

Ruskean rasvan aktiivisuuden mittausmenetelmät

Janni Ollikainen
Lääkekehityksen kemia
Kemian laitos
Turun Yliopisto

06.08.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Lääkekehityksen kemia

Tekijä: Janni Ollikainen

Otsikko: Ruskean rasvan aktiivisuuden mittaamenetelmät

Ohjaajat: Heli Jokela, Pasi Virta

Sivumäärä: 50 sivua

Päivämäärä: 6.8.2024

Ruskea rasva on lämpöä tuottavaa ja energiaa kuluttavaa rasvakudosta, joka on potentiaalinen tutkimuskohde ylipainon ehkäisemisessä ja hoidossa. Ruskean rasvakudoksen aktivoituessa esimerkiksi kylmäältistuksessa, sympaattisten hermojen erittämä noradrenaliini sitoutuu rasvasolujen pinnalla oleviin β 3-adrenergisiin reseptoreihin. Noradrenaliinin sitoutuminen β 3-adrenergisiin reseptoreihin aiheuttaa solun sisäisten reaktioiden ketjun, joka aktivoi ruskean rasvakudoksen lämmöntuoton. Kaikissa kudoksissa, ruskea rasva mukaan lukien, on kokoelma eri alkuperää olevia makrofageja. Näillä kudosspesifeillä valkosoluilla on tärkeä rooli elimistön puolustusjärjestelmän lisäksi esimerkiksi kudosten kehityksessä ja toiminnassa. Ruskeassa rasvakudoksessa makrofagien on osoitettu säätelevän tai toimivan viestinviejinä sympaattisten hermojen ja rasvasolujen välillä.

Alkiokaudella kehittyneiden makrofagien puute voi aiheuttaa poikkeuksia kudosten kehityksessä ja toiminnassa. Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli tutkia, miten alkiokaudella kehittyneiden makrofagien puute vaikuttaa ruskean rasvan toimintaan ja optimoida ruskean rasvan aktiivisuuden mittaamenetelmiä vastasyntyneillä hiiren poikasilla. Ruskean rasvan immunologiaa ja immuunisolujen merkitystä sen kehityksen ja toiminnan kannalta ei ole vielä tutkittu tarpeeksi. Lapsuuden ja aikuisiän lihavuuden ehkäisemiseksi on tärkeää selvittää ruskean rasvakudoksen kehityksen ja kasvuvaiheen säätelytekijät.

Tutkielman tavoitteina oli kehittää kvantitatiivinen MRM (*engl.* multiple reaction monitoring) -menetelmä noradrenaliinin konsentraation määrittämiseksi ruskeasta rasvakudoksesta, määrittää kehitetyllä menetelmällä noradrenaliinin konsentraatio eri hiirimalleilta eri ikäpisteissä ja optimoida β 3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektioprotokolla.

Noradrenaliinin konsentraatioissa makrofagipuutteisen ja tavallisen hiiren välillä havaittiin noradrenaliini pitoisuuden alenema, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkittävä. Alkiokaudella kehittyneitä makrofageja ei pystytty täysin poistamaan kudoksesta. Jäljelle jäävät makrofagit todennäköisesti hoitavat tehtävänsä ruskeassa rasvakudoksessa, joka selittää sen, ettei noradrenaliinin konsentraatioissa havaita merkittäviä eroja. β 3-adrenergisten reseptorien agonistin injektioprotokollan optimointi jatkuu edelleen. Haasteina ovat agonistin mahdollinen vaikutus virtsarakossa sijaitseviin reseptoreihin tai verensokerin nopeaan laskuun, jolloin hiiri virtsaa runsaasti eikä odotettua lämpötilan nousua havaita ruskeassa rasvakudoksessa.

Avainsanat: ruskea rasvakudos, noradrenaliini, makrofagit, β 3-adrenergisten reseptorien agonisti

Sisällysluettelo

Lyhenteet	0
1 Johdanto	1
1.1 Ruskea rasva	1
1.1.1 Ruskean rasvan kehitys	3
1.1.2 Ruskean rasvan toiminta	4
1.1.3 Löytyykö ruskeasta rasvasta ratkaisu lihavuuden hoitoon?	6
1.2 Makrofagit	7
1.2.1 Makrofagien kehittyminen	8
1.2.2 Kudoskohtaiset makrofagit	9
1.2.3 Makrofagit ruskeassa rasvassa	10
1.3 β3-adrenergisten reseptorien agonistit	11
1.3.1 CL316,243	12
1.3.2 Mirabegron	13
1.3.3 Muut	13
1.4 Tutkimuksen tavoitteet	14
2 Materiaalit ja menetelmät	15
2.1 Hiiret	15
2.2 Noradrenaliinin konsentraation mittaaminen ruskeasta rasvasta	16
2.2.1 Käytetyt reagenssit	17
2.2.2 Laitteisto ja datan analysointi	17
2.2.3 Näytteiden käsittely	18
2.3 Infrapunavalokuvat	18
2.4 Makrofagien poistaminen kudoksesta αCSF1-vasta-ainekäsittelyllä syntymän jälkeen	19
2.4.1 α CSF1-vasta-ainekäsittely	19
2.4.2 Virtaussytometria	19
2.4.3 Kudosten keräys ja käsittely virtaussytometriaa varten	20
2.4.4 Solujen vasta-ainevärijäys	21
2.4.5 Käytetyt reagenssit	21
2.5 β3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektio	23
3 Tulokset	24
3.1 Noradrenaliinin konsentraation mittaaminen ruskeasta rasvasta	24

3.1.1	MRM-menetelmän standardisuoran optimointi ja ionipaireagenssin tarpeellisuuden tutkiminen	24
3.1.2	Alkion maksassa kehittyvien makrofagien puutteen vaikutus noradrenaliinin konsentraatioon ruskeassa rasvakudoksessa	25
3.2	Makrofagien poistaminen ruskeasta rasvasta syntymän jälkeen αCSF1-vastainekäsittelyllä	28
3.2.1	Virtaussytometrinen analyysi	28
3.2.2	Makrofagien poistamisen vaikutus ruskean rasvakudoksen toimintaan	30
3.3	β3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektiot	32
4	Tulosten tarkastelu	41
4.1	Hiirten käyttö mallieläimenä	41
4.2	Noradrenaliinin konsentraation mittaus ruskeasta rasvasta	41
4.3	β 3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektiot	42
4.4	Yhteenveto	43
5	Liitteet	45
5.1	Liuokset	45
6	Viitteet	46



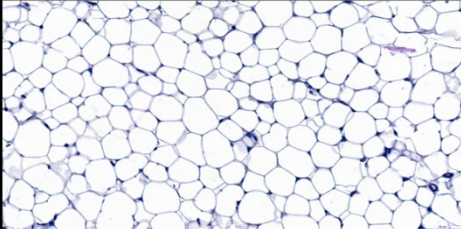
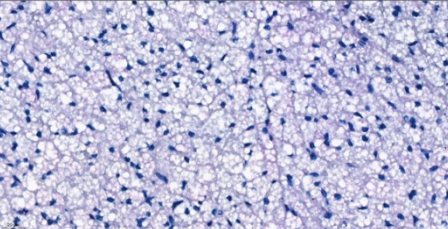
Lyhenteet

ATP	adenosiinitrifosfaatti
BMP7	bone morphogenic protein 7
CAMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	syklinen adenosiinimonofosfaatti
CSF1/αCSF1	colony stimulating factor
EBF2	early b-cell factor 2
ESI	sähkösumutus-ionisaatio
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HSA	1-heptaanisulfonihapon natriumsuolan monohydraatti
IL-4	interleukiini-4
LC-MS	nestekromatografia massaspektrometria
IgG	immunoglobuliini G
MRM	usean reaktion seuraaminen, <i>engl.</i> multiple reaction monitoring
Myf5	myogenic factor 5
MyoD	myogenic differentiation 1
Plvap	plasmalemma vesicle associated protein
PGC1α	peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PKA	proteiinikinaasi A
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRDM16	histone-lysine N-methyltransferase PRDDM16
SEMA6A	Semaphorin-6A
TyrH	tyrosiinihydroksylaasientsyymi
UCP1	irtikytkijäproteiini

1 Johdanto

1.1 Ruskea rasva

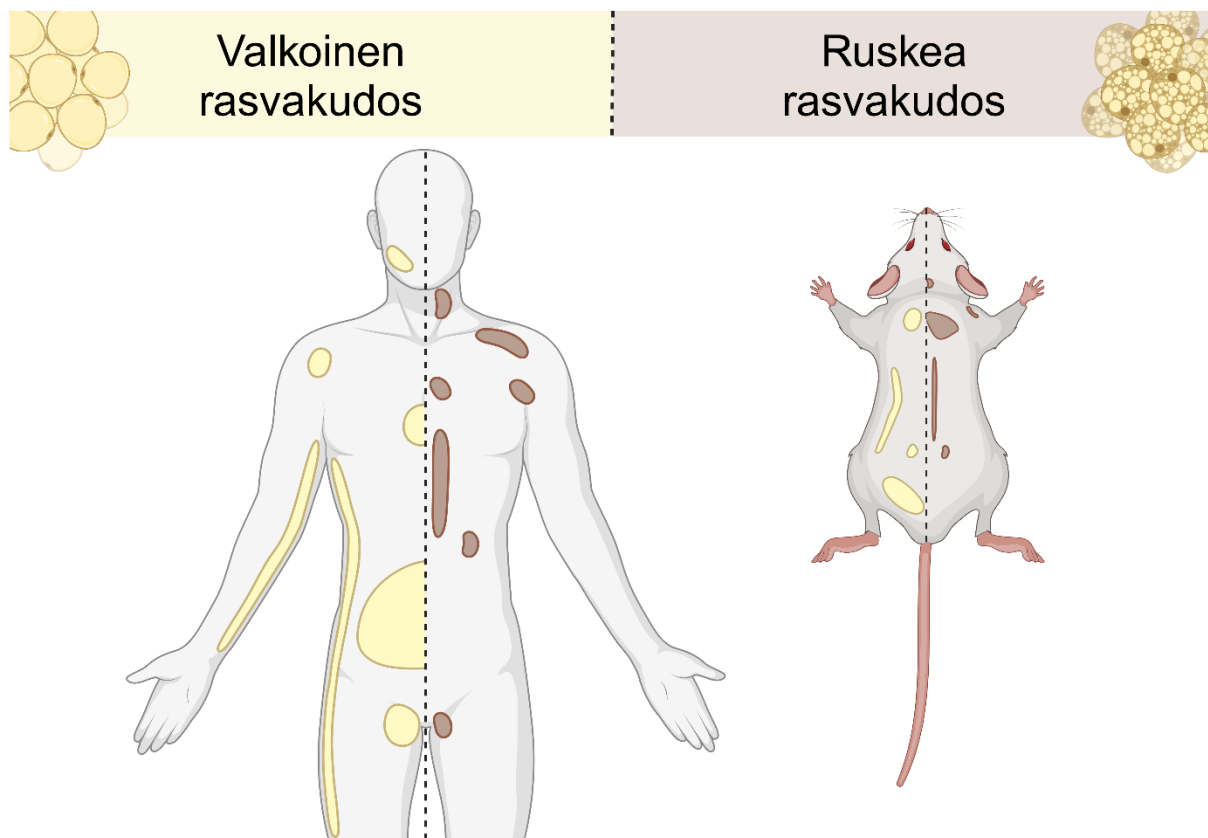
Ruskea rasva on energiaa kuluttavaa ja lämpöä tuottavaa rasvakudosta, joka on potentiaalinen tekijä tyypin 2 diabeteksen ja ylipainon ehkäisemisessä ja hoidossa. Ruskea rasvakudos on rakenteeltaan ja toiminnaltaan erilainen kuin valkoinen rasvakudos. Ruskean ja valkoisen rasvakudoksen eroja on havainnollistettu kuvassa 1. Ruskeat rasvasolut koostuvat useista pienistä lipidipisaroista ja mitokondrioista, jotka aiheuttavat ruskealle rasvakudokselle ominaisen ruskeahkon värin¹. Valkoisissa rasvasoluissa on yksittäisiä isoja lipidipisaroita, joihin triglyseridit varastoidaan. Termogeneesi eli lämmöntuotto tapahtuu ruskean rasvan mitokondrioissa UCP1 (irtikytkijä) -proteiinin avulla. Ruskeassa rasvakudoksessa on tiiviisti verisuonia ja hermoja. Valkoisten rasvasolujen mitokondriot eivät ilmennä UCP1:tä. Ruskean rasvakudoksen tiheä verisuoniverkosto on eduksi esimerkiksi lämmön kuljettamisessa koko kehoon. Ruskean rasvan sympaattiset hermot erittävät noradrenaliinia, jolla on tärkeä rooli lämmöntuoton aktivoitumisessa.

	 Valkoinen rasvakudos	Ruskea rasvakudos 
Tehtävä	Varastoida energiaa	Kuluttaa energiaa, termogeneesi
Solujen morfologia	Lipidipisarot isoja unilokulaarisia, vähän mitokondrioita	Lipidipisarot pieniä multilokulaarisia, runsaasti mitokondrioita
Kudoksen rakenne	Joitain verisuonia ja hermoja	Tiiviisti verisuonia ja hermoja
UCP1-ilmentäminen	Heikko	Merkittävä
5 viikkoa vanhan 6N hiiren kudoksesta tehty PAS-värjäys		

Kuva 1. Valkoisen ja ruskean rasvakudoksen erot.

Hiirillä ruskeaa rasvaa on eniten lapaluiden välissä (interskapulaarinen ruskea rasva). Interskapulaarista ruskeaa rasvaa käytetään usein tutkimuksissa sen suuren määrän ja tarkan sijainnin tuoman keräyksen helppouden takia. Ruskeaa rasvaa on hiirillä myös pieniä määriä lapaluiden alla, kainaloissa, kaulassa ja munuaisten ympärillä². Aiempi käsitys siitä, että vain vastasyntyneillä ihmisillä on aktiivista ruskeaa rasvaa, muuttui vuonna 2009, kun useissa

tutkimuksissa osoitettiin aikuisilla ihmisillä olevan myös aktiivista ruskeaa rasvakudosta³⁻⁵. Vastasyntyneillä ruskean rasvan sijainti voi vaihdella, mutta eniten sitä on lapaluiden alueella⁶. Aikuisilla ruskeaa rasvaa on yleensä kaulassa ja solisluiden yläpuolella. Ruskeaa rasvakudosta voi olla myös solisluiden alla, rintalihasten välissä ja tärkeiden elinten läheisyydessä rintakehän ja vatsan alueella selkärangan vieressä. Kuvassa 2 on osoitettu valkoisen ja ruskean rasvakudoksen sijainnit ihmisellä ja hiirellä. Ihmisten ruskean rasvan aktiivisuus vaihtelee yksilöiden välillä painoindexistä (BMI), sukupuolesta, iästä ja ulkolämpötilasta riippuen⁷.



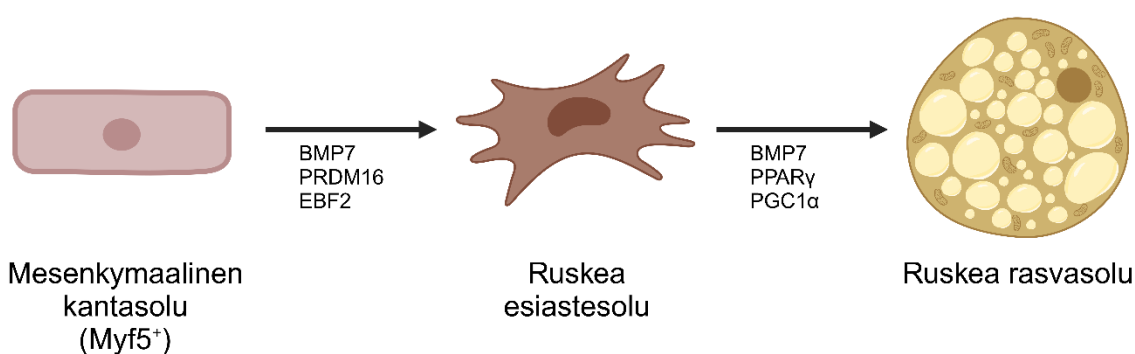
Kuva 2. Valkoisen ja ruskean rasvakudoksen sijainnit ihmisellä ja hiirellä. Tämä kuva on luotu Biorender-ohjelmalla.

Ihmisten ja hiirten ruskea rasvakudos ovat hyvin samankaltaisia, mutta muutamia eroja on. Hiirellä ruskea rasva sijaitsee selvästi lapaluiden välissä ja se koostuu pelkistä ruskeista rasvasoluista. Aikuisen ihmisen ruskea rasva on sijainniltaan laajasti hajallaan ja on sekoitus valkoisia, beigejä ja ruskeita rasvasoluja⁸. Beigeillä rasvasoluilla on valkoisten ja ruskeiden rasvasolujen ominaisuuksia. Niitä voisi kuvata ruskistuneiksi valkoisiksi rasvasoluiksi tai ruskeiden rasvasolujen kaltaisiksi soluiksi⁶. Ne kehittyvät eri solulinjasta kuin ruskea rasva⁶, mutta ilmentävät UCP1:tä. Ihmisillä ruskeaa rasvakudosta on myös huomattavasti vähemmän kuin hiirillä suhteutettuna koko kehon painoon⁹. Mitokondrion toimintaa tarkasteltaessa, ihmisten ja hiirten UCP1 ovat verrattavissa toisiinsa¹⁰. β 3-adrenergisten reseptorien agonistit

vaihtoehtoisena ruskean rasvan aktivoijana ovat antaneet lupaavia tuloksia hiirillä¹¹. Ihmisillä agonistien haasteena on heikko vaste ja biologinen hyötyosuus¹², mutta joissain tutkimuksissa on myös osoitettu niiden olevan potentiaalisia ylipainon hoidossa¹³⁻¹⁵. Ihmisten ruskean rasvan lämmöntuotto saattaaakin aktivoitua noradrenaliinin sitoutuessa β 2-adrenergisiin reseptoreihin β 3-adrenergisten reseptoreiden sijaan¹⁶.

1.1.1 Ruskean rasvan kehitys

Ruskeiden ja valkoisten rasvasolujen ajateltiin kehittyvän samasta alkuperästä, kunnes solulinjan jäljitys -menetelmällä osoitettiin ruskeiden rasvasolujen kehittyvän samasta prekursorista kuin lihassolut. Ruskeat rasvasolut kehittyvät dermamyotomissa sijaitsevista mesenkymaalista kantasoluista. Dermamyotomissa osa Myf5 (myogenic factor 5) -positiivisista mesenkymaalista kantasoluista erilaistuu ruskeiksi esiastesoluiksi muun muassa BMP7:n (bone morphogenic protein 7), PRDM16:n (histone-lysine N-methyltransferase PRDM16) ja EBF2:n (early b-cell factor 2) vaikutuksesta. Esiastesolut kehittyvät kypsiksi rasvasoluiksi muun muassa BMP7:n, PPAR γ :n (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) ja PGC1 α :n (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha) vaikutuksesta. Ruskeiden rasvasolujen kehitys ja siihen vaikuttavat tärkeät tekijät on esitetty kuvassa 3. Ruskean rasvan esiastesolut ilmestyvät hiiren lapaluiden väliin alkionkehityksen päivänä E14.5 (*engl.* embryonic age 14.5). Ruskeat esiastesolut ovat erilaistuneet epäkypsiksi ruskeiksi rasvasoluiksi alkionkehityksen ajankohtana E18.5. Lopullinen kypsyminen ruskeiksi rasvasoluiksi tapahtuu syntymän jälkeen^{2,17}.



Kuva 3. Ruskeiden rasvasolujen erilaistuminen ja siihen vaikuttavat tekijät. Tämä kuva on luotu Biorender-ohjelmalla.

BMP7-proteiini vaikuttaa usealla eri tavalla ruskeiden rasvasolujen erilaistumisessa ja kehityksessä. BMP7 ohjaa kantasolut kehittymään ruskeiksi rasvasoluiksi lisäämällä ruskeiden rasvasolujen erilaistumista lisäävien tekijöiden ilmentymistä ja poistamalla erilaistumista estävät tekijät¹⁸. BMP7-poistogeenisillä (BMP7^{-/-}) hiirillä ruskean rasvakudoksen määrä ja

ruskealle rasvakudokselle tyypillisten geenien ilmentyminen oli vähentynyt merkittävästi verrattaessa villityypin kontrolliin. *BMP7*^{-/-}-hiirillä ei kuitenkaan havaittu muutoksia valkoisen rasvakudoksen määrässä¹⁹.

PRDM16 vaikuttaa yhdessä erilaisten proteiinien kanssa ruskeiden rasvasolujen kehitykseen aktivoiden ruskealle rasvakudokselle tyypillisten geenien ilmentymistä. PRDM16 estää solujen erilaistumisen valkoisiksi rasvasoluiksi alkion kehityksen aikana ja hiiren ikääntyessä, sekä ylläpitää ruskean rasvakudoksen rakennetta ja toimintaa²⁰.

Myf5-positiiviset solut jakautuvat kahteen erilliseen populaatioon sen perusteella, ilmentävätkö ne *Ebf2*- vai *MyoD* (Myogenic differentiation 1) -geeniä. *MyoD*-geeniä ilmentävät solut erilaistuvat lihassoluiksi ja *Ebf2*-geeniä ilmentävät solut ruskeiksi preadiposyyteiksi²¹. EBF2-poistogeenisillä hiirillä on pienempi ruskea rasvakudos ja vähemmän mitokondrioita, joka on seurausta mitokondriaalisten geenien ilmentymisen vähentymisestä. Niillä myös ruskealle rasvakudokselle tyypillisten geenien ilmentyminen on vähentynyt ja vastaavasti valkoiselle rasvakudokselle tyypillisten geenien ilmentyminen on kasvanut verrattaessa villityypin kontrolliin²². Nämä havainnot osoittavat EBF2:n olevan tärkeä tekijä mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumisessa ruskeiksi esiastesoluiksi.

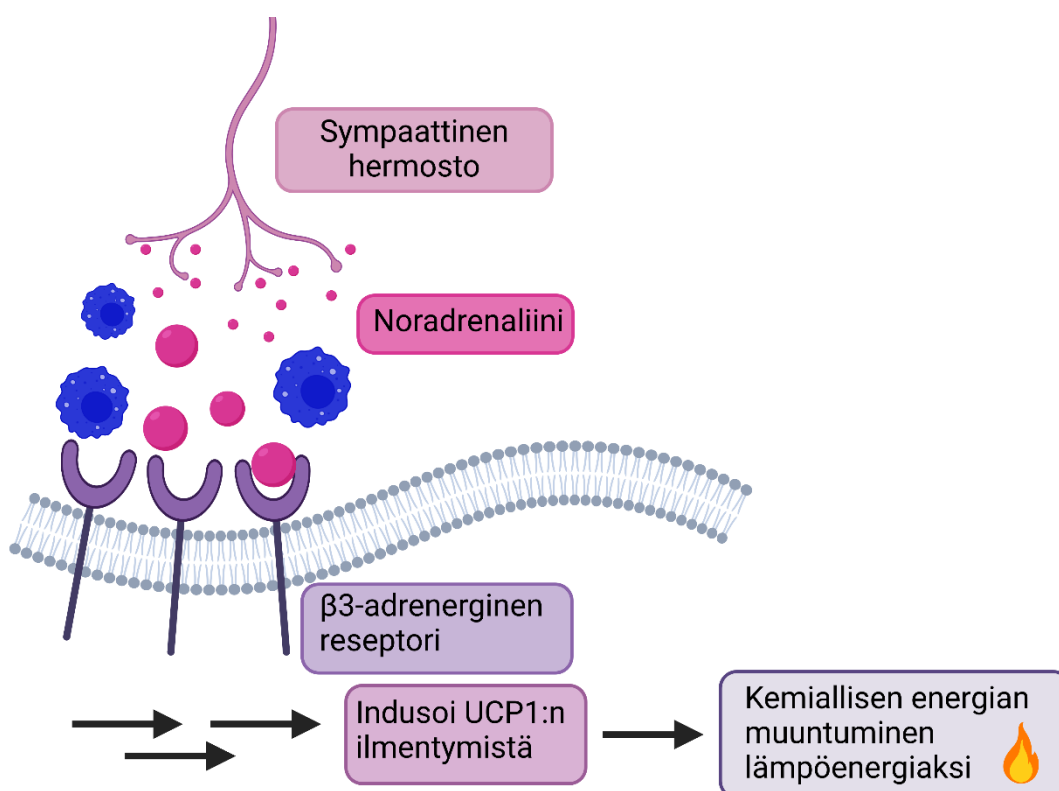
PPAR γ on merkittävä tekijä adipogeenisissä eli rasvasolujen erilaistumisessa kaikissa rasvakudoksissa ja se säätelee ruskean rasvakudoksen lämmöntuottoa. PGC1 α on yksi ruskean rasvan aineenvaihdunnan säätelijöistä. Se aktivoituu kylmälämpötilan jälkeen aktivoiden edelleen muita tärkeitä transkriptiotekijöitä. PGC1 α myös tehostaa rasvahappojen hapettumista ja UCP1:n aktiivisuutta ruskeissa rasvasoluissa²³.

1.1.2 Ruskean rasvan toiminta

Sympaattinen hermosto ja UCP1:n ilmentyminen ovat tärkeitä ruskean rasvan toiminnalle. Sympaattinen hermosto aktivoituu vapauttamaan ruskeaa rasvakudosta aktivoivaa noradrenaliinia muun muassa kylmän, syömisen, liikunnan ja hormonien vaikutuksesta. UCP1 on ruskealle rasvalle spesifinen proteiini, joka säätelee ruskean rasvan lämmöntuottoa eli termogeneesiä. Hiirimalleissa UCP1:n puuttuminen on yhdistetty painonnousuun ruskean rasvan lämmöntuottokyvyn menetyksen vuoksi^{24,25}. UCP1-proteiini sijaitsee ruskeiden rasvasolujen mitokondrioiden sisemmällä kalvolla ja sen tehtävä on kuljettaa vetyioneja kalvon läpi²³.

Väristyksetön termogeneesi aktivoituu kylmälämpötiluksesta ja on riippuvainen UCP1:n ilmentymisestä². Kylmälämpötilus aktivoi ruskean rasvakudoksen sympaattiset hermot erittämään

noradrenaliinia. Noradrenaliini sitoutuessaan ruskeiden rasvasolujen pinnalla oleviin β 3-adrenergisiin reseptoreihin aktivoi solunsisäisten reaktioiden ketjun, mikä lopuksi johtaa lämmöntuoton aktivoitumiseen. β 3-adrenergisten reseptorien aktivoituminen aktivoi adenylaattisyklaasin, joka katalysoi syklisen adenosinimonofosfaatin (cAMP) synteesiä ATP-molekyylistä. cAMP aktivoi proteiinkinasi A:n (PKA), jonka aktivoituminen indusoi monien termogeneesin toimintaan liittyvien geenien ilmentymistä. Tärkeimpänä se välillisesti aktivoi UCP1:n ilmentymisen. UCP1:n aktivoituminen katalysoi protonigradientin purkautumista lämmöksi ATP-tuotannon sijaan²⁶. Kuvassa 4 on havainnollistettu väristyksettömän termogeneesin aktivoitumista ruskeassa rasvakudoksessa.



Kuva 4. Väristyksettömän termogeneesin aktivoituminen ruskeassa rasvassa. Tämä kuva on luotu Biorender-ohjelmalla.

Nykytutkimuksen mukaan ruskean rasvan lämmöntuotto voisi aktivoitua myös muuta kautta kuin vain UCP1-välitteisesti^{27,28}. Osan tutkimuksen mukaan ainakaan hiirellä ei ole muita mekanismeja väristyksettömälle termogeneesille kuin UCP1-välitteinen termogeneesi. UCP1-poistogeeniset (UCP1^{-/-}) hiiret eivät lakkaa tärisemästä kylmäältistuksessa, joka osoittaa, että lihasten täriseminen olisi ainoa lämmön ylläpitäjä UCP1^{-/-}-hiirillä²⁹. Tämä ei kuitenkaan selitä UCP1^{-/-}-hiirten kykyä ylläpitää ruumiinlämpöään jopa kylmäältistuksessa tai niiden sopeutumista kylmään, kun kylmäältistus tapahtuu asteittain²⁷. UCP1^{-/-}-hiirten ruskean rasvan

onkin osoitettu tuottavan lämpöä, joka on todiste myös muista lämmöntuoton mekanismeista³⁰. Muita ruskean rasvan UCP1-riippumattomia lämmöntuoton mekanismeja ovat esimerkiksi kreatiini-välitteinen termogeneesi, lipolyysi, kalsiumkierto ja ADP/ATP -kantaja²⁸. Kreatiini-välitteisessä termogeneesissä kreatiinikinaasi fosforyloi kreatiinin. Tästä seuraa muodostuneen fosfokreatiinin defosforylaatio, joka uudelleen muodostaa kreatiinin ja hajottaa korkeaenergisestä fosfaatin lämmöksi. Kreatiini-välitteinen termogeneesi käyttää mitokondrioiden ATP:tä fosfokreatiinin synteesiin²⁷.

1.1.3 Löytyykö ruskeasta rasvasta ratkaisu lihavuuden hoitoon?

Lihavuus on vakava terveysriski ja se altistaa monille muille sairauksille, esimerkiksi sydän- ja verisuonitaudeille, syöville ja rasva-aineenvaihdunnan häiriöille kuten tyypin 2 diabetekselle. Lihavuudessa energiansaanti ylittää jatkuvasti energiankulutuksen, jolloin valkoisen rasvakudoksen määrä kasvaa. Lihavuus johtaa valkoisen rasvakudoksen tulehdukselliseen tilaan, jossa tulehdukselliset makrofagit kerääntyvät kudokseen³¹. Krooninen tulehduksellinen tila ylittää myös ruskeaan rasvakudokseen, mutta pienemmässä mittakaavassa. Tulehdukselliset makrofagit ja niiden erittämät sytokiinit inhiboivat lämmöntuotolle tärkeää UCP1:tä, jolloin ruskealle rasvalle ominaiset piirteet, lämmöntuotto ja energian kulutus, heikentyvät³². Lihavuuden aiheuttamasta tulehduksellisesta tilasta valkoisessa rasvakudoksessa tiedetään enemmän kuin sen vaikutuksesta ruskeaan rasvakudokseen. Ruskean rasvan aktiivisuuden puute lapsuudessa ja murrosikässä on yhdistetty painonnousuun ja rasvamassan kerääntymiseen aikuisella iällä³³. Ruskea rasva on potentiaalinen tekijä lihavuuden hoidossa ja ehkäisemisessä sen lämmöntuottokyvyn ja energiankulutuksen takia. Tällä hetkellä tutkitaan monenlaisia erilaisia vaihtoehtoja ruskean rasvan aktivoimiselle tai valkoisen rasvan muuttamiselle ruskean rasvan kaltaiseksi eli beigeiksi rasvasoluiksi. Beiget rasvasolut ilmentävät ruskealle rasvalle tyypillisiä geenejä, kuten PRDM16 ja UCP1, sekä kykenevät tuottamaan lämpöä ja kuluttamaan energiaa. Kylmäaltistus ei ole pidemmän päälle käytännöllinen tapa aktivoida ihmisen ruskeaa rasvaa kuluttamaan energiaa. Muita mahdollisia ruskean rasvan tai valkoisen rasvan muuttumista ruskean rasvan kaltaiseksi aktivoivia tekijöitä ovat muun muassa β 3-adrenergisten reseptorien agonistit, lyhytketjuiset rasvahapot, mikroRNA:t, liikunta, hormonit, jotkut lääkkeet ja ruuasta saatavat yhdisteet (kaneli, kapsaisiini, kalaöljy)³⁴.

β 3-adrenergisten reseptorien agonistit aktivoivat ruskean rasvakudoksen lisäksi valkoisten rasvasolujen ruskistumista eli muuttumista beigeiksi rasvasoluiksi. Ne aktivoivat rasvasolut ilmentämään UCP1:tä ja niiden on osoitettu estävän valkoisen rasvakudoksen kasvua

lihavuuden aikaisessa kehitysvaiheessa. β 3-adrenergisten reseptorien agonisteista kerrotaan lisää myöhemmin tässä tutkielmassa. Lyhytketjuiset rasvahapot, esimerkiksi butyraatit ja asetaatti, aktivoivat lämmöntuottoa ja indusoivat UCP1:n, PRDM16:n ja PGC1 α :n ilmentymistä³⁵. PPAR γ -agonisti rosiglitazone on hyväksytty tyypin 2 diabeteksen hoitoon, sen on osoitettu aktivoivan valkoisen rasvan muuntumista ruskean rasvakudoksen kaltaiseksi ja vaimentavan makrofagien tulehdusvastetta³⁶. Chilipaprikoiden sisältämän kapsaisiinin on raportoitu aktivoivan valkoisen rasvakudoksen ruskistumista³⁷ ja kanelin indusoivan ruskealle rasvalle tyypillisten markkerien ilmentymistä samalla inhiboiden valkoiselle rasvalle tyypillisiä markkereita³⁴.

Ruskeaa rasvaa tai valkoisen rasvan ruskistumista aktivoivien lääkeaineiden kehityksessä on monia haasteita, esimerkiksi lajikohtaiset erot, lääkeaineiden kuljetus ja tarvittavien annostelukertojen suuri määrä. Joitain lääkeaineita on todettu toimiviksi jyrsijöillä, mutta ne eivät olekaan saaneet odotettua vaikutusta aikaan tai ne ovat aiheuttaneet merkittäviä sivuvaikutuksia ihmisillä³⁵. Lääkkeiden annostelussa suun kautta tai injektiona on monia ongelmia. Lääkeaineet eivät kulkeudu oikeaan paikkaan tai suurin osa lääkeaineesta hajoaa matkalla kohdekudokseen. Ratkaisuksi näihin ongelmiin kehitetään lääkelaastoreita tai lääkeaineiden kuljetukseen käytettäviä nanomateriaaleja. Esimerkiksi kohdekudoksen pintaproteiineihin sitoutuvilla ligandeilla varustettu hajoava polymeeri mahdollistaisi spesifisemmän kuljetuksen ja hallitun lääkeaineen vapautumisen kohdekudoksessa³⁸. On tärkeää etsiä aktiivisia yhdisteitä, jotka vaikuttaisivat selektiivisesti rasvasoluihin aiheuttaen halutut ominaisuudet (painonpudotus, parantunut sokeri- ja rasva-aineenvaihdunta) minimaalisilla sivuvaikutuksilla.

1.2 Makrofagit

Ihmisen immuunijärjestelmä jaetaan synnynnäiseen epäspesifiseen immunitettiin ja hankittuun spesifiseen immunitettiin. Synnynnäinen immunitetti on heti valmiina tuhoamaan elimistöön tunkevat vieraat patogeenit (esimerkiksi virukset ja bakteerit). Synnynnäinen immunitetti on epäspesifinen eli se toimii vieraasta patogeenista riippumatta aina samalla tavalla. Synnynnäisen immunitetin soluja ovat esimerkiksi makrofagit, neutrofiilit, monosyytit, dendriittisolut ja eosinofiilit. Kaikki nämä solut kehittyvät samasta myeloidisen linjan kantasolusta. Synnynnäinen immunitetti kehittyy jo sikiöaikana, mikä tekee siitä erityisen tärkeän vastasyntyneille lapsille, joilla hankittu immunitetti vasta kehittyy. Hankitun immunitetin vaste on synnynnäistä immunitettia hitaampi ja se astuu kuvaan, jos

synnynnäinen immuniteetti ei onnistu tuhoamaan elimistölle vierasta patogeenia. Hankittu immuniteetti perustuu T- ja B-soluihin. Sen etuja ovat vieraiden patogeenien tunnistaminen, spesifisyys ja immunologisen muistin kehittyminen.

Makrofagit ovat myeloidista alkuperää olevia valkosoluja, joiden yksi tunnetuimpia tehtäviä on fagosytoida eli solusyödä elimistölle vieraita patogeeneja, kuolleita soluja ja soludebristä. Makrofageilla on myös tärkeä rooli elimistön puolustusjärjestelmän lisäksi kudosten kehityksessä ja toiminnassa sekä elimistön sisäisen tasapainon ylläpidossa. Ne ovat usein kudosten suurin immuunisolupopulaatio. Makrofagit jaetaan yleensä karkeasti proinflammatorisiin M1- ja anti-inflammatorisiin M2-makrofageihin. M1-makrofagit ovat ”klassisesti aktivoituja” makrofageja, jotka aktivoituvat kohdatessaan taudinaiheuttajia ja proinflammatorisia signaaleja. M2-makrofagit ovat ”vaihtoehtoisesti aktivoituja” makrofageja, jotka tuottavat esimerkiksi kasvutekijöitä. Niillä on tärkeä rooli esimerkiksi kudoksen palautumisessa tulehduksen jälkeen. Makrofagien ominaisuudet ovat todellisuudessa paljon monimutkaisempia, joten kyseinen luokkajako on vanhanaikainen ja yksinkertaistettu.

1.2.1 Makrofagien kehittyminen

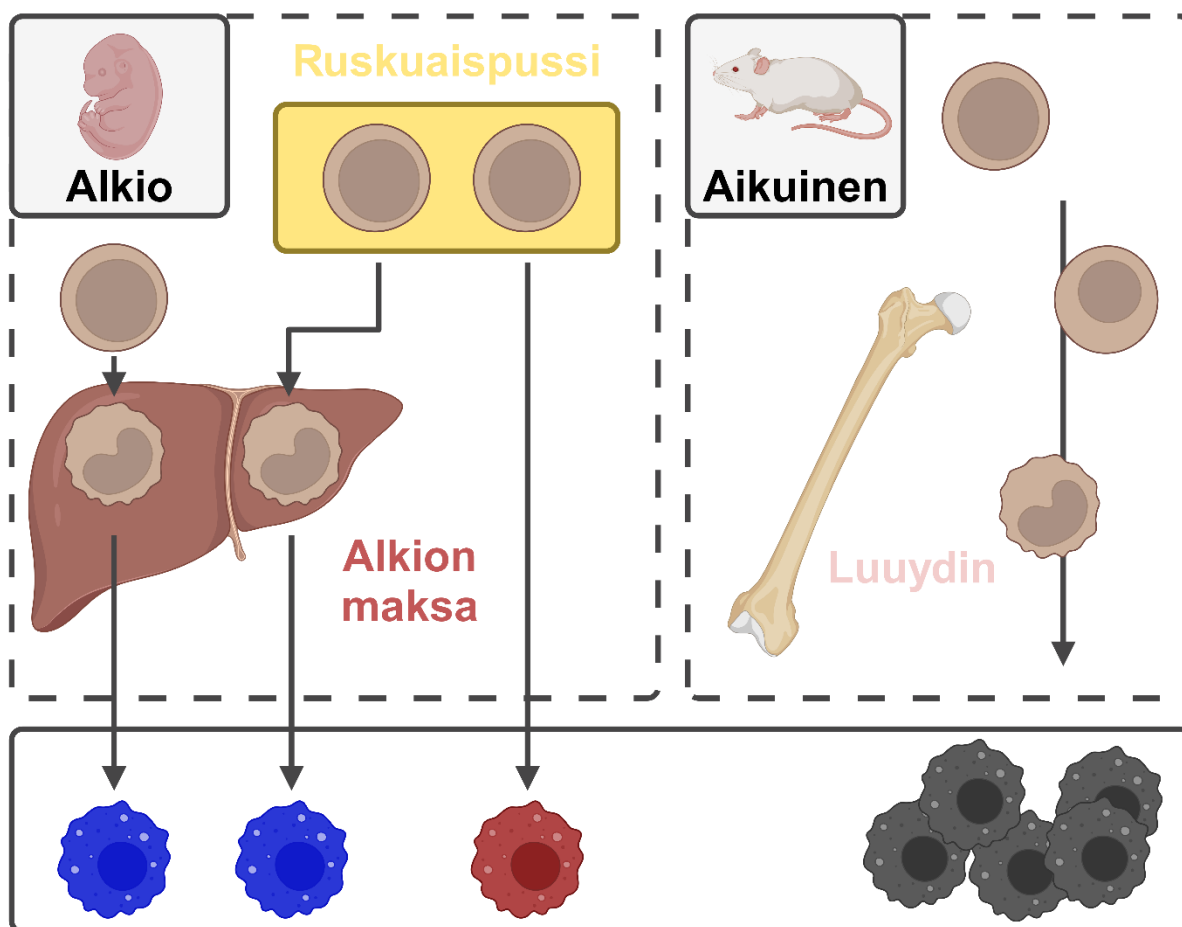
Nykytiedon mukaan makrofagit ovat peräisin kolmesta eri lähteestä: alkion ruskuaispussista, alkion maksasta ja aikuisen luuytimeestä (kuva 5). Makrofagit ovat hematopoieettisia soluja, jotka kehittyvät hematopoieesin eli verenmuodostuksen aikana. Makrofagien alkuperä edustaa yhtä hematopoieesin aaltoa. Hematopoieesin kolme aaltoa ovat primitiivinen, lyhytaikainen definitiivinen ja definitiivinen hematopoieesi. Hiiren ja ihmisen hematopoieesi ovat hyvin samankaltaisia, mutta myös lajikohtaisia eroja on.

Ensimmäisessä aallossa eli primitiivisessä hematopoieesissa ensimmäiset kudoksiin kulkeutuvat makrofagit kehittyvät alkion ruskuaispussissa alkionkehityksen ajankohtana E7-E7.5. Ruskuaispussissa kehittyneet primitiiviset makrofagit eivät käy läpi monosyyttivälivaihetta³⁹.

Hiiren alkionkehityksen päivänä E8-8.5 ruskuaispussin myeloidisen linjan kantasolut vaeltavat ruskuaispussin hemogeenisestä endoteelistä sikiön maksaan. Tästä alkaa lyhytaikainen definitiivinen hematopoieesi. Maksasta tulee merkittävin hematopoieettinen elin sikiön kehityksen ajankohtana E11.5-E12.5. Alkion maksassa myeloidisen linjan kantasoluista kehittyvät monosyytit kulkeutuvat kudoksiin erikoistuen makrofageiksi ajankohtana E13.5-E15.5³⁹.

Definitiivisessä hematopoieesin aallossa kypsymättömät hematopoieettiset kantasolut kulkeutuvat luuytimeen. Kolmannen aallon luuytimessä kehittyvät monosyytit saapuvat

kudoksiin viimeisinä erilaistuen makrofageiksi ja korvaten osan alkionkehityksen aikana kehittyneistä makrofageista kudoksesta riippuen³⁹. Luuytimen monosyyttejä voidaan värvätä kudoksiin esimerkiksi tulehdustilanteessa.



Kuva 5. Ensimmäiset makrofagit ovat peräisin alkion ulkopuolisesta ruskuaispussista. Hematopoieesin toisessa aallossa alkion maksa tuottaa kudoksiin makrofageja. Syntymän jälkeen makrofagien tuotanto siirtyy luuytimeen. Tämä kuva on luotu Biorender-ohjelmalla.

1.2.2 Kudokohtaiset makrofagit

Kaikissa kudoksissa on kokoelma eri alkuperää olevia makrofageja. Näiden kudokohtaisten makrofagien alkuperä ja kulloinkin kudoksessa vallitsevat solujen väliset ja paikalliset signaalit määräävät niiden tarkat tehtävät. Kudokohtaiset makrofagit jäävät kudoksiin pysyvästi eivätkä palaa verenkiertoon tai siirry muihin kudoksiin⁴⁰.

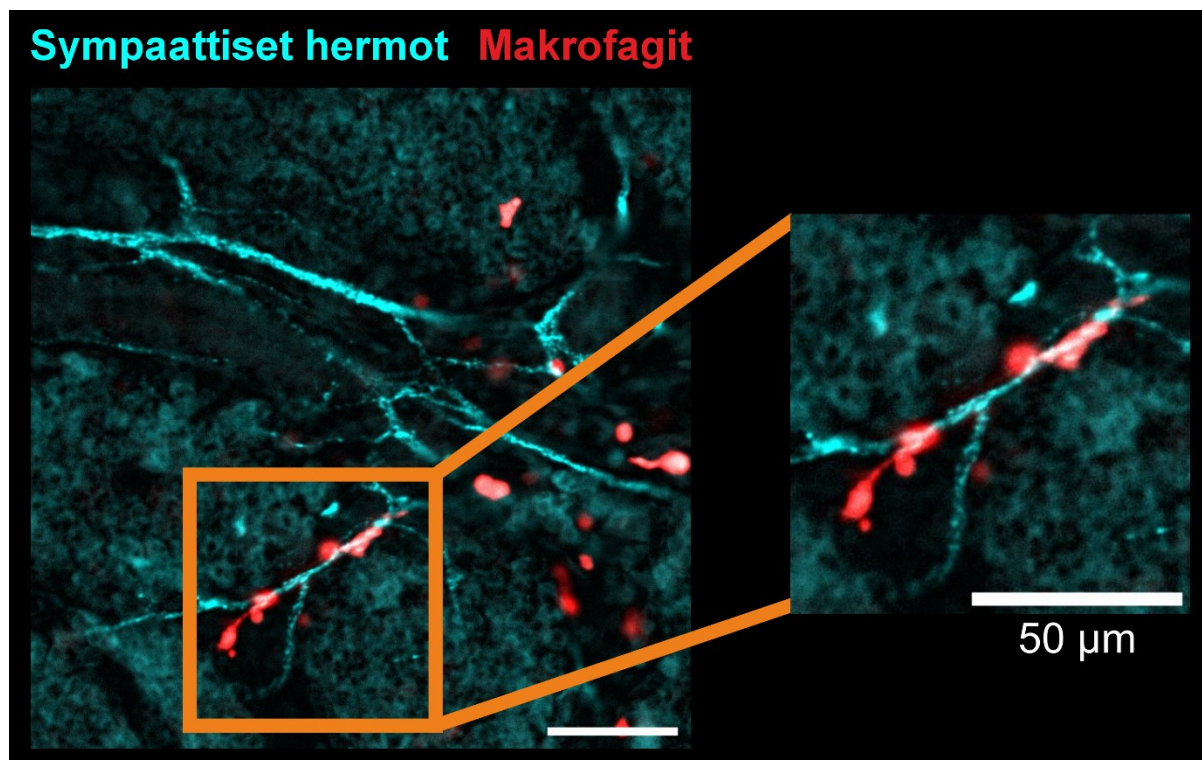
Aivojen makrofagit eli mikroglia-solut ovat kehittyneet alkion ruskuaispussissa. Luuydinperäiset makrofagit eivät korvaa mikroglia-soluja, vaan ne uusiutuvat itsenäisesti. Veri-aivoesteiden muodostuminen vaikeuttaa muiden solujen kulkeutumista aivoihin. Mikroglia-solujen tehtäviin kuuluu muun muassa hermoverkoston ylläpito ja hermopäätteiden karsiminen⁴¹. Mikroglia-solujen toimintahäiriöt voivat olla osallisena Alzheimerin taudin ja muiden sairauksien puhkeamisessa ja etenemisessä⁴². Maksan Kupffer-solut ja keuhkojen

alveolaariset makrofagit ovat kehittyneet alkion maksassa. Kupffer-solujen tehtäviin kuuluu muun muassa myrkyllisten yhdisteiden poistaminen maksasta, raudan ja kolesterolin kierrätys sekä vanhojen punasolujen solusyönti. Alveolaariset makrofagit ovat plastisia ja tärkeitä kudosten uusiutumisessa sekä puolustuksessa⁴³. Suoliston alkioaikaudella kehittyneet makrofagit korvautuvat täysin luuytimen monosyyteillä jatkuvan uusiutumistarpeen vuoksi⁴⁴.

1.2.3 Makrofagit ruskeassa rasvassa

Rantakarin tutkimusryhmä Turun Biotiedekeskukselta on osoittanut, että hiiren ruskean rasvan makrofagit ovat peräisin alkioaikauden maksasta ja noin viikon ikäisestä alkaen suurin osa niistä korvautuu luuytimessä kehittyneillä makrofageilla (dataa ei vielä julkaistu). Makrofagien tehtävät kehittyvässä ruskeassa rasvakudoksessa ovat vielä epäselviä, mutta niiden oletetaan toimivan viestinviejinä sympaattisten hermojen ja ruskeiden rasvasolujen välillä. Tutkimukset ovat osoittaneet makrofagien vaikuttavan ruskean rasvakudoksen lämmöntuottoon ja hermojen kehittymiseen sekä toimintaan aikuisella hiirellä^{45,46}.

Makrofagit vaikuttavat noradrenaliinin vapautumiseen ilmentämällä PLEXINA4-proteiinia ja tyrosiinihydroksylaasientsyymiä (TyrH)⁴⁶. Makrofagit voivat säädellä sympaattisten hermojen kehitystä ruskeassa rasvakudoksessa PLEXINA4-pintaproteiinin avulla. Ruskean rasvakudoksen sympaattiset hermot ilmentävät SEMA6A-semaforiinia (semaphorin-6A), johon PLEXINA4 voi sitoutua. Sitoutuminen aiheuttaa sympaattisten hermojen vetäytymisen pois päin heikentäen kudoksen lämmöntuottoa⁴⁷. Tyrosiinihydroksylaasientsyymi on tärkeä osa katekoliamiinien synteesiä. PKA/CAMKII-signaalointi aktivoi TyrH:n fosforylaatiota edistäen noradrenaliinin tuotantoa termogeneesin aktivoimiseksi⁴⁸. On myös osoitettu, että interleukiini-4 (IL-4) vaihtoehtoisesti aktivoisi makrofagit tuottamaan katekoliamiineja⁴⁹. Makrofagien ilmentämän tyrosiinihydroksylaasientsyymien tärkeys noradrenaliinin vapautumisessa on kiistanalainen. Sen poistaminen vaihtoehtoisesti aktivoituista makrofageista ei vaikuttanut hiirten lämmöntuottoon tai energian kulutukseen⁵⁰. Aikuisten hiirten ruskean rasvakudoksen makrofagit ovat kiinnittyneitä sympaattisiin hermoihin ja säätelevät noradrenaliinin konsentraatiota kudoksessa hajottamalla sitä⁴⁵. Vaikka makrofagien tehtäviä ei tarkasti tiedetä kehittyvässä ruskeassa rasvakudoksessa, jo alkiovaiheessa makrofagit ovat kiinnittyneitä kudoksen kehittyviin sympaattisiin hermoihin (kuva 6).

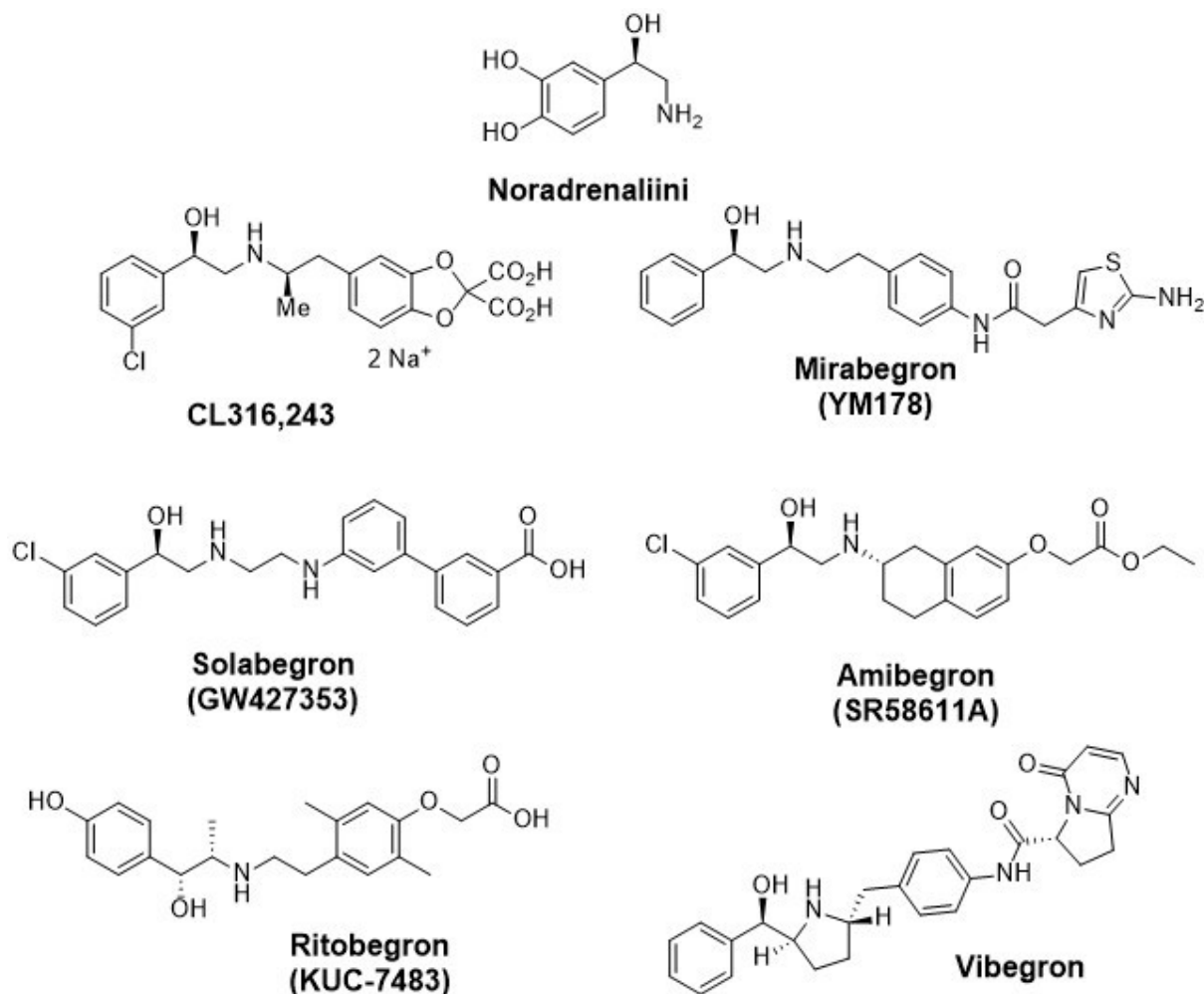


Kuva 6. Whole mount -värjäys hiiren alkion ruskeasta rasvasta. Makrofagit ovat kiinnittyneinä sympaattiseen hermoverkostoon.

1.3 β 3-adrenergisten reseptorien agonistit

Agonistit ovat lääkkeitä, jotka aktivoivat reseptorin sen luonnollisen ligandin sijasta. Koska β 3-adrenergiset reseptorit ruskeassa rasvakudoksessa aktivoituvat sympaattisten hermojen vapauttamasta noradrenaliinista, agonistien rakenteet jäljittelevät osittain noradrenaliinin rakennetta (kuva 7)⁵¹. β 3-adrenergisia reseptoreja sijaitsee myös muissa kudoksissa, esimerkiksi virtsarakossa, sydämässä, verisuonissa ja aivoissa. β 3-adrenergisten reseptoreiden agonisteista etsitään hoitokeinoa lihavuuteen. Aktivoimalla vaihtoehtoisesti ruskean rasvan lämmöntuotto agonistilla, ruskea rasva kuluttaisi energiaa edistään painonpudotusta. β 3-adrenergisten reseptorien agonistit ovat antaneet eläinkokeissa lupaavia tuloksia. Ihmisillä tutkimusta ovat hidastaneet agonistien huono biologinen hyötyosuus, selektiivisyys ja mahdolliset kardiovaskulaariset sivuvaikutukset. Biologinen hyötyosuus kertoo siitä, kuinka suuri osa lääkeannoksesta pääsee muuttumattomana verenkiertoon. Ongelmat kehitettyjen agonistien selektiivisyydessä ihmisen β 3-adrenergisille reseptoreille johtuu siitä, että hiiren ja ihmisen reseptorit ovat noin 80 % identtisiä. Kuten myös aiemmin mainittua, ihmisten ruskean rasvan osuus koko kehon painosta on pieni. Haasteena on saada energian kulutus kasvamaan agonistin avulla tarpeeksi suureksi, jotta painonpudotus olisi käytännössä mahdollista. β 3-adrenergisten reseptorien agonisteja tutkitaan myös muidenkin sairauksien kuin lihavuuden

hoitoon, esimerkiksi yliaktiivisen virtsarakon, masennuksen, ärtyneen suolen oireyhtymän tai aineenvaihdunnan häiriöiden hoitoon⁵¹.



Kuva 7. Noradrenaliinin ja kehitettyjen β_3 -adrenergisten reseptorien agonistien rakenteet.

1.3.1 CL316,243

Tässä tutkimuksessa käytetty agonisti CL316,243 on β_3 -adrenergisten reseptorien aktivaattori, joka on kehitetty hoitokeinoksi ylipainoon ja diabetekseen. Kyseistä agonistia käytetään laajasti muun muassa jyrsijöillä vaihtoehtoisena ruskean rasvan aktivoijana kylmäaltistuksen sijaan. CL316,243-agonisti on selektiivisempi hiirten ruskeassa rasvakudoksessa oleville β_3 -adrenergisille reseptoreille kuin ihmisen. Jyrsijöillä sen on osoitettu vaikuttavan perusaineenvaihduntaan ja lämmöntuottoon, sekä laskevan verensokeria ja stimuloivan insuliinin eritystä. CL316,243-injektio vaikuttaa nopeasti aktivoiden ruskean rasvakudoksen stimuloimalla cAMP:n muodostumista. Sen on osoitettu kasvattavan energian kulutusta ja edistävän painonpudotusta lihavilla hiirillä^{52,53}.

1.3.2 Mirabegron

Mirabegron on ensimmäinen β_3 -adrenergisten reseptorien agonisti, joka on hyväksytty lääkkeeksi yliaktiivisen virtsarakon hoitoon. Mirabegronilla on parempi selektiivisyys ihmisten β_3 -adrenergisille reseptoreille kuin CL316,243:lla. Mirabegron indusoi valkoisen rasvan ruskistumista eli ruskealle rasvalle tyypillisten markkereiden, kuten UCP1:n, ilmentymistä valkoisessa rasvakudoksessa⁵⁴. Mirabegronin kliiniset kokeet ihmisten ruskean rasvan aktivoijana ja hoitokeinona lihavuuteen jatkuvat. Kliinisissä kokeissa on saatu lupaavia tuloksia, mutta on havaittu myös joitain ongelmia. Huolena on mahdolliset kardiovaskulaariset sivuvaikutukset ja sydänrasituksen riski. Haasteena on myös se, että tämänhetkistä hyväksyttyä annosmäärää pitäisi nostaa, jotta ruskean rasvan energian kulutus kasvaisi tarpeeksi suureksi. Pitkäaikainen mirabegron-hoito toimii paremmin kuin yksi akuutti annos, mutta siinäkin kohdataan haaste mahdollisesta reseptorien desensitisaatiosta eli reseptoreille kehittyvästä sietokyvystä lääkemolekyylä vastaan⁵⁴.

1.3.3 Muut

Vibegron on hyväksytty Japanissa ja Yhdysvalloissa yliaktiivisen virtsarakon hoidossa. Vibegron on vielä selektiivisempi ihmisten β_3 -adrenergisille reseptoreille kuin mirabegron ja sen on myös osoitettu aiheuttavan vähemmän kardiovaskulaarisia haittavaikutuksia⁵⁵. Solabegronia ja Ritobegronia tutkitaan yliaktiivisen virtsarakon hoidossa. Solabegronin potentiaalisuutta ärtyneen suolen oireyhtymän ja tyypin 2 diabeteksen hoidossa tutkitaan myös. Vibegronin ja Solabegronin potentiaalia lihavuuden tai metabolisten sairauksien hoidossa ei ole vielä tutkittu kattavasti⁵⁶. Amibegronia on tutkittu ensisijaisesti masennuslääkkeenä. Useat eläinkokeet osoittivat sen potentiaalisuuden masennuslääkkeenä, mutta ihmisten kliiniset kokeet keskeytettiin huonon vasteen takia. Huono vaste johtunee siitä, ettei aivoissa ole paljoa β_3 -adrenergisia reseptoreita. Amibegron oli ensimmäinen suun kautta annosteltava aktiivinen β_3 -adrenergisten reseptorien agonisti, joka läpäisi veriaivoesteen. Amibegronin toiminta on UCP1-riippuvaista, jolloin se voisi toimia ruskean rasvan aktivoijana⁵⁷.

1.4 Tutkimuksen tavoitteet

Ruskean rasvan immunologiaa ja sen solujen merkitystä ruskean rasvan kehitykselle ja toiminnalle ei vielä tunneta. Ruskeaan rasvaan liittyvä tutkimus keskittyy tällä hetkellä pääosin aikuisen ruskean rasvan aktiivisuuden tutkimiseen ja siihen, miten tätä tietoa voitaisiin käyttää lihavuuden hoitokeinojen kehityksessä. Tärkeää on myös tutkia ruskean rasvakudoksen kehitystä ja etenkin kasvuvaiheen säätelytekijöitä ehkäisemään lasten lihavuutta ja sitä kautta myös aikuisiän lihavuutta. Tutkimalla ruskean rasvan kehityksen mekanismeja, näitä samoja mekanismeja voitaisiin mahdollisesti tulevaisuudessa hyödyntää aikuisellakin ruskean rasvan aktiivisuuden lisäämisessä muokkaamalla makrofagien toimintaa.

Pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli optimoida ruskean rasvakudoksen aktiivisuuden muokkausta ja mittausta vastasyntyneillä hiiren poikasilla ja selvittää, miten makrofagien puute vaikuttaa ruskean rasvan kehitykseen ja toimintaan. Noradrenaliinilla ja β 3-adrenergisilla reseptoreilla on tärkeä rooli ruskean rasvan aktivoitumisessa, jonka takia tutkielman tavoitteita olivat:

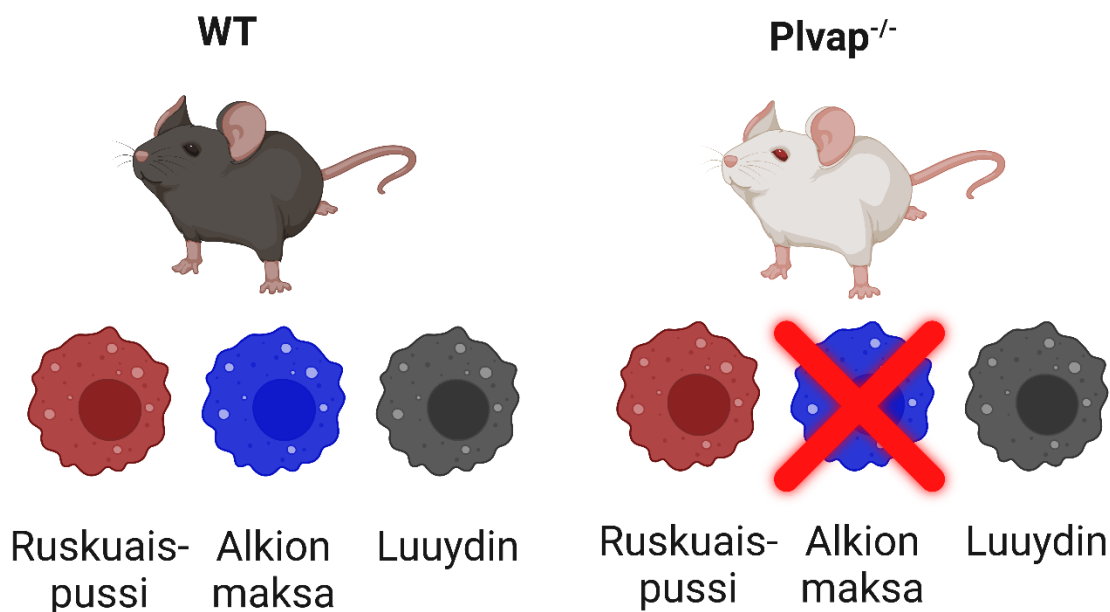
1. Kehittää ja optimoida kvantitatiivinen MRM-menetelmä sekä näytteiden käsittely protokolla ruskean rasvan noradrenaliinin konsentraation mittausta varten.
2. Määrittää noradrenaliinin konsentraatio ruskeasta rasvakudoksesta erilaisilta hiirimalleilta ja eri-ikäisiltä hiiriltä.
3. Optimoida β 3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektioprotokolla vastasyntyneille hiirille.

2 Materiaalit ja menetelmät

2.1 Hiiret

Työssä käytettiin hiiriä yleisesti käytetystä sisäsiitteisestä C57BL/6NRj (6N, Janvier Labs) ja hybriditaustaisesta *Plvap* poistogeenisestä (*Plvap*^{tm1Salm}) kannoista. Hiiret kasvatettiin standardiolosuhteissa Turun yliopiston koe-eläinkeskuksessa. Huoneiden ilmankosteus oli 55 % ±15 % ja lämpötila +21°C ±3°C. Valorytmi oli normaali, 12 h valoa (klo 07.00–19.00) ja 12 h pimeää. Eläimillä oli jatkuvasti saatavilla ruokaa ja vettä. Kaikki eläinkokeet suoritettiin Suomen aluehallintaviraston hyväksymän tavoin (hankelupanumero 23546/2023) ja EU-lainsäädännön mukaisesti noudattaen EU-direktiiviä 2010/63/EU.

Plvap poistogeenistä hiirikantaa ylläpidettiin heterotsygoottisena (*Plvap*^{+/-}), sillä homotsygoottisena poistogeenisenä (*Plvap*^{-/-}) genotyyppi on letaali noin 4-8 viikon iässä. Heterotsygoottien vanhempien jälkeläisten genotyyppi selvitettiin korvapaloista eristetyn DNA:n avulla. Poikaset määritettiin joko homotsygooteiksi *plvap*-poistogeenisiksi (*engl.* knock-out, KO, *Plvap*^{-/-}), homotsygooteiksi villityypin hiiriksi (*engl.* wild type, WT, *Plvap*^{+/+}) tai heterotsygooteiksi hiiriksi (*engl.* heterozygous, hez, *Plvap*^{+/-}). Tässä tutkimuksessa käytettiin homotsygootteja poistogeenisiä (*Plvap*^{-/-}, KO) hiiriä ja kontrollina saman poikueen homotsygootteja villityyppisiä (*Plvap*^{+/+}, WT), joilla on täysin normaali, toimiva *plvap* (plasmalemma vesicle associated protein) -geeni homotsygoottisena. *Plvap*^{-/-}-hiirillä alkioikaudella maksassa kehittyvät makrofagit eivät pääse kulkeutumaan kudoksiin (kuva 8)⁵⁸. Lapaluiden välissä sijaitsevaa ruskeaa rasvakudosta kerättiin yhden päivän, kolmen päivän ja viikon ikäisiltä *Plvap*-hiiriltä noradrenaliinin konsentraation mittaamiseen. 6N hiiriä käytettiin α CSF1-vasta-ainekäsittelyn ja β 3-adrenergisten reseptoreiden agonisti-injektioiden (CL316,243) kokeissa. Vasta-ainekäsittelyiltä yhden viikon ikäisiltä 6N hiiriltä kudokset kerättiin virtausytometriin analyysiin sekä noradrenaliinin mittaamiseen. Yhden viikon ikäiset hiiret nukutettiin isofluraanihöyryllä ennen lopettamista dekapitaatiolla. Käytetty eläinten anestesia-aine isofluraani oli Piramal Healthcaren valmistama (Northumberland, Iso-Britannia). Lopetuksen jälkeen tarvittavat kudokset preparoitiin ja käytettiin tuoreeltaan joko noradrenaliinin mittaamiseen tai virtausytometriin analyysiin. Alle viikon ikäiset *Plvap*-hiiret ja agonisti-injektiokekeissa käytetyt 6N hiiret lopetettiin dekapitaatiolla.



Kuva 8. *Plvap*^{-/-}-hiireltä puuttuu alkioaudella maksassa kehittyneet makrofagit. Tämä kuva on luotu Biorender-ohjelmalla.

2.2 Noradrenaliinin konsentraation mittausta ruskeasta rasvasta

Ruskean rasvakudoksen lämmöntuotto aktivoituu sympaattisten hermojen erittämästä noradrenaliinista. Makrofagien oletetaan säätelevän tai toimivan viestinviejinä sympaattisten hermojen ja ruskeiden rasvasolujen välillä. Tässä tutkielmassa makrofagien vaikutusta ruskean rasvan lämmöntuottoon tutkittiin muun muassa mittaamalla noradrenaliinin konsentraatiota makrofagipuutteisesta ruskeasta rasvakudoksesta.

Noradrenaliinin konsentraation mittaamiseen ruskeasta rasvasta kehitettiin kvantitatiivinen MRM-menetelmä LC-MS laitteistolle. LC-MS-analyysin alussa näyte johdetaan nestekromatografian kolonnin läpi, jossa näytteen sisältämät yhdisteet erottuvat toisistaan. Tämän jälkeen massaspektrometrissa yhdisteet ionisoidaan ja kiihdytetään massa-analysointilaitteen läpi. Kolmoiskvadrupolimassaspektrometrissa ensimmäinen kvadrupoli erottaa syntyneistä ioneista halutun prekursori-ionin (äiti-ionin). Prekursori-ioni ionisoidaan ja fragmentoidaan keskimmaisessä kvadrupolissa. Syntyneet tuoteionit kulkevat kolmannen kvadrupolin läpi. Tuoteionit analysoidaan viimeisen kvadrupolin jälkeen sijaitsevalla detektorilla ja tuloksista koostetaan massaspektiksi kutsuttu kuvaaja. MRM eli usean reaktion seuraaminen (*engl.* multiple reaction monitoring) on massaspektrometriassa käytettävä analyysimenetelmä, joka mahdollistaa tiettyjen yhdisteiden tunnistamisen ja kvantitoinnin näytteestä. Sisäisen standardin käyttö näytteissä ja optimoidun standardisuoran laimennoksissa tekee menetelmän kvantitatiivisuudesta luotettavamman.

Noradrenaliinin konsentraation määrittämiseen verestä, virtsasta ja aikuisten hiirten ruskeasta rasvasta on kehitetty erilaisia LC-MS -menetelmiä^{47,59,60}. Tätä ei ole kuitenkaan tehty Turun yliopistossa, eikä julkaistua menetelmää vastasyntyneiden hiirten ruskean rasvakudoksen noradrenaliinin konsentraation mittaamiseen ole tehty. Tässä tutkielmassa käytetyn menetelmän kehittäminen aloitettiin siis kirjallisuuskatsauksella, josta löydettiin muun muassa ioniparireagenssin käyttö noradrenaliinin retentioajan pidentämiseksi.

2.2.1 Käytetyt reagenssit

Massa-analyyseissä käytetty LC-MS-laatuinen vesi ja metanoli oli Honeywellin valmistamia (Seelze, Saksa). LC-MS-laatuinen muurahaishappo oli VWR:n valmistama (Fontenay-sous-Bois, Ranska). Sisäisenä standardina käytetyn deuteroidun (\pm)-noradrenaliini-d₆ valmistaja oli Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, Yhdysvallat). Noradrenaliiniliuoksiin, joiden avulla määritettiin standardisuora, käytetyn kiinteän noradrenaliinin valmistaja oli Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Yhdysvallat). Testatun HSA ioniparireagenssin valmistaja oli Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Yhdysvallat).

2.2.2 Laitteisto ja datan analysointi

Kaikissa noradrenaliinin mittausanalyyseissä käytettiin Agilent 6460 QqQ LC-MS laitteistoa, joka koostui yhdistetyistä Agilent 1290 Infinity -nestekromatografista ja Agilent 6460 -kolmoiskvadrupolimassaspektrometrasta. Kehitetystä ja optimoidusta MRM-menetelmästä MS-laitteistossa käytettiin sähkösumutus-ionisaatiota (ESI), jonka kapillaarijännite oli 2,5 kV ja ionilähteen lämpötila 100°C. Haihdutus-, suoja- ja törmäyskaasuna toimi typpi. Haihdutuskaasun lämpötila oli 150°C ja virtausnopeus 4,0 l/min. Suojakaasun virtausnopeus oli 12,0 l/min. Käytetyn bifenyylisolonnin mitat olivat 2,1 x 100 mm ja partikkelikoko 1,7 µm. Eluenttien virtausnopeus oli 0,4 ml/min ja injektion tilavuus oli aina 10 µl. Käytetty gradientti on kuvattu taulukossa 1. Eluenteina käytettiin 0,1 % muurahaishapon vesiliuosta (A) ja 0,1 % muurahaishapon metanoliliuosta (B). Dataa kerättiin kuuden minuutin ajalta. Kehitetyn menetelmän prekursori-ioni oli 168,1 *m/z* ja sen tuoteionit olivat 150,1 *m/z* ja 123,0 *m/z*. Näiden ionien avulla pystyttiin karakterisoimaan retentioajalla 0,6 min esiintyvä piikki noradrenaliinin piikiksi. Kehitetyn MRM-menetelmän ionisaatioksi valittiin negatiivinen ionisaatio.

Mittaustulokset analysoitiin Agilent Masshunter Quantitative Analysis -ohjelmistolla. Tuloksia kuvaavat kaaviot tehtiin Graphpad Prism (versio 10.2.2) -ohjelmistolla. Mittaustuloksille

suoritettiin Mann-Whitneyn U-testi, joka kertoo kahden riippumattoman otoksen välisen eron merkittävyyden. Alle 0,05 p-arvoa pidettiin tilastollisesti merkitsevänä.

Taulukko 1. Käytetty eluentigradietti.

Aika (min)	0,1% HCOOH (A, %)	0,1% HCOOH MeOH (B, %)
0	95	5
1,0	95	5
2,0	85	15
3,0	0	100
4,0	0	100
4,1	95	5
6,0	95	5

2.2.3 Näytteiden käsittely

Näytteiden käsittelyprotokollaa lähdettiin kehittämään artikkelissa Wolf et al. (2017) kuvatussa menetelmästä⁴⁷. Artikkelin menetelmässä käytettiin eri liuotinta ja derivatisaatiota, jota tässä tutkielmassa kehitetyssä menetelmässä ei käytetty. Hiiren ruskea rasva kerättiin 1,5 ml Rino-putkiin (Next Advance), jossa oli 100µl 1ppm sisäistä standardia metanolissa. Kudos jäädytettiin kuivajään avulla ja punnittiin. Näytettä saksittiin pienemmiksi paloiksi, minkä jälkeen putkeen lisättiin läpimitaltaan 0,5 mm zirkoniumoksidi kuulia. Kudos homogenisoitiin Qiagenin TissueLyserilla kylmähuoneessa (4°C). Kun kudosta oli homogenisoitu noin 20 min, näytteeseen lisättiin 100µl metanolia ja homogenisointia jatkettiin niin kauan, kunnes näyte oli täysin homogenisoitunut. Näyte suodatettiin käyttämällä proteiinin saostukseen tarkoitettua 96-kuoppalevyä (Merck) paineilman avulla. Suodatettu liuos pipetoitiin viaaleihin, joista haihdutettiin metanoli pois tyypeä ja lämmitystä (40°C) käyttäen. Haihdutuksen jälkeen näytteet resuspensoitiin 20µl LC-MS laatuiseen veteen.

2.3 Infrapunavalokuvat

Infrapunavalokuvilla analysoitiin ruskean rasvan lämpötilaa α CSF1-vasta-ainekäsittelyillä ja agonisti-injektoiduilla hiirillä. Esimerkiksi β 3-adrenergisten reseptorien agonisti-injektion toimiessa, ruskean rasvan lämpötilan pitäisi nousta injektion jälkeen, mikä kertoisi ruskean rasvan aktivoitumisesta. Lämpötilan nousu havaittaisiin infrapunavalokuvista. Kuvausta

edeltävästi hiiret otettiin huoneenlämpöön laatikkoon, jossa jokaisella oli oma osionsa. Vasta-ainekäsitteltyjen hiirten ruskean rasvan lämpötilan annettiin stabiloitua 30 min ennen infrapunavalokuvan ottamista. Agonisti-injektiokokeissa ruskean rasvan lämpötilan annettiin stabiloitua 10 min ennen kontrollikuvan ottamista. Lämpökuvat otettiin myös 5 min, 10 min ja 15 min agonisti-injektion jälkeen. Infrapunavalokuvat otettiin FLIR T620bx (FLIR Systems AB) lämpökameralla ja analysoitiin FLIR Thermal Studio -ohjelmalla (versio 2.0.11).

2.4 Makrofagien poistaminen kudoksesta α CSF1-vasta-ainekäsittelyllä syntymän jälkeen

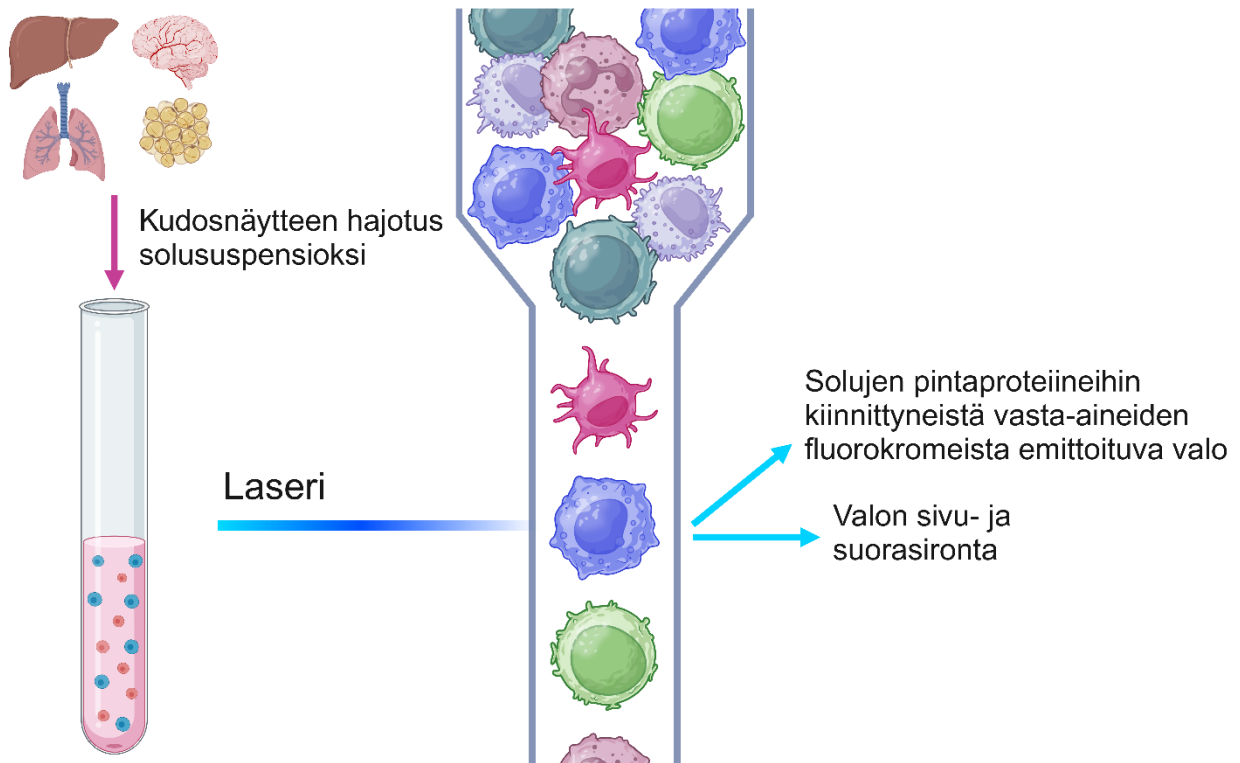
2.4.1 α CSF1-vasta-ainekäsittely

α CSF1-vasta-ainekäsittelyllä tutkittiin, vaikuttaako ruskean rasvan makrofagien poistaminen syntymän jälkeen ruskean rasvan toimintaan. CSF1 (*engl.* colony stimulating factor) stimuloi makrofagien kasvua ja proliferaatiota⁶¹. α CSF1-vasta-aine inhiboi tätä kyseistä kasvutekijää, jolloin makrofagit pyyhkiytyvät pois kudoksesta. α CSF1-vasta-ainetta injektoidiin 150 μ g fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS) yhden ja kolmen päivän ikäisiin hiiriin. Injektio tilavuus oli 20 μ l. Viiden päivän ikäisiin hiiriin vasta-ainetta injektoidiin 200 μ g PBS:ssä. Injektio tilavuus oli 30 μ l. Kontrollihiiriin injektoidiin vastaavasti IgG (immunoglobuliini G) -vasta-ainetta. Kaikki injektiot injektoidiin intraperitoneaalisesti eli hiiren vatsaonteloon. Kuuden päivän ikäisenä hiiristä otettiin infrapunavalokuvat edellä kuvatulla tavalla (kts. 2.3 Infrapunavalokuvat). Kudokset kerättiin yhden viikon ikäisiltä hiiriltä virtaussytometriin analyysiin sekä noradrenaliinin konsentraation mittausta varten.

2.4.2 Virtaussytometria

Virtaussytometrialla voidaan tutkia esimerkiksi tiettyä solupopulaatiota, kuten tässä tutkimuksessa on tutkittu makrofageja ja niiden määrää kudoksessa vasta-ainekäsittelyn jälkeen. Virtaussytometrisissa analyyseissä kerätty kudoksenäyte hajotetaan mekaanisesti ja/tai entsyymaattisesti yksisolususpensioksi. Solususpensio värjätään fluorokromikonjugoiduilla vasta-aineilla, jotka valitaan tutkittavan solupopulaation mukaisesti. Tässä tutkimuksessa solususpensio värjättiin vasta-aineilla, jotka sitoutuvat makrofagien pinnalla oleviin proteiineihin. Värjätty solususpensio johdetaan virtaussytometrian virtauskammioon. Solut kulkevat mittauskammiossa yksitellen lasersäteiden kohdalle. Detektori detektoi valon sivu- ja suorasiirtoa sekä vasta-aineisiin konjugoituneiden virittyneiden fluorokromien emittoimaa valoa. Kuvassa 9 on esitetty yksinkertaistetusti virtaussytometrian toimintaperiaate. Käytetty

laitteisto oli LSRFortessa-virtaussytometri (BD Biosciences) ja data analysoitiin FlowJo-ohjelmalla (versio 10.10).



Kuva 9. Virtaussytometrian toimintaperiaate. Kuva on luotu Biorender-ohjelmalla.

2.4.3 Kudosten keräys ja käsittely virtaussytometriä varten

Virtaussytometriin mittauksiin kerättiin yksiviikkoisilta α CSF1-vasta-ainekäsitellyiltä hiiriltä ruskea rasva. Kontrollikudoksena kerättiin kivekset, koska α CSF1-vasta-ainekäsittelyn on osoitettu poistavan sieltä kaikki makrofagit⁶². Ruskea rasva kerättiin kryoputkiin kylmään HBSS-liuokseen (Hanks' Balanced Salt Solution), ja kudosten rakenne hajotettiin mekaanisesti saksilla. Mekaanisen pilkkomisen jälkeen kudos hajotettiin entsyymaattisesti kollagenaasi D:llä (10 mg/ml) ja DNAasilla (2 mg/ml). Kudosnäytteitä pidettiin 60 minuuttia +37°C:ssa ja ravisteltiin manuaalisesti 15 minuutin välein. Tämän jälkeen näyte pipetoitiin edestakaisin huolellisesti kudossmassan homogenisoimiseksi ja suodatettiin silkkikankaan (77 μ m) läpi 5 ml näyteputkeen. Näytteen solut sentrifugoitiin putken pohjalle (1006 g, 1,5 min). Supernatantti eli pohjalle laskeutuneiden solujen ylle jäävä liuos kaadettiin pois ja solut pestiin kerran 1 ml HBSS-liuoksella pipetoiden edestakaisin. Näyte sentrifugoitiin uudelleen näyteputken pohjalle ja supernatantti kaadettiin pois. Lopuksi näytteeseen lisättiin 300 μ l HBSS-liuosta samalla pipetoiden näytettä edestakaisin. Näyte suodatettiin uudelleen silkkikankaan läpi uuteen 5 ml näyteputkeen ennen vasta-ainejärjystä.

Kivekset kerättiin 24-kuoppalevyille kylmään HBSS-liuokseen. Kiveksille tehtiin samankaltainen mekaaninen ja entsyymaattinen hajotus kuin yksiviikkoisten hiirten ruskealle rasvalle. Kivesten rakenne hajotettiin mekaanisesti pinseteillä repimällä, minkä jälkeen kudokset hajotettiin entsyymaattisesti kollagenaasi D:llä (10 mg/ml) ja DNAasilla (2 mg/ml). Kudosnäytteitä pidettiin 30 minuuttia +37°C:ssa. Näyte pipetoitiin edestakaisin kudosmassan homogeenisoimiseksi ja suspensio suodatettiin silkkikankaan (77 µm) läpi 5 ml näyteputkeen. Näytteen solut sentrifugoitiin samalla tavalla kuin ruskean rasvakudoksen näytteet. Näyteputken pohjalle jääneet solut pestiin 1 ml PBS-liuosta pipetoiden edestakaisin. Näyte sentrifugoitiin uudelleen näyteputken pohjalle ja supernatantti kaadettiin pois. Lopuksi näytteeseen lisättiin 300 µl PBS-liuosta samalla pipetoiden näytettä edestakaisin.

2.4.4 Solujen vasta-ainevärjäys

Kudoksista eristetyt solut siirrettiin 96-kuoppalevyille ja sentrifugoitiin näytekaivon pohjalle (1500 rpm, 3 min, Eppendorf Centrifuge 5810 R). Koska vasta-aineet ovat taipuvaisia epäspesifiseen sitoutumiseen kuolleissa soluissa, solut värjättiin ensin eläväsolumarkkerilla (Live eFluor™780), joka laimennettiin suhteessa 1:1000 PBS:ään (30 minuuttia). Eläväsolumarkkeri värjää kuolleet ja kuolevat solut, milloin ne pystytään erottamaan elävistä soluista ja jättämään analysoitavien solujen ulkopuolelle. Sitoutumaton väriaine pestiin pois EPICS I:llä (250 µl/kaivo). Vasta-ainevärjäyksessä käytettyjen EPICS-liuosten valmistusohjeet on esitetty liitteissä. Pesut EPICS I:llä tehtiin kaksi kertaa ja niiden välissä solut sentrifugoitiin näytekaivon pohjalle (1500 rpm, 3 min), supernatantti heitettiin pois ja soluja pipetoitiin edestakaisin pesuliuoksessa. Näytteitä pidettiin 5 minuuttia Fc-blokissa (CD16/32) vasta-aineiden epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi. Tämän jälkeen solut resuspensoitiin 100 µl vasta-aine-EPICS I -liuokseen. Tutkimuksessa käytettyjen vasta-aineiden tarkemmat tiedot on esitetty taulukossa 2. Vasta-aineiden annettiin sitoutua 30 minuuttia, jonka jälkeen näytteet pestiin EPICS I:llä (250 µl/kaivo) samalla tavalla kuin edellä. Näytteet pidettiin koko vasta-ainevärjäyksen ajan jäillä ja valolta suojattuna. Värjäyksen lopuksi solut fiksattiin EPICS fix -liuoksella (250 µl/kaivo) ja näytteet säilytettiin +4°C:ssa. Värjätyt näytteet analysoitiin vuorokauden kuluessa värjäyksestä.

2.4.5 Käytetyt reagenssit

Makrofagien poistamiseen kudoksesta käytetyn vasta-aineen α CSF1 ja kontrollina käytetyn IgG valmistaja oli Bio X Cell (Lebanon, New Hampshire, Yhdysvallat). Fosfaattipuskuroidun

suolaliuoksen (PBS) valmistaja oli Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Yhdysvallat). Virtausytometrisissa analyyseissä käytetyn HBSS-liuoksen ja kudosten entsyymattiseen hajotukseen käytettyjen entsyymien valmistajat olivat Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Yhdysvallat). Solujen vasta-aineväryyksessä käytetyn elävsolumarkkerin valmistaja oli eBioscience (Santa Clara, Kalifornia, Yhdysvallat). Muiden vasta-aineväryyksessä käytettyjen vasta-aineiden valmistajat olivat BioLegend (San Diego, Kalifornia, Yhdysvallat), BD Bioscience (Franklin Lakes, New Jersey, Yhdysvallat), eBioscience (Santa Clara, Kalifornia, Yhdysvallat), BioRad (Hercules, Kalifornia, Yhdysvallat) ja Bio X Cell (Lebanon, New Hampshire, Yhdysvallat). Taulukossa 2 on esitetty virtausytometrisissa analyyseissä käytettyjen vasta-aineiden yksityiskohdat.

Taulukko 2. Virtausytometriassa käytetyt fluorokromikonjugoidut vasta-aineet.

Antigeeni	Fluorokromi	Isäntä -eläin	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennos- suhde
CD16/32	-	hiiri	InVivoMab #BE0307	1:100
CD11b	BV786	rotta	BD 740861	1:200/1:400
CD11c	BV605	hamsteri	BioLegend 117333	1:200
CD45	PerCP-Cy5,5	rotta	BD 550994	1:200
CD64	PE	hiiri	BioLegend 139304	1:200
CD115	Pe-Cy7	rotta	eBioscience 25-1152-82	1:400
CD163	APC	rotta	BioLegend 155306	1:500
CD206	BV650 Pe/Dazzle	rotta	BioLegend 141723 BioLegend 141732	1:200
CX3CR1	BV650	hiiri	BioLegend 149033	1:200
F4/80	A647 A488	rotta	BioRad MCA497A647 eBioscience 53-4801-82	1:100 1:200
LY6C	BV421	rotta	BD 562727	1:200
MHCII	A488 BV711	rotta	BD 562352 BD563414	1:500 1:400
P2RY12	A488	rotta	BioLegend 848015	1:200
TIM4	PE-Cy7	rotta	BioLegend 130010	1:200

2.5 β 3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektiot

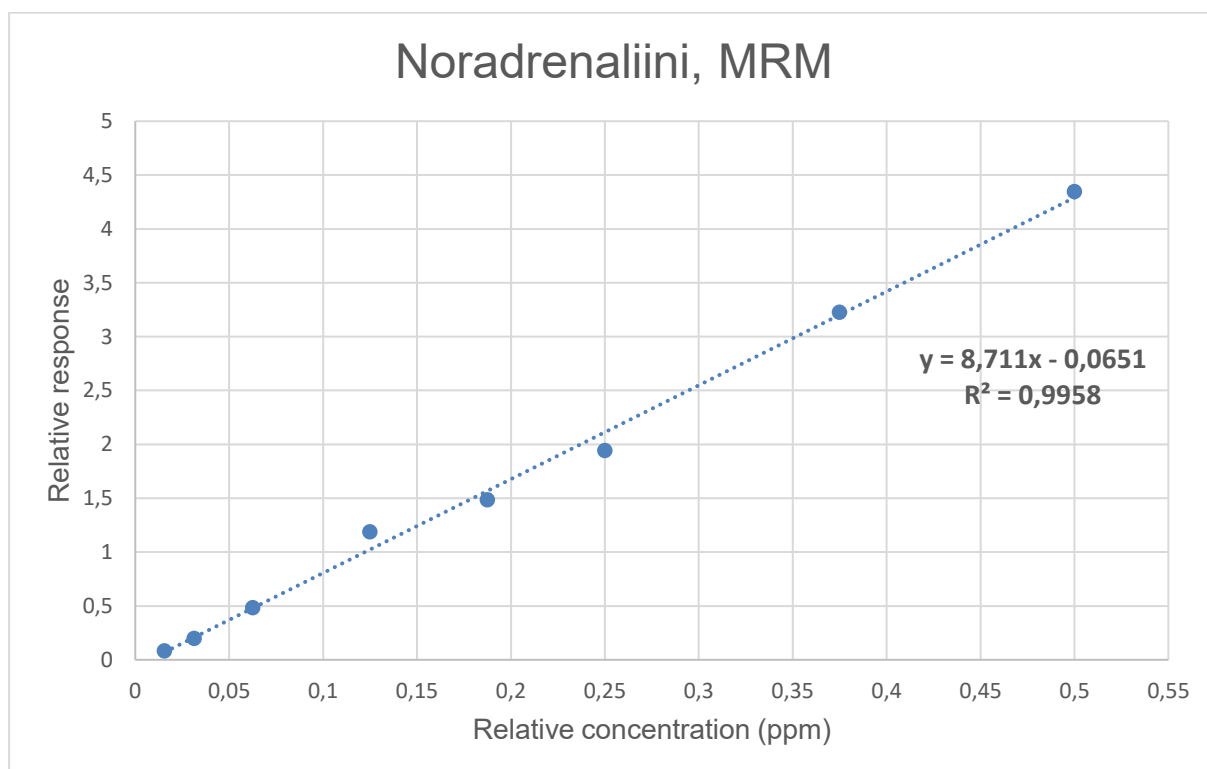
CL316,243-agonistin injektioprotokolla on aikaisemmin optimoitu aikuisille hiirille^{53,63-65}, mutta ei vastasyntyneille. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia vastasyntyneiden hiirten ruskean rasvan toimintaa, minkä takia päätettiin optimoida kyseinen protokolla alle viikon ikäisille hiirille. Infrapunavalokuvat otettiin aiemmin kuvatulla tavalla (kts. 2.3 Infrapunavalokuvat). Glukoosiliuosta annettiin samalla tavalla kuin artikkelissa Tremblay et al. (2017)⁶⁶. Sokeriliuos syötettiin pipetillä hiiren suuhun kontrollikuvan jälkeen ennen agonisti-injektiota. Hiirille annettava glukoosimäärä oli 0,1 - 0,2 g/kg. Hiirille syötettävän glukoosiliuoksen tilavuus suhteutettiin hiirten painoon. Glukoosiliuoksen valmistaja oli Baxter (Deerfield, Illinois, Yhdysvallat). Agonistia injektoitiin 20 μ l 1 mg/kg tai 0,5 mg/kg PBS:ssä intraperitoneaalisesti. Agonisti-injektioihin käytetyn kiinteän CL316,243 valmistaja oli Tocris (Bristol, Iso-Britannia). Kontrollihiireen ei injektoitu agonistia, vaan pelkkää suolaliuosta. Kokeiden loputtua hiiret lopetettiin dekapitaatiolla ja verensokeri mitattiin joko hännän verisuonesta, suoraan sydäimestä tai dekapitaatiosta saadusta verestä. Verensokerin mittaukseen käytettiin Contour XT verensokerimittaria (BAYER) sekä Contour next verensokeriliuskoja (BAYER). Tuloksia kuvaavat kaaviot tehtiin Graphpad Prism (versio 10.2.2) -ohjelmistolla. Mitatuille verensokeriarvoille suoritettiin Mann-Whitneyn U-testi. Alle 0,05 p-arvoa pidettiin tilastollisesti merkitseväenä.

3 Tulokset

3.1 Noradrenaliinin konsentraation mittausta ruskeasta rasvasta

3.1.1 MRM-menetelmän standardisuoran optimointi ja ioniparireagenssin tarpeellisuuden tutkiminen

Noradrenaliinin standardisuora konsentraation määrittämiseksi tehtiin kiinteästä noradrenaliinista. Noradrenaliinia punnittiin 10 mg ja se liuotettiin 10 ml LC-MS-laatuiseen veteen. Kantaliuoksesta tehtiin laimennos, jonka pitoisuus oli 1 ppm eli sama kuin käytetyllä sisäisellä standardilla. Kyseisestä laimennoksesta tehtiin laimennossarja, jonka jokaiseen näytteeseen pipetoitiin lopuksi 100 µl 1 ppm sisäistä standardia metanolissa. Laimennossarjasta määritettiin jokaisen ajon yhteydessä noradrenaliinin kvantitoimiseen käytettävä standardisuora Agilent Masshunter Quantitative Analysis -ohjelmistolla (kuva 10).



Kuva 10. Noradrenaliinin konsentraation määrittämiseen käytetty standardisuora.

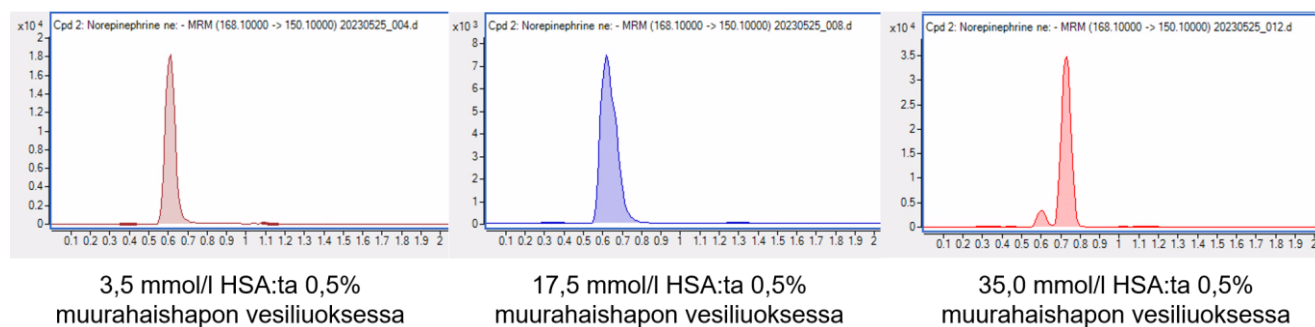
Noradrenaliinin konsentraation määrittämisessä biologisista näytteistä LC-MS -menetelmiä käyttäen on osoitettu olevan monia haasteita. Ongelmia ovat noradrenaliinin lyhyt retentioaika, yhdisteen epästabiilius, valoherkkyys ja matalat konsentraatiot. Näytteen derivatisoinnin tai ioniparireagenssin käytön on osoitettu pidentävän yhdisteen retentioaikaa^{59,67}. Menetelmää kehitettäessä testattiin ioniparireagenssina 1-heptaanisulfonihapon natriumsuolan monohydraattia (HSA), jota on käytetty noradrenaliinin retentioajan pidentämiseksi⁶⁰.

Ioniparireagenssin lisääminen tekee näytteen yhdisteet varauksettomiksi ja näin syntyneen poolittoman yhdisteen retentioaika kasvaa. Ioniparireagenssin voi lisätä joko ajoliuokseen tai suoraan ajettavaan näytteeseen näytteiden käsittelyn viimeisessä vaiheessa, kuten tässä tutkimuksessa tehtiin. Ioniparireagenssia testattiin kolmella eri konsentraatiolla, testattujen näytteiden tiedot ja havaittu retentioaika on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Ioniparireagenssin testinäytteiden tiedot.

Noradrenaliinin konsentraatio näytteessä (ppm)	HSA:n konsentraatio 0,5% muurahaishapon vesiliuoksessa (mmol/l)	Retentioaika (min)
1	3,5	0,606
1	17,5	0,615
1	35,0	0,725

Testinäytteiden havaitut piikit on esitetty kuvassa 11. HSA:n ei havaittu pidentävän retentioaikaa merkittävästi. Korkeammilla pitoisuuksilla (35,0 mmol/l) havaittiin piikin jakautuminen, jonka on osoitettu olevan yksi ioniparireagenssin käytön haasteista ja vaikeuttavan analyysiä⁵⁹. Ioniparireagenssi HSA:ta päätettiin olla käyttämättä edellä mainittujen havaintojen takia ja koska kehitetyllä menetelmällä pystyttiin luotettavasti kvantitoimaan noradrenaliini ilman ioniparireagenssiäkin.

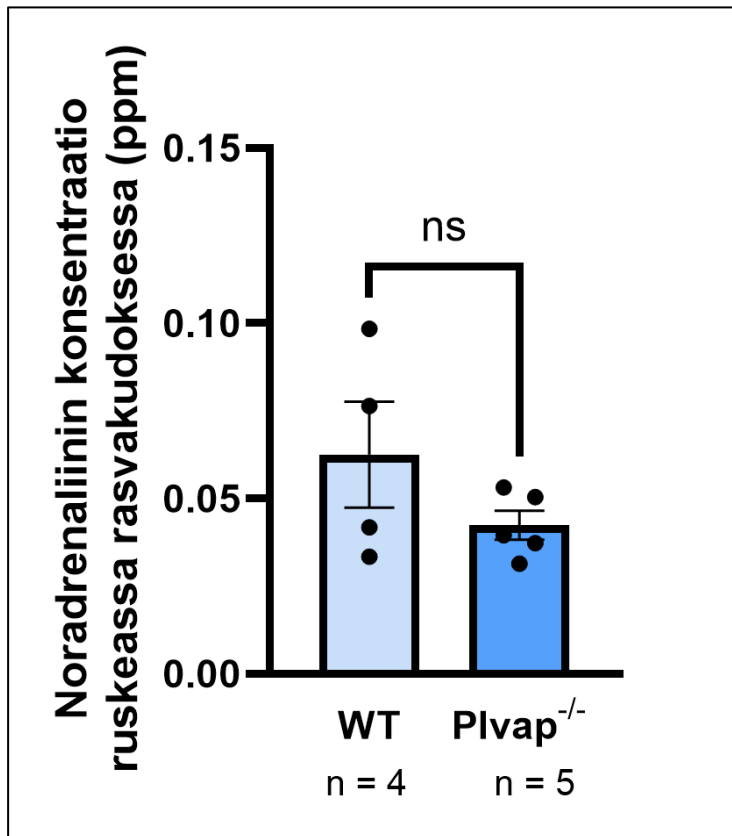


Kuva 11. Ioniparireagenssin testinäytteiden havaitut piikit.

3.1.2 Alkion maksassa kehittyvien makrofagien puutteen vaikutus noradrenaliinin konsentraatioon ruskeassa rasvakudoksessa

Plvap^{-/-}-hiirillä on osoitettu ruskean rasvakudoksen lämmöntuoton olevan heikentynyt. Noradrenaliini on tärkeä osa ruskean rasvan aktivoitumista, joten syytä makrofagipuutteisen hiiren lämmöntuoton heikentymisestä tutkittiin noradrenaliinin konsentraatiosta kudoksessa. Yksiviikkoisilta Plvap^{-/-}-hiiriltä kerätyt näytteet käsiteltiin kehitetyllä protokollalla ja noradrenaliinin konsentraation mittaukset suoritettiin optimoidulla kvantitatiivisella MRM-menetelmällä. Molemmat menetelmät todettiin toimiviksi ja noradrenaliinin konsentraation

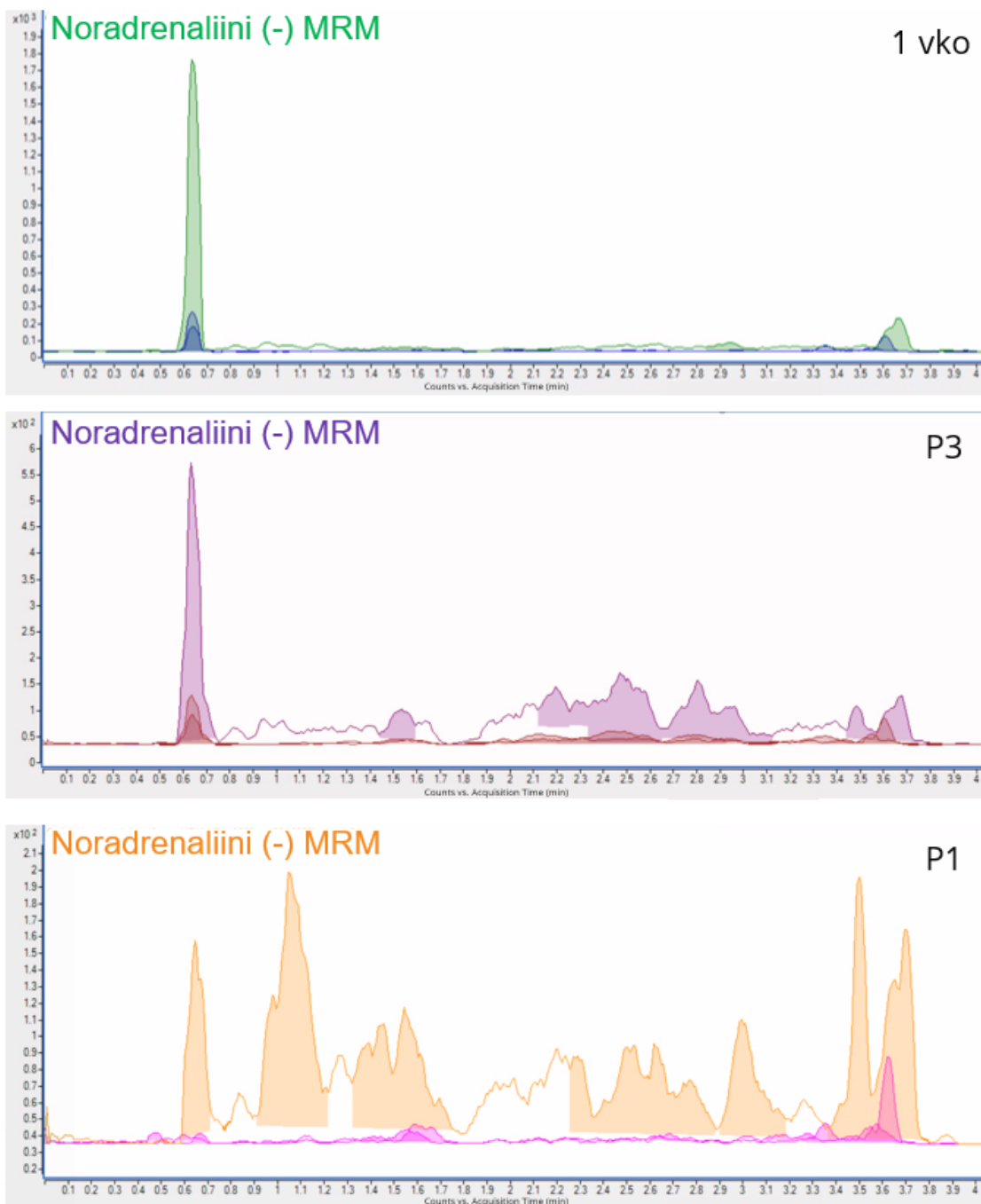
mittaustulokset yksiviikkoisilta Plvap-hiiriltä on esitetty kuvassa 12. Noradrenaliinin konsentraatiossa Plvap^{-/-} ja WT-hiirien välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa (p-arvo 0,4127), vaikka pientä alenemaa oli havaittavissa.



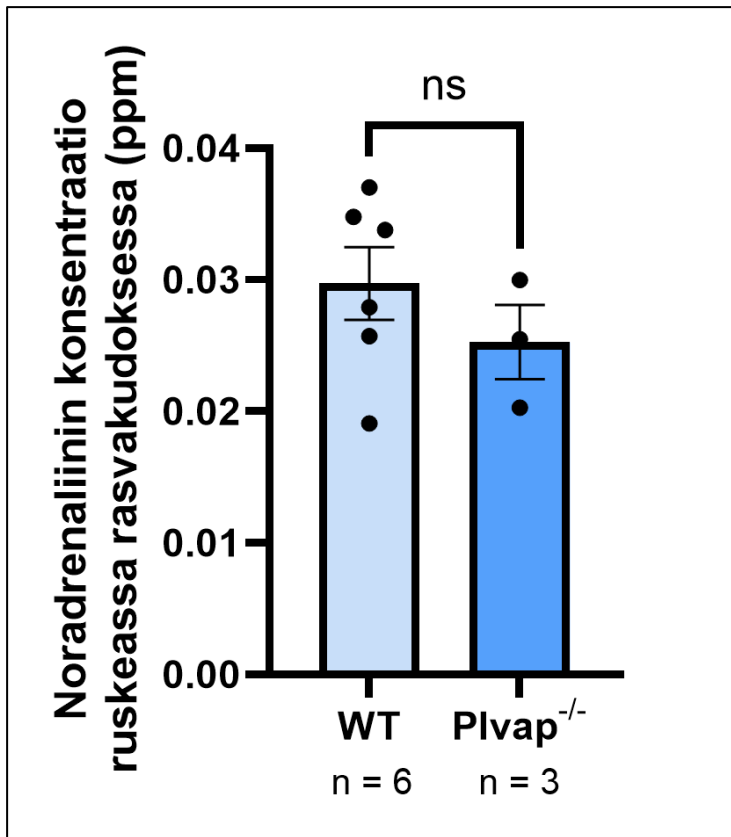
Kuva 12. Noradrenaliinin konsentraation mittaustulokset yhden viikon ikäisten Plvap-hiirten ruskeasta rasvasta (ns = not significant).

Plvap^{-/-}-hiiriltä puuttuu alkioikaudella maksassa kehittyvät makrofagit, mutta alkioikaudella ruskuaispussissa ja syntymän jälkeen luuytimessä kehittyvät makrofagit kehittyvät ja kulkeutuvat kudoksiin normaalisti⁵⁸. Syntymän jälkeen noin yhden viikon iässä luuytimessä kehittyvät makrofagit alkavat korvaaman alkioikaudella kehittyneitä makrofageja ruskeassa rasvakudoksessa. Nämä makrofagit todennäköisesti hoitavat tehtävänsä kudoksessa, jolloin noradrenaliinin konsentraatiossa ei havaita merkittävää eroa yhden viikon iässä makrofagipuutteisen ja WT-hiiren välillä. Tämän takia noradrenaliinin konsentraatiota päätettiin mitata vielä nuoremmilta hiiriltä, joilla luuytimessä kehittyneet makrofagit eivät olisi vielä kulkeutuneet kudoksiin. Kehitettyllä menetelmällä kokeiltiin mitata noradrenaliinin konsentraatiota ruskeasta rasvasta yhden päivän ikäisiltä (P1) hiiriltä, mutta menetelmä ei ollut tarpeeksi herkkä niin matalan konsentraation määrittämiseksi (kuva 13). Kolmen päivän ikäisiltä (P3) Plvap-hiiriltä onnistuttiin mittaamaan noradrenaliinin konsentraatio ja nämä mittaustulokset on esitetty kuvassa 14. Myöskään kolmen päivän ikäisten Plvap^{-/-} ja WT-

hiirten välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa noradrenaliinin konsentraatiossa (p-arvo 0,3810). Yhden viikon ja kolmen päivän ikäisten hiirten mittaustuloksissa ei ollut yhtään tilastollisesti poikkeavaa arvoa, jotka olisi pitänyt jättää analyyseissä huomioimatta. Alkiokaudella maksassa kehittyvien makrofagien puute heikentää ruskean rasvan lämmöntuottoa, mutta syy ei ole noradrenaliinin vapautumisessa sympaattisista hermoista.



Kuva 13. Mitattu kromatogrammi ruskean rasvan näytteistä eri-ikäisiltä P1vap-hiiriltä.

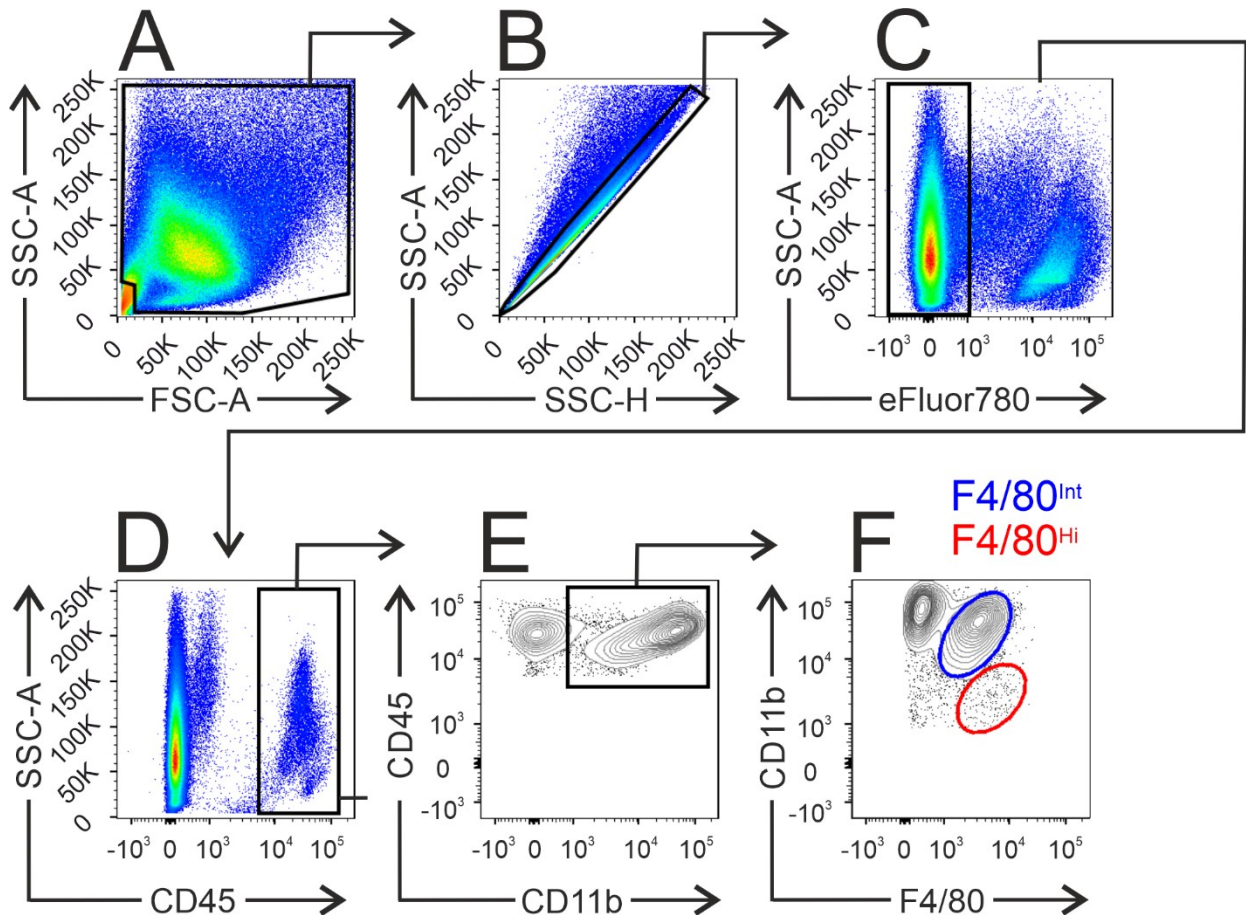


Kuva 14. Noradrenaliinin konsentraation mittaustulokset kolmen päivän ikäisten Plvap-hiirten ruskeasta rasvasta (ns = not significant).

3.2 Makrofagien poistaminen ruskeasta rasvasta syntymän jälkeen α CSF1-vasta-ainekäsittelyllä

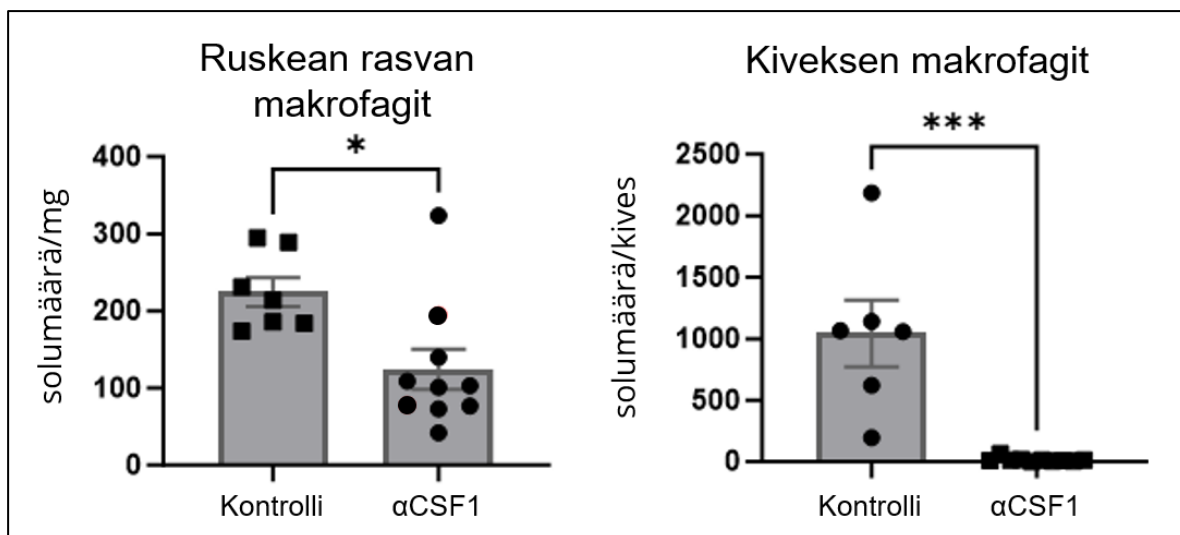
3.2.1 Virtaussytometrinen analyysi

Virtaussytometrillä varmistettiin makrofagien pyyhkiytyminen pois kudoksesta α CSF1-vasta-ainekäsittelyn jälkeen. Solupopulaatiot analysoitiin FlowJo-ohjelmalla valon sirontaominaisuuksien ja vasta-aineisiin konjugoitujen fluorokromien emittoiman valon perusteella. Valon sivu- (SSC) ja suorasiroonnan (FSC) perusteella analyyseistä suljettiin pois toisiinsa takertuneet ja jakautumassa olevat solut sekä soludebris. Analyysiä jatkettiin rajaamalla kuolleet solut pois. Tarkastelun kohteeksi rajattiin myeloidisista valkosoluista (CD45+CD11b⁺ -solut) F4/80⁺-makrofagit, jotka jakautuvat vielä kahteen makrofagipopulaatioon F4/80-ekspression mukaan. F4/80^{hi}-makrofagit ovat alkioikaudella ruskuaispussissa kehittyneitä ja F4/80^{int}-makrofagit ovat alkioikaudella maksassa kehittyneitä makrofageja^{39,41,62,68}. Virtaussytometrisen analyysiprosessin malli on esitetty kuvassa 15.



Kuva 15. Solupopulaatiot rajattiin virtausytometrisen analyysiprosessin mukaisesti. Analyysistä rajattiin pois soludebris ja verisolut (A), soluduplikaatit (B) ja kuolleet solut (C). Tämän jälkeen tarkastelun kohteeksi rajattiin myeloidiset valkosolut (D ja E). Lopuksi analysoitiin makrofagien määrää ruskeassa rasvakudoksessa (F).

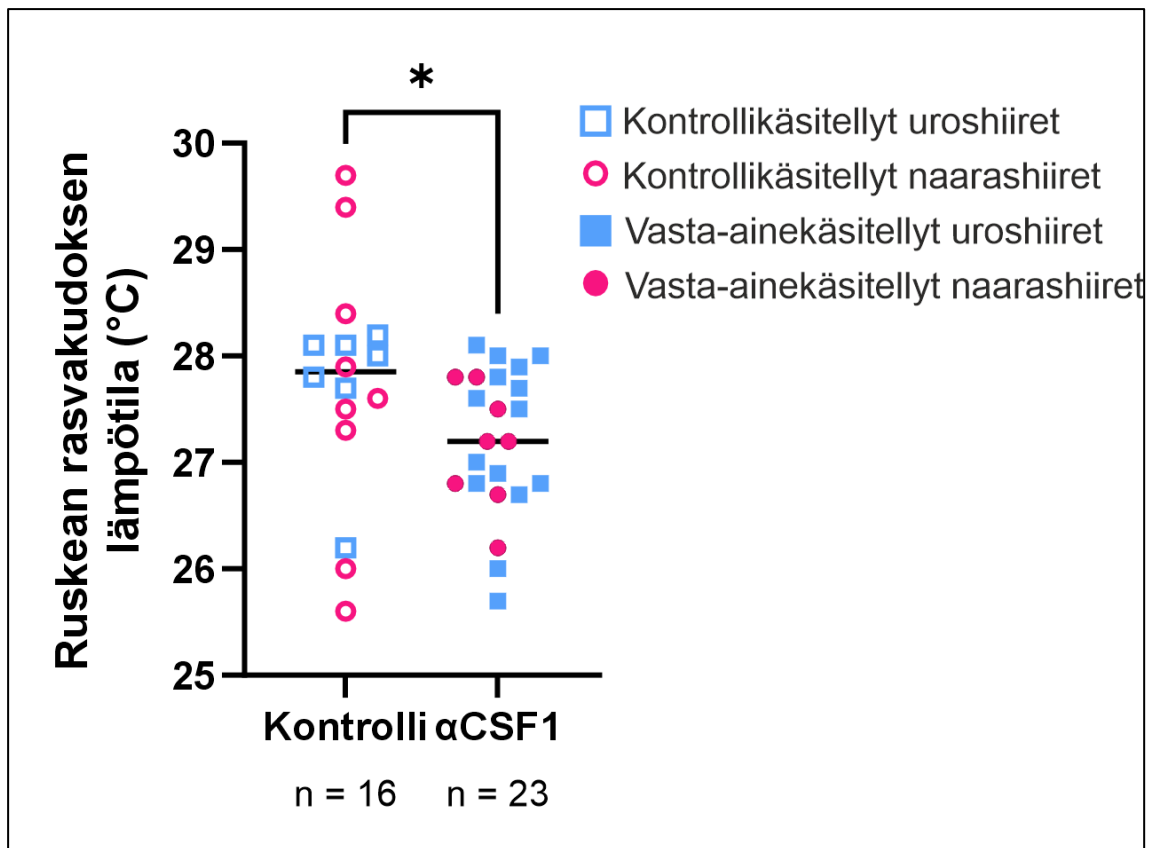
Virtausytometrisen analyysin perusteella α CSF1-vasta-ainekäsittely onnistui. Kiveksestä saatiin poistettua kaikki makrofagit ja ruskeasta rasvasta merkittävä määrä makrofageja (kuva 16). Makrofagien määrässä oli tilastollisesti merkittävä ero kontrollin ja vasta-ainekäsittelyn välillä (ruskean rasvan p-arvo on 0,0136 ja kiveksen p-arvo on 0,0002). Rantakarim tutkimusryhmä Turun Biotiedekeskukselta on tehnyt useita kokeita ruskean rasvan makrofagien poistamiseksi erilaisilla vasta-aineilla (dataa ei julkaistu). Niiden perusteella ruskean rasvan makrofageja on hyvin vaikea poistaa kudoksesta vasta-ainekäsittelyllä, joten tämä koe oli niihin verrattuna hyvin onnistunut.



Kuva 16. Virtausytometrian perusteella vasta-ainekäsittely on onnistunut, kudoksista on poistettu makrofageja syntymän jälkeen.

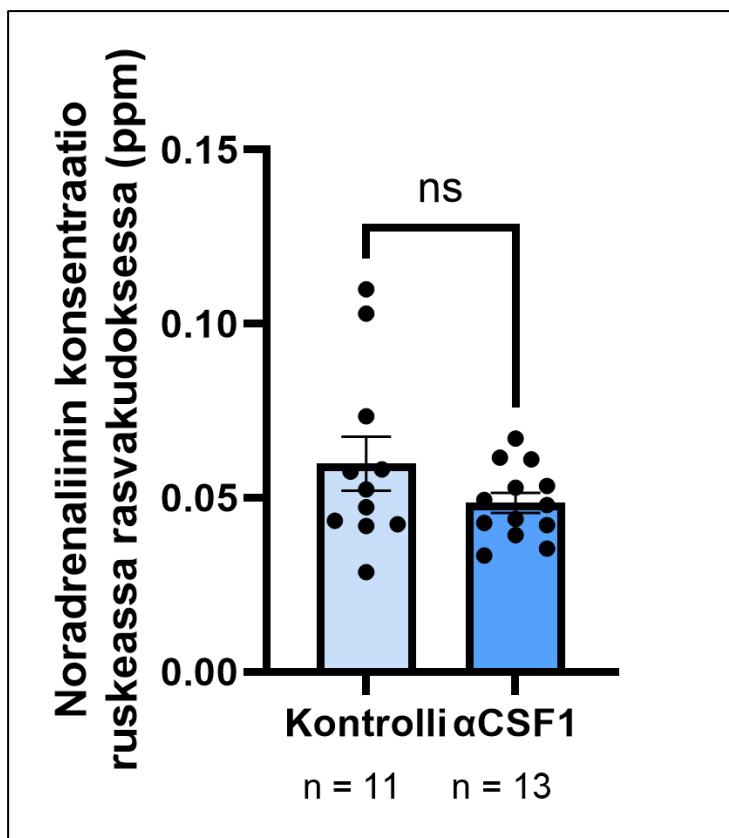
3.2.2 Makrofagien poistamisen vaikutus ruskean rasvakudoksen toimintaan

Virtausytometrisella analyysillä osoitettiin, että α CSF1-vasta-ainekäsittely poisti ruskeasta rasvakudoksesta makrofageja. Noradrenaliinin konsentraatio ja ruskean rasvakudoksen lämpötila määritettiin vasta-ainekäsitellyiltä hiiriltä, koska tutkittiin vaikuttaako makrofagien poistaminen syntymän jälkeen kudoksen toimintaan. Ruskean rasvan lämpötilan mittaustulokset on esitetty kuvassa 17. Vaikka vasta-ainekäsiteltyjen ja kontrollihiiren ruskean rasvan lämpötilassa on tilastollisesti merkittävä ero (p-arvo 0,0452), lämpötilat jakautuvat hyvin tasaisesti. Tuloksen tilastollinen merkitsevyys voi johtua siitä, että kontrollihiiren ruskean rasvan lämpötiloissa on muutama ääripääarvo. Vaikka tulos on tilastollisesti merkittävä, siitä ei voida luotettavasti vetää johtopäätöstä siitä, että makrofagien poistaminen ruskeasta rasvakudoksesta syntymän jälkeen heikentäisi kudoksen lämmöntuottoa. Vasta-ainekäsittely on toistettu yhdeksän kertaa ja lämpökuvien ottaminen kuusi kertaa.



Kuva 17. Ruskean rasvakudoksen lämpötila vasta-ainekäsittelyn jälkeen.

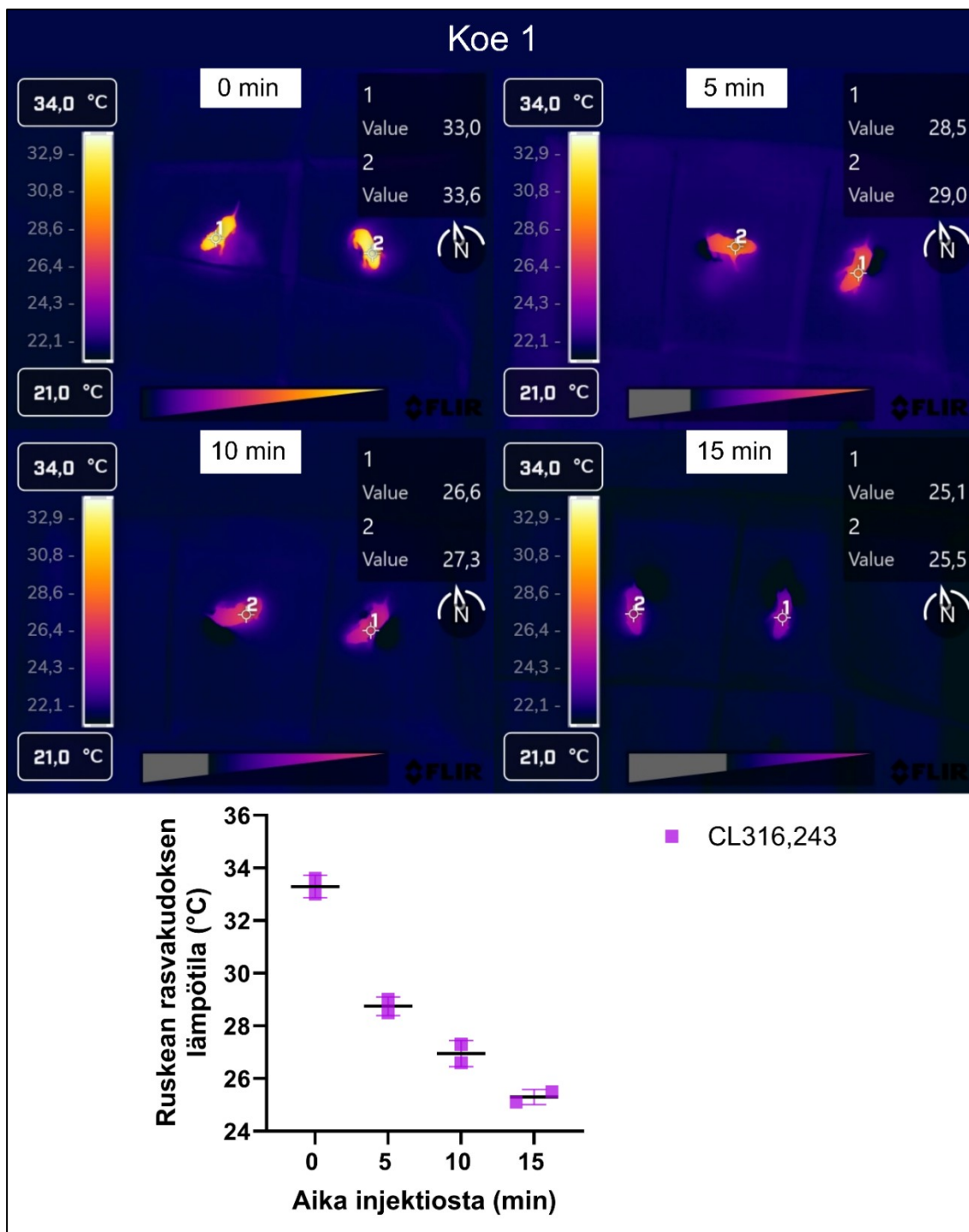
Ruskean rasvan toimintaa α CSF1-vasta-ainekäsittelyn jälkeen tutkittiin myös mittaamalla noradrenaliinin konsentraatio ruskeassa rasvassa (mittaustulokset on esitetty kuvassa 18). Makrofagien poistaminen ruskeasta rasvasta syntymän jälkeen ei aiheuttanut tilastollisesti merkitsevää eroa (p-arvo 0,4585) noradrenaliinin konsentraatioon makrofagipuutteisen ja kontrollihiiren välille. Ruskean rasvakudoksen lämpötilan ja noradrenaliinin konsentraation mittaustuloksissa ei ollut yhtään tilastollisesti poikkeavaa arvoa, jotka olisi pitänyt jättää analyseissä huomioimatta. Syntymän jälkeen makrofagien pyyhkiminen pois kudoksesta ei vaikuta ruskean rasvan aktiivisuuteen. Huomioon täytyy ottaa se, että vasta-ainekäsittelyllä ei pystytty poistamaan kaikkia makrofageja kudoksesta, kuten virtaussytmetrinen analyysi osoitti (kuva 16).



Kuva 18. Noradrenaliinin mittaustulokset yhden viikon ikäisiltä vasta-ainekäsitellyiltä hiiriltä.

3.3 β3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektiot

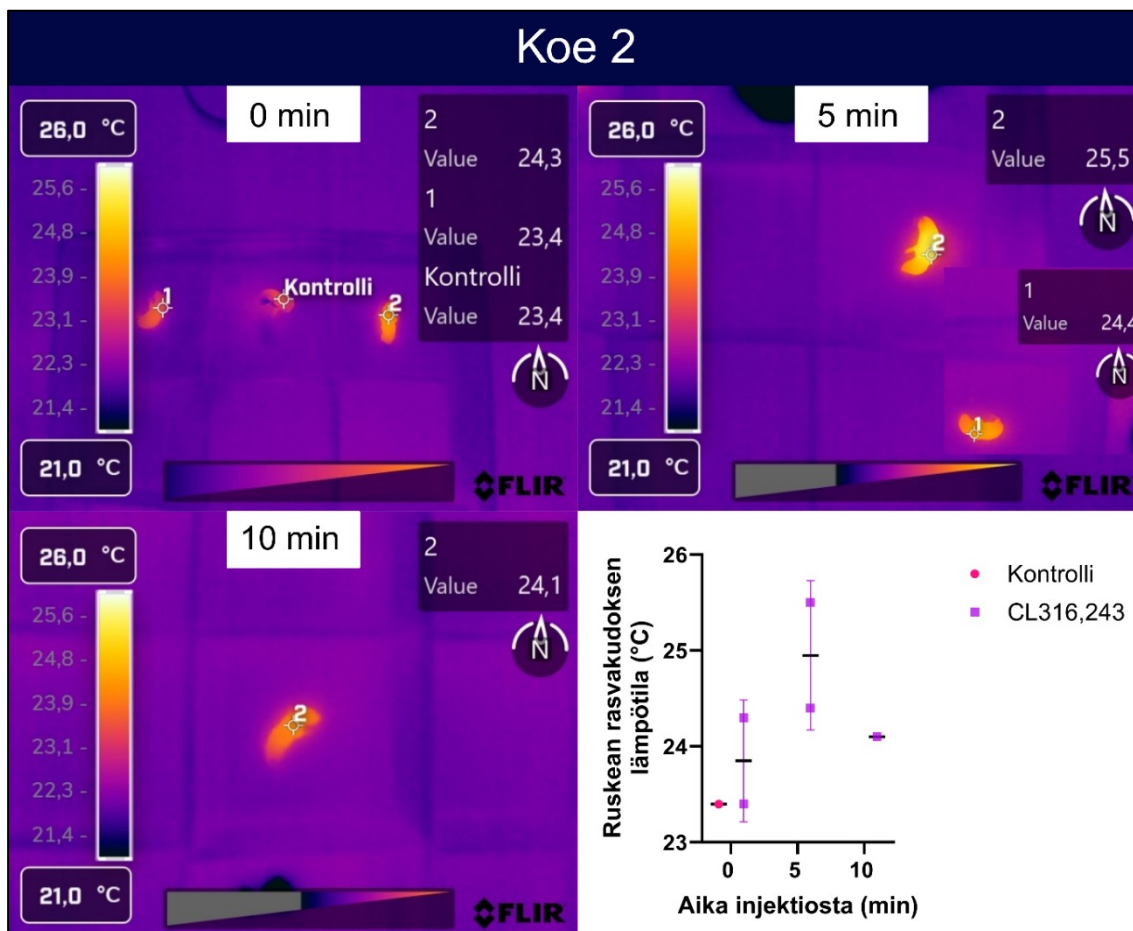
Tarkoituksena oli optimoida CL316,243-agonistin injektioprotokolla alle viikon ikäisille hiirille niiden ruskean rasvan toiminnan ja aktivoitumisen tutkimiseen. Ensimmäisessä kokeessa agonistia injektioitiin 20 µl 1 mg/kg PBS:ssä kahteen neljä päivää vanhaan naarashiireen. Lämpökuvat otettiin ennen injektioita (0 min), ja 5 min, 10 min ja 15 min injektioiden jälkeen. Tarkoituksena oli ottaa infrapunavalokuvat myös 30 min ja 60 min injektioiden jälkeen, mutta hiiret osoittivat hypotermian oireita, jolloin ne asetettiin lämpömatolle. Odotettua lämpötilan nousua ei havaittu (kuva 19). Hypotermian oireet johtuivat mahdollisesta agonistin yliannostuksesta. Yliannostukseen viittasi myös nopea verensokerin lasku, joka näkyi hiirten normaalia runsaampana virtsaamisena. Agonistin konsentraatiota päätettiin laskea seuraavaan kokeeseen, jotta edellä mainituilta yliannostuksen oireilta välttyttäisiin.



Kuva 19. Ensimmäisen $\beta 3$ -agonisti-injektiokokeen infrapunakuvat ja ruskean rasvakudoksen lämpötilan muuttuminen kokeen aikana kuvaajalla havainnollistettuna.

Toiseen toistoon agonistin konsentraatio laskettiin 0,5 mg/kg. Toisessa kokeessa agonistia injektoidiin kahteen yhden päivän ikäiseen hiireen ja pelkkää suolaliuosta yhteen samanikäiseen hiireen. Hiirillä ei ollut maitotäplää mahassa, joka tarkoittaa sitä, että emo ei ollut syöttänyt niitä. Tämän on osoitettu vaikuttavan negatiivisesti ruskean rasvan lämmöntuottoon eli emon pitäisi syöttää, jotta ruskean rasvan lämmöntuotto voisi luonnollisesti aktivoitua⁶⁹. Koe lopetettiin jo 10 min injektoiden jälkeen, koska hiiret muuttivat väriä sinertäväksi, ne olivat

passiivisia ja tärisivät. Lämpökuvista havaittiin ruskean rasvan lämpötilan nousu 5 min injektioiden jälkeen (kuva 20), mikä johtui todennäköisesti agonistista. Koetta ei kuitenkaan voi selvästikään tehdä näin nuorilla hiirillä muiden sivuoireiden takia.

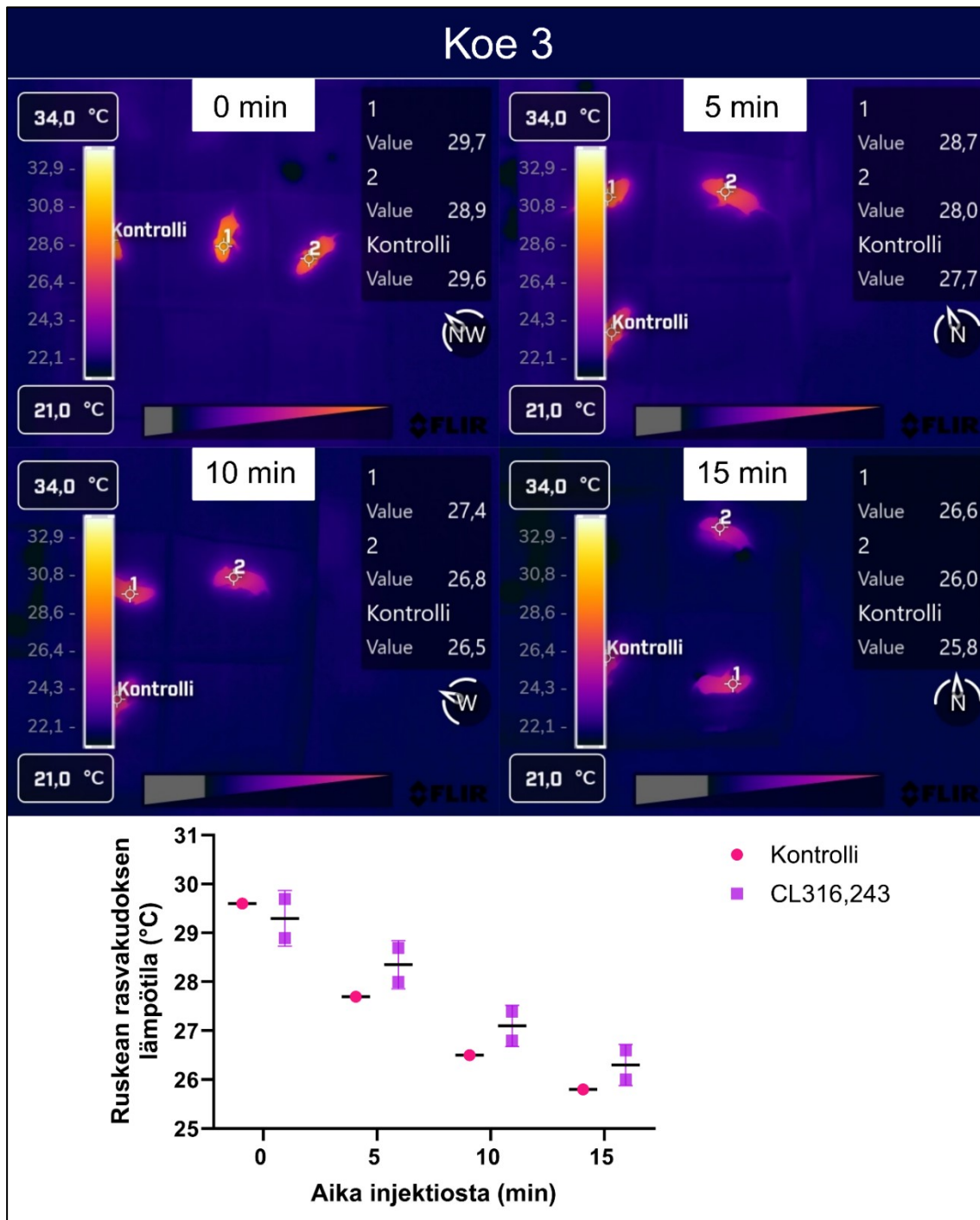


Kuva 20. Toisen β_3 -agonisti-injektiokokeen infrapunakuvat ja ruskean rasvakudoksen lämpötilan muuttuminen kokeen aikana kuvaajalla havainnollistettuna.

Kolmannessa toistossa agonistia injektoidiin 0,5 mg/kg kahteen ja suolaliuosta yhteen viisi päivää vanhaan naarashiireen. Infrapunakuvat otettiin kuten ensimmäisessä toistossa ja verensokeri päätettiin mitata joko hännän verisuonesta tai suoraan sydäimestä. Verensokeri mitattiin, koska haluttiin osoittaa sivuoireiden (runsaampi virtsaaminen, passiivisuus, täriseminen) johtuvan agonistin aiheuttamasta verensokerin laskusta. Verensokeri yritettiin mitata heti dekapitaation jälkeen, mutta hännän verisuonen löytäminen todettiin mahdottomaksi. Verensokeri mitattiin sydäimestä saadulla verellä ja tulokset ovat esitetty taulukossa 4. Mitatut verensokeriarvot eivät ole luotettavia, koska mittaukset tapahtuivat viiveellä dekapitaatiosta. Odotettua lämpötilan nousua ei myöskään havaittu (kuva 21).

Taulukko 4. Verensokerimittauksen tulokset agonisti-injektion jälkeen.

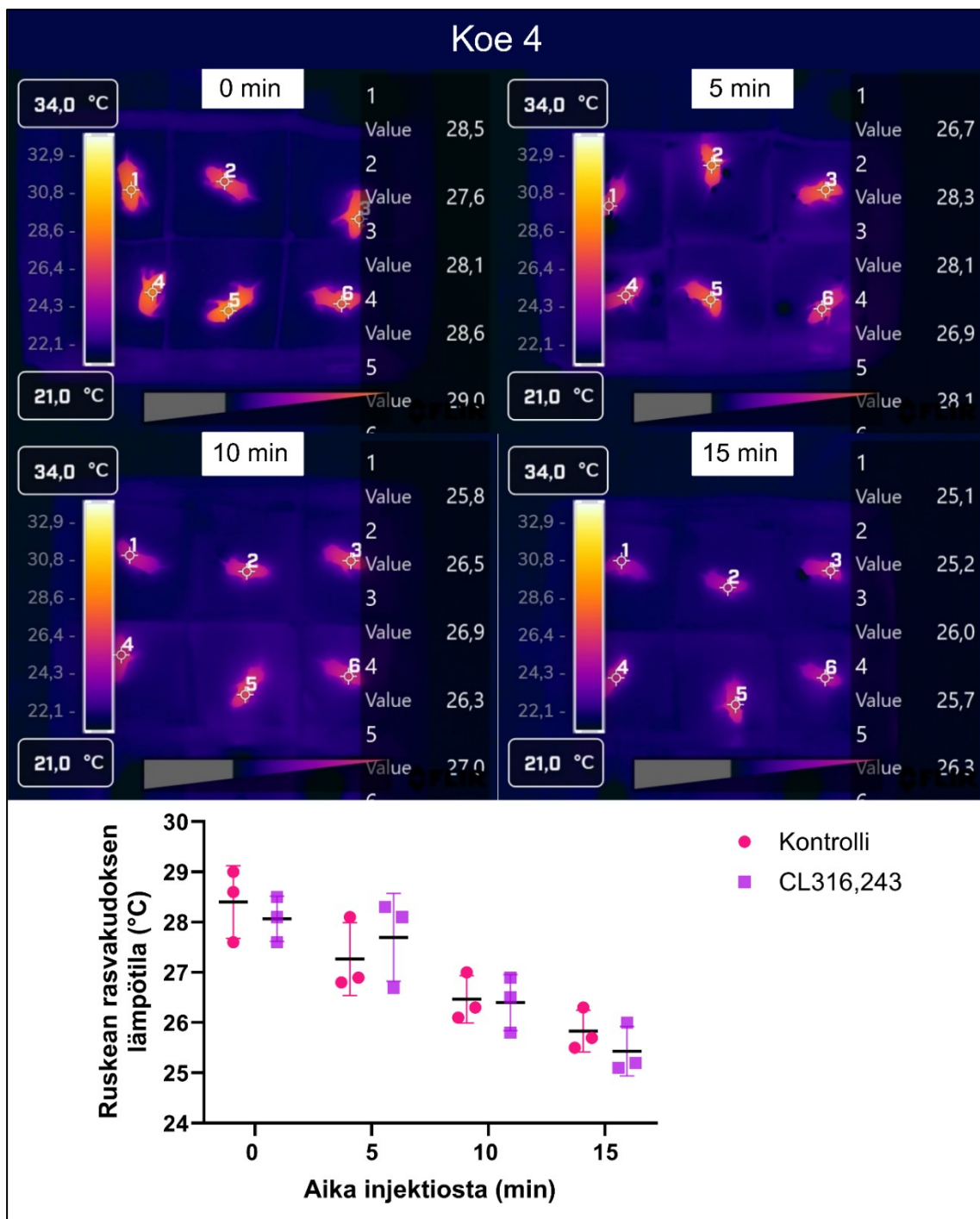
Näyte	Mitattu verensokeri (mmol/l)
Kontrolli	9,7
1	8,0
2	10,4

Kuva 21. Kolmannen β_3 -agonisti-injektiokokeen infrapunakuvat ja ruskean rasvakudoksen lämpötilan muuttuminen kokeen aikana kuvaajalla havainnollistettuna.

Neljännessä toistossa verensokerin nopeaa laskua yritettiin ehkäistä syöttämällä hiirille glukoosiliuosta ennen injektiota. Syötetty glukoosiliuos toimii myös samalla kivun lievityksenä. Neljännessä toistossa agonistia injektoidiin 0,5 mg/kg kolmeen ja pelkkää suolaliuosta kolmeen viisipäiväiseen hiireen. Kuvassa 22 on esitettyä neljännän toiston lämpökamerakuvat. Kuvista havaitaan, että ensimmäisenä injektoidun hiiren ruskean rasvan lämpötila on laskenut (1), toisella agonisti-injektoidulla hiirellä ruskean rasvan lämpötila on noussut (2) ja kolmannella lämpötila on pysynyt samana (3). Tulokset ovat lupaavia, mutta eivät anna varmuutta injektio-protokollan optimoinnin onnistumisesta. Hiirellä, joka osoitti ruskean rasvan aktivoitumisen merkkejä, oli haastava injektio (2). Lämpötilan nousu voi myös johtua siitä, että sitä pidettiin kauemmin kädessä, jolloin hiiren lämpötila kohosi lämpötilan stabiloimisen jälkeen. Toisaalta myös ensimmäisenä injektoidun hiiren injektioista oli kulunut enemmän kuin 5 minuuttia kuvanottohetkellä, jolloin agonistin nopean vasteen takia, mahdollinen lämpötilan nousu jäi näkemättä (1). Kokeen lopussa hiiriltä mitattujen verensokeriarvojen keskiarvot on esitetty taulukossa 5. Verensokerin mittaaminen oli myös haastavaa, jonka takia kaikilta ei saatu sitä mitattua. Verensokeri päätettiin mitata dekapitaatiosta saadulla verellä ja se mitattiin samasta hiirestä kolme kertaa, jotta tulos olisi mahdollisimman luotettava. Edelleen neljännessä toistossa oli samanlaisia haasteita kuin aiemmissa kokeissa, mutta se myös antoi lupaavia tuloksia mahdollisen protokollan optimoimisen onnistumisen kannalta.

Taulukko 5. Neljännän toiston verensokerimittauksen tulokset agonisti-injektion jälkeen

Näyte	Ryhmä	Mitattujen verensokerien keskiarvo (mmol/l)
1	CL316,243	8,1
2	CL316,243	8,3
3	CL316,243	8,1
4	Kontrolli	-
5	Kontrolli	6,8
6	Kontrolli	7,0



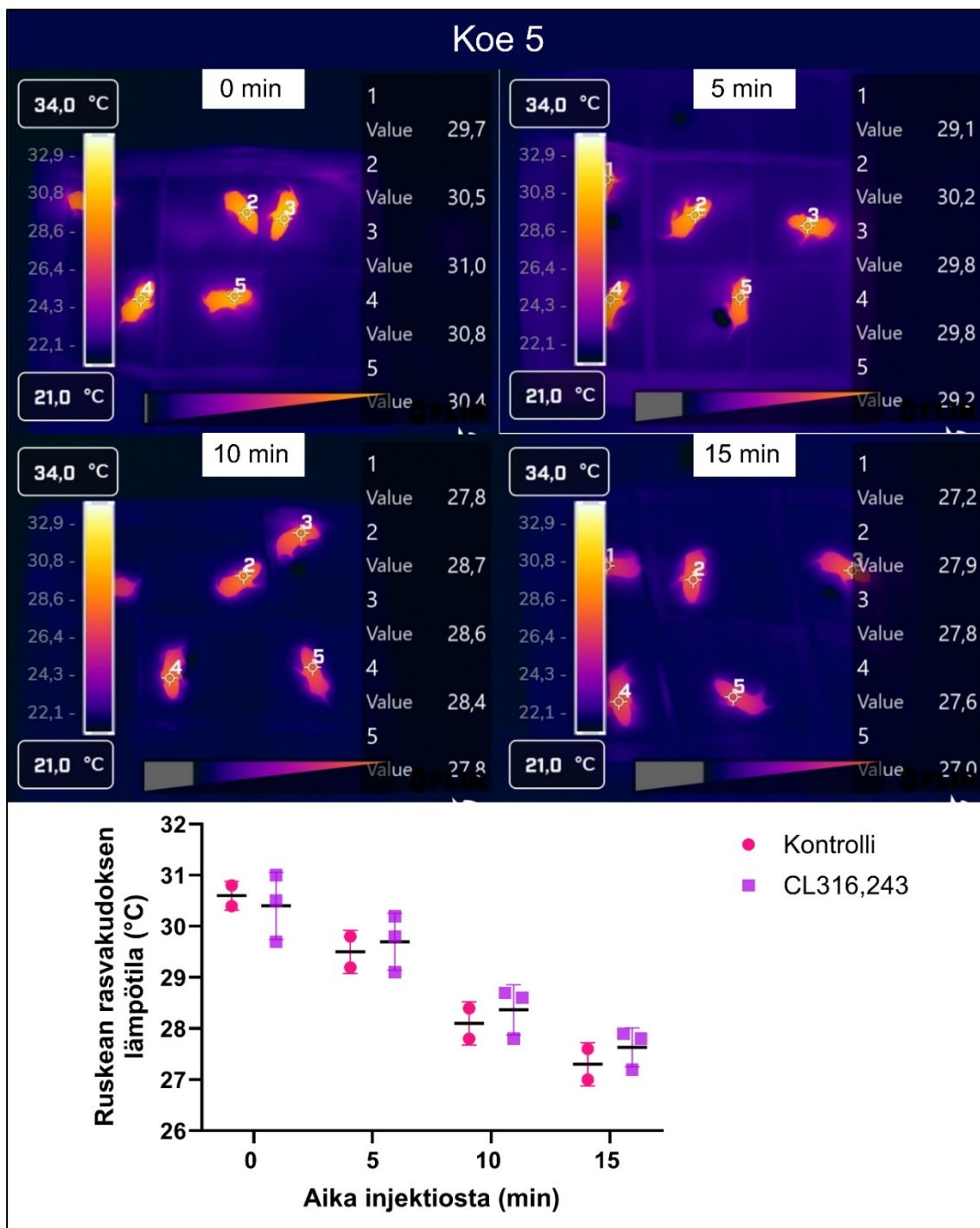
Kuva 22. Neljännen β 3-agonisti-injektiokokeen infrapunakuvat. Hiiriä 1-3 injektoidiin agonistilla ja hiiret 4-6 ovat kontrolleja. Kuvaajalla on havainnollistettu ruskean rasvakudoksen lämpötilan muutosta kokeen aikana.

Neljännessä toistossa havaitun lupaavan lämpötilan nousun takia agonisti-injektioprotokollaa kokeiltiin vielä kerran. Viidennessä toistossa agonistia injektoidiin 0,5 mg/kg kolmeen ja pelkkää suolaliuosta kahteen viisipäiväiseen hiireen. Koe toteutettiin samalla tavalla kuin edellinen. Hiirille syötettiin glukoosiliuosta ennen agonisti-injektiota, injektiot toteutettiin samanaikaisesti kaikille kolmelle hiirelle ja verensokeri mitattiin kokeen loputtua. Mitatut verensokeriarvot heittelevät, eikä niistä havaita selvää agonistin aiheuttamaa rajua verensokerin laskua (taulukko

6). Viidennessä toistossa ei edelleenkään havaita ruskean rasvan lämpötilan nousua agonisti-injektion jälkeen (kuva 23).

Taulukko 6. Viidennen toiston verensokerimittauksen tulokset agonisti-injektion jälkeen.

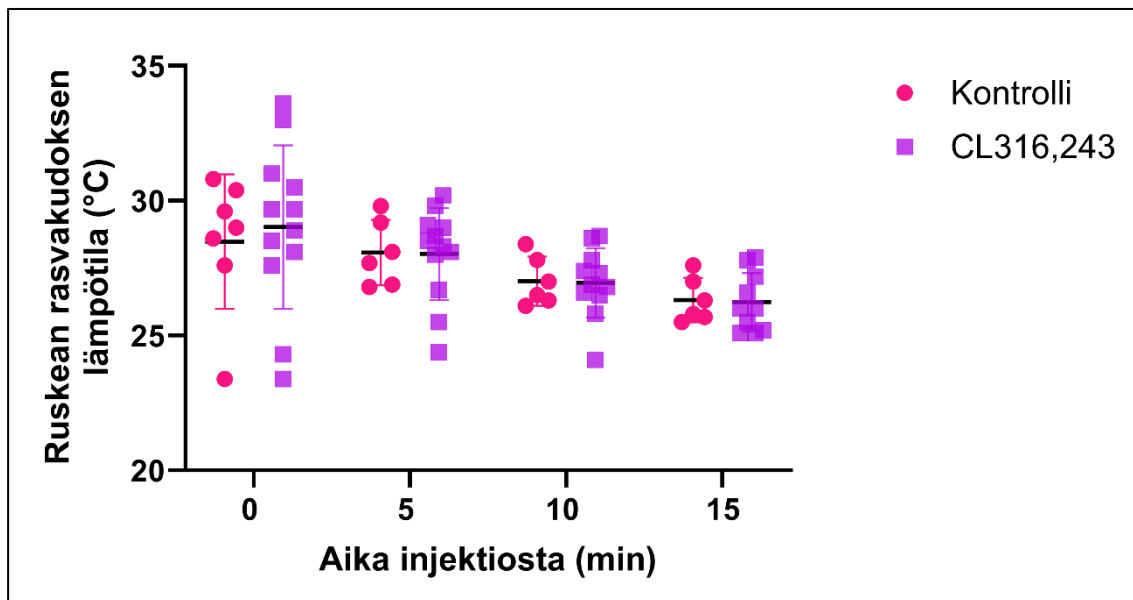
Näyte	Ryhmä	Mitattujen verensokerien keskiarvo (mmol/l)
1	CL316,243	8,8
2	CL316,243	9,0
3	CL316,243	7,5
4	Kontrolli	10,4
5	Kontrolli	8,2



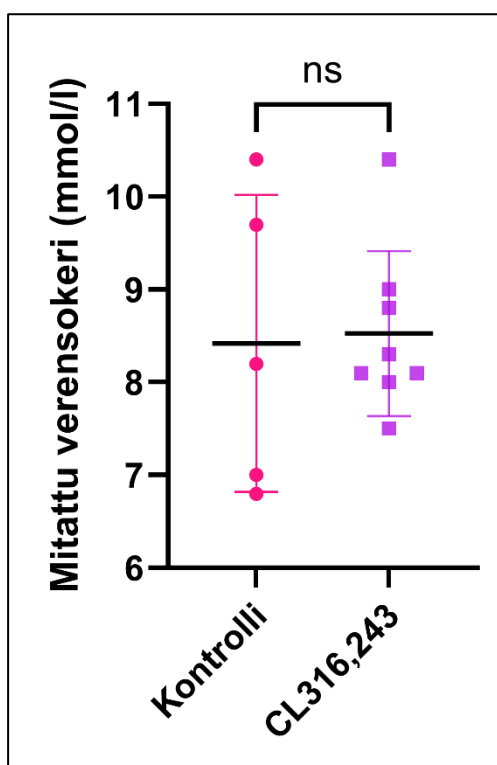
Kuva 23. Viidennen β_3 -agonisti-injektiokokeen infrapunakuvat. Hiiriä 1-3 injektoitiin agonistilla ja hiiret 4 ja 5 ovat kontrolloita. Kuvaajalla on havainnollistettu ruskean rasvakudoksen lämpötilan muutosta kokeen aikana.

Tässä tutkielmassa β_3 -adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektio-protokollan optimoiminen jäi kesken useiden haasteiden takia. Kuvassa 24 on esitetty kootusti agonistikokeiden kaikkien hiirten ruskeiden rasvakudosten havaitut lämpötilat. Kaavio osoittaa, ettei odotettua lämpötilan nousua tapahdu. Syynä voi olla, että hiiren vatsapuolelle injektoitaessa agonisti kulkeutuu vaikuttamaan virtsarakon reseptoreihin ruskean rasvakudoksen sijasta. Agonisti voi myös vaikuttaa matkalla ruskeaan rasvakudokseen laskien

hiirten verensokerin nopeasti. Mitattujen verensokeriarvojen välillä ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkittävää eroa agonisti-injektion ja kontrollin välillä (kuva 24, p-arvo 0,8632). Aikuisilla hiirillä CL316,243 aktivoi ruskeaa rasvakudosta, joten voi olla myös mahdollista, että agonistin biologinen vaste alle viikon ikäisillä hiirillä on erilainen.



Kuva 24. Tehtyjen agonistikokeiden hiirten ruskeiden rasvakudosten havaitut lämpötilat kootusti esitettynä.



Kuva 35. Kokeissa mitatut verensokeriarvot esitettynä kaaviossa (ns = not significant).

4 Tulosten tarkastelu

4.1 Hiirten käyttö mallieläimenä

Hiirten käyttö mallieläimenä on perusteltua, mutta myös aikaa vievää. Tässä tutkimuksessa tutkittiin makrofageja ja niiden roolia ruskean rasvakudoksen toiminnassa. Makrofageja on hankala tutkia *in vitro*, koska soluviljelmässä ei pystytä ylläpitämään oikeanlaista fysiologista ympäristöä, jolloin niiden fenotyyppi muuttuu erilaiseksi. Hiirten ruskean rasvakudoksen samankaltaisuus ihmisten ruskean rasvakudoksen kanssa tekee siitä hyvän mallin ruskean rasvakudoksen toiminnan tutkimiselle. Noradrenaliinin mittauksia ruskeasta rasvasta tehtiin useita ja kaikkia mittauksia ei ole esitetty tässä tutkielmassa, koska kyseisissä mittauksissa ei ollut haluttuja poistogeenisiä $Plvap^{-/-}$ tai villityypin $Plvap^{+/-}$ -hiiriä. Tutkimuksessa haasteena oli oikean genotyypin saaminen syntyneestä pentueesta. Hiirten genotyyppi selvitetään aikaisintaan 10 päivän iässä, jolloin hiirten genotyyppiä ei voitu tietää etukäteen tämän tutkielman kokeissa. Homotsygoottisena poistogeenisenä ($Plvap^{-/-}$) genotyyppi on letaali, joten osa poistogeenisistä hiiristä voi syntyä jo kuolleena. $Plvap$ -hiirimallin ongelmana on myös se, että $Plvap^{-/-}$ -hiiren verisuonet alkavat vuotaa *plvap*-proteiinin puuttumisen vuoksi. Verisuonien vuotaminen voi myös vaikuttaa hiirten lämmön siirtymiseen ruskeasta rasvasta, koska ruskean rasvan tuottama lämpö kulkeutuu ympäri kehoa verisuonten kautta. Poistogeenisen $Plvap^{-/-}$ -hiiren voi tunnistaa ulkoisista piirteistä ennen genotyypausta, mutta nekin voivat olla huomaamattomia ja riippuvat yksilöstä. $Plvap^{-/-}$ -hiirelle ominaisia piirteitä ovat turvonnut olemus, mutka hännässä ja pienempi koko verrattuna pentueen muihin poikasiin.

4.2 Noradrenaliinin konsentraation mittaaminen ruskeasta rasvasta

Kvantitatiivinen MRM-menetelmä noradrenaliinin konsentraation mittaamiseksi ruskeasta rasvasta saatiin kehitettyä. Menetelmän ionisaatioksi valittiin negatiivinen sähkösumutus-ionisaatio. Prekursori-ionin 168,1 *m/z* ja tuoteioneiden 150,1 *m/z* ja 123,0 *m/z* avulla retentioajalla 0,6 min esiintyvä piikki karakterisoitiin noradrenaliinin piikiksi.

Kehitetyllä menetelmällä mitattiin eri-ikäisiltä $Plvap$ -hiiriltä ja yksiviikkoisilta vasta-ainekäsittelyiltä hiiriltä ruskean rasvan noradrenaliinin konsentraatio. Noradrenaliinin konsentraatioissa makrofagipuutteisen ja kontrollihiiren välillä havaittiin noradrenaliini pitoisuuden alenema, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkittävä.

$Plvap^{-/-}$ -hiiriltä puuttuu alkioikaudella maksassa kehittyvät makrofagit ja niiden ruskean rasvakudoksen lämmöntuoton on osoitettu olevan heikentynyt. Alkioikaudella ruskuaispussissa

ja syntymän jälkeen luuytimessä kehittyvät makrofagit kuitenkin kehittyvät ja kulkeutuvat kudoksiin normaalisti.⁵⁸ Vasta-ainekäsittelyjen hiirten ruskeasta rasvakudoksesta ei pystytty poistamaan kaikkia makrofageja. Kummassakin tapauksessa, kudokseen jäävä pieni määrä makrofageja todennäköisesti hoitaa tehtävänsä normaalisti, jolloin noradrenaliinin konsentraatioissa makrofagipuutteisten ja tavallisten hiirten välillä ei havaita merkittävää eroa. Vasta-ainekäsittelyillä hiirillä huomioon pitää ottaa myös se, että makrofagit ovat osallistuneet normaalisti alkionaikaiseen kudoksen kehitykseen. Plvap-hiirten tapauksessa, syy heikentyneeseen lämmöntuottoon ei ole noradrenaliinin määrässä, vaan jokin muun termogeneesin tapahtumakaskadista on heikentynyt. Makrofagien poistamisella ruskeasta rasvakudoksesta syntymän jälkeen ei havaittu olevan vaikutusta kudoksen toimintaan.

Noradrenaliinin konsentraation määrittämiseen kehitetyn kvantitatiivisen MRM-menetelmän mittaustulokset ovat luotettavia. MRM-menetelmän tarkoitus on karakterisoida ja kvantitoida haluttu molekyyli näyteseoksesta. Menetelmä kehitettiin kiinteälle noradrenaliinin puhtasaineelle ja sen todettiin toimivan luotettavasti ruskean rasvakudoksen näytteille. Menetelmä on luotettava, koska tässä tutkielmassa kehitetyllä menetelmällä muun muassa detektoidaan samoja ioneja kuin aikaisemmin kirjallisuudessa raportoiduilla menetelmillä^{59,60,70}, massakromatogrammeissa havaitut noradrenaliinin piikit ovat pinta-alaltaan ja intensiteeteiltään hyviä, sisäisen standardin käyttö tekee menetelmän kvantitatiivisuudesta luotettavan ja fragmenttien ionisuhteet ovat 50/50 (kuva 13). Noradrenaliinin hajoaminen voi vaikuttaa näytetuloksiin jonkin verran, mutta sen vaikutus on minimoitu näytteiden pitämällä kylmässä ja ajon tapahtuessa samana päivänä kuin näytteiden keruun ja käsittelyn.

4.3 β 3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektiot

β 3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektioprotokolla on aiemmin optimoitu aikuisille hiirille^{53,63-65}. Tässä tutkimuksessa kyseistä protokollaa yritettiin optimoida alle viikon ikäisille hiirille niiden ruskean rasvan toiminnan ja siihen vaikuttavien tekijöiden tutkimiseksi, siinä kuitenkin onnistumatta. Hiiret aloittavat runsaan virtsaamisen heti injektion jälkeen, mikä voi johtua agonistin aiheuttamasta nopeasta verensokerin laskusta tai sen vaikutuksesta virtsarakossa. Odotettua ruskean rasvakudoksen lämpötilan nousua, joka kertoisi sen lämmöntuoton aktivoitumisesta, ei havaittu.

Tarkoituksena oli, että injektioprotokollan optimoimisen jälkeen sillä olisi tutkittu Plvap-hiirten ruskean rasvan aktivoitumista. Plvap-hiirten ruskean rasvakudoksen noradrenaliinin konsentraatioissa ei havaittu merkittävää eroa, joten tällä agonisti-injektioprotokollalla olisi

voitu tutkia, onko syy ruskean rasvan lämmöntuoton heikentymiseen sittenkin noradrenaliinia sitovissa β 3-adrenergisissa reseptoreissa.

β 3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektioprotokollan optimointi ei onnistunut. Protokollan optimointia olisi voitu jatkaa vaihtamalla intraperitoneaalinen injektio eli vatsaonteloon injektoiminen subkutaaniseen injektioon. Subkutaaninen injektio on ihonalainen injektio hiiren niskassa olevaan löysään nahkaan. Subkutaanista injektiota kuitenkin harvoin annetaan näin nuorille hiirille, koska niillä ei ole yhtä paljon löysää niskanahkaa kuin aikuisilla hiirillä. Se olisi kuitenkin paikallisempi injektio lapaluiden välissä olevan ruskean rasvakudoksen lähelle, jolloin agonisti voisi helpommin kulkeutua haluttuun paikkaan ja virtsarakon β 3-adrenergiset reseptorit eivät aktivoituisi välttämättä yhtä helposti.

Tutkielman β 3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektioprotokollan optimointitulosten luotettavuuteen vaikuttaa moni asia. Agonisti-injektiot on vaikea toteuttaa täysin samanaikaisesti, jolloin infrapunakuvat eivät välttämättä ole kaikkien hiirten kohdilla otettu esimerkiksi tasan 5 minuuttia injektion jälkeen. Hiirten runsas virtsaaminen haittaa infrapunakameran lämpötilan havaitsemista ja hiirten käsitteleminen kuvien välissä voi vaikuttaa niiden lämpötilaan. Verensokeri mitataan dekapitaatiosta saadulla verellä, koska se ei onnistu hännästä eikä suoraan sydäimestä näin nuorilla hiirillä. Tällöin veressä saattaa olla mukana kudostestettä, joka haittaa verensokerin mittausta. Kaiken kaikkiaan tutkielman tulokset ovat luotettavia, koska injektiot kuitenkin pyritään tekemään mahdollisimman samanaikaisesti, hiiriä siirretään puhtaisiin paikkoihin, käsittely on hyvin lyhytaikaista ja kudostesteen määrä veressä on hyvin vähäinen.

4.4 Yhteenveto

Tässä tutkimuksessa pyrittiin optimoimaan hiiren poikasten ruskean rasvan aktiivisuuden mittaamismenetelmiä ja selvittämään makrofagien puutteen vaikutusta ruskean rasvan kehitykseen ja toimintaan. Tavoitteina oli kehittää MRM-menetelmä noradrenaliinin konsentraation mittaamiseen ruskeasta rasvakudoksesta, mitata kehitettyä menetelmää käyttäen noradrenaliinin konsentraatio ruskeasta rasvasta eri hiirimalleilta ja eri-ikäisiltä hiiriltä ja optimoida injektioprotokolla β 3-adrenergisten reseptorien agonistille. Kvantitatiivisen MRM-menetelmän kehittäminen noradrenaliinin mittaamiseksi onnistui, β 3-adrenergisten reseptorien agonisti-injektioprotokollan optimoiminen jäi vielä kesken.

Noradrenaliinin konsentraation mittaukset ruskeasta rasvakudoksesta osoittivat, ettei noradrenaliinin konsentraatiossa ole merkittävää eroa makrofagipuutteisten ja tavallisten hiirten välillä. Plvap^{-/-}-hiirillä ruskeaan rasvakudokseen jäävä vähäinen määrä ruskuaispussissa

kehittyneitä makrofageja ja viikon iässä kudokseen kulkeutuvat luuytimen makrofagit hoitavat tehtävänsä normaalisti. Vasta-ainekäsitellyillä hiirillä makrofagit osallistuvat normaalisti alkiovaiheessa rasvakudoksen kehitykseen ja kudokseen jää makrofageja vasta-ainekäsittelyn jälkeen. Tämän takia vasta-ainekäsitellyillä hiirillä ruskean rasvakudoksen toiminnassa ei havaita poikkeavuuksia.

β 3-adrenergisten reseptorien agonistin (CL316,243) injektio-protokollan optimoiminen jäi ajan puutteessa kesken. Ajan riittäessä protokollaa olisi voitu vielä optimoida enemmän sokerin syöttämisen, verensokerin mittaamisen ja injektion paikan osalta.

5 Liitteet

5.1 Liuokset

EPICS PBS

1:10 10x PBS (BP399-4, Thermo Fischer Scientific) laimennettuna MilliQ-veteen

EPICS PBS I

40 ml EPICS PBS

0,8 ml FCS (naudan sikiöseerumi)

0,04 ml 4% NaN₃

EPICS FIX

20 ml EPICS PBS

0,54 ml 37% formaldehydi

6 Viitteet

1. Oelkrug, R., Polymeropoulos, E. T. & Jastroch, M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* vol. 185 587–606 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0907-7> (2015).
2. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. (2004) doi:10.1152/physrev.00015.2003.-The.
3. Virtanen, K. A. *et al.* Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *New England Journal of Medicine* **360**, 1518–1525 (2009).
4. Cypess, A. M. *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans *A BS TR AC T. N Engl J Med* vol. 360 <http://faculty>. (2009).
5. van Marken Lichtenbelt *et al.* Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. (2009).
6. Lidell, M. E. *et al.* Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* **19**, 631–634 (2013).
7. Ouellet, V. *et al.* Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **96**, 192–199 (2011).
8. Liu, X., Cervantes, C. & Liu, F. Common and distinct regulation of human and mouse brown and beige adipose tissues: a promising therapeutic target for obesity. *Protein and Cell* vol. 8 446–454 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0378-6> (2017).
9. Kowaltowski, A. J. Cold Exposure and the Metabolism of Mice, Men, and Other Wonderful Creatures. *Physiology* vol. 37 Preprint at <https://doi.org/10.1152/physiol.00002.2022> (2022).
10. Porter, C. *et al.* Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. *Cell Metab* **24**, 246–255 (2016).
11. Xiao, C., Goldgof, M., Gavrilova, O. & Reitman, M. L. Anti-obesity and metabolic efficacy of the β 3-adrenergic agonist, CL316243, in mice at thermoneutrality compared to 22°C. *Obesity* **23**, 1450–1459 (2015).
12. Clapham, J. C. & Arch, J. R. S. Thermogenic and metabolic antiobesity drugs: Rationale and opportunities. *Diabetes, Obesity and Metabolism* vol. 9 259–275 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2006.00608.x> (2007).
13. Cypess, A. M. *et al.* Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* **21**, 33–38 (2015).
14. Dąbrowska, A. M. & Dudka, J. Mirabegron, a Selective β 3-Adrenergic Receptor Agonist, as a Potential Anti-Obesity Drug. *Journal of Clinical Medicine* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jcm12216897> (2023).

15. Ma, L., Xiong, L. & Huang, G. Effects of mirabegron on brown adipose tissue and metabolism in humans: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology* vol. 80 317–333 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00228-023-03614-0> (2024).
16. Blondin, D. P. *et al.* Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by β 2-AR Stimulation. *Cell Metab* **32**, 287-300.e7 (2020).
17. Schulz, T. J. & Tseng, Y. H. Brown adipose tissue: Development, metabolism and beyond. *Biochemical Journal* vol. 453 167–178 Preprint at <https://doi.org/10.1042/BJ20130457> (2013).
18. Saini, S., Duraisamy, A. J., Bayen, S., Vats, P. & Singh, S. B. Role of BMP7 in appetite regulation, adipogenesis, and energy expenditure. *Endocrine* vol. 48 405–409 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0406-8> (2015).
19. Tseng, Y. H. *et al.* New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000–1004 (2008).
20. Harms, M. J. *et al.* Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab* **19**, 593–604 (2014).
21. Wang, W. *et al.* Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 14466–14471 (2014).
22. Rajakumari, S. *et al.* EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell Metab* **17**, 562–574 (2013).
23. Liu, X., Zhang, Z., Song, Y., Xie, H. & Dong, M. An update on brown adipose tissue and obesity intervention: Function, regulation and therapeutic implications. *Frontiers in Endocrinology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1065263> (2023).
24. Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B. & Nedergaard, J. UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. *Cell Metab* **9**, 203–209 (2009).
25. Bradford B. Lowell, V. S.-S. A. H. J. A. L. J. H.-H. B. B. B. L. P. K. and J. S. F. *Development of Obesity in Transgenic Mice after Genetic Ablation of Brown Adipose Tissue*. (1993).
26. Tabuchi, C. & Sul, H. S. Signaling Pathways Regulating Thermogenesis. *Frontiers in Endocrinology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.595020> (2021).
27. Kazak, L. & Cohen, P. Creatine metabolism: energy homeostasis, immunity and cancer biology. *Nature Reviews Endocrinology* vol. 16 421–436 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0365-5> (2020).
28. Roesler, A. & Kazak, L. UCP1-independent thermogenesis. *Biochemical Journal* vol. 477 709–725 Preprint at <https://doi.org/10.1042/BCJ20190463> (2020).
29. Golozoubova, V., Cannon, B. & Nedergaard, J. UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. (2006) doi:10.1152/ajpendo.00387.2005.-Partici.

30. Antonacci, M. A. *et al.* Direct detection of brown adipose tissue thermogenesis in UCP1^{-/-} mice by hyperpolarized ¹²⁹Xe MR thermometry. *Sci Rep* **9**, (2019).
31. Rahman, M. S. & Jun, H. The Adipose Tissue Macrophages Central to Adaptive Thermoregulation. *Frontiers in Immunology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.884126> (2022).
32. Sakamoto, T. *et al.* Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **310**, 676–687 (2016).
33. Gilsanz, V., Hu, H. H. & Kajimura, S. Relevance of brown adipose tissue in infancy and adolescence. *Pediatric Research* vol. 73 3–9 Preprint at <https://doi.org/10.1038/pr.2012.141> (2013).
34. Ghesmati, Z. *et al.* An update on the secretory functions of brown, white, and beige adipose tissue: Towards therapeutic applications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* vol. 25 279–308 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11154-023-09850-0> (2024).
35. Wankhade, U. D., Shen, M., Yadav, H. & Thakali, K. M. Novel Browning Agents, Mechanisms, and Therapeutic Potentials of Brown Adipose Tissue. *Biomed Res Int* **2016**, (2016).
36. Di Mascolo, D. *et al.* Rosiglitazone-loaded nanospheres for modulating macrophage-specific inflammation in obesity. *Journal of Controlled Release* **170**, 460–468 (2013).
37. Concha, F. *et al.* Nutritional and non-nutritional agents that stimulate white adipose tissue browning. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* vol. 20 161–171 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09495-y> (2019).
38. Zhang, W., Sheng, T., Gu, Z. & Zhang, Y. Strategies for Browning Agent Delivery. [doi:10.1007/s11095-021-03081-1](https://doi.org/10.1007/s11095-021-03081-1)/Published.
39. Hoeffel, G. & Ginhoux, F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol* **330**, 5–15 (2018).
40. Mass, E., Nimmerjahn, F., Kierdorf, K. & Schlitzer, A. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nature Reviews Immunology* vol. 23 563–579 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00848-y> (2023).
41. Ginhoux, F. *et al.* Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science (1979)* **330**, 838–841 (2010).
42. Prinz, M. & Priller, J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: From origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 15 300–312 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrn3722> (2014).
43. Lambrecht, B. N. Alveolar Macrophage in the Driver's Seat. *Immunity* vol. 24 366–368 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.03.008> (2006).
44. Bain, C. C. *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* **15**, 929–937 (2014).

45. Omran, F. & Christian, M. Inflammatory Signaling and Brown Fat Activity. *Frontiers in Endocrinology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00156> (2020).
46. Zhang, Y., Zhang, B. & Sun, X. The molecular mechanism of macrophage-adipocyte crosstalk in maintaining energy homeostasis. *Frontiers in Immunology* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1378202> (2024).
47. Wolf, Y. *et al.* Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure. *Nat Immunol* **18**, 665–674 (2017).
48. Luo, Y. *et al.* Myeloid adrenergic signaling via CaMKII forms a feedforward loop of catecholamine biosynthesis. *J Mol Cell Biol* **9**, 422–434 (2017).
49. Nguyen, K. D. *et al.* Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* **480**, 104–108 (2011).
50. Fischer, K. *et al.* Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat Med* **23**, 623–630 (2017).
51. Schena, G. & Caplan, M. J. Everything you always wanted to know about β 3-ar * (* But were afraid to ask). *Cells* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells8040357> (2019).
52. Macpherson, R. E. K., Castellani, L., Beaudoin, M.-S., Wright, D. C. & Wright, D. Evidence for fatty acids mediating CL 316,243-induced reductions in blood glucose in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **307**, 563–570 (2014).
53. Li, Y. *et al.* Comparative Transcriptome Profiling of Cold Exposure and β 3-AR Agonist CL316,243-Induced Browning of White Fat. *Front Physiol* **12**, (2021).
54. Finlin, B. S. *et al.* Human adipose beiging in response to cold and mirabegron. *JCI Insight* **3**, (2018).
55. Yamamoto, S., Kusabuka, H., Matsuzawa, A., Maruyama, I. & Yamazaki, T. Vibegron shows high selectivity and potent agonist activity for β 3-adrenoceptors, irrespective of receptor density. *PLoS One* **18**, (2023).
56. Pan, Y., Liu, J. & Qi, F. Identification of key candidate genes and molecular pathways in white fat browning: An anti-obesity drug discovery based on computational biology. *Hum Genomics* **13**, (2019).
57. Liu, M. *et al.* Brown/beige fat activation after skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Muscles Ligaments Tendons J* **10**, 579–588 (2020).
58. Rantakari, P. *et al.* Fetal liver endothelium regulates the seeding of tissue-resident macrophages. *Nature* **538**, 392–396 (2016).
59. Bergh, M. S. S., Bogen, I. L., Andersen, J. M., Øiestad, Å. M. L. & Berg, T. Determination of adrenaline, noradrenaline and corticosterone in rodent blood by ion pair reversed phase UHPLC–MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1072**, 161–172 (2018).
60. Bergmann, M. L. & Schmedes, A. Highly sensitive LC-MS/MS analysis of catecholamines in plasma. *Clin Biochem* **82**, 51–57 (2020).

61. Kelley, T. W. *et al.* *Macrophage Colony-Stimulating Factor Promotes Cell Survival through Akt/Protein Kinase B**. <http://www.jbc.org> (1999).
62. Lokka, E. *et al.* Generation, localization and functions of macrophages during the development of testis. *Nat Commun* **11**, (2020).
63. Peppler, W. T., Miotto, P. M., Holloway, G. P. & Wright, D. C. CL 316, 243 mediated reductions in blood glucose are enhanced in RIP140^{-/-} mice independent of alterations in lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **486**, 486–491 (2017).
64. Labbé, S. M. *et al.* Metabolic activity of brown, ‘beige,’ and white adipose tissues in response to chronic adrenergic stimulation in male mice. *J Physiol Endocrinol Metab* **311**, 260–268 (2016).
65. Grujic, D. *et al.* *B3-Adrenergic Receptors on White and Brown Adipocytes Mediate B3-Selective Agonist-Induced Effects on Energy Expenditure, Insulin Secretion, and Food Intake A STUDY USING TRANSGENIC AND GENE KNOCKOUT MICE**. <http://www.jbc.org> (1997).
66. Tremblay, S. *et al.* Repeated exposure to sucrose for procedural pain in mouse pups leads to long-term widespread brain alterations. *Pain* **158**, 1586–1598 (2017).
67. Boughton, B. A. *et al.* Comprehensive profiling and quantitation of amine group containing metabolites. *Anal Chem* **83**, 7523–7530 (2011).
68. Perdiguero, E. G. & Geissmann, F. The development and maintenance of resident macrophages. *Nature Immunology* vol. 17 2–8 Preprint at <https://doi.org/10.1038/ni.3341> (2016).
69. Hondares, E. *et al.* Hepatic FGF21 Expression Is Induced at Birth via PPAR α in Response to Milk Intake and Contributes to Thermogenic Activation of Neonatal Brown Fat. *Cell Metab* **11**, 206–212 (2010).
70. Cohen, A. M. *et al.* Use of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to assess the concentration of epinephrine, norepinephrine, and phenylephrine stored in plastic syringes. *Pharm Technol Hosp Pharm* **8**, (2023).