

**SPARC:N JA KOLLAGEENI IV:N ILMENTYMINEN KEUHKOJEN  
KEHITYKSEN AIKANA**

LK Härkönen, Janita  
Syventävien opintojen tutkielma  
Lääketieteen tutkinto-ohjelma  
Lääketieteellinen tiedekunta  
Oulun yliopisto  
Toukokuu 2021  
Ohjaajat: Prof. Riitta Kaarteenaho  
FT Heta Merikallio  
Sisätautien tutkimusyksikkö  
Medical Research Center Oulu

OULUN YLIOPISTO  
Lääketieteellinen tiedekunta  
Lääketieteen tutkinto-ohjelma

## TIIVISTELMÄ

Härkönen, Janita: SPARC:n ja kollageeni IV:n ilmentyminen keuhkojen kehityksen aikana  
Syventävien opintojen tutkielma: 22 sivua, 2 liitettä

---

Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) ja kollageeni IV (COLIV) ovat ekstrasellulaarisia eli soluvälitilassa olevia proteiineja, jotka kykenevät säätelemään kudosten rakennetta ja toimintaa ja siten niillä on myös tärkeä rooli keuhkojen homeostaasin ylläpitämisessä. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia SPARC:n ja COLIV:n soluspesifistä ilmentymistä ihmiskeuhkojen eri vaiheissa (pseudoglandulaarivaihe, sakkulaarivaihe, kanalikulaarivaihe ja alveolaarivaihe) sikiökehityksen aikana.

Tutkimusaineisto koostui neonataalikauden keuhkokudosnäytteistä keuhkojen eri kehityskausilta. Näytteistä tutkittiin SPARC:n ja COLIV:n ilmentymistä lähetti-RNA- (l-RNA-) käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktiolla (RT-PCR) ja proteiinitasolla immunohistokemiallisin värjäyksin. Immunohistokemiallisten värjäysten tulosten tulkinnassa käytettiin sekä semikvantitatiivista että kvantitatiivista automatisoitua menetelmää.

RT-PCR:n ja immunohistokemiallisten värjäysten tuloksista todettiin, että molemmat proteiinit ilmentyivät keuhkojen eri kehitysvaiheiden aikana samantyyppisesti. Immunohistokemiallisten värjäysten ilmentymät voimistuivat asteittain pseudoglandulaarivaiheesta sakkulaarivaiheeseen ja vähenivät hieman alveolaarivaiheessa. Ilmentyminen oli yhä kuitenkin voimakkaampaa alveolaarivaiheessa kuin kehityksen alussa. RT-PCR:n tulosten mukaan SPARC:n ja COLIV:n l-RNA:n ilmentyminen lisääntyi pseudoglandulaarivaiheesta sakkulaarivaiheeseen ja lopulta laski hieman alveolaarivaiheessa. Kokonais-l-RNA:n määrä oli korkeampi alveolaarivaiheessa kuin pseudoglandulaarivaiheessa. Normaalissa ihmisen keuhkon kehityksessä SPARC:n ja COLIV:n määrät siis vaihtelevat kehityskausittain, mutta niiden ilmenemisen muutokset ovat samantapaisia. Havaittu johtopäätös on aiemmin tunnistettu eläinmalleissa ja se on nyt ensimmäistä kertaa demonstroitu myös kehittyvässä ihmiskeuhkossa.

Avainsanat: immunohistokemia, kollageeni IV, kuva-analyysi, käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktio (RT-PCR), secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)

## SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO.....	4
2. TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA.....	4
2.1. Keuhkojen kehitys ihmisellä.....	4
2.2. Soluvälitilan proteiinien merkitys keuhkojen kehityksessä.....	5
3. TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT.....	7
4. TUTKIMUSAINEISTO JA TUTKIMUSMENETELMÄT.....	7
4.1. Potilaisaineisto ja näytteet.....	7
4.2. Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät.....	8
4.2.1. SPARC:n immunohistokemiallinen värjäys.....	8
4.2.2. COLIV:n immunohistokemiallinen värjäys.....	9
4.3. Automatisoitu immunoreaktiiviteetin arviointi.....	9
4.4. Immunoreaktiiviteetin soluspesifinen arvioiminen semikvantitatiivisesti.....	9
4.5. Kvantitatiivinen RT-PCR.....	10
5. TULOKSET.....	10
5.1. Immunoreaktiiviteetin kvantitatiivinen arviointi immunohistokemiallisista värjäyksistä.....	10
5.2. SPARC:n ja COLIV:n soluspesifinen ilmentyminen immunohistokemiallisissa värjäyksissä.....	11
5.3. SPARC:n ja COLIV:n määrät kvantitatiivisella RT-PCR:llä tutkittuna.....	12
6. POHDINTA.....	14
LÄHDELUETTELO.....	18

## LIITTEET

Liite 1. Taulukko 3. SPARC:n ja COLIV:n immunoreaktiivisuus kehitysvaiheittain jaoteltuna.

Liite 2. Esimerkkikuvat SPARC:n ja COLIV:n immunohistokemiallisesta värjäytymisestä pseudoglandulaarivaiheessa.

## 1. JOHDANTO

Keuhkojen kehitys voidaan jakaa viiteen osaan (embryoninen vaihe, pseudoglandulaarivaihe, sakkulaarivaihe, kanalikulaarivaihe ja alveolaarivaihe), joista kolmen ensimmäisen kehitysvaiheen aikana runsaasti esiintyvän sidekudoksen määrä vähenee ja samanaikaisesti ilmatiet, alveolit ja verisuonet kehittyvät (Mullassery & Smith 2015). Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) ja kollageeni IV (COLIV) ovat ns. ekstrasellulaarisia eli soluvälitilan proteiineja, jotka ovat välttämättömiä keuhkojen homeostaasin kannalta, sillä niillä on useita muiden solujen säätelyä koskevia ominaisuuksia (Murphy-Ullrich & Sage 2014). Tutkimuksen tavoitteena oli havainnoida SPARC:n ja COLIV:n ilmentymistä ihmiskeuhkojen eri sikiökehitysvaiheissa ja tarkentaa tietämystä siitä, missä keuhkojen kehittyvissä soluissa ja rakenteissa kyseiset proteiinit ilmenevät ja kuinka voimakkaasti.

## 2. TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1. Keuhkojen kehitys ihmisellä

Ihmisen keuhkojen sikiöaikainen kehitys alkaa neljännellä kehitysviikolla ja se voidaan histologisesti jakaa viiteen eri vaiheeseen, kuten taulukossa 1 on havainnollistettu. Seitsemäntenä kehitysviikkona eli embryonisen vaiheen lopussa, kypsät sentraaliset verenkiertorakenteet ja ilmatiet ovat jo olemassa. Pseudoglandulaarivaihe kestää sikiönkehityksen 52. päivästä kuudenteentoista viikkoon, ja tällöin ilmäteiden primitiiviset epiteelit kasvavat ja erilaistuvat. Pseudoglandulaarivaiheen lopussa kaikki ilmäteiden ja verenkierron isoimmat rakenteet ovat muodostuneet. Kanalikulaarivaiheessa, kehitysviikoilla 16-28, muodostuu ohuet ilmaveriesteet ja keuhkojen surfaktanttieritys alkaa. Lisäksi bronkusten terminaaliosien ja keuhkojen parenkyymien kehitys alkaa. Kanalikulaarivaiheessa ja sitä seuraavassa sakkulaarivaiheessa (kehitysviikot 28-36) verisuonet jatkavat kasvuaan. Sakkulaarivaiheessa kehittyvät myös primitiiviset ja terminaaliset keuhkojen rakenteet, ja tyyppin 2 alveolisolut aloittavat surfaktanttituotannon. Viimeinen kehitysvaihe eli alveolaarivaihe alkaa kehitysviikon 36 jälkeen. Sen aikana tärkeimmät tapahtumat ovat keuhkoverisuonten angiogeneesi ja sekundaarinen väliseinien muodostuminen. Siten alveolien kehitys voi alkaa ja se jatkuu yhä syntymän jälkeen. Myös verisuonet jatkavat kasvuaan syntymän jälkeen alveolimuodostuksen mukana. (Mullassery & Smith 2015)

Taulukko 1. Ilmateiden ja verisuonten tärkeimmät kehitystapahtumat ihmisen keuhkon kehityksen eri vaiheissa.

Kehitysvaihe	Kehitysviikot	Ilmatiet	Verisuonet
Embryoninen vaihe	1-7	Sentraalisten ilmateiden kehittyminen.	Sentraalisten rakenteiden kehittyminen.
Pseudoglandulaarivaihe	7-16	Primitiivisten epiteelien kasvu ja erilaistuminen.	Suurten rakenteiden kehittyminen.
Kanalikulaarivaihe	16-28	Surfaktanttieritys alkaa, keuhkojen parenkyymien ja bronkusten terminaalisien kehitys alkaa.	Ohuiden ilmaveriesteiden muodostuminen, verisuonten kehitys jatkuu.
Sakkulaarivaihe	28-36	Primitiivisten ja terminaalisten rakenteiden muodostuminen, tyypin 2 alveolisolujen surfaktanttieritys alkaa.	Verisuonten kasvu pituus- ja leveys suunnassa.
Alveolaarivaihe	36 ->	Sekundaaristen väliseiniä muodostus ja alveolien kehitys alkaa jatkuen yhä syntymän jälkeen.	Keuhkoverisuonten angiogeneesi, verisuonten kasvu jatkuu yhä syntymän jälkeen.

## 2.2. Soluvälitilan proteiinien merkitys keuhkojen kehityksessä

Osa soluvälitilan proteiineista luokitellaan niin sanottuihin matrisellulaarisiin proteiineihin, jotka kykenevät sitoutumaan sekä ekstrasellulaarimatriksiin että solujen pintareseptoreihin. Matrisellulaariset proteiinit säätelevät solujen toimintaa, ja siten myös kudosten korjautumista, tulehdus- ja immuunivastetta. Tutkimuksissa on löydetty useita kehittyvässä keuhkossa ilmeneviä matrisellulaarisia proteiineja. Niistä esimerkiksi periostiinilla on merkittävä rooli ilmateiden kehittämisessä ja alveolien epiteelin korjautumisessa (O'Dwyer & Moore 2017), ja tenaskiini-C mahdollistaa bronkiolien epiteelin normaalin kehityksen (Giblin & Midwood 2015). Myös SPARC on ekstrasellulaarinen ja matrisellulaarinen proteiini, joka säätelee useita eri toimintoja, kuten solujen kiinnittymistä, proliferaatiota ja erilaistumista (Murphy-Ullrich & Sage 2014).

SPARC:n ilmentymistä ja toimintaa on aiemmin tutkittu lähinnä eläinmalleilla. Korkeita SPARC-proteiinin määriä on havaittu hiiren sikiöiden keuhkojen alveoleissa ja tiehyiden epiteeleissä, mutta ei lainkaan aikuisilla hiirillä (Sage ym. 1989). Vastasyntyneillä hiirillä on sen sijaan todettu matalia SPARC:n l-RNA-tasoja, kun taas aikuisten hiirien keuhkoissa l-RNA:ta on havaittu huomattavasti enemmän (Holland ym. 1987).

Soluvälitilan proteiinista myös kollagenaasit vaikuttavat keuhkojen kehitykseen. Kollagenaasit ovat metalloentsyymejä, jotka yhdessä metalloproteinaasien inhibiittorien kanssa säätelevät kollageenin määrää ja jakautumista. Gelatinaasit ovat tyypin IV kollagenaaseja, jotka pilkkovat spesifisti tyypin IV kollageenia (Davidson 1990). Tutkimuksen mukaan ihmisen neonataalikeuhkojen epiteelin käsittely kollagenaasilla aiheuttaa tyvikalvon ja muiden viereisten ekstraselulaaristen rakenteiden tuhoutumisen, mikä estää keuhkojen morfogeneesin (Wessels & Cohen 1968). Löydös viittaa siihen, että kollageeni on välttämätön keuhkoepiteelin morfologian ylläpitämiseksi.

COLIV toimii tyvikalvon keskeisenä rakenneosana ja sen muodostamien kollageeniverkkojen säätelemät dynaamiset prosessit liittyvät solujen kiinnittymiseen, signaalointiin ja selviytymiseen (Chioran ym. 2017). COLIV on tärkeä tekijä tyvikalvon muodostumisessa keuhkoissa, ja se myös vahvistaa veri-ilmaestettä (Poschl 2004). Eräässä tutkimuksessa perehdyttiin hiirien ja lintujen sikiöiden keuhkoihin, ja todettiin, että COLIV:n osallistuminen epiteelin ja verisuonirakenteiden sekä alveolaaristen myofibroblastien kehittymiseen johtaa siihen, että se osaltaan säätelee myös alveolien erilaistumista (Loscertales ym. 2016).

SPARC:n ja COLIV:n välisistä vuorovaikutussuhteista tiedetään toistaiseksi melko vähän eikä niiden välisiä suhteita ole tutkittu kehittyvässä ihmiskeuhkossa. Tiedetään kuitenkin, että SPARC kykenee sitoutumaan COLIV:ään (Mayer ym. 1991). Mahlakärpäsiä koskeva tutkimus osoitti, että SPARC on välttämätön tekijä COLIV:n jakautumisessa ja muotoutumisessa tyvikalvoksi (Duncan ym. 2020). On myös havaittu, että SPARC vaikuttaa COLIV:n esiintymiseen mahlakärpästen lamina basaliuksessa – mikäli SPARC:ia ei ilmene lainkaan sikiönkehityksen keski- ja loppuvaiheissa, myöskään COLIV:tä ei ilmene (Martinek ym. 2008). On havaittu viitteitä, että COLIV:llä olisi saperoniproteiinin kaltaista vaikutusta SPARC:iin, ja että SPARC:n puuttuminen häiritsee tyvikalvon homeostaasia (Chioran ym. 2017).

### **3. TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT**

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää SPARC:n ja COLIV:n l-RNA- ja proteiinitason ilmentyminen kehittyvässä ihmiskeuhkossa eri kehitysvaiheiden aikana immunohistokemiallisin menetelmin ja kvantitatiivisen RT-PCR:n avulla. Immunohistokemiallisissa analyyseissä huomioitiin värjäysten intensiteetti, laajuus ja soluspesifisyys. RT-PCR-analyyseissä eri kehitysvaiheita edustavia näytteitä verrattiin terveen aikuisen keuhkoon, jotta saatiin selvitettyä suhteelliset arvot sille, mikä on kehityksen aikainen l-RNA-taso verrattuna kypsään kudokseen. Tutkimuskysymys rajattiin koskemaan SPARC:ia ja COLIV:ää itsenäisinä proteiineina eikä tämän tutkimuksen tarkoituksena ollut selvittää niiden keskinäistä säätelyä. Tavoitteena oli tarkastella niiden ilmentymisen muutoksia ensisijaisesti kehitysvaiheittain.

### **4. TUTKIMUSAINEISTO JA TUTKIMUSMENETELMÄT**

#### **4.1. Potilaisaineisto ja näytteet**

Keuhkokudosnäytteet on kerätty tutkimusryhmän aikaisempia tutkimuksia varten Oulun yliopistollisen sairaalan patologian osaston arkistoista. Aineisto koostuu neonataalikauden keuhkonäytteistä ja terveen aikuisen keuhkon verrokinäytteestä. Tutkituilla ei ollut todettu keuhkosairauksia, sydänsairauksia, infektoita, keuhkojen kehityshäiriöitä tai mitään synnynnäisiä kehityshäiriöitä. Kuolinsyitä olivat hypoksia tai ennenaikaisuus, mutta osa syistä oli jäänyt tuntemattomiksi.

Tutkimusmateriaali oli kerätty tutkimusryhmän aikaisempiin tutkimuksiin (Kaartenaho ym. 2010a; Kaartenaho ym. 2010b). Tutkimusta varten on olemassa Pohjois-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin eettisen toimikunnan puoltava päätös (lausunto 70/2001, amendment 68/2005, 12/2014, 2/2018) sekä lupa Valviralta kudosten tutkimuskäyttöön (reg.nr. 7323/05.01.06./2009 ja 863/04/047/08).

Aineistossa on materiaalia kehitysviikoilta 16-40 eli embryonaalivaihetta lukuun ottamatta jokaisesta keuhkojen kehitysvaiheesta. Immunohistokemiallisiin analyyseihin ja RT-PCR-menetelmään käytettiin näytteitä taulukon 2 mukaisesti. Lisäksi RT-PCR-analyyseissä

käytettiin kontrollinäytteenä aikuisen normaalirakenteista keuhkokudosta, jota ei ole laskettu taulukkoon mukaan.

Taulukko 2. Tutkimusaineistojen sisältö kehitysvaiheittain. Immunohistokemiallisen analyysin ja RT-PCR-analyysin näytemäärissä oli pientä vaihtelua. Taulukon RT-PCR-näytemäärään ei ole huomioitu työssä hyödynnettyä verrokinäytettä.

Kehitysvaihe	Menetelmä			
	IHC		RT-PCR	
	SPARC	COLIV	SPARC	COLIV
Pseudoglandulaarivaihe	9	9	4	4
Kanalikulaarivaihe	7	9	19	19
Sakkulaarivaihe	7	5	8	8
Alveolaarivaihe	9	7	2	2
Yhteensä	32	31	33	33

## 4.2. Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät

Parafiiniin petatuista keuhkokudosnäytteistä leikattiin neljän mikrometrin paksuisia leikkeitä, jotka lämmitettiin 60 asteessa 35 minuutin ajan. Deparafinointi suoritettiin kastamalla leikkeet ksyleeniin, jonka jälkeen ne kuivattiin laskevassa alkoholisarjassa. Tämän jälkeen leikkeet värjättiin immunohistokemiallisesti.

### 4.2.1. SPARC:n immunohistokemiallinen värjäys

Immunohistokemialliseen värjäykseen käytettiin Vecsastain Elite PK-6105 goat IgG ABC-värjäyskittiä (Vector Laboratories, Kalifornia, Yhdysvallat). Epitoopit saatiin keittämällä leikkeitä mikroaaltouunissa 13 minuutin ajan 10mM:n sitraattipuskuriliuoksessa, jonka pH oli 6.0. Primaarivasta-aineena käytettiin ihmisen SPARC-vasta-ainetta (AF941, R&D Systems, Minneapolis, Yhdysvallat) laimennoksella 1:750. Primäärivasta-aineen annettiin vaikuttaa leikkeillä yön yli 4°C:ssa. Sen jälkeen lisättiin biotinyloitu sekundaarinen vasta-aine. Lopullinen väri kehitettiin diaminobentsidiinillä ja vastavärjäykseen käytettiin hematoksyliiniä.



#### 4.2.2. COLIV:n immunohistokemiallinen värjäys

COLIV-leikkeiden värjäykseen käytettiin Lab Vision UltraVision Large Volume Detection System anti-polyvalent, HEP TP-125-HL-värjäyskitti (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Yhdysvallat). Pepsiniliuoksen annettiin vaikuttaa leikkeissä 37°C:ssa 30 minuutin ajan, jotta vasta-aineiden värjäytyminen tehostuisi. Primaarivasta-aineena käytettiin tyypin IV kollageenin vasta-ainetta (klooni CIV22, Dako M785, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Yhdysvallat), jota inkuboitiin 60 minuutin ajan huoneenlämmössä. Sen jälkeen leikkeille lisättiin sekundaarisena vasta-aineena biotinyloitu vuohen antipolyvalentti vasta-aine. Väriin kehittämiseksi hyödynnettiin jälleen diaminobentsidiiniä ja vastavärjäykseen käytettiin hematoksyliiniä.

#### 4.3. Automatisoitu immunoreaktiiviteetin arviointi

Jokaisesta leikkeestä valittiin kymmenen edustavaa kuvaa 10-kertaisella suurennoksella mikroskoopilla (DFC420, Leica Microsystems, Wetzlar, Saksa). Kuvat luokiteltiin automaattisesti erikseen taustaan ilman solurakenteita, negatiivisesti värjäytyneiden solujen alueeseen ja positiivisesti värjäytyneiden solujen alueeseen. Luokitteluun kehitettiin kuvanlaskenta-algoritmi MATLAB-ohjelmointikielellä (v. 9.4, The MathWorks Inc., Natick, MA, 2018).

Mikroskoopin RGB-kuvat esikäsiteltiin tekemällä epätasaisen säteilykentän korjaus (ns. flat-field korjaus), jolla poistettiin epätasaisen valonlähteen aiheuttama pikselikohtainen intensiteetin vaihtelu. Seuraavaksi kuva jaettiin laskennallisesti kohteeseen ja taustaan hyödyntäen paikallista entropiasuodatusta, joka mittaa kuvan tekstuurin vaihteluvoimakkuutta. Solurakenteita sisältävillä alueilla kuvatekstuurin vaihtelu on voimakkaampaa kuin tasaisemmalla taustalla ja solurakenteiden entropia on siis suurempi. Korkeamman entropian solurakenteet ja matalamman entropian tausta erotettiin kuvasta hyödyntämällä Otsun menetelmää (Otsu 1979). Kun solurakenteet saatiin erotettua kuvan taustasta, negatiivisesti värjäytyneet alueet erotettiin tunnistamalla alueet, joissa ilmentyi pääosin sinistä väriä. Algoritmin parametrit optimoitiin manuaalisesti tunnistamaan erot negatiivisesti ja positiivisesti värjäytyneiden alueiden välillä.

#### 4.4. Immunoreaktiiviteetin soluspesifinen arvioiminen semikvantitatiivisesti

Semikvantitatiivinen analyysi värjäyksien laajuudesta toteutettiin arviointiasteikolla negatiivinen (-), heikko (+), keskivahva (++) ja vahva (+++). Analyysissä huomioitiin värjäytymän laajuus ja intensiteetti. Immunoreaktiiviteettia arvioitiin eri rakenteissa ja niiden soluissa eli bronkuksissa eli suurissa keuhkoputkissa, bronkioleissa eli pienissä keuhkoputkissa, alveoleissa eli keuhkorakkuloissa, pleuran eli keuhkopussin epiteelisoluissa ja verisuonien intiman, median sekä eksternan endoteelisoluissa.

#### **4.5. Kvantitatiivinen RT-PCR**

Menetelmässä tutkittiin SPARC:n ja COLIV:n suhteellisia l-RNA:n määriä. Kokonais-RNA eristettiin parafiinin petatuista leikkeistä Purelink FFPE total RNA isolation – kitin avulla (Invitrogen, Carlsbad, CA, Yhdysvallat). Tutkittiin yhteensä 33 näytettä, jotka edustivat kaikkia keuhkojen eri kehitysvaiheita, kuten taulukossa 2 on havainnollistettu. Ylläpitogeeninä käytettiin glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasia (GADPH). l-RNA käännettiin komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) RevertAid first-strand cDNA-kitillä (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Yhdysvallat). RT-PCR-prosessi suoritettiin iG5 Optical system-laitteella (Bio-Rad Laboratories, Kalifornia, Yhdysvallat). Reaktioseokseen lisättiin 5 µL cDNA:ta, ja reaktioliuoksen kokonaistilavuus oli 25 µl. DNA:n kiinnittämiseen käytettiin SYBR Green I - väriainetta (iQ Custom SYBR green supermix, Bio-Rad Laboratories), joka sitoutuu epäspesifisti kaksijosteiseen DNA:han. Sen määrää mitattiin jokaisessa amplifikaatiosykliä ajan funktiona. Jokainen reaktio toteutettiin duplikaatteina 96-kaivoisella levyllä. Prosessissa syklit tapahtuivat seuraavasti: yksi sykli 95°C:ssa kolmen minuutin ajan, 45 amplifikaatiosykliä (jokainen 95°C 10 sekunnin ajan ja lisäksi 62°C (SPARC)/ 61°C (COLIV α1) 30 sekunnin ajan), yksi sykli 95°C:ssa yhden minuutin ajan ja yksi sykli 55°C:ssa yhden minuutin ajan. Tulokset normalisoitiin GADPH:n avulla, ja verrokkinäytteenä käytettiin näytettä kehitysviikolta 42.

## **5. TULOKSET**

### **5.1. Immunoreaktiiviteetin kvantitatiivinen arviointi immunohistokemiallisista värjäyksistä**

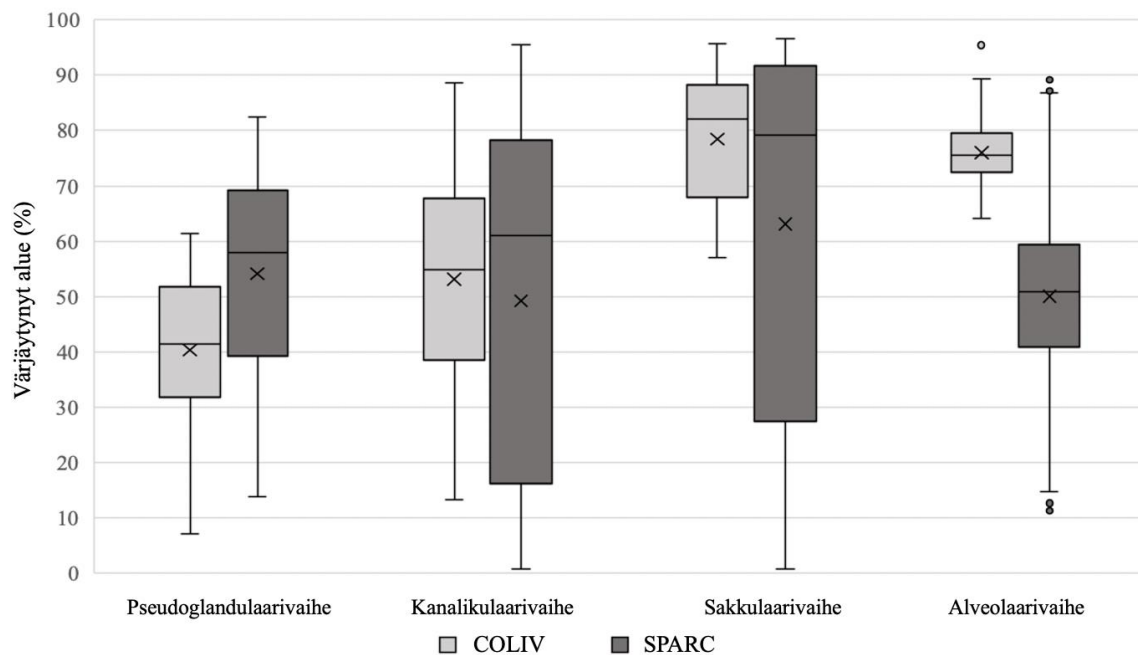
Immunohistokemiallisten värjäysten laajuutta eri kehitysvaiheissa on hahmoteltu kuvioon 1. COLIV:n värjäytymisen kokonaislaajuus kohosi pseudoglandulaarivaiheesta sakkulaarivaiheeseen, ja se hieman väheni alveolaarivaiheen aikana. SPARC:n värjäysten

mediaanilaajuus vaihtelee välillä 50-70% koko keuhkojen kehityksen ajan, ja se on laajimmillaan sakkulaarivaiheessa. COLIV ja SPARC ilmentyivät merkittävimmin sakkulaarivaiheessa (kuva 1). SPARC:n immunohistokemiallisissa värjäytymissä havaittiin suurta vaihtelua. SPARC osoitti merkittävämpää vaihtelua värjäytymissä koko kehityksen aikana verrattuna COLIV:ään. Pseudoglandulaari- ja sakkulaarivaiheiden aikana SPARC:n värjäytyminen oli laajempaa kuin COLIV:n. Sakkulaarivaiheen aikana kuitenkin COLIV:n ilmentyminen lisääntyi. Alveolaarivaiheessa tilanne oli muuttunut siten, että SPARC:n värjäytyminen oli vähäisempää kuin COLIV:n.

## **5.2. SPARC:n ja COLIV:n soluspesifinen ilmentyminen immunohistokemiallisissa värjäyksissä**

SPARC:n ja COLIV:n ilmentymistä arvioitiin semikvantitatiivisesti soluspesifisyyden määrittämiseksi. Molemmat proteiinit ilmentyivät useissa eri soluissa, kuten liitteiden 2(1) ja 2(2) kuvamateriaalista nähdään. Kaikkien kehitysvaiheiden aikana SPARC ja COLIV värjäytyivät positiivisesti tyvikalvossa, kun taas epiteelisoluissa ilmentymistä ei esiintynyt. Pseudoglandulaari- ja kanalikulaarivaiheiden aikana SPARC ilmentyi kohtalaisesti kehittyvissä ilmasteissa ja alveoleissa, kun taas COLIV:n immunoreaktiiviteetti oli niissä kohtalaisesti tai vahvasti positiivista. Sakkulaarivaiheen aikana bronkukset, bronkiolit ja alveolit ilmensivät vahvasti SPARC:ia, mutta alveolaarivaiheessa ilmentyminen heikkeni. COLIV:n ilmentyminen oli vahvasti positiivista kahden viimeisen kehitysvaiheen aikana. Etenkin bronkiolitasolla SPARC:n ilmentyminen vahvistui kehityksen edetessä. Bronkuksien ympärillä ilmentyi SPARC:ia ja COLIV:a kaikissa kehitysvaiheissa. (Taulukko 3)

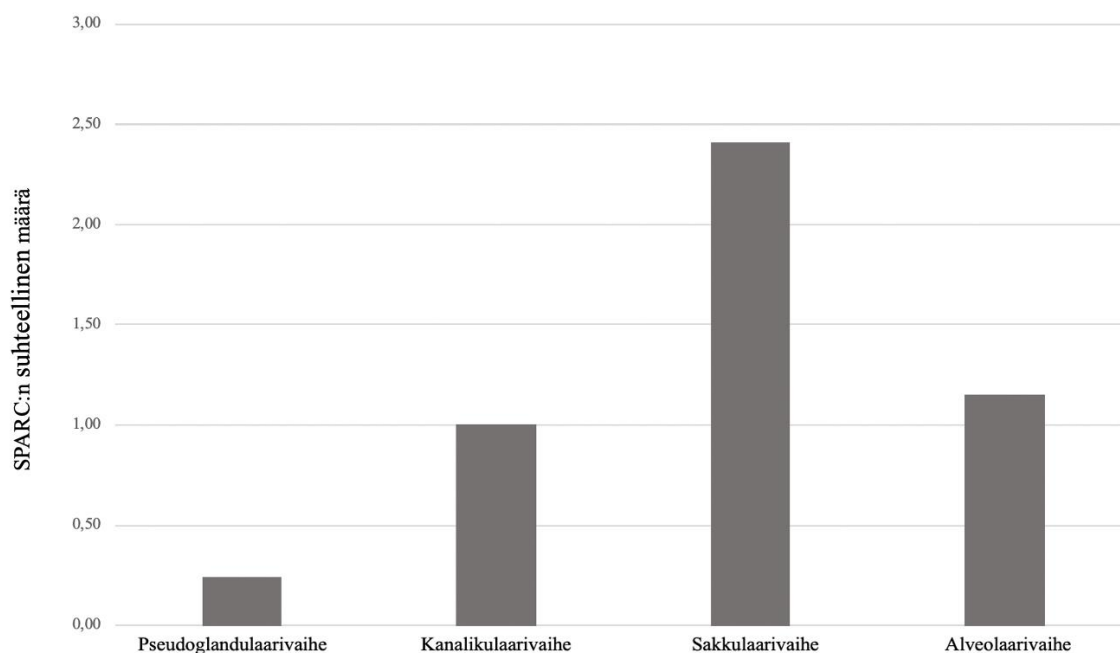
Endoteelisoluissa SPARC ei pääosin ilmentynyt lainkaan, kun taas COLIV:n ilmentymisessä oli suurta vaihtelua riippuen kehitysvaiheesta. Pleuran mesoteelissa SPARC:ia ilmentyi kahden ensimmäisen kehitysvaiheen aikana, mutta sen ilmentyminen väheni kehityksen seuraavissa vaiheissa ja viimeisimmissä kehitysvaiheissa sen ilmentyminen hävisi. Pleuran mesoteelisoluissa COLIV:n immunoreaktiiviteettia ei juurikaan havaittu. (Taulukko 3)



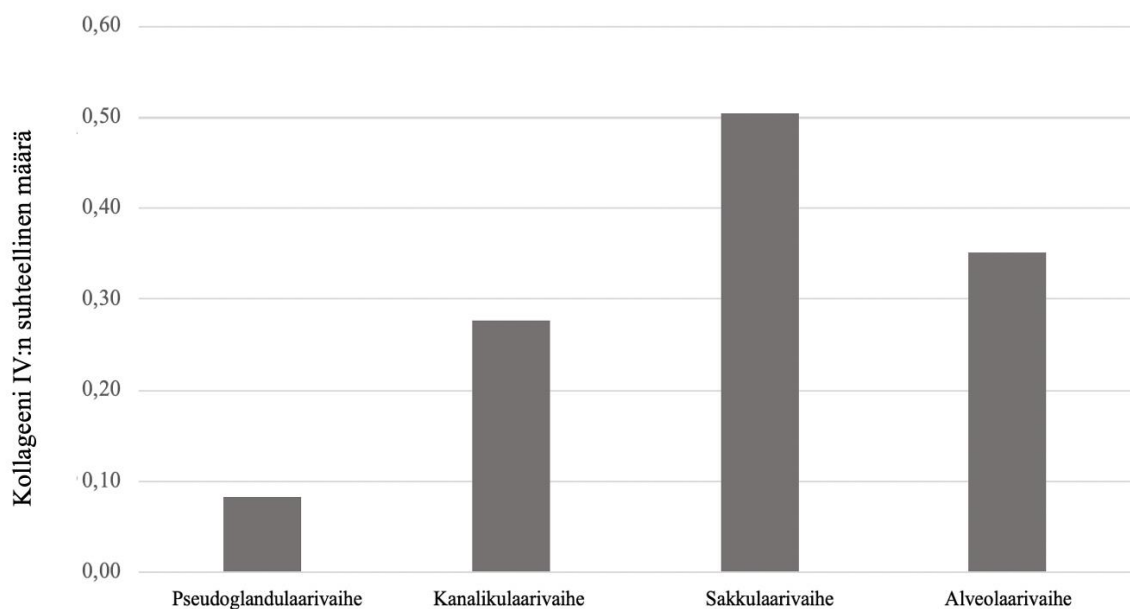
Kuva 1. SPARC:n ja COLIV:n immunohistokemiallinen värjäytyminen eri kehitysvaiheissa automaattisella kuva-analyysillä tutkittuna. COLIV:n värjäytymisen kokonaislaajuus kasvoi pseudoglandulaarivaiheesta sakkulaarivaiheeseen, mutta se väheni alveolaarivaiheessa. SPARC:n värjäytymisen kokonaislaajuuden muutokset olivat samankaltaisia, mutta niissä havaittiin suurempaa vaihtelua.

### 5.3. SPARC:n ja COLIV:n määrät kvantitatiivisella RT-PCR:llä tutkittuna

Määrät suhteutettiin näytteeseen kehitysviikolta 42, joka normalisoitiin arvoon 1, jotta saatiin luotua suhteellisia tuloksia. Täten SPARC:n ja COLIV:n tulokset eivät ole keskenään absoluuttisesti vertailtavissa. RT-PCR-tulokset molemmille proteiinille ovat kuitenkin suhteellisesti samankaltaisia, kun tutkitaan, miten suhteelliset proteiinimäärät vaihtelevat kehityksen ajan. Molempien proteiinien määrät kohosivat pseudoglandulaarivaiheesta sakkulaarivaiheeseen, mutta laskivat alveolaarivaiheen aikana. Molempien proteiinein suhteellisten määrien trendit muistuttivat toisiaan myös siten, että on havaittavissa lähes eksponentiaalista kasvua pseudoglandulaarivaiheen ja sakkulaarivaiheen aikana, kuten myös merkittävää laskua alveolaarivaiheessa. (Kuva 2, kuva 3)



Kuva 2. SPARC:n l-RNA:n RT-PCR-tulokset noudattavat samankaltaista kaavaa kuin immunohistokemialliset värjäyksetkin: l-RNA:n määrä kasvaa pseudoglandulaarivaiheesta sakkulaarivaiheeseen ja laskee alveolaarivaiheessa. Suhteellisesti suurinta kasvua tapahtuu siirryttäessä kanalikulaarivaiheesta sakkulaarivaiheeseen.



Kuva 3. COLIV:n RT-PCR-tulokset muistuttavat suhteellisesti SPARC:n RT-PCR-tuloksia, sillä myös COLIV:n määrä kasvaa sakkulaarivaiheeseen saakka ja laskee alveolaarivaiheessa. Samoin COLIV:n suhteellisesti suurin kasvu tapahtuu siirryttäessä

kanalikulaarivaiheesta sakkulaarivaiheeseen. COLIV:n immunohistokemiallisten värjäysten laajuuden muutokset muistuttavat sen l-RNA:n kehitysvaiheittain tapahtuvia muutoksia.

## 6. POHDINTA

Tämä tutkimus on kirjottajan tietämyksen mukaan ensimmäinen, jossa selvitettiin SPARC:n ja COLIV:n ilmentymistä ihmiskeuhkojen sikiöaikaisessa kehityksessä. Tietokoneanalyysissa ja semikvantitatiivisessa analyysissa tarkasteltiin tutkittavien kohteiden immunohistokemiallisten värjäyksen laajuutta ja intensiteettiä. Tietokoneanalyysi huomioi endoteelin ja bronkiolin värjäytymisen, ja semikvantitatiivinen analyysi täydensi tätä huomioimalla alveolit. RT-PCR-tulokset olivat yhteneväisiä kvantitatiivisen analyysin kanssa, koska molemmat menetelmät huomioivat ilmentymisen koko leikkeessä, mikä vahvistaa tietokonekuva-analyysimenetelmän tuloksia. Työn keskeisenä analyysimenetelmänä immunoreaktiiviteetin tutkimiseen käytettiin täysin automatisoitua kvantitatiivista tekniikkaa. Tämä lähestymistapa valittiin paremman toistettavuuden ja tehokkaamman data-analyysin vuoksi (Hamilton ym. 2014, Rizzardi ym. 2016). Tällä lähestymistavalla on omat rajoitteensa: menetelmän parametrit ovat riippuvaisia käytetyistä värjäysaineista ja mikroskoopin ominaisuuksista. Näin ollen käytetty menetelmä ei ole suoraan yleistettävissä. Toisaalta semikvantitatiivinen analyysi on arvio, joka voi vaihdella tulkitsijan mukaan. Sen etuna on kuitenkin mahdollisuus subjektiiviseen arvioon leikkeen kelpoisuudesta tutkimusmateriaaliksi ja mahdollisten artefaktojen poissulkeminen analyysistä. Tietokoneanalyysi ei automaattisesti poissulkenut mahdollisesti epäedustavia kuvia, joten siihen valittiin edustavia kuvia manuaalisesti. Tässä työssä molemmat analyysimenetelmät täydensivät toisiaan.

Immunohistokemiallisilla menetelmillä ja kvantitatiivisella RT-PCR:llä tutkittuna havaittiin, että SPARC:n ja COLIV:n ilmentyminen vaihteli eri kehityskausien aikana. Pseudoglandulaari-, kanalikulaari- ja sakkulaarivaiheiden aikana proteiinien ja l-RNA:n määrät kohosivat. Sen sijaan alveolaarivaiheessa määrät vähenivät lähes samalle tasolle kuin kanalikulaarivaiheessa. Sekä SPARC:n että COLIV:n vahvin ilmentyminen havaittiin sakkulaarivaiheessa. Kyseisessä kehitysvaiheessa elastisten säikeiden ja kollageenisäikeiden muodostama sidekudosverkko kehittyi, ja kaksikerroksinen kapillaariverkosto muodostuu primaariseptaan (Schittny 2017). Vastaavasti COLIV värjäytyi positiiviseksi endoteelisoluissa sakkulaarivaiheen aikana. Löydökset vahvistavat aiempien tutkimusten

nisäkäs- ja eläinmallien tuloksia, joissa on havaittu, että SPARC:ia esiintyy laajasti sikiön kudoksissa eri eläinlajeilla. Esimerkiksi rotan sikiön keuhkoissa SPARC-proteiinia havaittiin epiteelisoluissa pseudoglandulaarivaiheen aikana (Strandjord ym. 1995), ja nyt tiedämme tämän pitävän paikkansa myös ihmiskeuhkossa koko kehityksen ajan. Lisäksi hiiren sikiöillä tehty tutkimus havaitsi korkeaa SPARC-proteiinipitoisuutta alveoleiden epiteelissä ja mahdollisesti endoteelissa sekä tiehyiden epiteelissä (Sage ym. 1989). Myös lintututkimuksissa on havaittu SPARC 1-RNA:ta kanan sikiön keuhkoissa (Bassuk ym. 1993).

Ekstrasellulaarinen mikroympäristö on välttämätön keuhkojen homeostaasille ja sen järkkäminen voi aiheuttaa yksin tai yhdessä muiden tekijöiden kanssa kroonisen keuhkosairauden. Aiemmin on havaittu, että SPARC:ia erittyy syöpäsoluista ja kasvaimen mikroympäristöstä (Tichet ym. 2015), ja kasvaimesta riippuen sillä on joko onkogeeninen tai suppressiivinen rooli (Nagaraju ym. 2014). SPARC:n on todettu myötävaikuttavan myös keuhkojen levyepiteelikarsinooman tuumorigeneesiin (Xu ym. 2019). Lisäksi se ajaa mikroverenkierron uudelleenmuodostumista ja ekstrasellulaarimatriksin proteiinien ylenmääräistä kertymistä pienisoluisessa keuhkosityössä sekä idiopaattisessa keuhkofibroosissa (Wong & Sukkar 2017). Syöpäsolujen voidaan ajatella olevan analogisia kehittyvän keuhkon kanssa sillä mikroympäristön muutokset ovat kiihtyneet tavanomaiseen solujen mikroympäristöön verrattuna. SPARC indusoi fibroblastien migraatiota organisoituvassa pneumoniassa ja interstitiaalisessa pneumoniassa (Kuhn & Mason 1995). Viimeaikainen kliininen tutkimus osoittaa, että jotkin aikuisiällä ilmenevät keuhkosairaudet saavat alkunsa itseasiassa jo sikiönkehityksen tai lapsuuden aikana (Nikolić ym. 2018), mikä korostaa sikiönkehityksen tutkimisen tärkeyttä.

COLIV on eräs tyvikalvon tärkeimmistä rakenneosista, minkä vuoksi se osaltaan muodostaa rakenteellista estettä syöpäsolujen invaasiolle. COLIV:n määrä vähenee syöpäkudoksessa, mikä usein on havaittavissa sen puuttumisena immunohistokemiallisissa värjäyksissä (Chang & Chaudhuri 2019). Tämä tutkimus havaitsi, että normaalin kehityksen aikana COLIV:n ilmentyy vahvasti ja että sen pitoisuus pysyy yllä myös täysin kypsässä ja terveessä keuhkossa. Eräässä tutkimuksessa havaittiin COLIV:n määrän lisääntymisen parenkymaalisisessa kollageenissa ihmisen keuhkojen kehityksen aikana ja tämän perusteella todettiin onnistuneen kehityksen vaativan normaalisti kehittyneen interstitiumin ja ehkä myös kollageenistruktuurin (Thibeault ym. 2003). Edellä mainittu on linjassa tämän

tutkimuksen kanssa, jossa todettiin COLIV:n l-RNA:n ja proteiinin määrien kasvua kehitysvaiheiden edetessä. Sikiön altistuminen nikotiinille raskausaikana voi indusoida epänormaalia COLIV-ekspressiota ja aiheuttaa puutoksia bronkopulmonaarisessa kehityksessä (Kohbanani ym. 2012), mikä tukee hypoteesia, että COLIV on välttämätön normaalin kehityksen kannalta, ja tätä normaalia ilmentymistä kehitysvaiheittain tämä tutkimus hahmotteli.

Tämän tutkimusaineiston avulla on jo aiemmin toteutettu useita tutkimuksia ekstrasellulaarimatriksin proteiineista (ECM-proteiini) ja matrisellulaariproteiineista keuhkojen kehityksessä. Vertailuna ECM-proteiini tenaskiini-C ilmenee voimakkaasti ilmasteiden epiteelin alla erityisesti kehitysviikkojen 12-23 aikana, jonka jälkeen sen ilmentyminen heikkenee. Kanalikulaarivaiheessa tenaskiini-C ilmentyy voimakkaasti verisuonten intimassa. Tenaskiini-C siis ilmentyy hyvin samankaltaisesti kuin COLIV. Tyyppien I ja III kollageenien prekursoriproteiineja ilmenee pleurassa, bronkuksissa ja bronkioleissa kaikkien kehitysviikkojen aikana, jonka tämä tutkimus osoitti olevan totta myös SPARC:n ja COLIV:n osalta. Tyyppien I ja III prekursoriproteiineja ilmentyy vahvasti keuhkovaltimoissa ja -laskimoissa koko kehityksen ajan. Sen sijaan SPARC:n ja COLIV:n ilmentyminen verisuonissa vaihtelee kehitysvaiheittain: SPARC ilmentyy vahvemmin kahdessa ensimmäisessä kehitysvaiheessa ja COLIV kahdessa viimeisessä. (Kaarteenaho-Wiik ym. 2001, Kaarteenaho-Wiik ym. 2004)

Tutkimuksen rajoitteet liittyivät osin harvinaislaatuiseen tutkimusaineistoon ja osin itse tutkimuskysymyksen ainutlaatuisuuteen. Tutkimusaineisto koostui rajatusta määrästä kudoksenäytteitä immunohistokemiallisia tutkimuksia ja kuva-analyysia varten sekä pienestä määrästä näytteitä RT-PCR-analyysia varten. Tutkimusaineiston ainutkertaisuuden vuoksi tämä pieni määrä näytteitä silti tarjoaa suuren määrän arvokasta uutta tietoa. Kehittyvien ihmiskudosten hyödyntäminen tutkimuksissa on varsin harvinaista. Vertailukohdiksi ei ollut olemassa aiempia tutkimuksia näistä proteiineista kehittyvässä ihmiskeuhkossa, joten vertailuun käytettiin pelkästään eläinmallien tuloksia.

Tämä tutkimus demonstroi SPARC:n ja COLIV:n ilmentymistä normaalissa ihmisen keuhkon kehityksessä. Tulokset osoittavat, että näiden proteiinien ilmentyminen vaihtelee koko kehityksen ajan. SPARC:n immunohistokemiallisen värjäytymisen laajuuden hajonta oli suuri, mikä mahdollisesti pienenesi näytemäärän kasvaessa. Toisaalta COLIV:n



värjäytymisen hajonta oli huomattavasti vähäisempää. Värjäytymien hajonnat voivat kertoa kyseisten proteiinien ominaisesta määrän vaihtelusta kehittyvässä keuhkossa. Toisin sanoen COLIV:n esiintyvyyden vaihtelu eri kehitysvaiheissa voi olla luontaisesti vähäisempää kuin SPARC:lla. COLIV:n vaihteleva ilmentyminen voi olla seurausta SPARC:n säätelemästä kehityskulusta, sillä SPARC voi sitoutua COLIV:ään ja sen tiedetään olevan tyvikalvon homeostaasin säätelijä. SPARC:n ja COLIV:n välistä assosiaatiota tulisi tutkia lisää, ja koska keuhkojen kehityshäiriö voi olla fataali, kyseisten proteiinien osuuksia keuhkosairauksien patogeenisissä tulisi selvittää.

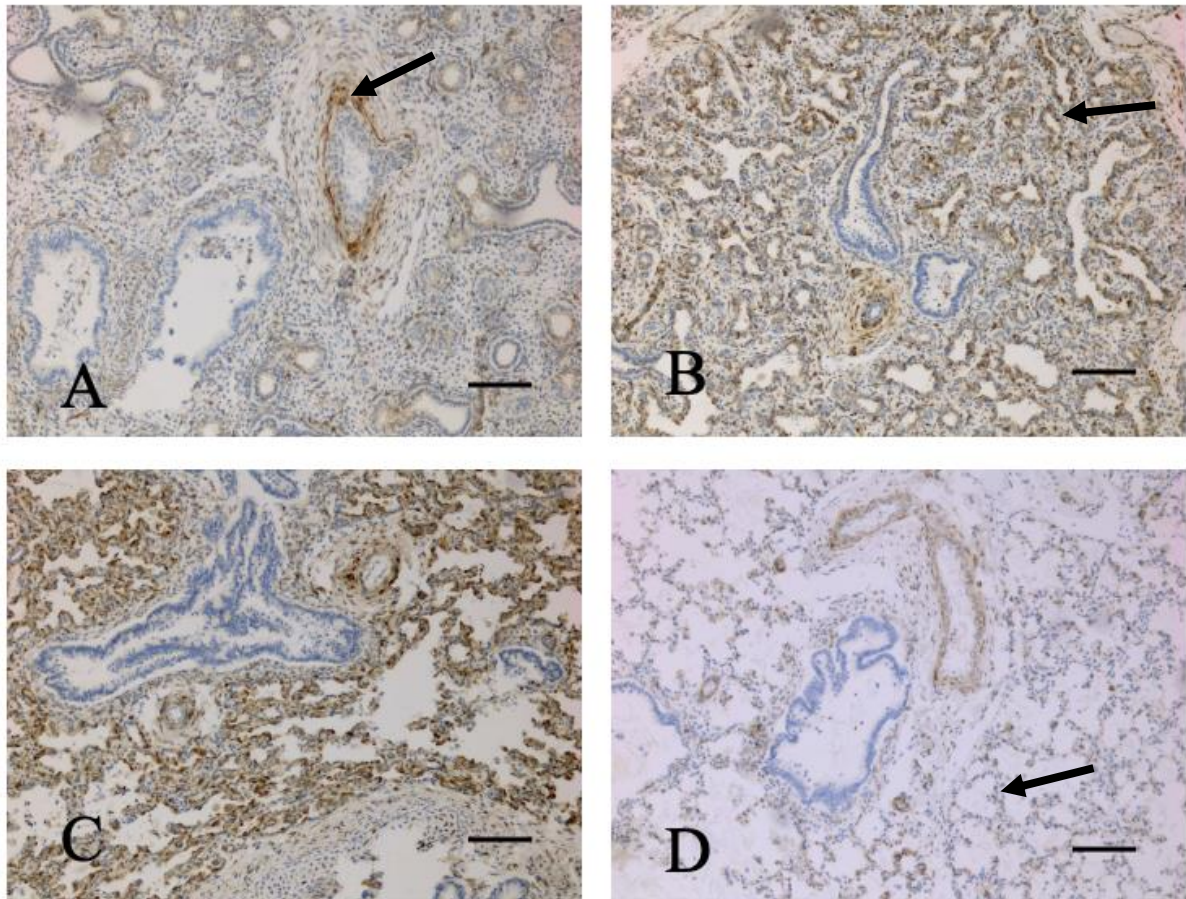
## LÄHDELUETTELO

- Bassuk JA, Iruela-Arispe ML, Lane TF, Benson JM, Berg RA & Sage EH (1993). Molecular analysis of chicken embryo SPARC (osteonectin). *European Journal of Biochemistry* 218(1): 117–127.
- Chang J & Chaudhuri O (2019). Beyond proteases: Basement membrane mechanics and cancer invasion. *Journal of Cell Biology* 218(8): 2456–2469.
- Chioran A, Duncan S, Catalano A, Brown TJ & Ringuette MJ (2017). Collagen IV trafficking: The inside-out and beyond story. *Developmental Biology* 431(2): 124–133.
- Davidson JM (1990). Biochemistry and turnover of lung interstitium. *European Respiratory Journal* 3:1048-1063.
- Duncan S, Delage S, Chioran A, Sirbu O, Brown TJ & Ringuette MJ (2020). The predicted collagen-binding domains of *Drosophila* SPARC are essential for survival and for collagen IV distribution and assembly into basement membranes. *Developmental Biology* 461(2): 197–209.
- Giblin SP & Midwood KS (2015). Tenascin-C: Form versus function. *Cell Adhesion & Migration* 9(1–2): 48–82.
- Hamilton PW, Bankhead P, Wang Y, Hutchinson R, Kieran D, McArt DG ym. (2014). Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods* 70(1): 59–73.
- Holland PW, Harper SJ, McVey JH & Hogan BL (1987). In vivo expression of mRNA for the Ca<sup>++</sup>-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *The Journal of Cell Biology* 105(1): 473–482.
- Kaarteenaho-Wiik R, Kinnula V, Herva R, Pääkkö P, Pöllänen R & Soini Y (2001). Distribution and mRNA Expression of Tenascin-C in Developing Human Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25(3): 341–346.
- Kaarteenaho-Wiik R, Pääkkö P, Herva R, Risteli J & Soini Y (2004). Type I and III collagen protein precursors and mRNA in the developing human lung. *The Journal of Pathology* 203(1): 567–574.
- Kaarteenaho R, Lappi-Blanco E & Lehtonen S (2010a). Epithelial N-cadherin and nuclear -catenin are up-regulated during early development of human lung. *BMC Developmental Biology* 10(1): 113.
- Kaarteenaho R, Merikallio H, Lehtonen S, Harju T & Soini Y. (2010b). Divergent expression of claudin -1, -3, -4, -5 and -7 in developing human lung. *Respiratory Research* 11(1): 59.
- Kohbanani MS, Nikravesh MR, Jalali M, Fazel A, Sankian M ym. (2012). Effects of Maternal Nicotine Exposure on Expression of Laminin Alpha 5 in Lung Tissue of Newborn. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15(24): 1168–1175.
- Kuhn C & Mason RJ (1995). Immunolocalization of SPARC, tenascin, and thrombospondin in pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology* 147(6): 1759–1769.
- Loscertales M, Nicolaou F, Jeanne M, Longoni M, Gould DB. ym. 2016. Erratum to: Type IV collagen drives alveolar epithelial-endothelial association and the morphogenetic movements of septation. *BMC Biology* 1;14(1):73.
- Martinek N, Shahab J, Saathoff M & Ringuette M (2008). Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *Journal of Cell Science* 121(10): 1671–1680.
- Mayer U, Aumailley M, Mann K, Timpl R & Engel J (1991). Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin, SPARC) to basement membrane collagen type IV. *European Journal of Biochemistry* 198(1): 141–150.

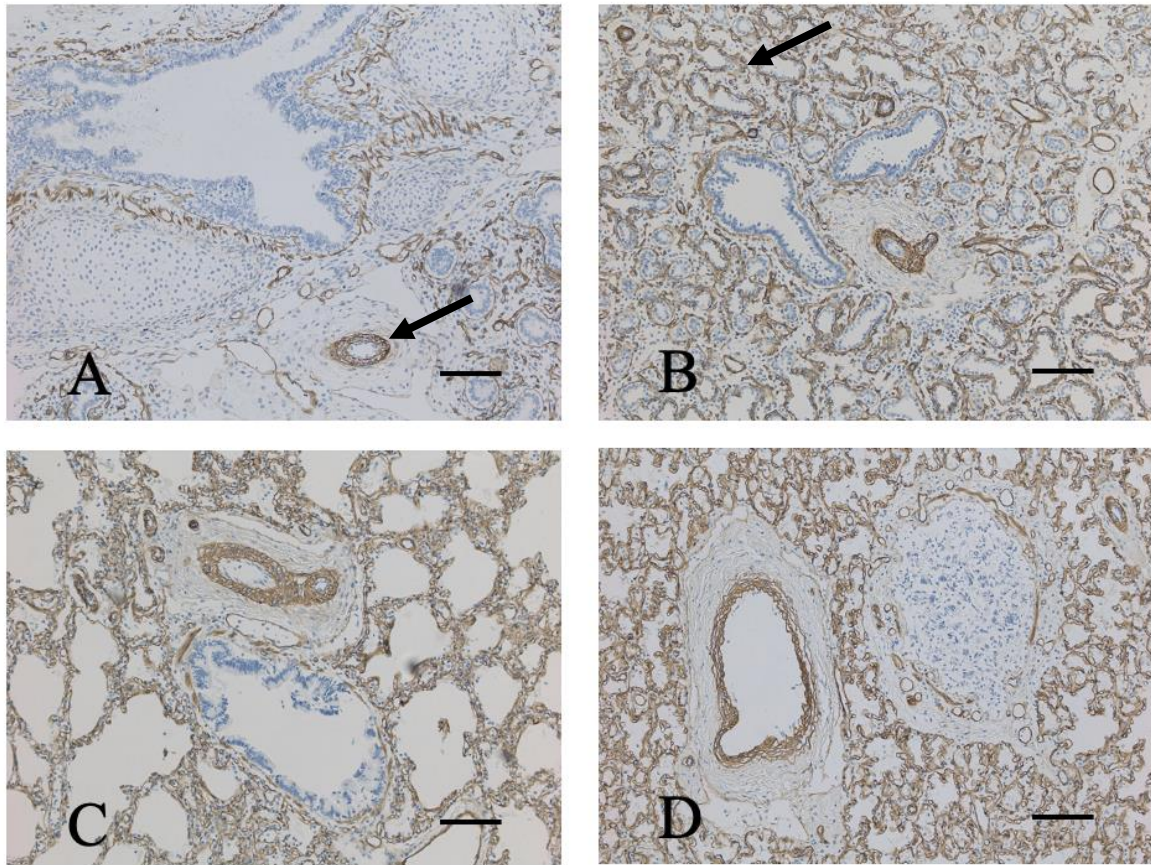
- Mullassery D & Smith NP (2015). Lung development. *Seminars in Pediatric Surgery* 24(4): 152–155.
- Murphy-Ullrich JE & Sage EH (2014). Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biology* 37: 1–14.
- Nagaraju GP, Dontula R, El-Rayes BF & Lakka SS (2014). Molecular mechanisms underlying the divergent roles of SPARC in human carcinogenesis. *Carcinogenesis* 35(5): 967–973.
- Nikolić MZ, Sun D & Rawlins EL (2018). Human lung development: recent progress and new challenges. *Development* 145(16): dev163485.
- Wessells NK & Cohen JH (1968). Effects of collagenase on developing epithelia in vitro: Lung, ureteric bud, and pancreas. *Developmental Biology* 18(3):294-309.
- O'Dwyer DN & Moore BB (2017). The role of periostin in lung fibrosis and airway remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017 Dec;74(23):4305-4314.
- Otsu N (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9(1): 62–66.
- Poschl E (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131(7): 1619–1628.
- Rizzardi AE, Zhang X, Vogel RI, Kolb S, Geybels MS, Leung Y-K ym. (2016). Quantitative comparison and reproducibility of pathologist scoring and digital image analysis of estrogen receptor  $\beta 2$  immunohistochemistry in prostate cancer. *Diagnostic Pathology* 11(1):63.
- Sage H, Vernon RB, Decker J, Funk S & Iruela-Arispe ML (1989). Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 37(6):819–829.
- Schittny JC (2017). Development of the lung. *Cell and Tissue Research* 367(3): 427–444.
- Strandjord TP, Sage EH & Clark JG (1995). SPARC participates in the branching morphogenesis of developing fetal rat lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 13(3): 279–287.
- Thibeault DW, Mabry SM, Ekekezie II, Zhang X & Truog WE (2003). Collagen Scaffolding During Development and Its Deformation With Chronic Lung Disease. *Pediatrics* 111(4): 766–776.
- Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N, Ambrosetti D, Mallavialle A, Cerezo M ym. (2015). Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nature Communications* 6(1):6993.
- Wong SLI & Sukkar MB (2017). The SPARC protein: an overview of its role in lung cancer and pulmonary fibrosis and its potential role in chronic airways disease. *British Journal of Pharmacology* Jan;174(1):3-14
- Xu J, Yang S, Gu X, Shen H, Wang L, Xu W ym. (2019). SPARC correlates with unfavorable outcome and promotes tumor growth in lung squamous cell carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology* Oct;110:104276.

Taulukko 3. SPARC:n ja COLIV:n immunohistokemiallinen soluspesifi ilmentyminen keuhkojen eri kehitysvaiheissa semikvantitatiivisesti analysoituna. Kehittyvissä ilmasteissa ja alveoleissa COLIV:n ilmentyminen on voimakkainta kehityksen alku- ja keskivaiheilla, mutta SPARC:n ilmentyminen vahventuu maltillisemmin kehityksen edetessä. Verisuonten endoteelisoluissa COLIV:n ilmentyminen on vahvaa kehityksen alussa, ja SPARC:n ilmentyminen vahvistuu kehityksen puolenvälin jälkeen. Pleurassa proteiinien ilmentyminen on vaihtelevaa, mutta SPARC ilmenee useammin positiivisena kuin COLIV.

		Kehitysvaihe			
Rakenne	Proteiini	Pseudoglandulaarivaihe (SPARC n=9, COLIV n=9)	Kanalikulaarivaihe (SPARC n=9, COLIV n=9)	Sakkulaarivaihe (SPARC n=7, COLIV n=5)	Alveolaarivaihe (SPARC n=8, COLIV n=7)
Bronkukset	SPARC	+ (5), ++ (4)	- (1), + (5), ++ (2), +++ (1)	+ (3), ++ (1), +++ (3)	+ (4), ++ (4)
	COLIV	++ (4), +++ (5)	++ (6), +++ (3)	++ (1), +++ (4)	++ (4), +++ (3)
Bronkiolit	SPARC	+ (3), ++ (6)	- (1), + (5), ++ (2), +++ (1)	+ (3), ++ (1), +++ (3)	+ (4), ++ (4)
	COLIV	++ (3), +++ (6)	++ (2), +++ (7)	+++ (5)	++ (2), +++ (5)
Alveolit	SPARC	+ (3), ++ (6)	- (1), + (5), ++ (2), +++ (1)	+ (3), ++ (1), +++ (3)	+ (4), ++ (4)
	COLIV	++ (2), +++ (7)	++ (1), +++ (8)	+++ (5)	++ (2), +++ (5)
Endoteelisolut	SPARC	- (8), + (1)	- (1), + (5), ++ (2), +++ (1)	+ (3), ++ (1), +++ (3)	+ (4), ++ (4)
	COLIV	- (4), + (1), ++ (1), +++ (3)	- (6), + (1), ++ (2)	- (4), + (1)	- (2), + (5)
Pleura	SPARC	+ (6), ++ (2), +++ (1)	- (1), + (5), ++ (2), +++ (1)	+ (3), ++ (1), +++ (3)	+ (4), ++ (4)
	COLIV	- (8), + (1)	- (7), + (2)	- (3), + (2)	- (7)



Kuva 4. SPARC:n immunohistokemiallinen värjäytyminen eri kehitysvaiheissa. A. pseudoglandulaarivaihe, B. kanalikulaarivaihe, C. sakkulaarivaihe ja D. alveolaarivaihe. Kehityksen alussa (A) endoteelisolut värjäytyvät positiivisesti ja bronkusten epiteeli negatiivisesti. Kehityksen edetessä kanalikulaarivaiheessa (B) verisuonet ja kehittyvät alveolit värjäytyvät melko vahvasti positiivisiksi, ja sakkulaarivaiheessa (C) ne värjäytyvät vielä voimakkaammin. Alveolaarivaiheessa (D) bronkukset värjäytyvät edelleen negatiivisesti, endoteelisolut positiivisesti ja alveolit pääosin negatiivisesti. Mittiviivan pituus jokaisessa kuvassa on 80 $\mu$ m.



Kuva 5. COLIV:n immunohistokemiallinen värjäytyminen eri kehitysvaiheissa. A. pseudoglandulaarivaihe, B. kanalikulaarivaihe, C. sakkulaarivaihe, D. alveolaarivaihe. Pseudoglandulaarivaiheessa (A) bronkusten epiteeli ja kehittyvät alveolit värjäytyvät negatiivisesti, mutta endoteelisolut positiivisesti. Kanalikulaarivaiheessa (B) kehittyvät ilmatiet ja alveolit sekä endoteelisolut värjäytyvät jo vahvasti positiivisena, mutta bronkusten epiteelisolut yhä negatiivisesti. Sakkulaarivaiheessa (C) värjäytymislöydökset muistuttavat kanalikulaarivaihetta. Viimeisessä vaiheessa eli alveolaarivaiheessa (D) alveolit ja verisuonten intiman endoteelisolut värjäytyvät voimakkaasti positiivisina, ja bronkusten epiteelit jälleen negatiivisina. Mittaviivan pituus jokaisessa kuvassa on 80 $\mu$ m.