO

| | |
|---|-----------|
| 1 JOHDANTO | 1 |
| 2 AINEISTO JA MENETELMÄT | 5 |
| 2.1 Eettiset hyväksynät | 5 |
| 2.2 Eläimet | 5 |
| 2.3 Aivoleikkeiden keräys | 5 |
| 2.4 Immunohistokemiallinen aivoleikkeiden värjäys | 6 |
| 2.5 Solujen laskeminen ja mikroskopointi | 7 |
| 2.6 Tilastollinen analyysi | 8 |
| 3 TULOKSET | 9 |
| 3.1 Aikuisiän hippokampaalinen neurogeneesi | 9 |
| 4 TULOSTEN TARKASTELU | 11 |
| KIITOKSET..... | 13 |
| KIRJALLISUUS..... | 13 |

LYHENTEET

| | |
|------------|--|
| AHN | aikuisiän hippokampaalinen neurogeneesi (engl. adult hippocampal neurogenesis) |
| DG | pykäläpoimu (engl. dentate gyrus) |
| HCR | korkean suorituskyvyn juoksija (engl. high-capacity runner) |
| HRT | korkean vasteen harjoittelija (engl. high-response trainer) |
| LCR | matalan suorituskyvyn juoksija (engl. low-capacity runner) |
| LRT | matalan vasteen harjoittelija (engl. low-response trainer) |
| SGZ | subgranulaarinen vyöhyke (engl. subgranular zone) |
| SVZ | subventrikulaarinen vyöhyke (engl. subventricular zone) |

1 JOHDANTO

Ylipaino ja metaboliset sairaudet ovat maailmanlaajuisesti kasvava ongelma, ja niiden on tutkittu olevan yhteydessä useisiin keskushermoston sairauksiin, kuten masennukseen, aivoinfarkteihin ja Alzheimerin tautiin (Guillemot-Legris & Muccioli 2017). Ylipainoon liittyvä tulehdustila voi olla merkittävä tekijä kognition heikentymisen kannalta, mutta kyseisestä yhteydestä tarvitaan lisätutkimusta (Almeida-Suhett ym. 2017). Ravinnon ja fyysisen aktiivisuuden lisäksi myös yksilön perimällä on osoitettu olevan merkitystä ylipainon sekä sydän-, verisuoni- ja aivoterveiden kannalta (Fall & Ingelsson 2014, Lett ym. 2020). Yksilön ikääntyessä aivojen muovautuvuus eli plastisiteetti vähenee, mikä myös osaltaan vaikuttaa heikentävästi kognitiivisiin toimintoihin, kuten muistiin ja oppimiseen (Kozareva ym. 2019).

Kognitiivisten toimintojen kannalta hippokampuksen alue on tärkeä. Hippokampuksen pykäläpoimussa (engl. dentate gyrus, DG) tapahtuva aikuisiän hippokampaalinen neurogeneesi (eng. adult hippocampal neurogenesis, AHN) on jatkuva prosessi, jossa esisolut kypsyvät jyväissoluiksi, jotka lopulta liittyvät hermoverkkoihin (Kozareva ym. 2019). Aikuisten nisäkkäiden aivoissa neurogeneesiä tapahtuu kahdella alueella eli hippokampuksen DG:n subgranulaarisella (engl. subgranular zone, SGZ) ja subventrikulaarisella (engl. subventricular zone, SVZ) vyöhykkeellä (Gage 2000). Neurogeneesissä syntyvillä uusilla jyväissoluilla esiintyy enemmän synaptista plastisuutta verraten vanhempiin jyväissoluihin (Kempermann ym. 2015, Abbott ym. 2020). AHN siis edistää sekä plastisiteettia hippokampuksen alueella että informaation prosessointia. Ikääntymisen lisäksi myös hermostoa rappeuttavat eli neurodegeneratiiviset sairaudet voivat heikentää neurogeneesiä. Jyrsijöillä tehdyissä tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että neurogeneesiä edistämällä näitä

ikäntymisen sekä rappeuttavien sairauksien haittavaikutuksia kognitiivisiin toimintoihin voidaan osittain kumota (Berdugo-Vega ym. 2020).

Neurogeneesiin vaikuttavat sekä hippokampuksen sisäiset että ulkoiset tekijät (Aimone ym. 2014). Nykytietämyksen mukaan ulkoisista tekijöistä fyysisellä aktiivisuudella katsotaan olevan kognitiota parantava vaikutus erityisesti hermovälittäjäaineiden ja hippokampuksen veren läpivirtauksen muutoksien, kasvutekijöiden säätelyn sekä lisääntyneen hippokampuksen alueen neurogeneesin kautta. Liikunnan neurogeneesiä stimuloiva vaikutus on osoitettu sekä jyrksijöillä että ihmisillä. Erityisesti aerobisen liikunnan on osoitettu edistävän neurogeneesiä hippokampuksen alueen kasvutekijöiden määrää stimuloimalla, mikä edistää uusien neuronien syntyä (Vivar & Praag 2017, Liu & Nusslock 2018). Akuuttina vasteena liikunta stimuloi neurokemikaaleja, kuten laktaattia, kortisolia ja neurotropiineja sekä välittäjäaineita, kuten serotoniinia, asetyylikoliinia ja glutamaattia (Basso & Suzuki 2017). Välittäjäaineilla on vaikutuksia solujen erilaistumis- ja selviytymisvaiheissa; esimerkiksi serotoniini käynnistää esisolujen lisääntymisvaihetta ja asetyylikoliini sekä glutamaatti edistävät neuronien selviytymisen vaihetta (Aimone ym. 2014). Matalatasoisen neuroinflammation, jossa ilmenee tulehduksellisia markkereita mikroglia soluissa ja valkosolujen erittämiä sytokiineja, on todettu liittyvän ikäntymiseen. Mikroglia solut ovat immuunipuolustuksen soluja, jotka säätelevät keskushermoston tulehdusreaktiota esimerkiksi fagosytoimalla solujätettä (Kohman ym. 2012, Airas & Saraste 2020). Neuroinflammation on todettu vaikuttavan hippokampuksen neurogeneesiin heikentävästi, mutta tutkimusten mukaan liikunta alentaa neuroinflammatiota muokaten mikroglia-aktivaatiota. Varsinaiset vaikutukset ovat kuitenkin riippuvaisia sukupuolesta, iästä ja aivojen alueesta (Kohman ym. 2012, Airas & Saraste 2020).

Perimän sekä liikunnan vaikutusta hippokampuksen neurogeneesiin on tutkittu rottamalleilla, jotka on perimältään valikoidusti jalostettu eroamaan aerobiselta vasteeltaan tai kapasiteetiltaan (Nokia ym. 2016, Mäkinen 2021). Nokia ym. (2016)

tutkimuksessa on ilmennyt, kuinka AHN lisääntyy sekä hyvän aerobisen vasteen harjoittelijoilla (engl. high-response trainer, HRT) että huonon aerobisen vasteen harjoittelijoilla (engl. low-response trainer, LRT) pitkäaikaisen aerobisen liikunnan myötä verrattuna liikkumattomiin rottiin. HRT-rotilla maksimaalinen juoksukapasiteetti kehittyy tehokkaammin kuin LRT-rotilla, ja AHN onkin ollut kaikista suurinta HRT-rotilla näiden hyvän perityn aerobisen vasteen takia (Nokia ym. 2016). Neurogeneesiin mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä on tutkittu myös rottamallilla, jossa rotilla on perimältään joko korkea tai alhainen aerobinen kapasiteetti (Mäkinen ym. 2021). Koch & Britton (2018) ovat kehittäneet rottamallin, jossa rotat ovat valikoidusti jalostettu hyvän perityn aerobisen kapasiteetin omaaviin eli korkean suorituskyvyn juoksijoihin (engl. high-capacity runners, HCR), sekä huonon perityn aerobisen kapasiteetin omaaviin eli matalan suorituskyvyn juoksijoihin (engl. low-capacity runners, LCR). HCR-rottien maksimaalinen peritty juoksukapasiteetti on yli seitsemänkertainen LCR-rottien juoksukapasiteettiin verrattuna. HCR-rotat jaksavat juosta maksimissaan noin 2000 metriä, mutta LCR-rotat vain noin 250 metriä. Tätä rottamallia on käytetty myös tautiriskien, ikääntymisen ja pitkäikäisyyden tutkimista varten. LCR-rotilla on HCR-rottia korkeampi riski ylipainoon ja metabolisiin sairauksiin, minkä vuoksi niillä on matalampi elinajanodote. Kyseistä rottamallia on käytetty myös tutkimuksissa, joissa on selvitetty yhteyttä matalan liikuntakapasiteetin sekä neurodegeneratiivisten ja kognitiota heikentävien sairauksien välillä (Koch & Britton 2018). Mäkinen ym. (2021) ovat tutkineet neuroinflammaation ja aivojen plastisuuden markkereita liikkumattomien LCR- ja HCR-rottien hippokampuksissa. Tutkimuksessa AHN:n määrä on ollut merkittävästi pienempi LCR-rotilla verrattuna HCR-rotiin. LCR-rotilla on ollut myös enemmän neuroinflammaatiosta kertovia markkereita kuin HCR-rotilla. Tutkimuksen mukaan alhainen perinnöllinen aerobinen kapasiteetti, joka altistaa liikalihavuudelle ja huonolle aineenvaihdunnalle, vaikuttaisi negatiivisesti aivojen terveyteen (Mäkinen ym. 2021). Liikunnan vaikutuksesta HCR- ja LCR-rottien neurogeneesiin ei ole vielä julkaistu tutkimusta. Koska aivojen terveyttä

heikentävät ylipaino ja metaboliset sairaudet ovat maailmanlaajuisestikin yleistyvä ongelma (Guillemot-Legrís & Muccioli 2017), niin Koch & Britton (2018) kehittämällä rottamallilla voidaan saada hyödyllistä tietoa siitä, kuinka liikunnalla voitaisiin kumota näitä huonon perimän aiheuttamia haittavaikutuksia.

Tässä LuK-tutkielmassa tutkittiin kuinka perimä ja liikunta vaikuttavat neurogeneesiin aikuisten urosrottien hippokampuksen pykäläpoimussa. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, kuinka rottien erilainen perinnöllinen juoksukapasiteetti ja fyysinen aktiivisuus vaikuttavat uusien hermosolujen syntyyn. Perimän ja liikunnan vaikutusten tutkimiseen käytettiin alun perin Koch & Britton (2018) jalostamia HCR- ja LCR-rottia. HCR- ja LCR-rotat jaettiin fyysiseltä aktiivisuudeltaan kahteen erilaiseen ryhmään eli liikkumattomiin ja juokseviin. Liikkumattomalla ryhmällä voitiin tutkia pelkän perityn aerobisen kapasiteetin vaikutusta neurogeneesiin, ja juoksevalla ryhmällä voitiin puolestaan tutkia kuinka liikunta vaikuttaa HCR- ja LCR-rottien neurogeneesiin. Neurogeneesiä tutkittiin uusia soluja värjäävän Ki-67-vasta-ainevärjäyksen avulla. Ki-67-vasta-ainevärjäyksen jälkeen rottien aivoleikkeistä laskettiin uudet jakautuneet hermosolut valomikroskoopin avulla. Koska LCR-rotilla on huono peritty juoksukapasiteetti ja useille eri sairauksille altistava perimä, tutkimuksen hypoteesina oli, että LCR-rotilla on liikkumattomassa ryhmässä vähemmän neurogeneesiä kuin HCR-rotilla. Juoksevilla LCR-rotilla on kuitenkin enemmän neurogeneesiä kuin liikkumattomilla LCR-rotilla liikunnan neurogeneesiä lisäävien vaikutusten takia. Koska HCR-rotilla on hyvä peritty juoksukapasiteetti ja terveyden kannalta parempi perimä, tutkimuksen hypoteesina oli, että juoksevilla HCR-rotilla tulee olemaan enemmän neurogeneesiä kuin liikkumattomilla HCR-rotilla.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Eettiset hyväksynnät

Kaikissa tutkimukseen liittyvissä kokeissa noudatettiin Euroopan unionin valtuuston direktiiviä 86/609/EEC "Kokeisiin sekä muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien selkärankaisten eläinten suojelua koskeva eurooppalainen yleissopimus". Eläinkoelupien numero oli ESAVI/12840/2019.

2.2 Eläimet

Kokeessa käytettiin Koch & Britton (2018) kehittämää polygeenista rottamalla, jossa kantapopulaatiosta on valikoidusti jalostettu kaksi aerobiselta juoksukapasiteetiltaan erilaista rottalinjaa, eli LCR- ja HCR-rottalinjat. Aikuiset LCR- ja HCR-rotat (uros- ja naarasrotat) kuljetettiin Toledon yliopistosta (Ohio, Yhdysvallat) Jyväskylään, jossa rotista siitettiin 45. sukupolvi. Tutkimuksessa käytettiin vain urosrottia, jotka vieroitettiin neliviikkoisina. Tämän jälkeen LCR- ja HCR-rotat jaettiin tutkimusta varten fyysiseltä aktiivisuudeltaan erilaisiin ryhmiin, eli liikkumattomiin ja juokseviin, mikä mahdollisti neurogeneesin tutkimisen ja vertailun neljän eri ryhmän välillä. Jokaisessa ryhmässä oli 6 rottia. Eläintilojen lämpötila oli 21 ± 2 °C ja ilmankosteus 50 ± 10 %. Rottien vuorokausirytmä vaihteli 12 h välein valoisan ja pimeän jakson välillä; valot laitettiin päälle klo 08.00 ja pois klo 20.00. Juoksevilla rotilla oli häkissä juoksupyörä, kun taas liikkumattomilla oli juoksupyörän tilalla virikkeenä muoviputki. Kaikissa häkeissä ruokaa oli vapaasti tarjolla. Rottia pidettiin yksittäin häkeissä noin 5 viikon ajan, jonka jälkeen ne lopetettiin.

2.3 Aivoleikkeiden keräys

Näytteiden keräys suoritettiin ohjaajan toimesta Mäkinen ym. (2021) kuvaaman protokollan mukaisesti ennen tämän tutkielman laboratorio-osuutta. Rotat

tainnutettiin hiilidioksidilla, ja lopetettiin sydänpunktiolla noin 12 h viimeisen liikuntasuorituksen jälkeen. Rottien aivot poistettiin kallosta, minkä jälkeen vasen ja oikea aivopuolisko erotettiin toisistaan. Tutkimuksessa käytettiin vain oikeaa aivopuoliskoa, joka kiinnitettiin 4 % paraformaldehydiliuoksessa 48 h, + 4 °C. Tämän jälkeen aivopuoliskot siirrettiin 0,1 M fosfaattisuolaliuokseen (PBS, pH 7,4). Aivopuoliskoja pidettiin leikkauksen preparointia varten 48 h huoneenlämmössä 30 % sakkaroosiliuoksessa, joka toimi jäätymisenestoaineena. Aivopuoliskot leikattiin kuivajäissä 40 µm paksuisiksi koronaalisiksi leikkeiksi. Tämän jälkeen jokaisen rotan yhden aivopuoliskon leikkeet jaettiin 12 jäätymisenestoainetta sisältävään putkeen niin, että jokaisessa putkessa oli 9-12 leikettä, mikä mahdollisti koko hippokampuksen kattavan anatomisen kuvauksen. Tutkimusta varten jokaista rottaa kohden valittiin yksi putki kahdestatoista. Leikkeitä säilöttiin ennen immunohistokemiallista värjäystä - 20 °C (Mäkinen ym. 2021).

2.4 Immunohistokemiallinen aivoleikkeiden värjäys

Rottien vapaasti kelluvat aivoleikkeet värjättiin immunohistokemiallisesti eri erissä samalla menetelmällä. Kaikki pesuvaiheet ja inkuboinnit tapahtuivat heilurissa huoneenlämmössä. LCR- ja HCR-rottien näytteet siirrettiin omiin lasisiin tuikepulloihin, joissa oli 1xPBS (pH 7,4). Näytteissä käytetty jäätymisenestoaine pestiin tämän jälkeen pois PBS-liuoksella 2 x 15 min. PBS poistettiin tuikepulloista, tilalle lisättiin 0,01 M Na-sitraatti, 0,05 % Triton X-100-liuosta ja näytteitä keitettiin 80 °C 30 min. Näytteiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi, minkä jälkeen näytteet pestiin 3 x 5 min PBS-liuoksessa. Tämän jälkeen suoritettiin peroksidaasiblokkaus 3 % H₂O₂ PBS-liuoksessa 30 min, joka esti aivoleikkeiden verisuonten värjäytymisen näytteissä. Seuraavaksi suoritettiin proteiinien epäspesifiä sitoutumista estävä seerumiblokkaus käyttämällä PBS, 0,3 % Triton X-100, 2 % normaalia vuohen seerumia, 1 h. Seerumiblokki poistettiin ja näytteiden primaarivärjäys suoritettiin hiiressä tuotetulla ihmisen Ki67-vastaisella monoklonaalisella vasta-aineella (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego,

California, Yhdysvallat) 1:500, PBS, 0,3 % Triton X-100, 2 % normaali vuohen seerumi. Näytteitä inkuboitiin yön yli huoneenlämmössä, minkä jälkeen näytteet pestiin 3 x 5 min PBS-liuoksessa. Pesun jälkeen suoritettiin sekundaarivärjäys hiiren IgG1:n raskaaseen ketjuun kohdistuvalla vuohen biotinyloidulla polyklonaalisella vasta-aineella (Abcam, Cambridge, Yhdistynyt kuningaskunta) 1:500, PBS, 0,3 % Triton-X-100. Näytteitä inkuboitiin 2 h huoneenlämmössä, minkä jälkeen näytteet pestiin 3 x 5 min PBS-liuoksessa. Pesun jälkeen suoritettiin tertiäarivärjäys streptavidini-piparjuuriperoksidaasi-konjugaatilla (Avantor®, Radnor, Pennsylvania, Yhdysvallat) 1:1000, PBS, 0,3 % Triton-X-100. Näytteitä inkuboitiin 2 h huoneenlämmössä, minkä jälkeen näytteet pestiin ensin 2 x 5 min PBS-liuoksessa ja kerran 0,05 M Tris-puskurilla (pH 7,6). Värjäysten visualisointia varten näytteet käsiteltiin diaminobentsidiinillä (DAB, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Yhdysvallat) seuraavanlaisesti: 0,05 M Tris-puskuriin (pH 7,6) lisättiin tablettina 0,25 % DAB:ia, minkä jälkeen tabletti liuotettiin sonikoimalla (Branson 2510, Connecticut, Yhdysvallat) n. 5 min ja vorteksoimalla. DAB suodatettiin uuteen putkeen ja aktivoitiin lopuksi 0,0225 % H₂O₂:lla. DAB:in annettiin vaikuttaa n. 8 min, jonka jälkeen DAB poistettiin ja näytteet pestiin 3 x 15 min 0,1 M natriumfosfaattipuskurilla. Aivoleikkeet siirrettiin puhtaille aluslaseille (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Yhdysvallat) 0,4 % gelatiinissa. Näytteet jätettiin kuivumaan 24 h ajaksi + 37 °C kuivauskaappiin.

Kuivuneet näytteet taustavärjättiin Nokia ym. (2012) mukaan 0,1 % kresyyli-violetilla, jonka annettiin vaikuttaa, kunnes leikkeet näyttivät tarpeeksi värjäytyneiltä. Puhdistus tapahtui nousevalla alkoholikonsentraatiolla ja ksyleenillä. Tämän jälkeen aluslasit peitettiin Depexillä (Merck, Darmstadt, Saksa) ja peitinlaseilla (Avantor®, Radnor, Pennsylvania, Yhdysvallat).

2.5 Solujen laskeminen ja mikroskopointi

Taustavärjättyjen näytteiden mikroskooppianalyysi suoritettiin sokkona. Tällä varmistettiin, että solujen laskemisen suorittaja ei tiennyt, mihin koe-eläinryhmään

kyseiset tarkasteltavat leikkeet kuuluivat. Neurogeneesin todentamiseksi leikkeiden hippokampuksen alueen Ki-67-positiiviset solut laskettiin valomikroskoopin (Olympus BX50, Tokio, Japani) avulla 40x suurennoksella. Näytteissä oli 9-12 leikettä, mikä huomioitiin solujen lukumäärää laskettaessa. Solujen lukumäärä suhteutettuna leikemäärään laskettiin jokaiselle näytteelle kaavalla:

$$\text{Solujen lukumäärä suhteutettuna leikemäärään} = \frac{\text{solujen määrä leikkeissä yhteensä} \times 12 \times 2}{\text{leikemäärä}}, \quad (1)$$

Koko hippokampuksen alueen kattava solumäärä saatiin kertomalla 12:sta, sillä yhden aivopuoliskon leikkeet oli alun perin jaettu ennen värjäystä 12 putkeen. Molempien hippokampusten solumäärä saatiin kertomalla solujen määrä vielä kahdella. Jokaisesta rottaryhmästä valittiin lopuksi yksi edustava näyte kuvattavaksi. Kuvaamiseen käytettiin valomikroskooppia (Olympus BX50, Tokio, Japani), kameraa (AxioCam ERc 5s, ZEISS, Jena, Saksa) ja ZEN lite 2012-ohjelmaa. Näytteet kuvattiin 10x objektiivilla (UPlanFI 10x/0.30 JAPAN, Tokio, Japani), sekä 100x öljyimmersion-objektiivilla (UPlanFI 100x/1.30 oil JAPAN, Tokio, Japani), jolloin peitinlasille lisättiin öljyä (ZEISS Immersol 518 F, Jena, Saksa).

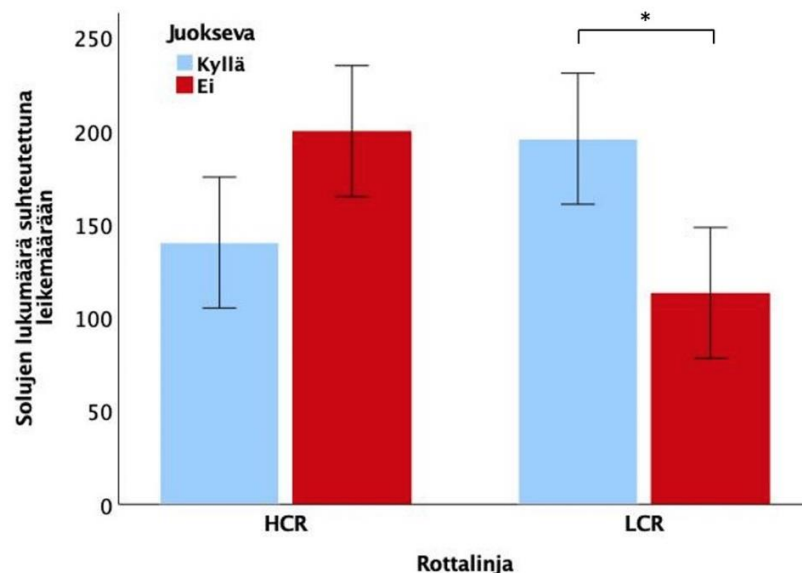
2.6 Tilastollinen analyysi

Tilastollinen analyysi tehtiin SPSS-ohjelmistolla (IBM SPSS Statistics 28.0.0.0). Aineiston normaalijakautuneisuus tarkistettiin käyttämällä Shapiro-Wilk-testiä. Tilastoanalyysissa käytettiin parametrisiä testejä, koska aineisto oli normaalijakautunut. Tilastollisesti merkittäväksi kynnysarvoksi asetettiin $p = 0,05$. Yhden muuttujan analyysilla (engl. Univariate) tarkasteltiin suhteutettujen solumäärien keskiarvojen eroja yhden muuttujan suhteen. Yksisuuntaisella varianssianalyysilla (engl. One-way ANOVA) verrattiin samanaikaisesti aineiston kahden muuttujan, rottalinja (HCR, LCR) ja juokseminen (kyllä, ei), suhteutettujen solumäärien keskiarvojen eroja.

3 TULOKSET

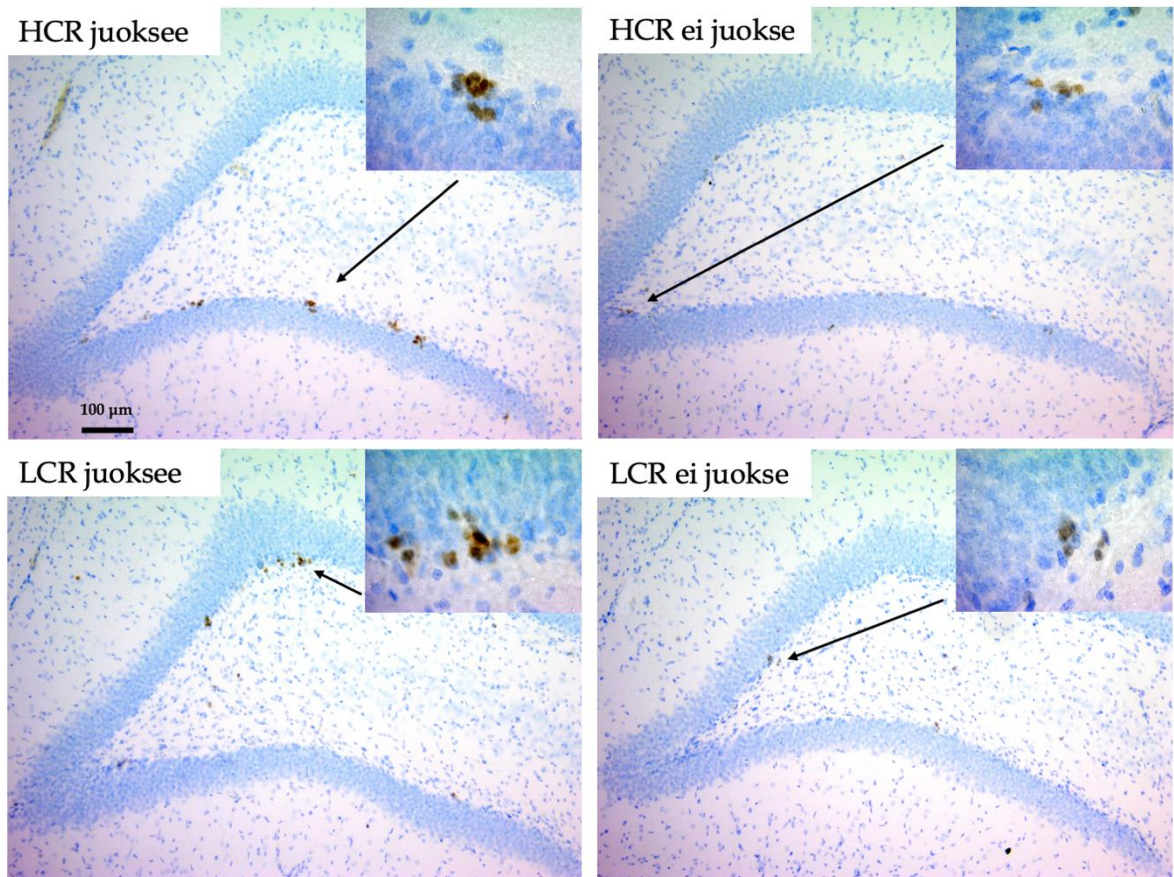
3.1 Aikuisiän hippokampaalinen neurogeneesi

Yhden muuttujan analyysissä HCR- (n = 12) ja LCR-rottien (n = 12) solumäärien ero ei ollut kokonaisuudessaan tilastollisesti merkitsevä (p = 0,622). Juoksevien ja liikkumattomien rottien välillä ei myöskään ollut kokonaisuudessaan tilastollisesti merkitsevää eroa solujen määrässä (p = 0,748). Rottalinjojen sisällä (Kuva 1) esiintyi kuitenkin eroja juoksevien ja liikkumattomien välillä. Kahden muuttujan varianssien vertailussa LCR-rottien juoksevien (n = 6) ja liikkumattomien (n = 6) ryhmien välinen ero oli tilastollisesti merkitsevä, $F[1, 11] = 6,087$, p = 0,033. Juoksevien LCR-rottien keskiarvo (SE) oli 196 (25) solua, ja liikkumattomien LCR-rottien keskiarvo (SE) oli 113 (23) solua. HCR-rottien ryhmien välillä ei ilmennyt tilastollisesti merkittävää eroa, $F[1, 11] = 0,939$, p = 0,355. Juoksevien HCR-rottien (n = 6) keskiarvo (SE) oli 140 (37) solua ja liikkumattomien HCR-rottien (n = 6) keskiarvo (SE) oli 200 (50) solua.



Kuva 1. Juoksevien ja liikkumattomien HCR- ja LCR-rottien uusien hermosolujen lukumäärän keskiarvo (\pm keskiarvon keskivirhe) hippokampuksen pykäläpöimussa. Jokaisen ryhmän otoskoko oli n = 6 eli yhteensä 24 rottaa. * p < 0,05.

Kuvassa 2 nähdään eri rottaryhmien värjäytyneet hermosolut hippokampuksen pykäläpoimussa. Kuvasta 2 on myös nähtävissä, että juoksevilla LCR-rotilla ilmeni enemmän värjäytyneitä hermosoluja kuin liikkumattomilla LCR-rotilla, mikä oli myös tämän tutkielman ainoa merkitsevä tulos.



Kuva 2. Valomikroskoopilla otetut kuvat eri rottaryhmien värjäytyneistä hermosoluista hippokampuksen pykäläpoimussa. Uudet jakautuneet hermosolut, jotka näkyvät ruskeina keskittyminä, on värjätty Ki-67-vasta-aineella. Suuremmat kuvat, joissa näkyy pykäläpoimun kärki, on otettu 10x suurennoksella. Lähikuvat, joista voi nähdä yksittäiset värjäytyneet hermosolut, on otettu 100x suurennoksella. Kuvaan on liitetty 100 µm pituinen mitta-asteikko.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Tämän LuK-tutkielman tavoitteena oli selvittää vaikuttavatko perimä ja liikunta rottien hippokampuksen neurogeneesiin. Juoksevien LCR-rottien uusien hermosolujen määrässä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero liikkumattomiin LCR-rottiin verrattuna, eli liikunta lisäsi neurogeneesiä (Kuva 1, Kuva 2). HCR-ryhmien kesken sekä liikkumattomien HCR- ja LCR-rottien välillä ei esiintynyt tilastollisesti merkitsevää eroa hermosolujen määrässä. Hypoteesi, jossa juoksevilla LCR-rotilla olisi enemmän neurogeneesiä kuin liikkumattomilla LCR-rotilla liikunnan neurogeneesiä indusoivien vaikutusten takia, toteutui. Aiemmissä tutkimuksissa liikunnan on osoitettu edistävän neurogeneesiä (Vivar & Praag 2017). Nokia ym. (2016) ovat myös huomanneet tutkimuksissaan AHN:n määrän nousevan liikunnan vaikutuksesta huonon aerobisen vasteen omaavilla LRT-rotilla. Ikääntymisen, ylipainon ja metabolisten sairauksien on tutkittu olevan yhteydessä neuroinflammaatioon, jonka on todettu alentavan hippokampuksen neurogeneesiä (Kohman ym. 2012, Almeida-Suhett ym. 2017). Liikunta alentaa neuroinflammaatiota, mikä puolestaan edistää neurogeneesiä (Kohman ym. 2012). Tämän tutkimuksen LCR-rottien tulokset ovat linjassa aiempien tutkimusten kanssa, sillä LCR-rottien perimä altistaa neuroinflammaatiolle ja aivojen aineenvaihdunnallisille häiriöille (Mäkinen ym. 2021), ja liikunnan neuroinflammaatiota alentavat vaikutukset voisivatkin osaltaan selittää juoksevien LCR-rottien lisääntyneen AHN:n.

Tutkimuksen toisena hypoteesina oli, että juoksevilla HCR-rotilla tulee olemaan enemmän neurogeneesiä kuin liikkumattomilla HCR-rotilla. Hypoteesi ei toteutunut, sillä liikkumattomilla HCR-rotilla ilmeni enemmän neurogeneesiä kuin juoksevilla HCR-rotilla, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Tuloksen voisi osaltaan selittää HCR-rottien jo valmiiksi hyvä juoksukapasiteetti, minkä vuoksi juokseminen ei lisännyt merkitsevästi neurogeneesiä. Lisäksi hypoteesina oli, että liikkumattomilla LCR-rotilla tulee olemaan vähemmän neurogeneesiä kuin

liikkumattomilla HCR-rotilla. Liikkumattomilla HCR-rotilla ilmeni enemmän neurogeneesiä kuin liikkumattomilla LCR-rotilla, mutta ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa uusien hermosolujen määrässä. Vaikka hypoteesi ei toteutunut, tulos oli samansuuntainen Mäkinen ym. (2021) tutkimuksen kanssa, jossa liikkumattomilla HCR-rotilla esiintyi enemmän neurogeneesiä liikkumattomiin LCR-rottiin verrattuna. Heidän tutkimuksessaan otoskoko oli suurempi ja tutkimuksessa käytettiin tuplakorttiin (engl. doublecortin, DCX) kiinnittyvää vasta-ainetta neurogeneesin tutkimiseen (Mäkinen ym. 2021), kun puolestaan tässä LuK-tutkielmassa käytettiin Ki-67-proteiiniin kohdistuvaa vasta-ainetta. DCX-proteiinia esiintyy DG:ssä kypsyvien neuraalisten esisolujen migraation aikana (Brown ym. 2003), kun taas Ki-67-proteiinia esiintyy hermosolujen lisäksi kaikissa elimistön jakautuvissa soluissa (Graefe ym. 2019), eli Ki-67-vasta-aineilla pystytään toisaalta värjäämään muitakin kuin hermosoluja. Molempia menetelmiä voidaan kuitenkin käyttää neurogeneesin tutkimiseen (Brown ym. 2003, Nokia ym. 2016).

Tässä LuK-tutkielmassa käytetyn HCR-LCR -rottamallin on ehdotettu soveltuvan ihmisten metabolisten sairauksien mallintamiseen, sillä kyseinen rottamalli on ihmisten tavoin polygeeninen kyseisten sairauksien suhteen. Usein tutkimuksissa käytetyt rottamallit eivät huomioi geenien yhteisvaikutusta sairauksien kohdalla. Tutkimus rottamallilla mahdollistaa olosuhteiden kontrolloimisen ja sen vuoksi kausaaliteetin havainnoinnin. Jalostuksen myötä rottamallissa on kuitenkin myös rajoitteita. Erityisesti HCR-rotat ovat hyvin pitkälle jalostettuja ja poikkeavat normaalista hajonnasta, mikä voisi osaltaan selittää juoksevien HCR-rottien hypoteesien vastaisia tuloksia (Koch ym. 2012, Mäkinen ym. 2021). Koska tutkimus on tehty vain urosrotilla, tutkimus ei huomioi sukupuolten välisiä eroja ja niiden mahdollisia vaikutuksia tuloksiin (Kohmann ym. 2012). Lisäksi tutkimuksen rajoitteena voidaan pitää suhteellisen pientä otoskokoa ($n = 24$).

Tämän tutkimuksen tulosten pohjalta voidaan todeta, että liikunta edistää huonon perityn aerobisen kapasiteetin omaavien rottien neurogeneesiä. Tällä rottamallilla

tehty tutkimus tuo lisätietoa siitä, että liikunta voisi edistää neurogeneesiä ja aivojen terveyttä, mikä mahdollisesti lieventää huonon perimän haittavaikutuksia. Tarvitaan kuitenkin lisätutkimusta ihmisillä, jotta tiedetään, onko liikunnan vaikutuksilla mahdollista kumota metabolisten sairauksien ja ylipainon vaikutuksia ihmisten aivoterveeseen.

KIITOKSET

Kirjoittajat haluavat kiittää LuK-tutkielman ohjaajia, Elina Mäkistä ja Jonna Nykkyä erinomaisesta ohjauksesta ja avusta projektin aikana. Haluamme kiittää LuK-ryhmää kaikkien tasapuolisesta työpanoksesta ja sujuvasta yhteistyöstä.

KIRJALLISUUS

- Abbott L.C. & Nigussie F. 2020. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat. Histol. Embryol.* 49: 3–16.
- Aimone J. B., Li Y., Lee S. W., Clemenson G.D., Deng W. & Gage F. H. 2014. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol. Rev.* 94: 991–1026.
- Airas L. & Saraste M. 2020. Mikroglia-solut-aivojen puhdistajat ja puolustajat. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim.* 136: 751–758.
- Almeida-Suhett C. P., Graham A., Chen Y. & Deuster P. 2017. Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 β expression in specific brain regions. *Physiol. Behav.* 169: 130–140.
- Basso J. C. & Suzuki W. A. 2017. The Effects of Acute Exercise on Mood, Cognition, Neurophysiology, and Neurochemical Pathways: A Review. *Brain plast. (Amsterdam, Netherlands).* 2: 127–152.
- Berdugo-Vega G., Arias-Gil G., López-Fernández A., Artegiani B., Wasielewska J. M., Lee C. C., Lippert M. T., Kempermann G., Takagaki K. & Calegari F., 2020.

- Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. *Nat. Commun.* 1: 1138–1142.
- Brown J. P., Couillard-Després S., Cooper-Kuhn C. M., Winkler J., Aigner L., Kuhn H. G. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 467: 1–10.
- Direktiivi 86/609/EEC. Kokeisiin sekä muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien selkärankaisten eläinten suojelua koskeva eurooppalainen yleissopimus (Eurooppa-neuvosto nro 123, Strasbourg 1985) Saatavissa: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A31986L0609>.
- Fall T. & Ingelsson E. 2014. Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382: 740–757.
- Gage F.H. 2000. Mammalian Neural Stem Cells. *Science* 287: 1433–1438.
- Graefe C., Eichhorn L., Wurst P., Kleiner J., Heine A., Panetas I., Abdulla Z., Hoeft A., Frede S., Kurts C., Endl E., Weisheit C. K. 2019. Optimized Ki-67 staining in murine cells: a tool to determine cell proliferation. *Mol. Biol. Rep.* 46: 4631–4643.
- Guillemot-Legris O. & Muccioli G. G. 2017. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci.* 40: 237–253.
- Kempermann G., Song H., Gage F. H. 2015. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9: 7–9.
- Koch L. G., Britton S. L., Wisløff U. 2012. A rat model system to study complex disease risks, fitness, aging, and longevity. *Trends. Cardiovasc. Med.* 2: 29–34.
- Koch L. G. & Britton S. L. 2018. Theoretical and Biological Evaluation of the Link between Low Exercise Capacity and Disease Risk. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2: 8–12.
- Kohman R. A., DeYoung E. K., Bhattacharya T. K., Peterson L. N., & Rhodes J. S. 2012. Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain. Behav. Immun.* 26: 803–810.
- Kozareva D. A., Cryan J. F. & Nolan Y. M. 2019. Born this way: hippocampal neurogenesis across the lifespan. *Aging Cell.* 18: e13007.

- Lett T. A., Vogel B. O., Ripke S., Wackerhagen C., Erk S. & Awasthi S. 2020. Cortical surfaces mediate the relationship between polygenic scores for intelligence and general intelligence. *Cereb. Cortex.* 30: 2707–2718.
- Liu, P. Z., & Nusslock, R. 2018. Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. *Front. Neurosci.* 12: 52–54.
- Mäkinen E., Lensu S., Honkanen M., Laitinen P., Wikgren J., Koch L. G., Britton S. L., Kainulainen H., Pekkala S., Nokia M. S. 2021. Rats bred for low intrinsic aerobic exercise capacity link obesity with brain inflammation and reduced structural plasticity of the hippocampus. *Brain. Behav. Immun.* 97: 250–259.
- Nokia, M. S., Anderson, M. L., & Shors, T. J. 2012. Chemotherapy disrupts learning, neurogenesis and theta activity in the adult brain. *Eur. J. Neurosci.* 36(11), 3521–3530.
- Vivar C. & van Praag H. 2017. Running Changes the Brain: the Long and the Short of It. *Physiology (Bethesda).* 32: 410-424.