

TYVITUMAKKEIDEN GABAERGISEN NEUROTRANSMISSION ADAPTIIVISET
MUUTOKSET PARKINSONIN TAUDISSA

Arttu Kontti
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmakologian ja lääkehoidon osasto

Syyskuu 2014

SISÄLLYSLUETTELO

| | |
|---|----|
| 1. JOHDANTO | 6 |
| 2. AIVOJEN TYVITUMAKKEET JA PARKINSONIN TAUTI..... | 7 |
| 2.1. Tyvitumakkeiden toiminta ja anatomia | 7 |
| 2.2. GABA:n synteesi ja metabolia | 10 |
| 2.3. Parkinsonin tauti..... | 11 |
| 2.3.1. Parkinsonin taudin etiologia | 13 |
| 2.3.2. Parkinsonin taudin patofysiologia | 15 |
| 2.3.2.1. Solutason muutokset..... | 17 |
| 2.3.2.2. Toiminnalliset muutokset..... | 18 |
| 3. PARKINSONIN TAUDIN AIHEUTTAMAT MUUTOKSET TYVITUMAKKEIDEN GABAERGISESSA NEUROTRANSMISSIOSSA..... | 18 |
| 3.1. GABA-pitoisuuksien muutokset tyvitumakkeissa | 18 |
| 3.2. Vaikutukset GABA-reseptoreihin | 20 |
| 3.3. Vaikutukset glutamaattidekarboksylaasi- ja GABA-transportteritasoihin | 21 |
| 3.4. Huomioita GABAergisten muutosten tutkimuksesta | 23 |
| KOKEELLINEN OSA | 25 |
| 4. JOHDANTO JA TUTKIMUKSEN TAVOITE..... | 25 |
| 5. MATERIAALIT JA MENETELMÄT | 26 |
| 5.1. Koe-eläimet | 26 |
| 5.2. Tutkittavat yhdisteet ja mikrodialyysissa käytetyt kemikaalit | 27 |
| 5.3. Stereotaktinen leikkaus | 29 |
| 5.4. Mikrodialyysit | 30 |
| 5.5. Rottien perfusointi ja mikrotomisten leikkeiden valmistaminen | 32 |
| 5.6. HPLC-analyysin ajoliuokset ja analyysin vaatimat kemikaalit ja liuokset..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 5.6.1. HPLC-ajoliuokset | 33 |
| 5.6.2. GABA:n derivatisointiliuokset ja derivatisointiprotokolla | 34 |
| 5.6.3. Standardiliuosten valmistus | 36 |
| 5.7. HPLC-laitteisto | 36 |
| 5.8. GABA:n erottumisen validointi | 37 |
| 5.9. Havaitsemis- ja määrittämissrajien määrittäminen | 38 |
| 5.10. Derivatisointimenetelmän stabiilius | 39 |
| 5.11. Mikrodiälyysikoettimet ja niiden testaaminen | 39 |
| 6. TULOKSET | 40 |
| 6.1. Käsitteilyn vaikutus rottien kasvuun | 40 |
| 6.2. GABA:n erottumisen validointi | 42 |
| 6.3. Havaitsemis- ja määrittämissrajien määrittäminen | 43 |
| 6.4. Derivatisointiliuoksen stabiilius | 47 |
| 6.5. Koettimien <i>in vitro</i> -saannot | 48 |
| 7. POHDINTA | 49 |
| 7.1. Hermokasvutekijöiden vaikutus rottien kasvuun | 49 |
| 7.2. HPLC-laitteiston toiminta | 50 |
| 7.3. GABA:n erottuminen | 51 |
| 7.4. Derivatisointi | 52 |
| 7.5. Havaitsemis- ja määrittämissrajien määrittäminen | 53 |
| 7.6. Derivatisointiliuoksen stabiilius | 54 |
| 7.7. Koettimien <i>in vitro</i> -saantomäärittäminen | 55 |
| 7.8. Mikrodiälyysi menetelmänä | 56 |
| 8. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET | 58 |
| KIRJALLISUUSLUETTELO | 60 |

LYHENTEET

| | |
|----------|--|
| 5-HIAA | = 5-Hydroxyindoleacetic acid, 5-hydroksi-indolietikkahappo |
| 6-OHDA | = 6-hydroksidopamiini |
| AAV | = Adeno-associated virus, adenoassosioitu virus |
| CDNF | = Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor, konservoitunut dopamiinisolujen hermokasvutekijä |
| CHO-solu | = Chinese hamster ovary cell, kiinanhamsterin munasarjasolu |
| DBS | = Deep brain stimulation, aivojen syvien osien stimulaatio |
| DL | = Detection limit, analyysin havaitsemisraja |
| DOPAC | = 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3,4-dihydroksifenylietikkahappo |
| GABA | = γ -amino butyric acid, gamma-aminovoihappo |
| GAD | = Glutamic acid decarboxylase, glutamaattidekarboksylaasi |
| GAT | = GABA-transporter, GABA-transportteri |
| GDNF | = Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor, Glia-solulinjaperäinen hermokasvutekijä |
| GPe | = Globus pallidus externus (syn. globus pallidus lateralis), linssitumakkeen pallon ulompi osa |
| GPi | = Globus pallidus internus (syn. globus pallidus medialis), linssitumakkeen pallon sisempi osa |
| GWAS | = Genome-wide Association Study, Genomin kattava assosiaatiotutkimus |
| HPLC | = High performance liquid chromatography, korkean erotuskyvyn nestekromatografia |
| HVA | = Homovanillic acid, homovanilliinihappo |
| IC50 | = Half-maximal inhibitory concentration, inhibition puolimaksimipitoisuus |
| ICH | = International Conference on Harmonisation |
| L-DOPA | = L-3,4-dihydroxyphenylalaninen, L-3,4-dihydroksifenyylialaniini (syn. levodopa) |

| | |
|-------|---|
| MANF | = Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor, mesenkefaalinen astrosyyttiperäinen hermokasvutekijä |
| MAO-B | = B-tyypin monoamiinioksidaasi |
| MFB | = Medial forebrain bundle, mediaalinen etuaivojen kimppu |
| MPTP | = 1-metyyli-4-fenyyl-1,2,3,6-tetrahydropyridiini |
| mRNA | = Messenger-ribonucleic acid, lähetti-ribonukleinihappo (lähetti-RNA) |
| NAT | = Noradrenaline transporter, noradrenaliinitransportteri |
| OPA | = O-Phthal(di)aldehyde, o-ftaali(di)aldehydi |
| PAF | = Paraformaldehydi |
| PBS | = Phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos |
| PET | = Positron emission tomography, positroniemissiotomografia |
| PPN | = Pedunculo pontine nucleus, pedunkulopontiinitumake |
| QL | = Quantification limit, analyysin määritysraja |
| SNe | = Substantia nigra pars compacta, mustatumake pars compacta |
| SNr | = Substantia nigra pars reticulata, mustatumake pars reticulata |
| VTA | = Ventral tegmental area, ventraalinen tegmentaali alue (syn. ventraalinen tegmentum) |

1. JOHDANTO

Parkinsonin tauti on etenevä aivorappeumasairaus, jossa *substantia nigra* (mustatumake) dopaminergiset hermosolut alkavat kuolla, ja tämän seurauksena *striatum*in dopaminerginen aktiivisuus vähenee (Dauer ja Przedborski 2003). Tämä johtaa koko tyvitumakejärjestelmän epätasapainoon, mikä näkyy taudille tyypillisinä motorisina oireina. Viimeaikoina on myös enemmän alettu kiinnittämään huomiota Parkinsonin taudin ei-dopaminergisen hermovälityksen häiriöistä johtuviin oireisiin. Nämä oireet eivät tyydyttävästi lievyt dopaminergisillä lääkkeillä (Brichta ym. 2013). Taudille leimalliset oireet ovat seurausta dopaminergisten hermoratojen muutoksista, mutta osa oireista johtuu myös muiden hermojärjestelmien muutoksista, jotka voivat olla itsenäisiä patologisia muutoksia tai seurausta dopaminergisen järjestelmän vaurioiden aiheuttamista adaptiivisista muutoksista. Vaikka Parkinsonin tauti on tunnettu pitkään ja sitä on myös tutkittu paljon, niin suuri osa taudin patofysiologiasta on edelleen selvittämättä.

Tämän pro gradu -työn kirjallisessa osassa tarkastelen, mitä aivojen gamma-aminovoihappo (GABA) -välitteisten inhibitoristen järjestelmien muovautumisesta Parkinsonin taudin yhteydessä tiedetään, ja minkälaisia vaikutuksia näillä muutoksilla on Parkinsonin taudin oireiden kehittymisessä. Työn kokeellisen osan tarkoituksena oli selvittää hermokasvutekijöiden, mesenkefaalisen astrosyyttiperäisen hermokasvutekijän (MANF), konservoituneen dopamiinisolujen hermokasvutekijän (CDNF) sekä gliasolulinjaperäisen hermokasvutekijän (GDNF) vaikutusta tyvitumakkeiden suoran ja epäsuoran palauteradan toimintaan mikrodialyysimenetelmän avulla.

Mikrodialyysinäytteiden analysointi on haasteellista. Mikrodialyysikoetin kerää kaikkia pienimolykyllisiä fysiologisia yhdisteitä vaihtelevin saannoin. Dialyysinesteillä on korkea suolapitoisuus, mistä johtuen *on line* -analytiikan kehittäminen on vaikeaa ja muun muassa massaspektrometrin suora liittäminen mikrodialyysilaitteiston päähän on haastavaa, vaikka siinäkin on onnistuttu (Shackman ym. 2007; Buck ym. 2009). Tämän työn kokeellisessa osiossa tarkastelen o-ftaaldialdehydi-derivatisoidun GABA:n käänteisfaasi-HPLC-analyysimenetelmän ja -laitteiston toimintaa ja

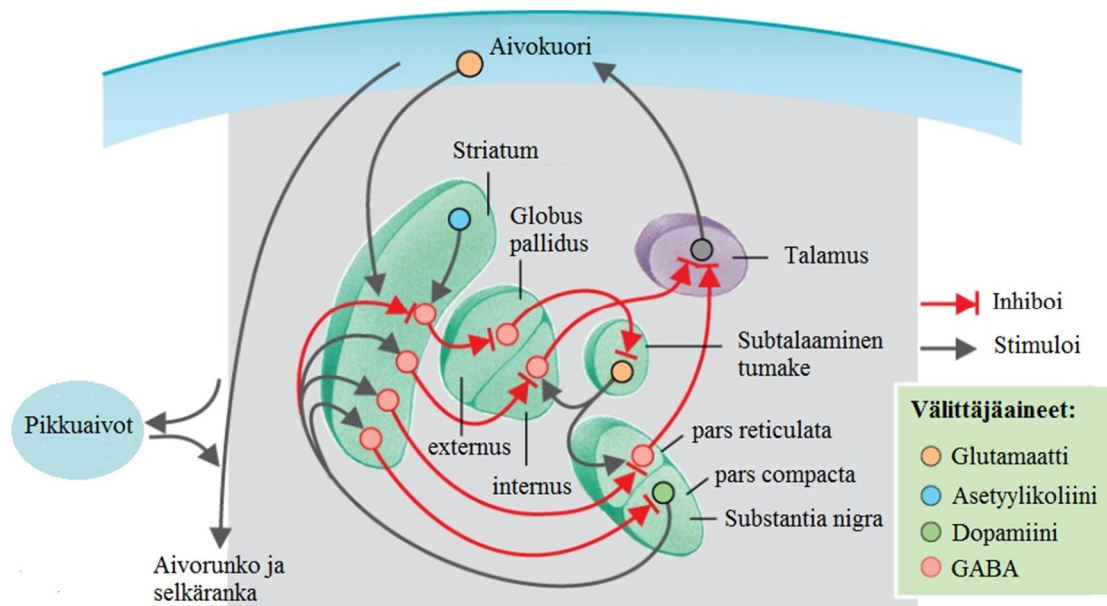
analyysiparametreja. Tämän lisäksi kuvailen kuinka hermokasvutekijöiden stereotaktinen annostelu sekä mikrodialyysikoheet toteutettiin.

2. AIVOJEN TYVITUMAKKEET JA PARKINSONIN TAUTI

2.1. Tyvitumakkeiden toiminta ja anatomia

Tyvitumakkeet ovat ryhmä toisiinsa yhteyksissä olevia hermosolukeskittymiä isoaivojen keskellä ja pohjassa, ja ne osallistuvat liikkeiden aloituksen kontrollin lisäksi muun muassa liikkeiden toteuttamisen kontrolliin, työmuistin toimintaan, sekä motivaatioon (Turner 2001). Niiden tehtävänä on toimia eräänlaisina säätelykytkiminä. Motoriikkaa säädelllessään niiden mahdollisena tehtävänä on antaa motorisille toimeenpaneville aivoalueille lupa toteuttaa automaattisia liikesarjoja, ja ne myös integroivat tähän päätöksentekoon sekä opittuja että motivaatioon liittyviä tekijöitä (Wichmann ym. 2011). Liikkeen aloitukseen liittyvät signaalit ovat lähtöisin motoriselta aivokuorelta. Tyvitumakkeilla tiedetään olevan myös muita kuin motoriikkaan liittyviä tehtäviä, mutta tässä työssä keskityn tarkastelemaan motorista säätelyä.

Tyvitumakkeet koostuvat ihmisellä *putamenista* (aivokuorukka), *globus palliduksesta* (linssitumakkeen pallo), *nucleus caudatuksesta* (häntätumake), subtalaamisesta tumakkeesta (STN), sekä *substantia nigra* (mustatumake). *Putamen* ja *globus pallidus* yhdessä muodostavat rakenteen, jota kutsutaan *nucleus lentiformikseksi* (linssitumake). *Striatum* viittaa useimmin *putamenin* ja *nucleus caudatuksen* yhdessä muodostamaan rakenteeseen, kun taas *corpus striatum* voi kirjallisuudessa sisältää edellisten lisäksi myös *globus palliduksen* (Paxinos ja Watson 1998; Turner 2001). Toiminnallisesti näitä tumakkeita jaetaan yleensä vielä edelleen. *Globus pallidus* voidaan jakaa kahteen osaan: sisempään (*g. pallidus internus/medialis*, GPI/GPm) ja ulompaan osaan (*g. pallidus externus/lateralis*, GPe/GPl). *Substantia nigra* jaetaan puolestaan kahteen toiminnallisesti erilliseen osaan: *substantia nigra pars compactaan* (SNc) ja *pars reticulataan* (SNr). Kuvassa 1. on kuvattuna tyvitumakkeiden väliset tärkeimmät kytkökset.



Kuva 1. Aivojen tyvitumakkeet ja niiden tärkeimmät hermoyhteydet. Kuva muokattu (Simmons 2011) -kirjan kuvasta.

Striatum on tärkein syöttösignaaleja saava osa tyvitumakkeista saaden hermosignaaleja eri puolelta aivokuorta, sekä dopaminergista hermotusta *substantia nigra pars compactasta* ja *ventraalisesta tegmentumista* (VTA) (Utter ja Basso 2008). *Substantia nigra pars compactan* hermotukset ovat tärkeitä motorisen kontrollin säätelyssä ja VTA:lta tulevat dopaminergiset hermotukset ovat puolestaan keskeisiä palkitsemisjärjestelmän kytkeytymisessä motorisiin osiin. Hermoyhteydet *striatumiin* jakaantuvat tarkasti alueittain, eikä yhdelle *striatumin* alueelle tule signaalia kuin pieneltä alueelta aivokuorta (Turner 2001). *Striatumin* signaaliprosessointi on aivokuoren tavoin voimakkaasti spatiaalisesti organisoitunutta. Myös subtalaamista tumaketta voidaan pitää syöttötumakkeena, sillä myös siihen tulee suoraa eksitoivaa hermotusta aivokuorelta (Nambu ym. 2002).

Tyvitumakkeista signaalit lähtevät ulos *substantia nigra pars reticulatan* tai *globus pallidus internuksen* kautta, ja nämä aivoalueet hermottavat vain kolmea kohdetta: *talamusta*, *superior colliculusta* (yläkukkulat), sekä *pedunculopontiinitumaketta* (*Pedunculopontine nucleus*, PPN) (Utter ja Basso 2008). *Talamuksen* kautta tyvitumakkeet vaikuttavat motorisen, sensorisen ja kognitiivisen kortikaalisen informaation käsittelyyn. *Superior colliculuksen* kautta tyvitumakkeet osallistuvat

silmien ja pään liikkeiden kordinointiin. PPN:n kautta tyvitumakkeet vaikuttavat liikkumiseen ja asennon säätelyyn.

Nykyinen perusmalli kahdesta rinnakkaisesta toiminnallisesta radasta tyvitumakkeiden sisällä on esittelemisestään lähtien ollut Parkinson-tutkimuksen perusta (Albin ym. 1989; Alexander ja Crutcher 1990). Mallin perustana on ajatus kahdesta rinnakkaisesta hermoradasta, joita *striatumia* hermottava *substantia nigra pars compacta* säätelee dopaminergisen hermotuksen avulla (Kuva 2). Suorassa radassa aivokuoren glutamaterginen aktiivisuus ja *substantia nigra pars compactan* dopaminerginen, D1-reseptorin kautta välittyvä, eksitaatio aktivoivat GABAergista rataa, joka inhiboi suoraan *globus palliduksen* sisempää (*internus*, GPi) osaa sekä *substantia nigraa pars reticulataa* (SNr). Näiden kahden tumakkeen inhibitio johtaa *talamuksen* lisääntyneeseen aktivaatioon. Epäsuorassa radassa *striatumin* inhibitoristen D2-reseptorien aktivaatio inhiboi GABAergista rataa, joka puolestaan inhiboi *globus palliduksen* ulompaa (*externus*, GPe) osaa. Tämän inhiboivan radan inhibitio johtaa GPe:n lisääntyneeseen aktivaatioon. GPe:n lisääntynyt aktivaatio puolestaan inhiboi GABAergisen radan kautta subtalaamista tumaketta (STN), sekä suoraan GPi:a ja SNr:a. STN on tärkeä säädellyn motorisen aktiivisuuden keskus ja tyvitumakkeiden ainoa glutamaterginen solukeskus. Subtalaaminen tumake aktivoi normaalisti SNr:a ja GPi:a. SNc:sta tuleva *striatumin* aktivaatio normaalisti toimivissa tyvitumakkeissa johtaa sekä suoran että epäsuoran radan kautta *talamuksen* lisääntyneeseen aktivaatioon, mikä antaa motoriselle aivokuorelle signaalin käynnistää toivottuja liikesarjoja (Wichmann ym. 2011). Parkinsonin taudissa dopaminergisen hermotuksen heikkenemisen myötä *talamuksen* aktivaatio vähenee.

Epäsuoran ja suoran radan epätasapaino on ollut klassinen Parkinsonin taudin tutkimuksen viitekehys. Nykyään tiedetään, että tyvitumakkeita säätelee näiden kahden radan lisäksi myös kolmas, glutamaterginen hypersuora rata (Nambu ym. 2002). Siinä aivokuoren motoriset osat eksitoivat suoraan subtalaamista tumaketta ohittaen kokonaan *striatumin* ja *globus palliduksen*. Tämän radan merkitys Parkinsonin taudin oireisiin on edelleen epäselvä, mutta koska *substantia nigra pars compactan* dopaminergiset solut

eivät osallistu suoraan tämän radan säätelyyn, on sen merkitys Parkinsonin taudissa todennäköisesti suoraa ja epäsuoraa rataa vähäisempi.

2.2. GABA:n synteesi ja metabolia

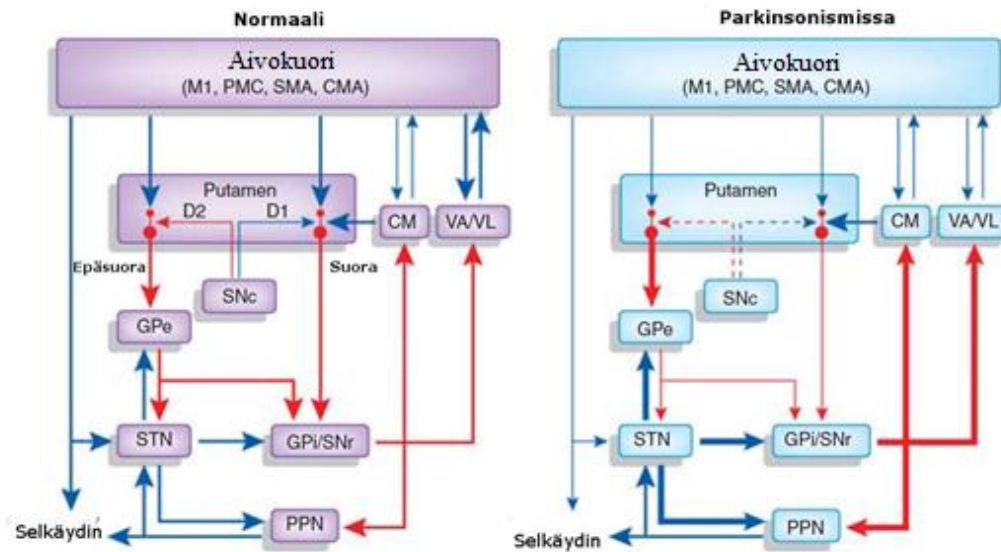
GABA on rakenteeltaan aminohappo, jota ei kuitenkaan käytetä proteiinien muodostamiseen. GABAergiset hermosolut muodostavat uutta GABA:a pääasiassa glutamaatista glutamaattidekarboksylaasi (GAD) -entsyymien avulla, vaikka muitakin synteesireittejä tunnetaan (Iversen ym. 2009). GAD-entsyymistä tunnetaan kaksi isoformia, GAD65 ja GAD67, jotka katalysoivat samaa reaktiota, mutta niiden lokalisaatio ja säätely poikkeavat toisistaan. GABA:n muodostumiselle tärkeä glutamaatti syntetisoituu puolestaan glukoosista sitruunahappokierron entsyymien syntetisoimana. GABA varastoituu hermopäätteissä oleviin vesikkeleihin, joiden pinnalla oleva vesikulaarinen GABA-transportteri (VGAT) vastaa GABA:n konsentroimisesta vesikkeleihin.

Soluvälitilaan vapautuneen GABA:n eliminaatio tapahtuu aktiivisen soluun otton kautta. Suurin osa GABA:n soluun otosta tapahtuu läheisiin gliasoluihin, mutta myös presynaptiset GABAergiset hermosolut ilmentävät soluun otosta vastaavaa GABA-transportteria (GAT) (Conti ym. 2011). Presynaptiseen hermosoluun päätyvä GABA varastoituu vesikkeleihin uudelleen käytettäväksi tai muutetaan takaisin glutamaatiksi, josta voidaan myöhemmin taas syntetisoida GABA:a (Iversen ym. 2009). Gliasoluun otettu GABA puolestaan metaboloidaan. Prosessissa ensin mitokondriaalinen entsyymi GABA-transaminaasi (GABA-T) katalysoi reaktiota, jossa GABA:n aminoryhmä siirtyy α -ketoglutaraatti-molekyylille. Reaktiossa syntyy yksi glutamaatti- ja yksi sukkinyylisemialdehydi-molekyyli, joka voi puolestaan pilkkoutua edelleen sukkinyylisemialdehydidehydrogenaasin (SSADH) katalysoimana sukkinaatiksi. Sukkinaatti metaboloituu edelleen sitruunahappokierron osana. Gliasolussa syntyvä glutamaatti muutetaan glutamiiniksi glutamiinisyntaasin katalysoimana. Syntynyt glutamiini kuljetetaan solusta ulos ja presynaptiseen GABAergiseen hermosoluun, jossa siitä syntetisoidaan uutta GABA:a.

2.3. Parkinsonin tauti

Parkinsonin tauti on tyvitumakkeisiin kohdistuva hermorappeumasairaus. Taudin tyypioireet ovat vapina, liikkeen aloittamisen vaikeus (akinesia), liikkeiden hitaus (bradykinesia), ilmeettömyys (hypomimia), käsialan pieneneminen (mikrografia), askelpituuden lyheneminen, sekä asentovirheet, kuten Parkinson-potilaille tyypillinen etukumara asento (Wolters 2009). Se on toiseksi yleisin neurodegeneratiivinen sairaus Alzheimerin taudin jälkeen (Dauer ja Przedborski 2003). Nimensä tauti on saanut James Parkinsonin mukaan, joka kuvaili sairauden oireet 1817 artikkelissaan ”an Essay on the Shaking Palsy”. Parkinsonin taudissa *substantia nigra* dopaminergiset hermosolut alkavat kuolla, mikä johtaa *striatumin* vähentyneeseen dopaminergiseen aktiivisuuteen. Dopamiinipitoisuus *striatumissa* voi olla laskenut jopa 80 % ja noin 60 % *striatumia* hermottavan *substantia nigra pars compactan* soluista voi olla tuhoutunut ennen kuin Parkinsonin taudille tyypilliset motoriset oireet tulevat esiin (Dauer ja Przedborski 2003).

Viime vuosina on alettu enemmän kiinnittämään huomiota Parkinsonin taudin muihin kuin motorisiin oireisiin. Näitä ovat muun muassa autonomisen hermoston muutokset, kuten häiriöt unikäyttäytymisessä ja ylenmääräinen hikoilu, sekä muutokset aistimusten tulkinnassa (Brichta ym. 2013). Parkinsonin tautiin liitetään usein myös muita neurologisia liitännäissairauksia, kuten masennus, dementia, psykoosit ja ahdistuneisuushäiriöt (Wolters 2009). Nämä oireet ovat myös monen Parkinsonin taudissa käytetyn lääkkeen mahdollisia haittavaikutuksia, mikä vaikeuttaa näiden oireiden merkityksen tulkintaa. Näiden ei-motoristen Parkinsonin taudin oireiden patofysiologiassa taustalla on mahdollisesti aivojen ei-dopaminergiset muutokset, jotka voivat olla seurausta dopaminergisen järjestelmän muutoksista johtuvista sopeutumismuutoksista, tai täysin itsenäisiä patologisia muutoksia. Taudin patofysiologiaa tarkastelen tarkemmin myöhemmissä luvuissa 2.3.1 ja 2.3.2. Kuvassa 2. on esitetty tärkeimmät oletetut muutokset tyvitumakkeiden hermovälityksessä parkinsonismissa normaaliin tilaan verrattuna.



Kuva 2. Parkinsonin taudin aiheuttamat oletetut muutokset tyvitumakkeiden välisten hermoratojen aktiivisuudessa. Punaiset viivat ovat inhiboivia hermoratoja ja siniset eksitoivia. Lyhenteet: SNc = *Substantia nigra pars compacta*, SNr = *Substantia nigra pars reticulata*, Gpe = *Globus pallidus externus* Gpi = *Globus pallidus internus*, STN = Subtalaaminen tumake, PPN = Pedunkulopontiinitumake, CM = Sentromediaanitumake (talamuksessa), VA/VL = Ventroanteriorinen/ventrolateraalinen tumake (talamuksessa). Muokattu (Smith ym. 2012) mukaan.

Parkinsonin taudin tärkeimmät nykyiset lääkehoidot keskittyvät striatumiin dopamiinipuutoksen korjaamiseen (Smith ym. 2012). Ensimmäinen Parkinsonin taudin tehokas lääkehoito oli dopamiinin esiasteyhdiste levodopa (L-DOPA), jota alettiin käyttää Parkinsonin taudin hoidossa 1960-luvulla. Levodopan lisäksi nykyisiä lääkehoitoja ovat dopamiinireseptoriagonistit sekä dopamiinia hajottavan monoamiinioksidaasi B (MAO-B) -entsyymien estäjät. Levodopa annetaan nykyään aina yhdessä perifeerisen dopadekarboksylaasiestäjän kanssa. Tämä parantaa levodopan keskushermostoon pääsevää hyötyosuutta ja vähentää levodopan haittavaikutuksia. Levodopa-dopadekarboksylaasiestäjä-hoittoon voidaan liittää myös dopamiinia pilkkovan katekoli-o-metyylitransferaasi-entsyymien (COMT) estäjä. COMT-esto pidentää dopamiinin vaikutusta ja tasaa tilanvaihteluita levodopalääkityillä potilailla (Ahtila ym. 1995; Kurth ja Adler 1998).

Ennen dopaminergisia lääkkeitä ainoat Parkinsonin taudin lääkkeet olivat antikolinergisia (Smith ym. 2012). Niiden teho on kuitenkin heikko, eikä niillä ole vaikutusta kuin osaan oireista. Lisäksi niillä on lukuisia hankalia antikolinergisesta

vaikutuksesta johtuvia haittavaikutuksia. Dopaminergiset lääkkeet ovatkin syrjäyttäneet ne lähes täysin.

2.3.1. Parkinsonin taudin etiologia

Parkinsonin tauti on Alzheimerin taudin jälkeen yleisin hermorappeumasairaus (Dauer ja Przedborski 2003). Elinikäinen sairastuvuus on länsimaisessa väestössä noin 2 % (Schapira 2006). Suomessa kansaneläkelaitoksen (kela) erityiskorvausta Parkinsonin taudin tai siihen vertautuvan sairauden perusteella sai vuonna 2012 vajaa 17 000 potilasta (Kela 2013).

Parkinsonin tautia on pidetty kauan pääasiassa ympäristön ja sattuman aiheuttamana. Varhain alkava Parkinsonin taudin muoto on tunnettu pitkään, mutta ensimmäinen Parkinsonin taudin lisääntyneeseen riskiin liitetty geeni, *SNCA* (geenituote α -synukleini), löydettiin vasta alle kaksikymmentä vuotta sitten (Polymeropoulos ym. 1996; Polymeropoulos ym. 1997). Tämän jälkeen Parkinsonin taudin lisääntyneeseen riskiin liitettyjä geenejä on löydetty ainakin 16, joista viiden geenin kytkös Parkinsonin tautiin on varmistettu laajoissa genomitutkimuksissa (Hardy 2010; Nuytemans ym. 2010) (Taulukko 1).

Suurimmalla osalla Parkinson-potilaista *SNCA*-geeni kuitenkin toimii normaalisti. Ennen nykyisiä koko genomien kattavia assosiaatiotutkimuksia (Genome-Wide Association Study, GWAS) vain noin 5 %:lle tautitapauksista voitiin osoittaa perinnöllinen tausta ja perinnöllinen tausta pystyttiin liittämään vain ennen 50 ikävuotta alkavaan varhaiseen Parkinsonin taudin muotoon (Dauer ja Przedborski 2003). Uudet GWAS-tutkimukset ovat pystyneet laajentamaan käsitystämme geneettisistä tekijöistä, jotka lisäävät Parkinsonin tautiin sairastumisen riskiä ja uusien tutkimusten myötä lukuisia geenejä on pystytty yhdistämään Parkinsonin tautiin. On arvioitu, että nykyään tunnetut Parkinsonin taudin riskigeenit onnistuvat selittämään noin puolet Parkinsonin tautiin sairastumisen riskistä (Hardy 2010). Nykykäsityksen mukaan Parkinsonin tauti on seurausta monesta tekijästä: ympäristöllä ja erityisesti oksidatiivisella stressillä on tärkeä osa, mutta taudin puhkeamista edistää perinnöllinen alttius. Minkään yksittäisen

ympäristötekijän ei ole voitu osoittaa olevan yksinään itsenäinen Parkinsonin taudin riski, kun taas usean mitokondrioiden toimintaan, oksidatiivisen stressin käsittelyyn ja proteasomikompleksin säätelyyn liittyvän geenin yhteys lisääntyneeseen sairastumisriskiin on varmistettu (Schapira 2006; Nalls ym. 2011; Wirdefeldt ym. 2011).

Toistaiseksi viiden geenin mutaation on toistetusti osoitettu olevan kytköksissä Parkinsonin tautiin (Taulukko 1). Kaikki varmistetut geenituotteet liittyvät mitokondrioiden toimintaan tai oksidatiivisen stressin käsittelyyn.

Taulukko 1. Parkinsonin tautiin liitetyt geenit ja geenien proteiinituotteet. Taulukon tiedot (Nuytemans ym. 2010).

| Geeni | Proteiinituote |
|--------------|--|
| <i>SNCA</i> | α -synukleiini |
| <i>PARK2</i> | Parkin |
| <i>PINK1</i> | PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) |
| <i>PARK7</i> | DJ-1 |
| <i>LRRK2</i> | Leucine-rich repeat kinase 2 (syn. dardarin) |

GWAS-tutkimukset ovat laajentaneet käsitystä Parkinsonin taudin geneettisestä taustasta ja osaltaan auttaneet myös taudin patofysiologian selvittämisessä, mutta edelleen ympäristötekijöille ja sattumalle on jäänyt suuri merkitys taudin selittäjänä. Ympäristötekijöiden merkitystä Parkinsonin taudin taustalla korosti erityisesti kuuluisa MPTP (1-metyyli-4-fenyyli-1,2,3,6-tetrahydropyridiini) -tapaus 1970-luvun Yhdysvalloissa, kun kemian opiskelija yritti syntetisoida petidiini-pohjaista opioidia ja annosteli tuotosta itseensä. Muutamassa päivässä hänelle kehittyi Parkinsonin tautia muistuttava tila, johon liittyi kaikki Parkinsonin taudin motoriset oireet (Langston 1985). Myöhemmin ruumiinavauksessa voitiin todeta, että *substantia nigra*n dopaminergiset solut olivat tuhoutuneet. Vaikka taudin kulku oli huomattavasti luonnollista Parkinsonin taudin kulkua nopeampi, niin solutuhon kohdentuminen juuri tiettyihin, Parkinsonin taudissakin tuhoutuviin soluihin teki MPTP:stä parhaan Parkinsonin taudin tutkimuksen johtolangan vuosikausiksi ja siitä on tullut

6-hydroksidopamiinin (6-OHDA) ohella koe-eläintutkimusten johtava Parkinson-malli (Blesa ym. 2012).

MPTP:n toksisuus johtuu sen aktiivisesta metaboliitista, MPP⁺:sta, jonka tiedetään estävän mitokondrion kompleksi I:a ja lisäävän vapaiden happiradikaalien määrää (Kopin 1992). 6-OHDA puolestaan aiheuttaa suoraa oksidatiivista stressiä, sillä fysiologisissa olosuhteissa 6-OHDA aiheuttaa entsyymitoiminnasta riippumatonta reaktiivisten happiyhdisteiden, kuten kinonien, peroksidien, sekä vapaiden radikaalien muodostumista (Bove ja Perier 2012). 6-OHDA:n toksisuus kohdistuu selektiivisesti dopaminergisiin ja noradrenergisiin hermosoluihin, sillä 6-OHDA on näiden solujen pinnalla ilmenevien dopamiinitransportterin (DAT) ja noradrenaliinitransportterin (NAT) substraatti. Epidemiologisissa tutkimuksissa vahvin positiivinen yhteys on löydetty joidenkin kasvimyrkkyjen, erityisesti parakvatin ja rotenonin, ja Parkinsonin taudin välillä (Wirdefeldt ym. 2011; Baltazar ym. 2014). Parakvatti muistuttaa rakenteeltaan MPTP:ä, mutta näiden kahden yhdisteen toksisuuden mekanismit todennäköisesti poikkeavat toisistaan. Parakvatti ei esimerkiksi estä mitokondrion kompleksi I:a (Richardson ym. 2005). Rotenoni puolestaan ei muistuta mitään edellä mainittua yhdistettä. Sen toksinen vaikutus on liitetty mitokondrion toiminnan häiritsemiseen kompleksi I:n eston kautta (Sherer ym. 2003). Poistogeenisillä hiirillä tehdyissä kokeissa on kuitenkin osoitettu, että edellä mainittujen yhdisteiden toksisuus ei vaadi kompleksi I:n inhibiitoriä (Choi ym. 2008). Vaikka näiden yhdisteiden toksisuuden mekanismit ovatkin vielä osin selvittämättä, edelleen ajatellaan, että yhdisteiden toksisuus liittyy mitokondrioiden toiminnan häiritsemiseen ja/tai oksidatiivisen stressin lisäämiseen.

2.3.2. Parkinsonin taudin patofysiologia

Parkinsonin tauti on samaan aikaan sekä solutason patologinen prosessi, että solumuutoksista seuraava aivojen viestinnän toiminnallinen häiriö. Patologia voidaan jakaa solutason muutoksiin, joiden kautta voidaan yrittää kehittää solujen selviämistä ja uusiutumista edistäviä hoitomuotoja, sekä toiminnallisiin muutoksiin, joiden kautta voidaan tarkastella liikehäiriöiden luonnetta ja erotusdiagnostiikkaa. Toiminnallisten

muutosten luonteen ymmärtäminen on mahdollistanut myös aivojen syvien osien stimulaation (Deep Brain Stimulation, DBS) käytön Parkinsonin taudin hoidossa. Seuraavaksi tarkastelen molempien muutosten yleispiirteitä. GABAergisiä muutoksia tarkastelen kattavammin luvussa 3.

2.3.2.1. Solutason muutokset

Parkinsonin taudin selkein, tyypilliset oireet aiheuttava muutos on *substantia nigra pars compacta* dopaminergisten hermosolujen kuoleminen. Kuten luvussa 2.3.1. on kerrottu, solujen kuolema on ainakin osin seurausta kumulatiivisesta oksidatiivisesta stressistä, mikä johtaa lopulta solujen apoptoottiseen kuolemaan. Vaikka Parkinsonin tauti diagnosoidaan motoristen oireiden perusteella, on olemassa vahvoja viitteitä siitä, että Parkinsonin tauti ei rajoitu vain dopaminergisiin soluihin, vaan myös serotonergiset ja kolinergiset solukeskukset ovat vaurioituneita jo taudin alkuvaiheessa (Braak ym. 2003). Hajuaistin heikkenemisen on osoitettu liittyvän Parkinsonin taudin ensioireisiin lähes poikkeuksetta (Haehner ym. 2009). Anteriorisen hajutumakkeen vaurio on puolestaan osoitettu patologisten tutkimusten avulla. Hajutumakkeen vaurion lisäksi pedunkulopontiinitumakkeen kolinergisen hermovälityksen muutosten ajatellaan olevan dopaminergisille lääkkeille resistenttien asentovirheiden taustalla (Muller ja Bohnen 2013). Dopaminergisia hermosoluja on pidetty erityisen herkkinä oksidatiiviselle stressille, minkä on esitetty johtuvan mm. vapaan dopamiinin oksidatiivisesta toksisuudesta, *substantia nigra pars compacta* poikkeuksellisen korkeasta rautapitoisuudesta ja matalasta oksidatiiviselta stressiltä suojaavan glutationin pitoisuudesta (Exner ym. 2012). Kuitenkin myös muiden kuin dopaminergisten hermosolujen vaurioituminen jo aivan taudin alkuvaiheessa osoittaa, että Parkinsonin tauti ei ole yksinomaan dopaminergisten hermosolujen sairaus.

Parkinsonin taudin selkeimpinä histologisina muutoksina on pidetty niin sanottuja Lewyn kappaleita, jotka ovat hermosolujen sisäisiä pyöreitä eosinofiilisiä proteiiniagregaatteja. Ne muodostuvat useista proteiineista, muun muassa α -synukleiinista, parkiinista, ubikitiinistä, sekä neurofilamenteista (Dauer ja Przedborski 2003). Lewyn kappaleiden lisääntyminen ei ole yksinään Parkinsonin taudin piirre, vaan

näitä on löydettävissä myös terveillä ikääntyneillä ihmisillä kaikilta aivoalueilta. Lewyn kappaleet eivät ole myöskään lisääntyneet kaikissa Parkinsonin taudin muodoissa: eräissä perinnöllisissä Parkinsonin taudin muodoissa ja kemiallisesti aiheutuneissa Parkinsonin taudeissa Lewyn kappaleita ei aina ole havaittavissa (Nuytemans ym. 2010; Exner ym. 2012). Lewyn kappaleet eivät ilmeisimmin ole Parkinsonin taudin aiheuttaja, vaan seurausta Parkinsonin taudin soluja tappavista prosesseista, sekä mahdollisista geenivirheistä.

2.3.2.2. Toiminnalliset muutokset

Tyvitumakkeet ohjaavat toisiaan hermoratojen jatkuvan sähköisen viestityksen välityksellä. Vaikka Parkinsonin tauti liittyykin vähentyneeseen dopamiinin määrään *striatumissa*, niin seuraus tästä ei ole vain muutos solujen homeostaasissa, vaan myös sähköisten purkausten taajuuksissa ja taajuuskuvioissa. Parkinsonin taudille tyypillinen vapina johtuu nimenomaan oskilloivista rytmisistä purkauksista tyvitumakkeissa, erityisesti subtalaamisessa tumakkeessa (Wichmann ym. 2011; Nambu ja Tachibana 2014). Aivojen syvien osien stimulaatiohoidon (DBS) tehokkuus motoristen oireiden, erityisesti vapinan, hoidossa korostaa sähköisen toiminnan häiriöiden merkitystä Parkinsonin taudin motoristen oireiden taustalla.

Parkinson-potilaiden aivojen tyvitumakkeiden sähköistä aktiivisuutta mittaavassa tutkimuksessa on osoitettu, että *globus pallidus internan*, *globus pallidus externan* ja subtalaamisen tumakkeen hermosolut purkautuvat oskilloivasti noin 6 ja 20 Hz taajuudella, ja että tämä oskillointi katoaa tehokasta levodopa-annosta annettaessa (Brown ym. 2001). MPTP-käsitellyillä apinoilla tehdyissä elektrofysiologisissa tutkimuksissa on selvitetty, että *globus pallidus internan* oskillaatio on seurausta subtalaamisen tumakkeen oskilloivista purkauksista, jotka puolestaan ovat seurausta aivokuorelta tulevista eksitoivista signaaleista yhdistettynä *globus pallidus externasta* tulevaan vähentyneeseen GABAergiseen inhibitioon (Nambu ja Tachibana 2014).

3. PARKINSONIN TAUDIN AIHEUTTAMAT MUUTOKSET TYVITUMAKKEIDEN GABAERGISESSA NEUROTRANSMISSIOSSA

Kuten kappaleessa 2.1. on kerrottu, on GABA tyvitumakkeiden hallitseva välittäjäaine. Parkinsonin taudin aiheuttamat muutokset tyvitumakkeiden hermotuksissa voivat vaikuttaa GABAergiseen hermovälitykseen kahdella tavalla: muutokset voivat olla joko sairauden primäärisiä, suoraan GABAergisiin hermoratoihin liittyviä patologisia muutoksia, tai ne voivat olla muiden hermoratojen patologisista prosesseista johtuvia sopeutumismuutoksia. Seuraavaksi tarkastelen mitä näistä muutoksista tiedetään.

3.1. GABA-pitoisuuksien muutokset tyvitumakkeissa

Tyvitumakkeissa on useita GABAergisia hermoratoja, ja erityisesti suoraan ja epäsuoraan palauterataan liittyvät GABAergisen hermovälityksen muutokset on liitetty Parkinsonin tautiin (Wichmann ym. 2011) (kuva 2). GABAergisen inhibitorisen kontrollin heikkeneminen ja subtalaamisen tumakkeen glutamatergisen, eksitoivan signaaloinnin voimistuminen *substantia nigra pars reticulatassa* sekä *globus pallidus internassa* johtavat *talamuksen* motorisen osan voimakkaaseen inhibitioon, ja tämä on mahdollisesti Parkinsonin tautiin liittyvän liikkeen aloittamisen vaikeuden taustalla (Nambu 2005).

Post mortem -tutkimuksissa on selvinnyt, että GABA-pitoisuudet ovat korkeammat Parkinsonin tautia sairastaneiden *striatumeissa* verrattuna terveiden verrokkien *striatumeihin* (Kish ym. 1986). *Striatumin* GABAergiset hermosolut ovat sekä epäsuoran että suoran radan toiminnan taustalla, joten pelkästä GABA-pitoisuuksien noususta tällä aivoalueella ei voida tehdä pitkälle meneviä johtopäätöksiä näiden kahden hermoradan toiminnan suhteellisista muutoksista. Eläinkokeista tiedetään, että glutamaattidekarboksylaasi-entsyymien määrä lisääntyy MPTP-käsitellyillä apinoilla (kts. luku 3.3.) (Soghomonian ja Laprade 1997). Pitoisuuden nousu saattaa siis johtua lisääntyneestä GABA-synteesistä.

Jo yli kaksikymmentä vuotta käytössä olleen teorian mukaan *substantia nigra pars compacta striatumiin* lähtevän dopaminergisen hermotuksen väheneminen johtaa suoran ja epäsuoran palauteradan epätasapainoon. *Substantia nigra pars compactan* dopaminergiset hermosolut vapauttavat myös GABA:a hermopäätteistään ja inhiboivat täten dopamiinista riippumatta *striatumin* hermosoluja (Tritsch 2012). Tämän löydöksen merkitys on edelleen epäselvä terveissäkin aivoissa, mutta Parkinsonin taudin *substantia nigra pars compactan* hermosolujen kuolema vaikuttaa täten myös suoraan GABAergiseen hermovälitykseen. Mikrodialyysimenetelmillä on osoitettu, että 6-OHDA-leesioituilla rotilla lateraalisen *globus palliduksen* GABA-pitoisuudet ovat koholla (Galeffi ym. 2003). Samassa tutkimuksessa ei havaittu eroa leesioitujen rottien *substantia nigra pars reticulatan* GABA-pitoisuuksissa. Toisessa tutkimuksessa, jossa myös käytettiin 6-OHDA-leesioituja rottia, on havaittu nousseita GABA-pitoisuuksia *substantia nigra pars reticulatassa* (Windels ym. 2005). Apinoilla on osoitettu, että MPTP-käsittely nostaa lateraalisen *globus palliduksen* GABA-pitoisuuksia (Robertson ym. 1991). Nämä löydökset sopivat hyvin hypoteesiin epäsuoran ja suoran palauteradan muutoksista.

Hermovälittäjäaineiden pitoisuuksien muutokset tulisi ihannetapauksessa selvittää elävän potilaan aivoista oireiden vaihdellessa, mutta aivovälittäjäaineiden pitoisuuksien reaaliaikainen määrittäminen kliinisissä tutkimuksissa on vaikeaa ja vaatii usein invasiivisen operaation, jonka täytyy olla terapeuttisesti perusteltavissa. Vasta vähän aikaa sitten on ensimmäisen kerran yhdistetty ihmisen aivojen syvien osien stimulaatio ja mikrodialyysi (Buchanan ym. 2014). Uusia kehittyneisiin tietokonetomografiaan perustuvia menetelmiä kehitetään jatkuvasti ja niitä on myös kokeiltu Parkinsonin tautia sairastavien potilaiden dopamiinipitoisuuksien määrittämiseen (Groger ym. 2014). Aiemmin hermovälittäjäainepitoisuuksia on määritetty vain *post mortem* -tutkimuksilla, joiden avulla ei ole mahdollista saada kuvaa aivojen toiminnallisista muutoksista. Erityisesti Parkinsonin tautiin liittyvät purkausaktiivisuuksien muutokset ja soluryhmien rytmittyneet, oskilloivat purkaukset jäävät näissä tutkimuksissa ilman selitystä.

3.2. Vaikutukset GABA-reseptoreihin

GABA-reseptorit jaetaan kahteen luokkaan: GABA_A-reseptoreihin, jotka ovat kloridi-ionikanavia (GABA_C-reseptori lasketaan tässä tähän luokkaan), sekä GABA_B-reseptoreihin, jotka ovat G-proteiinikytkentäisiä reseptoreita (Iversen ym. 2009). GABA_A-reseptorit muodostuvat viidestä alayksiköstä, jotka kuuluvat useaan eri polypeptidiluokkaan (α , β , γ , δ , ϵ , θ , π ja ρ). Alayksiköistä tunnetaan myös useita isoformeja (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} ja ρ_{1-3}) ja suurin osa valmiista reseptoreista muodostuu tyypillisesti kahdesta α -alayksiköistä, kahdesta β -alayksiköistä, sekä yhdestä γ - tai δ -alayksiköistä (Iversen ym. 2009; Hörtnagl ym. 2013). Isoformien suuri määrä tekee GABA_A-reseptorien potentiaalisesta kirjosta valtavan. GABA_B-reseptorien toiminta ei ole yhtä hyvin tunnettu ja niiden merkityksen tutkimista vaikeuttaa solun sisäisen signaloinnin tärkeä osuus signaalin välittämisessä. Tiedetään, että kaikki GABA_B-reseptorit ovat inhibitorisia ja niiden vaikutus välittyy todennäköisesti pääasiassa solukalvon K⁺-ionikanavien avaamisen, Ca²⁺-ionikanavien estämisen ja adenyylaattisyklaasin estämisen kautta (Iversen ym. 2009). GABA_A-reseptorit välittävät nopeita vasteita, kun taas GABA_B-reseptorit vastaavat hitaammasta ja pidempään kestävästä inhibitiosta. GABA_B-reseptorit ovat myös presynaptisia autoreseptoreita. GABA_A-reseptorien alatyypijakauma aivoissa vaihtelee suuresti. Hiirten aivoilla tehdyissä mRNA *in situ* -hybridisaatiokokeissa ja GABA-reseptorialatyypin histologisissa kokeissa on osoitettu, että eri tyvitumakkeissa on toisistaan poikkeavat jakaumat GABA_A-reseptorialatyyppejä (Pirker ym. 2000; Hörtnagl ym. 2013).

Parkinsonin taudin levodopa-hoitoon liittyy tunnettu haitta, niin sanottu ”wearing-off”-ilmiö, joka tarkoittaa terapeuttisen hyvän dopamiinivasteajan (ns.”on”-ajan) lyhenemistä ja optimaalisen lääkevastealueen kapenemista hoidon jatkuessa pitkään (Thobois ym. 2005). *Post mortem* -tutkimuksessa on osoitettu, että Parkinson-potilaille, joilla on havaittu ”wearing-off”-ilmiötä, GABA_A-agonisti [³H]-Flunitratsepaami sitoutuu *putamenissa* terveitä kontrolleja ja ei ”wearing-off”-ilmiöstä kärsiviä voimakkaammin (Calon ym. 2003). Samassa tutkimuksessa todettiin myös, että [³⁵S]-butyylibisyklifosforotonaatin ([³⁵S]TBPS), GABA_A-reseptoriin sitoutuvan yhdisteen, sitoutuminen oli voimakkaampaa Parkinson-potilaiden lateraalisen *globus palliduksen*

ventraalisessa osassa. GABA_B-reseptoriin sitoutuvan [¹²⁵I]-CGP64213-yhdisteen sitoutuminen oli puolestaan vähäisempää *putamenissa* ja *globus palliduksessa externuksessa*, mutta ei *globus pallidus internuksessa*. On myös osoitettu, että vaste GABA_A-antagonisti gabatsiinia kohtaan voimistuu *globus palliduksessa* MPTP-käsitellyillä hiirillä (Chen ym. 2007; Chen ym. 2013). Tämän voidaan ajatella johtuvan lisääntyneestä GABAergisesta hermovälityksestä tai muutoksista reseptoritasolla.

MPTP-käsitellyillä apinoilla tehdyissä immunohistokemiallisessa tutkimuksessa ei havaittu eroa GABA_B-reseptorin määrässä *putamenissa* eikä *globus palliduksissa* (Galvan ym. 2011). Tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että MPTP-käsiteltyjen eläinten vaste GABA_B-agonisti baklofeenia kohtaan kasvoi sekä lateraalisisessa että mediaalisessa *globus palliduksessa*.

Edellä mainittujen tutkimusten perusteella ainakaan *globus palliduksessa* GABA-reseptorien määrät eivät muutu merkittävästi, mutta toiminnallisia muutoksia sen sijaan tapahtuu. Kuten luvussa 3.1. on kerrottu, Parkinsonin taudissa lateraalisen *globus palliduksen* GABA-pitoisuudet nousevat ja mediaalisen *globus palliduksen* GABA-pitoisuudet laskevat. On todennäköistä, että nämä muutokset GABA-reseptorien toiminnassa ovat suurimmaksi osaksi seurausta reseptoreiden itsesäätelystä muuttuneiden GABA-pitoisuuksien seurauksena, eikä itsenäinen patologinen prosessi. Tässä tapauksessa nämä säätelyprosessit voivat olla pikemminkin Parkinsonin taudin oireita lievittäviä sen sijaan, että ne olisivat taudin oireiden taustalla.

3.3. Vaikutukset glutamaattidekarboksylaasi- ja GABA-transportteritasoihin

GAD-entsyymitasojen muutos Parkinsonin tautia sairastavilla potilailla on havaittu jo yli neljäkymmentä vuotta sitten (McGeer ym. 1971; McGeer ym. 1973). Apinoilla tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että MPTP-käsitellyillä eläimillä *striatumin* GAD65- ja GAD67-mRNA-tasot ovat kohonneet (Soghomonian ja Laprade 1997). *Striatumin* GABAergiset projektioneuronit ovat keskeisiä sekä suoralle että epäsuoralle radalle. Lisääntynyt GAD-entsyymien ekspressio viittaa GABA:n synteesin lisääntymiseen *striatumissa*. Jyrsijöillä on osoitettu, että toispuoleinen 6-OHDA-leesio

*substantia nigra pars compacta*an sekä mediaaliseen etuaivojen kimppuun (medial forebrain bundle, MFB) nostaa GAD-mRNA-pitoisuuksia koko *striatumin* alueella leesion suuruudesta riippuvaisesti (Levy ym. 1995; Katz ym. 2005). GAD-tasojen nousu sopii hyvin yhteen 6-OHDA -leesioitujen rottien mikrodialyysikokeiden tuloksien kanssa, joiden mukaan GABA-pitoisuudet ovat koholla leesiopuolen *globus palliduksessa* (Galeffi ym. 2003).

Terveessä subtalaamisessa tumakkeessa GAD-positiivisia soluja on noin 8 % ja ne toimiva tumakkeessa projektioneuroneita säätelevinä interneuroneina (Levesque ja Parent 2005). Subtalaamisen tumakkeen yliaktiivisuus ja oskilloivien rytmisten purkausten muodostuminen ovat Parkinsonin taudin tyyppimuutoksia (Levesque ja Parent 2005; Wichmann ym. 2011). Oskillaation muodostumisen patofysiologista mekanismeista ei tunneta, mutta se voi liittyä subtalaamisen tumakkeen heikentyneeseen tumakkeensisäisen inhibitionsäätelyn toimintaan.

GAD-geenisiirtoa adenoassosioituneen virus (AAV) -vektorin avulla on kokeiltu sekä Parkinsonin taudin rottamallissa että Parkinsonin taudin hoidossa kliinisissä kokeissa (Luo ym. 2002; LeWitt ym. 2011). Näiden geeniterapioiden kohde on ollut subtalaaminen tumake. Eläinkokeiden perusteella GAD-geeniterapia vähentää subtalaamisen tumakkeen aktiivisuutta ja se myös osoittautui *substantia nigra*n dopaminergisia hermosoluja suojaavaksi, mikä ei johtunut pelkästään vähentyneestä glutamatergisestä aktiivisuudesta. Subtalaamisen tumakkeen GABAergisen inhibition lisäämisen GABA-agonisteilla on myös eläinkokeissa todettu vähentävän 6-OHDA-leesioitujen rottien pyörimiskäytöstä. On kuitenkin epätodennäköistä, että GABAergisen hermovälityksen lisääntymisestä johtuva Parkinsonin taudin oireiden väheneminen olisi taudin patologiaa muuttava. Rottien GAD-geenisiirtotutkimuksessa osoitettiin, että GAD-geenin siirto pikemminkin muuttaa glutamatergisistä hermosoluista osittain GABAergisiksi sen sijaan, että ne palauttaisivat GABAergisille soluille niiden menettämän ominaisuuden (Luo ym. 2002).

GABA-transporttereita tunnetaan neljä tyyppiä, joista kolmea ilmennetään keskushermostossa (Iversen ym. 2009). Ne vastaavat GABA:n solunotosta

ekstrasellulaaritalasta, pääasiassa gliasoluihin. GABA-transportteritasojen muutoksia on tutkittu vasta hyvin vähän. MPTP-käsitellyillä apinoilla on kuitenkin tutkittu GABA-transportteri 1 ja 3 (GAT-1 ja GAT-3) -tasojen muutoksia *globus palliduksessa* immunohistokemiallisin menetelmin. Tutkimuksen mukaan MPTP-käsittely ei merkittävästi vaikuta GAT-tasoihin (Galvan ym. 2010). Koska GABA-transportterit vaikuttavat GABAergiseen hermovälitykseen, on mahdollista, että Parkinsonin taudin vaikutuksia tähän prosessiin löydetään myöhemmin.

3.4. Huomioita GABAergisten muutosten tutkimuksesta

Adaptiiviset muutokset ovat neurotutkimukselle iso haaste. Aivojen toiminnan tutkiminen tarvitsee koevälineikseen toimivia hermojärjestelmiä. Tähän tarvitaan koe-eläimiä, mutta koe-eläimillä tehtävä tautitutkimus ei koskaan tutki tautia kokonaisuudessaan kaikkine prosesseineen, vaan vain jotakin taudin osaa mallin kautta. Parkinsonin taudin tärkein jyrksijämalli on toispuoleinen 6-OHDA-leesiomalli, missä aivoihin annostellulla 6-OHDA-injektiolla tuhotaan dopaminergisia hermoyhteyksiä *substantia nigra pars compactasta striatumiin* (Schober 2004). Se on käyttökelpoinen malli dopaminergisten lääkkeiden toiminnan selvittämiseen, mutta koska siinä patologinen prosessi ei vastaa luonnollista Parkinsonin tautia, ei se sovellu hyvin muun kuin dopaminergisiin soluihin vaikuttavien muutosten tutkimiseen. Jyrksijöiden tyvitumakkeiden toiminta ei myöskään kaikilta osin vastaa ihmisen tyvitumakkeita, joten jyrksijät eivät sovellu erityisen hyvin hienovaraisten hermojärjestelmien adaptiivisten muutosten tutkimiseen.

Kädellisten MPTP-malli on jyrksijöiden 6-OHDA-mallia parempi adaptiivisten muutosten tutkimiseen, sillä kädellisten tyvitumakkeiden toiminta ja mahdolliset adaptiiviset muutokset ovat todennäköisemmin lähempänä ihmisten vastaavia. Malli on kuitenkin vaikeampi toteuttaa ja mallissa vaurio aiheutetaan yleensä molemmille puolille, sillä yksipuolisen MPTP-vaurion aiheuttaminen koe-eläimelle on kirurgisesti haastavaa (Schober 2004). Apinoilla tehtynä malli on myös kallis ja eettisesti ongelmallinen. Kuten 6-OHDA-malli, MPTP-malli ei mallinna ei-dopaminergisten hermosolujen soluvaurioita, eikä muistuta patologiselta prosessiltaan luonnollista

Parkinsonin tautia. Näistä syistä myöskään MPTP-malli ei ole erityisen hyvä muiden kuin dopaminergisten muutosten mallintamiseen. Tässä työssä esiteltyjen kaltaisten adaptiivisten muutosten selvittäminen eläinmalleilla on varsin haastavaa ja tuloksien oikeellisuus tulisi varmistaa ihmisillä, mikä monessa tapauksessa on eettisistä ja teknisistä syistä mahdotonta.

KOKEELLINEN OSA

4. JOHDANTO JA TUTKIMUKSEN TAVOITE

Hermokasvutekijät ovat lupaava ryhmä yhdisteitä, joita voidaan ehkä tulevaisuudessa käyttää Parkinsonin taudin hoidossa. Hermokasvutekijöiden vaikutusta rottien nigrostriataalisen radan dopamiini-, dopamiinin metaboliittien homovanilliinihapon (HVA) ja 3,4-dihydroksifenyylietikkahapon (DOPAC), sekä serotoniinin metaboliitti 5-hydroksiindolietikkahapon (5-HIAA) pitoisuuksiin on tutkittu laboratoriossamme aikaisemmin (Renko 2012).

Tämän pro gradu -työn kokeellisen osan tavoitteena oli selvittää, miten eri hermokasvutekijät GDNF (gliasolulinjaperäinen hermokasvutekijä), MANF (mesenkefaalinen astrozyttiperäinen hermokasvutekijä) sekä CDNF (konservoitunut dopamiinisolujen hermokasvutekijä) vaikuttavat *striatumiin* annosteltuina leesioimattoman rotan *substantia nigra pars reticulata* sekä lateraalisen *globus palliduksen* GABA-pitoisuuksiin. Näytteet kerättiin mikrodialyysimenetelmällä ja niiden GABA-pitoisuudet oli tarkoitus määrittää mikrodialyysimenetelmän sekä korkean erotuskyvyn nestekromatografian (HPLC, high performance liquid chromatography) avulla. Hermokasvutekijöiden vaikutusta GABAergiseen hermovälitykseen oli tarkoitus arvioida myös immunohistokemiallisilla menetelmillä. Suunnitelman mukaan aivoleikkeistä oli tarkoitus määrittää GAD-entsyymin muutokset, mutta näitä kokeita ei ehditty suorittaa.

GDNF kuuluu GDNF-perheeseen ja sillä on osoitettu olevan sekä neuroprotektiivinen että neurorestoratiivinen vaikutus useassa hermosolulinjassa (Lin ym. 1993; Airavaara ym. 2012). GDNF teho hermosolujen suojaamisessa on osoitettu myös *in vivo* -malleissa (Tomac ym. 1995). GDNF:a on pidetty lupaavana Parkinsonin taudin lääkkeenä, mutta vaikka ensimmäisien kliinisten kokeiden perusteella GDNF:lla on hoidollista potentiaalia Parkinsonin taudissa, epäilyt hoidon turvallisuudesta ja

mahdollisesta heikosta tehosta ovat toistaiseksi estäneet hoidon kehittämisen ensimmäisiä kliinisiä kokeita pidemmälle (Kordower ym. 1999; Gill ym. 2003; Peck 2005). MANF ja CDFN kuuluvat molemmat samaan uuteen hermokasvutekijöiden perheeseen (Lindholm ja Saarna 2010). Myös niillä on Parkinsonin taudin eläinmalleissa osoitettu olevan neuroprotektiivisiä ja neurorestoratiivisia ominaisuuksia (Lindholm ym. 2007; Voutilainen ym. 2009; Voutilainen ym. 2011). Niitä ei ole vielä ehditty testata kliinisissä kokeissa, mutta koska niillä on solukokeissa samankaltaisia vaikutuksia kuin GDNF:lla, pidetään niitä lupaavina mahdollisina Parkinsonin taudin lääkkeinä.

HPLC-analyysissa esiintyneiden ongelmien vuoksi mikrodialyysinäytteiden GABA-pitoisuuksia ei voitu työn aikana määrittää. Tästä syystä kokeellinen osa ei sisällä kasvutekijöiden vaikutusta GABAergiseen hermovälitykseen. Sen sijaan osa sisältää mikrodialyysikokeiden suorittamisen kuvailun, HPLC-laitteiston analyysiparametrien määrittämisen sekä mikrodialyysikoettimien toiminnan selvittämisen. Tuloksissa esitetään HPLC-laitteiston analyysiparametrien määrittäminen, koettimien saantojen vertailu, sekä kasvutekijöiden vaikutus rottien kasvuun leikkausten jälkeen.

5. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

5.1. Koe-eläimet

Koe-eläiminä tutkimuksissa käytettiin 52:a Wistar-urosrottaa (RccHan:Wist, Harlan, Hollanti) ja kokeet toteutettiin kolmessa erässä. Ensimmäisessä kahdessa erässä oli 16 rottaa ja kolmannessa 20 rottaa. Tutkimuksille oli Etelä-Suomen aluehallintoviraston eläinkoelautakunnan lupa (ESAVI/3705/04.10.03/2012). Rotat olivat saapuessaan noin seitsemän viikon ikäisiä. Rotat pidettiin ennen leikkausta häkeissä Helsingin yliopiston farmasian tiedekunnan farmakologian osaston koe-eläinhuoneessa Viikissä (3-4 rottaa/häkki) noin kaksi viikkoa ennen stereotaktista leikkausta, minkä aikana rottia totutettiin käsittelyyn ja uuteen ympäristöön. Eläinhuoneen lämpötila koko kokeiden

ajan oli noin 22 °C ja suhteellinen ilmankosteus 30 %. Huoneessa oli 12 tunnin pimeävalorytmi ja valoisa aika oli 6.20 – 18.20.

Stereotaktisten leikkausten jälkeen rotat pidettiin yksittäishäkeissä kokeiden loppuun asti. Eläinten kunto, ja veden ja ruoan riittävyys tarkistettiin päivittäin. Rotilla oli koko kokeiden ajan standardirehua (Teklad Global 16 % protein rodent diet, Harlan, Hollanti) sekä hanavettä vapaasti saatavilla.

5.2. Tutkittavat yhdisteet ja mikrodialyysissa käytetyt kemikaalit

Tutkimuksessa käytetyt yhdisteet on listattu taulukossa 2. Kasvutekijät laimennettiin käyttövahvuuteen valmistajan ohjeiden mukaan ja säilytettiin -80 °C-lämpötilassa. CDNF ja MANF laimennettiin PBS-liuoksella ja GDNF MilliQ-vedellä. Mikrodialyysinesteinä käytetyt Ringerin liuokset valmistettiin itse. Niiden käyttövalmis koostumus on listattu taulukossa 3. Ne valmistettiin kymmenkertaisena kantaliuoksena, säilytettiin Falcon-putkissa pakastettuna koepäivän aamuun saakka ja laimennettiin käyttövahvuuteen MilliQ-vedellä.

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytetyt yhdisteet ja kemikaalit

| Yhdiste | Valmistaja | Valmistusmaa | Laatu/tuotantolinja |
|--|--|---------------------|--------------------------------------|
| Asetonitriili (HPLC-ajoliuos) | Merck | Saksa | Analyysilaatu |
| CDNF | Biovia Oy | Suomi | Sf9-hyönteissolut |
| rhGDNF | ProSpec | Israel | E. coli |
| rhMANF | Icosagen AS | Viro | Kiinanhamsterin munasarjasolut (CHO) |
| Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS) (mikroinjektiot ja perfuusio) | Biotekniikan Instituutti, Viikki, Helsinki | Suomi | Tutkimuskäyttöön |
| Natriumfosfaatti kidevedellinen (HPLC-ajoliuos) | Merck | Saksa | Analyysilaatu |
| Dinatriumfosfaatti kidevedellinen (HPLC-ajoliuos) | Sigma-Aldrich | Saksa | Analyysilaatu |
| Isofluraani (Attane Vet) | ScanVet | Englanti | lääkelaatu |
| Isopentaani (aivojen jäädytys) | VWR Chemicals | USA | Analyysilaatu |

| | | | |
|---|--|----------|------------------|
| Jäätymisenestopuskuriliuos (kelluvat leikkeet) | Biotekniikan Instituutti, Viikki, Helsinki | Suomi | Tutkimuskäyttöön |
| Tramadoli (Tramal 50 mg/ml) | Orion Oy | Suomi | Lääkelaatu |
| Sakkarooosi (aivojen säilöntäliuos) | Amresco | USA | Ultra pure |
| Steriili keittosuolaliuos | Braun | Saksa | Lääkelaatu |
| Tissue-Tek –kudosliima | Sakura Finetek | Hollanti | Tutkimuskäyttöön |
| Lidokaiini adrenaliinilla (Lidocain cum Adrenalin 10 mg + 10 µg / ml) | Orion Oy | Suomi | Lääkelaatu |
| Klooriheksidiini-liuos (Klorhexol 5 mg/ml) | Leiras Oy | Ruotsi | Lääkelaatu |
| Nipekoottihappo | Sigma-Aldrich | Saksa | Analyysilaatu |
| Paraformaldehydi (PAF) | Sigma-Aldrich | Saksa | Analyysilaatu |
| Pentobarbitaali (Mebunat 60 mg/ml) | Orion Oy | Suomi | Lääkelaatu |
| Ringer-liuokset: | | | |
| NaCl | Merck | Saksa | Ph.Eur. |
| KCl | Merck | Saksa | Pro analysis |
| MgCl ₂ · 6 H ₂ O | Merck | Saksa | Pro analysis |
| CaCl ₂ · 1 H ₂ O | Merck | Saksa | Pro analysis |

Taulukko 3. Mikrodialyysissa käytettyjen Ringer-liuoksen ja muokatun Ringer-liuoksen koostumukset

| Ringer | Molaarisuus (mM) |
|----------------------|-------------------------|
| NaCl | 147 |
| KCl | 2,7 |
| MgCl ₂ | 1,0 |
| CaCl ₂ | 1,2 |
| Kalium-Ringer | |
| NaCl | 99,7 |
| KCl | 50 |
| MgCl ₂ | 1,0 |
| CaCl ₂ | 1,2 |

Mikrodialyysissa käytetyt nipekoottihapolliset Ringerin liuokset valmistettiin lisäämällä taulukossa 3 esitettyihin koostumuksiin 100 µM pitoisuutta vastaava määrä 10 mM nipekoottihappokantaliuosta.

5.3. Stereotaktinen leikkaus

Stereotaktiset leikkaukset tehtiin isofluraanianestesiassa aamupäivisin aikavälillä 9:00 – 13:30. Yhden päivän aikana leikattiin neljä rottaa. Rottien keskipaino leikatessa oli välillä 229 g - 305 g keskipainon ollessa 266 g. Käytetty isofluraanikaihdutin oli Univentor 400 (Malta). Ilmavirtausnopeus säädettiin 450 – 500 millilitraan minuutissa. Anestesian isofluraani-induktioannoksena käytettiin 4,5 v-%:a anestesiakammiossa ja ylläpitoannoksena 2,0 - 3,0 v-%:a maskin kautta siten, että annokseksi pyrittiin säätämään pienin mahdollinen pitoisuus, jolla eläimen refleksit katosivat (isofluraani: Attane Vet 1000mg/g, ScanVet, Englanti). Anestesian syvyyttä seurattiin testaamalla refleksit hännästä ja takajalasta nipistämällä, sekä seuraamalla hengitystaajuutta ja hengityksen syvyyttä. Leikkauksen edetessä annosta tyypillisesti pystyttiin vähentämään asteittain. Leikkauksen keskimääräinen kesto oli noin tunti.

Nukutettu rotta kiinnitettiin korvakäytävistä ja etuhampaista stereotaktiseen kehikkoon. Päälaen karvat leikattiin trimmerillä, iho desinfioitiin klooriheksidiini-liuoksella (Klorhexol 5 mg/ml, Oy Leiras Ab) ja päälaen nahka leikattiin auki. Leikkaushaava ja kallon pinnan kalvot puudutettiin lidokaiini-adrenaliini -liuoksella (Lidocain cum adrenalin 10mg/ml + 10µg/ml -injektioneeste, Orion Pharma, Suomi) ennen kalvojen leikkaamista. Bregma merkittiin tussilla, ja injektio- ja ohjauskanyylin koordinaatit määritettiin bregman ja kallon pinnan suhteen. Koordinaatit on listattu taulukkoon 4. Injektiota varten porattiin kalloon reikä, injektioneula (Hamilton, USA) laskettiin tavoiteltuun syvyyteen ja hermokasvutekijät annosteltiin aivoihin Stoelting Co Quintessential (USA) -stereotaktisella injektio-laitteella. Injektio-tilavuus oli 5 µl ja injektio-nopeus 1 µl/min. Proteiinipitoisuus liuoksessa oli 2 µg/µl, joten kokonaisproteiinimäärä oli 10 µg/injektio kaikilla proteiineilla. Kasvutekijöiden annostelun jälkeen neulan annettiin olla paikoillaan neljä minuuttia kasvutekijöiden kudokseen siirtymisen parantamiseksi, minkä jälkeen neula nostettiin hitaasti pois.

Injektion jälkeen ohjauskanyylin (MD-2250 -ohjauskanyyli, BASi, USA) paikka merkittiin tussilla, ja ohjauskanyylille sekä kolmelle kiinnitysruuville porattiin reiät. Ohjauskanyyli laskettiin tavoitesyvytyteen ja kiinnitettiin kalloon ja ruuveihin sinkki-

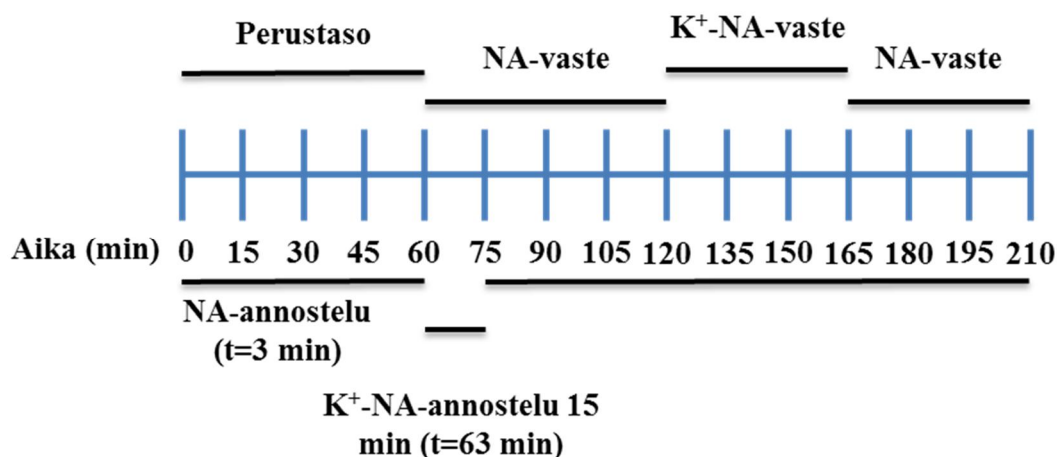
polykarboksylaattisementin (Aqualox, Voco, Saksa) avulla. Rotille annettiin 1 mg/kg tramadolia ihon alle (Tramal 50 mg/ml injektioneste, Orion, Suomi). Tramadoli oli laimennettu 1 mg/ml vahvuuteen keittosuolaliuoksella (laimennos: 0,9 % NaCl, Braun, Saksa). Lopuksi rotat siirrettiin yksittäishäkkeihin, joissa niitä pidettiin koesarjan loppuun asti.

Taulukko 4. Hermokasvutekijäinjektioiden ja ohjauskanyylien suunnitellut sijainnit. Koordinaatit ovat suhteessa bregmaan ja kallon pintaan. Suunnitellut paikat on määritetty. Kordinaattiyksikkö on millimetri.

| | Kasvutekijäinjektio | <i>S. nigra</i>-koetin (Rotat 1-16) | <i>S. nigra</i>-koetin (Rotat 17-28) | <i>L. Globus</i> <i>pallidus</i>-koetin |
|------------|----------------------------|--|---|--|
| A/P | +1,0 | -5,4 | -5,6 | -1,4 |
| M/L | +2,7 | +2,2 | +2,4 | +3,5 |
| D/V | -5,0 | -7,9 | -7,4 | -5,5 |

5.4. Mikrodialyysit

Mikrodialyysit tehtiin yhden ja kolmen viikon kuluttua leikkauksesta hereillä oleville vapaasti liikkuville rotille. Yhden päivän aikana tehtiin samanaikaisesti neljä mikrodialyysia. Mikrodialyysinesteenä käytettiin Ringerin liuosta, nipekoottihappo-Ringerin liuosta (nipekoottihappopitoisuus 100 μ M), sekä nipekoottihappo-kalium-Ringerin liuosta (nipekoottihappopitoisuus 100 μ M, K⁺-pitoisuus 50 mM). Liuosten koostumus on lueteltu taulukossa 3. Käytettyjen mikrodialyysikoettimien saantoprosentit määritettiin *in vitro* luvussa 5.11. kuvatulla tavalla ennen koettimien käyttämistä mikrodialyysikokeissa. Mikrodialyysin toteuttaminen on havainnollistettu kuvassa 3.



Kuva 3. Mikrodialyysipäivän altisteaikataulu. Ennen ensimmäistä näytettä koettimien annettiin stabiloitua vähintään kaksi tuntia tavallisen Ringerin liuoksen kanssa. Letkustojen keskimääräiseksi läpivirtausajaksi määritettiin 57 minuuttia. (NA = niipekoottihappo). Kuva muokattu tutkimussunnitelman pohjalta (Renko, J-M.)

Koettimet huuhdeltiin ennen käyttöä pumpptomalla Ringerinliuosta koettimen läpi vähintään 15 minuuttia ennen päähän asettamista. Koepäivän alussa rottien päähän asetettiin mikrodialyysikoetin (BASi, 1 mm koetin *substantia nigra pars reticulata*n, 2 mm koetin lateraaliseen *globus pallidukseen*) ohjauskanyylin kautta ja koettimen kautta pumpattiin ensin niipekoottihapotona Ringerin liuosta (pumppu: Harvard apparatus 22, USA) virtausnopeudella 2 μ l minuutissa. Koettimen annettiin stabiloitua vähintään kaksi tuntia ennen näytteiden keräämisen aloittamista. Näytteitä kerättiin 15 minuutin välein 3,5 tunnin ajan. Näytteitä kerättiin yhteensä 14 rottaa kohti. Näytteet vietiin välittömästi keräämisen jälkeen pakastimeen (-20 °C) ja viimeistään tunnin kuluttua näytteet siirrettiin syväjäähdytyspakastimeen (-80 °C). Ensimmäisen koesarjan näytteet pakastettiin pienissä avovialeissa ja kahden jälkimmäisen koesarjan näytteet pienissä Eppendorf-putkissa.

Koettimet huuhdeltiin MilliQ-vedellä käytön jälkeen ja säilytettiin jääkaapissa MilliQ-vedessä kokeiden välillä. Koettimien eheys tarkistettiin ennen kokeita ja kokeiden jälkeen silmämääräisesti. Koettimia käytettiin korkeintaan kaksi kertaa.

5.5. Rottien perfusointi ja mikrotomisten leikkeiden valmistaminen

Rotat nukutettiin terminaalianestesiaan intraperitonealisella pentobarbitaali-injektiolla (90 mg/kg, Mebunat 60 mg/ml, Orion, Suomi) jälkimmäistä mikrodialyysia seuranneena päivänä. Rotille suoritettiin tämän jälkeen transkardiaalinen perfusointi seuraavasti: rotan rintakehä leikattiin auki ja sydämen vasempaan kammioon pistettiin neula, jonka läpi alettiin pumpata fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS, Biotekniikan instituutti, Suomi) samalla kun sydämen oikeaan eteiseen tehtiin reikä. PBS-liuosta pumpattiin viiden minuutin ajan ja perfuusion aikana tarkastettiin, että ulos tuleva perfuusioneste ja rotan raajat muuttuivat verettömiksi. Tämän jälkeen neulan läpi pumpattiin 4 % paraformaldehydiliuosta (PAF) kymmenen minuutin ajan. Aivot irrotettiin kallosta, postfiksattiin 4 % PAF-liuoksessa yön yli jääkaapissa ja lopuksi siirrettiin 20 % sakkaroosiliuokseen Falcon-putkessa, kunnes aivot olivat uponneet astian pohjaan. Sakkaroosikäsitellyt aivot jäädettiin tämän jälkeen hiilihappojään päällä jäähdetyssä isopentaanissa 90 sekunnin ajan ja laitettiin syväjäähdyttimeen (-80 °C) odottamaan kelluvien koronaarileikkeiden tekoa.

Kelluvat koronaarileikkeet tehtiin käyttäen mikrotomista leikkuria (Leica CM3050, Saksa). Aivot kiinnitettiin leikkuriin kudostiteillä (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Hollanti). *Striatum*- ja *globus pallidus* -leikkeet kerättiin yhtenä sarjana ja *substantia nigra* -leikkeet yhtenä (*striatum*- ja *g. pallidus*: 1,60 mm – -3,14 mm ja *s. nigra* -4,30 mm – -6,72 mm suhteessa *bregmaan*). Leikkeiden paksuus oli 40 µm, ja leikkeet kerättiin kuuteen rinnakkaiseen kuoppaan siten, että peräkkäiset leikkeet kerättiin aina seuraavaan kuoppaan. Kuopat täytettiin jäätymisenestoliuoksella, joka sisälsi 30 v-% glyserolia (J.T.Baker, USA) ja 30 v-% etyleeniglykolia (Sigma, Saksa) fosfaattipuskurissa (pH 7,4) (fosfaattipuskurin valmistuksessa käytetty natriumfosfaatti monohydraatti ja dinatriumfosfaatti dihydraatti: Merck, Saksa). Näytteet siirrettiin pakastimeen (-30 °C) odottamaan jatkotutkimuksia.

5.6. HPLC-analyysin ajoliuokset ja analyysin vaatimat kemikaalit ja liuokset

5.6.1. HPLC-ajoliuokset

Ajoliuoksina käytettiin kahta liuosta:

A-liuos koostui 20 v-% asetonitriilistä (Merck, HPLC-laatu) 0,1 M fosfaattipuskurissa (pH 4,90). Liuos tehtiin valmistamalla 0,1 M NaH_2PO_4 -liuos ja 0,1 M Na_2HPO_4 -liuos ja säätämällä ensimmäisen liuoksen pH 4,90:än lisäämällä toista liuosta. pH määritettiin pH-mittarilla (Schott CG 842, Saksa). Mittapullon lisättiin 20 % pullon tilavuudesta asetonitriiliä mittalasilla ja pullo täytettiin merkkiin fosfaattipuskurilla. Kokeen aikana kokeiltiin myös ajoliuoksia, joiden asetonitriilipitoisuus oli 18 v-% - 24 v-%.

B-liuos koostui 80 v-% asetonitriilistä (Merck, HPLC-laatu). Se valmistettiin lisäämällä mittalasilla 4 osaa 100 %:a asetonitriiliä ja 1 osa MilliQ-vettä.

Ajoliuokset suodatettiin 0,2 μm suodatinkalvon läpi, tyytetettiin 15 minuuttia ja liitettiin HPLC-laitteistoon ilmatiiviisti. HPLC-laitteiston syöttölaitteisto huuhdeltiin jokaisen näytteen välillä 10 v-% metanoli-MilliQ-vesiseoksella.

GABA:n erotus ja retentio perustuivat vain ajoliuos A:n ja kolonnin väliseen vuorovaikutukseen. Ajoliuos B:ä ajettiin kolonniin vasta GABA:n detektion jälkeen kolonnin puhdistamiseksi voimakkaasti retentoituvista yhdisteistä. Ajoliuosten virtausnopeus oli 1,2 ml/min.

Taulukossa 5 on listattu GABA:n analyysissä käytetyt liuottimet ja reagentit.

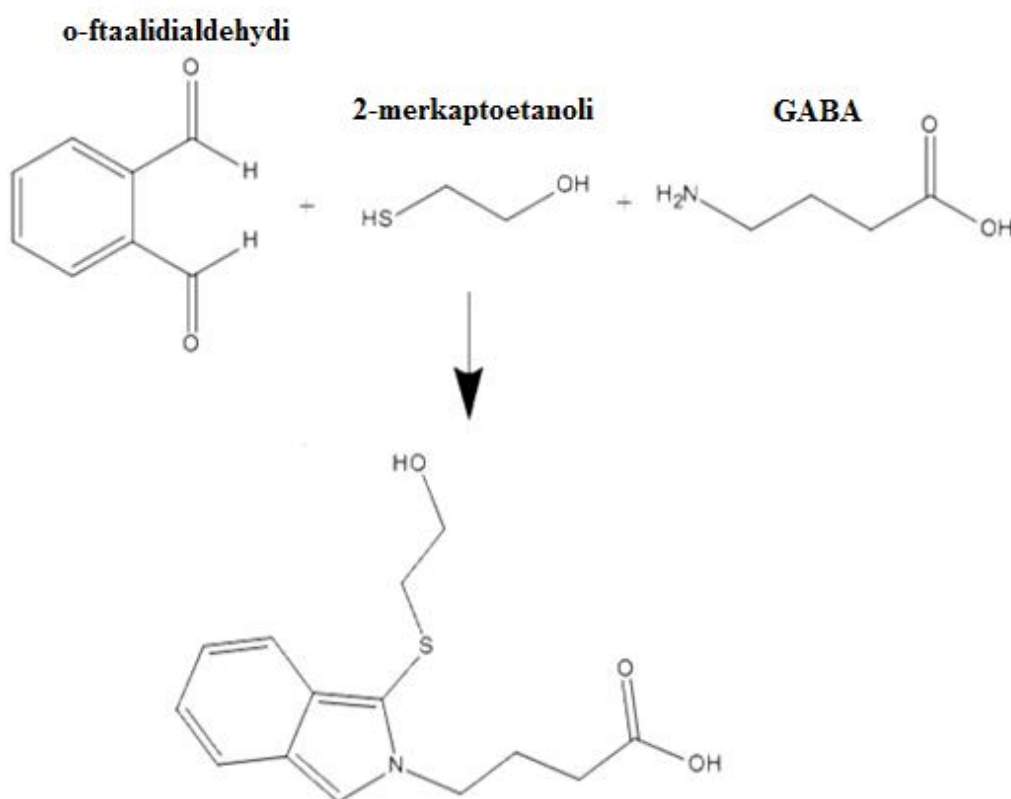
Taulukko 5. HPLC-analyysissä käytetyt liuottimet ja reagentit

| Yhdiste | Valmistaja | Valmistusmaa | Laatu |
|---|--|--------------|----------------|
| Asetonitriili | Merck | Saksa | HPLC |
| MilliQ-Vesi | Helsingin vesi, suodatus: Simplicity 185 -laite. Simpak 1- suodatin | | |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | Merck | Saksa | Analyysilaatu |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | Sigma-Aldrich | Saksa | Analyysilaatu |
| Metanoli | Merck | Saksa | HPLC |
| O-ftaalialdehydi- reagentti (tuotetunnus P7914) | Sigma-Aldrich | Saksa | Reagenssilaatu |
| 2-Merkaptoetanol (M6250) | Sigma-Aldrich | Saksa | Reagenssilaatu |
| Gamma- aminovoihappo (GABA) | Sigma-Aldrich | Saksa | Analyysilaatu |

5.6.2. GABA:n derivatisointiliuokset ja derivatisointiprotokolla

GABA:n herkkä detektointi vaatii kemiallisen muokkauksen. Käyttämämme o-ftaalialdehydi (OPA) -derivatisointi on paljon käytetty ja nopea menetelmä, ja se mahdollistaa GABA:n detektoimisen nanomolaarisilla pitoisuuksilla (Piepponen ja Skujins 2001). Reaktio ei ole GABA:lle selektiivinen, vaan reaktio tapahtuu vaihtelevissa määrin kaikkien nukleofiilien kanssa - GABA:n ja muiden aminohappojen kohdalla primäärisen amiiniryhmän kanssa (Zuman 2004). Derivatisoidun yhdisteen eksitaatio- ja emissioaallonpituudet eivät myöskään merkittävästi riipu nukleofiilin rakenteesta, vaan pelkästään OPA:n isoindolijohdososasta. Detektiosta ei ole tästä syystä mahdollista tehdä GABA-selektiivistä, vaan yhdisteiden analyysin selektiivisyys täytyy saavuttaa HPLC-erotuksen optimoinnin kautta.

O-ftaalialdehydin reaktio on pH-riippuvainen. Käyttämämme OPA-reagentti (Tuotetunnus P7914, Sigma-Aldrich, Saksa) on kaupallinen valmiste reaktion tekemiseen ja se on boorihappopuskuroitu. Tämä reagentti ei sisällä vielä reaktion vaatimaa tiolihdistettä (kuva 4). Käyttämämme 2-merkaptetaanoli (Tuotetunnus M6250, Sigma-Aldrich, Saksa) lisättiin reaktioliuokseen juuri ennen analyysia: 3 μ l 2-merkaptetaanolia millilitraa OPA:a kohti. 2-Merkaptetaanolin lisäämisen jälkeen reagenttia säilytettiin HPLC-laitteiston 4 °C:een jäädytetyssä näytteensyöttäjässä. Mikrodialyysinestettä oli analysoitavissa näytteissä 15 μ l. Näytteensyöttäjä ohjelmoitiin tekemään derivatisointireaktion vaatimat vaiheet seuraavasti: laite otti 6 μ l OPA-reagenttia, lisäsi sen mikrodialyysinäytteeseen, ja sekoitti näytteen vetämällä kaksi kertaa ruiskuun ja ulos 20 μ l näytettä. Laite odotti minuutin (reaktioaika) ja annosteli laitteistoon 20 μ l näytettä. OPA-johdoksen muodostuminen GABA:sta on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. O-ftaalialdehydi-johdoksen muodostuminen GABA:sta 2-merkaptetaanolin läsnä ollessa. Kuva piirretty mukailen (Zuman 2004).

5.6.3. Standardiliuosten valmistus

GABA:n pitoisuudet määritettiin vertaamalla analyysilaitteiston signaalien pinta-aloja valmistamiemme standardiliuosten vastaaviin lineaarisen regressioanalyysin avulla.

Standardiliuokset valmistettiin seuraavasti:

GABA-puhdasaineesta (Sigma-Aldrich, Saksa) valmistettiin 100 ml:n mittapulloon 1 mM kantaliuos MilliQ-vesi - metanoli (1:1 v/v) liuokseen kerran kuukaudessa. Tätä liuosta säilytettiin jääkaapissa.

Joka viikko 1 mM:sta kantaliuoksesta tehtiin 10 μ M välilaimennos MilliQ-veteen. Myös tämä liuos säilytettiin jääkaapissa. Tästä 10 μ M välilaimennoksesta ja Ringerin liuoksesta tehtiin joka koepäivän aamuna 10 ml Falcon-putkiin 15 nM, 30 nM, 60 nM, 120 nM ja 240 nM standardiliuokset.

Standardinäytteet analysoitiin joka päivän alussa ennen varsinaisten dialyysinäytteiden analysointia laitteiston toiminnan varmistamiseksi. Jos HPLC-analyysien oli tarkoitus kestää useamman tunnin ajan, myös näytesarjan loppuun laitettiin standardisuora laitteiston toiminnan varmistamiseksi.

5.7. HPLC-laitteisto

HPLC-laitteisto koostui liuotinpumpusta (Jasco PU-1580, Ruotsi), joka oli liitetty kaasunpoistajaan (Jasco DG-980-50, Ruotsi) sekä matalapainegradienttisekoittajaan (Jasco LG-1580-02, Ruotsi). Mikrodialyysinäytteiden derivatisointitesteissä ja kolonniinsyötössä käytettiin jäähdytettyä automaattinäytteensyöttäjää (Shimadzu Nexera SIL-30AC, USA). Koettimet 18–24 testattiin edellä mainitulla näytteensyöttäjällä, mutta koettimien 1-17 testaamisessa käytettiin toista automaattinäytteensyöttäjää (Jasco CMA200, Ruotsi). Analyyttinen kolonni (Kinetex 50 X 4,6 mm, partikkelikoko 5 μ m, C18, huokoskoko 100 Å, Phenomenex, USA) oli suojattu SecurityGuard ULTRA suodattimella (Phenomenex, USA). Kolonni termostoitettiin 45 °C:een kolonnilämmittimellä (CROCO-CIL, Cluzeau Info-Labo,

Ranska) ja näytteet analysoitiin fluoresenssidetektorilla (Jasco FP-1520, Ruotsi). Eksitointiaallonpituutena käytettiin 330 nm:a ja detektioaallonpituutena 450 nm:a.

5.8. GABA:n erottumisen validointi

GABA:n retentio käänteisfaasikolonissa on voimakkaasti riippuvainen käytetyn ajoliuoksen asetonitriilipitoisuudesta (oma havainto) sekä pH:sta (Rea ym. 2005). Myös kolonin lämpötila vaikuttaa yhdisteiden retentioon kolonissa. Monimutkaisessa biologisessa matriisissa pelkkä yhden analysoitavan yhdisteen retentioon vaikuttaminen ei paranna menetelmän erotuskykyä, vaan erotus pitää saada aikaiseksi usean yhdisteen retention yhtäaikaisella säätämällä. Monimutkaisten yhdistematriisien erottamisen optimoimiseen onkin kehitetty aivan omia tietokoneohjelmistoja, sillä monen parametrin vaikutuksen yhtäaikainen hallinta ylittää nopeasti inhimillisten kykyjen rajat.

Käyttämämme erotusprotokolla on muokattu laboratoriossamme aikaisemmin käytetyn protokollan pohjalta vain asetonitriilin määrää säätämällä (Vihavainen ym. 2008). GABA:n erottuminen ennen fysiologisten näytteiden analysoimista pyrittiin varmistamaan valmistamalla ja analysoimalla kymmenen aminohapon suhteen 1 mikromolaarinen testiliuos. Yhdisteet on listattu taulukossa 6.

Taulukko 6. GABA:n erotuksen validoinnissa käytetyt yhdisteet

| Yhdiste | Valmistaja |
|-------------------|----------------------|
| l-Arginiinihappo | Sigma-Aldrich |
| l-Glutamiinihappo | Sigma-Aldrich |
| l-Asparagiini | Sigma-Aldrich |
| l-Histidiini | Sigma-Aldrich |
| l-Glutamiini | Sigma-Aldrich |
| Glysiini | Sigma-Aldrich |
| l-Treoniini | Sigma-Aldrich |
| l-Arginiini | Sigma-Aldrich |
| l-Alaniini | Sigma-Aldrich |
| Tauriini | Fluka |

5.9. Havaitsemis- ja määritysrajan määrittäminen

Kaikkien analyttisten menetelmien validoinnissa on tärkeää kyetä arvioimaan mikä analyttipitoisuus on mahdollista havaita kohinasta (Havaintoraja, Detection Limit, DL) ja kuinka suuret pitoisuudet on myös mahdollista määrittää luotettavasti (Määritysraja, Quantification Limit, QL). Näiden rajojen määrittämiseen on useita menetelmiä, mutta tässä työssä käytimme International Conference of Harmonisation (ICH) -järjestön laatukäsikirjan ”Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2” kohtia 6.3.2 ja 7.3.2. Menetelmässä rajat määritetään usean eri päivänä tehdyn standardisuoran y-akselien leikkauspisteen ja standardisuoran kulmakertoimen avulla. Arvot laskettiin erikseen sekä vanhaa (Jasco CMA200) että uutta näytteensyöttäjää (Shimadzu Nexera SIL-30AC) käyttäen.

ICH:n kaavat havaitsemis- ja määritysrajojen määrittämiseen standardisuorien avulla ovat:

$$DL = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

ja

$$QL = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

missä σ on y-akselin leikkauspisteiden keskihajonta ja S on standardisuorien kulmakerroin.

ICH:n mukainen rajojen määrittäminen tehtiin myös samoista standardiliuoksista peräkkäisinä pipetointina tehdyistä standardeista. Tarkoituksena oli arvioida kuinka suuri osa hajonnasta muodostuu päivien välisestä standardisuorien valmistamiseen liittyvästä vaihtelusta ja kuinka suuri osa pipetoinnista.

5.10. Derivatisointimenetelmän stabiilius

Koska GABA:ssa ei ole kromoforisia rakenteita, se ei fluoresoi eikä absorboi UV-säteilyä. GABA:ssa ei myöskään ole herkästi hapettuvia tai pelkistyviä rakenteita, joten herkkä elektrokemiallinen detektio ilman derivatisointia on myös mahdotonta suorittaa. Mikrodialyysinäytteiden pienet analyttikonsentraatiot edellyttävät analyysimenetelmältä korkeaa herkkyyttä. O-ftaalialdehydi-derivatisoidun GABA:n fluoresenssidetektio on erittäin herkkä menetelmä, jota on käytetty jo 80-luvulta lähtien GABA:n mikrodialyysinäytteiden analyysiin (Kehr ja Ungerstedt 1988).

Derivatisointiliuoksen stabiilius pitkien ajosarjojen aikana varmistettiin ajamalla yhdellä, yli 18 tuntia kestäneellä ajokerralla seitsemän samoista liuoksista pipetoitua standardiliuosta, joiden annettiin olla HPLC-laitteen jäädytetyssä näytteensyöttäjässä analyysiin asti. Standardisuorat olivat kelkassa siten, että analyysisarjan alussa oli kolme standardisuoraa, keskellä päivää yksi ($t = 8,5$ tuntia kokeen alusta) ja sarjan lopussa kolme ($t = 15,5 - 18$ tuntia). Standardisuorien välissä ajettiin rottien mikrodialyysinäytteitä.

5.11. Mikrodialyysikoettimet ja niiden testaaminen

Koettimet olivat kaupallisesti saatavilla olevia BR-1 (BASi, USA) koettimia yhden millimetrin pituisella membraanilla tai MD-2200 BR-2 (BASi, USA) koettimia kahden millimetrin pituisella membraanilla. Koettimien membraanin ulkohalkaisija oli $320 \mu\text{m}$ ja sisähalkaisija $220 \mu\text{m}$. *Substantia nigraan* kohdistettujen koettimien membraanit olivat yhden millimetrin pituisia ja lateraaliseen *globus pallidukseen* kohdistettujen koettimet membraanit puolestaan kahden millimetrin pituisia. BR-1 -koettimet tehtiin koetta varten valmistajan erikoiseränä, kun taas BR-2 -koettimet olivat valmistajan varastotuote.

Mikrodialyysin nesteensiirtoletkut olivat polyetyyleeniä (Intramedic Polyethylene Tubing, Becton Dickinson and Company, USA) Letkujen sisähalkaisija oli $0,28 \text{ mm}$. Sisääntuloletkun pituus oli 105 cm ja ulostuloletkun 83 cm . Liuoksen

läpikulkeutumisaika määritettiin kokeellisesti pumppaamalla värillistä liuosta yhden koettimeen liitetyn letkuston läpi. Liuoksen läpivirtausaika oli noin 57 minuuttia.

Ennen koettimien käyttöä, niiden toiminta varmistettiin määrittämällä koetinkohtainen *in vitro* -saanto. Saannot määritettiin valmistamalla 1 mM GABA 50 % v/v Metanoli:MilliQ-vesi -standardiliuoksesta 700 nM ja 1400 nM laimennokset mittapullossa Ringerin liuokseen. 2 mm koettimille käytettiin 700 nM liuosta ja 1 mm koettimille 1400 nM liuosta. Koettimet huuhdeltiin MilliQ-vedellä vähintään 15 minuutin ajan siten, että koettimien membraanit olivat vedessä samalla kun koettimien läpi pumpattiin vettä. Huuhtelun jälkeen koettimien membraanit upotettiin koestandardiliuokseen samalla kun koettimien läpi pumpattiin Ringerin liuosta virtausnopeudella 2 µl/min. Koettimien annettiin stabiloitua vähintään tunnin ajan, jonka jälkeen kolme mikrodialyysinäytettä kerättiin Eppendorf-putkiin 15 minuutin välein. Näytteet pakastettiin -80 °C:en analyysiin asti. Koettimien *in vitro*-saantoprosentti laskettiin kaavalla:

$$Saanto\% = \frac{Analysoitu\ pitoisuus}{Koeliuoksen\ pitoisuus} \times 100\%$$

Kolmen peräkkäin kerätyn näytteen analyysituloksesta laskettiin saannon keskiarvo.

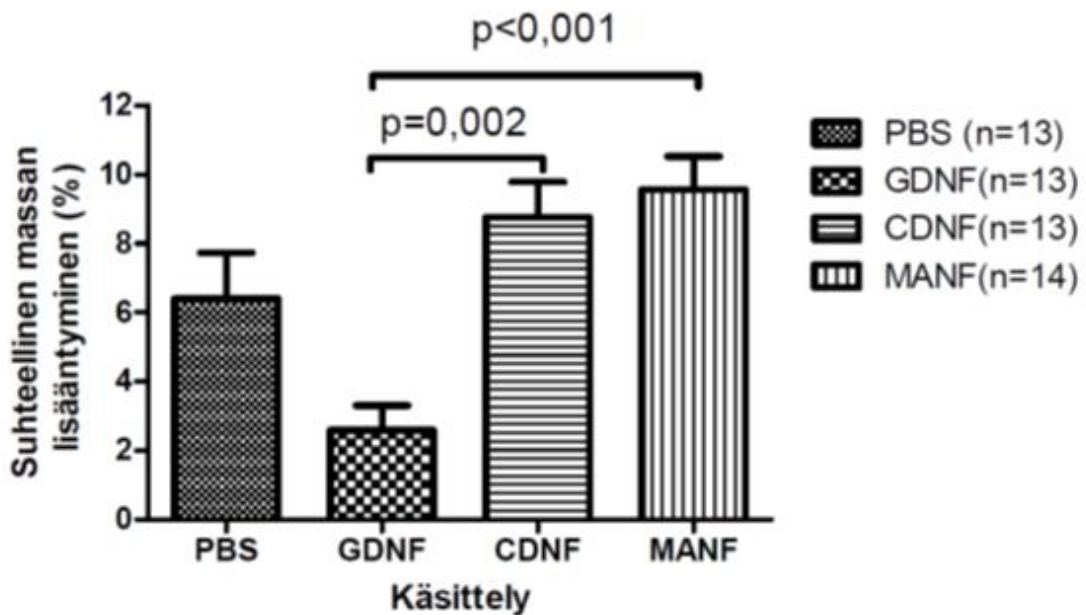
6. TULOKSET

6.1. Käsittelyn vaikutus rottien kasvuun

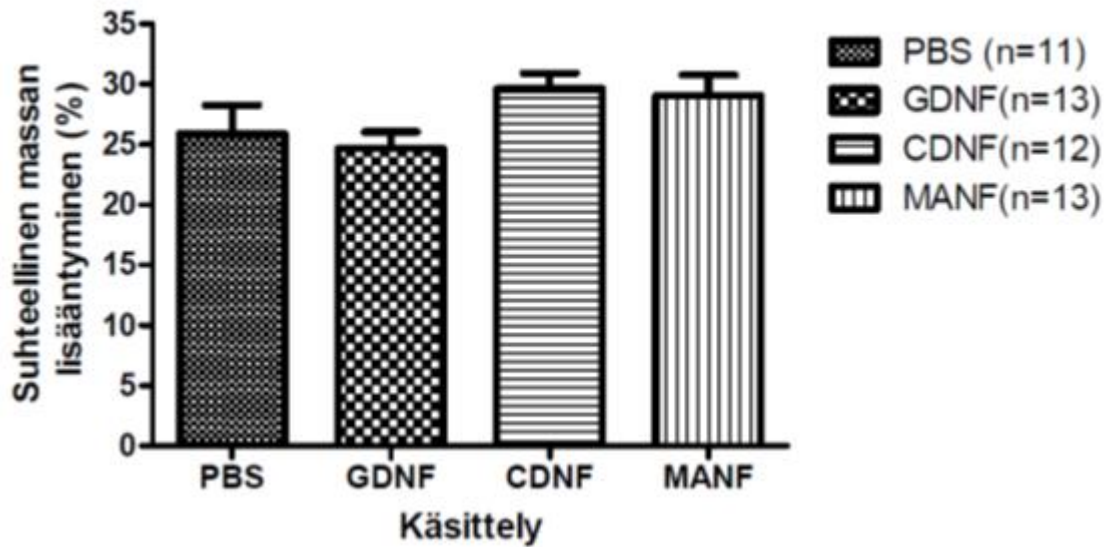
Rotat punnittiin ennen stereotaktista leikkausta ja ennen mikrodialyysija. Massojen muutoksia tarkasteltaessa huomattiin, että rottien massojen muutokset leikkausten jälkeen vaikuttivat vaihtelevan käsittelyryhmien välillä. Tulokset analysoitiin yksisuuntaisen varianssianalyysin avulla. *Post hoc* -testinä käytettiin Tukeyn HSD-testiä.

Viikon kuluttua leikkauksesta GDNF-käsitellyt rotat olivat kasvaneet keskimäärin 2,6 %, kun CDNF- ja MANF-käsitellyt rotat olivat kasvaneet keskimäärin 8,8 % ja 9,7 %. PBS-rotat olivat kasvaneet 6,4 %. Ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero ($F_{3,46} = 8,543$, $p < 0,001$) (kuva 5) Erot PBS-ryhmän ja muiden ryhmien välillä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Erot GDNF- ja MANF-ryhmän sekä GDNF- ja CDNF-ryhmän välillä olivat tilastollisesti merkitseviä (GDNF vs. MANF, $p < 0,001$; GDNF vs. CDNF, $p = 0,002$). Tuloksissa ei ole tehty eroa ohjauskanyylin paikan suhteen. Ohjauskanyylin paikka ei kuitenkaan vaikuttanut kasvunopeuksiin.

Kolmen viikon kuluttua leikkauksesta ryhmien välillä ei ollut enää tilastollisesti merkitsevää eroa ($F_{3,43} = 1,856$, $p = 0,191$) (kuva 6) Viikon 1 ja 3 ryhmien koot eroavat toisistaan, koska muutamalta rotalta kokeiden aikana ohjauskanyylin kiinni pitävä sementtihattu oli irronnut, ja nämä rotat oli lopetettu ennen toista mikrodialyysia.



Kuva 5. Rottien massojen muutos leikkauksen ja ensimmäisen mikrodialyysin välillä ($Ka \pm SEM$). Leikkauksesta on kulunut yksi viikko. Tilastollinen testi: Yksisuuntainen varianssianalyysi, *post hoc*: Tukey HSD.

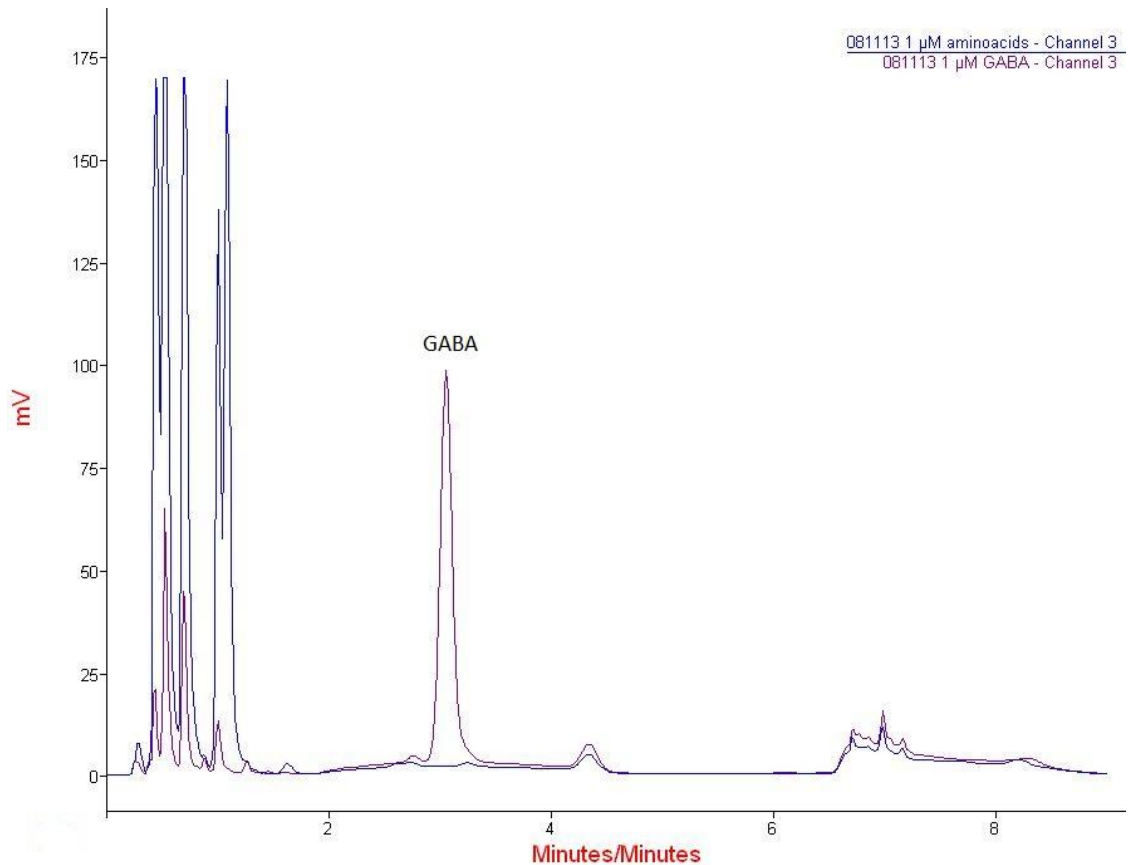


Kuva 6. Rottien massojen muutos leikkauksen ja toisen mikrodialyysin välillä ($Ka \pm SEM$). Leikkauksesta on kulunut kolme viikkoa. Ryhmien välillä ei ole tilastollisesti merkitseviä eroja.

6.2. GABA:n erottumisen validointi

GABA:n erottumisen varmistamiseksi tehdyn, kymmenestä aminohaposta koostuneen validointiliuoksen testaaminen osoitti, että hyvin erilaiset aminohapot eivät häiritse GABA:n analyysiä. Kuvasta 7. on nähtävissä, että GABA retentioaika on noin kolme minuuttia, mitä voidaan pitää analyysin kannalta lähes ihanteellisena. Muut aminohapot retentoituvat kolonnissa vähän ja tulevat ulos viimeistään 1,5 minuutin kohdalla.

Erotusmenetelmää ja laitteistoa oli käytetty laboratoriossamme aiemmin (Vihavainen ym. 2008). Tämän työn ja kuvassa 7 esitettyjen HPLC-kromatogrammien perusteella ei ollut syytä olettaa, ettei GABA:n erottaminen ja detektoiminen olisi tällä laitteistolla mahdollista.



Kuva 7. Validointiliuoksen ja GABA-standardin HPLC-kromatogrammit. Validointiliuoksen yhdisteet on listattu taulukossa 6. Ajoliuoksen asetonitriilipitoisuus on noin 23 v-%. Kuuden minuutin jälkeen alkava nousu johtuu todennäköisesti ajoliuos B:n syötöstä johtuvasta painevaihtelusta.

6.3. Havaitsemis- ja määritysrajan määrittäminen

Kokeiden aikana saadut kulmakertoimet, leikkauspisteet ja korrelaatiokertoimet on listattu taulukossa 7. Taulukkoon on listattu kaikki kulmakertoimet, joiden kaikki pitoisuudet saatiin luotettavasti määritettyä, ja joissa käytettiin samaa detektorin herkkyyttä.

Taulukko 7. Tutkimusten aikana uudella ja vanhalla näytteensyöttäjällä määritettyjen standardisuorien tiedot. Taulukkoon on listattu vain ne suorat, joissa standardipitoisuudet ovat 15, 30, 60, 120 ja 240 nM, ja näytteen tilavuus on 15 µl.

| CMA-200 näytteensyöttäjä. Ei kolonnin esisuodatinta | | | |
|--|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Ajopäivä | Kulmakerroin | y-akselin leikkauspiste | Korrelaatiokerroin (R) |
| 21.11.2013 | 7,2837 | 12,586 | 0,9989518 |
| 25.11.2013 | 7,0842 | -1,7254 | 0,9998656 |
| 29.11.2013 | 7,1325 | -1,9904 | 0,9999483 |
| 3.12.2013 | 6,9277 | 3,93708 | 0,9997980 |
| 13.12.2013 | 6,8553 | 2,1112 | 0,9999089 |
| 20.12.2013 | 6,7845 | 17,8596 | 0,9998616 |
| 10.1.2014a | 8,2561 | -11,8000 | 0,9999567 |
| 10.1.2014b | 8,0588 | -3,69667 | 0,9999387 |
| 13.1.2014 | 7,8778 | 11,9133 | 0,9997276 |
| 14.1.2014 | 8,0391 | 13,2458 | 0,9997640 |
| 15.1.2014 | 8,1854 | 48,8125 | 0,9993474 |
| 16.1.2014 | 7,9985 | 37,9575 | 0,9994062 |
| 17.1.2014a | 8,4391 | -10,6645 | 0,9997001 |
| 17.1.2014b | 7,5430 | -5,81458 | 0,9975096 |
| 21.1.2014 | 7,3702 | 15,2720 | 0,9997031 |
| keskiarvo | 7,5891 | keskihajonta | 16,5054 |
| | | (σ) | |

| Nexera SIL-30AC näytteensyöttäjä. Kolonnin esisuodatintimen kanssa | | | |
|---|---------------|---------------------|----------------|
| 17.3.2014 | 7,7226 | 26,3554 | 0,9999677 |
| 18.3.2014 | 8,3966 | 11,1250 | 0,9997422 |
| 19.3.2014 | 6,9173 | -2,0822 | 0,9989923 |
| 20.3.2014a | 7,8511 | 7,84625 | 0,9999264 |
| 20.3.2014b | 7,6546 | -7,20750 | 0,9993564 |
| 21.3.2014 | 7,0894 | 29,5454 | 0,9996463 |
| 28.3.2014 | 8,6919 | -6,6125 | 0,9993371 |
| 2.4.2014 | 8,1039 | 31,3788 | 0,9994036 |
| 3.4.2014 | 7,3957 | 22,7038 | 0,9998220 |
| keskiarvo | 7,7581 | keskihajonta | 14,6548 |
| | | (σ) | |

Yllä olevista tuloksista voidaan laskea ICH:n mukaiset havaitsemis- (Detection limit, DL) ja määritysrajat (Quantification limit, QL).

Vanha laitteisto:

$$DL = \frac{3,3 \times \sigma}{S} = \frac{3,3 \times 16,5054}{7,5891} = 7,1771 \dots \approx 7,2 \text{ nM}$$

$$QL = \frac{10 \times \sigma}{S} = \frac{10 \times 16,5054}{7,5891} = 21,7488 \dots \approx 22 \text{ nM}$$

Uusi laitteisto:

$$DL = \frac{3,3 \times \sigma}{S} = \frac{3,3 \times 14,6548}{7,7581} = 6,2335 \dots \approx 6,2 \text{ nM}$$

$$QL = \frac{10 \times \sigma}{S} = \frac{10 \times 14,6548}{7,7581} = 18,8896 \dots \approx 19 \text{ nM}$$

Koska näytteen tilavuus oli 15 μl , voidaan näistä tuloksista laskea, että laitteistomme havaitsemis- ja määrittäysrajat ovat:

Vanha laitteisto:

$$DL = V \times c = 15 \mu\text{l} \times 7,1771 \dots \text{ nM} = 107,656 \dots \text{ fmol} \approx 0,11 \text{ pmol}$$

$$QL = V \times c = 15 \mu\text{l} \times 21,7488 \dots \text{ nM} = 326,23 \dots \text{ fmol} \approx 0,33 \text{ pmol}$$

Uusi laitteisto:

$$DL = V \times c = 15 \mu\text{l} \times 6,2335 \dots \text{ nM} = 93,5025 \dots \text{ fmol} \approx 0,093 \text{ pmol}$$

$$QL = V \times c = 15 \mu\text{l} \times 18,8896 \dots \text{ nM} = 283,34 \dots \text{ fmol} \approx 0,28 \text{ pmol}$$

Laitteiston havaitsemisyläraja rajoittaa detektorin alhainen kyky mitata korkeaa fluoresenssia. Havaitsemisylärajan määrittäminen ei ole yhtä suoraviivaista kuin alarajan määrittäminen, sillä yläraja riippuu laitteiston erottaman analyytin maksimikonsentraatiosta detektoitaessa (piikin korkeudesta), mikä puolestaan riippuu mm. kolonnista, ajoliuoskoostumuksesta sekä retentioajasta. Laitteistossa on myös mahdollisuus käyttää maksimisignaalia heikentävää suodatinta, jolloin määrittämissä yläraja voidaan nostaa, mutta tällöin havaitsemis- ja määrittäysalaraja nousevat vastaavasti.

Laitteiston toimiessa ihanteellisesti standardisuoramme korkeimpana pitoisuutena käytetty 240 nM pitoisuus saavutti 97,7 % maksimaalisesta signaalivahvuudesta. Määrittämissä yläräjäksi käyttämillämme ajo-olosuhteilla ja laitteilla voidaan laskea:

$$\text{Määrittelysyräaja} = \frac{\text{Korkein konsentraatio}}{\text{Osuus maksimivasteesta}} = \frac{240 \text{ nM}}{0,977} = 245,64 \text{ nM} \approx 246 \text{ nM}$$

Vastaavasti

$$\text{Määrittelysyräaja} = V \times c = 15 \mu\text{l} \times 245,64 \text{ nM} = 3,6846 \text{ pmol} \approx 3,7 \text{ pmol}$$

Yllä laskettu arvo edustaa kokeiden aikana parhaiten onnistuneen erotuksen määrittelysyräjaa. Kolonnin vanhetessa kromatogrammin analyyttipiikit tyypillisesti leviävät mikä nostaa määrittelysyräjaa.

Arvioidaksemme määrittelyksen varianssin lähdeettä teimme standardisuorasarjan, joka pipetoitiin sarjana samoista standardiliuoksista. Kaikki vastaavat pitoisuudet pipetoitiin samalla pipetin kärjellä peräkkäin. Tavoitteena oli arvioida kuinka suuri osa standardisuorien hajonnasta johtuu näytteiden pipetoinnista ja kuinka suuri osa standardisuorien valmistuksesta ja muista päivien välillä vaihtuvista muuttujista. Alla olevassa taulukossa 8 on esitetty samasta liuoksesta tehtyjen standardisuorien y-akselien leikkauspisteet.

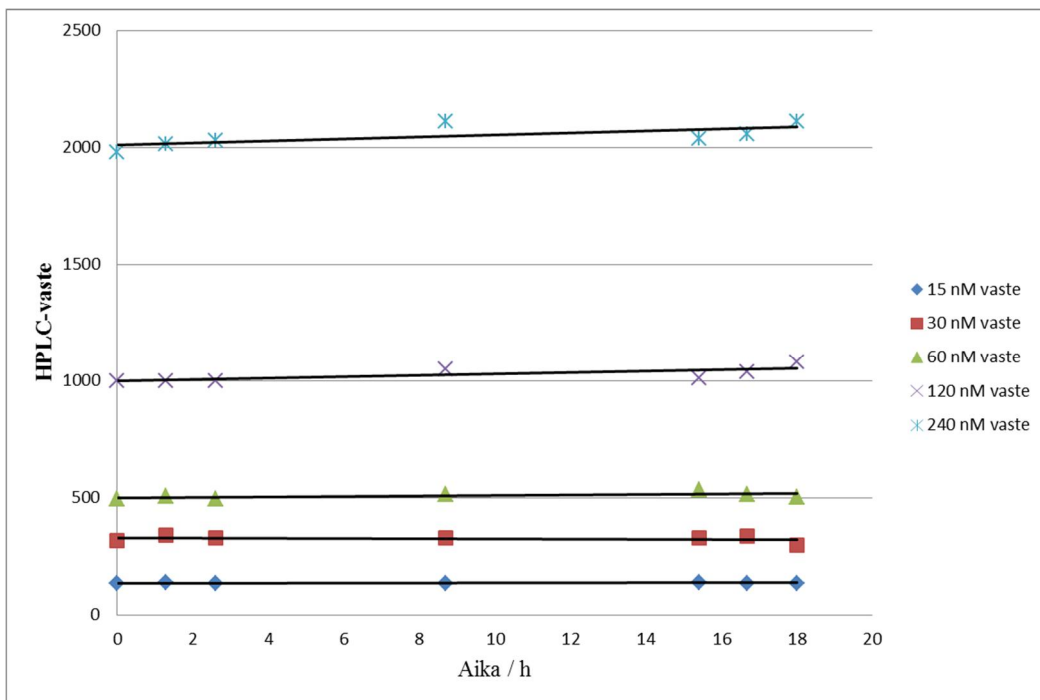
Taulukko 8. Samasta standardiliuoksesta peräkkäin analysoitujen standardisuorien y-akselin leikkauspisteet, sekä leikkauspisteiden keskihajonta. Standardit analysoitiin uudella laitteistolla.

| Ajettu 2.4.2014 | y-akselin leikkauspiste |
|--|------------------------------------|
| STD 1 | 31,3787 |
| STD 2 | 36,8679 |
| STD 3 | 25,5054 |
| STD 4 | 20,2050 |
| STD 5 | 39,2800 |
| STD 6 | 33,7604 |
| STD 7 | 8,6670 |
| keskihajonta(σ) | 9,9370 |

Samana päivänä tehtyjen standardisuorien y-akselin leikkauspisteiden keskihajonta on noin kolmasosan alhaisempi, kuin eri päivänä tehtyjen standardisuorien (taulukko 7 ja 8). Tästä voidaan arvioida, että standardisuorien hajonnasta noin kolmasosa tulee standardisuorialiuosten valmistamisessa tapahtuvasta vaihtelusta.

6.4. Derivatisointiliuoksen stabiilius

Alla olevassa kuvassa 8 on esitetty derivatisointiliuoksen stabiiliustestin tulokset. Tuloksista voidaan nähdä, että vaste ei muutu merkittävästi edes silloin, kun derivatisointiliuos on tehty valmiiksi yli 18 tuntia ennen analyysia. Korkeammissa pitoisuuksissa vasteen trendi näyttää hieman nousevalta. Mutta koska tämän kaltainen nouseva trendi puuttuu alemmista konsentraatioista, on todennäköistä, että tämä johtuu pikemminkin pipetoinnin vaihteluista, kuin systemaattisesta analyysin muutoksesta ajan myötä.



Kuva 8. Derivatisointiliuoksen ja standardiliuosten stabiilius. Kukin viiva kuvaa yhdestä standardiliuoksesta tehtyjen näytteiden vasteen muutosta ajan kuluessa.

Tulosten perusteella derivatisointiliuoksen stabiilius on riittävä vajaan vuorokauden analyysihin samalla derivatisointiliuoksella. On kuitenkin perusteltua pipetoida sama standardinäytesarja analyysisarjan alkuun ja loppuun stabiiliuden varmistamiseksi.

6.5. Koettimien *in vitro* -saannot

Koettimien saannoissa havaittiin eroja sekä yhden että kahden millimetrin koettimien välillä että myös osittain erien välillä. Käytetyistä koettimista erityisesti kahden millimetrin koettimet olivat useasta valmistuserästä. Yhden millimetrin koettimet olivat puolestaan vain kahdesta erästä, joista noin kaksi kolmasosaa oli vanhasta, osastolla yli vuoden säilytetystä erästä, ja yksi kolmasosa tuoreesta, kesken kokeiden suorittamista saadusta koetinerästä. Koettimien saantotestien yhdistetyt tulokset on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Koettimien saantojen keskiarvot ja niiden suhteelliset keskihajonnat. Vanhoina koettimina pidettiin koettimia, jotka olivat ehtineet olla osastolla varastoituna ennen kokeiden aloittamista lokakuussa 2013. Uusiksi laskettiin kaikki koettimet, jotka saatiin tehtaalta kokeiden aikana tammikuussa 2014.

| | 1 mm koetin vanhat (n=24) | 1 mm koetin uudet (n=15) | 2 mm koetin vanhat (n=20) | 2 mm koetin uudet (n=7) |
|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Saantojen keskiarvo | 4,4 % | 6,8 % | 9,4 % | 10,6 % |
| Suhteellinen keskihajonta | 34 % | 32 % | 16 % | 17 % |

Uusien ja vanhojen 1 mm koettimien välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero ($p < 0,001$, kaksisuuntainen t-testi). Ero 2 mm koettimien erien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Huomattava ero 1 mm ja 2 mm koettimien välisissä vaihteluissa havaittiin myös – 1 mm koettimien suhteellinen keskihajonta on noin kaksinkertainen 2 mm koettimiin verrattuna.

Kaikki uudet 1 mm koettimet olivat yhdestä erästä ja kaikki vanhat myös yhdestä erästä. Vanhat 2 mm koettimien olivat kolmea eri erää ja uudet olivat yhtä erää. Eräkohtaista vertailua ei siis voida näiden tulosten perusteella tehdä, koska 1 mm koettimissa iän ja erän vaikutusta ei voida erottaa toisistaan. Vanhoissa 2 millimetrin koettimissa vertailuryhmät ovat liian pieniä mielekkääseen tilastolliseen analyysiin.

7. POHDINTA

7.1. Hermokasvutekijöiden vaikutus rottien kasvuun

Tutkimuksen tulokset, joiden mukaan GDNF rotan *striatumiin* annosteltuna aiheuttaa CDNF- ja MANF-käsittelyä merkittävästi hitaamman kasvun annosta seuranneen viikon aikana, ovat mielenkiintoisia. GDNF oli valittu kokeeseen positiiviseksi kontrolliksi, sillä sen neuronien selviytymistä ja kasvua edistävät vaikutukset ovat jo hyvin dokumentoitu (Airavaara ym. 2012). CDNF- ja MANF-käsitellyt rotat kasvoivat molemmat keskimäärin nopeammin kuin PBS-käsitellyt rotat. Näiden kasvutekijäryhmien ja PBS-ryhmän kasvun ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä, mutta tuloksista voidaan nähdä, että CDNF- ja MANF-hermokasvutekijäkäsittelyn vaikutus on selkeästi poikkeava GDNF:n vaikutuksesta.

Kasvuerojen tasoittuminen kolmeen viikkoon mennessä osoittaa, että GDNF-injektion vaikutus on tilapäinen. Myöhemmin tehtävissä rottien aivoleikkeiden histologisissa testeissä näkynee paremmin mahdolliset pitkäaikaisemmat vaikutukset aivokudokseen. Massan muutoksen mittaaminen on tähän tarkoitukseen liian epäherkkä. GDNF:n kasvunopeutta hidastava vaikutus rotilla on havaittu myös aikaisemmissa tutkimuksissa (Aoi ym. 2000). GDNF-liuos erosi kuitenkin muista kasvutekijäliuoksista sekä negatiivisesta kontrollista (PBS) myös koostumuksensa suhteen. GDNF-liuos laimennettiin valmistajan ohjeiden mukaan MilliQ-vedellä käyttövahvuuteen, kun muiden liuoksien pohjalla oli PBS-liuos, joka on isotoninen, sekä pH-puskuroitu arvoon 7,4. GDNF-laimennosohjeessa haluttu proteiinikonsentraatio saadaan vain muuttamalla MilliQ-veden määrää, joten liuoksen isotonisuus vaihtelee halutusta proteiinikonsentraatiosta riippuen. On mahdollista, että havaittu ero johtuu erilaisen koostumuksen aiheuttamasta fysiologisesta stressistä injektio kohdassa. Parkinson-potilailla tehdyissä kliinisissä tutkimuksissa GDNF-hoidon haittavaikutukseksi on mainittu ruokahalun heikkeneminen (Kordower ym. 1999). On mahdollista, että mikäli CDNF ja MANF osoittautuvat tehokkaiksi Parkinsonin taudin hoidossa, saattaa niillä tämä GDNF-hoidon haittavaikutus olla merkittävästi vähäisempiä.

Alkuperäisen tutkimussuunnitelman mukaan tarkoitus oli tutkia hermokasvutekijöiden vaikutusta GABAergiseen hermovälitykseen tyvitumakkeissa. Valitettavasti jatkuvien teknisten ongelmien vuoksi näytteet, joiden perusteella vaikutusta olisi voitu arvioida, ovat edelleen tätä kirjoitettaessa analysoimatta.

7.2. HPLC-laitteiston toiminta

Kuten aikaisemmin on kerrottu, laitteistoa on käytetty laboratoriossamme aikaisemminkin GABA:n mikrodialyysinäytteiden analyysiin (Vihavainen ym. 2008). Merkittävin ero aikaisemmin käytetyn laitteiston ja käyttämämme laitteiston välillä oli, että aikaisemmin on käytetty Gemini-kolonnia (50 X 3.0 mm, partikkelikoko 5 µm, C18, huokoskoko 110 Å, Phenomenex, USA) ja meidän kokeissamme puolestaan Kinetex-kolonnia (50 X 4,6 mm, partikkelikoko 5 µm, C18, huokoskoko 100 Å, Phenomenex, USA). Vaikka kolonnit ovat tärkeimpien ominaisuuksien suhteen lähes identtisiä, on kolonnien sisäisessä rakenteessa ja kemiassa silti mahdollisesti niin suuria eroja, että erottumisen ongelmat voivat johtua pelkästään kolonnien välisistä eroista. Ilman esisuodatinta erottuminen vaikutti olevan juuri ja juuri riittävää. Esisuodattimen lisäämisen jälkeen kolonnin erotuskyky huononi riittämättömäksi.

Kokeita suorittaessa näkyi, että viikkojen aikana piikkien symmetria heikkeni voimakkaasti. Tämän heikkenemisen syy jäi selviämättä, mutta mahdollisia syitä voivat olla kolonnin vapaita piioksidiryhmiä suojaavien tetrametyylisilyyliryhmien hajoaminen kolonnin pinnasta, mikä lisää hydrofiilisten vuorovaikutusten määrää kolonnissa, sekä epäpuhtauksien kertyminen kolonniin. Epäpuhtauksien merkitystä vastaan puhuu lisättyjen huuhtelusykliden ja orgaanisen liuottimen pidennetyn huuhteluajan vähäinen vaikutus piikkien ”häntimiseen.” Toisaalta uuden kolonnin ja esisuodattimen kanssa häntiminen tapahtui edellistä laitteistoa nopeammin, ja häntiminen korjaantui esisuodatinta vaihtamalla. Tämä puolestaan puhuu mahdollisten epäpuhtauksien merkityksen puolesta.

Käänteisfaasikolonnin tulisi kestää käyttämämme pH (4,90), sekä orgaanisen liuottimen pitoisuudet (maksimissaan 80 v/v-% asetonitriili:MilliQ-vesi). Meillä ei ollut

käytettävissämme vertailuaineistoa vaihtoehtoisten kolonnien toiminnasta ja mahdollisesta huononemisesta ajan kuluessa, joten arviot ovat puhtaasti spekulatiivisia. On kuitenkin mahdollista, että käyttämämme Kinetex-kolonne ei kestänyt käyttämäämme derivatisointiliuosta. Jokaisessa syöttösyklissä kolonniin syötettiin pieni määrä reagoimatonta derivatisointiliuosta, joka sisälsi reaktiovalmista o-ftaaldialdehydiä ja myös mm. boorihappoa. Gemini-kolonne on suunniteltu erityisesti kestämaan vaihtelevia pH-olosuhteita (Kolonnivalmistajan kotisivut, www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Gemini#, tieto haettu 3.6.2014). Kinetex-kolonnista tämänkaltaista lisätietoa ei valmistajan kotisivuilla anneta.

7.3. GABA:n erottuminen

Mikrodialyysinäytteiden GABA-analytiikka on poikkeuksellisen vaikeaa. Kirjallisuudessa on esitetty, että GABA:n o-ftaaldialdehydi-johdoksen erottaminen muista fysiologisen liuoksen yhdisteiden johdoksista on erittäin epävarmaa ja olosuhdeherkkää jopa tunnin retentioajalla isokraattista ajoa käytettäessä (Rea ym. 2005).

Kolonnin esisuodattimen lisäämisen jälkeen GABA:n erottuminen heikkeni verrattuna edellisen kolonnin erottumiseen ilman suodatinta. Vaikka GABA:n retentioaika oli käyttämillämme ajo-olosuhteilla noin viisi minuuttia, mitä voidaan pitää analyysin kannalta tavoiteltavana arvona, vaati kolonnin stabiilina pysyminen noin yhdeksän minuutin huuhtelu-stabilointisyklin joka näytteen jälkeen. GABA:n paremman erottumisen aikaansaamiseksi retentioajan pidentäminen isokraattisessa ajossa ei yksinään paranna resoluutiota, sillä resoluution paraneminen retentioajan funktiona vähenee retentioajan pidetessä, kun piikin leveneminen alkaa kompensoida piikkien erottumisen vaikutusta (Toshihiko ja Smith 1999). Koska GABA:n analyysialue kromatogrammissa on ”täynnä”, on välttämätöntä kuitenkin pidentää retentioaikaa, esimerkiksi liuotinvahvuutta vähentämällä, mutta samalla suhteellista erottumista läheisiin epäpuhtauksiin täytyy parantaa muuttamalla suhteelliseen retentioon vaikuttavia tekijöitä, kuten kolonnin lämpötilaa ja/tai ajoliuos A:n pH:ta. GABA:n retentio on voimakkaasti pH:sta riippuvainen, joten todennäköisesti pH:n säätö on

helpoin menetelmä suhteellisten retentioiden muuttamiseen (Rea ym. 2005). Pidempää ajoaikoja käytettäessä myös liuosgradienttien käyttö parantaa resoluutiota.

Menetelmät jotka kaventavat analyyttipiikkejä, kuten retention lyhentäminen ja pienipartikkelisemmän kolonnin käyttö, parantavat menetelmän resoluutiota, mutta pienipartikkelisempi kolonni nostaa laitteiston vastapainetta ja kapeammat piikit johtavat myös korkeampiin detektorin huippusignaaleihin. Koska havaitsemisalueemme on suhteellisen pieni (kts. luku 5.8.), resoluution parantaminen piikkejä kaventamalla voi johtaa edelleen pienentyneeseen määritysalueeseen.

Koska fluoresenssidetektio on erittäin herkkä, on mahdollista, että kromatogrammin lukuisat piikit ovat peräisin käyttämämme veden epäpuhtauksista. Kokeiden jälkeen on ilmennyt, että käyttämämme MilliQ-laitteisto ei ole välttämättä toiminut vaaditulla tavalla ja osa analyysialueelle tulleista piikeistä on voinut johtua veden epäpuhtauksista.

7.4. Derivatisointi

Derivatisointi toimi kokeiden aikana hyvin, mikä oli odotettavissa ottaen huomioon, että se on paljon käytetty GABA:n mikrodialyysinäytteiden analyysimenetelmä.

O-ftaaldialdehydi-derivatisaatioreaktion edellytyksiä ovat nukleoofiili (tässä työssä GABA, primaarinen amiini) sekä tioliryhmä jotka molemmat kuluvat reaktiossa 1:1 ainemääräsuhteisesti (kuva 4) (Zuman 2004). Työssä reaktioluokseen lisättiin tioliryhmän sisältävää yhdistettä, 2-merkaptetaanolia. Fysiologisessa liuoksessa on kuitenkin molekyyliä, joilla on vapaa tioliryhmä, kuten glutationi, sekä kysteiini. Myös nämä yhdisteet voivat reagoida OPA:n kanssa ja muodostaa fluoresoivan yhdisteen analysoitavan aminohapon kanssa. Koska fluoresoivan johdoksen kromoforinen osa muodostuu yksinomaan o-ftaaldialdehydistä, vaihtoehtoiset johdokset fluoresoivat ja detektoituvat samalla tavalla kuin muutkin johdokset. Reaktion toistettavuuden ja tarkkuuden kannalta on tärkeää, että analyytin reaktio tapahtuu pääosin aina saman tioliryhmän sisältävän yhdisteen kanssa. Lisäämämme 2-merkaptetaanolin konsentraatio valmiissa reaktioluoksessa oli noin 12 mM. Aivoissa on kuitenkin suuria

pitoisuuksia glutationia; solunsisäisesti jopa 12 mM (Dringen 2000). Näin ollen jos glutationia pääsee vapautumaan solulimasta mikrodialyysinesteeseen, saattaa reaktio tapahtua osin glutationin kanssa. Glutationijohdoksen retentio kolonnissa on todennäköisesti erilainen kuin 2-merkaptotoetanoli johdoksella, eikä se tulisi siten tunnistetuksi GABA:n johdokseksi.

Glutationi on varastoitunut pääasiassa solun sisään. On kuitenkin mahdollista, että jos käsittelymme vaikuttaa tioliryhmiä sisältävien pienmolekyylien määrään reaktioluoksessa, vaikuttaa se myös GABA:n analyysiin. Koska soluvälinesteen molekyylien on kuljettava mikrodialyysikoettimen membraanin läpi päästäkseen reaktioluokseen, ja tioliryhmän sisältävät molekyylit ovat pääasiassa solun sisällä, ei tästä johtuva virhe ole tässä koeasetelmassa todennäköinen. Kuitenkin on tärkeää huomata, että puhtasainepitoisuuksia analysoitaessa pätevä sääntö, jonka mukaan fluoresenssin määrä riippuu vain nukleofiilin määrästä kun tiolinluovuttajaa on nukleofiilia suurempi pitoisuus, ei pädekään biologisia seoksia analysoitaessa. Lisätyn tiolin määrän on oltava merkittävästi suurempi kuin muiden fysiologisissa nesteissä olevien tioliryhmän sisältävien molekyylien.

7.5. Havaitsemis- ja määritysrajan määrittäminen

Detektio- ja kvantifiointirajat olivat suuruusluokassa, mitä kirjallisuuden perusteella voidaan pitää tälle menetelmälle tyypillisenä (Kehr ja Ungerstedt 1988). On tärkeää huomata, että havaitsemis- ja määritysrajaa määritettäessä data saadaan vain puhtasainetta sisältävistä standardisuoraluoksista. Nämä arvot edustavat siis ihanteellista analyysia, jossa muut analyyttipiikit ovat täysin erottuneet. Tapauksessamme näytteitä ei analysoitu juuri huonon erottumisen vuoksi, joten todellisessa tilanteessa, jossa täydellistä erottumista ei välttämättä ole mahdollista saavuttaa, ovat myös havaitsemis- ja määritysrajat hieman korkeammat.

Tulosten perusteella erilainen näytteensyöttäjä ja vaihtunut kolonni esisuodattimen kanssa tai ilman ei vaikuta laitteiston havaitsemis- ja määritysrajoihin. Tämä oli odotettavissa, sillä detektorin on molemmissa laitteistoissa sama ja standardisuorat

perustuvat puhtasainepitoisuuksiin, jolloin mahdolliset erot epäpuhtauksien erottumisessa eivät häiritse. Sekä uudella että vanhalla laitteistolla piikit levenivät kokeiden jatkuessa, joten määritysyläraja ei riipu niinkään laitteistosta kuin kolonnin kunnosta.

Keskiahjontojen suhdetta tarkastellessa samoista standardeista määritetyt standardisuorat ovat samoja, joilla määritettiin derivatisointiliuoksen stabiilius. Stabiiliustestin perusteella vaste ei merkittävästi muutu 18 tunnin näytteensyöttäjäkellässä odottamisen myötä, joten näitä tuloksia voidaan käyttää hajontaraja-arvojen määrittämiseen.

7.6. Derivatisointiliuoksen stabiilius

Derivatisointiliuos vaikuttaa olevan riittävän stabiili GABA:n luotettavaan analyysiin, kun derivatisointiliuoksen pisin käyttöaika on vuorokausi valmistamisen jälkeen, liuos suljetaan kumitulpalla tiiviisti ja säilytetään kokeen ajan jäädytetyssä näytteensyöttäjässä.

Koska stabiilisuuskokeissa oli havaittavissa signaalien pieni nouseva trendi suurempien konsentraatioiden näytteissä usean tunnin ajossa, on mahdollista, että avoimissa näyteputkissa liuotin pääsee hieman haihtumaan viilennetystä näytteensyöttäjästä huolimatta. Kuitenkin tällöin hienoista nousua pitäisi näkyä samansuuruisena kaikissa konsentraatioissa, mitä ei kuitenkaan havaittu. Onkin todennäköistä, että kahden suurimman konsentraation vasteen nouseva trendi johtuu pääasiassa pipetoinnin vaihtelusta, eikä derivatisointiliuoksen tai näytteiden systemaattisesta muuttumisesta.

OPA-derivatisoitujen amiinien stabiilius kolonnissa on myös teoriassa mahdollinen ongelma. OPA-derivatisoitujen yhdisteiden stabiiliutta HPLC-ajossa on tutkittu ja on osoitettu, että nämä johdokset ovat herkästi hajoavia (Zuman 2004). Muutaman tutkitun aminohappojohdoksen puoliintumisajat kolonnissa ovat vaihdelleet 16 minuutin ja tunnin välillä. HPLC-kolonnin suuri paine, kohonnut lämpötila sekä suuri pinta-ala saattavat tarjota olosuhteet katalyyttisille prosesseille. Erityisesti primaariset alkoholit,

kuten metanoli, ovat mahdollinen hajoamista edesauttava tekijä, sillä niiden tiedetään reagoivan OPA:n kanssa muodostaen asetaali- ja hemiasetaalijohdoksia (Zuman 2004). Nämä virhelähteet asettavat lisää vaatimuksia laitteiston stabiiliudelle ja rajoittavat käyttökelpoista HPLC-ajoaika. Mahdolliset muutokset kolonnin lämpötilassa sekä paineen vaihtelut voivat muuttaa johdoksen hajoamisnopeutta, jolloin konsentraatiosta riippuvat vasteet muuttuvat kesken ajon haitaten pitoisuuden luotettavaa analyysia.

Laitteiston toiminta kokeiden aikana oli kuitenkin hyvin toistettavaa. GABA:n pitoisuus määritetään suhteessa standardiliuoksen vasteeseen. Mahdollinen analysoitavan GABA:n OPA-johdoksen hajoaminen tulee otetuksi huomioon standardiliuoksen vastaavan hajoamisen myötä, jos ajo-olosuhteet pysyvät vakioina, eivätkä biologisen matriisin yhdisteet toimi ylimääräisenä katalyyttina, mikä on epätodennäköistä. Voidaankin todeta, että on epätodennäköistä, että nämä edellä mainitut mahdolliset ongelmat olisivat vaikuttaneet tuloksiimme.

7.7. Koettimien *in vitro* -saantomääritys

Koettimien saannoissa oli eroja sekä 1 millimetrin ja 2 millimetrin koettimien välillä että 1 millimetrin koettimien vanhan ja uuden erän välillä. Koska aineiden diffuusio mikrodialyysikoettimessa tapahtuu membraanin läpi ja membraanin pinta-ala on verrannollinen membraanin pituuteen, on odotettavissa, että 2 millimetrin koettimen saanto on noin kaksinkertainen 1 millimetrin koettimen saantoon verrattuna. Tämä myös havaittiin. Erien välinen vaihtelu on kuitenkin vaikeammin selitettävissä. Käyttämämme BASi BR-1 - koettimien membraanit ovat polyakrylonitriiliä ja ne on tehtäällä kyllästetty glyserolilla, jonka tehtävä on pitää koettimen membraani pehmeänä, sekä pitää membraanin huokoiset rakenteet auki huuhteluun asti. (tiedot: BR Brain Probes User's guide, Julkaistu 1999 ja päivitetty helmikuussa 2006, saatavilla valmistajan kotisivuilla: www.basinc.com/mans/brbp.pdf). Pitkässä säilytyksessä on mahdollista, että membraani kovettuu ja glyseroli osittain haihtuu, mikä voi johtaa huokosten huonompaan toimintaan.

Koettimien saannon määrittäminen *in vitro* poikkeaa mikrodialyysinäytteiden analyysistä muutamalla tavalla. Ensinnäkin ongelmaa HPLC-laitteiston erotuskyvyn ja analyttisen alueen pienuuden kanssa ei ole, koska testiliuoksen vahvuus on mahdollista valita analyysilaitteen toiminnan mukaan, ja näytteet ovat puhtasäinänäytteitä. Nämä tekijät tekevät analyysistä huomattavasti biologisten näytteiden analyysia helpompaa. Toisena erona on se, että näytteiden vasteita ei saantoja määritettäessä normalisoida mihinkään perustasoon. Tämä edellyttää laadukkaita ja toistettavasti valmistettuja standardiliuoksia. Vaikka standardiliuokset valmistettiin huolella, on tärkeä huomata, että tämä virhelähde koettimien saantomäärityksissä on olemassa verrattuna mikrodialyysinäytteiden analyysiin.

7.8. Mikrodialyysi menetelmänä

Mikrodialyysi on käyttökelpoinen menetelmä neurotutkimukseen, sillä menetelmä antaa mahdollisuuden määrittää hermovälittäjäainepitoisuuksia suoraan elävästä kudoksesta erilaisten altisteiden annon jälkeen. Verrattuna *post mortem* -määrityksiin mikrodialyysin etuina ovat mahdollisuus käyttää elävää kudosta ja suhteellisen nopea ajallinen resoluutio, mikä antaa tietoa kudoksen kemiallisen ympäristön toiminnallisista muutoksista.

Aivojen tumakkeiden toiminta on yleensä spatiaalisesti tarkasti säädeltyä ja tumakkeiden eri osien suhteellisilla aktiivisuuksilla on suuri merkitys siihen, mikä on tumakkeen nettovaikutus (Percheron ym. 1984). Mikrodialyysimenetelmä ei koskaan saa otetta tästä tärkeästä osasta hermovälitystä, vaan antaa pikemminkin suhteellisen pitkän ajan keskiarvon koko tumakkeen alueelta ja mahdollisesti myös viereisiltä alueilta.

Käyttämämme mikrodialyysimenetelmä ei anna suoraan määritettävän aineen pitoisuutta kudoksessa. Yksittäisten mikrodialyysikokeiden tulosten yleistettävyyden vuoksi on tarkoituksen mukaista suhteuttaa stimulaatiovasteet GABA:n ekstrasellulaariseen perustasoon. Koska tulosten vertailu vaatii luotettavan perustason määrittämisen, on analyysimenetelmän pystyttävä määrittämään luotettavasti sekä

korkeimmat pitoisuudet että alhaisimmat pitoisuudet. Vaatimus perustason luotettavasta määrittämisestä on haastava, koska GABA:n pienen, alle 30 nanomolaaristen pitoisuuksien määrittäminen vaatii hyvää piikkien erotuskykyä, ja on silloinkin lähellä analyysimenetelmämme määrittäsalueen alarajaa.

Koettimien vaihtelevilla saannoilla on vaikutusta myös muuhun kuin vain vaihteleviin GABA:n pitoisuuksiin dialyysineesteessä, sillä myös altisteet annettiin kokeissa koettimen membraanin läpi osana perfuusioliuosta. Käyttämämme nipekoottihappopitoisuus, 100 μM , olisi riittävä merkittävästi estämään GABA:n eliminaation kannalta tärkeimmän transportterin, GAT-1:n, toiminnan (Ruiz ym. 1994). Mutta koska nipekoottihappo annosteltiin koettimen läpi, vaikuttaa koettimien läpäisevyys GABA:n määrittämisen lisäksi myös altisteen vaikutuksen suuruuteen.

Nipekoottihapon kykyä läpäistä koettimen membraani ei määritetty kokeellisesti. Jos kuitenkin oletetaan, että sen läpäisevyys on GABA:n kanssa samaa suuruusluokkaa, eli noin 5 – 15 %, ovi nipekoottihapon pitoisuus kudoksessa korkeimmillaankin vain noin 15 μM . Kirjallisuudessa nipekoottihapon IC50 (Inhibitory concentration) -arvot vaihtelevat, mutta esimerkiksi hiiren GAT-1:n eston IC50-arvoiksi (eston puolimaksimipitoisuus) on määritetty 24 μM ja 7,1 μM (Ruiz ym. 1994; Madsen ym. 2007). Kudoksen koettimesta riippuva nipekoottihappopitoisuus todennäköisesti siis vaihtelee IC50-arvoa vastaavan pitoisuuden suuruusluokassa. Tästä seuraa, että sen lisäksi, että vaihtelevat koettimien saannot vaikuttavat soluvälitilan vapaasta GABA:sta kerättyyn osuuteen, ne myös vaikuttavat nipekoottihappo-Ringerin ja K^+ -nipekoottihappo-Ringerin aiheuttamien stimulaatiovasteiden suuruuteen. Tämä lisää tulosten hajontaa ja vaikeuttaa niiden tulkintaa.

Vaikka mikrodialyysia on käytetty useiden hermovälittäjäaineiden kudospitoisuuksien määrittämiseen, on näiden hermovälittäjäaineiden fysiologisessa toiminnassa suuria eroja, jotka vaikuttavat tulosten tulkittavuuteen. GABA:n mikrodialyysitulosten tulkintaa voidaan pitää erityisen haasteellisena, sillä esimerkiksi ekstrasellulaarisen GABA:n alkuperää hermosoluperäisenä välittäjäaineen on kyseenalaistettu (Timmerman ja Westerink 1997). Nykyään tiedetään, että muutkin kuin hermosolut

osallistuvat merkittävästi aivojen hermovälitykseen, ja gliasolut osallistuvat merkittävästi GABA:n ekstrasellulaarisen tason säätelyyn. Gliasoluista esimerkiksi astroosyyttien tiedetään ilmentävän GABA-transporttereiden lisäksi myös GABA-reseptoreita (Velez-Fort ym. 2012).

Gliasolujen on arveltu toimivan GABA:a soluvälitilasta poistavien tehtäviensä lisäksi myös joissain tapauksissa GABA:a soluvälitilaan vapauttavina, mahdollisesti GAT-1 – kuljettimen käänteisen toiminnan seurauksena (Angulo ym. 2008). Tämänkaltaisen ei-neuronaalinen GABA:n vapautuminen sopii erityisen hyvin havaittavaksi mikrodialyysimenetelmin, koska mikrodialyysikoetin ei kerää näytettä synapsiraosta, vaan laajemmalle soluvälitilaan levinnyttä GABA:a. Tuloksia tulkitessa onkin tärkeä muistaa, että GABA ei yllämainituista syistä johtuen välttämättä ole peräisin aluetta hermottavien neuronien eksosytoottisesta hermovälityksestä. Tämän toteamuksen puolesta puhuvat kokeet, joissa on osoitettu, että GABA:n vapautuminen soluvälitilaan ei ole kokonaan estettävissä Na^+ -kanavasalpaaja tetrodotoksiinilla tai kalsiumin poistolla (Timmerman ja Westerink 1997).

8. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Koska onnistuneita analyyseja ei ole vielä tätä kirjoitettaessa tehty, ei työ onnistunut antamaan vastausta tutkimuksen tärkeimpään kysymykseen, eli vaikuttavatko *striatumiin* annostellut hermokasvutekijät tyvitumakkeiden GABAergiseen hermovälitykseen. Näytteet ovat kuitenkin tätä kirjoitettaessa edelleen olemassa, joten vastaus kysymykseen saadaan toivottavasti tulevaisuudessa. Parkinsonin taudissa tyvitumakkeissa tapahtuu GABAergisen järjestelmän muutoksia, ja näitä muutoksia tapahtuu kaikilla tasoilla. Tutkimusten perusteella GABAerginen hermovälitys voimistuu useissa tyvitumakkeissa, ja muutoksia tapahtuu sekä GABA-pitoisuuksien nousun että reseptorimuutosten myötä. Kokonaiskuva näistä muutoksista on kuitenkin vielä puutteellinen. Tämän työn kaltaista tutkimusta tarvitaan vielä jatkossa, jotta tietoa GABAergisen järjestelmiin liittyvistä patologisista muutoksista voidaan käyttää hyväksi lääkehoitoja suunniteltaessa. Näiden tutkimusten myötä myös hermokasvutekijöitä

opitaan käyttämään mahdollisimman tehokkaalla tavalla Parkinsonin taudin ja muiden rappeuttavien hermosairauksien hoidossa.

Tämän työn merkittävin saavutus oli analyysilaitteiston kriittisten parametrien määrittäminen. Näitä tuloksia voidaan käyttää hyväksi tulevien tutkimusten suunnittelussa. Tulostemme perusteella laitteiston toimintakyky on riittävä mikrodialyysinäytteiden GABA-pitoisuuksien määrittämiseen. Määritysalue on kuitenkin analyysilaitteistoksi kapea, noin 0,3 pmol – 4 pmol 15 µl näytteestä analysoituna, mikä vaatii erityisen huolellista tutkimuksen suunnittelua, kun analyysin vaatimuksena on sekä matalimpien että korkeimpien pitoisuuksien luotettava määrittäminen.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Ahtila S, Kaakkola S, Gordin A, Korpela K, Heinavaara S, Karlsson M, Wikberg T, Tuomainen P, Mannisto PT: Effect of entacapone, a COMT inhibitor, on the pharmacokinetics and metabolism of levodopa after administration of controlled-release levodopa-carbidopa in volunteers. *Clin Neuropharmacol* 18: 46-57, 1995

Airavaara M, Voutilainen MH, Wang Y, Hoffer B: Neurorestoration. *Parkinsonism Relat Disord* 18 Suppl 1: S143-6, 2012

Albin RL, Young AB, Penney JB: The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12: 366-375, 1989

Alexander GE, Crutcher MD: Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13: 266-271, 1990

Angulo MC, Le Meur K, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E: GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog Neurobiol* 86: 297-303, 2008

Aoi M, Date I, Tomita S, Ohmoto T: The effect of intrastriatal single injection of GDNF on the nigrostriatal dopaminergic system in hemiparkinsonian rats: behavioral and histological studies using two different dosages. *Neurosci Res* 36: 319-325, 2000

Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes Bastos M, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F: Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases-A mechanistic approach. *Toxicol Lett* 2014

Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S: Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol* 2012: 845618, 2012

Bove J, Perier C: Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 211: 51-76, 2012

Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E: Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197-211, 2003

BR Brain Probes User's guide. BASi:n käyttöohjekirja BR-tyypin mikrodiaalyysikoettimille. Julkaistu 1999 ja päivitetty helmikuussa 2006. (viitattu kesäkuussa 2014). Saatavilla valmistajan kotisivuilla: www.basinc.com/mans/brbp.pdf

Brichta L, Greengard P, Flajolet M: Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. *Trends Neurosci* 36: 543-554, 2013

Brown P, Oliviero A, Mazzone P, Insola A, Tonali P, Di Lazzaro V: Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *J Neurosci* 21: 1033-1038, 2001

Buchanan RJ, Darrow DP, Meier KT, Robinson J, Schiehser DM, Glahn DC, Nadasdy Z: Changes in GABA and glutamate concentrations during memory tasks in patients with Parkinson's disease undergoing DBS surgery. *Front Hum Neurosci* 8: 81, 2014

Buck K, Voehringer P, Ferger B: Rapid analysis of GABA and glutamate in microdialysis samples using high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Neurosci Methods* 182: 78-84, 2009

Calon F, Morissette M, Rajput AH, Hornykiewicz O, Bedard PJ, Di Paolo T: Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the postmortem brains of parkinsonians with levodopa-induced motor complications. *Mov Disord* 18: 241-253, 2003

Chen R, Zhang M, Park S, Gnegy ME: C57BL/6J mice show greater amphetamine-induced locomotor activation and dopamine efflux in the striatum than 129S2/SvHsd mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 87: 158-163, 2007

Chen XY, Xue Y, Wang H, Zhu SH, Hao XM, Chen L: Modulation of firing activity by endogenous GABA receptors in the globus pallidus of MPTP-treated parkinsonian mice. *Neurosci Bull* 29: 701-707, 2013

Choi W, Kruse SE, Palmiter RD, Xia Z: Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. *PNAS* 105: 15136-15141, 2008

Conti F, Melone M, Fattorini G, Bragina L, Ciappelloni S: A Role for GAT-1 in Presynaptic GABA Homeostasis? *Front Cell Neurosci* 5: 2, 2011

Dauer W, Przedborski S: Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39: 889-909, 2003

Dringen R: Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62: 649-671, 2000

Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF: Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J* 31: 3038-3062, 2012

Galeffi F, Bianchi L, Bolam JP, Della Corte L: The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *Eur J Neurosci* 18: 856-868, 2003

Galvan A, Hu X, Smith Y, Wichmann T: Localization and pharmacological modulation of GABA-B receptors in the globus pallidus of parkinsonian monkeys. *Exp Neurol* 229: 429-439, 2011

Galvan A, Hu X, Smith Y, Wichmann T: Localization and function of GABA transporters in the globus pallidus of parkinsonian monkeys. *Exp Neurol* 223: 505-515, 2010

Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P: Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 9: 589-595, 2003

Groger A, Kolb R, Schafer R, Klose U: Dopamine reduction in the substantia nigra of Parkinson's disease patients confirmed by in vivo magnetic resonance spectroscopic imaging. *PLoS One* 9: e84081, 2014

Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay-Sim A, Fleischmann J, Silburn PA, Johnston AN, Mellick GD, Herting B, Reichmann H, Hummel T: Prevalence of smell loss in Parkinson's disease--a multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord* 15: 490-494, 2009

Hardy J: Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron* 68: 201-206, 2010

Hellman M, Arumae U, Yu LY, Lindholm P, Peranen J, Saarma M, Permi P: Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) has a unique mechanism to rescue apoptotic neurons. *J Biol Chem* 286: 2675-2680, 2011

Hörtnagl H, Tasan RO, Wieselthaler A, Kirchmair E, Sieghart W, Sperk G: Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience* 236: 345-372, 2013

Iversen LL, Iversen SD, Bloom FE, Roth RH: *Amino Acid Neurotransmitters*. Kirjassa: *Introduction to Neuropharmacology*, ss. 85-127, 1. painos. Toim. Iversen LL, Oxford University Press, Yhdysvallat 2009

Katz J, Nielsen KM, Soghomonian JJ: Comparative effects of acute or chronic administration of levodopa to 6-hydroxydopamine-lesioned rats on the expression of glutamic acid decarboxylase in the neostriatum and GABAA receptors subunits in the substantia nigra, pars reticulata. *Neuroscience* 132: 833-842, 2005

Kehr J, Ungerstedt U: Fast HPLC Estimation of γ -Aminobutyric Acid in Microdialysis Perfusates: Effect of Nipecotic and 3-Mercaptopropionic Acids. *J Neurochem* 51: 1308-1310, 1988

Kela ja Fimea: 2012 Suomen lääketilasto. Helsinki 2013 (viitattu 7.8.2014). Saatavilla Internetissä: http://www.fimea.fi/download/24954_SLT_2012_net.pdf

Kish SJ, Rajput A, Gilbert J, Rozdilsky B, Chang LJ, Shannak K, Hornykiewicz O: Elevated gamma-aminobutyric acid level in striatal but not extrastriatal brain regions in Parkinson's disease: correlation with striatal dopamine loss. *Ann Neurol* 20: 26-31, 1986

Kopin IJ: Features of the dopaminergic neurotoxin MPTP. *Ann N Y Acad Sci* 648: 96-104, 1992

Kordower JH, Palfi S, Chen E, Ma SY, Sendera T, Cochran EJ, Mufson EJ, Penn R, Goetz CG, Comella CD: Clinicopathological findings following intraventricular glial-

derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 46: 419-424, 1999

Kurth MC, Adler CH: COMT inhibition: a new treatment strategy for Parkinson's disease. *Neurology* 50: S3-14, 1998

Langston WJ: MPTP and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 8: 79-83, 1985

Levesque JC, Parent A: GABAergic interneurons in human subthalamic nucleus. *Mov Disord* 20: 574-584, 2005

Levy R, Herrero MT, Ruberg M, Villares J, Faucheux B, Guridi J, Guillen J, Luquin MR, Javoy-Agid F, Obeso JA: Effects of nigrostriatal denervation and L-dopa therapy on the GABAergic neurons in the striatum in MPTP-treated monkeys and Parkinson's disease: an in situ hybridization study of GAD67 mRNA. *Eur J Neurosci* 7: 1199-1209, 1995

LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, Kostyk SK, Thomas K, Sarkar A, Siddiqui MS, Tatter SB, Schwalb JM, Poston KL, Henderson JM, Kurlan RM, Richard IH, Van Meter L, Sapan CV, Doring MJ, Kaplitt MG, Feigin A: AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol* 10: 309-319, 2011

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F: GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260: 1130-1132, 1993

Lindholm P, Saarma M: Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol* 70: 360-371, 2010

Lindholm P, Voutilainen MH, Lauren J, Peranen J, Leppanen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M: Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 448: 73-77, 2007

Luo J, Kaplitt MG, Fitzsimons HL, Zuzga DS, Liu Y, Oshinsky ML, Doring MJ: Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science* 298: 425-429, 2002

Madsen K, White HS, Clausen RP, Frølund B, Larsson OM, Krogsgaard-Larsen P, Schousboe A: 14. Function and Pharmacological Aspects of GABA transporters. Kirjassa: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology - Neural Membranes and Transporters*, ss. 285-303, 3. painos. Toim. Lajtha A and Maarten REA, Springer, Yhdysvallat 2007

McGeer PLMD, McGeer EG, Wada JAMD: Glutamic acid decarboxylase in Parkinson's disease and epilepsy. *Neurology* 21: 1000-1007, 1971

McGeer P, McGeer EG, Fibiger HC: Glutamic-acid decarboxylase and choline acetylase in Huntington's chorea and Parkinson's disease. *The Lancet* 302: 623-624, 1973

Muller ML, Bohnen NI: Cholinergic dysfunction in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13: 377-013-0377-9, 2013

Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M, Simon-Sanchez J, Schulte C, Lesage S, Sveinbjornsdottir S, Stefansson K, Martinez M, Hardy J, Heutink P, Brice A, Gasser T, Singleton AB, Wood NW: Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 377: 641, 2011

Nambu A: A new approach to understand the pathophysiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 252 Suppl 4: IV1-IV4, 2005

Nambu A, Tachibana Y: Mechanism of parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia: some considerations based on our recent work. *Front Syst Neurosci* 8: 74, 2014

Nambu A, Tokuno H, Takada M: Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res* 43: 111-117, 2002

Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C: Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* 31: 763-780, 2010

Paxinos G, Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego 1998

Peck P: Amgen decision to halt gdnf clinical trials and withdraw the drug triggers protest from researchers and patients. *Neurol Today* 5: 24, 2005

Percheron G, Yelnik J, Francois C: A Golgi analysis of the primate globus pallidus. III. Spatial organization of the striato-pallidal complex. *J Comp Neurol* 227: 214-227, 1984

Phenomenex-kolonnivalmistajan tuote-esittely Gemini-kolonnille (viitattu 3.6.2014). Saatavissa Internetissä: www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Gemini#

Piepponen TP, Skujins A: Rapid and sensitive step gradient assays of glutamate, glycine, taurine and gamma-aminobutyric acid by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection with o-phthalaldehyde-mercaptoethanol derivatization with an emphasis on microdialysis samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 757: 277-283, 2001

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G: GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101: 815-850, 2000

Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC: Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274: 1197-1199, 1996

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL: Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047, 1997

Rea K, Cremers TI, Westerink BH: HPLC conditions are critical for the detection of GABA by microdialysis. *J Neurochem* 94: 672-679, 2005

Renko J: Hermokasvutekijöiden rakenne, vaikutusmekanismit ja kulkeutuminen aivoissa. Uusien hermokasvutekijöiden CDNF:n ja MANF:n vaikutukset rotan aivojen neurotransmission mikrodialyysimenetelmällä tutkittuna. Pro Gradu. Helsinki 2012

Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, Miller GW: Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci* 88: 193-201, 2005

Robertson RG, Graham WC, Sambrook MA, Crossman AR: Further investigations into the pathophysiology of MPTP-induced parkinsonism in the primate: an intracerebral microdialysis study of gamma-aminobutyric acid in the lateral segment of the globus pallidus. *Brain Res* 563: 278-280, 1991

Ruiz M, Egal H, Sarthy V, Qian X, Sarkar HK: Cloning, expression, and localization of a mouse retinal gamma-aminobutyric acid transporter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 4039-4048, 1994

Schapira AH: Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 66: S10-23, 2006

Schober A: Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318: 215-224, 2004

Shackman HM, Shou M, Cellar NA, Watson CJ, Kennedy RT: Microdialysis coupled on-line to capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometry for monitoring acetylcholine in vivo. *J Neurosci Methods* 159: 86-92, 2007

Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT: Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23: 10756-10764, 2003

Simmons MA: Pharmacology - An Illustrated Review. 1. painos. painos. Thieme, Yhdysvallat 2011

Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR: Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology* 37: 213-246, 2012

Soghomonian JJ, Laprade N: Glutamate decarboxylase (GAD67 and GAD65) gene expression is increased in a subpopulation of neurons in the putamen of Parkinsonian monkeys. *Synapse* 27: 122-132, 1997

Thobois S, Delamarre-Damier F, Derkinderen P: Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. *Clin Neurol Neurosurg* 107: 269-281, 2005

Timmerman W, Westerink BH: Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* 27: 242-261, 1997

Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L: Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 373: 335-339, 1995

Toshihiko H, Smith R: *HPLC : A Practical Guide*. 6. painos. painos. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Iso-Britannia 1999

Tritsch NX: Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490: 262, 2012

Turner RS: *Basal Ganglia and The Regulation of Movement*. Kirjassa: eLS, Anonymous John Wiley & Sons, Ltd, 2001

Utter AA, Basso MA: The basal ganglia: an overview of circuits and function. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 333-342, 2008

Velez-Fort M, Audinat E, Angulo MC: Central role of GABA in neuron-glia interactions. *Neuroscientist* 18: 237-250, 2012

Vihavainen T, Relander TR, Leiviska R, Airavaara M, Tuominen RK, Ahtee L, Piepponen TP: Chronic nicotine modifies the effects of morphine on extracellular striatal dopamine and ventral tegmental GABA. *J Neurochem* 107: 844-854, 2008

Voutilainen MH, Back S, Peranen J, Lindholm P, Raasmaja A, Mannisto PT, Saarma M, Tuominen RK: Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 228: 99-108, 2011

Voutilainen MH, Back S, Porsti E, Toppinen L, Lindgren L, Lindholm P, Peranen J, Saarma M, Tuominen RK: Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 29: 9651-9659, 2009

Wichmann T, DeLong MR, Guridi J, Obeso JA: Milestones in research on the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26: 1032-1041, 2011

Windels F, Carcenac C, Poupard A, Savasta M: Pallidal origin of GABA release within the substantia nigra pars reticulata during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25: 5079-5086, 2005

Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J: Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 26 Suppl 1: S1-58, 2011

Wolters EC: Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3: S6-12, 2009

Zuman P: Reactions of orthophthalaldehyde with nucleophiles. *Chem Rev* 104: 3217-3238, 2004