

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

**Kaspaasi 3 -immunohistokemiallinen värjäys
ja cresyl violet -värjäys koiran kroonisen ja
reaktiivisen hepatiitin diagnosoinnissa**

ELK Anna Huupponen

Helsingin yliopisto, Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto

Eläinlääketieteellinen patologia ja parasitologia

2021



Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto	
Tekijä - Författare – Author ELK Anna Huupponen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title Kaspaasi 3 -immunohistokemiallinen värjäys ja cresyl violet -värjäys koiran kroonisen ja reaktiivisen hepatiitin diagnosoinnissa			
Oppiaine - Läroämne – Subject Patologia ja parasitologia			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum – Month and year 4/2021	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages 44
Tiivistelmä - Referat – Abstract			
<p>Krooninen hepatiitti on yleisin maksasairaus koiralla. Sen aiheuttaja jää usein tuntemattomaksi. Tautiin voi sairastua minkä tahansa rotuinen koira, mutta tietyillä roduilla sairautta tavataan useammin. Krooninen hepatiitti on etenevä sairaus eikä siihen ole parantavaa hoitoa. Taudin etenemistä pystytään hidastamaan, jos se todetaan aikaisessa vaiheessa. Taudin diagnoosiin tarvitaan aina maksabiopsian histopatologinen tutkimus. Kroonisesta hepatiitista poiketen reaktiivinen hepatiitti on maksan vaste muualla kehossa tapahtuville patologisille tiloille, joista yleisimpiä ovat ruuansulatuskanavan ja virtsa- ja sukupuolielinten alueen tulehdukset. Reaktiivinen hepatiitti pystytään usein parantamaan hoitamalla taustasy. Kroonisen ja reaktiivisen hepatiitin oireet ovat epäspesifejä. Lisäksi kroonisen hepatiitin ja reaktiivisen hepatiitin histopatologinen kuva on osittain päällekkäinen, joten erityisesti taudin alkuvaiheessa niiden erottaminen toisistaan on haastavaa.</p> <p>Tämän työn kirjallisuuskatsaus taustoittaa tutkimusosuuden ja kuvaa tutkimusosuuteen valitut menetelmät. Kirjallisuuskatsauksessa esitellään lukijalle maksan histologiasta rakennetta, tehdään lyhyt katsaus solukuoleman mekanismeihin ja esitellään koiran kroonista ja reaktiivista hepatiittia tauteina.</p> <p>Tutkimusosuudessa tutkittiin, onko maksabiopsioiden erikoisvärjäysten avulla mahdollista erottaa lievää kroonista hepatiittia ja lievää reaktiivista hepatiittia sairastavat potilaat toisistaan. Tutkimuksen hypoteesina oli, että kaspaasi 3 -immunohistokemiallisella värjäyksellä osoitettavien apoptoottisten hepatosyyttien tai cresyl violet -värjäyksellä tunnistettavien nekroottisten (onkoottisten) hepatosyyttien määrä eroaa kroonisessa ja reaktiivisessa hepatiitissa.</p> <p>Tutkimuksessa vertailtiin kroonista hepatiittia (n=6) ja reaktiivista hepatiittia (n=6) sairastavien potilaiden sekä kontrolliryhmän (n=6) maksanäytteissä esiintyviä apoptoosin ja nekroosin määriä. Potilaiden jako kroonista hepatiittia sairastavaan ja reaktiivista hepatiittia sairastavaan ryhmään tehtiin potilaiden alaniiniaminotransferaasiarvojen perusteella. Kroonisen ja reaktiivisen hepatiitin ryhmien materiaaleina käytettiin vuosina 2015-2019 Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan patologian ja parasitologian oppiaineelle lähetettyjä koirien maksabiopsioita. Kontrolliryhmän materiaali koostui vuonna 2018 patologian ja parasitologian oppiaineella kerätyistä koirien ruumiinavausnäytteistä. Näytteet värjättiin sekä kaspaasi 3 -immunohistokemiallisella värjäyksellä (Cell Signaling, Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb) että cresyl violet -värjäyksellä. Kaspaasi 3 -värjäyksen näytteet analysoitiin digitaalisista kuvista, jotka oli digitoitu 3D Histec Panoramic MIDI skannerilla (BioSiteHisto Oy). Cresyl violet -värjäykset mikroskoipoitiin käyttäen Olympus BX51-mikroskooppia ja Moticam 1080 -kameraa. Näytteiden tilastolliseen analysointiin käytettiin www.socscistatistics.com -sivuston laskentaohjelmia.</p> <p>Tässä tutkimuksessa osoittautui, ettei tutkituilla värjäysmenetelmillä voida erottaa koiran lievää kroonista ja lievää reaktiivista hepatiittia toisistaan. Kaspaasi 3 -värjäyksessä tilastollisesti merkitsevä ero (p<0.05) havaittiin kontrolliryhmän ja kroonista hepatiittia sairastavan ryhmän välillä. Cresyl violet -värjäyksessä tilastollista merkitsevyyttä ei löydetty minkään ryhmän kesken. Cresyl violet -värjäyksen sivulöydöksenä nähtiin kuitenkin punaisella värjäytyviä, granuloita sisältäviä, tunnistamattomaksi jääneitä soluja kaikkien ryhmien näytteissä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Krooninen hepatiitti, reaktiivinen hepatiitti, maksan histologia, immunohistokemia, kaspaasi 3, cresyl violet, apoptoosi, nekroosi			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s) Työn johtaja: prof. Antti Sukura Työn ohjaajat: prof. Pernilla Syrjä ja yliopistonlehtori Niina Airas			

Sisälllys

1 JOHDANTO.....	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	2
2.1 Maksan histologinen rakenne.....	2
2.1.1 Maksan kolmiulotteinen rakenne	2
2.1.2 Maksan verenkierto ja sapen kulku	3
2.2 Maksan solut	5
2.2.1 Hepatosyytit	5
2.2.2 Ito-solut	6
2.2.3 Kupfferin solut	6
2.2.4 Pit-solut	7
2.2.5 Maksan kantasolut.....	8
2.3 Solukuolema.....	9
2.3.1 Apoptoosi	9
2.3.2 Nekroosi	12
2.4 Hepatiitit.....	13
2.4.1 Krooninen hepatiitti.....	14
2.4.1.1 Kroonisen hepatiitin esiintyminen	14
2.4.1.2 Kroonisen hepatiitin etiologia ja oireet	14
2.4.1.3 Maksaentsyymi ALAT kroonisen hepatiitin diagnostiikassa.....	15
2.4.1.4 Kroonisen hepatiitin diagnosointi biopsiasta	16
2.4.1.5 Kroonisen hepatiitin histologinen kuva.....	17
2.4.1.6 Apoptoosi kroonisessa hepatiitissa.....	18
2.4.1.7 Nekroosi kroonisessa hepatiitissa.....	19
2.4.2 Reaktiivinen hepatiitti ja sen histologinen kuva	20
3 AINEISTO JA MENETELMÄT	21
3.1 Tutkimusaineisto	21
3.2 Hepatiitin diagnostiset kriteerit	22
3.3 Värjäykset.....	23
3.4 Cresyl violet -värjäyksen mikroskopointi	23
3.5 Kaspasi 3 -värjäyksen tutkiminen	25
3.6 Tilastollinen analyysi	28
4 TULOKSET	29
4.1 Lopullinen tutkimusaineisto.....	29

4.2 Cresyl violet -värjäyksen tulokset	29
4.3 Kaspasi 3 -värjäyksen tulokset	31
5 POHDINTA	32
Lähteet	37
Liitteet	42

1 JOHDANTO

Krooninen hepatiitti on yleisin maksakudokseen kohdistuva sairaus koiralla (Blomqvist ym. 2017). Sen aiheuttaja jää kuitenkin usein tuntemattomaksi (Webster ym. 2019). Tautiin voivat sairastua minkä tahansa rodun edustajat, mutta tietyillä roduilla sairautta tavataan useammin (Webster ym. 2019). Krooninen hepatiitti on etenevä sairaus eikä siihen ole parantavaa hoitoa. Taudin etenemistä pystytään kuitenkin hidastamaan, jos se todetaan tarpeeksi aikaisessa vaiheessa (Blomqvist ym. 2017). Taudin diagnoosiin tarvitaan aina histopatologinen tutkimus maksabiopsiasta (Blomqvist ym. 2017). Reaktiivinen hepatiitti on maksan vaste muualla kehossa tapahtuville patologisille tiloille, joista yleisimpiä ovat ruuansulatuskanavan (Farray ym. 2019) ja urogenitaalialueen eli virtsa- ja sukupuolielinten alueen tulehdukset (Neumann ja Danner 2012). Toisin kuin krooninen hepatiitti, reaktiivinen hepatiitti pystytään usein parantamaan hoitamalla taustasyyn (Dirksen ym. 2017). Kroonisen ja reaktiivisen hepatiitin oireet ovat epäspesifejä. Lisäksi kroonisen hepatiitin ja reaktiivisen hepatiitin histopatologinen kuva on osittain päällekkäinen (Webster ym. 2019), joten erityisesti taudin alkuvaiheessa niiden erottaminen toisistaan on haastavaa.

Kirjallisuuskatsaus toimii taustatietona tutkimusosuudelle ja selventää tutkimusosuuteen valittuja menetelmiä. Se ei ole kattava tiivistelmä kroonisen tai reaktiivisen hepatiitin kliinisistä ominaisuuksista vaan keskittyy sairauksien patologiin erityispiirteisiin. Kirjallisuuskatsauksen tavoitteena on esitellä lukijalle maksan histologiasta rakennetta, tehdä lyhyt katsaus solukuoleman mekanismeihin ja esitellä koiran kroonista ja reaktiivista hepatiittia tauteina.

Tutkimuksen tavoitteena on tutkia, onko maksabiopsioiden erikoisvärjäysten avulla mahdollista erottaa lievää kroonista hepatiittia ja lievää reaktiivista hepatiittia sairastavat potilaat toisistaan. Tutkimuksen erikoisvärjäyksiä käytetään kaspasi 3 - immunohistokemiallista värjäystä ja cresyl violet -värjäystä. Tutkimuksen hypoteesi on, että apoptoottisten hepatosyyttien tai nekroottisten hepatosyyttien määrä eroaa kroonisessa ja reaktiivisessa hepatiitissa toisistaan eli taudit on mahdollista erottaa. Koska kroonisen hepatiitin histologia ei ole taudille spesifinen ja taudin ennuste sekä hoito eroavat merkittävästi reaktiivisesta hepatiitista, on perusteltua tutkia uusia menetelmiä näiden kahden taudin erottamiseksi toisistaan histologisella tasolla.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

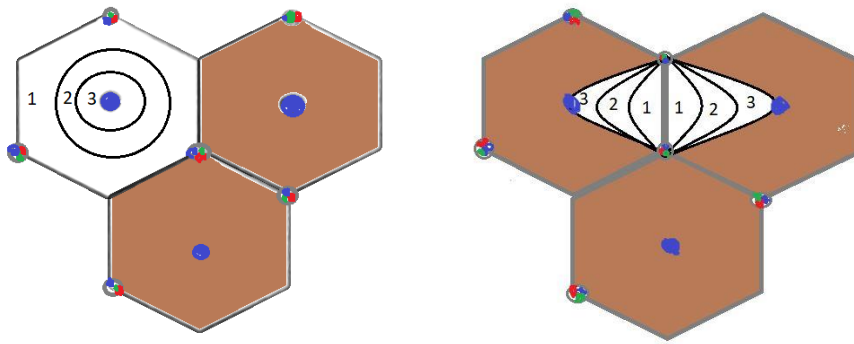
2.1 Maksan histologinen rakenne

2.1.1 Maksan kolmiulotteinen rakenne

Maksan kolmiulotteista rakennetta voidaan tarkastella histologisesti kolmella eri tavalla, joita ovat klassinen maksaliuska (engl. classic liver lobule), portaalinen maksaliuska (engl. portal lobule) ja asinus-malli (Ross ja Pawlina 2011). Tässä kirjallisuuskatsauksessa maksan rakenne esitellään käyttäen klassisen maksaliuskan mallia ja asinus-mallia. Lobulus eli maksaliuska on maksan rakenteellinen yksikkö, kun taas asinus kuvaa toiminnallisuutta (Autio-Harmainen 2012) ja korostaa erityisesti veren virtausta maksaparenkyymissä (Samuelson 2007).

Kuvassa 1 on esitetty kaavamaisesti klassisen maksaliuskan malli. Klassinen maksaliuska näkyy mikroskoopissa yleensä kuusikulmiona, jonka kulmissa on porta-alueet ja keskellä keskuslaskimo (Ross ja Pawlina 2011). Koiralla liuskan muoto ei ole kovin selvästi nähtävissä mikroskoopissa, koska sidekudosta ei juurikaan ole sen ympärillä (Cullen ja Stalker 2015). Porta-alueella sijaitsevat maksavaltimon ja porttilaskimon haarat, sappitiehyt sekä hermoja ja imusuonia (Cullen ja Brown 2012). Näiden ympärillä nähdään löysää sidekudosta (Ross ja Pawlina 2011). Klassisessa mallissa liuskan keskellä on selkeästi erottuva tukikudoksen ympäröimä keskuslaskimo (Ross ja Pawlina 2011). Hepatosyytit eli varsinaiset maksasolut muodostavat kolmiulotteiset solulevynsä niin, että jokaista hepatosyyttiä ympäröi kahdelta puolen sinusoidi eli maksan kapillaari, sappitiehyt tai toinen hepatosyytti (Ross ja Pawlina 2011). Dissen raolla tarkoitetaan tilaa, joka jää sinusoidien endoteelin ja hepatosyytin väliin (Ross ja Pawlina 2011).

Asinus-mallilla korostetaan maksan erityistä verenkiertoa. Maksa-asinus muodostuu kahden vierekkäisen keskuslaskimon ja kahden näitä lähinnä olevan porta-alueen väliin (Samuelson 2007), muodostaen vinoneliön (Ross ja Pawlina 2011) (Kuva 1). Erityisesti asinus-mallia käytettäessä voidaan puhua vyöhykkeistä, jotka kuvaavat hepatosyyttien sijaintia porta-alueesta ja keskuslaskimosta (Samuelson 2007). Periportaali-termiä eli vyöhyke 1 nimitystä käytetään, kun halutaan kuvata maksaliuskan aluetta lähellä porta-



Kuva 1. Maksan rakenne. Vasemmalla on klassisen maksaliuskan piirrosmalli. Oikealla on maksa-asinus. Kuvassa sinisellä suurella ympyrällä on merkittynä keskuslaskimo. Pieni sininen, punainen ja vihreä ympyrä kuvaavat porta-alueita. Vyöhykkeet on molempiin kuviin merkitty numeroilla 1-3. Kuva: Anna Huupponen 2021

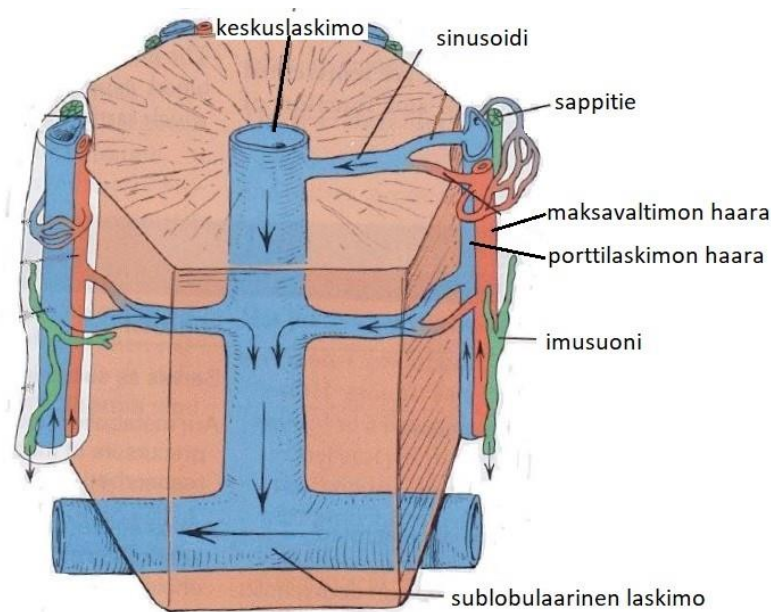
aluetta (Ross ja Pawlina 2011). Vyöhyke 1 on kaikkein happirikkain eli siellä sijaitsevat solut saavat verta, jossa hapen konsentraatio on kaikkein suurin (Cullen ja Stalker 2015). Porta-alueen kohtaa, jossa sidekudos muuttuu hepatosyyteiksi, kutsutaan termillä ”limiting plate” (Cullen ja Stalker 2015). Keskuslaskimon ympärillä olevaa aluetta kutsutaan sentrilobulaariseksi eli vyöhykkeeksi 3 (Cullen ja Stalker 2015), missä veri on kaikkein vähähappisinta (Samuelson 2007). Periportaalisesta ja sentrilobulaarisen alueen väliin jäävää aluetta kutsutaan keskivyöhykkeeksi (engl. mid-zonal) (Autio-Harmainen 2012).

2.1.2 Maksan verenkierto ja sapen kulku

Maksan verenkierto on kaksiosainen. Maksaan tulevasta verestä lähes 80 % tulee porttilaskimosta ja loput maksavaltimosta (Samuelson 2007). Maksavaltimon kautta tuleva veri on hapekasta, ja porttilaskimosta tuleva veri on ravinteikasta, mutta vähemmän happirikasta (Ross ja Pawlina 2011). Porttilaskimosta maksaan tulee myös toksineja ja pernassa hajonneita punasoluja (Cullen ja Stalker 2015 ja Ross ja Pawlina 2011). Molemmat suonet tulevat maksaan porta-alueelta, josta veri kulkeutuu kohti keskuslaskimoa sinusoideja pitkin. Porttilaskimon ja maksavaltimon veret sekoittuvat maksan sinusoideissa (Ross ja Pawlina 2011). Koska hepatosyytit saavat verensä sinusoidien kautta, niihin tuleva veri ei ole koskaan täysin happirikkasta (Cullen ja Stalker 2015 ja Ross ja Pawlina 2011).

Maksan erikoisen verenkierron takia periportaalisesti sijaitsevat hepatosyytit saavat kaikkein hapekkainta ja ravinnerikkainta verta (Cullen ja Stalker 2015), mutta toisaalta ne altistuvat

ensimmäisenä myös patogeeneille ja toksiineille, joita tulee porttilaskimon mukana ruoansulatuskanavasta (Cullen ja Stalker 2015). Siirryttäessä kohti sentrilobulaarisesti sijaitsevia hepatosyyttejä veren happiosapaine pienenee vähitellen ja lähinnä keskuskaskimoa sijaitsevat hepatosyytit saavat kaikkein vähähappisinta verta (Cullen ja Stalker 2015). Tämä altistaa sentrilobulaariset hepatosyytit hypoksialle (Cullen ja Brown 2012). Kuvassa 2 on esitetty maksan verenkierto.



Kuva 2. Maksan verenkierto. Veren kulkusuunta on merkitty kuvaan nuolilla. Kuva muokattu: Ross ja Pawlina 2011.

Sinusoidit ovat maksan sisällä olevia kapillaareja, joissa veri virtaa kohti keskuskaskimoa (Ross ja Pawlina 2011). Koirien sinusoidien endoteelisoluilla on koiran muista endoteelisoluista poiketen epäyhtenäinen tyvikalvo, mistä johtuvat suuret aukot endoteelisolujen välillä (Cullen ja Stalker 2015 ja Ross ja Pawlina 2011). Aukot mahdollistavat sinusoidien ja Dissen raon välisen suoran kontaktin ja suurien molekyylien kuljetuksen hepatosyyttien ja sinusoidin välillä (Cullen ja Stalker 2015).

Hepatosyyttien tuottama sappi kulkeutuu sappihiussuonten kautta kohti periportaalisesti sijaitsevia Heringin kanaaleja. Kanaaleista sappi kulkee kohti yhä isompia sappiteitä ja virtaa siis vastakkaiseen suuntaan kuin veri sinusoideissa (Autio-Harmainen 2012).

2.2 Maksan solut

2.2.1 Hepatosyytit

Maksaparenkyymi koostuu maksasoluista eli hepatosyyteistä, jotka muodostavat 70-80 % maksan massasta (Cullen ja Stalker 2015). Hepatosyytit ovat suuria ja kulmikkaita soluja, joiden sinusoidien puoleisella pinnalla on mikrovilluksia kasvattamassa solun pinta-alaa (Cullen ja Stalker 2015 ja Ross ja Pawlina 2011). Hepatosyyttien solulima on suuri ja eosinofiilinen eli se värjäytyy happamilla väriaineilla (Cullen ja Stalker 2015).

Hepatosyyteissä on yksi tai kaksi pyöreää tumaa (Samuelson 2007). Yksitumaisissa hepatosyyteissä tumien koko vaihtelee, mutta on usein suuri (Samuelson 2007). Tumien määrä soluissa lisääntyy, jos maksaan kohdistuu regeneraatioon (uudismuodostus) johtava vaurio tai stimulus (Cullen ja Stalker 2015).

Hepatosyyttien metabolia on erittäin aktiivista, joten muihin kudoksiin verrattuna ne ekspressoivat eli ilmentävät suurempaa osaa genomista ja niiden solulimasta löytyy suuri määrä soluorganelleja (Cullen ja Stalker 2015). Soluorganellien lisäksi hepatosyyteissä voidaan nähdä glykogeeniä sekä varastotriglyseridejä, proteiineja ja keskuslaskimoiden lähellä lipofuskiinia (Ross ja Pawlina 2011). Maksa on kupariaineenvaihdunnan tärkein elin, joten myös kuparia voidaan nähdä hepatosyyteissä. Hepatosyytit vastaavat kuparin varastoinnista, jakamisesta muille elimille ja kuparin erityksestä sappeen (Dirksen ja Fieten 2017). Jos hepatosyyttien kuparinsitomiskyky ylittyy, alkaa vapaata kuparia kertyä solujen sisään. Tämä johtaa vapaiden happiradikaalien muodostumiseen ja tulehdukseen (Blomqvist ym. 2017). Tietyillä koiraroduilla on alttiutta kuparin kertymiseen (Webster 2019).

Hepatosyyttien erilaisesta hapensaannista johtuen, eri vyöhykkeillä sijaitsevat hepatosyytit ovat myös aineenvaihdunnaltaan erilaisia (Cullen ja Stalker 2015) ja soluorganellien määrä eri hepatosyyteissä vaihtelee solun sijainnin mukaan (Samuelson 2007). Porta-alueen lähellä olevat hepatosyytit vastaavat suurelta osin maksan aerobisesta metaboliasta, glukoneogeenisistä, proteiinisynteesistä, ureasyklistä sekä lipidi- ja kolesterolimetaboliasta (Cullen ja Stalker 2015). Keskuslaskimon lähellä olevat hepatosyytit huolehtivat elimistön vierasainemetaboliasta. Niiden tehtäviin kuuluu myös muun muassa glykolyysi ja lipogeneesi (Cullen ja Stalker 2015). Keskuslaskimon lähellä olevat hepatosyytit ovat siis alttiita paitsi hypoksialle myös toksiineille (Cullen ja Stalker 2015). Patologisten muutosten sijainnin perusteella voidaankin tehdä alustavia päätelmiä taudinaiheuttajasta ja vaurion laadusta.

Hepatosyytit ovat pitkäikäisiä soluja etenkin verrattuna muihin ruuansulatuskanavassa esiintyviin soluihin kuten suolen epiteelisoluihin. Hepatosyyttien elinikä on noin viisi kuukautta (Ross ja Pawlina 2011), mutta yksi hepatosyytti voi elää jopa vuoden (Autio-Harmainen 2012). Hiirillä tehdyssä tutkimuksessa on todettu, että hepatosyytit voivat jakautua jopa 12-16 kertaa (Rhim ym. 1994). Normaalisti eli terveessä kudoksessa hepatosyytit ovat lepotilassa ja jakautuvat hitaasti. Kun maksakudokseen kohdistuu kudostuhoa, se alkaa uudistua voimakkaasti välittäjäaineiden ja kasvutekijöiden vaikutuksesta (Autio-Harmainen 2012). Uudistuessaan maksasolut alkavat jakautua ja niiden määrä lisääntyy kudostuhon korjaamiseksi. Tätä kutsutaan regeneraatioksi (Carpen ja Lohi 2012). Regeneraatiossa maksaliuskojen koko kasvaa ja jonkin verran muodostuu myös uusia maksaliuskoja (Cullen ja Brown 2012). Maksan vaurioituessa uusia hepatosyyttejä syntyy regeneraation lisäksi maksan kantasoluista erilaistumalla (Mescher 2010). Kantasoluista kerrotaan kappaleessa 2.2.5.

2.2.2 Ito-solut

Ito-solut (engl. myös stellate cell) sijaitsevat Dissen raossa ja ne tunnistaa nimensä mukaisesti tähtimäisestä rakenteestaan. Ito-solujen toinen tunnusmerkki on soluliman rasvapitoiset pisarat (Cullen ja Stalker 2015 ja Ross ja Pawlina 2011). Koirilla lipidipisarat ovat isoja ja yksittäisiä (IJzer ym. 2006), mutta niiden koko vaihtelee eläinlajien välillä (Uetsuka 2007). Tavallisella hematoksyliini-eosiini (HE) värjäyksellä ito-soluja on haasteellista nähdä (Mescher 2010)

Ito-solujen lipidipisarat ovat A-vitamiinin varastopaikka (Ross ja Pawlina 2011). Ito-solut toimivat myös sinusoidien verenvirtauksen säätelijöinä (Cullen ja Stalker 2015). Ainakin ihmisillä sekä laboratorioeläimillä ne voivat lisäksi toimia myös antigeenien esittelijöinä lymfosyyteille sekä aktivoida lymfosyyttejä tuottamalla interleukiineja (Winau ym. 2007). Kudosvaurion aikana erittyvät sytokiinit saavat aikaan ito-solujen erikoistumisen myofibroblastisolujen tyyppiseksi soluksi (Cullen ja Stalker 2015 ja Ross ja Pawlina 2011). Myofibroblastisolut tuottavat kollageenia (Ross ja Pawlina 2011) ja maksafibroosia stimuloivia komponentteja (Favier 2009).

2.2.3 Kupfferin solut

Kupfferin solut ovat maksan kypsiä makrofageja eli monosyyttilinjan soluja (Ross ja Pawlina 2011 ja Tizard 2009). Ne sijaitsevat sinusoidissa ja muodostavat ulokkeillaan osan

sinusoidien sisäpinnasta (Ross ja Pawlina 2011), joten ne ovat suorassa kontaktissa vereen (Cullen ja Stalker 2015). Magrofagit eli myös Kupfferin solut ovat pyöreitä, melko suuria yksitumaisia soluja. Sekä tuman että itse solun muoto voi kuitenkin vaihdella (Tizard 2009) ja Kupfferin solut ovatkin usein litistyneenä, jotta ne vaikuttaisivat veren virtausvastukseen mahdollisimman vähän (Samuelson 2007).

Kupfferin solut ovat osa synnynnäistä immunitettä. Synnynnäisellä immunitetillä tarkoitetaan elimistön puolustusmekanismia, joka vastaa infektioihin nopeasti ja aina samalla tavalla, vaikka sen solut eivät olisi kohdanneet taudinaiheuttajaa aiemmin (Tizard 2009). Kupfferin solujen pinnalla on toll-like -reseptoreita, jotka tunnistavat ja aktivoituvat kohdattuaan monien erilaisten patogeenien solurakenteita (Tizard 2009). Kupfferin solujen tehtäviin kuuluu fagosytoida eli syödä haitallista materiaalia (Tizard 2009), jota tulee maksaan erityisesti porttilaskimon kautta (Cullen ja Stalker 2015). Kupfferin solut fagosytoivat bakteereja, mutta ne myös hajottavat vanhoja punasoluja ja näin vapauttavat rautaa uudelleen elimistön käyttöön (Mescher 2010).

Kupfferin solut voivat toimia antigeenin esittelijöinä ja ovat näin osana myös hankittua immunitettä, vaikka eivät olekaan siinä yhtä tehokkaita kuin muiden kudosten makrofagit (Cullen ja Brown 2012). Hankitulla immunitetillä tarkoitetaan kehon puolustusmekanismia, joka toimii hitaammin, mutta tehokkaammin kuin synnynnäinen immunitetti (Tizard 2009). Hankittu immunitetti perustuu antigeenin esittelijäsolujen ja niitä tunnistavien solujen yhteistyöhön. Esittelijäsolujen pinnalla on major histocompatibility complex -reseptoreita (MHC), joihin antigeeni kiinnittyy. Lymfosyytit tunnistavat näitä antigeenejä omilla reseptoreillaan (Tizard 2009).

Tulehduksen edetessä ja sen kääntyessä paranemisvaiheeseen makrofagit alkavat tuottaa anti-inflammatorisia aineita ja osallistuvat näin kudosten ja haavojen paranemiseen (Tizard 2009). Kupfferin soluilla on myös tärkeä ja suuri rooli pit-solujen (ks. 2.2.4 Pit-solut) kehittämisessä maksassa (Vanderkerken ym. 1995).

2.2.4 Pit-solut

Maksan immuunipuolustuksen toinen erityinen solutyyppejä ovat pit-solut. Pit-solut ovat suuria granulaarisia lymfosyyttejä, joilla on luonnollisen tappajasolun (engl. natural killer cell, NK-cell) toimintakyky (Cullen ja Stalker 2015). Elektronimikroskoopissa pit-solut tunnistaa niiden suurista valejaloista, erityisistä sauvamaisista vesikkeleistä ja niiden solulimassa

olevista tiiviistä granuloista. Solut sijaitsevat useimmiten maksalobuluksen porta-alueilla sinusoidien lumenissa (Kaneda ja Wake 1983).

NK-solut ovat immuunipuolustuksen soluja, joiden toiminta perustuu niiden vastaanottamiin inhibitorisiin ja aktivoiviin signaaleihin, joiden keskinäinen tasapaino ratkaisee, tuhoako NK-solu kohdesolun vai jättääkö se solun rauhaan (Tizard 2009). NK-solut tuhoavat kohdesolujaan kolmen erilaisen aktivaatiomekanismin kautta (Tizard 2009). Tuhoamisreaktio voi käynnistyä solussa, jos NK-solu saa liian vähän inhibitorisia signaaleja. Inhibitoristen signaalien vähyys johtuu kohdesolun viallista tai puutteellisista MHC I-molekyyleistä (Tizard 2009). MHC I-molekyylejä on kaikkien terveiden solujen pinnalla. Virukset vähentävät MHC I-molekyylin ilmentymistä isäntäsoluissaan ja kasvainsolut ovat usein huonoja ekspressoimaan eli ilmentämään MHC I-molekyylejä (Tizard 2009). NK-solut tunnistavat näiden solujen erilaisen pintarakenteen, reagoivat niihin ja tarvittaessa tuhoavat solun. NK-solut tunnistavat vioittuneet solut myös, koska vialliset solut tuottavat stressin seurauksena proteiineja, joita NK-solujen reseptorit tunnistavat. NK-soluilla on reseptoreita myös vasta-aineille, joten ne pystyvät aktivoitumaan myös niiden avulla (Tizard 2009). Kun NK-solu on aktivoitunut, se pystyy aktivoimaan apoptoosin kohdesolussaan (Tizard 2009).

Rotilla on todettu, että maksan pit-solut eroavat verenkierron NK-soluista sekä mikroskooppiselta rakenteeltaan että aktiivisuudeltaan (Vanderkerken ym. 1990). Eroa on kuitenkin vain siinä määrin, että pit-solujen oletetaan olevan verenkierron kautta maksaan kypsytettyjä NK-soluja (Vanderkerken ym. 1990). Tämän takia pit-solu termin käytöstä on osittain luovuttu ja soluja kutsutaan suoraan myös NK-soluiksi (Cullen ja Stalker 2015). Pit-solut ovat tehokkaampia ja aktiivisempia syöpäsoluja vastaan verrattuna verenkierron NK-soluihin (Vanderkerken ym. 1990).

2.2.5 Maksan kantasolut

Maksan kantasolut eli oval-solut ovat pieniä ovaalin muotoisia soluja, joilla on vain vähän solulimaa ja hyvin erottuva tumakotelo (Faber 1956). Oval-solujen tuma on suuri suhteessa solun soluliman kokoon ja tuman muoto on pyöreä tai sikarin mallinen (Sarraf ym. 1994). Oval-solut sijaitsevat periportaalisesti Heringin kanaaleissa ja aktivoituttuaan ne kulkeutuvat kohti maksaparenkymia (Faber 1956 ja Sarraf ym. 1994).

Tarvittaessa oval-solut vastaavat maksakudoksen uusiutumisen (Faber 1956 ja Sarraf ym. 1994), vaikka hepatosyyttien uusiutumiskyky onkin erittäin hyvä (Rhim ym. 1994). Jos

jostain syystä hepatosyyttien uusiutumiskyky ei riitä, tai se estetään kokeellisesti, pystyvät oval-solut erikoistumaan hepatosyyteiksi (Faber 1956 ja Sarraf ym. 1994). Hepatosyyttien lisäksi oval-solut pystyvät erikoistumaan myös sappitieepiteeliksi (Sarraf ym. 1994). Ennen kuin oval-solujen olemassaolosta oltiin varmoja, niiden jakautumista onkin kutsuttu termillä sappitiereaktio (Sarraf ym. 1994).

2.3 Solukuolema

Solut voivat vastata erilaisiin vaurioihin ja stressitilanteisiin monin tavoin. Ne voivat joko adaptoitua eli sopeutua vaurioon tai korjaantua vauriosta, ja näin säilyä hengissä. Jos vaurio ja stressi käyvät solulle ylivoimaiseksi, se kuolee (Cullen ja Brown 2012) tai solun genomissa tapahtuu muutoksia (Kosma ja Vähäkangas 2012). Tarkkaa hetkeä tai raja-arvoa sille, milloin solu ei enää pysty palautumaan vaurioista, ei voida sanoa. Voidaan kuitenkin todeta, että solun vaste vaurioon riippuu esimerkiksi vaurion määrästä, uusiutumistiheydestä ja kestosta ja toisaalta myös solun omista ominaisuuksista (Kumar ym. 2015). Soluvauriota ja stressiä voivat aiheuttaa sekä ulkoiset että sisäiset tekijät (Kosma ja Vähäkangas 2012).

Solukuolema ei kuitenkaan aina ole seurausta patologiselle tilalle vaan voi olla myös fysiologista ja tarpeellista (Kumar ym. 2015) esimerkiksi yksilönkehityksen aikana tai solukon uusiutuessa (Kujala 2012). Solukuolemat voidaan karkeasti jakaa kahteen luokkaan, apoptoosiin ja nekroosiin. Raja on kuitenkin häilyvä. Sama aiheuttaja voi pieninä pitoisuuksina saada solun apoptoosiin, kun taas suurina määrinä se ajaa solun nekroosiin (Kosma ja Vähäkangas 2012). Lisäksi joskus solukuolemalla on sekä apoptoosin että nekroosin tunnusmerkkejä, jolloin käytetään termiä nekroptoosi (engl. necroptosis). Nekroptoosissa solu hajoaa kuten nekroosissa eikä siinä ole kaspasien (kts. 2.3.1) aktivaatiota (Kumar ym. 2015). Osa kirjallisuudesta on alkanut käyttää nekroosin sijaan termiä onkoosi (turpoaminen) kuvaamaan paremmin solun kuollessa tapahtuvaa muodonmuutosta ja luoden näin eron apoptoosilla tapahtuvaan solukuolemaan (Cullen ja Brown 2012).

2.3.1 Apoptoosi

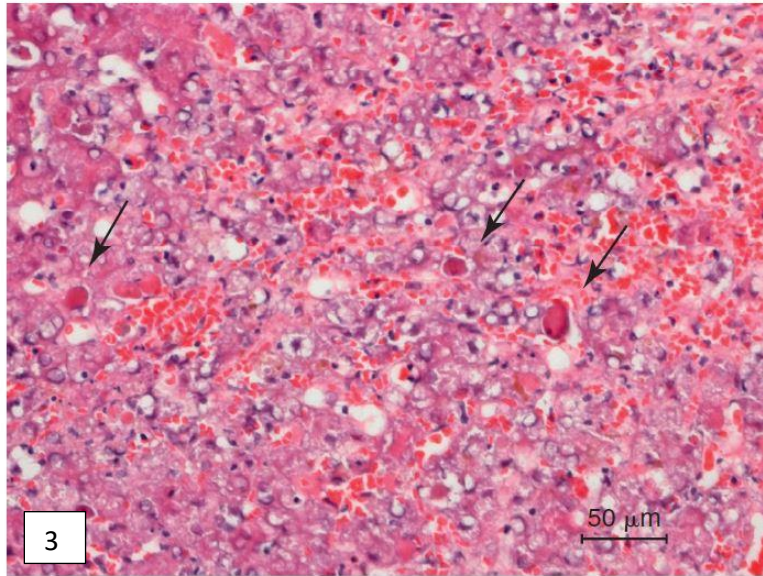
Apoptoosi on tarkkaan ohjelmoitu solukuolema, jonka tarkoituksena on eliminoida tarpeettomat solut (Kujala 2012). Solun apoptoosi voi johtua patologisista tai fysiologisista tekijöistä (Kumar ym. 2015). Patologinen apoptoosi voi olla seurausta esimerkiksi viruksen

tunkeutumisesta soluun tai solun DNA vauriosta (Kumar ym. 2015). Solukon uusiutuminen on esimerkki fysiologisesta apoptoosista (Kumar ym. 2015).

Kaspaasit ovat proteiineja hajottavia entsyymejä, jotka toimivat apoptoosin aikaansaajina. Apoptoosi voi solussa käynnistyä joko niin sanotun sisäisen tai ulkoisen reitin kautta (Kumar ym. 2015). Sisäinen reitti voi aktivoitua monista tekijöistä, esimerkiksi solun puutteellisista eloonjäämissignaaleista tai DNA-vauriosta. Aktivaatio johtaa mitokondrion ulkokalvon läpäisevyyden lisääntymiseen, josta seuraa sytokromi c-entsyymien ja muiden proteiinien vuotaminen solulimaan. Sytokromi c:n päätyminen solulimaan aktivoi kaspaasi 9:n. Tämä johtaa edelleen muiden kaspaasien aktivaatioon ja näin solujen apoptoosiin (Kumar ym. 2015). Ulkoinen reitti aktivoituu solukalvolla olevien reseptorien kautta. Kun reseptori aktivoituu esimerkiksi sytokiiniin tai sytotoksisten T-solujen vaikutuksesta, aktivoituu sen soluliman puoleinen osa eli niin kutsuttu kuolonreseptori (engl. death receptor/ death domain). Tämä johtaa edelleen kaspaasi 8 aktivaatioon, joka taas saa aikaa seuraavien kaspaasien aktivaation (Kumar ym. 2015). Kaspaasit 8 ja 9 ovat aloittajakaspaaseja, jotka aktivoivat toimeenpanokaspaaseja (muun muassa kaspaasit 3, 6 ja 7).

Toimeenpanokaspaasit ovat yhteisiä ulkoisessa ja sisäisessä reitissä. Ne saavat aikaan varsinaiset solukuolemaan johtavat mekanismit esimerkiksi hajottamalla solun tukirankaa ja aiheuttavat DNA:n fragmentaation eli pilkkoutumisen (Kujala 2012).

Apoptoosia ei histologisesti välttämättä aina nähdä, vaikka apoptoosien määrä olisi kudoksessa suuri. Tämä johtuu apoptoottisten solujen nopeasta hajoamisesta ja kuolleiden solujen tehokkaasta fagosytoinnista (Kumar ym. 2015). Vince ym. toteavat vuonna 2014 tehdyssä tutkimuksessaan, että terveiden koirien maksabiopsioissa 78 % ei esiintynyt ollenkaan apoptoottisia soluja ja lopulla 22 % niitä esiintyi vain vähän (Vince ym. 2014). Apoptoottisten solujen ympärille ei muodostu kudoksessa tulehdusreaktiota, koska kuolevien solujen sisältöä ei päästetä valumaan kudokseen, vaan solujen solulima ja soluelimet pakataan pieniin fagosytoitaviin fragmentteihin (Kumar ym. 2015). HE värjäyksessä apoptoottiset solut näyttävät pieniltä pyöreiltä tai ovaaleilta soluilta, joilla on voimakkaan eosinofiilinen solulima (Kumar ym. 2015 ja Rothuizen 2006). Apoptoottisten solujen ympärillä nähdään myös tyhjä kehä (Rothuizen 2006). Kuvassa 3 on esitetty kolme apoptoottista solua koiran maksassa. Tarkemmat apoptoottiset solumuutokset, kuten kromatiinin kondensaatio ja apoptoottisten fragmenttien muodostuminen näkyy parhaiten elektronimikroskoopilla (Kumar ym. 2015).



Kuva 3. Koiran maksa, histologinen leike, HE-värjäys. Kuvassa erottuu kolme nuolella merkittyä apoptoottista solua. Solut ovat voimakkaan eosinofiilisiä, pieniä ja niiden ympärillä nähdään valkoinen kehä. Kuva: Cullen ja Stalker 2015.

Kaspaasien aktivaatio on spesifisin apoptoosin markkeri (Gown ja Willingham 2002). Immunohistokemialla voidaan osoittaa apoptoosiin liittyviä proteiineja kudoksetleikkeissä (Kujala 2012). Immunohistokemia perustuu koe-eläimissä tuotettuihin vasta-aineisiin, jotka pystyvät tunnistamaan kudoksetleikkeissä proteiinien antigeenejä. Vasta-aine saadaan näkyviin joko värjäämällä se suoraan tai kiinnittämällä siihen sekundäärivasta-aine, joka värjätään. Väri saadaan useimmiten aikaan fluerisoivilla tai entsyymaattisilla aineilla (Kalyuzhny 2016). Immunohistokemiallisesti on mahdollista osoittaa sekä aktivoituneita kaspaaseja (engl. cleaved caspases) että kaspaasien aktivoitumattomia muotoja (Eckle ym. 2004). Tämän työn tutkimusosuudessa on tutkittu aktivoituneita kaspaaseja. Kaspaasi 3:n osoittaminen immunohistokemiallisella värjäyksellä on käyttökelpoinen useimmissa kudoksissa ja sillä saatuja tuloksia on helppo tulkita (Gown ja Willingham 2002). Kaspaasi 3:n osoittamisella saadut tulokset korreloivat hyvin apoptoosin kanssa (Krajewska ym. 1997) ja se soveltuu käytettäväksi myös vanhempien arkistoitujen kudoksetleikkeiden tutkimiseen (Gown ja Willingham 2002).

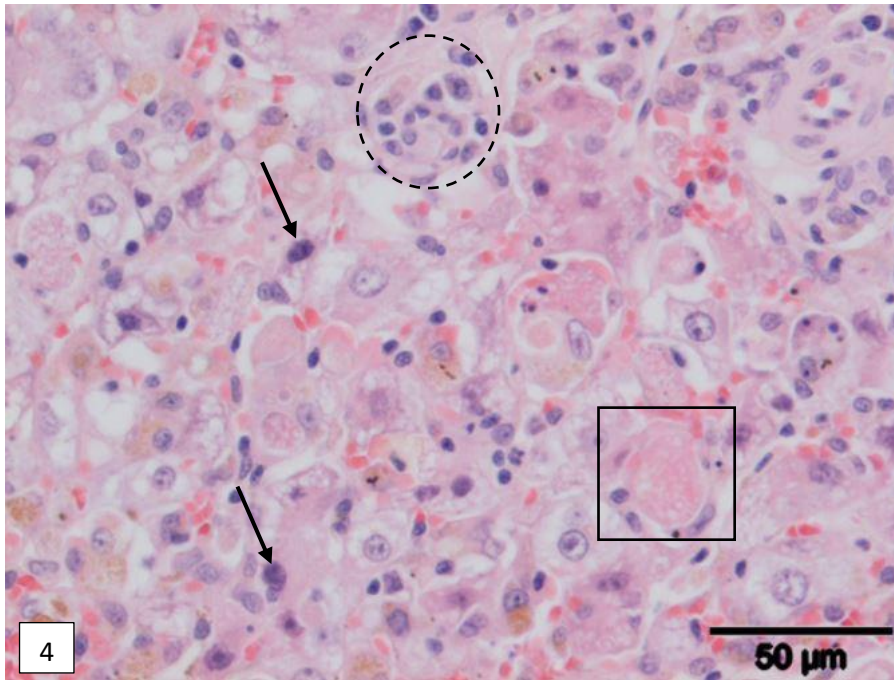
2.3.2 Nekroosi

Nekroosi on solukuoleman tyyppi, joka on aina patologinen ja johtaa usein kudoksen tulehdustilaan. Nekroottinen solu turpoaa ja lopulta sen solukalvo hajoaa. Solun sisältö valuu solusta ulos ympäröivään kudokseen, josta solun jäänteet hajotetaan entsymaattisesti (Kumar ym. 2015).

Adenosiinitrifosfaatin (ATP) määrän väheneminen on tärkein yksittäinen syy nekroosiin. ATP:n vähenemiseen solussa on kuitenkin useita syitä, joista tärkeimmät ovat vähentynyt hapen ja ravinteiden saanti, mitokondriovauriot sekä jotkin toksiinit (Kumar ym. 2015). ATP:n väheneminen johtaa solukalvon Na-K-ATPaasin toimimattomuuteen ja täten solun turpoamiseen, solun happamoitumiseen, Ca²⁺-ionin siirtymiseen soluun, proteiinisynteesin vähenemiseen ja lopulta mitokondrioiden ja lysosomien vaurioihin. Mitokondriovauriot johtavat aina ATP:n vähenemiseen ja joskus jopa suoraan solukuolemaan apoptoosin avulla (Kumar ym. 2015).

Kalsium on liiallisissa määrin haitallista soluille, koska se muuttaa mitokondrion kalvon läpäisevyyttä ja vaikuttaa suoraan solun entsyymitoimintaan. Myös vapaat radikaalit voivat vaikuttaa solukalvojen läpäisevyyteen tai proteiinien laskostumiseen tai ne voivat aiheuttaa suoraan mutaatioita. Nykyään tiedetään, että niillä on myös apoptoottisia vaikutuksia (Kumar ym. 2015). Nekroosiin johtavat solutason mekanismit ovat siis moninaisia ja osittain päällekkäisiä sekä toisiaan vahvistavia.

Nekroottiset muutokset ovat havaittavissa valomikroskoopilla kudokset leikkäessä. HE värjäyksessä nekroottisilla alueilla eosinofilia kasvaa eli ne sitovat enemmän punaista eosinia ja värjäytyvät punaisemmin. Punainen väri tarttuu leikkeeseen paremmin, kun soluliman proteiinit denaturoituvat. Lisäksi RNA:n määrä vähenee nekroottisissa soluissa, jolloin sininen väri tarttuu kudokset leikkäeseen huonommin (Kumar ym. 2015). Nekroottisten solujen solulima muuttuu vakuolaariseksi, kun entsyymien tuhoamat soluelimet turpoavat (Kumar ym. 2015), mikä nähdään valomikroskoopissa. Kuvassa 4 on nekroottisia soluja koiran maksassa. Nekroottisten solujen tumissa tapahtuu muutoksia, joita ovat liukeneminen (engl. karyolysis), hajoaminen (engl. karyorrhexis) ja kutistuminen (engl. pyknosis) (Kumar ym. 2015). Kaikkia tumamuutoksia voidaan nähdä yhdessä nekroottisessa alueessa (Cullen ja Brown 2012). Selvin nekroosin merkki on hajonneet solut (Cullen ja Brown 2012).



Kuva 4. Koiran maksa, histologinen leike, HE-värjäys. Kuvassa on akuutti hepatiitti. Kuvaaan nuolilla merkitty Kupfferin soluja. Kuvaaan on neliöllä merkitty hajonnut nekroottinen solu. Katkoviivalla kuvaaan on ympyröity tulehdussoluja. Kuva muokattu: Rothuizen 2006.

Maksasolujen nekroosia voidaan tutkia värjäämällä biopsianäytteet cresyl violet -väriaineella (Henrich ja Köhler 2018). Emäksiset väriaineet reagoivat negatiivisesti varautuneiden solukomponenttien, kuten ribosomaalisen RNA:n fosfaattiryhmien kanssa (Ross ja Pawlina 2011). Koska maksasolujen metabolia ja proteiinisynteesi on kiivasta ja niissä on paljon ribosomaalista RNA:ta, cresyl violet -värjäys soveltuu hyvin myös hepatosyyttien tarkasteluun (Henrich ja Köhler 2018). Nekroottisessa solussa osmoottinen säätely on häiriintynyt, josta seuraa veden siirtyminen soluun. Tämä johtaa ribosomien irtoamiseen. Koska cresyl violet voi värjätä vain ehjiä ribosomeja, näkyvät nekroottiset hepatosyytit valomikroskoopissa vähentyneenä värin intensiteettinä (Henrich ja Köhler 2018).

2.4 Hepatiitit

Koirilla maksan parenkyymiin kohdistuvat sairaudet voidaan jakaa primaarisiin ja sekundaarisiin. Primaarisia maksan sairauksia ovat krooninen hepatiitti ja akuutti hepatiitti (Watson 2014). Akuutti hepatiitti voi johtaa krooniseen hepatiittiin (Poldervaart ym. 2009). Kroonisen hepatiitin tiettyä muotoa, jossa maksaparenkyymän normaali arkkitehtuuri katoaa, kutsutaan maksaliuskoja dissekoivaksi hepatiitiksi (engl. lobular dissecting hepatitis)

(Webster ym. 2019). Sekundaarisella hepatiitilla tarkoitetaan maksan tulehdusvastetta sen ulkopuolisiin patologisiin tiloihin (Tams 2003). Termiä reaktiivinen hepatiitti käytettäessä viitataan sekundaariseen hepatiittiin (Watson 2014).

2.4.1 Krooninen hepatiitti

2.4.1.1 Kroonisen hepatiitin esiintyminen

Krooninen hepatiitti on yleisin maksan parenkyymiin kohdistuva sairaus koirilla (Favier 2009 ja Poldervaart ym. 2009). Poldervaart ym. 2009 totesivat tutkimuksessaan, että primaarista hepatiittia sairastavista koirista suurin osa sairasti nimenomaan kroonista hepatiittia. Vuonna 2010 Watsonin ym. tekemässä tutkimuksessa kroonisen hepatiitin esiintyvyys oli 12 % 200:n satunnaisesti valitun koiran obduktionäytteiden aineistossa. 1997 julkaistussa Fuentealban ym. tutkimuksessa, jonka tutkimusaineisto oli kerätty vuosina 1994-1998, krooninen hepatiitti tavattiin noin 30 % kroonisesta maksasairaudesta kärsivistä koirista. He olivat kuitenkin uusimmista tutkimuksista poiketen jakaneet kroonisen hepatiitin alakategorioihin, joten prosenttiosuus olisi mahdollisesti suurempi erilaisella jaottelulla.

Vaikka kroonista hepatiittia tavataan kaikilla koiraroduilla, siinä esiintyy vahvaa rotusidonnaisuutta. Tautia esiintyy runsaasti mm. bedlingtoninterriereillä, amerikan- ja englannin cockerspanielieleillä, dobermanneilla ja labradorinnoutajilla (Webster ym. 2019). Yleensä sairastumisikä on noin 8 vuotta, mutta tautia on todettu aina 7 kuukauden ikäisistä pennuista 16-vuotta vanhoihin koiriin. Riskirodut sairastuvat muita aiemmin (Bexfield ym. 2012). Taudin on todettu olevan yleisempää nartuilla kuin uroksilla (Bexfield ym. 2011 ja Fuentealba ym. 1997 ja Poldervaalt ym. 2009).

2.4.1.2 Kroonisen hepatiitin etiologia ja oireet

Kroonisen hepatiitin taustalla voivat olla monet syyt. Sitä voivat aiheuttaa infektiiviset, toksiset tai autoimmuunitaustaiset tekijät (Webster ym. 2019). Yleisin toksisista aiheuttajista on maksaan kertyvä liiallinen kupari, jota voi esiintyä millä tahansa rodulla, vaikkakin tietyillä roduilla on suurempi alttius kupariin liittyvään krooniseen hepatiittiin (Webster ym. 2019). Bedlingtoninterrierillä on todettu perinnöllinen kupariaineenvaihduntaan vaikuttava geenimutaatio (Watson 2014), ja myös labradorinnoutajilla on geneettistä alttiutta sairastua kupariaineenvaihdunnan häiriöihin (Dirksen ja Fieten 2017). Kuparia voi esiintyä myös

sekundäärisenä maksasolujen nekroosin takia (Dirksen ja Fieten 2017). Dobermanneilla sairauden oletetaan johtuvan epänormaalista hepatosyyttien MHC II-molekyylien tuotosta, mikä johtaa t-solujen aktivaatioon eli hepatiitin etiologia on autoimmuuniperäinen (Speeti ym. 2003). Lisäksi dobermanneilla on todettu kuparinkuljetusproteiini ATP7B:n mutaation (*ATP7B:c.4358G>A*) olevan yhteydessä kuparin määrän lisääntymiseen maksassa (Wu ym. 2019). Usein taudin syy tai aiheuttaja jää kuitenkin tuntemattomaksi eli se on idiopaattinen (Webster ym. 2019).

Kroonisen hepatiitin oireet ovat epäspesifisiä, mutta niitä ovat esimerkiksi huonontunut ruokahalu, voimattomuus, oksentelu ja polyuria ja polydipsia (Webster ym. 2019).

Kroonisella hepatiitilla on ilmeisesti pitkä subkliininen vaihe, koska jopa 20 % tautia sairastavista koirista esiintyy veriarvoissa maksaentsyymien nousua ilman kliinisiä oireita (Webster ym. 2019). Oireet eivät korreloi myöskään histopatologisen kuvan kanssa, koska kliinisesti terveillä koirilla voi esiintyä muutoksia histologiassa (Bexfield ym. 2011). Maksan histologiset muutokset kliinisesti terveillä koirilla selittyy sillä, että oireet alkavat vasta kun noin 70 % maksan funktionaalista massasta on jo menetetty (Hall ym. 2005). Tämän lisäksi maksalla on erinomainen reservipotentiaali ja regeneraatiokyky, joten kroonisissa sairauksissa oireet eivät välttämättä ilmene kovin nopeasti (Hall ym. 2005).

2.4.1.3 Maksaentsyymi ALAT kroonisen hepatiitin diagnostiikassa

Seerumin alaniiniaminotransferaasi (ALAT) on hepatosyyttien solulimassa oleva entsyymi (Villiers ja Ristić 2016). ALAT-entsyymiä pidetään hyvin maksaspesifisenä ja sen löytyminen plasmasta kertoo maksasolujen solukalvon vauriosta ja nekroosista (Tams 2003). Entsyymiä on kuitenkin myös esimerkiksi sydämessä ja lihaksissa, mutta näiden vaikutukset seerumin ALAT-aktiivisuuksiin eivät ole merkittäviä, ellei esimerkiksi lihasvaurio ole hyvin suuri (Villiers ja Ristić 2016). ALAT-aktiivisuus ei kerro maksan primaarista patologiasta (Villiers ja Ristić 2016). Testi ei myöskään anna viitteitä maksan toiminnasta (Villiers ja Ristić 2016).

ALAT-aktiivisuuden nousu seerumissa on ensimmäisiä kroonisen hepatiitin indikaattoreita ja on siksi paras verinäytteen tehtävä testi maksasairautta epäiltäessä (Webster ym. 2019). Osalla koirista saattaa olla histologisia muutoksia ilman ALAT- arvojen nousua (Webster ym. 2019). Fuentealban ym. (1997) tekemässä tutkimuksessa ALAT-arvon ja histologisten muutosten välillä ei nähty korrelaatiota, toisin kuin Dirksen ym. (2017) tutkimuksessa, jossa vahva

korrelaatio havaittiin. Vuonna 2019 ilmestyneen konsensusartikkelin mukaan assosiaatio voidaan kuitenkin todeta ALAT-arvon ja histologisen kuvan välillä (Webster ym. 2019). Seerumin ALAT-arvon on todettu olevan korkeampi kroonisissa kuin reaktiivisissa hepatiiteissa, mutta tarkkaa raja-arvoa tautien erottamiseksi toisistaan ei voida antaa (Dirksen ym. 2017). Reaktiivisessa hepatiitissa ALAT-arvon ei kuitenkaan oleteta nousevan yli kolmenkertaisiksi suhteessa viiterajojen yläpään (Webster ym.2019). Toisaalta ei ole tavatonta, että nähdään jopa viisinkertaista ALAT-arvon nousua maksan reagoiessa ruuansulatuskanavan patologioihin (Villiers ja Ristić 2016).

Vuonna 2019 ilmestyneen konsensusartikkelin mukaan hepatiittia pidetään kroonisena, kun ALAT-arvot ovat olleet yli 2 kuukauden ajan viiterajojen yläpuolella eikä nousua pystytä muutoin selittämään (Webster ym. 2019). Tarkkaa raja-arvoa sille, kuinka moninkertaisia ALAT-arvojen nousun tulee olla, ei kuitenkaan ole (Webster ym. 2019). Lähes kaikilla kroonisesta hepatiitista kärsivillä koirilla ALAT-aktiivisuus on 5-18 kertainen verrattuna viitearvojen yläpään (Ettinger ja Feldman 2010). ALAT-aktiivisuus seerumissa vaihtelee taudin eri vaiheissa. Lisäksi on huomioitavaa, että taudin edetessä kirroosiin ALAT-aktiivisuus voi jopa vähentyä maksaparenkyymin korvautuessa sidekudoksella (Webster ym. 2019).

2.4.1.4 Kroonisen hepatiitin diagnosointi biopsiasta

Kroonisen hepatiitin diagnosointiin tarvitaan aina maksabiopsia (Webster ym. 2019). Hyvän diagnoosin saavuttamiseksi histologiassa tulisi näkyä vähintään 12-15 porta-aluetta (Webster ym. 2019). Histologisesti tulee arvioida tulehduksen solutyypit, aste ja sijainti sekä apoptoosien ja nekroosien määrä ja sijainti. Näiden lisäksi on arvioitava fibroosin ja sappitiereaktion määrä (Webster ym. 2019). Histologisen tarkastelun lisäksi maksanäytteestä tulisi tehdä myös bakteeriviljely (Webster ym. 2019).

Kroonisen hepatiitin diagnosointiin kuuluu myös kuparin määrittäminen (Webster ym. 2019). Histologisesti kuparin määrä arvioidaan asteikolla 0-5 ja kaikkia yli kahden olevia arvoja pidetään epänormaaleina (Dirksen ja Fieten 2017). Histologisen tarkastelun lisäksi kupari tulisi määrittää myös kvantitatiivisesti eli määrällisesti (Dirksen ja Fieten 2017).

2.4.1.5 Kroonisen hepatiitin histologinen kuva

World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) julkaisi vuonna 2006 standardit koirien ja kissojen maksasairauksien kliiniselle ja histologiselle diagnosoinnille (Rothuizen ym. 2006). Nämä standardit ovat edelleen kattavin ja täsmällisin keino määrittellä kroonisen hepatiitin histologinen kuva (Webster ym. 2019). Krooniseen hepatiittiin kuuluu lymfosyyttinen, plasmasyyttinen tai granulomatoottinen tulehdus tai näiden sekoitus sekä hepatosyyttien apoptoosia ja nekroosia. Näiden lisäksi esiintyy eri asteista fibroosia ja regeneraatiota maksakudoksessa (Webster ym. 2019).

Kroonisessa hepatiitissa tulehdussolut koostuvat enimmäkseen lymfosyyteistä ja plasmasoluista (Fuentealba ym. 1997). Lymfosyyttien on kuitenkin todettu olevan pääsolutyypin ja plasmasolujen olevan selkeästi vähemmistönä (Bexfield ym. 2011 ja Thornburg 1998). Osalla koirista saatetaan tavata myös neutrofiilisiä granulosityyttejä (Bexfield ym. 2011 ja Kanemoto ym. 2013), joskin niitä on määrällisesti vähemmän kuin lymfosyyttejä tai plasmasoluja (Bexfield ym. 2011). Myös makrofagit voivat olla vallitseva solupopulaatio (Kanemoto ym. 2013).

Tulehdussolut sijoittuvat maksan porta-alueille, ulottuen sieltä kohti keskivyöhykettä (Fuentealba ym. 1997). Bexfieldin ym. (2011) tutkimuksen mukaan tulehdussoluinfiltraatiota tavataan porta-alueiden lisäksi myös koko maksaparenkyymissä. Soluja esiintyy myös sidekudosalueella sekä porttilaskimoiden että keskuslaskimoiden läheisyydessä (Thornburg 1998). Tulehdusreaktion sijainti saattaa selittyä taudin etenemisvaiheella niin, että reaktio alkaa porta-alueen sidekudoksesta siirtyen kohti hepatosyyttejä ja lopulta kohti maksaparenkyymiä (Tams 2003).

Kroonista hepatiittia sairastavien koirien tulehduksen aste maksassa vaihtelee. Fuentealban ym. (1997) tutkimuksessa todetaan, että kroonisessa hepatiitissa tulehdusreaktio on vakavuudeltaan kohtalaista tai vakavaa, kun käytössä oli asteikko 0-3 ("0=ei havaittu, 1=lievä, 2=kohtalainen ja 3=vakava"). Kanemoto ym. (2013) taas toteavat tutkimuksessaan, että tutkittujen koirien tulehdusreaktio oli lievää. Tutkimuspopulaatio muodostui koirista, joiden maksoissa havaittiin voimakasta sidekudoksen lisääntymistä. Myös muiden lähteiden mukaan tulehdusreaktio vähenee sidekudoksen lisääntymisen myötä (Ettinger ja Feldman 2010).

Taudin edetessä maksan sidekudoksen määrä lisääntyy (Bexfield ym. 2011 ja Fuentealba ym. 1997) ja se onkin yksi kroonisen hepatiitin histopatologisista tunnusmerkeistä (Rothuizen ym. 2006). Sidekudoksen lisääntyminen tapahtuu useassa eri vaiheessa. Vaurion alussa hepatosyytit alkavat jakautua, jolloin myös maksan koko kasvaa. Vaurion jatkuessa hepatosyyttien jakautuminen muuttuu riittämättömäksi, ja samaan aikaan myofibroblastien sekä sappiteiden epiteelisolujen osuus kasvaa (Lunz ym. 2005). Sidekudoksen lisääntyminen alkaa porta-alueen sidekudoksen määrän kasvuna ja etenee periportaalisesti muodostaen aina paksumpia juosteita. Kun prosessi on edennyt pitkälle, maksa muuttuu nodulaariseksi ja sitä kutsutaan kirroottiseksi maksaksi (Webster ym. 2019). Lopulta potilaalla esiintyy klinisiä oireita ja maksan toiminnallinen massa on vähentynyt merkittävästi (Lunz ym. 2005).

Kupari saadaan histologisesti näkyviin erikoisvärjäyksin (Dirksen ja Fieten 2017). Kroonisessa hepatiitissa, jonka taustalla on kupariaineenvaihdunnan häiriö, kuparia nähdään ensin sentrilobulaarisesti (Dirksen ja Fieten 2017). Periportaalisesti esiintyvä kupari on usein epäspesifistä eikä sillä ole kliinistä merkitystä (Webster ym. 2019), tai se voi viitata sappiteiden sairauksiin (Dirksen ja Fieten 2017).

2.4.1.6 Apoptoosi kroonisessa hepatiitissa

Maksakudoksen tulehduksen asteen ja vakavuuden on todettu korreloivan positiivisesti apoptoosien määrän kanssa koirilla (Vince ym. 2014). Vince ym. käyttivät vuoden 2014 tutkimuksessaan maksan tulehduksen asteen arviointiin modifioiden ihmisten kroonisissa maksasairauksissa käytössä olevaa Ishakin arviointiasteikkoa (engl. Ishak's grading scheme). Tutkimuksessa käytettiin tulehduksen asteesta termiä ”nekroinflammatorinen aktiivisuus” (Vince ym. 2014), jolla tarkoitetaan tilannetta, jossa tulehduksen tarkkaa syytä tai patomekanismia ei tunneta (Cullen ja Stalker 2015). Apoptoosien määrä lisääntyy ei-kirroottisissa maksoissa taudin edetessä myös Thornburgin tutkimuksen mukaan (Thornburg 1998). Kun tauti etenee pitkälle ja maksan sidekudoksen määrä kasvaa, eli maksa muuttuu kirroottiseksi, apoptoosien määrä vähenee. Kanemoton ym. (2013) tutkimuksessa apoptoottisia hepatosyyttejä tavattiin vain kolmella kolmestatoista tutkimuskoirasta, joiden näytteissä maksat olivat erittäin kirroottisia. Tiedetään kuitenkin, että apoptoosien määrissä on vaihtelua yksilöiden välillä. Vincen ym. (2014) tutkimuksessa koirien maksabiopsioille annettiin apoptoottinen indeksi kuvaamaan apoptoosien määrää. Tutkimuksessa mukana olleet yksilöt saivat arvoja indeksin ääri laidasta toiseen eli tulokset vaihtelivat riippuen yksilöstä.

Apoptoottisten solujen tarkemmasta sijainnista maksavauriossa ei olla täysin yksimielisiä. Maailman pieneläinlääkäri järjestön maksa-työryhmän (World Small Animal Veterinary Association, Liver Standardization Group) mukaan apoptoosien ja nekroosien jakautuminen vaihtelee suuresti (Rothuizen ym. 2006). Thornburg (1989) havaitsi tutkimuksessaan, että taudin alkuvaiheessa ensimmäiset yksittäiset apoptoottiset solut sijaitsevat maksa-asinuksien vyöhykkeellä kolme (Thornburg 1989). Bexfield ym. (2011) tutkimuksessa todettiin vastaavasti, että apoptoottisia hepatosyyttejä nähdään useimmiten yhdessä tulehdussolujen kanssa eli porta-alueella ja tämän lisäksi koko maksa-parenkyymissä (Bexfield ym. 2011).

2.4.1.7 Nekroosi kroonisessa hepatiitissa

Yhdessä apoptoosin kanssa nekroosia maksaparenkyymissä pidetään kroonisen hepatiitin tunnusmerkkinä (esim. Bexfiel ym. 2011). Nekroosien määrästä ei kroonisessa hepatiitissa voida kuitenkaan sanoa mitään kovin yhtenäistä. Joidenkin lähteiden mukaan nekroinflammatorinen aktiivisuus on kroonisessa hepatiitissa melko pientä. Kanemoto ym. luokittelivat vuonna 2013 tehdyssä tutkimuksessaan aktiivisuuden asteikolla 0-5, ja suurin osa tutkimuksen koirista sai arvon 1. Tutkimuksen koirat olivat kuitenkin taudinkuvassaan pitkälle edenneitä, eli histologiset näytteet olivat sidekudostuneita (Kanemoto ym. 2013). Toisen tutkimuksen mukaan sama aktiivisuus jaoteltiin asteikolle 0-18, ja suurin osa koirista asettuivat asteikon alapäähän, maksimin ollessa 14 (Vince 2014). Fuentealba ym. taas toteaa vuonna 1997 tehdyssä tutkimuksessa, että kroonisen hepatiitin erottaa muista hepatiiteista juuri nekroosit. Tässä tutkimuksessa kaikki koirat saivat arvot vakava tai kohtuullinen nekrooseja tutkittaessa (Fuentealba ym. 1997).

Kroonisessa hepatiitissa nekroosien on todettu sijoittuvan periportaalisesti ja kohdistuvan erityisesti hepatosyytteihin, jotka sijaitsevat porta-alueen lähellä (Fuentealba ym. 1997). Nekrooseja havaitaan kuitenkin myös koko maksaparenkyymissä (Bexfield ym. 2011), ja joskus nekroosien sijaintia ei pystytä määrittämään maksan arkkitehtuurin tuhoutumisen vuoksi (Kanemoto ym. 2013). Krooniselle hepatiitille on tyypillistä, että taudin alkuvaiheessa nekroosi näkyy niin sanottuna peacemeal -nekroosina (Tams 2003), jossa nekroottiset solut sijoittuvat normaaliin hepatosyyttien ympärille tai sekaan useimmiten lähelle porta-aluetta (Tams 2003). Taudin edetessä nekroottiset alueet alkavat kasvaa ja lopulta ne kulkevat maksaliuskasta toiseen muodostaen silloittuvaa nekroosia (engl. bridging necrosis) yhdessä sidekudoksen kanssa (Tams 2003).

2.4.2 Reaktiivinen hepatiitti ja sen histologinen kuva

Reaktiivinen hepatiitti on maksan reaktio maksan ulkopuolisiin patologiisiin tiloihin. Reaktiivinen hepatiitti pystytään usein parantamaan hoitamalla taustalla oleva syy, joita on useita (Dirksen ym. 2017). Neuman ja Danner 2012 totesivat, että urogenitaalisairaudet erityisesti endometriitti on yleisin reaktiivisen hepatiitin aiheuttaja. Farray ym. 2019 tutkimuksessa ruuansulatuskanavan sairaudet olivat kuitenkin yleisimpiä reaktiivisen hepatiitin aiheuttajia. Myös sydänvika tai hengityselintensairaudet aiheuttavat yleisesti reaktiivisen hepatiitin (Neumann ja Danner 2012). Reaktiivinen hepatiitti on yleisempi vanhoilla koirilla eikä sukupuolisidonnaisuutta ole (Neumann ja Danner 2012).

Reaktiivisen hepatiitin histologiassa tulehdussolut sijaitsevat yleensä porta-alueilla tai maksaparenkyymissä (Rothuizen 2006) diffuusisti tai multifokaalisesti (Neumann ja Danner 2012). Jos tulehdus on akuutti, maksassa nähdään lievää tai kohtalaista neutrofiilisten granulosityttien infiltraatiota sekä sinusoideissa Kupfferin soluja ja valkosoluja (Rothuizen 2006). Pidempään jatkuneessa reaktiivisessa hepatiitissa solukuva on mononukleaarinen koostuen plasmassoluista ja lymfosyyteistä. Myös pigmentoituneita magrofageja nähdään (Rothuizen 2006). Nekroosi, apoptoosi tai sidekudoksen lisääntyminen eivät kuulu reaktiivisen hepatiitin histologiseen kuvaan (Webster ym. 2019). Taulukossa 1 on vertailtu kroonisen hepatiitin ja reaktiivisen hepatiitin histologista kuvaa.

Taulukko 1. Kroonisen ja reaktiivisen hepatiitin histologisen kuvan vertailu. Taulukko muokattu Webster ym. 2019

Krooninen hepatiitti	Reaktiivinen hepatiitti
-kohtalainen tai merkittävä tulehdus	-lievä tai kohtalainen portaalinen tulehdus
-tulehdussoluina lymfosyytti, plasmassolu, neutrofiilinen granulositytti, eosinofiilinen granulositytti	-tulehdussoluina lymfosyytti, plasmassolu, neutrofiilinen granulositytti
-nekroosia ja/tai apoptoosia	-ei nekroosia eikä apoptoosia
-mahdollisesti sappitereaktiota	-ei fibroosia
-mahdollisesti fibroosia	-ei remodellaatiota
-mahdollisesti regeneratiivisia noduloita	

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

Tutkimus on vertaileva retrospektiivinen tutkimus, jossa verrataan lievää kroonista hepatiittia (n=6) ja lievää reaktiivista hepatiittia (n=6) sairastavien koirien sekä kontrolliryhmän (n=6) koirien maksanäytteiden apoptoosi- ja nekroosimääriä keskenään. Kroonista ja reaktiivista hepatiittia sairastavien potilaiden näytteet ovat biopsianäytteitä elävistä koirista ja kontrolliryhmän maksanäytteet koostuvat ruumiinavausnäytteistä.

3.1 Aineisto

Tutkimuksen hepatiitti ryhmien materiaaleina käytettiin vuosina 2015-2019 Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan patologian ja parasitologian oppiaineelle lähetettyjä koirien maksabiopsioita. Biopsianäytteitä oli saapunut oppiaineelle sekä yksityisten eläinlääkärien lähettämänä kaikkialta Suomesta että Yliopistollisen pieneläinsairaalan eläinlääkärien lähettämänä. Biopsianäytteet haettiin Provet-potilastietokannasta käyttäen hakusanoja ”hepatiitti”, ”maksa”, ”krooninen” ja ”reaktiivinen”. Näytteen alkuperäisellä mikroskopointihetkellä näytettä oli saatettu kuvailla joko krooniseksi hepatiitiksi tai reaktiiviseksi hepatiitiksi tai varmaa diagnoosia ei oltu pystytty antamaan. Jako kroonisen ja reaktiivisen hepatiitin ryhmiin tehtiin koirien ALAT-arvojen perusteella. Näytteiksi valittiin ainoastaan sellaiset näytteet, joiden muutoksia oli kuvailtu lieviksi, ja joiden kuparivärijäykset olivat saaneet luokituksen 0-2 asteikolla 0-5.

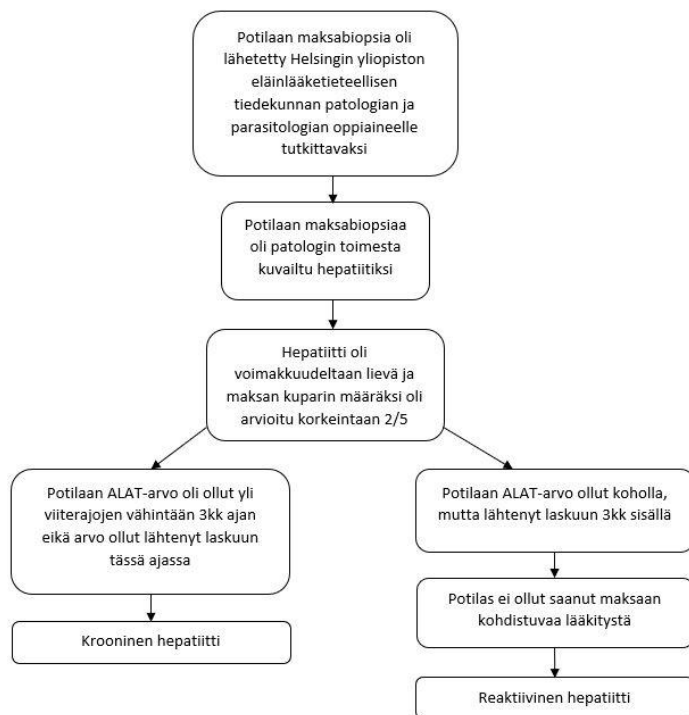
Kontrolliryhmä (n=6) muodostui vuonna 2018 patologian ja parasitologian oppiaineessa otetuista ruumiinavausnäytteistä. Kontrolliryhmän koirista neljä osallistui alun perin toiseen tutkimukseen, jota varten ruumiinavausnäytteet otettiin. Näistä kaksi oli lopetettu käytöshäiriöiden takia, yksi luusto-ongelmien takia ja yksi epilepsian takia. Loput kaksi kontrolliryhmän koiraa lopetettiin neurologisten syiden takia. Kaikilta kontrollikoirilta otettiin eutanasian yhteydessä verinäytteet, joista tutkittiin ALAT-arvo ja aspartaattiaminotransferaasiarvo (ASAT). Arvot olivat viitearvojen sisällä kaikilla koirilla. Kontrollikoirien maksan histologiassa ei todettu hepatiittimuutoksia. Millään kontrolliryhmän koiralla ei myöskään ollut maksasairauteen viittaavaa oireilua ennen lopetusta. Kaikkien kontrolliryhmän koirien eutanasiat suoritettiin Yliopistollisessa eläinsairaалassa ja ruumiinavaus sekä maksanäytteiden otto tehtiin maksimissaan yhden tunnin kuluttua lopetuksesta.

3.2 Hepatiitin diagnostiset kriteerit

Lievän kroonisen ja lievän reaktiivisen hepatiitin ryhmiin valittiin kuusi ensimmäistä kriteerit täyttävää koira kumpaankin ryhmään. Kroonisen hepatiitin diagnoosi perustui tässä tutkimuksessa seuraaviin kriteereihin: 1) biopsiaa oli kuvailtu lieväksi hepatiitiksi ja 2) koiran ALAT-arvot olivat olleet yli viiterajojen vähintään 3 kuukauden ajan, eivätkä ne tässä ajassa olleet lähteneet laskuun. Reaktiivisen hepatiitin diagnoosi perustui tässä tutkimuksessa seuraaviin kriteereihin: 1) biopsiaa oli kuvailtu lieväksi hepatiitiksi, 2) koiran ALAT-arvot olivat olleet koholla vain hetkellisesti eli lähteneet laskemaan 3 kuukauden sisällä, ja 3) koira ei ollut saanut maksaan kohdistuvaa lääkitystä. Kaaviossa 1 on esitetty potilaiden jaottelu ryhmiin.

ALAT-arvot tarkistettiin Yliopistollisen pieneläinsairaalan Provet-potilastietojärjestelmästä, suoraan omistajilta tai eläintä hoitaneelta eläinlääkäriltä. Lisäravinteiden tai ruokinnallisten maksan tukiravinteiden käyttö ei ollut poissulkeva kriteeri kummassakaan ryhmässä. Näytteiden histologinen laatu tarkastettiin patologin (tutkielman ohjaajat Niina Airas ja Pernilla Syrjä) toimesta ennen sen hyväksymistä mukaan tutkimukseen.

Kaavio 1. Koirien jaottelun perusteet lievän kroonisen hepatiitin ryhmään ja lievän reaktiivisen hepatiitin ryhmään.



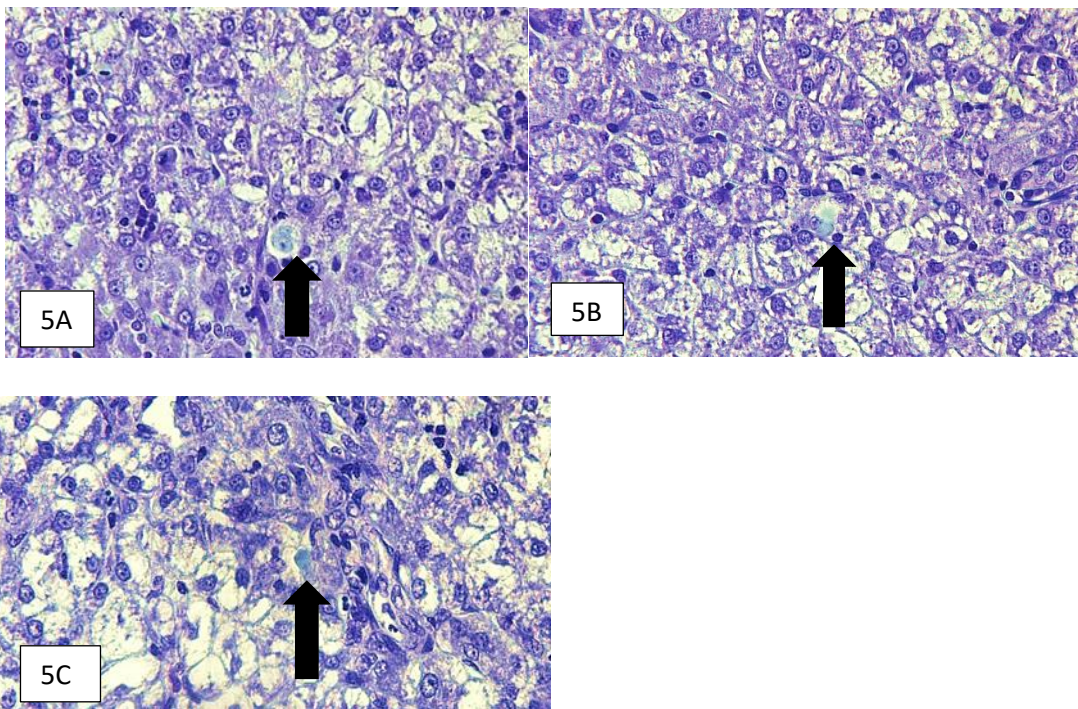
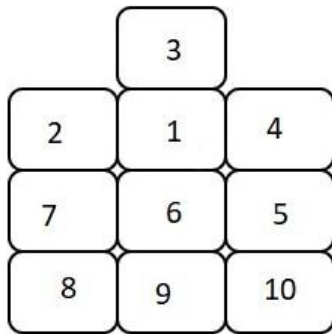
3.3 Värjäykset

Maksasolujen nekroosia tutkittiin värjäämällä näytteet cresyl violet -väriaineella. Apoptoosia tutkittiin värjäämällä näytteet kaspasi 3 -immunohistokemiallisella värjäyksellä (Cell Signaling, Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb). Värjäysten tarkempi protokolla on esitetty liitteissä 1 ja 2. Kaikki värjäykset suoritti koulutettu bioanalytikko saman protokollan mukaan.

3.4 Cresyl violet -värjäyksen mikroskopointi

Mikroskopioija ei mikroskopointihetkellä tiennyt kumpaan ryhmään (krooninen hepatiitti vai reaktiivinen hepatiitti) kyseinen näyte kuului eli näytteet sokkoutettiin. Jokaisesta näytteestä otettiin kymmenen kuvaa valomikroskoopilla käyttäen Olympus BX51 -mikroskooppia ja Moticam 1080 -kameraa. Kuvat otettiin käyttäen mikroskoopin 40-kertaista objektiivia. Kuvat otettiin maksaparenkymistä niin, että hepatosyyttejä oli kuvissa näkyvissä mahdollisimman tasaisesti välttämällä porta-alueita ja keskuslaskimoita. Ensimmäinen kuva otettiin kohdasta, josta ensimmäinen nekroottinen solu löytyi. Kuvia ei otettu satunnaisista kohdista, jotta löydettäisiin kunkin näytteen kohta, jossa tulehdus oli vakavin. Kuvat otettiin niin, että ensimmäiset kolme kuvaa otettiin löydetyn nekroottisen solun vasemmalta ja oikealta puolelta sekä suoraan ensimmäisen näkökentän yläpuolelta. Loput kuusi näkökenttää kuvattiin kahdessa allekkain olevassa rivissä suoraan ensimmäisen kuvan alapuolella. Näin välttyttiin kuvaamasta samaa kohtaa uudelleen. Kaaviossa 2 on esitetty kuvien ottamisen järjestys. Jos näkökenttään osui leikkeen reuna, suuria suonia tai sidekudosta, kyseinen näkökenttä ohitettiin ja siirryttiin lähimpään hepatosyyttejä sisältävään näkymään. Cresyl violet -värjäyksessä värjäytyneet solut laskettiin silmämääräisesti jokaisen näytteen jokaisesta kuvasta. Laskenta tehtiin televisionäytöltä digitalisoiduista kuvista. Kunkin näytteen jokaisen kuvan värjäytyneiden solujen lukumäärä summattiin. Kuvassa 5 on esitetty histologisia kuvia vakavaa hepatiittia sairastavista potilaista, joiden maksabiosiat on värjätty cresyl violet -väriaineella. Kuvia käytettiin tutkimuksen referenssiaineistona. Kuvissa nähdään nekroottinen solu vaaleampana kuin ympäröivä kudosa.

Kaavio 2. Cresyl violet -värjäyksen kuvien ottamisen järjestys.

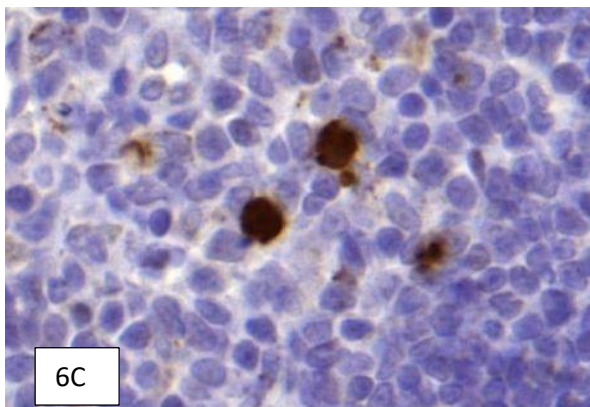
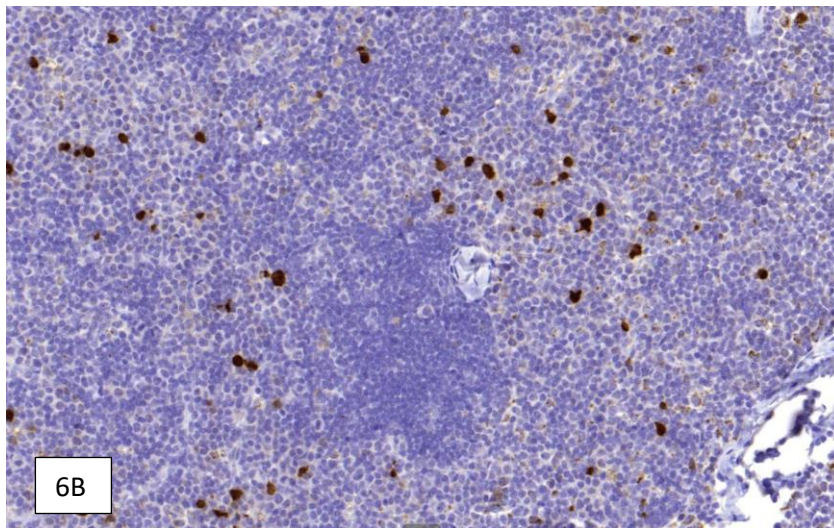
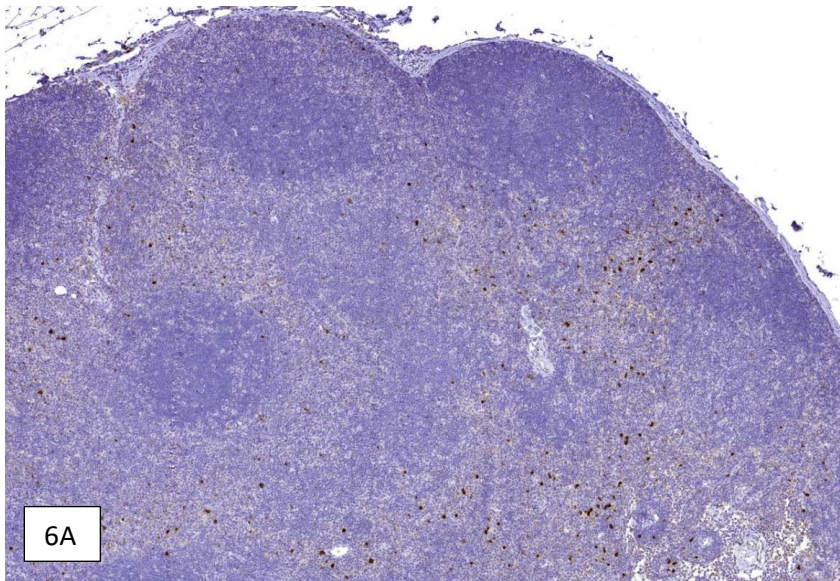


Kuva 5 A, B ja C. Cresyl violet -värjättyjä maksabiopsionäytteitä koirilta, joiden hepatiitti oli luokiteltu vakavaksi. 40-kertainen objektiivi. Nuoli osoittaa yhtä nekroottista hepatosyyttiä. Kuvat toimivat referenssikuvina tutkimuksen cresyl violet -värjäykselle. Mikroskooppinäkyssä värisävy poikkeaa näistä kuvista. Kuvat: Anna Huupponen 2021

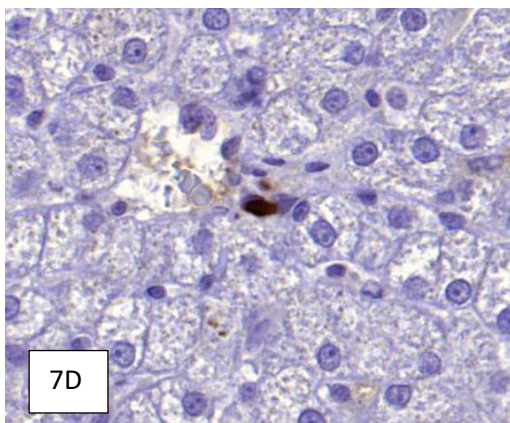
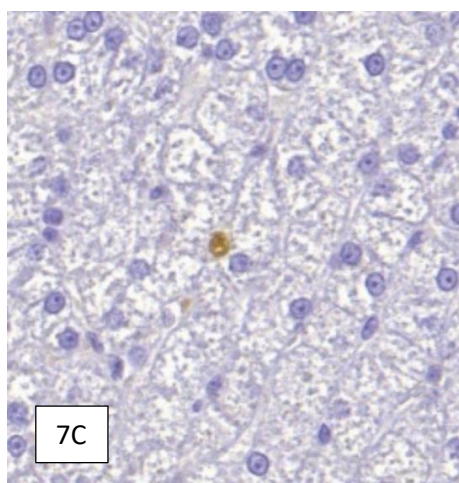
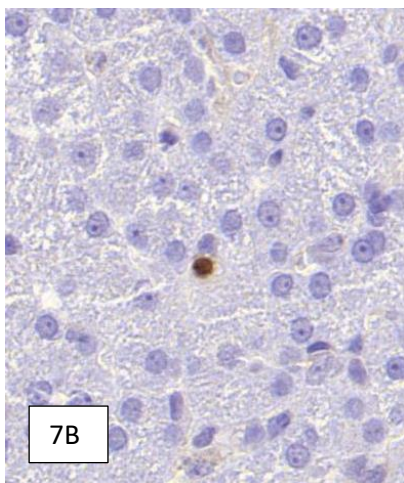
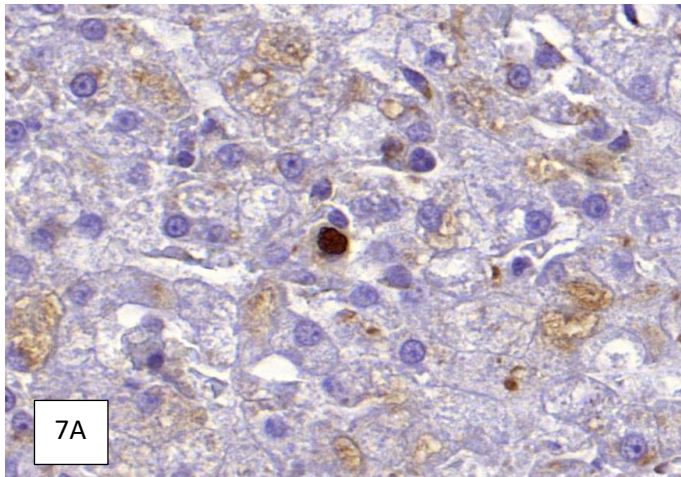
3.5 Kasperasi 3 -värjäyksen tutkiminen

Kasperasi-3 värjätyt näytteet skannattiin elektroniseen muotoon 3D Histec Panoramic MIDI digitaalisella lasi skannerilla (BioSiteHisto Oy). Näytteiden analysointiin käytettiin CaseViewer 2.4 -ilmaishjelmaa Windowsille. Näytteistä laskettiin ensin pienimmän näytteen pinta-ala, jonka jälkeen samankokoinen pinta-ala rajattiin kaikista lopuista näytteistä. Jos näyte oli huomattavasti suurempi kuin mitattava pinta-ala, ala otettiin satunnaisesta kohdasta näytettä. Mikäli rajatun alueen sisäpuolelle osui suuri sidekudosta tai verisuonia sisältävä kohta, sen pinta-ala vähennettiin molemmissa tapauksissa lopullisesta pinta-alasta, jotta tutkittavaksi saatiin mahdollisimman paljon maksasoluja sisältävä alue. Kasperasi 3 -värjäyksessä värjäytyneet solut laskettiin tietokoneruudulta näytteeseen rajatun pinta-alan sisäpuolelta ja summattiin yhteen. Jos värjäytyneitä soluja oli juuri rajatun pinta-alarajan ulkopuolella, ne laskettiin mukaan. Tällä haluttiin välttää virhettä, joka saattaa muodostua rajatun alueen satunnaisesta valitsemisesta. Värjäytynyt solu laskettiin mukaan myös vaikka sen sijainti olisi ollut sinusoidissa.

Kuvassa 6 on esitetty referenssikuvia kasperasi 3 -värjäyksen positiivisesta kontrollista, joka oli imusolmukkeesta. Kuvassa 7 on esitelty värjäymiä, joita tässä tutkimuksessa ei tulkittu apoptoosin aiheuttamiksi värjäymiksi vaan epäspesifisiksi signaaleiksi johtuen muun muassa sappi-, lipofuskiini- tai rautapigmenteistä.



Kuva 6 A, B ja C. Kaspasi 3 -värjätty imusolmuke, joka toimi positiivisena kontrollina ja verrokinäytteenä tutkimuksessa. Kuvassa A on 5-kertainen suurennos, kuvassa B on 20-kertainen suurennos ja kuvassa C 40-kertainen suurennos. Kaspasi 3 -värjättyt solut värjäytyvät erittäin tumman ruskeina, lähes mustina, tasareunaisina ja väritykseltään tasaisina soluina, joissa ei ole sisärakenteita näkyvissä. Kuvat: Anna Huupponen 2021



Kuva 7 A-D. Koiran maksa, kaspasi 3 -immunohistokemiallinen värjäys. Esimerkkejä värjäyksistä, joita ei tulkittu apoptoosin aiheuttamiksi vaan epäspesifisiksi signaaleiksi. A Värjäytyneen kappaleen sisällä nähdään kuplamaisia sisärakenteita ja kappaleen ulkoreuna ei ole tasainen, 40-kertainen suurennos. B Värjäytynyt alue on liian pieni. Se on tuman kokoinen ja sijaitsee maksasolun sisällä eikä täytä koko solulimaa, 30,5-kertainen suurennos. C Värjäytymä on liian vaalea, 40-kertainen suurennos. D Värjäytymän muoto on liian epätasainen, 40-kertainen suurennos. Kuvat: Anna Huupponen 2021

3.6 Tilastollinen analyysi

Värjäytyneiden solujen määristä laskettiin tilastolliset tunnusluvut kullekin ryhmälle (kontrolli, krooninen hepatiitti, reaktiivinen hepatiitti). Kaspasi 3 -värjäykselle; keskiarvo, keskihajonta, keskiarvon keskivirhe ja värjäytyneiden solujen suurin ja pienin arvo. Cresyl violet -värjäykselle laskettiin ainoastaan solujen suurin ja pienin arvo sekä mediaani, koska värjäys ei noudattanut normaalijakaumaa. Värjäytyneiden solumäärien jakauman normalisuus tarkistettiin ennen ryhmien välistä tilastollista vertailua Kolmogorov-Smirnov -testillä. Mikäli jakauma ei poikennut normaalijakaumasta suoritettiin ryhmien välinen vertailu yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) käyttäen post hoc -testinä Tukeyn testiä. Kruskal-Wallis testiä käytettiin, mikäli jakauma poikkesi normaalijakaumasta (Zar 1984). Tilastollinen testaus tehtiin internetistä löytyvällä ilmaislaskentaohjelmalla www.socscistatistics.com. Tilastollisen merkitsevyyden rajana ANOVA ja Kruskal-Wallis tuloksissa pidettiin p-arvoa < 0.05 (Zar 1984).

4 TULOKSET

4.1 Lopullinen tutkimusaineisto

Kroonisen hepatiitin ja reaktiivisen hepatiitin ryhmien ikähaarukka oli 9 kuukauden ikäisestä 11-vuotiaaseen koiraan. Koirista kolme oli sekarotuisia ja loput rotukoiria. Molemmissa ryhmissä oli mukana sekä narttuja että uroksia. Kroonisen hepatiitin ryhmässä oli neljä urosta ja kaksi narttua. Reaktiivisen hepatiitin ryhmässä oli kaksi urosta ja neljä narttua.

Kroonisen hepatiitin tutkimusaineiston koirista kahdella koiralla ALAT-arvo oli ollut koholla 11 kuukauden ajan. Muilla tutkimusryhmän koirista arvo oli ollut koholla vähintään vuoden ajan.

Kaikilla reaktiivisen hepatiitin ryhmän koirilla ALAT-arvo palautui viiterajojen alapuolelle biopsian ottamisen jälkeen. Yhden reaktiivisen hepatiitin ryhmän potilaan ALAT-arvo oli 6 kuukauden kuluttua biopsian otosta 126 U/l viitearvon ylärajan ollessa 125 U/l. Tämän tulkittiin olevan viiterajoissa. Reaktiivisen ryhmän koirista saatavilla olevan tiedon perusteella ALAT-arvo oli pysynyt viiterajoissa biopsian oton jälkeen seuraavasti: kahdella potilaalla ALAT-arvo oli pysynyt normaalina yli vuoden, kolmella potilaalla arvo oli pysynyt normaalina vähintään 6 kuukauden ajan, yhdellä potilaalla arvon tiedettiin pysyneen normaalina vähintään 4 kuukauden ajan.

4.2 Cresyl violet -värjäyksen tulokset

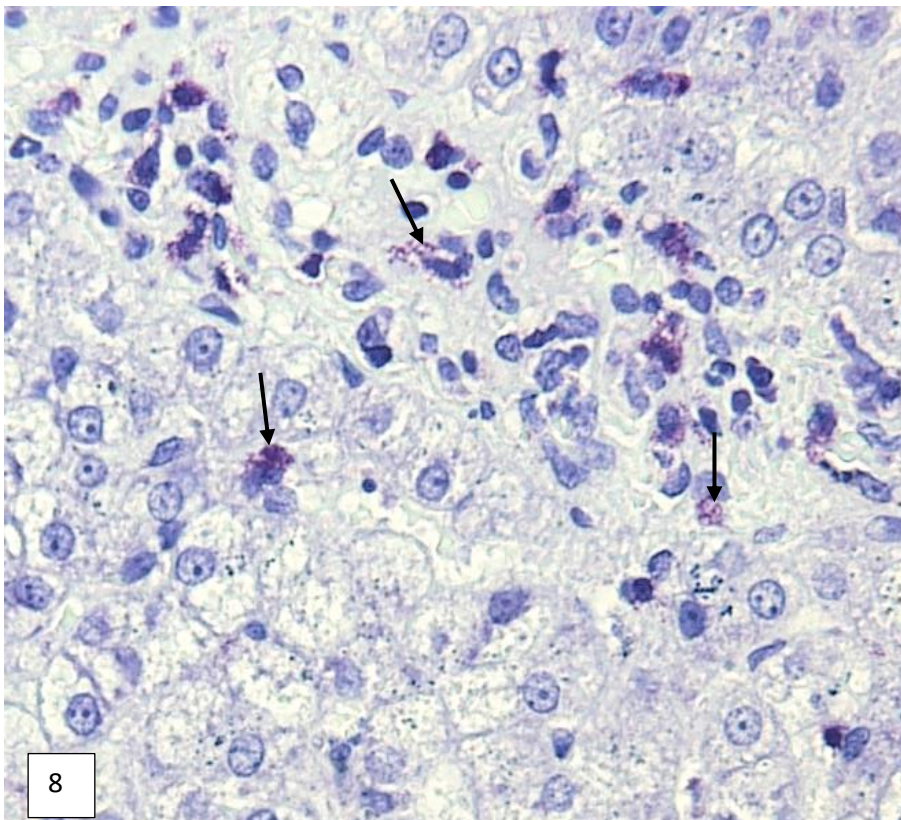
Cresyl violet -värjäyksessä kontrolliryhmän koirista otetuissa näytteissä värjäytyviä soluja löytyi vain yhdeltä koiralta kuudesta (yksi värjäytynyt solu yhden koiran näytteessä). Sekä kroonisen hepatiitin että reaktiivisen hepatiitin ryhmään kuuluvilla koirilla värjäytyneitä soluja havaittiin 4 koiralla kuudesta. Taulukossa 2 on esitetty cresyl violet -värjäyksessä värjäytyneiden solujen tilastolliset tunnusluvut.

Taulukko 2. Cresyl violet -värjäyksen tilastolliset tunnusluvut. Min. ja Max. sarakkeet tarkoittavat pienintä ja suurinta nekroottisten solujen lukumäärää kussakin ryhmässä

Ryhmä	Mediaani	Min.	Max.
kontrollit	0	0	1
krooniset	1	0	6
reaktiiviset	0,5	0	1

Cresyl violet -värjäyksen tulokset eivät noudattaneet normaalijakaumaa. Ryhmien välillä ei havaittu tilastollista eroa ($p= 0.224$) (Kruskall-Wallis-testi).

Cresyl violet -värjäyksen sivulöydöksenä osassa näytteissä nähtiin pavun muotoisia, punaisella värjäytyneitä soluja, joiden solulimassa oli granuloita. Solut sijaitsivat useimmiten näytteen sidekudosta sisältävillä alueilla, mutta myös maksalobuluksessa. Solut analysoitiin semikvantitatiivisesti (0= ei värjäytyneitä alueita, 1= yksittäisiä värjäytyneitä alueita, 2= muutamia värjäytyneitä alueita, 3= runsaasti värjäytyneitä alueita) koko näytteen kattavalta alueelta. Soluja nähtiin sekä kroonisen että reaktiivisen ryhmän potilailla. Myös yhdellä kontrolliryhmän koirista näitä soluja havaittiin. Luokkien jakauma ei eronnut ryhmien välillä tilastollisesti (Kruskal-Wallis). Kuvassa 8 on esitetty värjäytyneitä soluja tutkimusryhmän koirassa.



Kuva 8. Koiran maksa, Cresyl violet -värjäys, 40-kertainen objektiivi. Kuvaan on nuolilla merkitty punaisiksi värjäytyneitä soluja tukikudoksen ja lobuluksen alueella. Kuva: Anna Huupponen 2021

4.3 Kaspasi 3 -värjäyksen tulokset

Kontrolliryhmän koirista otetuissa näytteissä värjäytyviä soluja löytyi vain yhdeltä koiralta kuudesta (yksi värjäytynyt solu yhden koiran näytteessä); viideltä koiralta värjäytyneitä soluja ei näytteistä löytynyt. Krooniseen hepatiittiryhmään kuuluvilla koirilla värjäytyneitä soluja havaittiin kaikilla ja reaktiivisen hepatiittiryhmän koirilla neljällä koiralla kuudesta.

Taulukossa 3 on esitetty kaspasi 3 -värjäytyneiden solumäärien tilastolliset tunnusluvut.

Taulukko 3. Kaspasi 3 -värjäyksen tilastolliset tunnusluvut. Min. ja Max. sarakkeet tarkoittavat pienintä ja suurinta apoptoottisten solujen lukumäärää kussakin ryhmässä.

Ryhmä	Keskiarvo	Keskihajonta	Min.	Max.	Keskiarvon keskivirhe
kontrollit	0,17	0,41	0	1	0,17
krooniset	2,33	1,03	1	4	0,42
reaktiiviset	1,67	1,63	0	4	0,67

Kaspasi 3 -värjäyksen aineiston todettiin noudattavan normaalijakaumaa. Yksisuuntaisessa varianssianalyysissä havaittiin aineistossa olevan ryhmien välillä tilastollista eroa ($p = 0.015$, yksisuuntainen ANOVA). Tukeyn testissä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero ainoastaan kontrolliryhmän ja kroonisen hepatiittiryhmän välillä ($p = 0.013$). Kontrolliryhmän ja reaktiivisen hepatiittiryhmän välillä tilastollista merkitsevyyttä ei ollut ($p = 0.090$).

Tilastollista merkitsevyyttä ei havaittu myöskään kroonisten ja reaktiivisten hepatiittiryhmien välillä ($p = 0.580$).

5 POHDINTA

Koska koirien krooninen ja reaktiivinen hepatiitti ovat yleisiä sairauksia ja maksabiopsiat patologin usein kohtaamia näytteitä, oli tämän tutkimuksen tekeminen perusteltua. Erityisen tärkeäksi tutkimuksen tekemisen tekee se, että lievissä tapauksissa kroonisen ja reaktiivisen hepatiitin histopatologinen erottaminen toisistaan on haastavaa. Sairauksien hoito ja ennuste poikkeavat hyvin paljon toisistaan, joten potilaan ja lemmikin omistajan kannalta olisi tärkeää, että oikea diagnoosi saataisiin mahdollisimman nopeasti.

Tässä tutkimuksessa ei erikoisvärjäysten avulla pystytty luomaan maksabiopsiaan perustuvaa diagnosointimetodia, jolla lievä krooninen ja lievä reaktiivinen hepatiitti pystyttäisiin erottamaan luotettavalla tavalla. Kroonista hepatiittia ja reaktiivista hepatiittia sairastavien potilaiden välillä ei maksabiopsian histologisessa tutkimuksessa havaittu ero kaspaaasi 3 -värjäyksellä eikä cresyl violet -värjäyksellä visualisoituvien vaurioituneiden maksasolujen määrässä. Kaspaaasi 3 -värjäyksen avulla pystyttiin kuitenkin osoittamaan ero kontrolliryhmän ja kroonisesti sairaiden koirien maksanäytteiden välillä. Kontrolliryhmän ja reaktiivista hepatiittia sairastavien välillä oli nähtävissä ero numeerisesti, mutta tilastollista merkitsevyyttä ei näiden ryhmien välillä ollut.

Tämän tutkimuksen tulokset heijastavat hyvin aiempaa tietoa apoptoosien ja nekroosien määrästä sekä maksan suhteen terveissä että lievää kroonista tai reaktiivista hepatiittia sairastavien koirien maksakudosten histopatologisissa näytteissä. Kontrolliryhmän apoptoosien määrät olivat pieniä tässä tutkimuksessa. Saman ovat todenneet aiemmat tutkimukset aiheesta (Kumar ym. 2015 ja Vince ym. 2014). Tässä tutkimuksessa kroonisen hepatiitin ryhmän koirilla apoptoosien määrä oli myös melko vähäinen. Myös tämä tulos tukee aiempia tutkimuksia siitä, että taudin alkuvaiheessa apoptoosien määrä on vähäinen (Thornburg 1998 ja Vince ym. 2014). Apoptoosi ei kuulu reaktiivisen hepatiitin histopatologiseen kuvaan (Webster 2019). Tässä tutkimuksessa havaittiin yhdellä reaktiivisen hepatiitin ryhmään kuuluvalla potilaalla neljä apoptoottista solua, joka oli ryhmän suurin arvo apoptoottisten solujen määrässä. Vaikka luku poikkeakin nolasta, vastaa se silti melko hyvin aiempaa käsitystä, jonka mukaan reaktiivisessa hepatiitissa ei nähdä apoptoottisia soluja. Nekroosia ei juurikaan nähdä terveiden koirien maksoissa (Vince ym. 2014). Myös tämän tutkimuksen tulokset tukevat tätä aiempaa tutkimusta ja tietoa. Aiemmissä tutkimuksissa nekroosien määrästä kroonisessa hepatiitissa on esitetty toisistaan poikkeavia tuloksia (esim. Funtealba ym. 1997 ja Vince 2014). Osa tutkijoista pitää nekroosia kroonisen hepatiitin

tunnusmerkkinä (Bexfield ym. 2011). Tässä tutkimuksessa nekroottisia soluja ei kuitenkaan havaittu kaikilla kroonisen hepatiitin ryhmän potilailla. Nekroottiset solut eivät kuulu reaktiivisen hepatiitin histopatologiaan (Webster 2019). Tämän tutkimuksen tulokset tukevat aiempia tutkimustuloksia, sillä nekroottisia soluja oli korkeintaan yksi kullakin potilaalla.

Tutkimuksen aineisto edusti tutkittavia ryhmiä hyvin. Suurimmalla osalla kroonisen hepatiitin ryhmään kuuluvista potilaista ALAT-arvot olivat olleet koholla yli vuoden ajan eli huomattavasti pidempään kuin kroonisen hepatiitin määritelmään vaaditaan. Samoin reaktiivisen hepatiitin ryhmään kuuluvien koirien voidaan sanoa edustavan hyvin ryhmäänsä. Reaktiivisen ryhmän koirien ALAT-arvot olivat suurella osalla pysyneet monia kuukausia biopsian oton jälkeen alle viiterajojen; osalla koirista aika oli jopa vuosia. Kliinisesti maksan suhteen terveiden kontrollikoirien maksanäytteiden mukanaolo analyysissä puolestaan lisäsi tutkimuksen luotettavuutta. Vaikka kontrolliryhmän koirien maksanäytteet olivatkin ruumiinavausnäytteitä poiketen kroonisen ja reaktiivisen hepatiitin ryhmien biopsianäytteistä, ne edustivat hyvin terveiden koirien maksoja, koska näytteenotto oli tapahtunut hyvin nopeasti kuoleman jälkeen.

Tutkimuksen objektiivisuutta pyrittiin vahvistamaan sokkouttamalla hepatiittiryhmien näytteet. Kontrollikoirien näytteet olivat sen sijaan tunnistettavissa niiden suuremman näytekokoon perusteella.

Tutkimusaineiston pieni koko on saattanut rajoittaa tutkimuksen tuloksia. Vaikka aineisto oli edustava, sen pienuus on todennäköisesti heikentänyt mahdollisuutta tilastollisen merkitsevyyden saavuttamiseen ja lisännyt satunnaisvaihtelun vaikutusta. On kuitenkin huomattava, että kroonista ja reaktiivista hepatiittia edustavien näytteiden välinen keskimääräinen ero oli niin pieni, että tulosten hajonta huomioiden kliinisesti käyttökelpoisen eron havaitseminen kyseisten ryhmien välille olisi ollut vaikeaa, vaikka näytteiden lukumäärä olisi ollut suurempi. Lisäksi, koska tutkimuksen tavoitteena oli löytää diagnosointimenetelmä, olisi suurempi näytekoko ja homogeenisemmat ryhmät saattaneet aiheuttaa tietyille yksilöille paljon virhetulkintoja diagnoosissa.

Näytteiden lukumäärän lisäksi mikroskopoitavan näytteen pinta-alalla on merkitystä. Cresyl violet -värjäyksessä yli 10 kuvakentän tarkastelu olisi saattanut lisätä nekroottisten solujen määrää ja näin vaikuttaa tuloksiin. Mikroskooppinäkökymien sijasta analyysi olisi voitu perustaa myös koko näytteen skannaamiseen kasperasi 3 -värjäyksen tavoin, jolloin tarkasteltava pinta-ala olisi ollut suurempi. Kasperasi 3 -värjäyksessä tulokseen saattoi

vaikuttaa se, että analysoinnissa käytettiin pienimmän näytteen pinta-alaa. On mahdollista, että laskettavien pinta-alojen ulkopuolelle jäi apoptoottisia soluja, joilla olisi saattanut olla merkitystä tutkimuksen lopputulokseen. Pienimmän pinta-alan mittaamisen tilalla olisi voitu laskea myös jokaisen näytteen pinta-ala ja laskea kaikki löytyneet apoptoottiset solut, jonka jälkeen tulkinta olisi tehty suhteutettuna kunkin näytteen pinta-alaan. Pinta-ala oli huomattavasti suurempi kuitenkin ainoastaan kontrollikoirilla, joten valitulla tutkimusmenetelmällä ei oletettavasti ollut suurta merkitystä tai sen vaikutus oli hyvin vähäinen kroonisten ja reaktiivisten ryhmien välillä.

Potilaiden löytäminen kroonisen ja reaktiivisen hepatiitin ryhmiin oli haastavaa. Koska luokittelu kahteen eri tutkimusryhmään vaati potilaiden säännöllisiä verinäytekontroleja, oli vaikeaa löytää riittävästi potilaita, joiden omistajat olivat sitoutuneet kontroleihin.

Ongelmaksi muodostui myös se, että potilaat olivat saattaneet käydä monella eri klinikalla kontroleissa, mikä vaikeutti verinäytetulosten jäljitettävyyttä ja saatavuutta. ALAT-arvojen mittaaminen usealla eri klinikalla useiden eri näytteenottajien toimesta, saattoi vaikuttaa myös ALAT-arvojen luotettavuuteen. Koska jokaisella klinikalla tai laboratoriolalla on käytössään eri viitearvot verinäytteille, oli myös arvojen keskinäinen vertailu haastavaa. Mikäli tutkimus toteutettaisiin suuremmassa mittakaavassa ja omistajille tarjottaisiin säännölliset kontrollit yhdellä klinikalla, olisi aineiston kokoaminen mahdollisesti helpompaa. Sopivien näytteiden löytymistä hankaloitti myös se, ettei reaktiivisten koirien aineistoon voitu hyväksyä maksan tulehdusta hillitsevällä lääkityksellä hoidettuja koiria, koska lääkitys olisi saattanut laskea ALAT-arvoa ja vaikuttaa näytteen tulehduskuvaan.

Koska sekä apoptoottisia että nekroottisia soluja oli kussakin näytteessä melko vähän, yksittäiset solut vaikuttivat tulokseen ja subjektiivisen tulkinnan merkitys korostui tässä tutkimuksessa. Yhdenkin värjäytyneen alueen tulkitsematta jättäminen tai tulkinta apoptoottiseksi tai nekroottiseksi oli prosentuaalisesti merkitsevää. Toisaalta subjektiivisuus ja sen luoma mahdollinen virhe on aina osa tämän tyyppistä tutkimusta. Subjektiivisuuden vaikutusta pyrittiin vähentämään vertaamalla tutkimusaineiston värjäytyneitä soluja positiivisiin kontroleihin. Subjektiivisuuden mahdollisesti tuomaan virhettä vältettiin myös sillä, että yksi henkilö analysoi koko aineiston. Analysointi tehtiin myös lyhyen ajanjakson sisällä, jolloin analysoijan kriteerit eivät muuttuneet analysoinnin aikana.

Koska tässä tutkimuksessa laskettiin myös sinusoideissa näkyvät värjäytyneet solut, on väistämätöntä, että värjäytyneiden solujen joukossa oli myös muita soluja kuin hepatosyyttejä.

Tällä ei kuitenkaan ole tutkimuksen tuloksen kannalta merkitystä, koska näin toimittiin jokaisen näytteen kohdalla riippumatta siitä mihin ryhmään näyte kuului. Lisäksi tutkimusryhmän näytteet edustivat tulehduksen asteelta samaa (lievää) kategoriaa, joten sinusoideissa sijaitsevien tulehdussolujen määrä on oletettavasti yhtenevä.

Cresyl violet -värjäyksen sivulöydöksenä esiin tulleiden punaisten solujen merkitys jäi tässä tutkimuksessa epäselväksi. Soluja ei myöskään luonnehdittu tarkemmin tässä tutkimuksessa. Soluja voidaan kuitenkin kuvailla granuloita sisältäviksi, pavun muotoisiksi ja cresyl violet -värjäyksessä punaisiksi värjäytyviksi. Niiden avulla ei pystytty tässä tutkimuksessa tekemään eroa kroonisen ja reaktiivisen ryhmän välille. Löydös oli kuitenkin mielenkiintoinen ja vaatii tarkempia lisätutkimuksia. Tutkimusta olisi mielenkiintoista jatkaa niin, että cresyl violet -värjättyjä näytteitä verrataan samojen potilaiden HE -värjättyihin näytteisiin etsien samoja soluja niistä. Solujen tarkempi tutkiminen elektronimikroskoopilla olisi myös mielenkiintoista ja oletettavasti lisäinformaatiota antavaa.

Kaspaasi 3 -värjäyksen tilastollinen tarkastelu osoitti, että värjäys pystyy erottamaan kontrolliryhmän koirat kroonisen tutkimusryhmän koirista. Kroonista hepatiittia sairastavien koirien erottaminen reaktiivista tautimuotoa sairastavista ei tässä tutkimuksessa kuitenkaan ollut mahdollista. Kaspaasi 3 -värjäys oli kuitenkin melko helposti tulkittavissa. Cresyl violet -värjäyksen tilastollinen analyysi osoitti, ettei sen avulla pystytty tässä tutkimuksessa erottamaan ryhmiä toisistaan. Cresyl violet -värjäyksen merkittäväksi ongelmakohdaksi tässä tutkimuksessa muodostui värjäyksen haasteellinen tulkittavuus. Näytteistä ei ollut mahdollista tunnistaa värjäytyneitä soluja yhtä helposti kuin kaspaasi 3 -värjäyksellä. Tämä lisäsi virhearvioinnin riskiä. Värjäysprotokollaa kehittämällä tai muuttamalla saattaisi olla mahdollista, että riittävä väriero normaalien ja nekroottisten solujen välille pystyttäisiin luomaan. Mahdollisesti kuvien digitaalinen käsittely saattaisi myös helpottaa tulkintaa. Cresyl violet -värjäys ei kuitenkaan ole yleisessä käytössä maksabiopsioiden värjäyksessä, joten on melko epätodennäköistä, että värjäystä pystytään käyttämään kliinisessä työssä apuna hepatiittien erotteluun. Haasteellisuutta lisäsi myös maksasolujen aktiivinen metabolia ja erilaiset solunsisäiset kertymät, jotka vaikuttivat solun värjäytyvyyteen.

Yhteenvedona tutkimuksesta voidaan todeta, että Kaspaasi 3- ja Cresyl violet -värjäysten avulla ei voida erottaa koiran lievää kroonista ja lievää reaktiivista hepatiittia toisistaan. Tutkimuksen tulokset noudattavat suurelta osin aiempien aiheesta tehtyjen tutkimusten tuloksia. Koska aihe on tärkeä, jatkotutkimukset ovat tarpeellisia. Lievän kroonisen hepatiitin

ja lievän reaktiivisen hepatiitin välistä eroa voitaisiin tutkia vielä esimerkiksi vertailemalla tulehdussolujen määrää tai sijaintia, tutkia apoptoosia ja nekroosia muilla menetelmillä tai lähteä selvittämään tässä tutkimuksessa löydettyjen punaisten solujen merkitystä.

Lähteet

Autio-Harmainen H. Maksa, sappirakko ja haima. Teoksessa: Carpen O, Kosma V, Lehto V, Mäkinen M, Paavonen T, Stenbäck F. Patologia. Duodecim, Helsinki 2012.

Bexfield NH, Andres-Abdo C, Scase TJ, Constantino-Casas F, Watson PJ. Chronic hepatitis in the English springer spaniel: clinical presentation, histological description and outcome. The Veterinary Record 2011, 169(16): 415.

Bexfield NH, Buxton RJ, Vicek TJ, Day MJ, Bailey SM, Haugland SP, Morrison LR, Else RW, Constantino-Casas F, Watson PJ. Breed, age and gender distribution of dogs with chronic hepatitis in the United Kingdom. Vet J 2012, 193: 124-128.

Blomqvist A-C, Speeti M, Wiberg M. Koiran krooninen hepattiitti, kirjallisuuskatsaus. Suom Eläinlääkäri 2017, 5:263-270.

Carpen O, Lohi J. Tulehdus ja paraneminen. Teoksessa: Carpen O, Kosma V, Lehto V, Mäkinen M, Paavonen T, Stenbäck F. Patologia. Duodecim, Helsinki 2012.

Cullen JM., Brown DL. Hepatobiliary System and Exocrine Pancreas. Teoksessa: Zachary JF, McGavin MD. Pathologic basis of veterinary disease. 5 p. Elsevier Mosby, St. Louis, Mo 2012.

Cullen JM, Stalker MJ. Liver and Biliary System. Teoksessa: Maxie G. Maxie, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals - e-Book: 3-Volume Set. Volume 2. Elsevier Health Sciences, London 2015.

Dirksen K, Burgener IA, Rothuizen J, van den Ingh, T. S. G. A. M., Penning LC, Spee B, Fieten H. Sensitivity and Specificity of Plasma ALT, ALP, and Bile Acids for Hepatitis in Labrador Retrievers. J Vet Intern Med 2017, 31: 1017–1027-1027.

Dirksen K, Fieten H. Canine Copper-Associated Hepatitis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2017, 47: 631-644.

Eckle V, Buchmann A, Bursch W, Schulte-Hermann R, Schwarz M. Immunohistochemical Detection of Activated Caspases in Apoptotic Hepatocytes in Rat Liver. Toxicol Pathol 2004, 32: 9-15.

Ettinger SJ, Feldman EC. Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat. Vol. 2. 7 p. Elsevier Saunders, St. Louis, Mo 2010.

Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956, 16: 142.

Farray D, Suarez D, Velazquez-Wallraf A, Perez J, Ravelo-García A, Carrascosa C, Rodriguez-Ventura M, Jaber JR. Study of non-specific reactive hepatitis in stray dogs. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 2019, 25: 757-762.

Favier RP. Idiopathic hepatitis and cirrhosis in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2009, 39: 481-488.

Fuentealba C, Guest S, Haywood S, Horney B. Chronic hepatitis: a retrospective study in 34 dogs. *Can Vet J* 1997, 38: 365-373.

Gown AM, Willingham MC. Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. *J Histochem Cytochem* 2002, 50: 449-454.

Hall EJ, Simpson JW, Williams DA. *BSAVA manual of canine and feline gastroenterology*. 2 p. British Small Animal Veterinary Association, Quedgeley 2005.

Henrich M, Köhler K. Visualization and Quantification of Hepatocellular Necrosis Using Cresyl Violet Stain. *J Comp Pathol* 2018, 158: 133.

Ijzer J, Roskams T, Molenbeek RF, Ultee T, Penning LC, Rothuizen J, van den Ingh T,S.G.A.M. Morphological characterisation of portal myofibroblasts and hepatic stellate cells in the normal dog liver. *Comparative Hepatology*. 2006. 5 7.

Kalyuzhny AE. *Immunohistochemistry: Essential Elements and Beyond*. Springer International Publishing AG, Cham 2016.

Kaneda K, Wake K. Distribution and morphological characteristics of the pit cells in the liver of the rat. *Cell Tissue Res* 1983, 233: 485-505.

Kanemoto H, Sakai M, Sakamoto Y, Spee B. American Cocker Spaniel Chronic Hepatitis in Japan. *J Vet Intern Med* 2013, 27: 1041-1048.

Kosma V-M, Vähäkangas K. *Soluvaurio ja nekroosi*. Teoksessa: Carpen O, Kosma V, Lehto V, Mäkinen M, Paavonen T, Stenbäck F. *Patologia*. Duodecim, Helsinki 2012.

Krajewaka M, Wang H-, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 1997, 57: 1605-1613.

Kujala P. Soluvaurio ja Nekroosi. Teoksessa: Carpen O, Kosma V, Lehto V, Mäkinen M, Paavonen T, Stenbäck F. *Patologia. Duodecim*, Helsinki 2012.

Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease: Professional Edition. 9 p. Elsevier Health Sciences, 2015.

Lundz JG, Tsuji H, Nozaki I, Murase N, Demetris AJ. An inhibitor of cyclin-dependent kinase, stress- induced p21Waf-1/Cip-1, mediates hepatocyte mito-inhibition during the evolution of cirrhosis. *Hepatology* 2005, 41: 1262-1271.

Mescher AL. Junqueira's basic histology: text & atlas. 12 p. McGraw-Hill, New York 2010.

Neumann S, Danner W. Reactive hepatitis in dogs. *Global Vet* 2012, 9: 454-459.

Poldervaart JH, Favier RP, Penning LC, Van Den Ingh, T. S. G. A. M, Rothuizen J. Primary Hepatitis in Dogs: A Retrospective Review (2002–2006). *J Vet Intern Med* 2009, 23: 72-80.

Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of Diseased Mouse Liver by Hepatic Cell Transplantation. *Science* 1994, 263: 1149-1152.

Ross MH, Pawlina W. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 6 p. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia 2011.

Rothuizen J. WSAVA standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver disease. Elsevier Saunders, Edinburgh; 2006.

Samuelson DA. Textbook of veterinary histology. Saunders, Elsevier, St. Louis, MO 2007.

Sarraf C, Lalani EN, Golding M, Anilkumar TV, Poulsom R, Alison M. Cell behavior in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. Light and electron microscopic observations. *Am J Pathol* 1994, 145: 1114-1126.

Speeti M, Ståhls A, Meri S, Westermarck E. Upregulation of major histocompatibility complex class II antigens in hepatocytes in Doberman hepatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2003, 96: 1-12.

Tams TR. Handbook of small animal gastroenterology. 2 p. Saunders, St. Louis (MO) 2003.

Thornburg LP. Histomorphological and Immunohistochemical Studies of Chronic Active Hepatitis in Doberman Pinschers. *Vet Pathol* 1998, 35: 380-385.

Tizard IR. *Veterinary immunology: an introduction*. 8 p. Saunders Elsevier, St Louis, Mo 2009.

Uetsuka K, Nishikawa S, Isobe K, Nakayama H. Histopathological characteristics of Kupffer cells and Ito cells in the porcine and bovine liver. *The Journal of Veterinary Medical Science* / 2007. 69(7): 767-70.

Vanderkerken K, Bouwens L, Van Rooijen N, Van Den Berg K, Baekeland M, Wisse E. The role of Kupffer cells in the differentiation process of hepatic natural killer cells. *Hepatology* 1995, 22: 283-290.

Vanderkerken K, Bouwens L, Wisse E. Characterization of a phenotypically and functionally distinct subset of large granular lymphocytes (pit cells) in rat liver sinusoids. *Hepatology* 1990, 12: 70-75.

Villiers E, Ristić J. *BSAVA manual of canine and feline clinical pathology*. British Small Animal Veterinary Association, Quedgeley, Gloucester 2016.

Vince AR, Hayes MA, Jefferson BJ, Stalker MJ. Hepatic Injury Correlates With Apoptosis, Regeneration, and Nitric Oxide Synthase Expression in Canine Chronic Liver Disease. *Vet Pathol* 2014, 51: 932-945.

Watson P. *Hepatobiliary and Exocrine Pancreatic Disorders*. Teoksessa: Nelson, Richard W. (Richard William), Couto CG. *Small animal internal medicine*. Elsevier/Mosby, St. Louis, MO 2014.

Watson PJ, Roulois AJA, Scase TJ, Irvine R, Herrtage ME. Prevalence of hepatic lesions at post-mortem examination in dogs and association with pancreatitis. *J Small Anim Pract* 2010, 51: 566-572.

Webster CRL, Center SA, Cullen JM, Penninck DG, Richter KP, Twedt DC, Watson PJ. ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs. *J Vet Intern Med* 2019, 33: 1173-1200.

Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, Modlin RL, Liblau RS, Gressner AM, Kaufmann SHE. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 2007. 26(1): 117-29.

Wu X, Mandigers PJJ, Watson AL, van den Ingh T,S.G.A.M., Leegwater PAJ, Fieten H.
Association of the canine ATP7A and ATP7B with hepatic copper accumulation in
Dobermann dogs. J Vet Intern Med 2019, 33: 1646-1652

Zar JH. Biostatistical analysis. 2 p. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ 1984.

Liitteet

Liite 1

Cresyl violet maksaleikkeille (Pernilla Syrjä, Anna Huupponen, ELTDK patologian laboratorio)

1. Xyleenit, laskeva alkoholisarja
2. Tislattu vesi
3. Esilämmitetty Cresyl Violet käyttöliuos 3 min
4. 96 % alkoholi, differentointi 10 sekuntia
5. Abs. alkoholi 2 x 2 min
6. Xyleenit 3 x 4 min

Peittely (Pertex ja peitinlasi)

0,1 % Cresyl Violet –asettaatti (kantaliuos)

- Cresyl Violet –asettaatti (C₁₈H₁₅N₃O₃) 0,3 g
- Aqua 300 ml

+20°C säilyy n. 6 kk.

Cresyl Violet käyttöliuos

- Kantaliuosta 50 ml
- 10 % etikkahappo 8 tippaa

Liite 2

Cell Signaling, Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb -vasta-aine, josta käytetään laimennosta 1:200, antigeeninpaljastusmenetelmänä on sitraattipuskuri 0,01M, pH 6.0 PT-moduulissa, 99 asteessa 20 min

<https://www.cellsignal.com/datasheet.jsp?productId=9664&images=1>

BrightVision +Poly- HRP-Anti Mouse/Rabbit, Biotin-free, RTU

Species of origin: Goat

Enzyme conjugate: Peroxidase

Tarvittavat reagenssit:

- Esikäsittelyliuos esim. sitraatti pH 6, Tris-EDTA pH 9 (kts. erilliset ohjeet liuosten tekoon)
- TBS-pesuliuos (1l): 100ml 10 x TBS pH 7.4 (erillinen ohje) + 900 ml aqua + 500 µl Tween 20
- 1 x PBS-liuosta
- 10% BSA: 1g BSA + 10ml 1 x PBS
- 3% vetyperoksidi (H₂O₂): laimennus 30% H₂O₂ 1 x PBS:ään 1:10, suojaa liuos foliolla (valoherkkä).

Ennen aloitusta:

- Laimenna esikäsittelyyn vaadittava puskuri ja kaada se PT-moduuliin. Laita PT-moduuli päälle ja laita puskuri esilämpenemään.
- Laita immunolasit paraffiinipoistoon (kesto n. 25 min).
- Kun PT-moduuli on lämmennyt +60 asteeseen, asettele lasit nojaamaan kammion seinämiä vasten. Sulje kansi ja käynnistä PT-moduuli. Esikäsittelyn kesto on n. 1 h ja 10 min.
- Ota polymeerikitti ja DAB-reagenssit huoneenlämpöön lämpenemään.
- Valmista tarvittavat määrät TBS-pesuliuosta, 1 x PBS:ää, 10% BSA:a sekä 3% vetyperoksidia. Laimenna vasta-aineet Normal antibody diluenttiin. Ota polymeerikitti + DAB-reagenssi huoneenlämpöön lämpenemään.
- Juuri ennen DAB-vaihetta sekoita DAB-liuosten substraatti ja kromogeeni (1ml + 1 tippa) keskenään. Suojaa DAB foliolla (valoherkkä).
- Esikäsittelyn jälkeen jatketaan protokollan kohdasta 1.

Protokolla (huoneenlämmössä, jos ei erikseen ohjeisteta):

- | | |
|--|------------------|
| 1. Coverplate + TBS | |
| 2. <u>TBS</u> | 5 min |
| 3. <u>3 % H₂O₂</u> | 10 min |
| 4. <u>TBS</u> | 2 x 5 min |
| 5. <u>10 % BSA</u> | 20 min |

6. Primäärivasta-aine **60 min**
 I. (laimennettu ImmunoLogicin Normal Antibody Diluentiin, cat# BD09)
 II. negatiiviselle laseille pelkkä Diluent
7. TBS **2 x 5 min**
8. Post-antibody Blocking **15 min**
9. TBS **2 x 5min**
10. Sekundäärivasta-aine **30 min**
 I. Poly-HRP-Goat anti Mouse/Rabbit (tms.)
 II. (Tässä vaiheessa *)
11. TBS **2 x 5 min**
12. DAB (vaakatasossa): **6 min**
 I. pipetoi riittävästi kudoksen päälle (esim. 200 µl)
13. Aqua
 I. Kun kaikki lasit on värjätty DAB:lla, vaihda aqua.
14. Harris HTX (taustaväri) **10 s.**
 I. Liikuta kelkkaa koko ajan
 II. *Huom!* Suodata Harris HTX ennen jokaista käyttökertaa ja vaihda uuteen aina 200 lasin tai kuukauden välein.
15. Hanavesi **3 min**
16. Aqua
17. Nouseva alkoholisarja, ksyleenit ja peittely Pertexillä

*Käännä DAB-kromogeeni-putki ylösalaisin (pienempi valkoinen pullo).