



**EESTI VABARIIK**  
PATENDIAMET

(11) **EE 200300559 A**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: A61K 38/21

(12) **PATENDITAOTLUS**

|  |  |
|--|--|
| (21) Patenditaotluse number: <b>P200300559</b>   | (71) Patenditaotleja:<br><br><b>Applied Research Systems ARS Holding N.V.</b><br><b>Pietermaai 15, Curaçao, AN</b>           |
| (85) Rahvusvahelise patendi-<br>taotluse siseriiklikku<br>faasi esitamise kuupäev: <b>15.12.2003</b> | (72) Leiutise autorid:<br><br><b>Ursula Boschert</b><br><b>Route d'Annecy 100 C, CH-1256 Troinex, CH</b>                     |
| (86) Rahvusvahelise patendi-<br>taotluse number: <b>PCT/EP02/05081</b>                               | <b>Georg Feger</b><br><b>159, route de Saint-Julien,</b><br><b>CH-1228 Plan-les-Ouates, CH</b>                               |
| (86) Rahvusvahelise patendi-<br>taotluse esitamise kuupäev: <b>08.05.2002</b>                        | <b>Raghuram Selvaraju</b><br><b>12 Chemin de la Cocuaz,</b><br><b>CH-1253 Vandoeuvres, CH</b>                                |
| (43) Patenditaotluse<br>avaldamise kuupäev: <b>16.02.2004</b>  | <b>Ruben Papoian</b><br><b>Chemin de la Redoute 52, CH-1260 Nyon, CH</b>   |
| (30) Prioriteediandmed: <b>17.05.2001</b><br><b>EP 01111296.8</b>                                    | <b>Lilia Bernasconi</b><br><b>Chemin du Relai 6, CH-1258 Perly, CH</b>   |
|  | (74) Patendivolnik:<br><br><b>Jüri Käosaar</b><br><b>Patendibüroo Käosaar &amp; Co OÜ</b><br><b>Tähe 94, 50107 Tartu, EE</b> |

(54) **Osteopontiini kasutamine neuroloogiliste haiguste raviks ja/või vältimiseks**

(57) Leiutis käsitleb osteopontiini või osteopontiini toimega agonisti kasutamist neuroloogiliste haiguste raviks või vältimiseks.

(57) The invention relates to the use of osteopontin, or of an agonist of osteopontin activity, for treatment or prevention of a neurologic diseases.

**Osteopontiini kasutamine neuroloogiliste haiguste raviks ja/või vältimiseks**

## TEHNIKAVALDKOND

Käesolev leiutus on üldiselt neuroloogiliste haiguste ja häirete valdkonnast. See käsitleb neuroproteksiooni, närvide müeliniseerimist ja müeliini produtseerivate rakkude tekkimist või regenereerumist. Eriti käsitleb see demüeliniseerumist ja neurodegeneratiivseid haigusi, neuropaatiad, traumaatilist närvivigastust, insulti ja neuroloogilisi haigusi, mis on põhjustatud kaasasündinud metaboolsetest häiretest. Täpsemalt käsitleb käesolev leiutus osteopontiini või osteopontiini toimega agonisti kasutamist ravimi valmistamiseks neuroloogilise haiguse raviks ja/või vältimiseks.

## 10 TEHNIKA TASE

Närvide müeliniseerimine on oluline protsess kesknärvisüsteemi (KNS) ja perifeerse närvisüsteemi (PNS) kompartmentide moodustumises ja funktsioneerimises. Müeliintupp ümber aksonite on vajalik elektriliste impulsside õigeks juhtimiseks mööda närvi. Müeliini kadu esineb paljude haiguste korral, mille hulgas on hulgiskleroos (*multiple sclerosis*, MS), mis kahjustab KNS, Guillain'-Barré sündroom, CIDP jt (vt Abramsky and Ovadia, 1997; Trojaborg, 1998; Hartung *et al.*, 1998). Kuigi erinevate etioloogiatega, nagu nakkuslikud patogeenidest või autoimmuunprotsessidest tingitud, põhjustavad kõik demüeliniseerivad haigused neuroloogilise funktsiooni kadumist ja võivad viia halvatuseni ning surmani. Kuigi praegusel ajal kasutatavad ravimained vähendavad põletikulisi protsesse MS korral ja pidurdavad haiguse progresseerumist, on vaja välja töötada ravimid, mis viiksid remüeliniseerumiseni ja neuroloogiliste funktsioonide taastumiseni (Abramsky and Ovadia, 1997; Pohlau *et al.*, 1998).

KNS kahjustus, mis on tekkinud ägedate insultide, kaasa arvatud trauma, hüpoksia ja isheemia, tagajärjel, võivad kahjustada nii närvirakke kui ka valgeainet. Kuigi enamus tähelepanust on pööratud protsessidele, mis viivad närvirakkude surmani, kinnitavad uurimistulemused üha enam, et aksoneid müeliniseerivate oligodendrotsüütide kahjustus on samuti KNS kahjustuse spetsiifiliseks komponendiks. Niisiis näidati oligodendrotsüütide patoloogiat väga varajases faasis pärast insulti (3 tundi) rottidel, mis kinnitab, et need rakud on isegi enam tundlikud ekstsitotoksilistele sündmustele kui närvirakud (Pantoni *et al.*, 1996). Üheks potentsiaalseks kandidaadiks, mis vahendab

rakusurma, on glutamaadi kontsentratsiooni märkimisväärne tõus, mis kaasneb paljude KNS ägedate kahjustustega (Lipton *et al.*, 1994). Tõepoolest leiti, et peale närvirakkude ekspresseerivad funktsionaalseid glutamaadiretseptoreid, mis kuuluvad AMPA/kainaadi alatüüpi, ka oligodendrotsüüdid. Pealegi on oligodendrotsüüdid väga tundlikud glutamaadi kasutamise suhtes (McDonald *et al.*, 1998).

Trauma on närvide kahjustus või vigastus. Selleks võib olla seljaajutrauma, mis on seljaajuvigastus, mis mõjustab kõikide närvide funktsiooni, mida kontrollitakse vigastuse tasandil ja sellest allpool, kaasa arvatud lihaste ja tundlikkuse kontroll, või peaaajutrauma nagu kinnisest peavigastusest põhjustatud trauma.

10 Ajuhüpoksia on hapnikuvaegus spetsiifiliselt aju poolkerades ja tavalisemalt kasutatakse seda terminit, viitamaks kogu aju hapnikuvaegusele. Sõltuvalt hüpoksia raskusastmest võivad sümptomid kõikuda segasusseisundist pöördumatu ajukahjustuse, kooma ja surmani.

Insulti põhjustab tavaliselt ajuisheemia. Seda nimetatakse ka peaju veresoonekonna haiguseks või sündmuseks. See on ajuhaiguste rühm, mis on seotud ajufunktsiooni kadumisega, mis esineb siis, kui verevarustus mis tahes ajuosas katkeb. Aju vajab ligikaudu 20% organismis tsirkuleerivast verest. Esmane verevarustus ajju toimub 2 kaelaarteri (unearterid) kaudu, mis hargnevad ajus paljudeks arteriteks, millest igaüks varustab kindlat ajupiirkonda. Isegi lühike verevoolu katkemine võib põhjustada ajufunktsiooni halvenemist (neuroloogiline defitsiit). Sümptomid kahjustatud ajupiirkonnas varieeruvad ja hõlmavad tavaliselt selliseid nagu nägemise muutused, kõnehäired, liikumishäired ja osas kehas tundlikkuse vähenemine, või muutused teadvuse tasemel. Kui verevool väheneb pikemaks ajaks kui mõni sekund, hävivad (infarkteeruvad) selles piirkonnas ajurakud, põhjustades selle ajupiirkonna püsivat kahjustust või isegi surma.

Insult kahjustab ligikaudu 4 inimest tuhandest. See on kolmandaks surma põhjuseks enamikes arenenud maades, kaasa arvatud USA. Insuldi esinemissagedus suureneb dramaatiliselt vanusega, risk kahekordistub iga kümne aastaga pärast 35 eluaastat. Ligikaudu 5% üle 65 aasta vanustest inimestest on olnud vähemalt üks insult. Haigus esineb meestel sagedamini kui naistel.

- Nagu mainitud eespool, hõlmab insult ajufunktsioonide kadumist (neuroloogiline defitsiit), mis on põhjustatud verevoolu puudumisest antud ajupiirkonda. Spetsiifilised neuroloogilised defitsiidid võivad varieeruda sõltuvalt kahjustuse asukohast ja ulatusest ning haiguse tekkimise põhjusest. Insulti võib põhjustada vähenenud verevool (isheemia), mis tuleneb verevarustuse puudulikkusest ja kudede surmast selles piirkonnas (infarkt).
- 5 Isheemiliste insultide põhjusteks on ajus moodustuvad verehüübed (trombid) ja verehüübed või aterosklerootiliste naastude tükid või muu materjal, mis liigub ajju teistest asukohtadest (embolid). Verejooks (hemorraagia) ajus võib põhjustada insuldile sarnanevaid sümptomeid.
- 10 Kõige tavalisemaks insuldi põhjuseks on ateroskleroosi põhjustatud insult (ajutromboos). Ateroskleroos ("arterite kõvastumus") on haigusseisund, mille korral arterite sisepinnal esinevad rasvladestused ja arenevad aterosklerootilised naastud (rasvladestustest ja vereliistakutest koosnev mass). Arterite oklusioon areneb aeglaselt. Mitte alati ei põhjusta aterosklerootilised naastud insulti. Erinevate ajuarterite vahel on palju väikesi ühendusi.
- 15 Kui verevool väheneb järkjärgult, suurenevad need väikesed ühendused ja moodustavad sulustunud piirkonnas lisavoolutee (kollateraalne vereringe). Kui esineb piisav kollateraalne vereringe, ei pruugi isegi täiesti blokeeritud arter põhjustada neuroloogilist defitsiiti. Teiseks aju kaitsemehhanismiks on see, et arterid laienevad piisavalt, nii et 75% veresoontest võivad olla okludeerunud ja ikkagi olla verevool sellesse ajupiirkonda piisav.
- 20 Trombootiline insult (tromboosist põhjustatud insult) esineb kõige tavalisemalt eakatel inimestel ja sageli on selle põhjuseks aterosklerootiline südamehaigus või suhkurtõbi. Sellist tüüpi insult võib esineda mis tahes ajal, kaasa arvatud puhkeajal. Inimene võib teadvuse kaotada või mitte.
- Embooliast (verehüübe liikumisest) põhjustatud insult on kõige tavalisemaks kardiogeense emboolia tagajärjeks, hüübed, mis tekivad südamehäirete tõttu, liiguvad edasi ajju.
- 25 Emboolia võib saada alguse ka teistes piirkondades, eriti seal, kus esinevad aterosklerootilised naastud. Embolid liiguvad verevooluga edasi ja hakkavad kleepuma väikestesse arteritesse ajus. Selline insult tekib äkki kohese maksimaalse neuroloogilise defitsiidiga. See ei ole seotud inimese aktiivsuse tasemega ja võib esineda igal ajal. Selle
- 30 häire puhul täheldatakse tavaliselt südame arütmiaid ja see on sageli emboolia põhjuseks. Ajukahjustus on sageli raskem, kui ajutromboosi põhjustatud insuldi korral. Teadvus võib

kaduda või mitte. Võimalik tagajärg on halvem, kui veresooned on insuldirebendist ja verejooksust (hemorraagiline insult) kahjustatud.

5 Perifeerne neuropaatia on sündroom, mida iseloomustatakse tundlikkuse kadumise, lihasnõrkuse ja -atroofia, alanenud sügavakõõluste reflekside ja vasolomotorsete sümptomitega, mis esinevad üksi või mis tahes kombinatsioonides.

Haigus võib kahjustada üksikut närvi (mononeuropaatia), kahte või enamat närvi erinevates piirkondades (hulgipaikmeline mononeuropaatia) või paljusid närve samaaegselt (polüneuropaatia). Kõigepealt võib kahjustada akson (nt suhkurtõve, Lyme tõve või ureemia korral või toksiliste ainetega) või müeliintupp või Schwanni rakud (nt ägeda või 10 kroonilise põletikulise polüneuropaatia, leukodüstroofiate või Guillain'-Barré sündroomi korral). Väikeste müeliniseerimata ja müeliniseeritud kiudude kahjustus põhjustab eeskätt temperatuuri- ja valutundlikkuse kadumist, suurte müeliniseeritud kiudude kahjustus põhjustab motoorseid või sügavtundlikkuse defekte. Mõned neuropaatiad (nt pliimürgistusest, dapsooni kasutamisest, puugihammustusest või Guillain'-Barré 15 sündroomist põhjustatud) kahjustab eeskätt motoorseid kiude, teised (nt vähist tingitud närvijuure ganglioniidist, leeprast, AIDS-st, suhkurtõvest või kroonilisest püridoksiinimürgistusest põhjustatud) kahjustab eeskätt närvijuureganglione või sensoorseid kiude, tekitades sensoorseid sümptomeid. Arvatavasti on kaasatud ka kraniaalnärvid (nt Guillain'-Barré sündroomi, Lyme tõve, suhkurtõve ja difteeria korral). 20 Modaliteetide kindlaks tegemine kergendab põhjuse määramist.

Trauma on kõige tavalisemaks üksiku närvi paikse kahjustuse põhjuseks. Lihaste liigne aktiivsus või liigese tugev ülepingutus võib põhjustada paikset neuropaatiat, nagu ka korduvad väikesed traumad (nt väikestest tööriistadest kõvasti kinni hoidmine, liigne vibratsioon suruõhuvarast). Kompressiooni- või suletud paralüüs kahjustab tavaliselt 25 pindmisi närve (küünarluu-, kodarluu-, pindluunärv) luuväljetes (nt sügava une või anesteesia ajal kõhnadel või kahhektistel isikutel ja sageli alkohoolikutel) või kitsastes kanalites (nt randmekanali sündroom). Kompressiooniparalüüsi võivad põhjustada ka kasvajakasv, luu liigluustumine, lahased, kargud või pikaajaline krampis asend (nt aiatöö). Neuropaatiat võib põhjustada verejooks närvi ja külma või kiirituse mõju. 30 Mononeuropaatiat võib põhjustada otsene kasvaja invasioon.

Hulgipaikmeline mononeuropaatia on tavaliselt veresoonte kollageenhaiguse (nt sõlmjas polüarteriit, SLE, Sjögreni sündroom, RA), sarkoidoosi, metaboolsete haiguste (nt suhkurtõbi, amüloidoos) või nakkushaiguste (nt Lyme tõbi, HIV-nakkus) tagajärjeks. Mikroorganismid võivad põhjustada hulgipaikmelist mononeuropaatiat närvi otsese

5 invasiooniga (nt leepira).

Polüneuropaatiat, mis on tingitud ägedatest palavikuga haigustest, võib põhjustada toksiin (nt difteeria korral) või autoimmuunreaktsioon (nt Guillain'-Barré sündroomi korral), polüneuropaatia, mis mõnikord järgneb immuniseerimisele, on arvatavasti samuti autoimmuunne.

10 Toksilised ained põhjustavad tavaliselt polüneuropaatiat, kuid mõnikord ka mononeuropaatiat. Need ained hõlmavad emetiini, heksobarbitaali, barbitaali, klorobutanooli, sulfonüülamiide, fenütoiini, nitrofurantoiini, *Vinca* alkaloidide, raskmetalle, süsinikmonooksiidi, triortokresüülfosfaati, ortodinitrofenooli, paljusid lahusteid, teisi tööstuslikke mürke ja teatud AIDS-i ravimeid (nt zaltsitabiini, didanosini).

15 Polüneuropaatiat võivad põhjustada toitumisvaegused ja metaboolsed häired. Sageli on põhjuseks vitamiin B vaegus (nt alkoholismi, beriberi, pernitsioosse aneemia, isoniasiidi põhjustatud püridoksiinivaeguse, malabsorptsiooni sündroomi ja rasedusest tingitud liigse oksendamise korral). Polüneuropaatia esineb ka hüpotüreoidismi, porfüüria, sarkoidoosi, amüloidoosi ja ureemia korral. Suhkurtõbi võib põhjustada sensorimotoorset distaalset

20 neuropaatiat (kõige tavalisem), hulgipaikmelist mononeuropaatiat ja fokaalset mononeuropaatiat (nt kraniaalnärvide silmaliigutajanärvi või eemaldajanärvi oma).

Maliigsus võib põhjustada polüneuropaatiat monokloonse gammapaatia (hulgimüeloom, lümfoom), amüloidi invasiooni või toitumisvaeguse või paraneoplastilise sündroomi tõttu.

Spetsiifilised mononeuropaatiad: ühe ja mitme närvi mononeuropaatiad iseloomustatakse

25 valu, nõrkuse ja parapareesi kahjustatud närvi innervatsioonipiirkonnas. Hulgipaikmeline mononeuropaatia on asümmeetriline, närvid võivad olla hõlmatud kõik korraga või progresseeruvalt. Paljude närvide ulatuslik haaratus võib simuleerida polüneuropaatiat.

Küünarluunärvi halvatus on põhjustatud sageli närvitraumast küünarnuki küünarluunärvi vaos pideva toetumise tõttu küünarnukile või asümmeetrilisest luu kasvust pärast luumurdu

30 lapsepõlves (aeglaselt tekkiv küünarluunärvi halvatus). Küünarluunärv võib olla ka surutud

kubitaalkanalisse. Vääraistingud ja tundepuudulikkus esineb 5. ja 4. sõrme mediaalsel poolel, põidla lähendajalihas, 5. sõrme eemaldajalihas ja luudevahelised lihased on nõrgad ja atrofeerunud. Raske krooniline küünarluunärvi halvatus tekitab küniskäelist deformatsiooni. Kahjustuskoha võib kindlaks teha närvijuhtivuse uuringutes. Enne kirurgilist sekkumist tuleks püüda kasutada konservatiivset ravi.

Randmekanali sündroomi põhjustab keskpärase närvi kompressioon randmekanali peopesapoolses osas pindmise randme-ristsideme ja kätt painutavate küünarvarre lihaste pikisuunaliste kõõluste vahel. See võib olla ühepoolne või kahepoolne. Kompressioon põhjustab paresteesiat käe peopesapoolses kodarluus ning valu randmes ja peopesas, mõnikord esineb valu kompressioonikoha lähedal küünarvarres ja õlas. Valu võib olla tugevam öösel. Võib järgneda kolme esimese sõrme tundlikkuse puudulikkus peopesapoleel, lihased, mis kontrollivad põidla lähendamist ja vastupidi, võivad muutuda nõrgaks ja atrofeeruda. Seda sündroomi tuleks eristada C-6 närvijuure kompressioonist, mis on tingitud radikulopaatiast.

Pindluunärvi halvatust põhjustab sageli närvikompressioon pindluukaela lateraalse külje vastu. See esineb tavaliselt kõhetutel voodihaigetel patsientidel ja kõhnadel isikutel, kes tavaliselt ristavad jalgu. Esineb jalgade dorsifleksiooni ja eversiooni nõrkus (rippuvad jalad). Mõnikord esineb tundlikkuse puudulikkus sääre alaosa ja jala selgmise osa või 1. ja 2. põialuu vahelise osa anterolateraalset küljel. Kompressioonineuropaatiate ravi on tavaliselt konservatiivne (nt jalgade ristamise vältimine). Mittetäielikke neuropaatiad jälgitakse tavaliselt kliiniliselt ja need paranevad iseenesest. Kui taastumist ei esine võib olla näidustatud kirurgiline sekkumine.

Kodarluunärvi halvatus ("laupäevaõine halvatus") on põhjustatud närvikompressioonist õlavarreluu vastu, näiteks kui käsivars on libisenud üle tooli seljatoe mürgistuse või sügava une ajal. Sümptomid hõlmavad randme ja sõrmede sirutajalihaste nõrkust (rippuv ranne) ja mõnikord tundlikkuse kadumist käe 1. dorsaalse luudevahelise lihase selgmisel poolel. Ravi on tavaliselt samasugune kui pindluunärvi neuropaatia korral.

Polüneuropaatiad on suhteliselt sümmeetrilised, kahjustades sageli samaaegselt sensoorseid, motoorseid ja vasomotoorseid kiude. Need võivad kahjustada müeliintupe aksonisilindrit ja esineda kas ägeda (nt Guillain'-Barré sündroom) või kroonilise (nt neerupuudulikkus) vormina.

Metaboolsetest häiretest (nt suhkurtõbi) või neerupuudulikkusest põhjustatud polüneuropaatia areneb aeglaselt, sageli kuude või aastate jooksul. See algab sageli tundlikkuse häiretega alumistes jäsemetes, mis on sageli rohkem distaalselt kui proksimaalselt. Põhilisteks sümptomiteks on sageli perifeerne kihelus, tuimus, põletav valu või liigeste sügavtundlikkuse puudulikkus ning vibreeriv tunne. Valu tugevneb sageli öösel ja võib süveneda kahjustatud piirkonna puudutamisel või temperatuuri muutumisel. Rasketel juhtudel esinevad tundlikkuse kadumise objektiivsed nähud, tavaliselt "soki-  
5 kinda" kujulise neuropaatia. Achilleuse- ja teiste sügavkõõluste refleksid on vähenenud või puuduvad. Kui tundlikkuse kadu süveneb, võivad areneda valulikud haavandid sõrmedel või Charcoti liigesed. Tundlikkuse või sügavtundlikkuse puudulikkus võib põhjustada käimishäireid. Motoorikahäired tulenevad distaalsete lihaste nõrkusest ja atroofiast. Täiendavalt või selektiivselt võib olla kaasatud ka autonoomne närvisüsteem, mis põhjustab öist kõhulahtisust, kuse- ja roojapidamatust, impotentsust või posturaalset hüpotensiooni. Vasomotoorsed sümptomid varieeruvad. Nahk võib olla kahvatum ja  
10 kuivem kui tavaliselt, mõnikord tumedate plekkidega, võib esineda ülemäärast higistamist. Troofilised muutused (sile ja läikiv nahk, poorsed või lõhenenud küüned, osteoporoos) on tavalised raskete ja pikaajaliste juhtude korral.

Toitumisvaegusest põhjustatud polüneuropaatia on tavaline alkohoolikutel ja alatoitumusega isikutel. Primaarne aksonopaatia võib põhjustada järgnevat demüeliniseerumist ja aksoni hävimist kõige pikemates ja suuremates närvides. Kas  
20 põhjuseks on tiamiini- või muu vitamiini vaegus (nt püridoksiini, pantoteenhappe, foolhappe), ei ole selge. Püridoksiinivaegusest põhjustatud neuropaatia esineb tavaliselt vaid isikutel, kes võtavad tuberkuloosi tõttu isoniasiidid, väikelastel, kellel on pürisoksiinivaegus või -sõltuvus, võib esineda krampe. Distaalsete jäsemete kõhetumine ja  
25 sümmeetriline nõrkus on tavaliselt varjatud, kuid võib progresseeruda kiiresti, millega mõnikord kaasneb tundlikkuse kadumine, paresteesia ja valu. Valu, krampi tõmbumine, külmatunne, põletustunne ja tuimus sääremarjades ja jalgades võib puudutamisel tugevneda. Kui etioloogia on selgusetu, võib anda palju vitamiine, kuid need ei ole andnud kasu.

30 Harva ja eranditult alati algab sensoorne polüneuropaatia perifeerse valu ja paresteesiaga ning progresseerub tsentraalselt kõikide tundlikkuse liikide kadumiseni. See esineb kartsinoomi (eriti bronhogeense) kõrvaltoimena, pärast ülemäärast püridoksiini



manustamist ( $>0,5$  g/päevas) ja amüloidoosi, hüpötüroidismi, müeloomi ja ureemia korral. Püridoksiini põhjustatud neuropaatia kaob, kui püridoksiini enam ei manustata.

Pärilikud neuropaatiaid nimetatakse sensorimotoorseteks neuropaatiateks või sensoorseteks neuropaatiateks. Charcot-Marie-Toothi tõbi on kõige tavalisem pärilik sensorimotoorne neuropaatia. Vähem tavaline sensorimotoorne neuropaatia algab sünniga ja põhjustab suuremat invaliidsust. Harva esinevate sensorimotoorsete neuropaatiade korral on distaalse valu ja temperatuuritundlikkuse kadu tugevamalt väljendunud kui vibratsiooni- ja asenditundlikkuse kadu. Peamiseks probleemiks on jala kõntumine valu mittetundlikkuse tõttu, koos sagedaste infektsioonide ja osteomüeliidiga.

- 5
- 10 I ja II tüüpi pärilik motoorne ja sensoorne neuropaatia (Charcot-Marie-Toothi tõbi, pindluulihase atroofia) on suhteliselt tavaline, harilikult autosomaalne dominantne haigus, mida iseloomustab lihasnõrkus ja -atroofia, eeskätt pindluulihaste ja distaalsetes reielihastes. Patsientidel või nende perekonnaanamneesis võib esineda ka teisi degeneratiivseid haigusi (nt Friedreichi ataksia). I tüüpi neuropaatiaga patsientidel
- 15 esinevad lapsepõlve keskel rippuvad jalad ja aeglaselt progresseeruv distaalsete lihaste atroofia, mis põhjustab "toonekurejalgu". Sisemine lihaste kõhetumine kätes algab hiljem. Vibratsiooni-, valu- ja temperatuuritundlikkus vähenevad "soki-kinda" kujuliselt äravõtmisel. Sügavkõõluste refleksid puuduvad. Kõrge jalavõlv ja vasarvarbad võivad olla ainsateks tunnusteks vähem kahjustatud perekonnaliikmetel, kellel see haigus esineb.
- 20 Närvi erutusjuhtivuse kiirus on aeglane ja distaalsed latensiajad pikenenud. Esineb segmentaalne demüeliniseerumine ja remüeliniseerumine. Suurenenud perifeerseid närve võib palpeerida. Haigus progresseerub aeglaselt ja ei mõjuta elu kulgu. II tüüpi haigus areneb veelgi aeglasemalt, lihasnõrkus areneb tavaliselt hiljem elu jooksul. Patsientidel on suhteliselt normaalne närvi erutusjuhtivuse kiirus, kuid madal erutuspotentsiaalide
- 25 amplituud. Biopsiad näitavad Walleri degeneratsiooni.

- III tüüpi pärilik motoorne ja sensoorne neuropaatia (hüpertroofiline interstitsiaalne neuropaatia, Dejerine-Sottase sündroom), harva esinev autosomaalne retsessiivne haigus, algab lapsepõlves progresseeruva lihasnõrkuse ja tundlikkuse kadumise ning sügavkõõluste reflekside puudumisega. Esialgu meenutab see Charcot-Marie-Toothi tõbe,
- 30 kuid motoorne nõrkus progresseerub suurema kiirusega. Esinevad demüeliniseerumine ja remüeliniseerumine, mis põhjustavad perifeersete närvide suurenemist ning närvibiopsial on näha sibulakujulisi moodustisi.

Motoorse nõrkuse iseloomulik levimine, jalgade deformeerumine, perekonnaanamnees ja elektrofüsioloogilised ebanormaalsused kinnitavad diagnoosi. Geneetiline analüüs on kättesaadav, kuid mitte spetsiifiline ravi. Võib olla kasulik erialane nõustamine, valmistamiseks noori patsiente ette haiguse progresseerumiseks. Toestik aitab korrigeerida rippuvaid jalgu, jalgade stabiliseerimist võib aidata ortopeedilise kirurgiaga.

Neurodegeneratiivsed haigused hõlmavad muu hulgas Alzheimeri tõbe, Parkinsoni tõbe, Huntingtoni tõbe ja amüotroofilist lateraalskleroosi (ALS).

Alzheimeri tõbi on haigus, mis on seotud psüühiliste funktsioonide halvenemisega, mis on põhjustatud muutustest ajukoos. See hõlmab ajukoe kokkukuivamist, mis ei ole põhjustatud veresoonte häirest, primaarset degeneratiivset dementsust ja difuusset ajuatroofiat. Alzheimeri tõbe nimetatakse ka Alzheimeri tüüpi seniildementsuseks (*senile dementia Alzheimer's type*, SDAT). See on kõige tavalisem vanusega seotud intellektuaalsete võimete halvenemise põhjus. Esinemissagedus on ligikaudu 9 inimest 10 000-st. See haigus esineb naistel veidi sagedamini kui meestel ja esineb eeskätt eakatel inimestel.

Põhjus on teadmata. Neurokeemilised faktorid, mis võivad osaleda haiguse tekkimises, hõlmavad ainete, mida kasutatakse närvirakkude poolt närviimpulsside ülekandmiseks (neurotransmitterite), kaasa arvatud atsetüülkoliin, somatostatiin, substants P ja norepinefriin, puudumine. Keskkonnategurid hõlmavad alumiiniumi, mangaani ja teiste ainete mõju. Nakkuslikud faktorid hõlmavad prioonnakkusi (viirusesarnased organismid), mis kahjustavad aju ja seljaaju (KNS). Mõnedes perekondades (moodustavad 5-10% juhtudest) on haiguse arenemiseks pärilik eelsoodumus, kuid see ei järgi täpset (Mendeli) pärilikkuse seadusi. Diagnoosimine toimub tavaliselt teisi dementsuse põhjusi välistades.

Uurijad on leidnud, et perekondades, kus on paljudel liikmetel Alzheimeri tõbi, esineb eriline geenivariant, mille esinemine on kõikide selle haigusega inimeste puhul tavaline. Öeldakse, et geen, mis produtseerib apolipoproteiiniks E4 nimetatavat ainet, ei põhjusta seda haigust, selle esinemine lihtsalt suurendab võimalust, et haigus võib lõpuks areneda. On palju inimesi, kellel on E4 geen ja kellel kunagi ei arene Alzheimeri tõbe.

Algust iseloomustatakse mälu halvenemise, intellektuaalsete funktsioonide progresseeruva kadumisega. Kui haigus progresseerub, võivad esineda meeolelu muutused, muutused

kõnevõimes, muutused käimises ja teised muutused. Väheneb ajukoe suurus (atroofia), suurenevad vatsakesed (tühimikud ajus) ja ajukoosse tekivad ladestused.

Parkinsoni tõbi on peaajuhaigus, mida iseloomustatakse värisemise ja käimis-, liigutuste ja koordinatsiooniraskustega. Haigus on seotud ajuosa, mis kontrollib lihaste tööd, kahjustusega. Seda haigust nimetatakse ka värihalvatuseks või vappelhalvatuseks.

Haigus esineb ligikaudu 2 inimesel 1000-st ja areneb kõige sagedamini pärast 50. eluaastat. See esineb nii meestel kui ka naistel ja on üheks kõige tavalisemaks neuroloogiliseks haiguseks eakatel. Termin "parkinsonism" viitab mis tahes haigusseisundile, mis hõlmab mis tahes kombinatsiooni liikumise muutuste tüüpidest, mis esinevad Parkinsoni tõve puhul, mis juhtub olema kõige tavalisemaks selle rühma sümptomite põhjustajaks. Parkinsonismi võivad põhjustada teised haigused või välistegurid (sekundaarne parkinsonism).

Parkinsoni tõbe põhjustab närvirakkude progresseeruv kahjustus ajuosades, mis kontrollivad lihaste tööd (basaalganglionid ja ekstrapüramidaalsüsteem). Selles piirkonnas produtseeritakse tavaliselt dopamiini, mis on üheks ainetest, mida rakud kasutavad impulsside ülekandmiseks (transmitterid). Selle ajupiirkonna kahjustamine vähendab organismi poolt saadavat dopamiini kogust. Dopamiinivaegus häirib tasakaalu dopamiini ja teiste transmitterite nagu atsetüülkoliin vahel. Dopamiinita ei saa närvirakud edastada õigesti informatsiooni ja see põhjustab lihaste funktsiooni kadumise. Täpne põhjus, miks ajurakke kahjustatakse, ei ole teada. Haigus võib kahjustada keha üht või mõlemat poolt funktsioonide kadumisega erineval määral.

Peale kontrolli kadumise lihaste üle muutuvad mõned Parkinsoni tõvega haiged raskelt depressiivseteks. Kuigi psüühiliste võimete varajane kadumine on haruldane, võib raske parkinsonismiga isikul esineda üleüldine psüühiline kahjustus (kaasa arvatud dementsus, hallutsinatsioonid jne). Dementsus võib olla ka mõnede haiguse raviks kasutatavate ravimite kõrvaltoimeks.

Huntingtoni tõbi on pärilik autosomaalne dominantne neuroloogiline haigus. See on haruldane, esinedes ligikaudu 1 inimesel 10 000-st (Breighton and Hayden, 1981). Haigus ei avaldu tavaliselt kliiniliselt kuni 50. eluaastani ja põhjustab psühhiaatrilisi häireid,

tahtmatut liikumishäiret ja kognitsiooni halvenemist, mis progresseerub halastamatult kuni surmani – tavaliselt 17 aastat peale algust.

5 Geeni, mis vastutab Huntingtoni tõve eest, nimetatakse huntingtiniks. See paikneb kromosoomil 4p, kujutades endast efektiivset vahendit prekliinilises ja antenataalses diagnoosimises. Geneetiline ebanormaalsus hõlmab tandemina korduvate CAG nukleotiidjärjestuste ülisuurt arvu.

10 CAG korduste arvu suurenemine Huntingtoni tõvega isikutel näitab kõrgelt olulist korrelatsiooni kliiniliste sümptomite alguse ja vanuse vahel. See seos on eriti silmatorkav juveniilse algusega Huntingtoni tõvega isikutel, kellel on väga oluline suurenemine, tavaliselt üle 50 korduse. CAG korduse pikkus Huntingtoni tõvega perekondades omab samuti mõningast ebastabiilsust, see on eriti märkimisväärne juhul, kui laps pärib huntingtini geeni kahjustatud isalt.

15 Huntingtoni tõve korral ei ole teada, kuidas see ulatuslikult ekspresseeruv geen põhjustab selektiivset närvirakkude surma. Peale selle ei kinnitanud järjestuse analüüs selget homoloogiat teiste tuntud geenidega ja ei identifitseeritud struktuurseid motiive või funktsionaalseid domeene, mis annaks selge ettekujutuse selle funktsioonist. Täpsemalt, küsimus, kuidas need laialdaselt ekspresseeruvad geenid põhjustavad selektiivset närvirakkude surma, jääb vastamata.

20 Amüotroofiline lateraalskleroos (ALS) on haigus, mis põhjustab progresseeruvat neuronaalse kontrolli kadumist tahtlikke liigutusi sooritavate lihaste üle närvirakkude hävimise tõttu pea- ja seljaajus. Amüotroofiline lateraalskleroos, mida nimetatakse ka Lou Gehrigi tõveks, on haigus, mis on seotud lihaste kasutamise üle kontrolli kadumisega. Neid närve kontrollivad lihaseid kuivavad kokku ja kaovad, põhjustades ka lihaskoe atrofeerumist närvistimulatsiooni puudumise tõttu. Lihaste tugevus ja koordineerimine  
25 halveneb alates tahtlikke liigutusi sooritavate lihastega (need, mis alluvad tahtele, nagu käte ja jalgade lihased). Kontrolli kadumine lihaste üle progresseerub püsivalt ja haarab üha rohkem lihastegruppe. Võib kaduda ka närvistimulatsioon mittetäielikult tahtele alluvates lihastes, nagu hingamist ja neelamist reguleerivad lihased. Toimet ei ole mõtlemisvõimele või järeltunde tegemisele. Põhjus on tundmata.

ALS esineb ligikaudu 1 inimesel 100 000-st. See näib mõningatel juhtudel esinevat perekonniti. Haigus esineb rohkem meestel kui naistel. Sümptomid ei arene tavaliselt kuni täiseani, sageli kuni 50. eluaastani.

5 Traumaatiline närvivigastus võib hõlmata KNS või PNS. Traumaatiline peajuuvigastus (*traumatic brain injury*, TBI), mida nimetatakse lihtsalt ka peavigastuseks või kinniseks peavigastuseks (*closed head injury*, CHI), viitab vigastusele, kus esineb ajukahjustus väljaspoolt vere voolamise tõttu pähe. See juhtub enamasti auto- või jalgrattaõnnetuse tõttu, kuid võib esineda ka uppumisele lähedal olijal, südameataki, insuldi ja nakkuste korral. Sellist tüüpi traumaatiline ajukahjustus võib tavaliselt olla tingitud hapniku 10 puudusest või aju puudulikkusest verevarustusest ning seetõttu võib seda nimetada ka “anoksiliseks kahjustuseks”.

Ajuvigastus või kinnine peavigastus esineb siis, kui saadakse löök pähe, nagu mootorsõiduki õnnetuse või kukkumise korral. Sellisel juhul saab kolju hoobi liikumatult objektilt ja kolju sees asuv aju pöörleb ja keerleb ümber oma telje (ajutüvi), põhjustades 15 paikseid või ulatuslikult levivaid kahjustusi. Samuti võib aju, pehme mass, mida ümbritseb vedelik, mis võimaldab sellel “hõljuda”, pörgata vastu koljut, põhjustades veelgi kahjustusi.

Vahetult pärast traumat võib esineda teadvusekao periood, mis võib kesta minuteid, nädalaid või kuid. Aju keerlemise ja pörkumise tõttu tekib traumaatilise ajuvigastusega 20 patsiendil tavaliselt vigastusi või muljumisi paljudes ajuosades. Seda nimetatakse difuusseks ajuvigastuseks või “mittelaskevigastuseks”. Ajukahjustuse tüübid, mis esinevad mittelaskevigastuste puhul, võib jagada kas primaarseteks või sekundaarseteks.

Primaarne ajukahjustus esineb vigastuse ajal, peamiselt löögikohas, eriti kui esineb koljumurd. Tugevate pörutustega võib kaasned aju sisene verejooks või ajukoore 25 rebenemine. Difuussed aksonikahjustused esinevad neuronijätkete nihke- ja tõmbedeformatsioonide tõttu, mis on põhjustatud aju pöörlevast liikumisest kolju sees. Võib esineda väikesi verejookse või aksonite difuusset kahjustust, mida saab tuvastada ainult mikroskoopiliselt.

Sekundaarne ajukahjustus esineb pärast vigastusmomenti tekkivate tüsistuste tõttu. Need hõlmavad koljusisest verejooksu, ajuväliste arterite traumaatilist vigastust, koljusiseste songade teket, hüpoksilist ajukahjustust või meningiiti.

5 Lahtine peavigastus on nähtav rünnak pähe ja see võib olla põhjustatud tulistamishaavast, liiklusõnnetusest või esemest, mis on läinud läbi kolju ajusse (aju laskevigastus). Seda tüüpi peavigastus kahjustab palju tõenäolisemalt aju konkreetseid piirkondi.

10 Niinimetatud kerge ajuvigastus võib esineda ilma teadvuse kaota ja võib olla ainult uimasustunde või segasusseisundiga, mis kestab lühikest aega. Kuigi antav meditsiiniline abi võib olla minimaalne, võivad ilma koomata ajuvigastusega inimestel esineda sümptomid ja kahjustused, mis on sarnased nendele, mis esinevad koomaga vigastusest ellujäänutel.

15 Vastuseks traumale esinevad ajus muutused, mis vajavad edasiste kahjustuste vältimiseks jälgimist. Aju suurus suureneb sageli pärast rasket peavigastust. Seda nimetatakse ajupaistetuseks ja see esineb kui ajju tunginud vere kogus suureneb. Hiljem võib haiguse ajal koguneda ajju vedelik, mida nimetatakse ajuturseks. Nii paistetuse kui ka turse põhjustavad üleliigset rõhku ajus, mida nimetatakse koljusiseseks rõhuks (*intracranial pressure*, ICP).

20 Seljaajuvigastused loetakse parapleegia ja tetrapleegia tõttu enamasti haiglaravi vajavateks. Üle 80% juhtudest on liiklusõnnetuste tulemused. Kliiniliselt tunnistatakse kahte peamist vigastuste rühma: lahtised vigastused ja kinnised vigastused.

25 Lahtisi vigastusi põhjustab seljaaju ja närvijuurte otsene trauma. Perforeerivad vigastused võivad põhjustada ulatuslikke rebendeid ja verejookse. Enamik seljaajuvigastusi loetakse kinnisteks vigastusteks ja nendega kaasneb tavaliselt lülisambamurd/nihestus, mida tavaliselt tõestatakse radioloogiliselt. Seljaajukahjustus sõltub luuvigastuste ulatusest ja seda võib jagada kahte põhirühma: primaarne kahjustus, milleks on põrutus, närvikiudude katkemine ja hemorraagiline nekroos, ning sekundaarne kahjustus, milleks on ekstraduraalsed hematoomid, infarkt, nakkus ja turse.

Viimased seljaajukahjustuse nähud hõlmavad: vigastatud närvikiudude üles- ja allapoole suunduvat anterograadset degeneratsiooni, posttraumaatilist seljaajuõõsistumust ja

parapleegia süsteemseid nähte, nagu kuseteede ja rindkere nakkused, rõhuhaavandid ja lihaste kõhetumine.

Neuroloogilised haigused võivad olla põhjustatud veel kaasasündinud metaboolsetest häiretest. Paljusid närvikiude katvad müeliintuped koosnevad lipoproteiinikihist, mis moodustub varajases eluetapis. Müeliin, mis moodustatakse oligodendroglia poolt KNS, erineb keemiliselt ja immunoloogiliselt sellest, mis moodustatakse Schwanni rakkude poolt perifeerselt, kuid mõlemal tüübil on sama funktsioon: soodustada närviimpulsside edastamist mööda aksonit.

Paljud kaasasündinud metaboolsed häired (nt fenüülketonuuria ja teised aminoatsiduurid, Tay-Sachsi, Niemann-Picki ja Gaucheri tõbi, Hurleri sündroom, Krabbe tõbi ja teised leukodüstroofiad) kahjustavad müeliintupe arenemist, peamiselt KNS-s. Kui bioloogilist defekti ei saa korrigeerida või kompenseerida, põhjustab see püsivat laiaulatuslikku neuroloogilist defitsiiti.

Krabbe tõbi või globoidrakkude leukodüstroofia on näiteks haigus, mis on seotud perifeerse ja kesknärvisüsteemi valgeainega. Mutatsioonid lüsoosomaalse ensüümi galaktotserebrosidaasi (GALC) geenis põhjustavad ensüümi madalat aktiivsust ja alanenud võimet lõhustada galaktolipiide, mis leiduvad peamiselt ainult müeliinis. Jätkuv müeliniseerimine ja/või remüeliniseerumine patsientidel nõuab funktsionaalseid endogeenseid oligodendrotsüüte või normaalsete oligodendrotsüütide või tüvirakkude, mis on võimelised diferentseeruma oligodendrotsüütideks, transplanteerimist, tagamaks piisav GALC-i ekspressioon (Wenger *et al.*, 2000).

Neurofibromatoos 1 (NF1) on tavaline autosomaalne haigus suure hulga neuroloogiliste sümptomitega.

Hulgisüsteemne atroofia (*multiple system atrophy*, MSA) on sporaadiline täiseas algav tundmatu etioloogiaga neurodegeneratiivne haigus. Haigusseisund võib olla haruldane neurodegeneratiivsete haiguse seas prominentse, kui mitte primaarse, osa tõttu, mida mängivad protsessi patogeneesis oligodendrogliaarakud. Peamiseks erinevuseks Parkinsoni tõvest on see, et MSA patsiendid ei reageeri *L*-dopa ravile.

Demüeliniseerumine hilisemal eluetapil on paljude neuroloogiliste haiguste tunnuseks, see võib tuleneda närvide või müeliinikahjustusest paikse vigastuse tõttu, isheemiast,

toksilistest ainetest või metaboolsetest häiretest. Ka on andmeid, et demüeliniseerumist võib soodustada skisofreenia. Ulatuslikule müeliinikaole järgneb tavaliselt aksonite degeneratsioon ja sageli rakukehade degeneratsioon, mis mõlemad võivad olla pöördumatud protsessid. Kuid paljudel juhtudel esineb remüeliniseerumine ja reparatsioon, regeneratsioon ning närvifunktsiooni täielik taastumine võib olla kiire. Tsentraalne demüeliniseerumine (st seljaaju, aju või nägemisnärv) on peamine leid primaarsete demüeliniseerivate haiguste puhul, mille etioloogiat ei tunta. Kõige enam tuntud on MS.

Ägedat dissemineeritud entsefalomüeliiti, nakkusejärgset entsefalomüeliiti iseloomustatakse perivaskulaarse KNS demüeliniseerumisega, mis võib esineda spontaanselt, kuid tavaliselt järgneb viirusnakkustele või viirusevastasele vaktsineerimisele (väga harva bakterivastasele vaktsineerimisele), mis näitab selle immunoloogilist olemust. Ägedad põletikulised perifeersed neuropaatiad, mis järgnevad viirusevastasele vaktsineerimisele või Guillain'-Barré sündroomile, on sarnased demüeliniseerivad haigused samasuguse oletatava immunopatogeneesiga, kuid need kahjustavad ainult perifeerseid struktuure.

Metakromaatiline leukodüstroofia on teiseks demüeliniseerivaks haiguseks. Adrenoleukodüstroofia ja adrenomüeloneuropaatia on harva esinevad X-liitelised retsessiivsed metaboolsed häired, mida iseloomustatakse neerupealise düsfunktsiooni ja närvisüsteemi laiaulatusliku demüeliniseerumisega. Adrenoleukodüstroofia esineb noortel poisitel, adenomüeloneuropaatia noorukitel. Võib esineda psüühiline mandumine, spastilisus ja pimedus. Adrenoleukodüstroofia lõpeb alati surmaga. Dieet- ja immunomoduloorset ravi uuritakse.

Leberi pärilikku nägemisnärv atroofiat ja sellega sarnast mitokondriaalhaigust iseloomustatakse eeskätt tsentraalse nägemise mõlemapoolse kadumisega, mis tavaliselt esineb noortel meestel hilises teismeliseas või varastes kahekümnendates. Leberi pärilik nägemisnärv atroofia võib meenutada nägemisnärv neuriti MS korral. On kindlaks tehtud mutatsioonid emalt päritud mitokondriaalses DNA-s.

HTLV-ga seotud müelopaatiat, aeglaselt progresseeruvat seljaajuhaigust, mis on seotud inimese T-raku lümfotroopse viirusnakkusega, iseloomustatakse mõlema jala spastilise nõrkusega.



Järgmised neuroloogilised haigused hõlmavad ebanormaalsest müeliniseerimisest põhjustatud neuropaatiad, milledest ülevaade antakse allpool.

Immuunsüsteemist tulenevad neuropaatiad: äge: Guillain'-Barré sündroom, kroonilised: krooniline immuunne demüeliniseeriv polüneuropaatia (CIDP), multifokaalne CIDP, 5 multifokaalne motoorne neuropaatia (MMN), anti-MAG sündroom, GALOP sündroom, sulfatiidivastase antikeha sündroom (seerumi M-valguga), GM2-vastase antikeha sündroom, POEMS sündroom (polüneuropaatia, organomegalia, endokrinopaatia või turse, M-valk, nahamuutused), perineuriit, IgM GD1b-vastase antikeha sündroom (aegajalt esinev).

10 Toksiinidest, nagu difteeria, türnpuu, heksaklorofeen, naatriumtsüanaat, telluur põhjustatud neuropaatiad.

Ravimitest, peamiselt demüeliniseerivad, nagu klorokviin, FK506 (takroliimus), perheksiliin, prokaiinamiid, zimeldiin, segatüüpi demüeliniseerivad ja aksonaalsed, nagu amiodaroon, eosinofiilia-müalgia sündroom, kuld, Suramin, Taxol, põhjustatud 15 neuropaatiad.

Pärilikest teguritest, nagu süsivesikute defitsiitne glükoproteiin, kataraktid ja näo düsmorfism, Cockayne sündroom, kaasasündinud hüpomüeliniseerumine, kaasasündinud lihastroofia: merosiinivaegus, Farberi tõbi (lipogranulomatoos), HMSN ja CMT, dominantsed: IA, IB, III, HNPP, EGR2, termosensitiivsus, retsessiivsed: III (Dejerine-Sottas), 4A, 4B, 4B2, 4C, 4D (LOM), 4E, 4F, HMSN-R, CNS, X-liitelised: IX, Krabbe 20 tõbi, Marinesco-Sjögreni sündroom, metakromaatilise leukodüstroofia, Niemann-Picki tõbi, Pelizaeus-Merzbacheri tõbi (PLP), Refsumi tõbi, prioonivalk (PrP27-30): Glu200Lys mutatsioon, Creutzfeld-Jakobi tõbi, hiiremudel: priooni üleekspressioon, Salla tõbi, SOX10, tenastiin-Xa, perifeersete müeliintüüpide ebaühtlane pakkimine, Ehlers-Danlosi 25 fenotüüp, põhjustatud neuropaatiad.

Metaboolsetest haigustest, nagu suhkurtõbi (tingitud kaasnevast CIDP-st), hüpotüreoidism, maksahaigused, põhjustatud neuropaatiad.

Mitokondriaalsetest haigustest, nagu MNGIE sündroom (müopaatia ja väline oftalmopleegia, neuropaatia, seedetrakti entsefalopaatia), NARP sündroom (neuropaatia, ataksia, pigmentoosne retiniit), põhjustatud neuropaatiad. 30

Nakkuste, nagu Creutzfeld-Jakobi tõi, difteeria, HIV, millega kaasneb CIDP, lepromatoosne lepra, segatüüpi aksonaalne-demüeliniseeriv neuropaatia, Creutzfeld-Jakobi tõve variant Schwanni rakkude kolonisatsioon, põhjustatud neuropaatiad.

Edasised üksikasjad võib võtta järgmiselt interneti aadressilt:

5 <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/nother/myelin.html>.

Hulgiskleroos (multiple sclerosis, MS) on kesknärvisüsteemi (KNS) põletikuline demüeliniseeriv haigus, millel on taastuv-remiteeruv või progresseeruv kulg. MS ei ole mitte ainus demüeliniseeriv haigus. Selle analoogiks perifeerses närvisüsteemis (PNS) on krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüradikuloneuropaatia (*chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*, CIDP). Peale selle esinevad PNS-s ägedad ühefaasilised haigused, nagu põletikuline demüeliniseeriv polüradikuloneuropaatia, mida nimetatakse Guillain'-Barré sündroomiks (GBS) ja KNS-s äge dissemineeritud entsefalomüeliit (*acute disseminated encephalomyelitis*, ADEM). Nii MS kui ka GBS on heterogeensed sündroomid. MS korral võivad eksogeensed tegurid koos geneetiliste teguritega anda sellise haiguse kulu, mis lõpuks vastab diagnostilistele kriteeriumidele. Mõlema haiguse korral võivad primaarsele demüeliniseerivale kahjustusele lisanduda aksoni kahjustused ja põhjustada püsivat neuroloogilist defitsiiti.

MS on eespool nimetatud demüeliniseerivatest haigustest kõige tavalisem. Seda iseloomustatakse kui autoimmuunhaigust, mille korral immuunsüsteemi leukotsüüdid ründavad kesknärvisüsteemi valgeainet. Hõlmatud võib olla ka hallaine. Kuigi MS täpset etioloogiat ei tunta, võivad seda soodustavad tegurid hõlmata geneetilisi tegureid, bakteriaalseid või viirusnakkusi. Oma klassikalise avaldumise järgi (85% kõikidest juhtudest) iseloomustatakse seda vahelduvate taastuvate-remiteeruvate neuroloogilise düsfunktsiooni episoodidele vastavate faasidega, mis kestavad mitu nädalat ja millel järgneb oluline või täielik paranemine (Noseworthy, 1999). Remissiooniperioodid muutuvad aja jooksul lühemaks. Seejärel siirduvad paljud patsiendid haiguse lõppfaasi, mida iseloomustatakse neuroloogiliste funktsioonide järkjärgulise kadumisega koos osalise paranemisega või ilma. Seda nimetatakse sekundaarseks progresseeruvaks MS-ks. Väike osa (~15% kõikidest MS patsientidest) kannatab haiguse algusest saadik järkjärgulise ja katkematu neuroloogilise funktsiooni halvenemise all (primaarne progresseeruv MS). Praegusel ajal ei ole MS kõige raskemate vormide, mis lõpevad tavaliselt surmaga, vastu head terapeutilist ravi.

MS põhiliseks tunnuseks on demüeliniseeritud naastud koos reaktiivsete gliiaarmide moodustistega, mida on näha aju ja seljaaju valgeaines. Demüeliniseerumine on seotud närviimpulsside ülekande funktsionaalse vähenemise või blokeerumisega. MS patsientidel täheldatakse ka aksonite katkemist ja surma (Bjartmar *et al.*, 1999). Patoloogilised uuringud näitavad, et ülekaalukalt on hõlmatud nägemisnärvid, periventrikulaarne valgeaine, ajutüvi ja seljaaju (Storch *et al.*, 1998). Need KNS defitsiidi toimed hõlmavad diploopia ägedaid sümptomeid, lihaskangust ja taaruvat kõnnakut, samuti kroonilisi sümptomeid, nagu spastiline paraparees ja kusepidamatus.

MS patogeneesi aluseks olevad molekulaarsed mehhanismid näivad pärinevat geneetilistest ja keskkonnateguritest, kaasa arvatud viirus- ja bakteriaalsed nakkused. Need mehhanismid soodustavad T-lümfotsüütide ja makrofaagide migratsiooni läbi hematoentsefaalbarjääri KNS koesse.

Demüeliniseerumist põhjustab müeliini ründamine aktiveeritud makrofaagide ja mikroglia poolt, samuti müeliniseerivate rakkude kahjustus, mis tuleneb Fas-ligandi signaaliülekandest ja komplemendi või antikeha vahendatud tsütotoksilisusest. Seetõttu tekib demüeliniseerumine nii otsese rünnaku tõttu müeliintubedele kui ka müeliini produtseerivate ja säilitavate rakkude elimineerimise tõttu.

Geneetilised ja keskkonnategurid põhjustavad põletikurakkude suurenenud sissevoolu läbi hematoentsefaalbarjääri. See põhjustab autoreaktiivsete T-lümfotsüütide ja makrofaagide suurenenud migratsiooni KNS koesse. Tsütokiini sekretsioon T-rakkude poolt aktiveerib antigeeni esitlevaid rakke (*antigen presenting cell*, APC). Kui autoreaktiivsed T-rakud MHC klass II molekulidena APC-del kohtuvad oletatava MS antigeeniga, sagedaste müeliintube valgukomponentidega, võivad need aktiveeruda. Seejärel võivad oligodendrotsüütide ja müeliini kahjustamises toimida mitmesugused järgmised mehhanismid. Komplemendi ja antikeha vahendatud tsütotoksilisus võib põhjustada mõnedel patsientidel suurema osa kahjustusest, samal ajal kui teistel võib Fas-ligandi signaaliülekande ja põletikueelsete tsütokiinide nagu TNF $\alpha$  vabastamine CD4<sup>+</sup> T-rakkude poolt rünnata valgeainet. Aktiveeritud makrofaagid võivad samuti mängida osa suurenenud fagotsütoosis ja faktori sekretsioonis. See põhjustab laiaulatuslikku demüeliniseerumist ja seejärel impulsi juhtivuse mööda KNS aksoneid efektiivsuse kadu. Seejärel võivad aga reparatsioonimehhanismid käivitada remüeliniseerimise kui põletikuprotsess on ükskord möödunud. MS patsientide aksonite remüeliniseerumist tuntakse patoloogiliselt ära

õhukeste tupede ilmumise ümber remüeliniseeritavate aksonite. Peale selle on leitud, et sageli sisenuvad naatriumkanalid demüeliniseeritud aksonimembraani, kompenseerides elektrijuhtivuse efektiivsuse kao. Oligodendroglia prekursorid võivad suurendada remüeliniseerimist MS kahjustuskohtades.

- 5 Oligodendrotsüüdid täidavad paljusid funktsioone, mis on seotud müeliintupede produtseerimise ja säilitamisega. See tagab paljudele närvirakkude aksonitele isolatsiooni, toe ja elektrijuhtivuse suurenemise. Üks oligodendrotsüüt võib müeliniseerida kuni 50 erinevat aksonit. Müeliniseerimine piirdub ainult teatud suure läbimõõduga aksonitega, dendriidid ja teised rakujätke nagu astrotsüütidel jäävad müeliniseerimata. Akson näib
- 10 omavat kontrolli paljude müeliniseerivate oligodendrotsüütide üle, kuna aksoni läbilõikamine roti nägemisnärvil mudelis inhibeerib müeliini uuenemist ja oligodendrotsüütide prekursorite produtseerimist (ülevaade Barres and Raff, 1999). Oligodendrotsüütide proliferatsiooni ja migratsiooni võib stimuleerida faktoritega, mis vabanevad aksonitest arenemise käigus. Sellisel viisil on hulk oligodendrotsüüte ja
- 15 aksoneid hoolikalt üksteisega kohandatud KNS-s.

Oligodendrotsüüdid, KNS perineuronaalsed tugirakud, müeliniseerivad aksoniteid ja suurendavad impulsi ülekannet. Need mängivad osa aksonite elumuses ja funktsioneerimises. Tuleb märkida, et nagu näidatud sellel graafikul, sirutavad oligodendrotsüüdid ainult ühe jätke igasse aksonisse selle müeliniseerimiseks.

- 20 Mitmekihiline müeliintupp on gliarakkude plasmamembraani spetsiaalne domeen, lipiidirikas ja madala valgusisaldusega. Selle ülesandeks on toetada aksonit ja parandada elektriliste signaalide juhtivuse efektiivsust KNS-s, takistades laengul äravoolata ümbritsevasse koesse. Ranvieri kiud on kohtadeks tupes piki aksonit, kus toimub impulsi hüppeline juhtivus.

- 25 Täiskasvanu ajus arenevad oligodendrotsüüdid siiani halvasti määratletud prekursorrakkudest pea- ja seljaaju subventrikulaarses tsoonis (Nait-Oumesmar *et al.*, 1999). Need prekursorid prolifereruvad ja ekspresseerivad müeliini transkripte ning valke, mis ilmuvad esimestena loote seljaaju ventraalses piirkonnas mitu nädalat enne müeliniseerimist (Hajihosseini *et al.*, 1996). Müeliniseerimisprotsess toimub postnataalses
- 30 ajus. Postnataalse arengu käigus migreeruvad need prekursorid müeliniseeritavate närvirakkudesse.

Oligodendrotsüüdid küpsevad oma prekursorrakkudest kindlaks määratud ja spetsiifilisel viisil (ülevaade nt Rogister *et al.*, 1999). Oligodendrotsüütide arenemine toimub kindla mudeli järgi, milles iga etapp on piiritletud mitmete rakuspetsiifiliste markeritega: endoteeli närvirakkude adhesioonimolekul (E-NCAM), vimetiin, A2B5, POU transkriptsioonifaktor Tst-1/Oct6/SCIP, preoligodendroblasti antigeen (POA), galaktotserebrosiid (GalC), O1, O4 ja müeliinispetsiifilised valgud PLP, MBP ja MOG. 5 Närvisüsteemi tüvirakud produtseerivad bipolaarseid pre-GD3<sup>+</sup> rakke, mis muutuvad O2A prekursoriteks. Need rakud võivad produtseerida kas oligodendrotsüüte või 2. tüüpi astrotsüüte. Progresseerumine jätkub preoligodendroglia ja pre-GalC etapis, enne kui 10 toimub tegelik diferentseerumine oligodendrotsüütideks. Oligodendrogliaast pärit rakkude arenemise lõppetapi määrab nende rakkude võimetus prolifereruda. Küpsed oligodendrotsüüdid ekspresseerivad lisaks müeliinispetsiifilistele valkudele rakuspetsiifilisi markereid GalC ja sulfatiid (SUL).

Niisiis diferentseeruvad oligodendrotsüüdid mitootiliselt aktiivsetest, migreerumis- 15 võimelistest prekursorrakkudest. Kui need rakud on muutunud juba postmitootilisteks, toimub nende transkriptsioon ja translatsiooni müeliinispetsiifilisi valke kodeerivate geenide poolt. Müeliintupe ettevalmistamine aksoni ümber keeramiseks toimub küpse oligodendrotsüüdi ja aksoni enda vahelise otsese kontakti kaudu. KNS aksoni tupega 20 ümbritsemine lõpeb müeliintupe tihenemisega, mis siis oma lõplikul kujul meenutab vedelkristalli, mis sisaldab makromolekule keerulises moodustises (Scherer, 1997). Müeliniseerimise soodustamine nõuab täpsete stõhhiomeetriliste suhete arvestamist müeliintupe individuaalsete struktuurvalkude vahel, kuna ühe komponendikoguse suurendamine või vähendamine võib põhjustada kogu tupestruktuuri häirumist.

Oligodendrotsüütide võimetus soodustada demüeliniseerunud aksonite reparatsiooni 25 põhjustab MS-le iseloomulikku kumulatiivset neuroloogilist düsfunktsiooni. Remüeliniseerumise soodustamine MS patsientidel kaitseks aksonite kao eest ja seega piiraks invaliidisuse, mis on seotud aksonite surmaga KNS-s, progresseerumist.

MS demüeliniseeruv fenotüüp viis ulatuslikele uuringutele aktiivse MS kahjustuse olemusest. Paljud aksonid ja müeliniseerivate oligodendrotsüütide puudumine viitas 30 normaalse müeliini lagunemisele ja kõrvalekalletele MS-ga kaasnevas remüeliniseerumisprotsessis. Näidati, et ligikaudu 40% MS kahjustuste korral täheldatakse nurjunud remüeliniseerumist, eriti haiguse varajases faasis (Prineas *et al.*, 1993). See on

tegelikult väga huvipakkuv, et müeliini reparatsiooni soodustamiseks arendatavad strateegiad takistaks närvisüsteemi püsivat kahjustust. Edu tõenäosus on eriti suur värskemate KNS kahjustuste korral, kus on näidatud juba toimuvat varast remüeliniseerumist. Kuid müeliniseeriv või remüeliniseeriv oligodendrotsüüt on äärmise metaboolse pinge all olev rakk, mis isegi väikese täiendava surve mõjul võib pöördumatult kahjustuda (Scolding and Lassmann, 1996). See vähendab aktiivse MS kahjustuse, kus põletik ja teised kahjulikud tegurid takistavad remüeliniseerimist, spontaanse reparatsiooni tõenäosust. Strateegiatele, mis soodustavad müeliini reparatsiooni, võivad seega lisada veel üht-teist, mis aitavad kaasa remüeliniseerimisele ja aksonite kaitsele aktiivsetes MS kahjustuskohtades.

On näidatud, et täiskasvanud inimese KNS sisaldab oligodendrotsüütide prekursorrakke, mis on võimelised prolifereeruma ja mis võivad küpseda müeliniseerivateks oligodendrotsüütideks. Peale selle näib, et endogeensed oligodendrotsüütide prekursorite populatsioonid, mis asuvad MS kahjustuskohtade lähedal, vähenevad haiguse krooniliste faaside ajal, mis on tingitud nende prekursorite proliferatsiooni- ja diferentseerumisvõime inhibeerimisest (Wolswijk, 1998). Sellised prekursorrakud on tavaliselt kroonilise MS kahjustuskohas puhkeolekus, mis takistab neil remüeliniseerimisele aktiivselt kaasa aidata. Seetõttu peaks krooniliste MS kahjustuste korral esinev olukord hõlmama faktoreid, mis raskendavad oligodendroglia regeneratsiooni või puuduvad antud olukorras faktorid, mis on vajalikud oligodendrotsüütide prekursorrakkude populatsiooni stimuleerimiseks (Wolswijk, 1998). See kontseptsioon viis hüpoteesini, et MS efektiivne ravi ei peaks piirduma põletiku mahasurumisega, vaid peaks soodustama ka remüeliniseerimist. Remüeliniseerivad rakud võiks pärineda mitmesugustest allikatest, kaasa arvatud eluvõimelised oligodendrotsüüdid, mis on kahjustuskoha suhtes natiivsed, nendest eluvõimelistest rakkudest pärit rakud või naabruses olevad prekursorrakud. On näidatud, et küpseid oligodendrotsüüte võib indutseerida mittediferentseeruma ja prolifereeruma faktoritega nagu aluseline fibroblasti kasvufaktor (bFGF), mis kinnitab oligodendroglia liini regeneratsioonimehhanismi demüeliniseeriva haiguse järgselt (Grinspan *et al.*, 1996; Grinspan *et al.*, 1993).

Täiendavad tõendid remüeliniseerimise soodsatest toimetest demüeliniseerivate haiguste korral nagu MS esitatakse uuringutes, mis on teostatud haiguse loomudelites gliia kasvufaktoritega ravimisel. Näidati, et gliia kasvufaktor 2 (neureguliin/GGF-2), KNS

kasvufaktor, mis teatakse soodustavat oligodendrotsüütide proliferatsiooni ja elumust, lükkas haiguse alguse edasi, vähendas kliinilist raskust ja vähendas taastumise sagedust MS-i EAE hiiremudelil (Marchionni *et al.*, 1999). Näidati, et neureguliinil on kasulik toime küpsete oligodendrotsüütide elumusele ja et neid produtseerivad aksonid (Fernández *et al.*, 2000).

5

On näidatud, et teised kasvufaktorid, mis hõlmavad vereliistakutest pärit kasvufaktorit (PDGF) ja IGF-1, soodustavad remüeliniseerimist ja omavad terapeutilist toimet EAE mudelites (ülevaade Dubois-Dalcq and Murray, 2000). Edu, mis saavutati remüeliniseerimise stimuleerimisega oligodendrotsüütide liini indutseerimisega prolifereruma ja/või diferentseeruma, näitas, et remüeliniseerimise perspektiivid on terapeutilise strateegiana MS korral kasulikud. Samuti oleks tähtis teha kindlaks molekulid, mis inhibeerivad müeliini sünteesi, kuna need võivad vähendada reparatsioonistrateegiate nagu oligodendrogliaarakkude transplantatsioon MS korral, efektiivsust.

10

Kahjustuste reparatsiooniks ja aksonite kaitsmiseks katkemisi ja surma eest võiks remüeliniseerimisprotsess töötada kooskõlas põletikuvastase rajaga.

15

Oligodendrotsüüte võib indutseerida remüeliniseerima aksoneid KNS-s, aidates seeläbi haigusseisundit leevendada. Remüeliniseerimise suurendamine võiks mõjuda vastupidiselt varasemale hävitamisele, mis toimus immuunsüsteemi rakkude invasiooniga KNS koesse ja nende rünnakuga müeliintupedele.

On teostatud hulk analüüse oligodendrotsüütide diferentseerumise ja hulgiskleroosi kahjustuste kohta, kus kasutatakse diferentsiaalse geeniekspressiooni (*differential gene expression*, DGE, Scarlato *et al.*, 2000; Whitney *et al.*, 1999) mikrokiipide visualiseerimist. Nendes on erinevate geenikomplektide määramiseks kasutatud oluliselt erinevaid kiiptehnoloogiaid. Geeniekspressiooni analüüs nii diferentseeruvates oligodendrotsüütides kui ka hulgiskleroosi kahjustuskohtades on näidanud olulisi muutusi müeliinispetsiifiliste geenide ekspressioonis. Peale selle on täpselt ära näidatud teised diferentsiaalselt reguleeritavad geenid, millest paljud teatakse olevat seotud selliste protsessidega nagu rakutsükli kontroll, tsütoskeleti reorganiseerimine ja transport läbi membraani (Scarlato *et al.*, 2000).

20

25

30

Osteopontiin (OPN) on kõrgelt fosforüülunud sialoproteiin, mis on luude ja hammaste mineraliseerunud ekstratsellulaarse maatriksi oluliseks komponendiks. OPN iseloomustatakse polüasparthappe järjestuse ja Ser/Thr fosforüülimiskohtade, mis vahendavad hüdroksüapatiidiga seondumist, ja kõrgelt konserveerunud RGD motiivi, mis vahendab rakkude kinnitumist/signaliseerimist, esinemisega. Osteopontiini ekspressioon mitmesugustes kudedes näitab selle mitmekesisid funktsioone, mis hõlmavad ühte või enamt nendest konserveerunud motiividest. Kuigi OPN *knockout* hiirte puhta fenotüübi puudumise tõttu ei ole tõestatud osteopontiini kindlat osa mis tahes koes, on viimased uuringud andnud mõningaid uusi ja intrigeerivaid vihjeid selle valgu mitmekülgsest erinevates bioloogilistes sündmustes, mis hõlmavad arenguprotsesse, haavade paranemist, immuunvastuseid, tuumorigeneesi, luu resorptsiooni ja kaltsifikatsiooni. Üheks osteopontiini paljudest funktsionaalsetest mitmekesisustest võib lugeda selle võimet stimuleerida raku aktiivsust paljude erinevate interaktiivsete signaaliülekanne radadega seotud retseptorite kaudu (Sodek *et al.*).

Samuti on näidatud, et osteopontiin ekspresseerub primaarsetes sensorsetes närvirakkudes roti spinaalses ja trigeminaalses närvisüsteemis nii närvirakukehades kui ka aksonites (Ichikawa *et al.*, 2000).

Osteopontiini mRNA-d ekspresseeritakse täiskasvanud ajus, nagu on näidatud *in situ* hübriidisatsiooniga. Ekspressiooni leiti haistmissibula ja ajutüve närvirakkudes ning hiljem leiti seda funktsionaalselt erinevates piirkondades, kaasa arvatud mootorikaga seotud piirkonnad, sensoorsed süsteemid ja retikulaarformatsioon (Shin *et al.*, 1999).

Teises uuringus uuriti osteopontiini mRNA ruumilist ja ajalist ekspressiooni pärast lühiajalist eesajuisheemiat rotil. OPN mRNA lühiajaline induktsioon pärast täielikku isheemiat esines striatumis varem kui hipokampuses. See oli väljendunud dorsomediaalses striatumis, mis asub külgmise vatsakese lähedal ja CA1 alaväljas ning hipokampuse subikulis enne kui mikrogliarakud muutusid reaktiivsemateks. Seda võis tuvastada ka hammastuumaväratis ja märkimisväärsel määral CA3 (Lee M. Y., Shin S. L., Choi Y. S., Kim E. J., Cha J. H., Chun M. H., Lee S. B., Kim S. Y., *Neurosci. Lett.*, 1999, Aug. 20, 271 (2), 81-4).

Osteopontiini nimetatakse ka Eta-1. Patenditaotluses WO 00/63241 käsitletakse meetodeid immuunvastuse moduleerimiseks, eriti meetodeid 1. tüüpi immuunvastuse



moduleerimiseks, kasutades Eta-1 (varajane T-lümfotsüütide aktivaator-1)/osteopontiini modulaatoreid. Öeldakse, et osteopontiini modulaatorid on kasulikud nakkuste, immuunhaiguste ja häirete, autoimmuunhaiguste, kaasa arvatud MS, mitmesugused immuunpuudulikkused, ja vähi raviks. Kõik patenditaotluses WO 00/63241 avaldatud osteopontiini modulaatorid, mis arvatakse olevat kasulikud autoimmuunhaiguste, kaasa arvatud MS korral, on osteopontiin/Eta-1 inhibiitorid, nagu selgitatakse üksikasjalikumalt patenditaotluse WO 00/63241 lõigus V "Clinical Applications of the Modulatory Methods of the Invention", lõigus D "Autoimmune Diseases", lk 51-53.

Interferoonid on tsütokiinide alarühm, millel on põletikuvastane, viirusevastane, ka proliferatsioonivastane toime. Biokeemiliste ja immunoloogiliste omaduste põhjal jagatakse looduslikult esinevad inimese interferoonid kolme rühma: interferoon-alfa (leukotsüüdi), interferoon-beeta (fibroblasti) ja interferoon-gamma (immuun-). Interferoon- $\alpha$  on praegusel ajal USA-s ja teistes maades heaks kiidetud karvrakk-leukeemia, genitaaltüügaste, Kaposi sarkoomi (vähk, mis esineb tavaliselt omandatud immuunpuudulikkuse sündroomi (AIDS) põdevatel patsientidel) ja kroonilise mitte-A-, mitte-B-hepatiidi raviks.

Peale selle on interferoonid (IFN-d) glükoproteiinid, mida organism produtseerib vastuseks viirusnakkusele. Need inhibeerivad viiruste paljunemist kaitstud rakkudes. Koosnedes väiksema molekulmassiga valgust on IFN-d oma toimete poolest märkimisväärselt mittespetsiifilised, st ühe viiruse poolt industeeritud IFN on efektiivne ka paljude teiste viiruste vastu. Siiski on need liigispetsiifilised, st ühe liigi poolt produtseeritud IFN stimuleerib viirusevastast toimet ainult sama või lähedalt seotud liikide rakkudes. IFN-d olid esimene tsütokiinide rühm, mida kasutati nende võimaliku kasvjavastase ja viirusevastase toime tõttu.

Kolme peamist IFN-i nimetatakse kui IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  ja IFN- $\gamma$ . Neid IFN-de põhitüüpe klassifitseeriti alguses vastavalt rakkudele, millest need pärit on (leukotsüüdid, fibroblastid või T-rakud). Kuid on selgunud, et üks rakk võib produtseerida erinevaid tüüpe. Seega nimetatakse leukotsüüdi IFN-i nüüd IFN- $\alpha$ , fibroblasti IFN on IFN- $\beta$  ja T-raku IFN on IFN- $\gamma$ . Leiti ka neljas IFN-i tüüp, lümfoblastoidne IFN, mida produtseerib Namalwa rakuliin (saadud Burkitti lümfoomist) ja mis näib produtseerivat leukotsüüdi ja fibroblasti IFN-de segu.

IFN aktiivsuse mõõduks on võetud interferooni ühik, mida määratletakse (mõnevõrra omavoliliselt) kogusena, mis on vajalik, kaitsmaks rakke viiruse kahjustuse eest 50% ulatuses.

5 Iga IFN-i rühm hõlmab mitmeid erinevaid tüüpe. IFN- $\beta$  ja IFN- $\gamma$  on mõlemad üksiku geeni produktid. Erinevus individuaalsete tüüpide vahel näivad olevat tingitud peamiselt varieerumisest glükosüülumises.

IFN- $\alpha$  on kõige erinevam rühm, mis hõlmab ligikaudu 15 tüüpi. Üheksandal kromosoomil on IFN- $\alpha$  geenide klaster, mis sisaldab vähemalt 23 liiget, millest 15 on aktiivsed ja transkribeeritud. Küps IFN- $\alpha$  ei ole glükosüülitud.

10 IFN- $\alpha$  ja IFN- $\beta$  on mõlemad ühe pikkusega (165 või 166 aminohapet) ja samasuguse bioloogilise toimega. IFN- $\gamma$  on 146 aminohappe pikkune ja see meenutab vähem  $\alpha$ - ja  $\beta$ -rühma. Ainult IFN- $\gamma$  võib aktiveerida makrofaage või indutseerida T-tappurrakkude küpsemist. Tegelikult võib neid terapeutiliste ainete uusi tüüpe nimetada bioloogilise vastuse modifitseerijateks (*biological response modifier*, BRM), sest need toimivad  
15 organismi vastusesse kasvajale, mõjustades äratundmist immunomodulatsiooni kaudu.

Viirusevastane toime on eriti inimese fibroblasti interferoonil (IFN- $\beta$ ) ja see võib samuti stimuleerida naturaalseid tappurrakke kasvajakude vastu. See on ligikaudu 20 000 Da polüpeptiid, mida indutseerivad viirused ja kaksikahelalised RNA-d. Fibroblasti interferooni geeni nukleotiidses järjestuses, mis on kloonitud DNA  
20 rekombinanttehnoloogiaga, tuletasid Derynk *et al.* (Derynk R. *et al.*, 1980) valgu täieliku aminohappejärjestuse. See on 166 aminohappe pikkune.

Shepard *et al.* (Shepard H. M. *et al.*, 1981) kirjeldasid mutatsiooni aluses 842 (Cys $\rightarrow$ Tyr asendis 141), mis kõrvaldas selle viirusevastase toime, ja nukleotiidide 1119-1121 deletsiooniga variantklooni.

25 Mark *et al.* (Mark D. F. *et al.*, 1984) sisestasid kunstliku mutatsiooni, asendades aluse 469 (T) A-ga, mis põhjustab aminohappe ümberlülitamist Cys $\rightarrow$ Ser asendis 17. Teatati, et saadud IFN- $\beta$  on sama aktiivne kui natiivne IFN- $\beta$  ja stabiilne pikaajalisel säilitamisel (-70 °C).

Rebif<sup>®</sup> (inimese rekombinantne interferoon- $\beta$ ) on viimane edusamm hulgiskleroosi (MS) interferoonravis ja on märkimisväärselt kasulik selle raviks. Rebif<sup>®</sup> on interferoon(IFN)-beeta-1a, mida produtseerivad imetaja rakuliinid ja mis on tegelikult identne inimese looduses esineva molekuliga.

- 5 Mehhanismid, millega IFN-d avaldavad oma toimeid, ei ole täielikult arusaadavad. Kuid enamikel juhtudel toimivad need, mõjustades teatud geenide induktsiooni või transkriptsiooni, mõjustades seeläbi immuunsüsteemi. *In vitro* uuringutes on näidatud, et IFN-d on võimelised indutseerima või supresseerima ligikaudu 20 geeniprodukti.

IFN- $\beta$  võib MS korral toimida kolme peamise raja kaudu:

- 10
- T-rakkude funktsioonide reguleerimine, nagu aktiveerimine, proliferatsioon ja rakkude funktsiooni supresseerimine,
  - tsütokiinide produktsiooni moduleerimine: põletikueelsete tsütokiinide produktsiooni mahareguleerimine ja inhibeerivate, põletikuvastaste tsütokiinide produktsiooni ülesreguleerimine,
- 15
- T-rakkude migratsiooni ja läbi HEB (hematoentsefaalbarjäär) KNS infintreerumise reguleerimine.

PRISMS uuringus on kindlaks tehtud interferoon-beeta-1a, manustatuna subkutaanselt kolm korda nädalas, efektiivsuse taastuva/remiteeruva hulgiskleroosi (*relapsing-remitting multiple sclerosis*, RR-MS) ravis. Selles uuringus näidati, et interferoonil-beeta-1a võib

20 olla positiivne toime MS pikaajalisele kulule, vähendades haiguse taastumiste arvu ja raskusastet ning vähendades haiguse koormust ja haiguse aktiivsust, määratuna MRI-ga. (Randomised, Double-blind, Placebo-Controlled Study of Interferon beta-1a in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis, The Lancet, 1998, 352 (7 November 1998), 1498-1504).

Mis tahes dokumendi tsiteerimine siin ei ole mõeldud tunnustamiseks, et selline dokument

25 on tehnika tasemele vastav või käsitletud materjal käesoleva patenditaotluse mis tahes nõudluspunkti patentsusele. Mis tahes dokumendi nii sisu kui ka kuupäeva mis tahes avaldamine põhineb taotlejatele patendi tegemise ajal kättesaadaval informatsioonil ja ei moodusta mööndust selle avaldamise korrektsuse suhtes.

## LEIUTISE OLEMUS

Käeoleva leiutise eesmärgiks on esitada uued vahendid neuroloogilise haiguse raviks ja/või vältimiseks.

5 Leiutis põhineb uurimistulemustel, et valk osteopontiin soodustab gliiarakkude proliferatsiooni ja diferentseerumist, soodustades seega müeliniseerumist ja närvide regeneratsiooni. Vastavalt käesolevale leiutisele on veel leitud, et osteopontiinil on kasulik toime hulgiskleroosi ja perifeersete neuropaatiate loomudelites.

10 Seetõttu käsitleb leiutis osteopontiini või osteopontiini toimega agonisti kasutamist neuroloogilise haiguse korral, nagu traumaatiline närvivigastus, insult, KNS või PNS demüeliniseerivad haigused, neuropaatiad ja neurodegeneratiivsed haigused.

Vastavalt leiutisele võib osteopontiini neuroloogiliste haiguste raviks ja/või vältimiseks kasutada ka kombinatsioonis interferooniga. Leiutise ulatusse kuulub ka osteopontiini sisaldavate nukleinhappe molekulide ja ekspressioonivektorite ning osteopontiini ekspresseerivate rakkude kasutamine neuroloogilise haiguse raviks ja/või vältimiseks.

15 Leiutis esitab veel ravimkoostised, mis sisaldavad osteopontiini ja interferooni, vajadusel koos ühe või enama farmatseutiliselt vastuvõetava ekstsipiendiga.

## JONISTE LOETELU

Joonisel fig 1A on kujutatud histogrammi, mis näitab osteopontiini ekspresioonitasemeid erinevatel aegadel pärast kuprisoonravi, määratuna TaqMan<sup>®</sup> analüüsiga. 3 ja 5 näd. kup. = 20 3 või 5 nädalat kuprisoonravi, 5 näd. kup. + 1, 3 või 6 näd. = viis nädalat kuprisoonravi ja pärast kuprisooni ärajätmist 1, 3 või 6 nädalat taastumist.

Joonisel fig 1B on kujutatud osteopontiini, MBP ja PLP mRNA regulatsioonikordade arv võrreldes kontrolli C1 tasemega, määratuna TaqMan<sup>®</sup> analüüsiga väikeaju arenemise erinevates staadiumides. C1 kuni C20 = postnataalne väikeaju päevadel 1-20, CA = 25 täiskasvanu väikeaju.

Joonisel fig 2 on kujutatud skemaatiliselt osteopontiini ja selle tuntud isovormide, samuti C- ja N-terminaalsete konstruktiivsete struktuur.

Joonisel fig 3 on kujutatud skemaatiliselt plasmiid Pac, mis sisaldab osteopontiini kodeerivat järjestust.

Joonisel fig 4 on kujutatud histogramm, mis selgitab osteopontiini mRNA ülesregulatsiooni kordade arv oligodendrotsüütide rakuliinis Oli-neu, mida töödeldi cAMP-ga 6 tundi (1), 2 päeva (2), 6 päeva (3) või 10 päeva (4) võrreldes kontrolliga. Tulbad 5 ja 6 kujutavad kuprisooni eksperimendis saadud osteopontiini mRNA tasemeid. (5): 3 nädalat kuprisoonravi, (6): 5 nädalat kuprisoonravi.

Joonisel fig 5 on kujutatud skemaatiliselt plasmiid pDEST 12.2, mis sisaldab osteopontiini kodeerivat järjestust.

10 Joonisel fig 6 on kujutatud skemaatiliselt plasmiid pDEST 12.2, mis sisaldab osteopontiini kodeerivat järjestust ja fluorestseeruvat markerit EGFP-d kodeerivat järjestust.

Joonisel fig 7 on kujutatud skemaatiliselt plasmiid pDEST 12.2, mis sisaldab His-märgisega osteopontiini kodeerivat järjestust.

Joonisel fig 8 on kujutatud Oli-neu rakkude proliferatsioon pärast insuliinita kasvatamist ja 24-tunnist töötlemist osteopontiiniga, mis on ekspresseeritud bakuloviiruses (BAC-OPN) või HEK-rakkudes (HEK-OPN). Väljundandmeks on elusaid rakke värviva värvi Alamari sinine fluorestsents.

Joonisel fig 9 on kujutatud insuliinita kasvatatud Oli-neu rakkude proliferatsiooni annusevastuse kõver, mis on saadud pärast 24-tunnist töötlemist osteopontiiniga, mis on ekspresseeritud bakuloviiruses (Baculo-OPN) või HEK-rakkudes (HEK-OPN).

Joonisel fig 10 on kujutatud Oli-neu rakkude proliferatsioon pärast insuliinita kasvatamist ja töötlemist kas täispikkuses bakuloviiruses ekspresseeritud osteopontiini (BacOPN) või osteopontiini N-terminaalse fragmendiga (N-terminaalne BacOPN).

Joonisel fig 11 on kujutatud MBP immunohistokeemia suurajukoore rakkude segakultuuris, mida töödeldi 100 nM bakuloviiruses ekspresseeritud rekombinantse osteopontiiniga. A = kontroll, B = OPN-ga töödeldud, C = B suurendus, D = teine väli OPN-ga töödeldud suurajukoore rakkude segakultuurist, kus ei ole näha aksoneid.

Joonisel fig 12 on kujutatud MBP-valgu suurenemine müeliniseerimisel suurajukoore rakkude segakultuur pärast LIF-i ja bakuloviiruses ekspresseeritud osteopontiiniga töötlemist, määratuna ELISA-ga.

5 Joonisel fig 13 on kujutatud CG4 rakkude proliferatsioon pärast töötlemist *in vitro* fosforüülitud *E. coli* ekspresseeritud osteopontiini (OPN-*E.coli*) või bakuloviiruses ekspresseeritud osteopontiini (OPN-Bac) erinevate annustega (10 pM, 10 nM, 100 nM).

10 Joonisel fig 14 on kujutatud perivaskulaarse põletiku infiltraadid, mis esinevad seljaajus EAE hiirtel, keda raviti subkutaanselt vehiikli (PBS), vehiikli + 0,1% BSA, 1, 10 või 100 µg/kg AS900011 (osteopontiin) või kombinatsiooniga AS900011 100 µg/kg ja hiire interferoon-beeta (mIFN-β) 20 000 ühikut hiire kohta või ainult mIFN-β-ga 20 000 ühikut hiire kohta.

15 Joonisel fig 15 on kujutatud protsentides demüeliniseeruv piirkond, mis esineb seljaajus EAE hiirtel, keda raviti subkutaanselt vehiikli (PBS), vehiikli + 0,1% BSA, 1, 10 või 100 µg/kg AS900011 (osteopontiin) või kombinatsiooniga AS900011 100 µg/kg ja hiire interferoon-beeta (mIFN-β) 20 000 ühikut hiire kohta või ainult mIFN-β-ga 20 000 ühikut hiire kohta.

20 Joonisel fig 16 on kujutatud kliinilised skoorid ravi lõpus, põletikulised infiltraadid ja demüeliniseerumine EAE hiirtel, keda raviti subkutaanselt vehiikli (PBS), vehiikli + 0,1% BSA, 1, 10 või 100 µg/kg AS900011 (osteopontiin) või kombinatsiooniga AS900011 100 µg/kg ja hiire interferoon-beeta (mIFN-β) 20 000 ühikut hiire kohta või ainult mIFN-β-ga 20 000 ühikut hiire kohta.

Joonisel fig 17 on kujutatud istmikunärvi aksotoomiaga tekitatud neuropaatiaga hiirte, keda raviti vehiikli, 1, 10 või 100 µg/kg osteopontiini (Ost), 10 µg/kg positiivse kontrolli ühendi (4-MC) või 100 µg/kg denatureeritud osteopontiiniga (Ost-D), kehamassid.

25 Joonisel fig 18 on kujutatud lihase liittegevuse amplituud neuropaatiaga hiirtel, keda raviti vehiikli, 1, 10 või 100 µg/kg osteopontiini (Ost), 10 µg/kg positiivse kontrolli ühendi (4-MC) või 100 µg/kg denatureeritud osteopontiiniga (Ost-D).

Joonisel fig 19 on kujutatud lihase liittegevuse latentsusaeg neuropaatiaga hiirtel, keda raviti vehiikli, 1, 10 või 100 µg/kg osteopontiini (Ost), 10 µg/kg positiivse kontrolli ühendi (4-MC) või 100 µg/kg denatureeritud osteopontiiniga (Ost-D).

Joonisel fig 20 on kujutatud lihase liittegevuse kestus neuropaatiaga hiirtel, keda raviti vehiikli, 1, 10 või 100 µg/kg osteopontiini (Ost), 10 µg/kg positiivse kontrolli ühendi (4-MC) või 100 µg/kg denatureeritud osteopontiiniga (Ost-D).

Joonisel fig 21 on kujutatud degenerereerunud kiudude arv protsentides neuropaatiaga hiirtel, keda raviti vehiikli, 1, 10 või 100 µg/kg osteopontiini (Ost), 10 µg/kg positiivse kontrolli ühendi (4-MC) või 100 µg/kg denatureeritud osteopontiiniga (Ost-D).

Joonisel fig 22 on kujutatud kiudude koguarv välja kohta neuropaatiaga hiirtel, keda raviti vehiikli, 1, 10 või 100 µg/kg osteopontiini (Ost), 10 µg/kg positiivse kontrolli ühendi (4-MC) või 100 µg/kg denatureeritud osteopontiiniga (Ost-D).

#### LEIUTISE ÜKSIKASJALIK KIRJELDUS

Käesolev leiutis põhineb uurimistulemustel, et osteopontiini ekspresseeritakse oligodendrotsüütide diferentseerumise ajal ja väikeaju arenemise käigus erinevalt. Veel on leitud, et osteopontiini cDNA ekspressioon oligodendrotsüütides viib nende rakkude diferentseeritud fenotüübini *in vitro*. Osteopontiini ekspressioonil avaldub oligodendrotsüütidel fenotüüp, mis on sarnane diferentseerivate, müeliniseerivate rakkude fenotüübile. Lisaks nendele *in vitro* uurimistulemustele on näidatud, et osteopontiinil ja eriti osteopontiini ning interferooni kombinatsioonil on kasulik toime hulgiskleroosi kehtivas mudelis. Perifeerse neuropaatia eksperimentaalses mudelis oli osteopontiinil märkimisväärne kasulik toime närvi aktiivsusele ja vähendas märkimisväärselt degeneratsiooni protsenti ning suurendas müeliniseerimise ulatust.

Seetõttu annavad siin esitatud eksperimentaalsed andmed uue võimaluse neuroloogiliste haiguste raviks, eriti nende, mis on seotud närvi- ja gliiarakkude funktsiooniga. Need uurimistulemused on eriti üllatavad, sest patenditaotluses WO 00/63241 soovitatakse hulgiskleroosi raviks osteopontiini inhibeerida.

Seetõttu käsitleb leiutis osteopontiini või osteopontiini toimega agonisti kasutamist ravimi valmistamiseks neuroloogiliste haiguste raviks ja/või vältimiseks.

Siin kasutatuna viitab termin "osteopontiin" inimese täispikale osteopontiinile, millel on aminohappejärjestus, mis on tuntud alates kaheksakümne date aastate lõpust (Oldberg *et al.*, 1986; Kiefer *et al.*, 1989). Siin tuuakse inimese osteopontiini järjestus kui SEQ ID nr 1 lisatud järjestuste loetelus. Siin kasutatuna viitab termin "osteopontiin" veel mis tahes  
5 osteopontiinile, mis on saadud loomadelt, nagu hiired, veised, või roti osteopontiinile, seni, kuni see on piisavalt identne säilitamiseks osteopontiini toimet, ja seni, kuni saadud molekul ei ole inimesele immunogeenne.

Siin kasutatuna viitab termin "osteopontiin" veel bioloogiliselt aktiivsetele muteiinidele ja fragmentidele nagu looduslikult esinevad osteopontiini isovormid. Osteopontiini  
10 ekspresseeritakse funktsionaalselt erinevates vormides, mis erinevad transkriptsiooni (alternatiivne splaising) ja posttranslatsiooniliste modifikatsioonide (fosforüülimine, glükosüülimine) taseme poolest. Siiani tuntakse kolme OPN splaissitud varianti, mida tähistatakse OPN-a (siin nimetatakse ka "täispikaks osteopontiiniks"), OPN-b ja OPN-c (SEQ ID nr 1, 2 ja 3 lisatud järjestuse loetelus, kujutatud ka joonisel fig 2). Isoforme  
15 kirjeldasid näiteks Kon *et al.* (2000) ja iseloomustasid näiteks Saitoh *et al.* (1995) ning Kon *et al.* (2002).

Trombiiniga lõhustamisel tekib kaks *in vivo* proteolüütilise lõhustamise fragmenti, mis sisaldavad valgu N- ja C-terminaalseid osi. Osteopontiini fosforüülimine, eriti valkude C-terminaalses osas, võib omada tähtsust osteopontiini funktsioonile. Seetõttu viitab termin  
20 "osteopontiin" siin kasutatuna ka neile proteolüütilise lõhustamise fragmentidele ja osteopontiini erinevalt fosforüülitud vormidele.

Siin kasutatuna viitab termin "osteopontiin" veel selle isovormidele, muteiinidele, sulandvalkudele, funktsionaalsetele derivaatidele, aktiivsetele fraktsioonidele või fragmentidele või rõngakujuliselt permuteeritud derivaatidele või nende sooladele. Neil  
25 isovormidel, muteiinidel, sulandvalkudel või funktsionaalsetel derivaatidel, aktiivsetel fraktsioonidel või fragmentidel või rõngakujuliselt permuteeritud derivaatidel säilib osteopontiini bioloogiline toime. Eelistatult on neil bioloogiline toime, mis on parem võrreldes metsiktüüpi osteopontiiniga.

Siin kasutatuna viitab termin "osteopontiini toimega agonist" molekulile, mis stimuleerib  
30 või jäljendab osteopontiini toimet, nagu osteopontiiniretseptorisse agonistlikult toimivad antikehad, või väikese molekulmassiga agonistid, mis aktiveerivad signaaliülekanne



osteopontiinireseptori kaudu. Osteopontiin vahendab oma funktsioone vähemalt kahe retseptorirühma kaudu. Esiteks interakteerub see  $\alpha$ v-integriinidega ( $\alpha$ v $\beta$ 3- ja  $\alpha$ v $\beta$ 5-integriinireseptoritega RGD(Arg-Gly-Asp) raku kinnitumismotiivi kaudu mangaani positiivse mõju toimetel, Kunicki *et al.*, 1997). Teiseks interakteerub see CD44 variandi isovormidega v6-v10. Arvatakse, et osteopontiini C-terminaalne osa on seotud interakteerumisega CD44-ga, samal ajal kui osteopontiini N-terminaalne osa arvatakse olevat seotud interakteerumisega integriinireseptoritega, makrofaagide proliferatsiooni, elumuse ja diferentseerumisega. Osteopontiini N-terminaalne osa indutseerib ka IL-12 ja IL-10 vabanemist. Siin kasutatuna hõlmab termin "OPN toimega agonist" mis tahes nende retseptorite agonisti, stimulaatorit või võimendajat.

Siin kasutatuna hõlmab termin "osteopontiini toimega agonist" veel ainetele, mis võimendavad osteopontiini vahendatud toimeid nagu rakkude ekstratsellulaarse maatriksi komponentidele kinnitumise soodustamine, oligodendrotsüütide liini rakkude morfogeneesi müeliini produtseerivateks rakkudeks soodustamine, oligodendrotsüütide liini rakkude (nagu progeniitorrakud või prekursorrakud) värbamise, proliferatsiooni, diferentseerumise või küpsemise soodustamine, oligodendrotsüütide liini rakkude apoptoosi ja rakukahjustuse eest kaitsmise soodustamine.

Siin kasutatuna tuleb terminitest "ravimine" ja "vältimine" aru saada kui neuroloogilise haiguse ühe või enama sümptomi, samuti neuroloogilise haigusega kaasnevate sümptomite, haiguste või tüsistuste vältimisest, inhibeerimisest, vähendamisest, leevendamisest või kõrvaldamisest. Kui "ravitakse" neuroloogilist haigust, manustatakse leiutise aineid pärast haiguse algust, "vältimine" viitab ainete manustamisele enne haigusnähtude ilmnemist patsiendil.

Siin kasutatuna hõlmab termin "neuroloogiline haigus" kõiki tuntud haigusi või häireid või KNS või PNS kahjustusi, kaasa arvatud need, mida üksikasjalikult on kirjeldatud osas "Tehnika tase".

Neuroloogilised haigused hõlmavad haigusi, mis on seotud KNS või PNS düsfunktsiooniga, nagu neurotransmissiooniga seotud haigused, peavalu, peatrauma, KNS nakkused, neuro-oftalmoloogilised ja kraniaalnärvidega seotud haigused, ajusagarate funktsiooni ja düsfunktsiooni häired, liikumishäired, stuupor ja kooma, demüeliniseerivad haigused, deliirium ja dementsus, kolju-kaela ühenduse ebanormaalsused,

krambiseisundid, seljaajuhaigused, unehäired, perifeerse närvisüsteemi haigused, peaaju veresoonekonna haigused või lihaste haigused. Nende haiguste määratlemiseks vaata näiteks <http://www.merck.com/pubs/mmanual/section14/sec14.htm>.

5 Eelistatult valitakse leiutise neuroloogilised haigused rühmast, kuhu kuuluvad traumaatiline närvivigastus, insult, KNS või PNS demüeliniseerivad haigused ja neurodegeneratiivsed haigused.

Traumaatiline närvivigastus võib hõlmata KNS või PNS, see võib olla peaaju- või seljaajutrauma, kaasa arvatud parapleegia, nagu on kirjeldatud eespool osas "Tehnika tase".

10 Insulti võib põhjustada ajuhüpeksia või -isheemia. Seda nimetatakse ka peaaju veresoonekonna haiguseks või sündmuseks. Insult võib olla seotud ajufunktsioonide kadumisega (neuroloogiline defitsiit), mis on põhjustatud verevoolu kadumisest ajupiirkondades. Verevoolu kadumine võib olla tingitud ka ajus moodustuvatest verehüüvetest (trombid) aterosklerootiliste naastude tükikestest või teisest materjalist, mis  
15 liigub ajju teistest kohtadest (embolid). Verejooks (hemorraagia) ajus võib põhjustada insuldile sarnanevaid sümptomeid. Kõige tavalisemaks insuldi põhjuseks on ateroskleroosile järgnev insult (ajutromboos) ja seetõttu käsitleb leiutis ka ateroskleroosi ravi.

Perifeerset neuropaatiat võib käsitleda sündroomina, mida iseloomustatakse tundlikkuse  
20 kadumise, lihasnõrkuse ja -atroofia, alanenud sügavakõõluste reflekside ja vasomotoorsete sümptomitega, mis esinevad üksi või mis tahes kombinatsioonides. Neuropaatia võib kahjustada üksikut närvi (mononeuropaatia), kahte või enamat närvi erinevates piirkondades (hulgipaikmeline mononeuropaatia) või paljusid närve samaaegselt (polüneuropaatia). Kõigepealt võib kahjustuda akson (nt suhkurtõve, Lyme tõve või  
25 ureemia korral või toksiliste ainetega) või müeliintupp või Schwanni rakud (nt ägeda või kroonilise põletikulise polüneuropaatia, leukodüstroofiate või Guillain'-Barré sündroomi korral). Järgmised neuropaatiad, mida võib ravida vastavalt leiutisele, võivad olla põhjustatud näiteks pliiimürgistusest, dapsooni kasutamisest, puugihammustusest, porfüüriast või Guillain'-Barré sündroomist ja need võivad kahjustada eeskätt motoorseid  
30 kiude. Teised, nagu need, mis on põhjustatud vähist tingitud närvijuure ganglioniidist, leeprast, AIDS-st, suhkurtõvest või kroonilisest püridoksiinimürgistusest, kahjustavad

eeskätt närvijuureganglione või sensoorseid kiude, tekitades sensoorseid sümptomeid. Ka kraniaalnärvid võivad olla kaasatud, näiteks Guillain''-Barré sündroomi, Lyme tõve, suhkurtõve ja difteeria korral.

5 Alzheimeri tõbi on haigus, mis on seotud psüühiliste funktsioonide halvenemisega, mis on põhjustatud muutustest ajukoes. See võib hõlmata ajukoe kokkukuivamist, primaarset degeneratiivset dementsust ja difuusset ajuatroofiat. Alzheimeri tõbe nimetatakse ka Alzheimeri tüüpi seniildementsuseks (SDAT).

10 Parkinsoni tõbi on peajuhaigus, mida iseloomustab värisemine ja käimis-, liikumis- ja koordinatsiooniraskused. Haigus on seotud lihaste tööd kontrolliva ajuosa kahjustusega, ja seda nimetatakse ka värihalvatuseks või vappelhalvatuseks.

Huntingtoni tõbi on pärilik autosomaalne dominantne neurloogiline haigus.

15 Amüotroofiline lateraalskleroos (ALS) on haigus, mis põhjustab progresseeruvat neuronaalse kontrolli kadumist tahtlikke liigutusi sooritavate lihaste üle närvirakkude hävimise tõttu pea- ja seljaajus. Amüotroofiline lateraalskleroos, mida nimetatakse ka Lou Gehrigi tõveks, on haigus, mis on seotud lihaste kasutamise üle kontrolli kadumisega.

20 Hulgiskleroos (MS) on kesknärvisüsteemi (KNS) põletikuline demüeliniseeriv haigus, millel on taastuv-remiteeruv või progresseeruv kulg. MS ei ole mitte ainus demüeliniseeriv haigus. Selle analoogiks perifeerses närvisüsteemis (PNS) on krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüradikuloneuropaatia (CIDP). Peale selle esinevad PNS-s ägedad ühefaasilised haigused, nagu põletikuline demüeliniseeriv polüradikuloneuropaatia, mida nimetatakse Guillain'-Barré sündroomiks (GBS) ja KNS-s äge dissemineeritud entsefalomüeliit (ADEM).

25 Teised neuroloogilised haigused hõlmavad ebanormaalse müeliniseerumisega neuropaatiad, nagu need, mis on loetletud eespool osas "Tehnika tase", samuti randmeluutunneli sündroomi. Traumaatilise närvivigastusega võivad kaasneda selgroo ortopeedilised tüsistused ja need kuuluvad samuti leiutise haiguste hulka.

Neuroloogilised haigused võivad olla põhjustatud veel kaasasündinud metaboolsetest häiretest. Leiutise eelistatud teostuses on neuroloogiline haigus seega põhjustatud kaasasündinud metaboolsest defitsiidist.

Leiutisega hõlmatavateks kaasasündinud metaboolseteks häireteks võivad olla näiteks fenüülketonuuria ja teised aminoatsiduuriad, Tay-Sachsi, Niemann-Picki ja Gaucheri tõbi, Hurleri sündroom, Krabbe tõbi ja teised leukodüstroofiad. Need võivad kahjustada arenevat müeliintuppe, peamiselt KNS-s.

- 5 Kaasasündinud metaboolsetest häiretest põhjustatud neuroloogilisi haigusi on samuti käsitletud üksikasjalikult osas "Tehnika tase".

Vähemtuntud neuroloogilised haigused, nagu neurofibromatoos või hulgisüsteemne atroofia (MSA) kuuluvad samuti käesoleva leiutise ulatusse. Teisi häireid, mida võib ravida vastavalt käesolevale leiutisele, on üksikasjalikumalt kirjeldatud eespool osas  
10 "Tehnika tase".

Järgmises eelistatud teostuses on neuroloogiliseks haiguseks perifeerne neuropaatia, enim eelistatult diabeetiline neuropaatia. Kemoterapiaga seotud neuropaatiad on samuti eelistatud vastavalt käesolevale leiutisele.

Termin "diabeetiline neuropaatia" viitab mis tahes diabeetilise neuropaatia vormile või  
15 ühele või enamale diabeetilise neuropaatiaga kaasnevale või selle poolt põhjustatud sümptomile või häirele või suhkurtõve tüsistustele, mis kahjustavad närve, nagu kirjeldatud üksikasjalikumalt eespool osas "Tehnika tase". Diabeetiliseks neuropaatiaks võib olla polüneuropaatia. Diabeetilise polüneuropaatia korral on samaaegselt kahjustatud paljud närvid. Diabeetiline neuropaatia võib olla ka mononeuropaatia. Koldelise mononeuropaatia  
20 korral kahjustab haigus näiteks ühte närvi, nagu silmaliigutajanärv või eemaldajanärv. See võib olla ka hulgipaikmeline mononeuropaatia, kui kahjustatud on kaks või enam närvi erinevates piirkondades.

Veel järgmises eelistatud teostuses on neuroloogiliseks haiguseks demüeliniseeriv haigus. Demüeliniseerivad haigused hõlmavad eelistatult KNS demüeliniseerivaid  
25 haigusseisundeid, nagu äge dissemineeritud entsefalomüeliit (ADEM) ja hulgiskleroos (MS), samuti perifeerse närvisüsteemi (PNS) demüeliniseerivaid haigusi. Viimased hõlmavad haigusi, nagu krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüradikuloneuropaatia (CIDP) ja ägedaid ühefaasilisi haigusi nagu põletikuline demüeliniseeriv polüradikuloneuropaatia, mida nimetatakse Guillain'-Barré sündroomiks (GBS).

Leiutise järgmine eelistatud teostus käsitleb neurodegeneratiivse haiguse ravi ja/või vältimist. Neurodegeneratiivne haigus valitakse rühmast, kuhu kuuluvad Alzheimeri tõbi, Parkinsoni tõbi, Huntingtoni tõbi ja ALS.

- Eelistatult valitakse osteopontiin peptiidi, polüpeptiidi või valgu hulgast, mis valitakse rühmast, kuhu kuuluvad:
- 5 (a) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1,
  - (b) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1 aminohappeid 1-168 või 170,
  - (c) polüpeptiid, mis sisaldab SED ID nr 1 aminohappeid 1-16 ja 170-314,
  - (d) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1 aminohappeid 170-314,
  - 10 (e) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 2,
  - (f) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 3,
  - (g) mis tahes punktile a-f vastav muteiin, mille aminohappejärjestus on vähemalt 40% või 50% või 60% või 70% või 80% või 90% identne vähemalt ühega järjestustest a-f,
  - (h) mis tahes punktile a-f vastav muteiin, mida kodeerib DNA järjestus, mis hübridiseerub natiivse DNA järjestuse, mis kodeerib mis tahes a-f mõõdukalt karmides tingimustes või 15 väga karmides tingimustes, komplemendiga,
  - (i) mis tahes punktile a-f vastav muteiin, milles mis tahes muudatused aminohappejärjestuses on konservatiivsed aminohapete asendused a-f aminohappejärjestustes,
  - 20 (j) mis tahes punktile a-f vastav isovorm, sulandvalk, funktsionaalne derivaat, aktiivne fraktsioon või rõngakujuliselt permuteeritud derivaat.

Aktiivsed fraktsioonid või fragmendid võivad sisaldada mis tahes osteopontiini isovormi mis tahes osa või domeeni, nagu N-terminaalne osa või C-terminaalne osa, või mis tahes OPN-a, -b või -c, nagu näidatud joonisel fig. 2. GRGDS motiiv võib esineda või puududa 25 või olla muteeritud. Heparini seondumiskoha võib muteerida, muutes osteopontiini võimetuks seonduma hepariiniga. Täispikk osteopontiin või selle mis tahes aktiivne fragment võib olla fosforüülitud ühes või enamas järgnevatest seriinijääkidest, nagu seriinijäägid järgmistes asendites: 8, 10, 11, 33, 46, 47, 60, 62, 65, 83, 86, 89, 92, 101, 104, 107, 110, 113, 153, 155, 175, 179, 199, 203, 208, 212, 218, 223, 227, 238, 242, 247, 251, 30 254, 259, 264, 275, 287, 292, 294, 295. Lisaks võib seriini fosforüülimiskohti muteerida seriinist glutamaadijääkidest, jäljendamaks fosforüülimist.

Vastava ala asjatundjatele on arusaadav, et isegi väikesed osteopontiini osad võivad olla piisavad oma funktsiooni täitmiseks, nagu aktiivne peptiid, mis sisaldab essentsiaalseid aminohappejääke, mida on vaja osteopontiini funktsiooniks.

5 Peale selle on vastava ala asjatundjatele arusaadav, et osteopontiini muteiinidel, sooladel, isovormidel, sulandvalkudel, funktsionaalsetel derivaatidel, osteopontiini aktiivsetel fraktsioonidel või rõngakujuliselt permuteeritud derivaatidel säilib osteopontiini samasugune või isegi parem bioloogiline toime. Osteopontiini ja selle muteiinide, isovormide, liitvalkude või funktsionaalsete derivaatide, aktiivsete fraktsioonide või fragmentide, rõngakujuliselt permuteeritud derivaatide või soolade bioloogilist toimet võib 10 määrata kooskultiveerimise testis nagu allpool teostusnäites 8 kirjeldatud. Suurajukoore rakkude segakultuurid sisaldavad oligodendrotsüüte, samuti teisi KNS-st pärit rakke (nagu närvirakud, astrotsüüdid, mikroglia) ja neid indutseerivad või reguleerivad üles tavalised geenid, mis osalevad müeliniseerimises, nagu P0, MBP või MAG, inkubeerimisel OPN või muteiini, isovormi, fragmendi, aktiivse fraktsiooni, funktsionaalse derivaadi või soolaga. 15 Nende geenide ekspressiooni võib mõõta kvantitatiivse reaalaja RT-PCR (TaqMan® RT-PCR) analüüsiga, mida kirjeldatakse üksikasjalikumalt allpool näidetes. Teiseks lihtsaks testiks OPN toime määramiseks on oligodendrotsüütide proliferatsiooni test, mis hõlmab sobiva oligodendrotsüütide rakuliini, nagu Oli-neu või CG4 rakud, inkubeerimist OPN või muteiini, isovormi, fragmendi, aktiivse fraktsiooni, funktsionaalse derivaadi või soolaga, 20 nagu kirjeldatakse näiteks allpool teostusnäites 7.

Eelistatud aktiivsed fraktsioonid on toimega, mis on võrdne või parem, kui täispika osteopontiini toime, või millel on täiendavad eelised, nagu parem stabiilsus või madalam toksilisus või immunogeensus, või on need kergemini valmistatavad suurtes kogustes või kergemini puhastatavad. Vastava ala asjatundjatele on arusaadav, et muteiine, aktiivseid 25 fragmente ja funktsionaalseid derivaate võib valmistada vastava cDNA kloonimisega sobivates plasmiidides ja nende testimisega kooskultiveerimise testis, nagu eespool mainitud.

Leiutise valgud võivad olla glükosüülitud või glükosüülimata, neid võib saada looduslikest allikatest nagu kehavedelikud või neid võib eelistatult valmistada rekombinantsetl. 30 Rekombinantse ekspresseerimise võib teostada prokarüootsetes ekspressioonisüsteemides nagu *E. coli* või eukarüootsetes ekspressioonisüsteemides nagu putukarakud ning eelistatult imetaja ekspressioonisüsteemides, nagu CHO-rakud või HEK-rakud.

Siin kasutatuna viitab termin "muteiinid" osteopontiini analoogidele, milles loodusliku osteopontiini üks või enam aminohappejääki on asendatud erinevate aminohappejääkidega või kustutatud või on üks või enam aminohappejääki lisatud osteopontiini looduslikule järjestusele, muutmata oluliselt saadud produktide toimet võrreldes metsiktüüpi osteopontiiniga. Need muteiinid valmistatakse tuntud sünteesi ja/või koht-suunatud mutageneesi meetoditega või mis tahes muu selleks sobiva meetodiga.

Osteopontiini muteiinid, mida võib kasutada vastavalt käesolevale leiutisele, või neid kodeerivad nukleiinhapped hõlmavad piiratud hulka praktiliselt vastavaid järjestusi, nagu asendatud peptiidid või polünukleotiidid, mida võib vastava ala asjatundja rutiinselt saada ilma liigse katsetamiseta, põhinedes siin esitatud õpetustel ja juhistel.

Leiutise muteiinid hõlmavad valke, mida kodeerib nukleiinhape, nagu DNA või RNA, mis hübridiseerub OPN kodeeriva DNA või RNA-ga vastavalt käesolevale leiutisele mõõdukalt või väga karmides tingimustes. Termin "karmid tingimused" viitab hübridiseerimise ja järgneva pesemise tingimustele, millele vastava ala asjatundjad konventsionaalselt viitavad kui "karmidele". Vaata Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, eespool, Interscience, N. Y., §§6.3 ja 6.4 (1987, 1992) ja Sambrook *et al.* (Sambrook, J. C., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Ilma piiramata, karmide tingimuste näited hõlmavad pesemistingimusi 12-20 °C allpool uuritava hübriidi arvutatud  $T_m$  näiteks  $2 \times \text{SSC}$  ja 0,5% SDS 5 minutit,  $2 \times \text{SSC}$  ja 0,1% SDS 15 minutit,  $0,1 \times \text{SSC}$  ja 0,5% SDS temperatuuril 37 °C 30-60 minutit ja seejärel  $0,1 \times \text{SSC}$  ja 0,5% SDS temperatuuril 68 °C 30-60 minutit. Vastava ala asjatundjatele on arusaadav, et tingimuste karmus sõltub ka DNA järjestuste, oligonukleotiidsondide (nagu 10-40 alust) või segatud oligonukleotiidi sondide pikkusest. Kui kasutatakse segatud sonde, on eelistatav kasutada tetrametüülammooniumkloriidi (TMAC) SSC asemel. Vaata Ausubel, eespool.

Eelistatud teostuses on mis tahes selline muteiin vähemalt 40% identne või homoloogne SEQ ID nr 1, 2 või 3 järjestusega lisatud järjestuse loetelus. Enam eelistatult on see sellega vähemalt 50%, vähemalt 60%, vähemalt 70%, vähemalt 80% või enim eelistatult vähemalt 90% identne või homoloogne.

Identsus peegeldab sarnasust kahe või enama polüpeptiidjärjestuse või kahe või enama polünukleotiidjärjestuse vahel, määratuna järjestuste võrdlemisega. Üldiselt viitab identsus täpsele nukleotiidi-nukleotiid või aminohape-aminohape vastavusele vastavalt kahes polünukleotiidis või kahes polüpeptiidjärjestuses võrreldavate järjestuste pikkuse ulatuses.

- 5 Järjestuste puhul, millel ei ole täpset vastavust, võib määrata "identsuse protsentes". Üldiselt reastatakse kaks võrreldavat järjestust, leidmaks maksimaalset korrelatsiooni järjestuste vahel. See võib hõlmata "tühikute" sisestamist kummassegi või mõlemasse järjestusse, suurendamaks kokkulangevuse astet. Identsuse protsendi võib määrata iga võrreldava järjestuse kogu pikkuse ulatuses (niinimetatud täielik reastamine), mis on eriti
- 10 sobiv sama või väga sarnase pikkusega järjestuste puhul, või lühemate, määratletud pikkuste ulatuses (niinimetatud lokaalne reastamine), mis sobib rohkem ebavõrdsete pikkustega järjestuste puhul.

- Meetodid kahe või enama järjestuse identsuse ja homoloogia võrdlemiseks on vastaval alal hästi tuntud. Seetõttu võib kasutada näiteks programme, mis on saadavad Wisconsin
- 15 Sequence Analysis Package-s, versioon 9.1 (Devereux J. *et al.*, 1984), näiteks programme BESTFIT ja GAP, määramaks identsuse protsenti kahe polünukleotiidjärjestuse vahel ning identsuse protsent ja homoloogia protsent kahe polüpeptiidjärjestuse vahel. BESTFIT kasutab Smithi ja Watermani (1981) "lokaalse homoloogia" algoritmi ja leiab kahe järjestuse vahel parima üksiku sarnasuse piirkonna. Samuti on vastaval alal identsuse ja/või
- 20 sarnasuse määramiseks järjestuste vahel tuntud teised programmid, näiteks programmide BLAST rühm (Altschul, S. F. *et al.*, 1990; Altschul, S. F. *et al.*, 1997, kättesaadavad NCBI koduleheküljel aadressil [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ja FASTA (Pearson, W. R., 1990; Pearson, 1988).

- Eelistatud muutused muteiinide puhul vastavalt käesolevale leiutisele on need, mida
- 25 tuntakse "konservatiivsete" asendustena. Osteopontiini polüpeptiidide konservatiivsed aminohapete asendused võivad hõlmata sünonüümseid aminohappeid rühmast, millel on piisavalt sarnased füsioloogilised omadused, nii et rühma liikmete vaheline asendus säilitab molekuli bioloogilise funktsiooni (Grantham, 1974). On selge, et eespool määratletud järjestustes võib teostada ka aminohapete insertioone ja deletsioone ilma
- 30 nende funktsiooni muutmata, eriti kui insertioonid ja deletsioonid hõlmavad vaid mõningaid aminohappeid, näiteks alla kolmekümne ja eelistatult alla kümne, ning ei eemalda ega asenda aminohappeid, mis on funktsionaalse konformatsiooni jaoks olulise



tähtsusega, näiteks tsüsteiinijääke. Selliste deletsioonide ja/või insertioonidega valmistatud valgud ja mütseinid kuuluvad leiutise ulatusse.

Eelistatult on sünonüümsete aminohapete rühmad sellised, mis on määratletud tabelis I. Enam eelistatult on sünonüümsete aminohapete rühmad sellised, mis on määratletud tabelis II, ning enim eelistatult on sünonüümsete aminohapete rühmad sellised, mis on määratletud tabelis III.

Tabel I

## Eelistatud sünonüümsete aminohapete rühmad

|    | Aminohape | Sünonüümne rühm                   |
|----|-----------|-----------------------------------|
| 10 | Ser       | Ser, Thr, Gly, Asn                |
|    | Arg       | Arg, Gln, Lys, Glu, His           |
|    | Leu       | Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu      |
|    | Pro       | Gly, Ala, Thr, Pro                |
|    | Thr       | Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr |
| 15 | Ala       | Gly, Thr, Pro, Ala                |
|    | Val       | Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val      |
|    | Gly       | Ala, Thr, Pro, Ser, Gly           |
|    | Ile       | Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile      |
|    | Phe       | Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe |
| 20 | Tyr       | Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr |
|    | Cys       | Ser, Thr, Cys                     |
|    | His       | Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His      |
|    | Gln       | Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln |
|    | Asn       | Gln, Asp, Ser, Asn                |
| 25 | Lys       | Glu, Gln, His, Arg, Lys           |
|    | Asp       | Glu, Asn, Asp                     |
|    | Glu       | Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu |
|    | Met       | Phe, Ile, Val, Leu, Met           |
|    | Trp       | Trp                               |

Tabel II

## Enam eelistatud sünonüümsete aminohapete rühmad

|    | Aminohape | Sünonüümne rühm         |
|----|-----------|-------------------------|
|    | Ser       | Ser                     |
| 5  | Arg       | His, Lys, Arg           |
|    | Leu       | Leu, Ile, Phe, Met      |
|    | Pro       | Ala, Pro                |
|    | Thr       | Thr                     |
|    | Ala       | Pro, Ala                |
| 10 | Val       | Val, Met, Ile           |
|    | Gly       | Gly                     |
|    | Ile       | Ile, Met, Phe, Val, Leu |
|    | Phe       | Met, Tyr, Ile, Leu, Phe |
|    | Tyr       | Phe, Tyr                |
| 15 | Cys       | Cys, Ser                |
|    | His       | His, Gln, Arg           |
|    | Gln       | Glu, Gln, His           |
|    | Asn       | Asp, Asn                |
|    | Lys       | Lys, Arg                |
| 20 | Asp       | Asp, Asn                |
|    | Glu       | Glu, Gln                |
|    | Met       | Met, Phe, Ile, Val, Leu |
|    | Trp       | Trp                     |

Tabel III

## 25 Enim eelistatud sünonüümsete aminohapete rühmad

|    | Aminohape | Sünonüümne rühm |
|----|-----------|-----------------|
|    | Ser       | Ser             |
|    | Arg       | Arg             |
|    | Leu       | Leu, Ile, Met   |
| 30 | Pro       | Pro             |
|    | Thr       | Thr             |
|    | Ala       | Ala             |

|    | Aminohape | Sünonüümne rühm |
|----|-----------|-----------------|
|    | Val       | Val             |
|    | Gly       | Gly             |
|    | Ile       | Ile, Met, Leu   |
| 5  | Phe       | Phe             |
|    | Tyr       | Tyr             |
|    | Cys       | Cys, Ser        |
|    | His       | His             |
|    | Gln       | Gln             |
| 10 | Asn       | Asn             |
|    | Lys       | Lys             |
|    | Asp       | Asp             |
|    | Glu       | Glu             |
|    | Met       | Met, Ile, Leu   |
| 15 | Trp       | Met             |

Aminohapete asenduste tegemiseks valkudes, mida võib kasutada leiutises kasutatava osteopontiini, polüpeptiidide või valkude, muteiinide saamiseks, näited hõlmavad mis tahes tuntud meetodite etappe, nagu esitatakse US patentides 4 959 314, 4 588 585 ja 4 737 462, Mark *et al.*; 5 116 943, Koths *et al.*; 4 965 195, Namen *et al.*; 4 879 111, Chong *et al.*; 20 ja 5 017 691, Lee *et al.*, ning lüsiiniga asendatud valke, mis on esitatud US patendis 4 904 584 (Shaw *et al.*).

Termin "sulandvalk" viitab polüpeptiidile, mis sisaldab osteopontiini või selle muteiini või fragmenti, mis on sulandatud teise valguga, millel on näiteks pikem kehavedelikes viibimise aeg. Seega võib osteopontiini sulandada teise valgu või polüpeptiidiga vms, 25 näiteks immunoglobuliini või selle fragmendiga.

Siin kasutatuna hõlmab termin "funktsionaalsed derivaadid" osteopontiini derivaate ja nende muteiine ja sulandvalke, mida võib valmistada funktsionaalsetest rühmadest, mis esinevad jääkide kõrvalahelatena, või N- või C-terminaalsetest rühmadest, vastaval alal tuntud meetoditega, ning need kuuluvad leiutise ulatusse, kuni need on farmatseutiliselt 30 vastuvõetavad, st need ei hävita valgu toimet, mis on praktiliselt samasugune kui osteopontiini toime, ja ei anna neid sisaldavatele koostistele toksilisi omadusi.

Need derivaadid võivad hõlmata näiteks polüetüleenglükookõrvalahelaid, mis võivad maskeerida antigeenseid kohti ja pikendada osteopontiini kehavedelikes viibimise aega. Teised derivaadid hõlmavad karboksüülrühmade alifaatseid estreid, karboksüülrühmade amiide, mis on saadud reageerimisel ammoniaagi või primaarsete või sekundaarsete amiinidega, aminohappejääkide vabade aminorühmade N-atsüül derivaate, mis moodustatakse atsüülrühmadega (nt alkanooüül- või karboksüklilised aroüülrühmad), või vabade hüdroksüülrühmade (nt serüül- või treonüüljääkide omade) O-atsüül derivaate, mis moodustatakse atsüülrühmadega.

Osteopontiini, muteiinide ja sulandvalkude "aktiivsete fraktsioonidena" hõlmab leiutis valgumolekuli polüpeptiidahela mis tahes fragmenti või prekursorit üksi või koos sellega seotud molekulide või sellega seotud jääkidega, näiteks suhkru- või fosfaatjääkide, või valgumolekuli või suhkrujääkide agregate endid, tingimusel, et nimetatud fraktsioonil on osteopontiiniga praktiliselt samasugune toime.

Termin "soolad" viitab siin OPN molekuli või selle analoogide nii karboksüülrühmade sooladele kui ka aminorühmade happeliitsooladele. Karboksüülrühma sooli võib moodustada vastaval alal tuntud meetoditega ning need hõlmavad anorgaanilisi sooli, näiteks naatriumi-, kaltsiumi-, ammoniumi-, raua- või tsingisooli jms, ning sooli orgaaniliste alustega, nagu sellised, mis moodustatakse näiteks amiinidega, nagu trietanoolamiin, arginiin või lüsiin, piperidiin, prokaiin jms. Happeliitsoolad hõlmavad näiteks sooli mineraalhapestega, nagu vesinikkloriidhape või väävelhape, ja sooli orgaaniliste hapestega, nagu äädikhape või oksaalhape. Muidugi peavad mis tahes sellised soolad säilitama vastavalt käesolevale leiutisele OPN bioloogilise toime, st avaldama oligodendrotsüütidele proliferatiivset toimet.

Leiutise eelistatavas teostuses sulandatakse osteopontiin kandjamolekuli, peptiidi või valguga, mis soodustab hematoentsefaalbarjääri (HEB) läbimist. See võimaldab molekuli paremat suunamist toimekohta nendel juhtudel, kui haiguses osaleb KNS. Viisid ravimi viimiseks läbi HEB-i nõuavad HEB-i lõhkumist kas osmootselt või biokeemiliselt, kasutades vasoaktiivseid aineid nagu bradükiniin. Teised strateegiad HEB-i läbimiseks võivad nõuda endogeensete transportsüsteemide kasutamist, kaasa arvatud kandja vahendatud transporterid, nagu glükoos- ja aminohappekandjad, retseptori vahendatud transtsuutoosi insuliini või transferrini puhul ja aktiivse väljavoolu transportereid nagu P-

glükoproteiin. Strategiad ravimi manustamiseks HEB-i taha hõlmavad lisaks ajusisest implanteerimist.

Osteopontiini funktsionaalseid derivaate võib konjugeerida polümeeridega, parandamaks valgu omadusi, nagu stabiilsus, poolväärtusaeg, biosaadavus, talutavus inimorganismi poolt või immunogeensus. Selle eesmärgi saavutamiseks võib osteopontiini siduda näiteks polüetüleenglükooliga (PEG). PEGüülimise võib teostada tuntud meetoditega, mida kirjeldatakse näiteks patenditaotluses WO 92/13095.

Seega on leiutise eelistatud teostuses osteopontiin PEGüülitud.

Leiutise järgmises eelistatud teostuses sisaldab sulandvalk sulandatud immunoglobuliini (Ig). Sulandada võib otse või lühikese linkerpeptiidi kaudu, mis võib olla 1-3 aminohappejäagi pikkune või pikem, näiteks 13 aminohappejäagi pikkune. Nimetatud linkeriks võib olla näiteks tripeptiid järjestusega E-F-M (Glu-Phe-Met) või näiteks 13 aminohappest linkerjärjestus, mis koosneb Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, mis sisestatakse osteopontiini järjestuse ja immunoglobuliini järjestuse vahele. Saadud sulandvalk on paremate omadustega, nagu pikem kehavedelikes viibimise aeg (poolväärtusaeg) või suurenenud spetsiifiline toime, suurenenud ekspressioonitase. Ig sulandamine võib kergendada ka sulandvalgu puhastamist.

Veel järgmises eelistatud teostuses sulandatakse osteopontiin Ig molekuli konstantse piirkonnaga. Eelistatult sulandatakse see raske ahela piirkondadesse, nagu näiteks inimese IgG<sub>1</sub> CH2 ja CH3 domeenid. Ig molekulide teised isovormid, nagu isovormid IgG<sub>2</sub> või IgG<sub>4</sub> või teised klassid, nagu näiteks IgM, on samuti sobivad leiutise sulandvalkude moodustamiseks. Sulandvalgud võivad olla monomeersed või multimeersed, hetero- või homomultimeersed. Liitvalgu immunoglobuliiniosa võib edasi modifitseerida, et mitte aktiveerida komplemendi sidumist või komplemendi kaskaadi või seondumist Fc-retseptoritega.

Leiutis käsitleb veel osteopontiini ja immunosupressiivse aine kombinatsiooni kasutamist ravimi valmistamiseks neuroloogiliste haiguste raviks ja/või vältimiseks samaaegse, järjestikuse või eraldi kasutamisega. Immunosupressiivseteks aineteks võivad olla steroidid, metotreksaat, tsüklofosfamiid, leukotsüütidevastased antikehad (nagu CAMPATH-1) jms.

Leiutis käsitleb veel osteopontiini ja interferooni kombinatsiooni kasutamist ravimi valmistamiseks neuroloogiliste haiguste raviks ja/või vältimiseks samaaegse, järjestikuse või eraldi kasutamisega.

5 Käesolevas patenditaotluses kasutatuna hõlmab termin "interferoon" mis tahes molekuli, mis on sellisena määratletud kirjanduses ja mis hõlmab näiteks mis tahes eespool osas "Tehnika tase" mainitud IFN-e. Interferoon võib eelistatult olla inimese oma, kuid saadud ka teistelt liikidelt, kuni bioloogiline toime on sarnane inimese interferoonidega ja molekul ei ole inimesele immunogeenne.

10 Eriti hõlmab eespool toodud määratlus mis tahes IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  ja IFN- $\gamma$ . Eelistatud IFN-ks vastavalt leiutisele on IFN- $\beta$ .

Käesolevas leiutises kasutatuna hõlmab termin "interferoon-beeta (IFN- $\beta$ )" inimese fibroblastide interferooni, mis on saadud eraldamisega bioloogilistest vedelikest või saaduna DNA rekombinanttehnikatega prokariootsetest või eukariootsetest peremeesrakkudest, samuti selle sooli, funktsionaalseid derivaate, variante, analooge ja fragmente.

15 Siin kasutatuna hõlmab termin "funktsionaalsed derivaadid" derivaate, mida võib valmistada funktsionaalsetest rühmadest, mis esinevad jääkide kõrvalahelatel, või N- või C-terminaalsetest rühmadest vastaval alal tuntud meetoditega, ning need kuuluvad leiutise ulatusse, kuni need on farmatseutiliselt vastuvõetavad, st need ei hävita valkude bioloogilist toimet, nagu eespool kirjeldatud, nagu võime seonduda vastava retseptoriga ja  
20 käivitada retseptori signaaliseerimine, ning ei anna toksilisi omadusi neid sisaldavatele koostistele. Derivaatidel võivad olla keemilised rühmad, nagu süsivesik- või fosfaatjäägid, tingimusel, et selline derivaat säilitab valgu bioloogilise toime ja jääb farmatseutiliselt vastuvõetavaks.

25 Derivaadid võivad hõlmata näiteks karboksüülrühmade alifaatseid estreid, karboksüülrühmade amiide, mis on saadud reageerimisel ammoniaagi või primaarsete või sekundaarsete amiinidega, aminohappejääkide vabade aminorühmade N-atsüül derivaate, mis moodustatakse atsüülrühmadega (nt alkanooüül- või karbotsükliilised aroüülrühmad), või vabade hüdroksüülrühmade (nt serüül- või treonüüljääkide omade) O-atsüül derivaate, mis moodustatakse atsüülrühmadega. Sellised derivaadid võivad hõlmata näiteks ka

polüetüleenglükoolkõrvalahelaid, mis võivad maskeerida antigeenseid kohti ja pikendavad molekuli kehavedelikes viibimise aega.

- 5 Eriti oluline on valk, mis on derivatiseeritud või kombineeritud komplekstekitiga, et see oleks pikaajalise toimega. Näiteks võib vastavalt leiutisele kasutada PEGüülitud variante, nagu eespool mainitud, või valke, mida on geneetiliselt modifitseeritud, et neil oleks pikaajaline toime organismis.

Termin "derivaadid" hõlmab ainult selliseid derivaate, mis ei muuda üht aminohapet teiseks kahekümnest tavaliselt esinevast looduslikust aminohapest.

- 10 Termin "soolad" viitab siin nii eespool kirjeldatud valkude või nende analoogide karboksüülrühmade sooladele kui ka aminorühmade happeliitsooladele. Karboksüülrühma sooli võib moodustada vastaval alal tuntud meetoditega ja need hõlmavad anorgaanilisi sooli, näiteks naatriumi-, kaltsiumi-, ammoniumi-, raua- või tsingisooli jms, ning sooli orgaaniliste alustega, nagu sellised, mis moodustatakse näiteks amiinidega, nagu trietanoolamiin, arginiin või lüsiin, piperidiin, prokaiin jms. Happeliitsoolad hõlmavad 15 näiteks sooli mineraalhapestega, nagu vesinikkloriidhape või väävelhape, ja sooli orgaaniliste hapestega, nagu äädikhape või oksaalhape. Muidugi peavad mis tahes sellised soolad säilitama valkude (vastavalt osteopontiin ja IFN- $\beta$ ) bioloogilise toime vastavalt käesolevale leiutisele, st võime seonduda vastava retseptoriga ja käivitada retseptori signaliseerimine.

- 20 Interferoone võib valkude stabiilsuse suurendamiseks konjugeerida ka polümeeridega. Interferoon- $\beta$  ja polüooli polüetüleenglükooli (PEG) konjugaati on kirjeldatud näiteks patenditaotluses WO 99/55377.

Leiutise ühes teostuses on interferooniks interferoon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) ja enam eelistatult IFN- $\beta$ 1a.

- 25 Osteopontiini kasutatakse eelistatult interferooniga samaaegselt, järjestikku või eraldi.

Käesoleva leiutise eelistatud teostuses kasutatakse osteopontiini koguses ligikaudu 0,0001-100 mg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 0,01-10 mg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 1-5 mg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 2 mg/kg kehamassi kohta.

Leiutis käsitleb veel nukleiinhappe molekuli kasutamist ravimi valmistamiseks neuroloogilise haiguse raviks ja/või vältimiseks, kusjuures nukleiinhappe molekul sisaldab nukleiinhappejärjestust, mis kodeerib polüpeptiidi, mis sisaldab aminohappejärjestust, mis valitakse rühmast, kuhu kuuluvad:

- 5 (a) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1,
- (b) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1 aminohappeid 1-168 või 170,
- (c) polüpeptiid, mis sisaldab SED ID nr 1 aminohappeid 1-16 ja 170-314,
- (d) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1 aminohappeid 170-314,
- (e) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 2,
- 10 (f) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 3,
- (g) mis tahes punktidele a-f vastav muteiin, mille aminohappejärjestus on vähemalt 40% või 50% või 60% või 70% või 80% või 90% identne vähemalt ühega järjestustest a-f,
- (h) mis tahes punktidele a-f vastav muteiin, mida kodeerib DNA järjestus, mis hübriidiseerub natiivse DNA järjestuse, mis kodeerib mis tahes a-f mõõdukalt karmides tingimustes või
- 15 väga karmides tingimustes, komplemendiga,
- (i) mis tahes punktidele a-f vastav muteiin, milles mis tahes muudatused aminohappejärjestuses on konservatiivsed aminohapete asendused a-f aminohappejärjestustes,
- (j) mis tahes punktidele a-f vastav isovorm, sulandvalk, funktsionaalne derivaat, aktiivne
- 20 fraktsioon või rõngakujuliselt permuteeritud derivaat.

Nukleiinhappe võib manustada näiteks lihtsalt nukleiinhappe molekulina, näiteks intramuskulaarse süstimisega.

- See võib lisaks sisaldada vektorjärjestusi nagu viirusejärjestus, mis on kasutatav nukleiinhappe molekuli kodeeritud geeni ekspresseerimiseks inimese organismis,
- 25 eelistatult vastavates rakkudes või kudedes.

- Seega sisaldab nukleiinhappe molekul eelistatud teostuses lisaks ekspresioonivektori järjestust. Ekspresioonivektori järjestused on vastaval alal hästi tuntud, need sisaldavad lisaks elemente, mis osalevad huvipakkuva geeni ekspresioonis. Need võivad sisaldada regulaatorjärjestusi, nagu promootor- ja enhanserjärjestused, selektsioonimarkeri
- 30 järjestused, multiplikatsiooni alguspunktid jms. Seega kasutatakse haiguse raviks ja/või vältimiseks geeniteraapia meetodit. Eelistatult toimub osteopontiini ekspressioon siis *in situ*.



Eelistatud teostuses on ekspressioonivektoriks lentiviirusest saadud vektor. Lentiviirusvektorid on näidatud olevat väga efektiivsed geenide ülekandmisel, eriti KNS-s. Samuti võib vastavalt leiutisele kasutada teisi hästi tuntud viirusvektoreid nagu adenoviirusest saadud vektorid.

- 5 Märklaudvektorit võib kasutada osteopontiini liikumise läbi hematoentsefaalbarjääri parandamiseks. Selliste vektorite märklauaks võivad olla näiteks transferriniireseptorid või teised endoteeli transportmehhanismid.

Leiutise eelistatud teostuses võib ekspressioonivektori manustada intramuskulaarse süstimise teel.

- 10 Samuti kuulub leiutise ulatusse vektori kasutamine osteopontiini endogeense produtseerimise indutseerimiseks ja/või suurendamiseks rakus, mis on tavaliselt osteopontiini ekspressiooni suhtes vaikiv või mis ekspresseerib osteopontiini ebapiisavates kogustes. Vektor võib sisaldada regulaatorjärjestusi, mis on funktsionaalsed rakkudes, kus soovitakse osteopontiini ekspresseerida. Sellisteks regulaatorjärjestusteks võivad olla
- 15 näiteks promootorid või enhanserid. Regulaatorjärjestuse võib seejärel viia genoomi sobivasse lookusesse homoloogilise rekombinatsiooniga, sidudes nii operaablilt regulaatorjärjestuse geeniga, mille ekspressiooni on vaja indutseerida või suurendada. Meetoditele viidatakse üldiselt kui "endogeensele geeniaktivatsioonile" (EGA) ja seda kirjeldab näiteks WO 91/09955.

- 20 Leiutis käsitleb veel raku, mida on osteopontiini produtseerimiseks geneetiliselt modifitseeritud, kasutamist ravimi valmistamises neuroloogiliste haiguste raviks ja/või vältimiseks.

- Leiutis käsitleb veel rakku, mida on osteopontiini produtseerimiseks geneetiliselt modifitseeritud, ravimi valmistamiseks neuroloogiliste haiguste ravimiseks ja/või
- 25 vältimiseks. Seega võib ravimi manustamiseks inimese organismi sobivatesse kohtadesse kasutada rakuteraapia meetodit.

- Leiutis käsitleb lisaks ravimkoostisi, mis on eriti kasutatavad neuroloogiliste haiguste raviks ja/või vältimiseks ja mis sisaldavad osteopontiini terapeutiliselt efektiivset kogust ning interferooni terapeutiliselt efektiivset kogust, lisaks vajadusel immunosupressandi
- 30 terapeutiliselt efektiivset kogust.

Termin "farmatseutiliselt vastuvõetav" hõlmab mis tahes kandjat, mis ei häiri toimeaine bioloogilise toime efektiivsust ja mis ei ole toksiline peremeesorganismile, kellele seda manustatakse. Näiteks võib parenteraalseks manustamiseks aktiivse(d) valgu(d) valmistada üksikannusvormis süstimiseks vehiiklites, nagu soolalahus, dekstroosilahus, seerumialbumiin ja Ringeri lahus.

Leiutise ravimkoostise toimeaineid võib manustada isikule mitmesugusel viisil. Manustamisviisid hõlmavad intradermaalset, transdermaalset (nt toimeainet aeglaselt vabastavad preparaadid), intramuskulaarset, intraperitoneaalset, intravenooset, subkutaanset, peroraalset, epiduraalset, paikset, intratekaalset, rektaalset ja intranasaalset viisi. Kasutada võib mis tahes muud terapeutiliselt efektiivset manustamisviisi, näiteks imendumist läbi epiteeli- või endoteelikudede või geeniteraapiat, milles toimeainet sisaldav DNA molekul manustatakse patsiendile (nt vektoriga), mis põhjustab toimeaine ekspresseerimise ja sekreteerimise *in vivo*. Lisaks võib leiutise valke manustada koos bioloogiliselt toimivate ainete teiste komponentidega, nagu farmatseutiliselt vastuvõetavad pindaktiivsed ained, ekstsipiendid, kandjad, lahjendid ja vehiiklid.

Parenteraalseks (nt intravenosseks, subkutaanseks, intramuskulaarseks) manustamiseks võib aktiivsetest valkudest valmistada lahuse, suspensiooni, emulsiooni või lüofiliseeritud pulbri koos farmatseutiliselt vastuvõetava parenteraalse vehiikli (nt vesi, soolalahus, dekstroosilahus) ja abiainetega, mis hoiavad isotoonilisust (nt mannitool) või keemilist stabiilsust (nt säilitusained ja puhvrid). Preparaat steriliseeritakse tavaliselt kasutatavate meetoditega.

Leiutise aktiivsete valkude biosaadavust võib samuti parandada, kasutades konjugeerimismeetodeid, mis suurendavad molekuli poolväärtusaega inimorganismis, sidudes näiteks molekuli polüetüleenglükooliga, nagu kirjeldatakse PCT patenditaotluses WO 92/13095.

Aktiivsete valkude terapeutiliselt efektiivsed kogused sõltuvad paljudest näitajatest, kaasa arvatud valgu tüüp, valgu afiinsus, antagonistidel esinev mis tahes tsütotoksiline jääkaktiivsus, manustamisviis, patsiendi kliiniline seisund (kaasa arvatud soov säilitada endogeense osteopontiini toime mittetoksilisel tasemel).

“Terapeutiliselt efektiivne kogus” on selline kogus, mille manustamisel on osteopontiini kasulik toime neuroloogilisele haigusele. Isikule manustatav annus, üksik- või mitme annusena, varieerub sõltuvalt mitmesugustest teguritest, kaasa arvatud osteopontiini farmakokineetilised omadused, manustamisviis, patsiendi seisundid ja omadused (sugu, vanus, kehamass, tervis, suurus), sümptomite ulatus, kaasuvad ravid, ravi sagedus ning soovitud toime.

Nagu eespool mainitud, võib osteopontiini kasutada eelistatult koguses ligikaudu 0,0001-10 mg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 0,01-5 mg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 0,01-5 mg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 0,1-3 mg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 1-2 mg/kg kehamassi kohta. Osteopontiini teisteks eelistatud kogusteks on ligikaudu 0,1-1000 µg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 1-100 µg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 10-50 µg/kg kehamassi kohta.

Leiutise eelistatud manustamisviisiks on manustamine subkutaanselt. Veel on vastavalt leiutisele eelistatav intramuskulaarne manustamine.

15 Järgmistes eelistatud teostustes manustatakse osteopontiini iga päev või igal teisel päeval.

Päevaannused antakse tavaliselt jagatud annustena või toimeainet pidevalt vabastavas vormis, mis on efektiivne soovitud tulemuste saamiseks. Teise või järgnevad manustamised võib teostada annusega, mis on sama, väiksem või suurem kui esimene või eelmine isikule manustatud annus. Teise või järgneva manustamise võib teostada haiguse ajal või enne selle algust.

Vastavalt leiutisele võib osteopontiini manustada profülaktiliselt või terapeutiliselt isikule enne, samaaegselt või järjestikku teiste terapeutiliste režiimide või ainetega (nt mitme ravimi režiimid), terapeutiliselt efektiivses koguses, eriti koos interferooniga. Toimeaineid, mida manustatakse samaaegselt teiste ravimainetega, võib manustada samas või erinevas koostises.

Leiutis käsitleb veel meetodit neuroloogilise haiguse ravimiseks, mis hõlmab osteopontiini või osteopontiini toimega agonisti efektiivse koguse manustamist seda vajavale patsiendile, vajadusel koos farmatseutiliselt vastuvõetava kandjaga.

Samuti kuulub leiutise ulatusse meetod neuroloogilise haiguse ravimiseks, mis hõlmab osteopontiini või osteopontiini toimega agonisti ning interferooni efektiivse koguse manustamist seda vajavale patsiendile, vajadusel koos farmatseutiliselt vastuvõetava kandjaga.

- 5 Kõik siin tsiteeritud viited, kaasa arvatud ajakirjade artiklid või kokkuvõtted, avaldatud või avaldamata US või välismaa patenditaotlused, välja antud US või välismaa patendid või mis tahes muud viited on siin täielikult toodud viitena, kaasa arvatud kõik andmed, tabelid, joonised ja tekst, mis on toodud viidetes esitatud. Lisaks on kogu siin tsiteeritud viidetes tsiteeritud viidete sisu samuti täielikult toodud viitena.
- 10 Viited tuntud meetodite etappidele, konventsionaalsete meetodite etappidele, tuntud meetoditele või konventsionaalsetele meetoditele ei ole mingil viisil mõõnduseks, et käesoleva leiutise mis tahes aspekti, kirjeldust või teostust on vastaval alal avaldatud, kirjeldatud või soovitatud.

- Eespool toodud konkreetsete teostuste kirjeldus paljastab ka täielikult leiutise üldise olemuse, mida teised võivad vastava ala teadmisi (kaasa arvatud siin tsiteeritud viidete sisu) rakendades kergesti modifitseerida ja/või kohandada mitmesugusteks rakendusteks nagu konkreetsete teostused ilma liigse katsetamiseta, väljumata käesoleva leiutise üldisest kontseptsioonist. Seega on sellised kohandused ja modifikatsioonid mõeldud olevat avaldatud teostuste tähenduses ja ekvivalentide ulatuses, põhinedes siin toodud õpetustel ja juhistel. On arusaadav, et fraseoloogia ja terminoloogia on siin toodud kirjelduse eesmärgil ja mitte piiramiseks, nii et käesoleva patendikirjelduse terminoloogiat ja fraseoloogiat tuleb vastava ala asjatundjal interpreteerida siin toodud õpetuste ja juhiste valguses, kombinatsioonis vastava ala asjatundja teadmistega.
- 15
- 20

- Olles nüüd leiutist kirjeldanud, on see kergemini mõistetav seoses järgnevate näidetega, mis on toodud selgitamiseks ja mida ei tule käsitleda leiutist piiravatena.
- 25

#### TEOSTUSNÄIDE 1

Osteopontiini ekspresseeritakse erinevalt demüeliniseerivate haiguste *in vivo* ja *in vitro* mudelites

#### Meetodid

In vitro mudelsüsteemid

Oli-neu rakuliin on loodud oligodendroglia prekursorite immortaliseerimisega replikatsioonidefektse retroviirusega, mis kodeerib t-neu onkogeeni, konstitutiivselt aktiivset türosiini kinaasi: näidati, et see rakuliin on indutseeritav diferentseeruma 1 mM dibutürüül-cAMP manulusel kultuurisöötmes (Jung *et al.*, 1995). See andis võimaluse uurida oligodendrotsüüte isoleeritud rakutüübina.

Hiire oligodendrotsüütide rakuliini Oli-neu rakkude, mis on saadud A2B5 hiire oligodendrotsüütide prekursoritest, morfoloogia ja antigeensed omadused on töötlemata tingimustes ja pärast 6-päevast diferentseerumiseelset töötlemist 1-5 mM dibutürüül-cAMP-ga oluliselt erinevad. Kui töötlemata Oli-neu rakud on ümara kujuga ja on enamikus bipolaarsed nagu oligodendrotsüütide prekursorrakudki, tekib cAMP-ga töödeldud rakkudel hulk jätkeid, on lameda välimusega ning moodustavad isegi lamedaid väljaveninud "tupesarnaseid" struktuure.

Lisaks võib kasutada *in vitro* müeliniseerimistesti, kus kasutatakse suurajukoore rakkude segakultuure, võimaldamaks funktsionaalset visualiseerimist *in vitro*. See süsteem annab võimaluse uurida, kuidas oligodendrotsüüdid kontakteeruvad ja müeliniseerivad aksoneid teiste KNS rakutüüpide manulusel (Lubetzki *et al.*, 1993). Selles süsteemis võib testida bioloogilisi tegureid, mis võivad mõjustada oligodendrotsüütide prekursorite proliferereerumist või toimida oligodendrotsüütide diferentseerumisele ja elumusele, nagu mõjustades tõeliste müeliinsegmentide moodustumist. Vajadus uurida müeliniseerumise protsesse *in vitro* on viinud paljude testitüüpide väljatöötamiseni, kaasa arvatud peaajurakkude kultuuride agregeerimine (Matthieu *et al.*, 1992), väikeaju lõikude kultuurid (Notterpek *et al.*, 1993) ja kooskultiveerimise süsteemid (Shaw *et al.*, 1996; Barres *et al.*, 1993). Nendel mudelitel on see eelis, et need võimaldavad uurida oligodendrotsüütide käitumist koos teiste rakutüüpidega ja kuidas neid rakke stimuleeritakse müeliini produtseerima. Samuti võib sellistes süsteemides esile kutsuda demüeliniseerumise spetsiifilise mõjustamisega ning samuti võib uurida remüeliniseerumise vastuse protsessi.

In vivo mudelsüsteemid

On olemas suur hulk eksperimentaalseid hulgiskleroosi *in vivo* ja *in vitro* mudeleid. Enamik *in vivo* mudeleid on seotud MS klassikalise loomudeliga, eksperimentaalse

allergilise entsefalomüeliidiga (EAE). On palju selle mudeli variatsioone, mida on kohandatud kasutamiseks paljude imetajate organismide puhul, kaasa arvatud hiire, roti ning primaadi süsteemid (vaadeldakse Petry *et al.* poolt, 2000). Lisaks on loodud meetodid MS oletatava viirusliku komponendi "jälgendamiseks" loomudelites, nagu MS  
5 entsefalitogeneenne Theileri hiire viirusmudel (Dal Canto *et al.*, 1995).

Müeliniseerumise uurimiseks ainult KNS-s või PNS-s kasutatakse loomudeleid vähem. On osutunud kasulikuks vaadelda arengulise müeliniseerumise protsessi, saamaks mõningat aimu mehhanismidest, mis on oligodendroglia või Schwanni rakkude diferentseerumise, migreerumise ja prolifereerumise aluseks, järgides "rekapitulatsiooni hüpoteesi" (Franklin ja Hinks, 1999). Kuid võrdlemaks arengulist müeliniseerumist, mis  
10 esineb, kui KNS ja PNS alles moodustub, ja remüeliniseerumist, mis esineb täiskasvanu eas, on vajalik luua mudelid, mis on spetsiifiliselt suunatud remüeliniseerumise protsessile.

#### Kuprisoonimudel

Üheks kõige paremini tuntumaks ja laialt kasutatavaks remüeliniseerumise mudeliks on remüeliniseerumise kuprisoonimudel hiirel. See hõlmab orgaanilise ühendi kuprisooni, vase kelaatija, mis on näidatud olevat selektiivselt toksiline oligodendrotsüütidele, peroraalset manustamist (Morell *et al.*, 1998).  
15

Demüeliniseerumine ja remüeliniseerumine esineb kuprisooniga ravitud hiirte mõhnkehas. Neid patoloogilisi seisundeid võib visualiseerida värvimisega CNPaasi-vastane antikeha või MBP-vastase antikehaga. Müeliin värvitakse Luxol Fast Blue-perjoodhappe-Schiffi reagentiga (LFB-PAS). Remüeliniseeruvaid oligodendrotsüütide prekursoreid võib visualiseerida, kasutades PDGF $\alpha$ -retseptori või NG2-vastaseid antikehi.  
20

Kuprisooni manustamine hiirtele 3-5-nädalase perioodi jooksul põhjustab mõhnkeha ulatusliku demüeliniseerumist. Koos demüeliniseerumisega reguleeritakse pärast 3-nädalast kuprisooni manustamist üles müeliinispetsiifilise geeni transkriptide süntees (Morell *et al.*, 1998).  
25

Järgnev kuprisoonirežiimi lõpetamine loob keskkonna, mis soodustab taastumist, nii et 6 nädalat pärast kuprisooniga toitumise lõpetamist esineb hiirtel mõhnkeha ulatuslik remüeliniseerumine. Seega annab kuprisoonimudel täieliku *in vivo* meetodi, millega uurida  
30 demüeliniseerumise ja remüeliniseerumise aspekte. Selle eelised hõlmavad T-rakkude

KNS koesse infiltreerumise puudumist, mis võimaldab põhjalikumalt uurida müeliniseerumise protsesse, samuti tulemuste reprodutseeritavust (Hiremath *et al.*, 1998).

Kuprisoonravi puhul kasutati uuringus C57BL/6 emaseid hiiri (8-nädalased,  $20 \pm 3$  g), mis hõlmas 6 rühma, igäühes 6 looma:

- 5 rühm 1: kontrollrühm, mida toideti normaalse pulbristatud toiduga,  
rühm 2: toideti 3 nädalat pulbristatud toiduga, mis sisaldas 0,2% kuprisooni (kup. 3 näd),  
rühm 3: toideti 5 nädalat pulbristatud toiduga, mis sisaldas 0,2% kuprisooni (kup. 5 näd.),  
rühm 4: toideti 5 nädalat pulbristatud toiduga, mis sisaldas 0,2% kuprisooni, sellele järgnes 1-nädalane taastumisperiod normaalse pulbristatud toiduga (1 näd. T),  
10 rühm 5: toideti 5 nädalat pulbristatud toiduga, mis sisaldas 0,2% kuprisooni, sellele järgnes 3-nädalane taastumisperiod normaalse pulbristatud toiduga (3 näd. T),  
rühm 6: toideti 5 nädalat pulbristatud toiduga, mis sisaldas 0,2% kuprisooni, sellele järgnes 6-nädalane taastumisperiod normaalse pulbristatud toiduga (6 näd. T).

- 15 Iga ravi lõpul koguti kindlaks määratud iga rühma loomadelt ajud. Kõigepealt hiired anesteetsiti ja perfuseeriti vasaku vatsakese kaudu. Ajud koguti ja valmistati rida koronaarlõike mõhnkeha-sabatuuma-putameni (striatum) ning hipokampuse tasandil. Ajukoe lõigud sisestati parafiini immunohistokeemiaks ning *in situ* hübriidiseerimiseks.

#### Histoloogiline koepreparaat

- 20 Valmistati formaliin, lahjendades 1 mahuosa formaldehüüdi (Fluka, 36%, analüüsipuhas) ja 1 mahuosa steriilset PBS-i 8 mahuosa steriilse veega. Silikoontoru, mis oli kohandatud peristaltiliseks pumbaks ning varustatud 20G, 1-1/5 nõelaga, täideti 10 ml PBS-ga. Seejärel täideti toru pidevalt 40 ml formaliiniga, hoolitsedes selle eest, et ei moodustuks õhumulle.

- 25 Loomad anesteetsiti naatriumpentobarbitaaliga (Sanofi®), mis on lahjendatud 1:1 steriilse PBS-ga kontsentratsioonini 3 mg/100 ml, enne intrakardiaalset perfusiooni fiksaatoriga, võimaldamaks organite ja kudede järgnevat histoloogilist analüüsi. Iga hiir sai intraperitoneaalse süsti 0,05 ml (0,75 mg/kg). Kui loomad olid uimased, fikseeriti nende jäsemel nõeltega (25G 5/8 nõelad) läbi naha Styrofoam alusele. Iga looma kõht puhastati etanooliga ja nahka tehti steriilsete käärdega sisselõige rinnaku tasemel. Seejärel lõigati alakeha edasi paremale ja vasakule poole. Rinnak tõsteti pintsettidega üles ja diafragma  
30 avati diagonaalse sisselõikega ning tehti bilateraalne sisselõige perpendikulaarselt roietega,

- paljastamaks rindkereõõnt koos töötava südamega selle keskel. Südant hoiti pintsettidega ja parem koda lõigati kohe lahti, võimaldamaks venoosel verel välja voolata. Igat hiirt perfuseeriti 10 ml PBS, seejärel 40 ml formaliiniga. Iga looma pea- ja seljaaju lõigati ettevaatlikult välja ja pandi 2 tunniks 10 ml formaliinilahusesse 50 ml Falcon®
- 5 katseklaasis. Seejärel asendati formaliinilahus 10 ml steriilse PBS-ga ja materjali hoiti temperatuuril +4 °C üleöö. Seejärel asendati jälle PBS lahusega ja materjali hoiti mõni tund temperatuuril +4 °C. Ajupoolkerad ja seljaaju lõigati ligikaudu 0,5 cm lõikudeks ja viidi plastkorvidesse, mis sobisid parafiini sisestamise seadmesse. Teostati pea- ja seljaaju sisestamine parafiini, kasutades automaatset Tissue Tek vaakuminfiltratsiooniprotsessorit
- 10 E150/E300 (Miles Inc. Diagnostics), vastavalt allpool kirjeldatud programmile:
- 30 minutit 50% etanoolis,
  - 60 minutit 70% etanoolis,
  - 60 minutit 70% etanoolis,
  - 60 minutit 80% etanoolis,
  - 15 90 minutit 80% etanoolis,
  - 30 minutit 96% etanoolis,
  - 90 minutit 96% etanoolis,
  - 120 minutit 96% etanoolis,
  - 30 minutit 100% ksüleenis,
  - 20 60 minutit 100% ksüleenis.

Neli 60-minutilist inkubeerimist parafiinis (Histosec, Merck 11609), viimane etapp on sisestamiseks.

- Kõiki lahuseid hoiti temperatuuril 40 °C koos parafiiniga temperatuuril 65 °C. Kui koelõigud olid valmis, pandi pea- ja seljaaju lõigud soovitud orientatsioonis
- 25 plastkambritesse sisestamiseks parafiinplokki. Valati peale vedel parafiin ning lasti jahedal alusel kiiresti jahtuda temperatuurini 0 °C. Parafiinblokid viidi mikrotoomi lõikamiseks (5-10 µm). Seejärel asetati lõigud silaaniga töödeldud alusklaasidele (SuperFrostPlus™, Menzel kat. nr 041300). Seejärel säilitati klaase tolmuvabas keskkonnas.

#### Rakukultuur

- 30 Oli-neu: hiire oligodendrotsüütide rakuliini (Oli-neu) rakud rikastati tsentrifugimisega ja resuspendeeriti Sato söötmes (Trotter *et al.*, 1989). Rakke kultiveeriti 75 ml kolbides



temperatuuril 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> manulusel kontrollitud tingimustes. Diferentseerimine teostati 1 mM dbcAMP-ga, mis lisati otse rakukultuuri söötmesse. RNA ekstraheeriti Trizol-meetodiga (vt allpool).

#### RNA eraldamine

- 5 Kogu RNA eraldati Oli-neu rakkudest, kuprisooniga töödeldud hiire ajulõikudest ja hiire postnataalsetest tervetest erinevates arengustaadiumites ajudest, kasutades Tri-ZOL<sup>®</sup> eraldamise eeskirja (Life Technologies AG, Basel, Šveits). Poly(A)<sup>+</sup> RNA valmistati kogu RNA proovidest, kasutades Qiagen OLIGOTEX<sup>™</sup> kolonne (QIAGEN Inc., 28159 Stanford Avenue, Valencia, CA 91355, USA).

10 DGE analüüs, kasutades cDNA mikrokiipe

Mikrokiipeksperimendid teostati Incyte Genomics'ga (Incyte Genomics Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, California 94304, USA). DGE analüüs teostati, kasutades Incyte Mouse GEM<sup>™</sup> 1 geeni ekspressiooni mikrokiipi (<http://www.incyte.com/reagents/gem/products.shtml>).

- 15 Nendes testides kasutatud Incyte kiipidele viidi cDNA molekulid, mis vastasid 8734 geenile, nii tuntud kui tundmatutele (EST järjestused). Incyte meetod võimaldab ühel kiibil näha iga selle geeni mikroproovi. Iga cDNA molekul, mis vastas tuntud geenile või EST-le, oli 500-5000 bp pikkune. Incyte määratlused andsid dünaamilise vahemiku 2-2000 pg individuaalse mRNA kohta proovis. RNA kogus, mida vajati iga kiipeksperimendi jaoks, oli 600 ng poly(A)<sup>+</sup> RNA-d. Detekteeritava diferentsiaalse ekspressiooni kindlaks tehtud tasemed esitati suhetena, mis on suuremad kui 1,75.

#### Signaali normaliseerimine ja ekspressioonitaseme määramine

- 25 2 fluorestsentsi intensiivsustest arvutatud suhted annavad suhtelise geeniekspressiooni taseme kvantitatiivse näitaja 2 analüüsitavas rakuproovis. Igale geenile omistatud suhe arvutatakse, põhinedes normaliseeritud ekspressiooni tasemetel. Normaliseerimisfaktor arvutatakse, jagades teise proovi (P<sub>2</sub>) koguekspressiooni esimese proovi (P<sub>1</sub>) koguekspressiooniga. Seda faktorit kasutatakse seejärel iga geeni ekspressioonitaseme puhul P<sub>2</sub>-s. Kui see normaliseerimisetapp on teostatud, arvutatakse geeni suhted vastavalt järgmisele reeglile.

Las  $E_1$  olla antud geeni ekspressioonitase proovis 1 ja las  $E_2$  olla sama geeni normaliseeritud ekspressioonitase proovis 2, kui  $E_2 > E_1$ , siis suhe =  $E_2/E_1$ , vastasel juhul suhe =  $-E_1/E_2$ .

- 5 Kuna sama hübriidiseerimine teostatakse korraga konkureerivalt, on Incyte kiibi tehnoloogia täpsem suhteliste ekspressiooni muutuste määramisel ja muutub vähem usaldatavaks absoluutsete ekspressioonitasemete määramisel. Siiski on võimalik kasutada neid ekspressioonitase väärtusi proovi RNA populatsioonide paaride võrdlemisel, mida tegelikult füüsiliselt kiibil ei võrreldud. Sellised *in silico* võrdlused on vähem usaldatavad, kuid need annavad täiendavat infot mehhanismide kohta, mida võib kasutada
- 10 testitavates süsteemides.

### Tulemused

#### Osteopontiini diferentsiaalse ekspressiooni analüüsimisel kasutatud mudelid

Tabelis IV on näidatud mudelid, mida kasutati mRNA eraldamiseks ja kiibi hübriidiseerimiseks (DGE analüüs), nagu eespool kirjeldatud.

- 15 Tabel IV. DGE analüüsis kasutatud mudelid

| Mudelid   | Töötlemised                                  | Kontrollid                                 |
|---|--|--|
| 1. <i>In vitro</i> oligodendrotsüütide diferentseerumise mudel      | Oli-neu rakud + dibutürüül-cAMP (6 tundi)    | Oli-neu rakud (töötlemata)                 |
|   | Oli-neu rakud + dibutürüül-cAMP (6 päeva)    | Oli-neu rakud (töötlemata)                 |
| 2. <i>In vivo</i> kuprisoon demüelineerumise/remüelineerumise mudel | Täiskasvanu eesaju + kuprisoon (3 nädalat)   | Töötlemata täiskasvanu eesaju              |
|   | Täiskasvanu eesaju + kuprisoon (5 nädalat)   | Töötlemata täiskasvanu eesaju              |
|   | Täiskasvanu eesaju + kuprisoon (3 nädalat)   | Täiskasvanu eesaju + kuprisoon (5 nädalat) |
| 3. Arenguline müelineerumine  | Hiire postnataalne 10-päevane (P10) väikeaju | Hiire postnataalne 2-päevane (P2) väikeaju |

DGE positiivne kontroll: müeliinispetsiifiliste geenide reguleerimine

Positiivse kontrollina testiti kõigepealt, kas DGE kasutades saaks näidata müeliinispetsiifiliste geenide diferentsiaalset regulatsiooni.

Tabelis V on näidatud regulatsioon, mida täheldati müeliinispetsiifiliste geenide puhul, mis esinesid Incyte mikrokiipidel. Iga geeni diferentsiaalse ekspressiooni väärtused on toodud nii 3-nädalase kui ka 5-nädalase kuprisooniga töötlemise ajamomentidest. Need andmed on positiivseks kontrolliks kiibi usaldatavuse kindlaks tegemisel. Kuna müeliini struktuursete geenide reguleerimist meie katsetingimustes on hästi iseloomustatud, võiks nende kiipidel mõõdetud geenide täheldatud ekspressiooni kasutada, näitamaks a) tehnoloogia täpsust ja b) meie mudelite reprodutseeritavust.

Tabel V. Müeliinispetsiifiliste geenide *in vivo* regulatsioon mikrokiibi testides *in vivo* müelineerimise mudelites

| Geeni nimi   | Identifitseerimisnumber | Kup.<br>3 näd. | Kup.<br>5. näd. | P<br>2/10* |
|--|-------------------------|----------------|-----------------|------------|
| Müeliini põhiline valk   | AA059540                | 113,6          | 11,3            | +7,9       |
| Müeliini vesikulaarne valk / müeliin ja lümfotsüüdi valk (MVP/MAL) | AA519027                | 33,5           | 11,7            | 0          |
| Tsükliline nukleotiidfosfodiesteras 1 (CNPaas)                     | W63987                  | 22,9           | 11,1            | +2,9       |

10 \* Postnataalne väikeaju päevadel 2 ja 10.

Eespool toodud tabel näitab, kuidas mõningaid müeliinispetsiifilisi gene reguleeriti mikrokiibi testides, mis teostati RNA-ga erinevatest *in vivo* mudelitest, mida kasutati demüelineerumise, remüelineerumise ja arengulise müelineerimise uurimiseks. Muutused nende müeliinispetsiifiliste geenide ekspressioonis näitavad, kuidas mikrokiipe kasutades saab müelineerumise protsessi uurida transkriptsioonilise reguleerimise tasemel.

Pärast 3-nädalast kuprisooni manustamist võib töötlemise demüelineerivat toimet visualiseerida hiire aju spetsiifilistes piirkondades. Seega loodeti 3 nädala pärast näha müeliini sünteesi ja/või müeliini säilitamisega seotud mitmesuguste geenide allamoduleerimist. Müeliinispetsiifiliste geenide allareguleerimine, nagu täheldatud mikrokiipide kaudu, on eksperimentaalse süsteemi täpsuse ja usaldusväärsuse kinnituseks. Tabelis V toodud andmed näitavad, et MBP mRNA tasemed, mis on alla reguleeritud 13,6-kordselt, ja tsüklilise nukleotiidfosfodiesteras 1 (CNPaas) tasemed, mis on alla reguleeritud 2,9-kordselt, vähenesid 3-nädalase kuprisooniga töötlemisel võrreldes kontrollidega. Siiski olid pärast 5-nädalast kuprisooniga töötlemist mõlema selle geeni

RNA tasemed langenud vastavalt tasemele, mis on 1,3 ja 1,1 korda alla normaalsete tasemete, näidates, et bioloogiline süsteem katsus käivitada remüelineerimist struktuursete müeliinivalkude sünteesi suurendamisega.

#### Osteopontiini diferentsiaalne regulatsioon

- 5 Kiibil reguleeriti osteopontiin kuprisooniga töötlemisel üles 3 nädala (+2,2) ja 5 nädalaga (+2,8).

#### TEOSTUSNÄIDE 2

#### Osteopontiini diferentsiaalse geeniekspressiooni kinnitamine reaallaja kvantitatiivse pöördtranskriptaasi (RT)-PCR testis (TaqMan®)

#### 10 Meetodid

##### cDNA matriitsi loomine

- cDNA matriitsid TaqMan® analüüsiks loodi kogu RNA proovidest pöördtranskriptsiooniga (RT), kasutades TaqMan® pöördtranskriptsiooni reagente (P/N N808-0234). Kõik RT reaktsioonid teostati 100 µl mahus, mis sisaldab 10 µl TaqMan RT puhvrit, 22 µl 25 mM
- 15 MgCl<sub>2</sub> lahust (5,5 mM), 20 µl desoksü-NTP-de segu (500 µM iga dNTP-d), 5 µl juhuslikult valitud heksameere (2,5 µM), 2 µl RNAasi inhibiitorit (0,4 U/µl), 2,5 µl MultiScribe™ pöördtranskriptaasi (1,25 U/µl) ja 38,5 µl RNA proovi (kokku 1 µg) RNAasi-vabas H<sub>2</sub>O-s. Reaktsioonid teostati Eppendorf MasterCycler'is temperatuuril 25 °C 10 minutit (inkubeerimisetapp), 48 °C 30 minutit (pöördtranskriptsioon) ja 95 °C 5 minutit
- 20 (inaktiveerimisetapp). Kõik sünteesitud cDNA-d säilitati temperatuuril -20 °C 20 µl mahuosadena.

##### Praimeri kavandamine ja kontrollimine

- Kavandati SYBR Green reaallaja PCR pärisuunalised ja pöördpraimerid kõikidele kinnitatud geenidele ja GAPDH-le (üldfunktsiooni kontroll), kasutades Primer Express™
- 25 tarkvara firmalt PE Biosystems vastavalt avaldatud järjestustele ja telliti 0,02 µM kontsentratsioonis firmalt Interactiva (Interactiva: The Virtual Laboratory, Sedanstrasse 10, D-89077 Ulm). Iga praimer komplekti puhul testiti spetsiifilisust ja optimaalseid praimer

konsentratsioone. Potentsiaalset genoomse DNA-ga saastumist jälgiti, teostades PCR reaktsioonid negatiivse kontrolli cDNA proovidega, millega oli teostatud pöördtranskriptsiooni reaktsioonid RT ensüümi puudumisel. Mittespetsiifilise amplifitseerimise puudumist kinnitati PCR produktide analüüsimisega agaros-  
 5 geelelektroforeesiga 3,5% MetaPhor geelil või eelvalatud NuSieve® 4% geelidel.

Allpool toodud tabel näitab geenispetsiifiliste praimerite järjestusi, mis on kavandatud TaqMan® analüüsi teostamiseks, kinnitamaks diferentsiaalset ekspressiooni geenidel, mis on näidatud olevat mikrokiipidel diferentsiaalselt reguleeritud. Samuti on lisatud geenide, mis vastavad igale praimeripaarile, nimed ja järjestuse identifitseerimisnumber, mida  
 10 kasutati iga praimeriga kavandamiseks PrimerExpress™ tarkvaraga.

Tabel VI. RT-PCR analüüsiks kasutatud praimerid

| Geeni nimi                                   | Identifitseerimisnumber | TaqMan® OLIGO nimi | TaqMan® OLIGO järjestus |
|--|-------------------------|--------------------|-------------------------|
| Sekreteeritud fosfoproteiin 1 (osteopontiin) | AA108928                | Osteopontiin-166F  | AGCCTGCACCCAGATCCTATAG  |
|  |                         | Osteopontiin-235R  | GCGCAAGGAGATTCTGCTTCT   |

#### TaqMan reaktsioonid

SYBR Green reaalaaja PCR teostati 5 µl/süvendis RT produktide (0,5 ng kogu RNA), 25 µl/süvendis SYBR Green PCR originaalseguga (Applied Biosystems, CA, USA)  
 15 AmpErase ehk uratsiili-N-glükosülaasiga (UNG) (0,5 ühikut/süvendis) ja 20 µl praimeritega (300 nM). PCR teostati temperatuuril 50 °C 2 minutit (AmpErase e. UNG inkubeerimiseks, kõrvaldamaks mis tahes potentsiaalset pikenemist, eemaldades eelnevatest TaqMan tsüklitest pärit PCR produktides oleva uratsiili), 95 °C 10 minutit (AmpliTaq Gold aktiveerimiseks). Seejärel teostati proovidega 40 tsüklit temperatuuril  
 20 95 °C 15 sekundit, 60 °C 1 minut ABI PRISM® 7700 järjestuse detekteerimise süsteemiga. Nii amplifitseeriti pöördtranskribeeritud cDNA proovid ja määrati nende C<sub>T</sub> (tsükli lävi) väärtused. Kõik C<sub>T</sub> väärtused normaliseeriti üldfunktsiooni geenile GAPDH. Kus võimalik, töötati proovidega kahes või kolmes korduses, mõõtmaks tulemuste reprodutseeritavust. Elektroforeetilisel analüüsil täheldati üht spetsiifilist DNA võõndit  
 25 kõigi kinnitatud geenide ja GAPDH puhul.

Geeniregulatsiooni arvutamine tsükli läve ( $C_T$ ) põhjal

Reaalajas mõõtmise põhimõtte, kasutades SYBR Green PCR originaalsegu, põhineb PCR produkti otsesel detekteerimisel, mõõtes fluorestsentsi suurenemist, mida tekitab SYBR Green värvi seondumine kaksikahelalise DNA-ga. See võimaldab kvantifitseerida  
5 geenispetsiifilise amplifitseerimise produkti suhtelist suurenemist PCR kasvukõverate alusel.

Spetsiifiliste cDNA liikide mõõtmine kontrollproovi suhtes teostatakse, kvantifitseerides informatsiooni-RNA-st saadud cDNA, mis vastab spetsiifilisele geenile, kaliibrimisproovi suhtes, mis toimib füsioloogilise võrdlusena. Kaliibrimine tehakse kontrollist või  
10 töötlemata olekust saadud prooviga. cDNA liikide suhteline kvantifitseerimine lõpetatakse normaliseerimisega endogeensele kontrollile (antud juhul GAPDH), arvestamaks mis tahes varieeruvust esialgses kontsentratsioonis ja kogu RNA kvaliteeti, mida kasutati matriits-cDNA-de loomiseks, ja pöördtranskriptsiooni reaktsioonide konversiooni efektiivsuses. Suhteliste kvantifitseerimise väärtuste arvutamine teostati, võttes iga prooviga tehtud  
15 kordusreaktsioonide keskmise  $C_T$  väärtuse, arvutades erinevuse ( $\Delta C_T$ )  $C_T$  keskmistes väärtustes märklauaproovide ja endogeensete kontrollide vahel, lahutades märklauaproovide kaliibrimisproovi keskmise  $C_T$  väärtuse selle märklauaproovi  $\Delta C_T$  väärtusest ( $\Delta \Delta C_T$ ) ja väljendades lõpuks märklauaproovi suhtelise kvantifitseerimisväärtuse kui  $2^{-\Delta \Delta C_T}$ , mõõtmaks geeniekspressiooni üles- või allareguleerimise ulatust.

20 Fluorestsentsi signaalide normaliseerimine TaqMan<sup>®</sup> reaktsioonides

SYBR Green-dsDNA kompleksi fluorestsentsi signaalid normaliseeritakse passiivsele võrdlusele või negatiivse kontrolli reaktsioonidele, mis ei sisalda matriits DNA-d. Normaliseerimine teostati SYBR Green-dsDNA kompleksi emissiooni intensiivsuse jagamisega eksperimentaalses reaktsioonis passiivse võrdluse emissiooni intensiivsusega.

25 See annab reaktsiooni  $R_n$  (normaliseeritud reporter) suhte:

- $R_n^+$  =  $R_n$  väärtus reaktsiooni puhul, mis sisaldab kõiki komponente, kaasa arvatud matriits-DNA,
- $R_n^-$  = töötlemata proovi  $R_n$  väärtus (ilma matriits-DNA-ta),
- $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$ , milles:

30  $R_n^+ = (\text{SYBR Green-dsDNA kompleksi emissiooni intensiivsus}) / \text{PCR matriitsiga}$   
(passiivse võrdluse emissiooni intensiivsus),

$R_n = (\text{SYBR Green-dsDNA kompleksi emissiooni intensiivsus}) / \text{ ilma matriitsita (passiivse võrdluse emissiooni intensiivsus)}.$

#### Reguleerimiskordade arvutamine tsükli läve ( $C_T$ ) väärtustest

$\Delta R_n$  on signaali, mis tekitati antud PCR tingimuste kompleksi poolt spetsiifilises reaktioonis, tugevus. Tsükli läve parameeter on geenispetsiifilise produkti amplifitseerimise suhtelise suurenemise näitajaks, mis kujutab spetsiifilise transkripti suhtelist küllust uuritavas cDNA populatsioonis. See fikseeritakse ajamomendina, mille ajal detekteeritakse esimest korda statistiliselt oluline  $\Delta R_n$  suurenemine. Lävi määratletakse  $R_n$  keskmise standardhälvena varastes tsüklites, korrutatuna korrigeeriva teguriga. Tsükli läve parameetrit kasutatakse diferentsiaalse geeniekspressiooni kvantifitseerimiseks. Iga geenispetsiifilise kasvukõvera puhul arvutatakse spetsiifilised väärtused, põhinedes ajamomendil või tsükli, mil detekteeritakse suurenemine üle taustfluorestsentsi intensiivsuse.

Kõik suhtelise kvantifitseerimise väärtuste arvutamised teostati, võttes iga prooviga teostatud kordusreaktsioonide  $C_T$  keskmise väärtuse, arvutades erinevuse ( $\Delta C_T$ )  $C_T$  keskmistes väärtustes märklaudproovide ja endogeensete kontrollide vahel, lahutades märklaudproovi kaliibrimisproovi  $C_T$  keskmise väärtuse selle märklaudproovi  $\Delta C_T$  väärtusest ( $\Delta \Delta C_T$ ). Lõpuks väljendati märklaudproovide suhteline kvantifitseerimisväärtus kui  $2^{-\Delta \Delta C_T}$ , mõõtmaks geeniekspressiooni üles- või allareguleerimise ulatust.

#### 20 Tulemused

Reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptaasi (RT)-PCR (TaqMan) annab tundliku ja usaldusväärse meetodi geeniekspressiooni muutuste kinnitamiseks ja selgitamiseks. TaqMan järjestuse detektor (ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA) integreerib PCR-l põhineva testi riistvara/tarkvara seadmestikuga, tagades süsteemi nukleiinhappejärjestuste kõrge jõudlusega kvantifitseerimiseks. See ühendab termilise tsüklistamise, fluorestsentsi detekteerimise ja spetsiifilise tarkvara kasutamise, võimaldamaks spetsiifilise PCR produkti koguse suurenemise detekteerimist tsüklite kaupa.

Mikrokiipanalüüsiga täpselt näidatud mitmete kõrgelt reguleeritud geenide ekspressioon tehti kindlaks, kasutades TaqMan<sup>®</sup> platvormi. Igal juhul, nii palju kui võimalik, hõlmati iga kasutatava mudelsüsteemi puhul ajaline kulg. See võimaldas koguda rohkem andmeid selle kohta, kuidas spetsiifilised geenid käituvad täieliku protsessi käigus.

- 5 Muutusi geeniekspressioonis saaks kvantifitseerida TaqMan<sup>®</sup>-ga PCR produkti suurenemise otsese detekteerimisega, mõõtes fluorestsentsi, mille tekitab SYBR Green värvi seondumine kaksikahelalise DNA-ga, mida esindavad testitavale geenile spetsiifilised amplifitseerimise produktid. Spetsiifiliste cDNA liikide mõõtmine kontrollproovi suhtes teostatakse cDNA kvantifitseerimisega, mis konverteeritakse
- 10 spetsiifilisele geenile vastavast informatsiooni-RNA-st, kaliibrimisproovi suhtes, mis on füsioloogiliseks võrdluseks. Kaliibrimine saadakse prooviga kontrollist või töötlemata olekust. cDNA liikide suhteline kvantifitseerimine arvutatakse normaliseerimisega GAPDH-le, arvestamaks mis tahes varieeruvust esialgses kontsentratsioonis ja kogu RNA kvaliteeti, mida kasutati matriits-cDNA-de loomiseks, ja pöördtranskriptsiooni
- 15 reaktsioonide konversiooni efektiivsuses.

Sekreteeritava fosfoproteiini 1 (osteopontiini) geeni ekspressiooni analüüsiti ajalise kuluga uuringus, mis hõlmas kuprisoonimudeliga seotud demüeliniseerumise/remüeliniseerumise protsesse.

- TaqMan eksperimentide tulemused osteopontiini ekspressiooni kohta remüelineerumise
- 20 kuprisoonimudelil on toodud joonisel fig 1A. Osteopontiini mRNA tasemed leiti olevat 18-kordselt ülesreguleeritud hiire frontaalsagaras pärast 3-nädalast kuprisooni manustamist (3 näd. kup.) ja 25-kordselt pärast 5-nädalast kuprisooniga töötlemist (5 näd. kup.).

- Osteopontiini ekspressioon reguleeriti alla pärast 1-, 3- ja 6-nädalast taastumist pärast 5-nädalast töötlemist kuprisooniga (5 näd. kup. + 1 näd., 3 näd. ja 6 näd.). Need leiud
- 25 näitavad osteopontiini olulist rolli mudeli demüeliniseerimis- ja remüeliniseerimisfaasis, kuna remüeliniseerumine algab, kui demüelineerumine alles toimub.

Joonis fig 1B näitab osteopontiini ekspressioonitasemete tulemusi arenevas väikeajus. Osteopontiini mRNA reguleeriti lühiaegselt üles varajase postnataalse arengu käigus, päevadel C4-C8, mis on väikeajus müelineerumise käivitumise aeg.



Mikrokiiptestide tulemused olid näidanud osteopontiini ülesreguleerimist hiire frontaalsagaras kuprisooniga töötlemise ajal. See analüüs laiendab osteopontiini ekspressiooni profiili, hõlmates kuprisooniga töötlemise nii demüelineerivad kui ka remüelineeriva faasid, ja näitab, et osteopontiini ekspresseerumise profiil kulmineerub kuprisooniga töötlemisel demüelineerimisfaasis ning taastumisperioodi jooksul langeb põhitasemete lähedale.

Tulemused on toodud allpool tabelis VII.

Osteopontiini ekspressiooni TaqMan® analüüsi tulemused kinnitasid selle ülesreguleerimist hiirte ajudes, keda toideti kuprisooniga 3 ja 5 nädalat.

10 Tabel VII. Osteopontiini reguleerimise TaqMan® analüüs kuprisoonimudelil

| Koe tüüp      | Katse                  | Ekspressioonitasemed | Reguleerimine |
|---------------|------------------------|----------------------|---------------|
| Frontaalsagar | kup. kontroll          | 1,00                 | kontrolltase  |
| Frontaalsagar | kup. kontroll          | -1,32                | alla          |
| Frontaalsagar | 3 näd. kup.            | 17,51                | üles          |
| Frontaalsagar | 3 näd. kup.            | 23,43                | üles          |
| Frontaalsagar | 5 näd. kup.            | 20,25                | üles          |
| Frontaalsagar | 5 näd. kup.            | 23,43                | üles          |
| Frontaalsagar | 5 näd. kup. + 1 näd. T | 1,79                 | üles          |
| Frontaalsagar | 5 näd. kup. + 1 näd. T | 3,32                 | üles          |
| Frontaalsagar | 5 näd. kup. + 3 näd. T | 2,95                 | üles          |
| Frontaalsagar | 5 näd. kup. + 3 näd. T | 4,56                 | üles          |
| Frontaalsagar | 5 näd. kup. + 5 näd. T | -1,16                | alla          |
| Frontaalsagar | 5 näd. kup. + 5 näd. T | 1,04                 | kontrolltase  |
| Frontaalsagar | 5 näd. kup. + 5 näd. T | 1,07                 | kontrolltase  |

### TEOSTUSNÄIDE 3

#### Osteopontiini diferentsiaalse ekspressiooni kinnitamine Northern blot analüüsiga

##### Meetodid

##### 15 Bloti valmistamine

Spetsiifiliste geenide puhul testiti ekspressiooni koospetsiifilisust, kasutades hiire Multi-Tissue Northern blotte (Clontech Labs, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto CA). Need sisaldasid 2 µg poly(A)<sup>+</sup> RNA-d rea kohta erinevatest täiskasvanud hiire kudetest.

Valmistati eraldi blotid diferentsiaalse geeniekspressiooni analüüsimiseks nii *in vitro* kui ka *in vivo* tingimustes. Blottide ühes komplektis kasutati RNA-d, mis oli eraldatud kuprisooniga ravitud hiirte ajudest ajamomentidel 3 nädalat, 5 nädalat ning taastumisprotsessi käigus 1, 3 ning 6 nädalat (kuni 6 nädalat). Teises komplektis kasutati postnataalse arengustaadiumi erinevate päevade kogu aju RNA-d. Lõpuks valmistati RNA-de ajalise kuluga seeriad Oli-neu rakkudest, mida kasvatati kultuuris ja töödeldi erineva aja jooksul dibutüürüül-cAMP-ga. Seda RNA-d kasutati kolmanda blottide komplekti valmistamiseks. Iga geenispetsiifilise sondi puhul kasutati uut blotti, kindlustamaks maksimaalset detekteerimise efektiivsust ning minimeerimaks variatsioone ebaühtlase väljalahustamise tõttu pärast hübridiseerimist. Kõiki blotte hübridiseeriti kaks korda, kõigepealt sondiga huvipakkuva geeni vastu ja seejärel pärast väljalahustamist sondiga hiire glütseraldehyüd-3-fosfaadi (mGAPDH) vastu, kontrollimaks RNA sisalduse varieeruvust.

RNA (10 µg/süvendis) viidi 1,2% denatureerivale agarosgeelile, mis sisaldas formaldehüüdi ja 5-kordse MOPS-s (209,27 g 3-(*N*-morfolino)propaansulfoonhapet, 20,5 g naatriumatsetaati, 50 ml 0,5 M EDTA-d (pH 8,0), 5 l steriilses H<sub>2</sub>O-s, pH väärtuseni 7,0 12 M NaOH-ga). Iga RNA proov segati 2 µl etiidiumbromiidiga (0,01 mg/ml), 2 µl 5-kordse 3-(*N*-morfolino)propaansulfoonhappe (MOPS), 3,5 µl 37% formaldehüüdi ja 10 µl formamiidiga. Seejärel kuumutati proove temperatuuril 65 °C 10 minutit ja jahutati kiiresti jään. Iga proovile lisati vahetult enne geelile kandmist 2 µl RNA pealekandmispuhvrit (50% glütserooli, 1 mM EDTA-d, 0,4% bromofenoolsinist ja 0,4% ksüleentsüaanoolvärvi).

Igat geeli voolutati ~3 tundi 1-kordse MOPS voolutuspuhvriga (1 l = 330 ml 37% formaldehüüdi, 400 ml 5-kordne MOPS, 270 ml DEPC-ga töödeldud H<sub>2</sub>O) pingega 5 V/cm (geeli pikkus). Seejärel kanti RNA üleöö positiivselt laetud nailonmembraanile (Hybond<sup>TM</sup>-N, Amersham Life Sciences, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, England HP7 9NA), kasutades SSC lahust, nagu kirjeldatud (Terry Brown, UNIT 4,9, Current Protocols, 1993 [ed. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith ja K. Struhl]). RNA ülekande efektiivsust kontrolliti membraani ja lamendunud geeli vaatlemisega UV valguses. RNA-d ristseoti membraanile Stratalinkeriga (Statagene, USA). Blotte säilitati enne hübridiseerimist Whatman 3MM filterpaberi lehtede vahel toatemperatuuril.

### Sondide valmistamine

Radioaktiivsed  $^{32}\text{P}$ -märgistatud sondid valmistati, kasutades cDNA kloonide geelil puhastatud restriksioonifragmente ( $\sim 500 > 800$  bp pikkused), mis vastasid huvipakkuvatele geenidele. DNA fragmendid märgistati juhuslikult spetsiifilise aktiivsusega  $> 10^9$  cpm/ml  $^{32}\text{P}$ -dCTP-ga, kasutades HighPrime<sup>TM</sup> märgistamissüsteemi (Roche Diagnostics AG, Industriestraße 7, 6343 Rotkreuz, Šveits). Liitumata  $^{32}\text{P}$ -dCTP eemaldati sondisegu raskusjõul põhineva elueerimisega Pharmacia NAP<sup>TM</sup> 5 kolonni, mis sisaldasid Sephadex® G-25 keskkonna (DNA mark destilleeritud vees, mis sisaldas 0,15% Kathon® CG/ICP Biocide®).

### 10 Hübridiseerimine ja signaali detekteerimine

Sondi hübridiseerimine teostati, kasutades ExpressHyb<sup>TM</sup> (Clontech Labs, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA) vastavalt valmistaja eeskirjadele. Blotti eksponeeriti pärast hübridiseerimist Hyperfilm<sup>TM</sup> MP-ga (Amersham Pharmacia Biotech, England) temperatuuril  $-80$  °C autoradiograafia kassettides. Sondi väljapesemine eksponeerimise järel teostati bloti inkubeerimisega 10 minutit steriilses  $\text{H}_2\text{O}$  / 0,5% SDS lahuses temperatuuril  $90-100$  °C ning lastes seejärel blotil jahtuda 10 minutit. Väljapestud membraanid suleti plastikusse ja säilitati temperatuuril  $-20$  °C, kuni neid vajati uuesti sondeerimiseks.

### Tulemused

20 Varem on teise tõestamismeetodina suuremahulise diferentsiaalse geeniekspressiooni uuringutes kasutatud Northern blot analüüsi (Chang *et al.*, 2000). Selle tundlikkus ja täpsus võimaldavad analüüsida mitte ainult antud huvipakkuva geeni ekspressiooni koespetsiifilisust, vaid ka diferentsiaalse regulatsiooni ulatust eksperimentaalsetes ja kontrolltingimustes. See teeb meetodi töökindlaks mikrokiipanalüüsis saadud DGE  
25 tulemuste kinnitamisel. Samuti annab Northern blot informatsiooni, mis on seotud transkriptide suuruse ja võimalike alternatiivste splaisitud isovormide kohta, mis vastavad huvipakkuvale geenile.

Valmistati traditsiooniline Northern blot, kasutades kuprisooniga ravitud ja kontrollhiirte ajudest eraldatud RNA-d. Neid sondeeriti radioaktiivselt märgistatud DNA fragmentidega

kloonidest, mis saatis meile Incyte Genomics. Northern blottide võimet reprodutseerida tulemusi, mis on saadud geeniekspressiooni TaqMan<sup>®</sup> analüüsiga, kinnitati, kasutades hiire osteopontiini vastast radioaktiivselt märgistatud sondi, mis on hübriidiseeritud kuprisooniga ravitud hiirte ajudest eraldatud RNA-de blotiga. Sellisel viisil oli võimalik kuprisooniga töödeldud loomadel võrrelda osteopontiini ekspressiooni Northern blot analüüsi TaqMan<sup>®</sup> analüüsiga.

Joonisel fig 3 on kujutatud pT7T3D-Pac vektorisse, mis on tellitud firmast Incyte Genomics, sisestatud hiire osteopontiini avatud lugemisraami. Hall piirkond on kodeeriv järjestus ja nooled näitavad osteopontiini täielikku cDNA-d. Klooniinsert külgnest *EcoRI* ja *NotI* restriksioonikohtadega. Valmistamiseks sondi Northern blot analüüsis kasutamiseks selle geeni ekspressiooni analüüsimiseks koes lõigati kloonist 893 bp fragment, kasutades *HincII* ja *StyI* restriksiooniensüüme. See fragment puhastati geelil ja märgistati kasutamiseks sondina.

Hiire osteopontiini ekspressioon tehti kindlaks Northern blot analüüsiga, kasutades omatehtud blotti, mis valmistati hiirte ajude RNA-dest, mis saadi kuprisoonimudeli igas etapis, kaasa arvatud taastumine ja ravimata kontrollid. Blotti sondeeriti kõigepealt hiire osteopontiini cDNA radioaktiivselt märgistatud fragmendiga, mis pesti pärast eksponeerimist välja ja seejärel sondeeriti uuesti hiire GAPDH radioaktiivselt märgistatud fragmendiga. Seda kasutati positiivse kontrollina, arvutamaks erinevusi täheldatud ekspresioonitasemetes, põhinedes RNA üldkoguste varieerumisel igas blotti rajal.

Osteopontiini ekspressioon kuprisooniga ravitud hiirte ajudes saavutas maksimumi 3- ja 5-nädalasel kuprisooniga toitmisel, veidi suurem ekspressioon esines 5. nädalal. Taastumisfaasi ajal alanesid osteopontiini RNA tasemed suhteliselt kiiresti, ekspresiooni märkimisväärne vähenemine esines 1 nädal pärast kuprisooniga toitmise lõpetamist. Osteopontiini RNA tasemed saavutasid ligikaudu normaalse taseme pärast 6-nädalast taastumist. See on kvalitatiivselt võrreldav tulemustega, mis saadi osteopontiini ekspresiooniga TaqMan<sup>®</sup> analüüsiga kuprisoonimudelil (vt joonist fig 1A).

## TEOSTUSNÄIDE 4

Osteopontiini reguleerimine Oli-neu rakkudes

Osteopontiini ekspressioon cAMP-ga töödeldud oligodendrotsüütides (Oli-neu) määrati TaqMan analüüsiga. Tulemused on toodud joonisel fig 4. Tulbad 1-4 näitavad oligodendrotsüütides saadud tulemusi. Võrreldes kontrolliga (väärus = 1) põhjustas 6 tundi cAMP-ga töötlemist (tulp 1) osteopontiini mRNA ülesreguleerimist. Kaks päeva pärast cAMP-ga töötlemist (tulp 2) määrati 12-kordne ülesregulatsioon. Pikemaajaline töötlemine 6-10 päeva (tulbad 3, 4) põhjustas osteopontiini mRNA tasemete alanemist. Osteopontiini mRNA regulatsiooni võrdlemine kuprisoonimudelil (tulbad 5, 6) näitas, et osteopontiini ülesregulatsioon frontaalsagaras pärast 3- ja 5-nädalast kuprisooniga ravimist oli võrreldav ülesregulatsiooniga oligodendrotsüütides 2 päeva pärast cAMP-ga töötlemist.

## TEOSTUSNÄIDE 5

Osteopontiini ekspressioon oligodendrotsüütidesMeetod

Oli-neu rakud transfekteriti lühiajaliselt kaltsiumfosfaadiga sadestamise meetodiga. Lühidalt, eksponentsiaalses kasvufaasis olevad Oli-neu rakud külvati ( $10^5$  rakku/ml) 6-süvendiga plaadile päev enne transfekterimist. 100  $\mu$ l 250 mM  $\text{CaCl}_2$  lahust segati 5  $\mu$ g plasmiid DNA-ga. Ca/DNA lahusele lisati võrdne kogus (100  $\mu$ l) 2-kordset HEPES lahust (140 mM NaCl, 50 mM HEPES-t, pH 7,05), mis sisaldas fosfaati  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ja  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  300 mM lähtelahusest (pH 7,05). Täpselt üks minuti hiljem lisati segu ettevaatlikult kultuuriplaatidele ja inkubeeriti 4 tundi temperatuuril 37 °C inkubaatoris  $\text{CO}_2$  manulusel. Pärast seda asendati sööde värsekega ja rakke inkubeeriti veel 24-72 tundi enne kogumist ja analüüsimist Western blot analüüsiga.

Tulemused

Erinevad hiire osteopontiini konstruktid pDEST12.2 vektoris (pDESR12.2-osteopontiin-EGFP, pDEST12.2-osteopontiin-His6, pDEST12.2-osteopontiin, vt jooniseid fig 4-7, ja pCIE-EGFP kui kontrollplasmiid) transfekteriti Oli-neu rakkudes. Rakud produtseerisid ja sekreteerisid valku, nagu detekteeriti spetsiifiliste kaubanduslike antikehadega (R & D

Systems, AF808). EGFP-märgisega konstrukt tegi transfektsiooni jälgimise kergemaks ja 24 tundi pärast transfektsiooni või detekteerida raku morfoloogias spetsiifilist muutust (oligodendrotsüütide jätkete suurenemine) võrreldes pCIEGFP kontrolliga (ei näidata), mis näitas, et osteopontiin juhib hiire oligodendrotsüütide rakuliini Oli-neu küpsemate morfoloogiliste fenotüüpide suunas. Osteopontiiniga transfekteeritud Oli-neu rakkudel täheldatud morfoloogia oli väga sarnane müeliniseerivate oligodendrotsüütide morfoloogiale.

Need tulemused näitavad, et osteopontiini ekspressioon oligodendrotsüütides on kasulik nende rakkude juhtimisel müeliniseerumise suunas ja näitavad seega osteopontiini kasulikkude toimet oligodendrotsüütide düsfunktsiooniga seotud haiguste korral.

#### TEOSTUSNÄIDE 6

##### Osteopontiinivalgu ekspressioon aju spetsiifilistes piirkondades kuprisoonimudelil

Osteopontiini immunohistokeemia viidi läbi kuprisoonimudelil mitmesugustel ajamomentidel de- ja remüeliniseerimise ajal. Tugevad signaalid saadi demüeliniseeritud mõhnkehas ja striatumikimpudes 5-nädalasel kuprisooniga ravimisel, ajamomendil, mis oli seotud mikroglia märkimisväärse värbamisega demüeliniseerumiskohtadesse. Visualiseerimaks aktiiveeritud mikrogliaarakke viidi läbi CD68 rakkude värvimine järjestikustes lõikudes ja samasugune ekspressioonimuster kinnitas osteopontiini mikroglia ekspressiooni.

Huvitav on see, et osteopontiini leiti ka rakkudes, mis asuvad eesmistes ajuvatsakestes. Kirjeldati, et see piirkond kui täiskasvanu subventrikulaarne tsoon, sisaldab palju multipotentseid tüvirakke närvirakkude, astrotsüütide ja oligodendrotsüütide produtseerimiseks. Määramaks oligodendrotsüütide prekursorrakkude osteopontiini ekspressiooni, viidi läbi kahekordne värvimine NG2, PSA-NCAM, PDGF $\alpha$ -retseptoriga.

#### 25 TEOSTUSNÄIDE 7

##### Osteopontiinivalgu toimed oligodendrotsüütide proliferatsioonile

Selles eksperimendis kasutati hiire primaarsete oligodendrotsüütide (oligodendroglia) rakuliini, mis oli immortaliseeritud t-neu onkogeeni ("Oli-neu" rakuliin). Oli-neu

rakuliini kindlaks tegemist ja omadusi, samuti kultiveerimistingimusi on kirjeldanud Jung *et al.* (1995).

- 5 Selle uuringu eesmärgiks oli OPN toimete määramine oligodendrotsüütide proliferatsioonile Oli-neu rakkude proliferatsioonitestis. Rakud külvati poollaatunult. Neid kasvatati 24 tundi insuliinivabas söötmes enne töötlemist kas kontroll- või rekombinantsete valkudega. Rakkude arv määrati kvantitatiivselt Alamari sinisega, mis andis fluorestsentsi lugemid. Potentseerimise arvutamine põhines võrdlemisel IGF1 (kontroll) standardkõveraga. Proliferatsiooni inhibeerimise arvutamine põhines võrdlusel dbcAMP standardkõveraga.

#### 10 Materjalid

##### Seadmed ja tarkvarad

Wallac Victor 2 multifunktsionaalne loendur

(ergastuslainepikkus 530-560 nm, emissioonilainepikkus 590 nm)

GraphPadPrism tarkvara

#### 15 Reagendid

Oli-neu rakuliin (Eur. J. Neurol., 1995, 7, 125-1265)

Alamar Blue (BioSourceIntl. Inc., Camarillo, CA93012)

Komponendid Sato söötme valmistamiseks olid järgmised:

| Produkt               | Varustaja     | Lähtelahus                            | µl/500 ml |
|-----------------------|---------------|---------------------------------------|-----------|
| DMEM                  | Seromed F0435 | 500 ml                                |           |
| Transferriin          | Sigma T-2252  | 100 mg/ml<br>(1 mg/10 ml PBS-s)       | 50        |
| Naatriumseleniit      | Sigma S-9133  | 1 mg/2,56 ml PBS-s                    | 50        |
| Insuliin              | Sigma I-1882  | 10 mg/ml<br>(100 mg/10 ml PBS-s)      | 500       |
| Putrestsiin           | Sigma P-7505  | 80,5 mg/ml (PBS)                      | 500       |
| Progesteroon          | Sigma P-0130  | 0,62 mg/ml (EtOH)                     | 50        |
| TIT (Trijoodtüroniin) | Sigma T-5516  | 1,7 mg/ml (1/3 HCl 1 N<br>+ 2/3 EtOH) | 100       |
| L-türoksiin           | Sigma T-0397  | 2,88 mg/ml + 1 tilk 1 N<br>NaOH-d     | 100       |

| Produkt                 | Varustaja          | Lähtelahus | µl/500 ml |
|-------------------------|--------------------|------------|-----------|
| L-glutamiin             | Gibco<br>25030-024 | 200 mM     | 5000      |
| Gentamütsiin            | Gibco<br>15750-037 | 50 mg/ml   | 250       |
| Natriumvesinikkarbonaat | Gibco<br>25080-052 | 7,50%      | 13 000    |
| Hobuse seerum           |                    |            | 5000      |

BioCoat lamedapõhjaline plaat, mis oli kaetud polü-D-lüsiiniga (356461, Becton Dickinson), R3-IFG1 (I1146, Sigma), dbcAMP (D-0627, Sigma).

#### Meetod

##### 5 Rakkude kultiveerimine *in vitro* biotestis

Oli-neu rakud on adhereeruvad rakud, mis kasvatatakse polü-L-lüsiini substraadil. Rakud külvati BioCoat™ polü-lüsiiniga eelnevalt kaetud 96-süvendiga plaatidele. Rakke passaažiti 2-3 korda nädalas. Nende passaažimiseks pesti neid esiteks PBS-ga ja seejärel eraldati PBS + 1 mM EDTA-ga. Rakke kasvatati niiskes inkubaatoris CO<sub>2</sub> manulusel.

- 10 Kasutatavaks külmutussöötmeks oli Sato sööde, mis sisaldab 20% FCS-i ja 10% DMSO-d. Selles eksperimendis kasutati mitte enam kui 16 Oli-neu rakkude passaaži. Rakke kasutati lõppkontsentratsioonis 4000 rakku 96 süvendiga plaadi ühe süvendi kohta pärast 24-tunnist insuliiniga kasvatamist Sato söötmes.

#### Värvimine Alamari sinisega

- 15 Pärast 48-tunnist inkubeerimist inkubaatoris CO<sub>2</sub> manulusel lisati süvenditesse Alamari sinisega lähtelahust ja inkubeeriti veel 2,5 tundi. Fluorestsentsi jälgiti ergastuslainepikkusel 530-560 nm ja emissioonilainepikkusel 590 nm. Plaatide võib lugeda kuni 4 tundi ja kuni 1 miljon suhtelise fluorestsentsi ühikuni.



Eksperimentaalne plaan

Kontrollidena kasutati 100 ng/ml R3-IGF1 (positiivne kontroll) või 1 mM dbcAMP (negatiivne kontroll) või insuliinita söödet või 100 nM keedetud OPN-i. Eksperimentaalseteks proovideks olid rekombinantne osteopontiin kontsentratsioonides 5 1 nM, 10 pM, 0,1 pM, 0,01 pM või 100 nM. Kontroll- ja eksperimentaalseid proove lahjendati insuliinita Sato söötmega soovitud kontsentratsioonini lõppmahus 50 µl ja lisati süvenditesse. Oli-neu rakke kasvatati insuliinivabas söötmes 24 tundi ja töödeldi seejärel 48 tundi kontroll- või eksperimentaalsete proovidega. Irdunud Oli-neu rakud, mida oli just 24 tundi kasvatatud insuliinita söötmes, koguti kultuurikolbidest PBS + 1 mM EDTA-ga. 10 Rakud lahjendati kontsentratsioonini 300 000 rakku/ml ja süvendi kohta lisati 50 µl. Seejärel inkubeeriti rakke 48 tundi temperatuuril 37 °C niiskes inkubaatoris CO<sub>2</sub> manulusel. Lisati 10 µl Alamar sinist ja rakke inkubeeriti veel 2,5 tundi. Seejärel viidi igast süvendist 70 µl tumedatele 96 süvendiga plaatidele ja määrati kohe fluorestsents.

24 tunni pärast määrati diferentseerumata Oli-neu rakkude proliferatsioon vastuseks 15 osteopontiini erinevatele kogustele, mis produtseeriti, kasutades putukarakke (BacOPN) või imetaja ekspressioonisüsteemi (HEK-OPN). Kasvu määr kvantifitseeriti rakkude metaboolse aktiivsuse määramisega fluoromeetriliselt/kolorimeetriliselt kasvu indikaatori Alamar sinisega. See aine sisaldab oksüdeerimise-redutseerimise indikaatorit, mis näitab nii fluorestsentsi kui ka selle värvuse muutusi vastuseks kasvusöötme keemilisele 20 redutseerumisele rakkude kasvamise tõttu. Kasutatavat ainet ja testi on kirjeldanud Ahmed *et al.* (1994) ja US patent 5 501 959.

Tulemused

Tulemused on toodud joonistel fig 8 - fig 10.

Annuse vastust täheldati nii bakuloviiruses kui ka HEK-rakkudes ekspresseeritud 25 rekombinantse osteopontiiniga. Valgu inaktiveerimine keetmisega hävitas bioloogilise toime, nagu oodati. Bakuloviiruses ekspresseeritud osteopontiini (BacOPN) ja HEK-rakkudes ekspresseeritud (HEK-OPN) osteopontiini lisamine andis rakkude proliferatsiooni annusest sõltuva vastuse suurenemise (joonis fig 8) BacOPN IC<sub>50</sub> väärtusega 3,7 nM ja HEK-OPN IC<sub>50</sub> väärtusega 0,05 nM (joonis fig 9). Peale selle 30 ekspresseeriti putukarakkudes N-terminaalne OPN konstrukti, mis vastab OPN isovormi

aminohapetele 1-168 (vt joonist fig 2, N-terminaalne OPN-a). Puhastatud valku testiti proliferatsioonitesti võrreldes täispika valguga. Lühendatud valk oli aktiivne (10 nM, 100 nM), vt joonist fig 10.

#### TEOSTUSNÄIDE 8

##### 5 Osteopontiini toimed müeliniseerimismarkerite ekspressioonile suurajukoore rakkude segakultuuris

Suurajukoore rakkude segakultuure, mida kasvatati katteklaasidel, töödeldi BacOPN-ga (100 nM) 12 päeva päevadel PIV (päevad *in vitro*) 5-17. Päeval 17 *in vitro* kultuurid fikseeriti ja värviti MBP-vastase antikehaga. Tulemused näitavad, et BacOPN katteklaasidel oli palju rohkem hargnenud MBP-positiivseid oligodendrotsüüte kui kontrollides (joonis fig 11). Peale selle, kuigi kontrollkultuurides (joonis fig 11A) ei täheldatud müeliniseerivaid oligodendrotsüüte, oli OPN-ga töödeldud kultuurides rikkalikult oligodendrotsüüte, mis põimuvad ümber aksonite ja moodustasid müeliinsegmente ja sõlmevahesid (joonised fig 11B-D). Segmendikogumike lugemine kinnitas, et kuigi kontrollis ei täheldatud segmente, esines kolmes erinevas OPN-ga töödeldud proovis 16, 22 ja 18 segmendikogumikku. Need tulemused näitavad, et suurajukoore rakkude segakultuuri töötlemine osteopontiiniga tekitab oligodendrotsüütide diferentseerunud fenotüübi, mis on iseloomulik müeliniseerivatele oligodendrotsüütidele.

#### TEOSTUSNÄIDE 9

##### 20 Osteopontiini toimed MBP ekspressioonile suurajukoore rakkude segakultuurides, määratuna MBP ELISA-ga

MBP-valgu suurenemise ja seega müelineerimise jälgimiseks OPN-i ja LIF-ga töödeldud suurajukoore rakkude segakultuurides kasutati MBP ELISA-t.

#### Primaarkultuurid

25 Materjali allikaks oli hiire loote ajukude loodetest, mis olid eraldatud tiinetelt NMR1 emastelt hiirtelt 16 päeva pärast paaritumist. Looded opereeriti välja vastavalt Lubetzki *et al.* eeskirjale, suurajukoore eraldati trüpsiiniga lagundamisega ning eraldatud rakud (kaasa arvatud närvirakud, astrotsüüdid, oligodendrotsüüdid, mikroglia ja närvirakkude

prekursorid) külvati tihedusega  $1 \times 10^5$  rakku süvendi kohta polü-L-lüsiiniga eelnevalt kaetud 96 süvendiga kultuuriplaatidele (algmahus 50 µl iga süvendi kohta).

#### Töötlemine rekombinantsete valkudega

Töötlemine toimus rekombinantsete valkudega (positiivne kontroll, rekombinantne hiire leukeemiat inhibeeriv faktor (LIF), ostetud firmast AMRAD Laboratories, kontsentratsioonidega 1 µg/ml, 100 ng/ml ja 10 ng/ml, hiire bakuloviiruses produtseeritud täispikk osteopontiin kontsentratsioonidega 100 nM, 10 nM ja 10 pM). Kõik valgud lahjendati lähtematerjalist kultuurisöötmeega sobiva kontsentratsioonini enne rakkude lisamist *in vitro*. Kultuuridel lasti kasvada 5 päeva *in vitro* ja seejärel töödeldi 17 päeva järjest. Söödet vahetati iga 3 päeva tagant.

#### Eeskiri proovide kogumiseks mikrosüvenditega plaatidel

Rakud lüüsiiti ja proovid koguti 17 päeva pärast *in vitro* (PIV17) kasvatamist. Rakkude lüüsi teostati kolmekordse detergendifuhvrit.

|    | Kolmekordne detergendifuhver | Lõppkontsentratsioon |
|----|------------------------------|----------------------|
| 15 | 50 ml TRIS (pH 8,0) 1 M      | 50 mM                |
|    | 8,77 g NaCl                  | 150 mM               |
|    | 2 ml NaN <sub>3</sub> (10%)  | 0,02%                |
|    | 5 ml SDS (20%)               | 0,1%                 |
|    | 10 ml NP40                   | 1%                   |
| 20 | 5 g naatriumdeoksükolaat     | 0,5%                 |

Enne kasutamist lisati 10 ml kolmekordsele detergendifuhvri lahusele üks proteaasi inhibiitorite tablett (Roche nr 1836170).

Sööde eemaldati suurajukoore rakkude segakultuuri proovidelt, mis olid külvatud 96 süvendiga eelnevalt kaetud plaatidele. Rakke pesti ettevaatlikult kaks korda 50 µl 1-kordse PBS-ga ja seejärel lisati igasse süvendisse 50 µl kolmekordset detergendifuhvrit. Kõiki mikrosüvenditega plaate, mis sisaldasid lüüsitud proove, säilitati seejärel enne analüüsimist temperatuuril -20 °C.

BCA-valgu test

Pierce BCA-valgu test on detergendiga kokkusobiv preparaat, mis põhineb bitsinhoniinhappel (BCA) kogu valgu kolorimeetriliseks detekteerimiseks ja kvantifitseerimiseks. See meetod ühendab hästi tuntud  $\text{Cu}^{+2}$  redutseerimise  $\text{Cu}^{+1}$ -ks valgu poolt aluselises keskkonnas vase katiooni ( $\text{Cu}^{+1}$ ) kõrgelt tundliku ja selektiivse kolorimeetrilise detekteerimisega, kasutades unikaalset reagenti, mis sisaldab bitsinhoniinhapet.

Selle testi purpurpunane reaktsiooniprodukt moodustub kahe BCA molekuli kelaatimisel ühe vaseiooniga. Sellel vees lahustuval kompleksil on tugev neeldumine lainepikkusel 562 nm, mis on lineaarne valgu suurenevate kontsentratsioonidega laias töövahemikus 20-2000  $\mu\text{g/ml}$ . BCA meetod ei ole täpne lõpp-punkti määramise meetod - lõpliku värvi tekkimine jätkub, kuid pärast inkubeerimist aeglustub värvi tekkimise kiirus piisavalt, võimaldamaks teha ühe korraga suure hulga proove. Valgu makromolekulaarne struktuur, peptiidsidemete arv ja nelja aminohappe (tsüsteiin, tsüsteiin, trüptofaan ja türosiin) esinemine teatakse olevat vastutav värvi moodustamise eest BCA-ga.

Eeskiri kogu valgu sisalduse määramiseks mikrosüvenditega plaadil

25  $\mu\text{l}$  igat standardit (BSA kontsentratsioon: 2000  $\mu\text{g/ml}$ , 1500  $\mu\text{g/ml}$ , 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 750  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ ) ja proovid lisati sobivatesse mikrosüvendiga plaadi süvenditesse. Tühiproovi süvendite puhul (töövahemik 20-2000  $\mu\text{g/ml}$ ) kasutati 25  $\mu\text{l}$  lahjendit (kolmekordne detergendipuhver).

Igasse süvendisse lisati 200  $\mu\text{l}$  tööreagenti (50 osa BCA reagenti A segu 1 osa BCA reagentiga B). Plaat loksutati 30 sekundit ja inkubeeriti temperatuuril 37 °C 30 minutit. Pärast inkubeerimist mõõdeti neeldumise väärtused lainepikkusel 570 nm.

MBP kihiline ELISA

25 96 süvendiga lamedapõhjalisi steriilseid mikroplaate (Costar) inkubeeriti üleöö temperatuuril 4 °C MBP-vastase antikehaga (Chemicon, MAB5274), mis oli lahjendatud 1 : 5000 1-kordse PBS-ga. Igasse süvendisse lisati 50  $\mu\text{l}$  lahjendatud antikeha lahust.

Järgmisel päeval eemaldati antikeha lahus kõikidest süvenditest plaatidel ja teostati blokeerimisetapp, lisades igasse süvendisse 50 µl 1% BSA lahust 1-kordses PBS-s. Blokeerimist teostati 1 tund ümbritseva keskkonna temperatuuril. Plaaite pesti automaatselt 3 korda, sellele järgnes blokeerimisetapp PBS/Tweeniga.

- 5 Inkubeerimine teostati pärast MBP-peptiidi standardite või proovide seerialahjenduste 1% BSA/PBS-s lisamist mikrosüvenditega plaatidele. MBP-peptiidi 100 ng/ml lähtelahus lahjendati 2 kahele. Siin kasutatud lahjendused määrati pärast kogu valgusisalduse arvutamist, kasutades BCA-valgu testi tulemusi. Need olid järgmised: 100 µg, 50 µg, 25 µg, 12,5 µg, 6,2 µg, 3,1 µg.

- 10 Inkubeerimise järel MBP standardi ja valguproovidega pesti plaaite 3 korda jälle 1% BSA/PBS-ga.

Teine inkubeerimine teostati polükloonse MBP-vastase antikehaga (Zymed 10-0038, 1:300), mis on lahjendatud 1% BSA/PBS-ga. Plaaite inkubeeriti 2 tundi ümbritseva keskkonna temperatuuril. Inkubeerimise järel pesti plaaite jälle nagu eespool 3 korda.

- 15 Inkubeerimine kitse küülikuvastase biotiiniga (Vector BA-1000, 1:10 000), mis lisati 50 µl mahuosadena kõikidesse süvenditesse pärast lahjendamist 1% BSA/PBS-ga, teostati 1 tund ümbritseva keskkonna temperatuuril. Jälle pesti plaaite pärast inkubeerimist nagu eespool.

- Viimane inkubeerimine teostati mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud streptavidiiniga (strep-HRP) (Amersham RPN 1051, 1:8000), mis oli lahjendatud 1-kordse PBS-ga ja mida 20 lisati igasse süvendisse 50 µl. Plaaite inkubeeriti 1 tund ümbritseva keskkonna temperatuuril.

- Pesemisetapi järel ilmutati reaktsioon, kasutades ortofenüleendiamiindivesinikkloriidi (OPD) (Sigma, lahus valmistati 1 tableti lisamisel 20 ml vette). See reaktsioon blokeeriti 3 M HCl või 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lisamisega. Optiline tihedus mõõdeti multiskaneeriva 25 fluoroplaadi lugejaga (Labsystems Multiskan EX) lainepikkusel 492 nm.

#### Tulemused

Nagu näidatud joonisel fig 12, suurenesid MBP valgu tasemed 3 korda BacOPN (10 nM) töödeldud kultuurides PIV 17, võrreldes kontrollkultuuridega. Need andmed kinnitavad

varasemaid tulemusi, mis näitavad bakuloviiruses ekspresseeritud OPN positiivset toimet oligodendrotsüütide prekursorite proliferatsioonile ja müelineerimisele.

#### TEOSTUSNÄIDE 10

##### Osteopontiini toime CG4 proliferatsioonile

5 CG4 rakuliin on roti immortaliseeritud oligodendrotsüütide rakuliin, mis saadi spontaanselt primaarsetest A2B5 oligodendrotsüütide prekursoritest. CG4 rakud on tavaliselt kasutatavaks rakuliiniks oligodendrotsüütide diferentseerumise või elumuse uurimisel. CG4 rakuliinil on järgmised eelised:

- kõrge proliferatsioonimäär, nagu oligodendrotsüütide progeniitoritelgi (O2A sarnane) (GD3, A2B5-positiivsed rakud),
- madalad hoolduskulud konditsioneeritud söötmes (kasvufaktorite efektiivsete kontsentratsioonidega), mis on saadud B104 roti neuroblastoomi rakuliinist (Louis, J. C. *et al.*, 1992), mis saadakse ATCC-st,
- ettenähtud söödet (ilma FBS-ta) võib kasutada (täiendatud FGF2 + PDGF-ga) B104 konditsioneeritud söötmel proliferatsiooniks lühikeste perioodide jooksul,
- määratletud söötmega võib käivitada diferentseerumist oligodendrotsüütideks (O4, GalC-positiivsed),
- diferentseerumist astrotsüütideks (GFAP-positiivsed) võib käivitada FBS manulusel.

20 Testimaks kahe OPN-valgu (ekspresseeritud *E. coli* või putukarakkudes) toimet proliferatsioonile passaažiti CG4 rakke 35 korda. Selles testis kasutati R&D System *E. coli* produtseeritud osteopontiini (Cat. 441-OP), mis seejärel fosforüülitati *in vitro* proteiini kinaasiga 2 (GST-ga sulandatud) 60 µl mahus järgmiselt:

| <u>Kinaasipuhver 6-kordne</u> | <u>Proovipuhver 2-kordne, pH 6</u> |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 25 HEPES 50 mM                | Tris-Cl 0,125                      |
| MgCl <sub>2</sub> 10 mM       | glütserool 20%                     |
| DTT 1 mM                      | DTT 0,2 M                          |
| naatriumvanadaat 0,2 mM       | bromofenoolsinine 0,02%            |
| beeta-glütseroolfosfaat 25 mM |                                    |

ATP segu (60  $\mu$ M)30  $\mu$ l ATP 600  $\mu$ M5  $\mu$ l  $^{32}$ P-ATP265  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- 5 Reaktsiooni alustamiseks lisati ATP segu ja inkubeerimine toimus temperatuuril 30 °C 1 tund. Pärast 90-minutilist inkubeerimist temperatuuril 30 °C (segamisega) lisati reaktsioonisegule 100  $\mu$ l glutatiooni-Sepharose terasid (Pharmacia), mida pesti eelnevalt PBS-s proteiini kinaasi elimineerimiseks. Seejärel inkubeeriti segu üks tund toatemperatuuril kerge segamisega. Suspensiooni tsentrifugeeriti terade sadestamiseks
- 10 kiirusega 500 g 5 minutit. Seejärel dialüüsiti supernatanti üleöö temperatuuril 4 °C PBS vastu. Valk kvantifitseeriti BCA-ga (Pierce).

Kinaasireaktsioon10  $\mu$ l kaseiinkinaasi 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l10  $\mu$ l *E. coli* OPN 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l

- 15 20  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl pH 8

10  $\mu$ l kinaasipuhvrit, 6-kordset10  $\mu$ l ATP segu.Proliferatsioonitest

- BacOPN ja *in vitro* fosforüülitud OPN-valkude toimet CG4 rakkude proliferatsioonile
- 20 testiti 10 pM, 10 nM ja 100 nM kontsentratsioonidega. Lugemite saamiseks kasutati BrdU (Amersham), nagu kirjeldavad Avellana *et al.*, 1996. Rakke kultiveeriti 70% N1 määratletud söötmes (DMEM, mis sisaldas 4,5 g/l glükoosi, 2 mM glutamiini, 100 U/ml penitsilliini, 100  $\mu$ g/ml streptomütsiini ja 1 mM naatriumpüruvaati ning millele oli lisatud
- 5  $\mu$ g/ml transferriini, 100 mM putrestsiini, 30 nM naatriumseleniiti ja 10 ng/ml biotiini)
- 25 ning 30% B104 konditsioneeritud söötmes (N1 ilma biotiinita) (Louis, J. C. *et al.*, 1992). Test teostati poliornitiiniga (100  $\mu$ g/ml) töödeldud 24 süvendiga plaatidel, millele külvati
- 3  $\times 10^4$  rakku süvendi kohta. Samal ajal lisati 10 nM BrdU ja rakke inkubeeriti 18 tundi. Pärast fikseerimist teostati immunotsütokeemia BrdU-vastase antikehaga, detekteerimaks
- rakkude jagunemist. Rakud värviti ka Hoechst 44432 värviga (Sigma), võimaldamaks
- 30 lugeda rakkude koguarvu. Saadi kujutised ja analüüsiti Leica Qwin kujutise analüüsi süsteemiga.

### Tulemused

Tulemused on toodud joonisel fig 13.

5 Bakuloviiruses ekspresseeritud osteopontiin põhjustab CG4 rakkude suurenenud prolifererumist. Kõige ilmekamat toimet võib täheldada OPN kontsentratsiooniga 10 nM, kuigi 100 nM OPN põhjustab samuti prolifererumist. *In vitro* fosforüülitud, *E. coli*'s ekspresseeritud OPN põhjustab CG4 rakkude vähest prolifererumist.

10 OPN-ga töödeldud *versus* töötlemata CG4 rakkude morfoloogia analüüs näitas, et kui kontrolli puhul ei täheldatud mingit diferentseerumist, diferentseerusid OPN-ga töödeldud CG4 rakud, nii et enamikul rakkudest tekkisid jätked. Kuigi diferentseerumine oli ilmekam bakuloviiruses ekspresseeritud OPN-ga põhjustab *E. coli*'s ekspresseeritud, *in vitro* fosforüülitud OPN samuti CG4 rakkude diferentseerumist (ei ole näidatud).

### TEOSTUSNÄIDE 11

#### Osteopontiini toimed MOG-ga tekitatud eksperimentaalsele autoimmuun-entsefalomüeliidile (EAE) hiirtel

#### 15 Uuringu eesmärk

Osteopontiin (OPN, AS900011) on tsütokiin, millel on pleiotroopsed funktsioonid, kaasa arvatud mitmesuguste rakutüüpide adhesioonis, migreerumises, diferentseerumises, elumuses ja tsütokiini sekretsioonis. OPN identifitseeriti diferentsiaalse geeniekspressiooni (DGE) meetodiga eesmärgiga detekteerida geene, mis võiksid reguleerida remüeliniseerumist ja oligodendrotsüütide funktsiooni (vt teostusnäide 1). Oligodendrotsüütide prekursorite töötlemine rekombinantse bakuloviiruses ekspresseeritud OPN-ga (AS900011) suurendas proliferatsiooni annusest sõltuval viisil ( $IC_{50}$ : 3,7 pM, vt teostusnäide 7). Lisaks avaldas AS900011 toimet CG4 rakuliini ja primaarsete neurosfäärade diferentseerumisele. OPN ekspresseeritakse kuprisooniga töödeldud hiirte demüeliniseeritud mõhnkehas ajupiirkonnas, kus ekspressioon oli tugevaim mikroglia rakkudes (vt teostusnäide 1). Lisaks täheldati OPN ekspressiooni subventrikulaarses tsoonis (SVZ), mis arvatakse produtseerivat oligodendrotsüütide prekursoreid, mis osalevad remüelineerimises (vt teostusnäide 4). Arvatakse, et OPN, mitmesuguste



immunoregulaatorsete omadustega tsütokiin, võib mängida rolli ka närvi- ja gliiarakkude funktsioonide modulaatorina.

Selle uuringu eesmärgiks oli testida OPN terapeutilist toimet MOG-ga tekitatud EAE-le hiirtel.

#### 5 Testimismeetod

Selles uuringus kasutatud EAE indutseerimise meetod on kohandatud protokollist, mille avaldasid Sahrbacher *et al.* (1998). Eksperimendis kasutatud loomade kaitsmine toimus vastavalt juhistele 86/609/EEC, mis on kehtestatud Itaalia D.L. nr 116 poolt 27. jaanuaril 1992. Füüsilised vahendid ja varustus loomade majutamiseks ning nende eest hoolitsemiseks on vastavuses EEC nõukogu juhise 86/609 sätetega. Instituudil on täielik  
10 luba kompetentse Veterinaarervishoiu Ameti poolt. Kõik selle loomade ees hoolitsemist käsitleva eeskirja osad on heaks kiidetud veterinaarametnike poolt. See eeskiri on täielikult heks kiidetud Itaalia Tervishoiuministeeriumi poolt (määrus nr 51/99-B).

#### Testimissüsteem

#### 15 Liik, tüvi, alatüvi ja sugu

C57 BL/6JICO emased hiired IFFA CREDO (Saint Germain sur I'Arbresle, Prantsusmaa) kolooniast saadi firma Charles River Italia (Calco, Lecco, Itaalia) kaudu.

#### Testsüsteemi valiku põhjendus

C57 BL/6JICO hiired valiti eksperimentaalseks mudeliks, see valitud tüvi on  
20 dokumenteeritud kui EAE suhtes tundlik.

#### Varustaja

Charles River Italia S.p.A.

Via Indipendenza, 11

23885 - Calco (Lecco)

#### 25 Aklimatiseerumine

Vähemalt 5 päeva enne uuringu alustamist. Sellel perioodil jälgitakse loomi iga päev, kindlustamaks nende sobivust uuringuks.

Vanus ja kehamass (randomiseerimisel)

Ligikaudu 8 nädala vanused, 18-22 g.

Majutamine

10 looma puuris õhukonditsioneeriga ruumides,

5 temperatuur:  $+22\text{ °C} \pm 2$ ,

suhteline niiskus:  $55\% \pm 10$ ,

õhuvahetus: ligikaudu 15-20/tunnis, filtritud HEPA 99,99%,

valgus: 12-tunnine tsükkel (7 a.m. – 7 p.m.),

10 puur: Makrolon<sup>®</sup> puur  $42,5 \times 26,6 \times 15$  cm, igäüks varustatud roostevabast terasest katte-  
toidurestiga. Puuri põhja on pandud võre. Jäägid, mis kukuvad läbi võre puuri põhja,  
eemaldatakse perioodiliselt.

Loomade indetifitseerimine

Kõrvamärgise abil. Puuri kaart, kus on toodud eksperimendi number, annuse rühm ja  
ühendi manustamise kuupäev.

15 Toit

GLP 4RF25 kõrgeima tunnistusega granuleeritud toit, mis on valmistatud Charles River  
Italia toidulitsentsiaadi Mucedola S.r.l., Settimo Milanese poolt. Kergendamaks haigete  
loomade söömist, asetati alates päevast 7 märjad graanulid iga päev puuri põhja.  
Valmistaja annab toitainete ja saasteainete analüüsi sertifikaadi, mille tasemed on  
20 piirangute sees, mida soovitasid EPA-TSCA (44FR: 44053 - 44093, 26. juuli, 1979). RBM  
on loomade toitu uuesti analüüsinud vähemalt kaks korda aastas bakteriaalse saastuse  
suhtes. Toit on loomadele saadav "*ad libitum*".

Vesi

25 Kohalikust põhiveevärgist. Vesi filtritakse ja jagatakse loomadele "*ad libitum*" automaatse  
klappsüsteemi abil. Lisaks automaatsele jootmissüsteemile kasutatakse plastpudeleid.  
Perioodiliselt analüüsitakse joogivett mikrobioloogiliste, raskmetallide, teiste saasteainete  
(nt lahustid, pestitsiidid) näitude ja teiste keemiliste ja füüsikaliste omaduste suhtes.  
Joogivee kvaliteedi vastuvõetavuse piirid on need, mis on määratletud EEC juhistes  
80/778.

Loodetakse, et saasteaineid, mis võiksid takistada uuringu eesmäärke, toidus ja joogiveses ei esine.

Testitavad ained

Hiire 6-His märgisega osteopontiin (AS900011) ja mIFN $\beta$ .

#### 5 Immuniseerimismeetod

Hiired immuniseeriti (päev = 0) 0,2 ml emulsiooni, mis sisaldas 200  $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub> peptiidi (Neosystem, Strasbourg, Prantsusmaa) Freundi täisadjuvandis (CFA, Difco, Detroit, USA), mis sisaldas 0,5 mg *Mycobacterium tuberculosis*'t s.c. süstimisega vasakusse külge. Kohe selle järel said nad i.p. süstimise teel 500 ng läkakõhatoksiini (List Biological Lab., 10 Campbell, CA, USA), mis oli lahustatud 400  $\mu$ l puhvrts (0,5 M NaCl, 0,017% Triton X-100, 0,015 M Tris, pH = 7,5). 2. päeval süstiti loomadele teist korda i.p. 500 ng läkakõhatoksiini. 7. päeval said hiired teise 200  $\mu$ g annuse MOG<sub>35-55</sub> peptiidi CFA-s, mis süstiti s.c. paremasse külge. Alates ligikaudu päevast 8-10, põhjustab see protseduur järkjärgult progresseeruva halvatus, mis algab sabast ja tõuseb eesjäsemeteni.

#### 15 Uuringu plaan

Uuring hõlmas 7 rühma, igas 15 looma. Kõik rühmad immuniseeriti MOG<sub>35-55</sub> peptiidiga CFA-s ja läkakõhatoksiiniga vastavalt immuniseerimiseeskirjale ning raviti järgmiselt:

1. rühm: positiivse kontrolli rühm, kellele manustati s.c. ainult OPN vehiiklit (PBS + 0,1% BSA).
- 20 2. rühm: positiivse kontrolli rühm, kellele manustati s.c. ainult mIFN- $\beta$  vehiiklit üksi (PBS).
3. rühm: manustati s.c. 1  $\mu$ g/kg osteopontiini (AS900011).
4. rühm: manustati s.c. 10  $\mu$ g/kg osteopontiini (AS900011).
5. rühm: manustati s.c. 100  $\mu$ g/kg osteopontiini (AS900011).
- 25 6. rühm: manustati s.c. 100  $\mu$ g/kg osteopontiini (AS900011) ja 20 000 ühikut hiire kohta s.c. mIFN- $\beta$ .
7. rühm: manustati 20 000 ühikut hiire kohta s.c. mIFN- $\beta$ .

Loomade arvuks rühmas on minimaalne arv, mis võimaldab täheldatud farmakoloogiliste toimete õiget hindamist.

## Vehiikel

Osteopontiini lahjendamiseks sobiva kontsentratsioonini kasutatakse PBS + 0,1% BSA. PBS kasutatakse mIFN- $\beta$  lahjendamiseks sobiva kontsentratsioonini.

## Manustamisviis

- 5 Osteopontiin (AS900011) annuses 1, 10 ja 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  manustati s.c. mahus 10 ml/kg. mIFN- $\beta$  annuses 20 000 ühikut hiire kohta manustati s.c. mahus 200  $\mu\text{l}$  hiire kohta. 1. rühmale manustatakse s.c. PBS + 0,1% BSA mahus 10 ml/kg ja 2. rühmale manustatakse s.c. 200  $\mu\text{l}$  PBS-i hiire kohta.

## Ravi kestus

- 10 Selle uuringu ravirühmade ravi alustati iga looma puhul kliinilise tulemuse  $\geq 1$  ilmnemisel ja seejärel jätkatakse 35 järjestikusel päeval.

## Manustamisvorm

Ühend ja mIFN- $\beta$  manustati lahustena sobivas vehiiklis. Vastavad preparaadid valmistati vastavalt sponsori juhtnööridele.

## 15 Kliinilised vaatlused

Alates 7. immuniseerimisjärgsest päevast uuriti loomi individuaalselt halvatusesinemise suhtes kliinilise skoori järgi järgmiselt:

- 0 = haigusnähtude puudumine,  
 0,5 = saba osaline halvatus,  
 1 = saba halvatus,  
 1,5 = saba halvatus + osaline ühepoolne tagajäsemete halvatus,  
 2 = saba halvatus + tagajäsemete nõrkus või tagajäsemete osaline halvatus,  
 2,5 = saba halvatus + tagajäsemete osaline halvatus (allpool vaagnat),  
 3 = saba halvatus + tagajäsemete täielik halvatus,  
 3,5 = saba halvatus + tagajäsemete täielik halvatus + kusepidamatus,  
 4 = saba halvatus + tagajäsemete halvatus + esijäsemete nõrkus või osaline halvatus,  
 5 = suremas või surnud.

Loomade jälgimine toimus vaikselt ruumis. Kliinilisi nähte jälgiti iga päev igas ravirühmas pimeviisil spetsialisti poolt, kes ei teadnud ravidest midagi.

- 30 Loomade kehamassi jälgiti iga päev.

Loomi, kes loeti valust kurnatud või suremas olevateks, uuriti veterinaarpersonali või selleks volitatud isikute poolt ja, kui vaja, surmati humaanselt, vähendamaks liigset valu või kannatusi.

#### Vereproovide võtmine

- 5 Kakskümmend tundi pärast viimast ravi võetakse igalt loomalt vereproovid (pentobarbitaalanesteesia all). Seerum eraldatakse rutiinse meetodiga ja seerumiproovid säilitatakse temperatuuril  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Seejärel saadetakse külmutatud seerumid SPRI-sse ühendi kontsentratsiooni suhteliseks määramiseks seerumis.

#### Histopatoloogilised uuringud

- 10 Ravi lõpus perfuseeriti-fikseeriti loomad pentobarbitaali anesteesia all 4% formaldehüüdiga vasaku vatsakese kaudu. Seejärel lõigati nende seljaajud ettevaatlikult välja ja fikseeriti formaliinis. Seljaajulõigud sisestati parafiinplokkidesse. Tehti lõigud ja värviti hematoksüliini ja eosiiniga põletiku, ja Kluver-PAS-ga (Luxol Fast Blue-perjoodhape-Schiffi reagent) demüeliniseerimise detekteerimiseks.
- 15 Andmete hindamine
- Kliiniliste uuringute tulemused igas rühmas väljendatakse keskmise ( $\pm$  S.E.M) skoorina. Testitavate ainete toimeid võrreldi vehiikliga ravitud positiivse kontrollrühma omadega. Erinevusi kliinilise skoori väärtustes rühmade vahel analüüsiti Kruskal-Wallise testiga, millele järgnes olulisuse korral Wilcoxon'i paaristest iga määramisaja puhul. Kehamasse
- 20 hinnati ühemõõtmelise ANOVA-ga, millel järgnes olulisuse korral Tukey test. Kasutatakse S-Plus<sup>®</sup> tarkvara.

#### Tulemused

Selle uuringu tulemused on toodud joonistel fig 14-16.

- 25 Perivaskulaarsete põletikuliste infiltraatide histoloogiline analüüs kinnitas, et OPN-ga ravitud loomadel oli tendents perivaskulaarsete infiltraatide koguse vähenemise suunas, eriti kõige väiksema manustatud annusega  $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ . OPN ja IFN- $\beta$ , mis teatakse avaldavat toimet hulgiskleroosi ravis, kombinatsioon oli efektiivsem kui OPN või IFN üksi manustamine (joonis fig 14).

- 30 Järgmisena määrati demüeliniseerunud piirkondade protsent (jooonis fig 15). Jällegi võis OPN-ga ravitud loomadel täheldada tendentsi vähem demüeliniseerunud piirkondade

suunas. IFN ja OPN kombinatsioon viis demüeliniseerumise kõrgelt olulise vähenemiseni, mis oli isegi palju väiksem kui demüeliniseerumise ulatus, mida täheldati ainult IFN-ga (joonis fig 15).

Joonisel fig 16 võetakse kokku kliinilised skoorid, mida täheldati ravi lõpus, põletikulised infiltraadid ja demüeliniseerumine, mis määrati selles uuringus. Kuigi OPN-ga ravitud hiirtel täheldatud kliinilised skoorid ei olnud oluliselt väiksemad kui kontrollil, avaldas OPN ja IFN kombinatsioon tugevalt väljendunud toimet kliinilistele skooridele, mis oli sama madal kui positiivsel kontrollil interferoonil-beeta. See tähelepanek korreleerus põletikuliste infiltraatide ja demüeliniseerumise ulatuse määramisega. Mõlemad parameetrid olid märkimisväärselt vähenenud pärast OPN ja IFN- $\beta$  manustamist (joonis fig 16).

Kokkuvõttes saadi selles uuringus järgmised tulemused.

Osteopontiin (AS900011), mida testiti üksi annustes 1, 10 ja 100 mg/kg s.c., ei vähendanud statistiliselt oluliselt perivaskulaarseid infiltraatide ja demüeliniseerumist. Ravimine mIFN- $\beta$ -ga (20 000 U/hiir, s.c.) indutseeris perivaskulaarsete infiltraatide (55%) ja demüeliniseerumise (53%) vähenemise. Kui mIFN- $\beta$  sama annus kombineeriti AS900011 annusega 100 mg/kg s.c., täheldati põletikuliste infiltraatide (71%) ja demüeliniseerumise (81%) märkimisväärselt vähenemist.

Histoloogilised andmed korreleeruvad kliiniliste skooridega, mida täheldati 35. päeval (ravi lõpp), kui loomad surmati ja seljaajud koguti histoloogiliseks analüüsiks. Osteopontiin (AS900011), mida testiti üksi annustes 1, 10 ja 100 mg/kg s.c., ei vähendanud oluliselt haiguse raskusastet. Ravimine mIFN- $\beta$ -ga (20 000 U/hiir, s.c.) vähendas oluliselt haiguse raskusastet. Kui mIFN- $\beta$  sama annus kombineeriti AS900011 annusega 100 mg/kg, täheldati kliiniliste nähtude statistiliselt olulist vähenemist.

Need andmed kinnitavad, et osteopontiini ja mIFN kombineeritud ravi on efektiivne nii kliiniliste kui ka patoloogiliste toimete vähendamiseks hiire EAE mudelis, ja seega võib see olla efektiivne hulgiskleroosi ravis.

## TEOSTUSNAIDE 12

Osteopontiini kaitsev toime istmikunärvi aksotoomiaga tekitatud neuropaatialle hiirtelLühendid

CMAP = lihase liittegevuse potentsiaal (*compound muscle action potential*),

5 EMG = elektromüograafia,

IGF1 = insuliini kasvufaktor,

s.c. = subkutaanne,

S.E.M. = keskmine standardviga,

vs = *versus*.

10 Sissejuhatus

Neuropaatiad on tavaliselt selektiivsed, nagu PNS närvirakke (nt sensoorsed *versus* motoorsed) tüüpi ja samuti närvirakkude alatüüpi (väikesed *versus* suured) kahjustavad. Perifeersete närvide aksotoomia on kõige tavalisem loomaldel kasutatav mudel neurotroopsete faktorite neuroprotektiivsete toimete hindamiseks. Traumaatiline

15 närvivigastus, põimiku vigastus ja närvijuure vigastused on tõsised õnnetuste järgsed tüsistused. Peale selle täheldatakse perifeerse närvi kompressiooni, mis võib põhjustada müeliini kahjustust, mis sageli esineb haiguste nagu randmekanali sündroomi korral, või mis on seotud lülisambaga ortopeediliste tüsistustega. Aksotoomia tekitab fenomeni nagu rakusurmgi, vähendades aksonite erutusjuhtivuse kiirust ja muutes neurotransmitterite

20 tasemeid kahjustatud närvirakkudes. Aksotoomiakahjustused alluvad regenereerumisele, täiendavale huvipakkuvale protsessile seoses neuropaatiliste seisunditega (McMahon S. and Priestley J. V., 1995).

Põhiküsimuseks raku neurobioloogias on närvi regenereerumise reguleerimine pärast vigastust või haigust. Funktsionaalseks närvi regeneratsiooniks on vaja mitte ainult aksonijätkete teket ja pikenemist, vaid ka uue müeliini sünteesi. Remüeliniseerumine on

25 vajalik närvi normaalse erutusjuhtivuse taastamiseks ja aksonite kaitsmiseks uute neurodegeneratiivsete immunoloogiliste atakkide eest. Uurimise esmaseks eesmärgiks neurodegeneratiivsete haiguste korral on lõplikult välja töötada vahendid, mis takistavad närvirakkude surma, säilitavad närvirakkude fenotüübi ja parandavad närvirakkude ja

30 müeliini kahjustust. Palju uuringuid on pühendatud molekulaarsete ja rakuliste

mehhanismide, mis vastutavad vigastatud seljaaju motoorsete närvirakkude täieliku regenereerumise eest, lahendamisele (Fawcett *et al.*, 1990; Funakoshi *et al.*, 1993). Vigastusest tekitatud neurotroopsete faktorite ja vastavate retseptorite ekspressioon võib mängida tähtsat osa närvi regeneratsioonivõimes. Varasemad uuringud on näidanud närvi  
 5 regenereerumise märkimisväärset paranemist mitmesuguste peptiidsete ja mittepeptiidsete ühendite toimet, nagu insuliini kasvufaktor (IGF-1), SKTH (Lewis *et al.*, 1993; Strand *et al.*, 1980), testosteroon (Jones, 1993), SR57746A (Fournier *et al.*, 1993) ja 4-metüülkatehool (Kaechi K. *et al.*, 1993, 1995; Hanaoka Y. *et al.*, 1992).

Käesolev uuring teostati närvi regenereerumise hindamiseks hiirtel, keda raviti  
 10 osteopontiiniga erinevates annustes. Selles mudelis viis OPN positiivne toime närvirakkude ja aksonite (sensoorsed ja motoorsed närvirakud) elumusele ja regeneratsioonile, müeliniseerumisele või makrofaagide põhjustatud põletikule, motoorse funktsiooni taastumisele. Regeneratsiooni võib määrata sensorimotoorsete funktsioonide taastumise järgi ja morfoloogilistes uuringutes. Seega teostati käesolevas uuringus  
 15 elektrofüsioloogilised registreerimised ja histomorfomeetriselised analüüsid paralleelselt.

#### Materjalid ja meetodid

##### Loomad

Kasutati 84 8-nädalast emast C57bl/6 RJ hiirt (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Need jagati 7 rühma (n = 12): (a) vehiikel + võltsoperatsioon, (b) vehiikel + närvi  
 20 aksotoomia, (c) närvi aksotoomia/osteopontiin (1 µg/kg), (d) närvi aksotoomia/osteopontiin (10 µg/kg), (e) närvi aksotoomia/osteopontiin (100 µg/kg), (f) närvi aksotoomia/4-metüülkatehool (10 µg/kg), (g) närvi aksotoomia/denatureeritud osteopontiin (100 µg/kg).

Loomad majutati rühmade kaupa (5 looma puuris) ja hoiti kontrollitud temperatuuriga (21-  
 25 22 °C) ning vahelduva valguse-pimeduse tsükliga (12 h/12 h) inkubaatoris, toit ja vesi olid kättesaadavad *ad libitum*. Kõik eksperimendid teostati vastavalt asutuse juhisteile.

##### Istmikunärvi vigastamine

Loomad anestesiti 60 mg/kg ketamiinklorohüdraadi i.p. süstimisega (Imalgène 500<sup>®</sup>, Rhône Mérieux, Lyon, France). Parem istmikunärv paljastati kirurgiliselt reie keskel ja



tehti aksotoomia 5 mm kauguselt proksimaalselt istmikunärvi hargnemise kohaga. Närvi aksotoomia teostati kaks korda 30 sekundi jooksul hemostaasipinsettidega (laius 1,5 mm, Koenig, Strasbourg, France), pöörates iga aksotoomia vahel 90 kraadi.

#### Eksperimentide planeerimine ja farmakoloogiline ravi

- 5 Elektromüograafiline (EMG) testimine teostati vahetult enne operatsioonipäeva (algfase) ja iga nädal kolme nädala jooksul pärast operatsiooni.

Närvi aksotoomia päev võeti päevaks (P) 0. Neli päeva pärast aksotoomiat testi ei teostatud.

Iga päev registreeriti kehamassid ja elumuse määr.

- 10 Närviviigastuse päevast kuni uuringu lõpuni manustati osteopontiini ja denatureeritud osteopontiini iga päev s.c., kuna 4-metüülkatehhooli süstimine toimus i.p.

Alates 4. nädalast surmati igast rühmast 4 looma ja istmikunärv lõigati morfoloogiliste analüüside tegemiseks välja.

#### Elektrofüsioloogilised registreerimised

- 15 Elektrofüsioloogilised registreerimised teostati Neuromatic 2000M elektromüograafia (EM) (Dantec, Les Ulis, France). Hiired anesteetsiti 100 mg/kg ketamiinklorohüdraadi (Imalgène 500<sup>®</sup>, Rhône Mérieux, Lyon, France) intraperitoneaalse süstimisega. Normaalne kehatemperatuur 30 °C säilitati soojenduslambiga ja kontrolliti kontaktermomeetriga (Quick, Bioblock Scientific, Illkirch, France), mis asetati sabale.
- 20 Lihase liittegevuse potentsiaal (CMAP) mõõdeti kaksik-sääremarjalihases pärast istmikunärvi ühekordset 0,2 ms ärritamist supramaksimaalse intensiivsusega (12,8 mA). Mõõdeti tegevuspotentsiaali amplituud (mV), latentsusaeg (ms) ja kestus (aeg, mis on vajalik depolarisatsiooni- ja repolarisatsioonperioodiks). Amplituud on aktiivsete motoorsete ühikute arvu näitajaks, samal ajal kui distaalne latentsusaeg peegeldab kaudselt
- 25 motoorse närvi erutusjuhtivust ja neuromuskulaarse transmissiooni kiirust.

### Morfomeetiline analüüs

Morfomeetiline analüüs teostati 3 nädalat pärast närvi aksotoomiat. Selles analüüsis kasutati igast rühmast nelja juhuslikult valitud looma. Loomad anesteetsiti 100 mg/kg Imalgène 500<sup>®</sup> i.p. süstimisega. Histoloogiaks lõigati 5 mm istmikunärvi lõigud. Kude fikseeriti üleöö 4% glutaaraldehüüdi vesilahusega (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, France) fosfaatpuhvri lahuses (pH = 7,4) ja säilitati 30% sahharoosis temperatuuril 4 °C kuni kasutamiseni. Närv fikseeriti 2% osmiumtetroksiidis (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, France) fosfaatpuhvris 2 tundi ja dehüdreeriti seerialiselt lahjendatud alkoholilahustega ning sisestati Epon-sse. Seejärel pandi sisestatud koed polümeriseerumiseks temperatuurile 70 °C kolmeks päevaks. Mikrotoomiga tehti 1,5 µm ristlõigud, värviti 1% toluidiinsinisega (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, France) 2 minutit ja dehüdreeriti ning asetati Eukitti. Uuriti 20 lõiku proovi kohta, kasutades optilist mikroskoopi (Nikon, Tokyo, Japan) ja morfomeetiline analüüs teostati 6 juhuslikult valitud lõiguga ühe närviproovi kohta poolautomaatse digitaalse kujutise analüüsi tarkvaraga (Biocom, France). Lõigu kohta uuriti kahte välja. Arvutati järgmised parameetrid: degenereerunud kiudude protsent (välja kohta) ja kogu kiudude arv.

### Andmete analüüs

Teostati andmete täielik analüüs, kasutades ühe teguri või korduvmõõtmiste dispersioonianalüüsi (ANOVA) ning ühepoolset ANOVA-t ning mitteparameetrilisi teste (Mann-Whitney test). Dunnetti testi kasutati samuti, kui sobis. Olulise tase määrati p väärtusega < 0,05. Tulemused väljendati keskmisena ± keskmine standardviga (S.E.M).

### Tulemused

Kõik loomad elasid pärast närvi aksotoomia protseduure. Hiired (närvi aksotoomia/vehiikel n° 2) surid 7. päeval ja 2 (vehiikel/võltsopereeritud, N° 3 ja N° 6) 14. päeval anesteesia tagajärjel EMG uuringu ajal.

Loomade kehamass

Nagu selgitatud joonisel fig 7, täheldati kogu uuringu jooksul märkimisväärset rühmadevahelist kehamassi suurenemist [ $F(6,132) = 1,93$  ja  $p < 0,001$ ; korduvmõõtmistega ANOVA].

- 5 Kõikides erinevates rühmades esines kehamassi uuringu käigus suurenemine.

Elektrofüsioloogilised määramisedLihase liittegevuse potentsiaali amplituud (joonis fig 18)

CMAP amplituudis esines kogu uuringu jooksul oluline rühmadevaheline erinevus [ $F(6,18) = 49,185$  ja  $p < 0,001$ ; korduvmõõtmistega ANOVA] (joonis fig 19).

- 10 Pärast närvivigastust esines kõikidel loomadel, kellele tehti närvi aksotoomia, oluline CMAP amplituudi alanemine võrreldes võltsopereeritud loomade rühmaga ( $p < 0,001$ , Dunnetti test).

Peale selle oli päeval 7 ja päeval 14 CMAP amplituud osteopontiiniga annuses  $100 \mu\text{g/kg}$  või 4-metüülkatehooliga annuses  $10 \mu\text{g/kg}$  ravitud hiirtel oluliselt kõrgem kui ainult närvi aksotoomia/vehiikli rühmas ( $p < 0,05$ , Dunnetti test).

- 15

Olulisi erinevusi ei esinenud närvi aksotoomia/vehiikli rühma ja närvi aksotoomia/D-osteopontiini  $100 \mu\text{g/kg}$  rühma vahel.

Lihase liittegevuse potentsiaali latentsusaeg (joonis fig 19)

Nagu selgitatud joonisel fig 20, esines kogu uuringu jooksul CMAP latentsusajas oluline rühmadevaheline erinevus [ $F(6,18) = 2,521$  ja  $p < 0,001$ ; korduvmõõtmistega ANOVA].

- 20 Päeval 21 esines närvi aksotoomiaga rühmades suurenenud CMAP latentsusaeg võrreldes võltsopereeritud rühmaga ( $p < 0,001$ , Dunnetti test). Peale selle esines osteopontiinraviga annustes  $10$  ja  $100 \mu\text{g/kg}$  oluline toime, latentsusaeg nendes rühmades oli tõepoolest oluliselt väiksem kui ainult närvi aksotoomia/vehiikli rühmas ( $p < 0,017$ , Dunnetti test).

- 25 Olulisi erinevusi ei esinenud närvi aksotoomia/vehiikli rühma ja närvi aksotoomia/D-osteopontiini  $100 \mu\text{g/kg}$  rühma vahel.

Lihase liittegevuse potentsiaali kestus (joonis fig 20)

CMAP kestuses esines kogu uuringu jooksul oluline rühmadevaheline erinevus [ $F(6,18) = 25,15$  ja  $p < 0,001$ ; korduvmõõtmistega ANOVA] (joonis fig 20).

Alates päevast 7 täheldati närvi aksotoomiaga rühmades (võltsopereeritud rühm *versus* 5 närvi aksotoomiaga rühm,  $p < 0,001$  Dunnetti test) CMAP kestuse olulist suurenemist. Peale selle esines päeval 7 närvi aksotoomia/osteopontiini 100 µg/kg rühmas kestus oluliselt lühem, kui ainult närvi aksotoomia/vehiikli rühmas ( $p < 0,001$ , Dunnetti test).

Päeval 14 ja päeval 21 esines kolmes rühmas: (a) närvi aksotoomia/osteopontiin 10 µg/kg, (b) närvi aksotoomia/osteopontiin 100 µg/kg, (c) närvi aksotoomia/4-metüülkatehool 10 µg/kg, kestuse oluline vähenemine võrreldes närviaksotoomia/vehiikli rühmaga. 10

Peale selle ei esinenud olulisi erinevusi närvi aksotoomia/vehiikli rühma ja närvi aksotoomia/D-osteopontiin 100 µg/kg rühma vahel.

Morfomeetiline analüüsDegeneraerunud kiudude protsent (joonis fig 21)

15 Statistiline analüüs kinnitas olulist rühmadevahelist erinevust degeneraerunud kiudude protsendis välja kohta ( $p < 0,001$ , ühemõõtmeline ANOVA) (joonis fig 22). Kõikides närvi aksotoomiaga rühmades esines degeneraerunud kiudude protsendi oluline suurenemine ( $p < 0,001$ , Dunnetti test). Peale selle oli närvi aksotoomia/ravitud rühma hiirtel see protsent oluliselt madalam kui närvi aksotoomia/vehiikli rühmas ( $p < 0,001$ , Dunnetti test). Peale 20 selle oli D-osteopontiiniga ravitud rühmas degeneraerunud kiudude protsent suurem kui osteopontiiniga ravitud rühmades ( $p < 0,001$ , Dunnetti test).

Kogu kiudude arv (joonis fig 22)

Lõike uuriti optilise mikroskoobiga ja morfomeetiline analüüs teostati Visiolab 2000 tarkvara abil (Biocom, Paris, France). Analüüsiti 5 lõiku looma kohta, igat 2 väljal. 25 Arvutiga registreeriti ainult funktsionaalsed müeliniseeritud kiud (ühtegi müeliintupe degeneraerumisega degeneraerunud kiudu ei registreeritud).

Järeldused

Närvi aksotoomia mudel on väga dramaatiline perifeerse neuropaatia mudel. Vahetult pärast närvi aksotoomiat kaob enamike suure läbimõõduga kiude tingituna mehhaanilisest kahjustusest, mis viib tugeva CMAP amplituudi alanemisele. CMAP-i latentsusaeg ei  
5 kahjustu kohe, kuid näitab suurenemist 21. päeval, tingituna väikese läbimõõduga kiudude järgnevast täiendavast kahjustusest, immuunvahendatud degeneratsioonist (makrofaagid, granulotsüüdid). CMAP kestus suureneb 7 päevaga, saavutades maksimumi päeval 14 ja jõuab päeval 21 tasemele, mis on võrreldav 7. päeva omaga. See on tingitud faktist, et 21 päevaga hakkavad närvi aksotoomia kohad regenereruma, täiendav huvipakkuv protsess  
10 seoses neuropaatiliste seisunditega. Seda aksonijätkete tekkimist/regenererumist täheldati kolme nädala möödumisel ka kontrollrühmas.

Osteopontiin avaldas kaitsvat toimet närvi aksotoomia mudelis hiirtel. Sensorimotoorsed funktsioonid olid oluliselt taastunud 7., 14. ja 21. päeval pärast vigastuse tekitamist annusest sõltuval viisil ja morfoloogilised uuringud, mis teostati 21. päeval pärast  
15 vigastuse tekitamist näitasid degenererunud kiudude protsendi alanemist ja kogu kiudude arvu suurenemist. OPN on sama efektiivne kui selles uuringus kasutatud kontrollmolekul, 4-metüülkatehool ja kuumusega inaktiveeritud, degenereritud OPN-valk ei avaldanud mingisugust olulist toimet funktsionaalsetele või histoloogilistele parameetritele. See positiivne toime funktsionaalsele ja histoloogilisele taastumisele võib olla tintitud OPN  
20 toimetest:

kiudude otsesele kaitsmisele sekundaarse immuunvahendatud degeneratsiooni eest,  
kiirenenud remüeliniseerimisele ja aksonite kaitsesele,  
kiirenenud regenererumisele/kahjustatud aksonite jätkete tekkimisele,  
suurenenud müeliiniriismete kõrvaldamisele makrofaagide poolt.

## 25 VIITED

1. Abramsky, O., Ovadia, H. *Frontiers in Multiple Sclerosis, clinical research and therapy*. Martin Dunitz publisher, London, 1997.
2. Altschul S. F. *et al.* *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410, 1990; Altschul S. F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25, 389-3402, 1997.

3. Barres, B. A., Raff, M. C. Axonal control of oligodendrocyte development. *Journal of Cell Biology* 1999, 147 (6), 1123-8.
4. Barres, B. A., Schmid, R., Sendtner, M., Raff, M. C. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development*, 1993, 118 (1), 283-95.
- 5 5. Bjartmar, C., Yin, X., Trapp, B. D. Axonal pathology in myelin disorders. *Journal of Neurocytology*, 1999, 28, 383-395.
6. Brighton, B., Hayden M. R., *S. Afr. Med. J.*, 1981 Feb 21, 59 (8), 250.
7. Dal Canto, M. C., Melvold R. W., Kim, B. S., Miller, S. D. Two models of multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison. *Microsc. Res. Tech.*, 1995, 32 (3), 215-29.
- 10 10. Derynk R. *et al.* *Nature*, 1980, 285, 542-547.
9. Devereux J. *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 387-395.
10. Dubois-Dalcq, M., Feigenbaum, V., Aubourg, P. The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends of Neuroscience*, 15 1999, 22 (1), 4-12.
11. Dubois-Dalcq, M., Murray, K. Why are growth factors important in oligodendrocyte physiology? *Pathol. Biol. (Paris)*, 2000, 48 (1), 80-6.
12. Fernandez, P. A., Tang, D. G., Cheng, L., Prochiantz, A., Mudge A. W., Raff, M. C. Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron*, 2000, 28 (1), 81-90.
- 20 13. Franklin, R. J., Hinks, G. L. Understanding CNS remyelination: clues from developmental and regeneration biology. *Journal of Neuroscience Research*, 1999, 58 (2), 207-13.
- 25 14. Grantham, *Science*, 1974, 185, 862-864.

15. Grinspan, J. B., Reeves, M. F., Coulaloglou, M. J., Nathanson, D., Pleasure, D. Re-entry into the cell cycle is required for bFGF-induced oligodendroglial dedifferentiation and survival. *Journal of Neuroscience Research*, 1996, 46 (4), 456-64.
16. Grinspan, J. B., Stern, J. L., Franceschini, B., Pleasure, D. Trophic effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on differentiated oligodendroglia. A mechanism for regeneration of the oligodendroglial lineage. *Journal of Neuroscience Research*, 1993, 36 (6), 672-80.
17. Hajihosseini, M., Tham, T. N., Dubois-Dalcq, M. Origin of oligodendrocytes within the human spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 1996, 16 (24), 7981-94.
- 10 18. Hartung, H. P., van der Meche, F. G., Pollard, J. D. Guillain-Barre syndrome, CIDP and other chronic immune-mediated neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.*, 1998, 11, 497-513.
19. Hiremath, M. M., Saito, Y., Knapp, G. W., Ting, J. P., Suzuki, K., Matsushima, G. K. Microglial/macrophage accumulation during Cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology*, 1998, 92 (1-2), 38-49.
- 15 20. Ichikawa H., Itota T., Nishitani Y., Torii Y., Inoue K., Sugimoto T. *Brain. Res.*, 2000 Apr 28., 863 (1-2), 276-81.
21. Jung, M., Krämer, E., Grzenkowski, M., Tang, K., Blakemore, W. F., Aguzzi, A., Khazaie, K., Chlichlia, K., von Blankenfeld, G., Kettenmann, H., Trotter, J. Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Neuroscience*, 1995, 7 (6), 1245-65.
- 20 22. Kiefer *et al.* The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin. *Nucleic Acids Res.*, 1989 Apr 25, 17 (8), 3306.
- 25 23. Kon S., Maeda M., Segawa T., Hagiwara Y., Horikoshi Y., Chikuma S., Tanaka K., Rashid M. M., Inobe M., Chambers A. F., Uede T. Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *Journal of Cellul Biochemistry*, 2000, 77 (3), 487-98.

24. Kon S., Yokosaki Y., Maeda M., Segawa T., Horikoshi Y., Tsukakoshi H., Rashid M. M., Morimoto J., Inobe M., Shijubo N., Chambers A. F., Uede T. Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2002, 84 (2), 420-32.
- 5 25. Kunicki, T. J., Annis D. S., Felding-Habermann, B. Molecular determinants of arg-gly-aspartic acid ligand specificity for  $\beta 3$  integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (7), 4103-7.
26. Lee *et al.* Transient upregulation of osteopontin mRNA in hippocampus and striatum following global forebrain ischemia in rats. *Neurosci. Lett.*, 1999 Aug 20, 271 (2), 81-4.
- 10 27. Lipton S. A., Rosenberg P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.*, 1994, 330, 613-22.
28. Loius J. C., Magal E., Muir D., Manthorpe M., Varon S. CG-4 A new bipontial glial cell line from rat brain, is capable of differentiating *in vitro* into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes. *J. Neuroscience Research*, 1992, 31, 193-204.
- 15 29. Lubetzki, C., Demerens, C., Anglade, P., Villaroya, H., Frankfurter, A., Lee, M. Y., Zalc, B. Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1993, 90, 6820-6824.
30. Marchionni, M. A., Cannella, B., Hoban, C., Gao, Y. L., Garcia-Arenas, R., Lawson, D., Happel, E., Noel, F., Tofilon, P., Gwynne, D., Raine, C. S. Neuregulin in neuron/glial interactions in the central nervous system. GGF2 diminishes autoimmune demyelination, promotes oligodendrocyte progenitor expansion, and enhances remyelination. *Advances in Experimental and Medical Biology*, 1999, 468, 283-95.
- 20 31. Mark *et al.* (Mark D. F. *et al.*) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1984, 81 (18), 5662-5666.
- 25 32. Matthieu, J. M., Comte, V., Tomic, M., Honegger, P. Myelin gene expression during demyelination and remyelination in aggregating brain cell cultures. *Journal of Neuroimmunology*, 1992, 40 (2-3), 231-4.



33. McDonald, J. W., Althomsons, S. P., Hyrc, K. L., Choi, D. W., Goldberg, M. P. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat. Med.*, 1998, 4, 291-7.
34. Morell, P., Barrett, C. V., Mason, J. L., Toews, A. D., Hostettler, J. D., Knapp, G. W.,  
5 Matsushima, G. K. Gene expression in brain during Cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1998, 12 (4/5), 220-227.
35. Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., Van  
Evercooren, A. B. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate,  
migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *European Journal*  
10 *of Neuroscience*, 1999, 11 (12), 4357-66.
36. Ng, W. P., Cartel, N., Roder, J., Roach, A., ja Lozano, A. Human central nervous  
system myelin inhibits neurite outgrowth. *Brain Research*, 1996, 720 (1-2), 17-24.
37. Noseworthy, J. H. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis.  
*Nature*, 1999 399, A40-A47.
- 15 38. Oldberg *et al.* Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin)  
cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*,  
1986, Dec. 83 (23), 8819-23.
39. Pantoni, L., Garcia, J. H., ja Gutierrez, J. A. Cerebral white matter is highly vulnerable  
to ischemia. *Stroke*, 1996, 27, 1641-6.
- 20 40. Pearson W. R. *Methods in Enzymology*, 1990, 183, 63-99.
41. Pearson W. R., Lipman D. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 2444-2448.
42. Petry, K. G., Boullerne, A. I., Pousset, F., Brochet, B., Caille, J. M., Dousset, V.  
Experimental allergic encephalomyelitis animal models for analyzing features of  
multiple sclerosis. *Pathol. Biol. (Paris)*, 2000, 48 (1), 47-53.
- 25 43. Pohlau, D., Aktas, O., Epplen, C., Hartung, H. P., Hoffmann, V., Przuntek, H.  
Promoting remyelination as a future therapeutic principle in Multiple Sclerosis.  
*Nervenarzt*, 1998, 69, 841-850.

44. Prineas, J. W., Barnard, R. O., Kwon, E. E., Sharer, L.R., Cho, E. S. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Annals of Neurology*, 1993, 33 (2), 137-51.
45. Rodriguez-Peña, A. Oligodendrocyte development and thyroid hormone. *Journal of Neurobiology*, 1999, 40 (4), 497-512.
- 5 46. Rogister, B., Ben-Hur, T., Dubois-Dalcq, M. From neutral stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1999, 14 (4-5), 287-300.
47. Sahrbacher, U. C., Lechner, F., Eugster, H. P., Frei, K., Lassmann, H., Fontana, A. Mice with an inactivation of the inducible nitric oxide synthase gene are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, 1998, 10 28 (4), 1332-8.
48. Saitoh Y., Kuratsu J., Takeshima H., Yamamoto S., Ushio Y. Expression of osteopontin in human glioma, correlation with the malignancy. *Laboratory Investigations*, 1995, 72 (1), 55-63.
49. Scarlato, M., Beesley, J., Pleasure, D. Analysis of oligodendroglial differentiation using cDNA arrays, *Journal of Neuroscience Research*, 2000, 59 (3), 430-5. 15
50. Scherer, S. S. Molecular genetics of demyelination: new wrinkles on an old membrane. *Neuron*, 1997, 18, 13-16.
51. Scolding, N., Lassmann, H. Demyelination and remyelination. *Trends in Neuroscience*, 1996, 19 (1), 1-2.
- 20 52. Shaw, C. E., Milner, R., Compston, A. S., French-Constant, C. Analysis of intergrin expression on oligodendrocytes during axo-glial interaction by using rat-mouse xenocultures. *Journal of Neuroscience*, 1996, 16 (3), 1163-72,.
53. Shin *et al.* Expression of osteopontin mRNA in the adult rat brain. *Neurosci Lett.*, 1999, Oct 1, 273 (2), 73-6.
- 25 54. Shepard H. M. *et al.* *Nature*, 1981, 294, 563-565.
55. Sodek J., Ganss B., McKee M. D., *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 2000, 11 (3), 279-303.

56. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985, 150, 76-85.
57. Smith and Waterman, J. *Mol. Biol.*, 1981, 147, 195-197. *Advances in Applied Mathematics*, 1981, 2, 482-489.
58. Storch, M. K., Piddlesden, S., Haltia, M., Iivanainen, M., Morgan, P., Lassmann, H. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Annals of Neurology*, 1998, 43 (4), 465-71.
59. Trojaborg W. Acute and chronic neuropathies: new aspects of Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, an overview and an update. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1998, 107, 303-316.
60. Trotter, J., Bitter-Suermann, D., Schachner, M. Differentiation-regulated loss of the polysialylated embryonic form and expression of the different polypeptides of the neural cell adhesion molecule by cultured oligodendrocytes and myelin. *Journal of Neuroscience Research*, 1989, 22 (4), 369-83.
61. Wiechelman, K., Braun, R., Fitzpatrick, J. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.*, 1988, 175, 231-237. The degenerated fibers and the normal fibers were counted.
62. Whitney, L. W., Becker, K. G., Tresser, N. J., Caballero-Ramos, C. I., Munson, P. J., Prabhu, V. V., Trent, J. M., McFarland, H. F., Biddison, W. E. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Annals of Neurology*, 1999, 46 (3), 425-8.

**Patendinõudlus**

1. Osteopontiini või osteopontiini toimega agonisti kasutamine ravimi valmistamiseks neuroloogilise haiguse raviks ja/või vältimiseks.
2. Kasutamine vastavalt punktile 1, mis **erineb** selle poolest, et neuroloogiline haigus  
5 valitakse rühmast, kuhu kuuluvad traumaatiline närvivigastus, insult, KNS või PNS demüeliniseerivad haigused, neuropaatiad ja neurodegeneratiivsed haigused.
3. Kasutamine vastavalt punktile 1 või 2, mis **erineb** selle poolest, et neuroloogiline haigus on põhjustatud kaasasündinud metaboolsest häirest.
4. Kasutamine vastavalt ükskõik millisele eelnevale punktile, mis **erineb** selle poolest, et  
10 neuroloogiliseks haiguseks on perifeerne neuropaatia.
5. Kasutamine vastavalt punktile 4, mis **erineb** selle poolest, et neuroloogiliseks haiguseks on diabeetiline neuropaatia.
6. Kasutamine vastavalt punktile 2, mis **erineb** selle poolest, et demüeliniseerivaks haiguseks on hulgiskleroos (MS).
- 15 7. Kasutamine vastavalt punktile 2, mis **erineb** selle poolest, et neurodegeneratiivne haigus valitakse Alzheimeri tõve, Parkinsoni tõve, Huntingtoni tõve ja amüotroofilise lateraalskleroosi (ALS) hulgast.
8. Kasutamine vastavalt ükskõik millisele punktile 1 kuni 7, mis **erineb** selle poolest, et osteopontiin on valitud rühmast, kuhu kuuluvad:  
20 (a) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1,  
(b) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1 aminohappeid 1-168 või 170,  
(c) polüpeptiid, mis sisaldab SED ID nr 1 aminohappeid 1-16 ja 170-314,  
(d) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1 aminohappeid 170-314,  
(e) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 2,  
25 (f) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 3,  
(g) mis tahes punktile a-f vastav muteiin, mille aminohappejärjestus on vähemalt 40% või 50% või 60% või 70% või 80% või 90% identne vähemalt ühega järjestustest a-f,

(h) mis tahes punktile a-f vastav muteiin, mida kodeerib DNA järjestus, mis hübridiseerub natiivse DNA järjestuse, mis kodeerib mis tahes a-f mõõdukalt karmides tingimustes või väga karmides tingimustes, komplemendiga,

5 (i) mis tahes punktile a-f vastav muteiin, milles mis tahes muudatused aminohappejärjestuses on konservatiivsed aminohapete asendused a-f aminohappejärjestustes,

(j) mis tahes punktile a-f vastav isovorm, sulandvalk, funktsionaalne derivaat, aktiivne fraktsioon või rõngakujuliselt permuteeritud derivaat.

9. Kasutamine vastavalt ükskõik millisele punktile 1 kuni 8, mis **erineb** selle poolest, et 10 osteopontiin sulandatakse kandjamolekuli, peptiidi või valguga, mis soodustab hematoentsefaalbarjääri läbimist.

10. Kasutamine vastavalt punktile 8 või 9, mis **erineb** selle poolest, et osteopontiin on PEGüülitud.

11. Kasutamine vastavalt ükskõik millisele punktile 8 kuni 10, mis **erineb** selle poolest, et 15 sulandvalk hõlmab immunoglobuliiniga (Ig) sulandatud valku.

12. Kasutamine vastavalt ükskõik millisele eelnevale punktile, mis **erineb** selle poolest, et ravim sisaldab lisaks interferooni samaaegseks, järjestikuseks või eraldi kasutamiseks.

13. Kasutamine vastavalt punktile 12, mis **erineb** selle poolest, et interferooniks on interferon- $\beta$ .

20 14. Kasutamine vastavalt ükskõik millisele eelnevale punktile, mis **erineb** selle poolest, et osteopontiini kasutatakse koguses ligikaudu 0,001-100 mg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 1-10 mg/kg kehamassi kohta või ligikaudu 1-5 mg/kg kehamassi kohta.

15. Nukleiinhappe molekuli kasutamine ravimi valmistamiseks neuroloogilise haiguse raviks ja/või vältimiseks, kusjuures nukleiinhappe molekul sisaldab 25 nukleiinhappejärjestust, mis kodeerib polüpeptiidi, mis sisaldab aminohappejärjestust, mis valitakse rühmast, kuhu kuuluvad:

(k) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1,

(l) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1 aminohappeid 1-168 või 170,

(m) polüpeptiid, mis sisaldab SED ID nr 1 aminohappeid 1-16 ja 170-314,

- (n) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 1 aminohappeid 170-314,
- (o) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 2,
- (p) polüpeptiid, mis sisaldab SEQ ID nr 3,
- (q) mis tahes punktile a-f vastav muteiin, mille aminohappejärjestus on vähemalt 40% või  
5 50% või 60% või 70% või 80% või 90% identne vähemalt ühega järjestustest a-f,
- (r) mis tahes punktile a-f vastav muteiin, mida kodeerib DNA järjestus, mis hübridiseerub  
natiivse DNA järjestuse, mis kodeerib mis tahes a-f mõõdukalt karmides tingimustes või  
väga karmides tingimustes, komplemendiga,
- (s) mis tahes punktile a-f vastav muteiin, milles mis tahes muudatused  
10 aminohappejärjestuses on konservatiivsed aminohapete asendused a-f  
aminohappejärjestustes,
- (t) mis tahes punktile a-f vastav isovorm, sulandvalk, funktsionaalne derivaat, aktiivne  
fraktsioon või rõngakujuliselt permuteeritud derivaat.
16. Kasutamine vastavalt punktile 15, mis **erineb** selle poolest, et nukleiinhappe molekul  
15 sisaldab lisaks ekspressioonivektori järjestust.
17. Vektori osteopontiini või osteopontiini toimega agonisti endogeense produktsiooni  
indutseerimiseks ja/või suurendamiseks rakkudes kasutamine ravimi valmistamiseks  
neuroloogilise haiguse raviks ja/või vältimiseks.
18. Kasutamine vastavalt ükskõik millisele punktile 15 kuni 17 geeniteraapias.
- 20 19. Rakkude, mis on geneetiliselt modifitseeritud produtseerima osteopontiini või  
osteopontiini toimega agonisti, kasutamine ravimi valmistamiseks neuroloogilise haiguse  
raviks ja/või vältimiseks.
20. Ravimkoostis, mis **sisaldab** osteopontiini või osteopontiini toimega agonisti ja  
interferooni, vajadusel koos ühe või enama farmatseutiliselt vastuvõetava ekstsipiendiga  
25 neuroloogilise haiguse raviks ja/või vältimiseks.

1/20

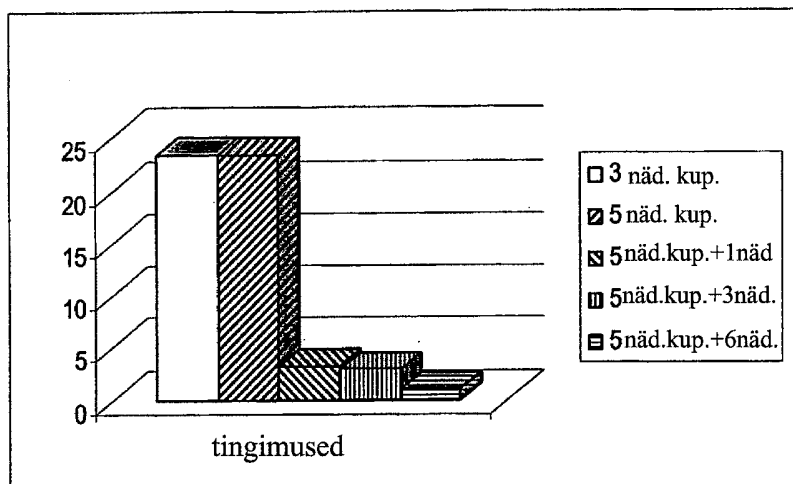


FIG 1A

| Väikeaju arenemine | osteop.   | MBP       | PLP        |
|--------------------|-----------|-----------|------------|
| <b>C1</b>          | <b>1</b>  | <b>1</b>  | <b>1</b>   |
| <b>C2</b>          | <b>2</b>  | <b>2</b>  | <b>2</b>   |
| <b>C4</b>          | <b>5</b>  | <b>6</b>  | <b>5</b>   |
| <b>C5</b>          | <b>9</b>  | <b>6</b>  | <b>4</b>   |
| <b>C6</b>          | <b>10</b> | <b>16</b> | <b>14</b>  |
| <b>C8</b>          | <b>9</b>  | <b>?</b>  | <b>?</b>   |
| <b>C10</b>         | <b>1</b>  | <b>26</b> | <b>56</b>  |
| <b>C12</b>         | <b>1</b>  | <b>32</b> | <b>111</b> |
| <b>C14</b>         | <b>1</b>  | <b>32</b> | <b>104</b> |
| <b>C20</b>         | <b>2</b>  | <b>26</b> | <b>137</b> |
| <b>CA</b>          | <b>3</b>  | <b>9</b>  | <b>39</b>  |

FIG 1B

2/20

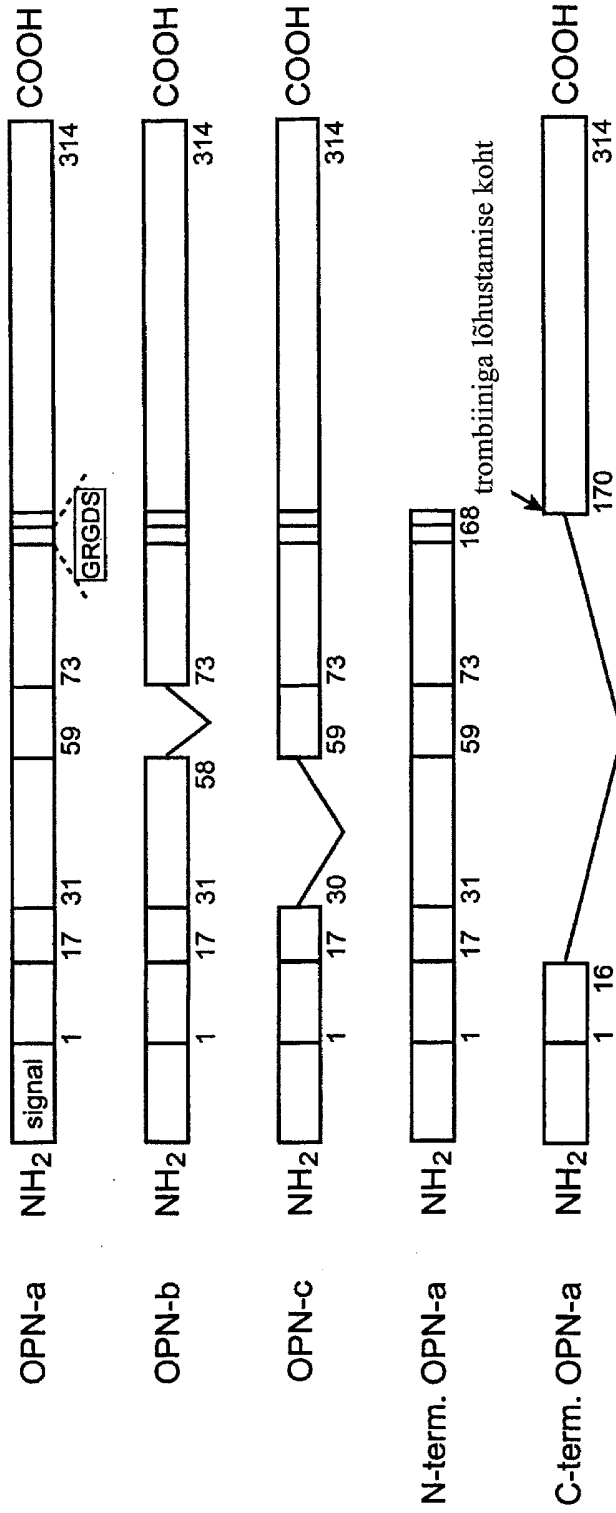


FIG 2



3/20

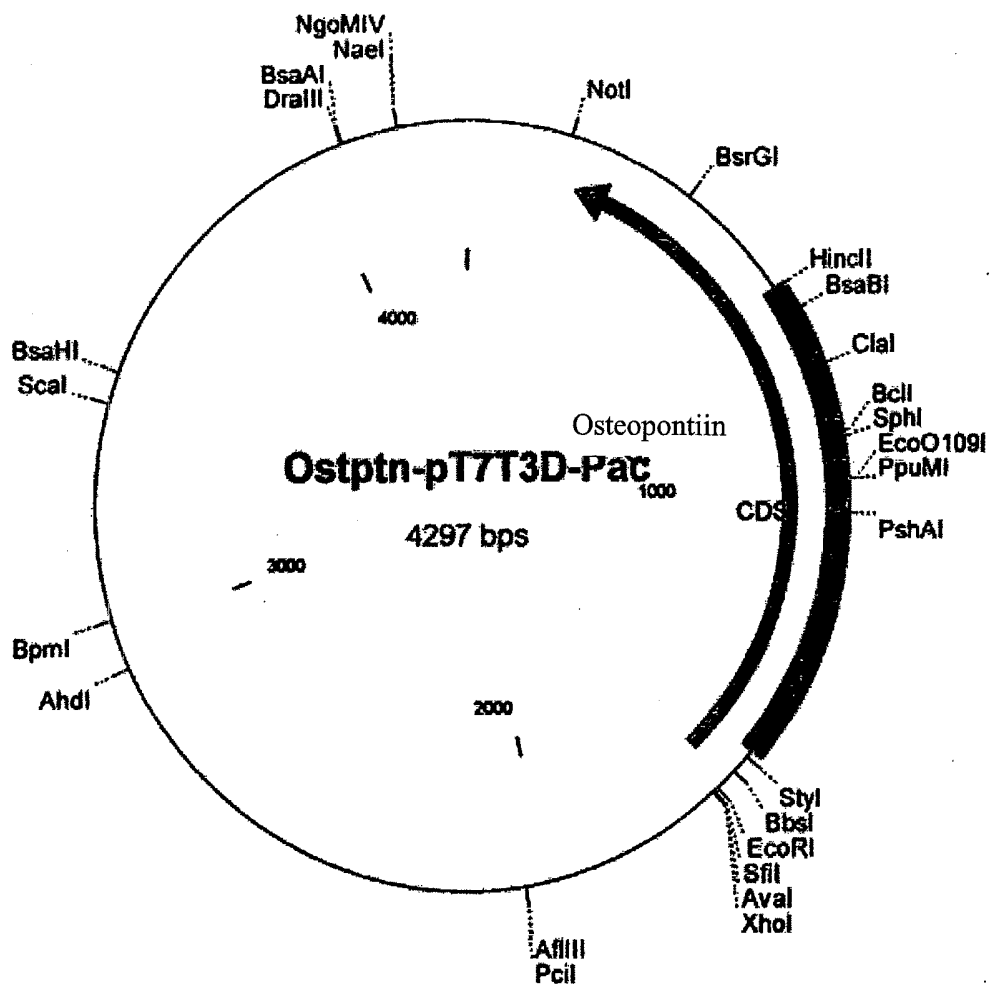


FIG 3

4/20

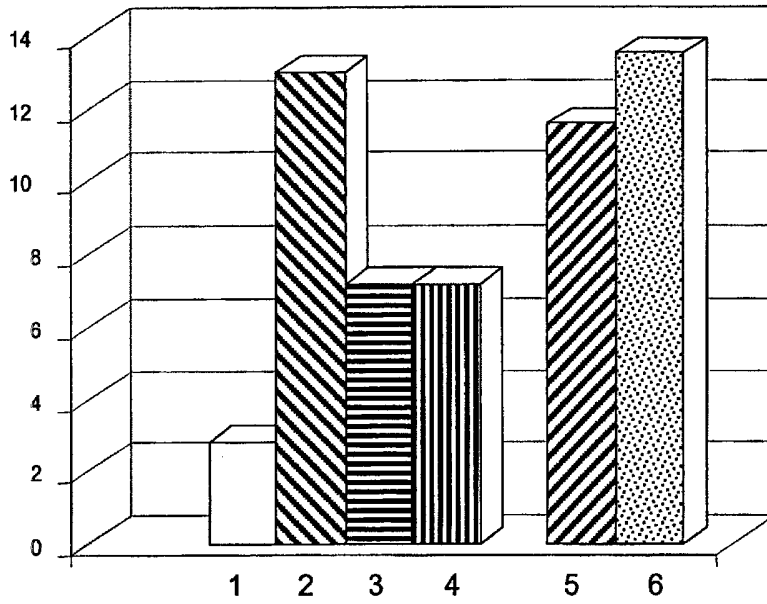


FIG 4

5/20

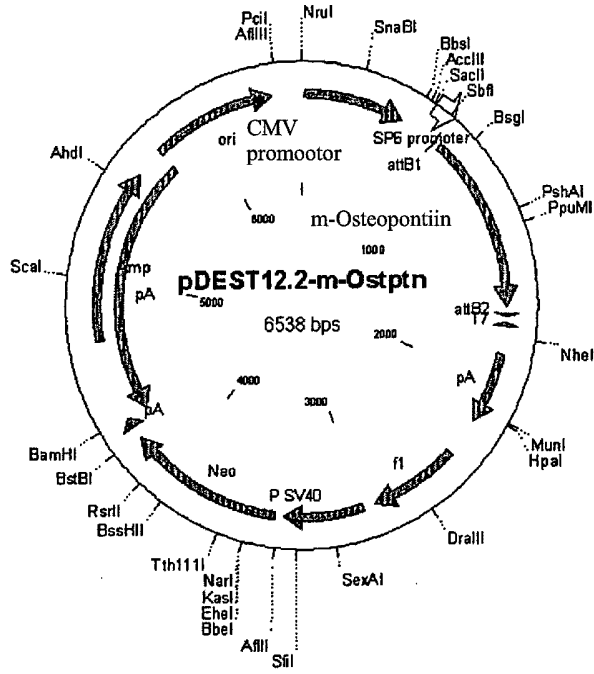


FIG 5

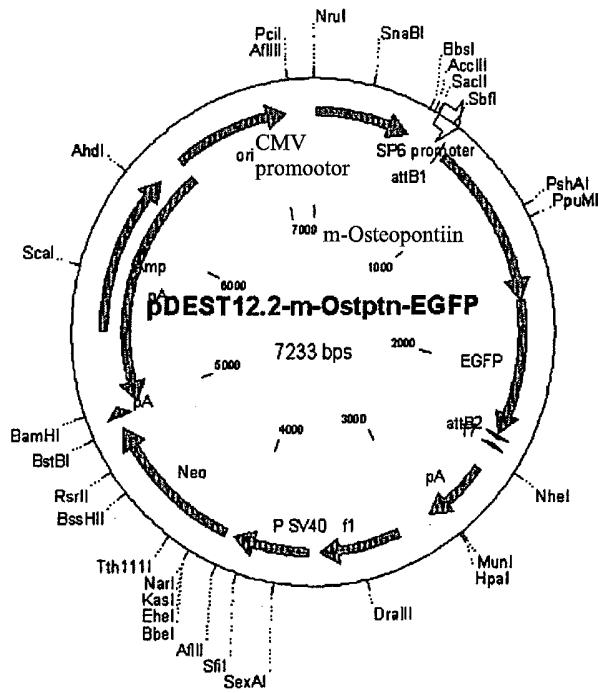


FIG 6

6/20

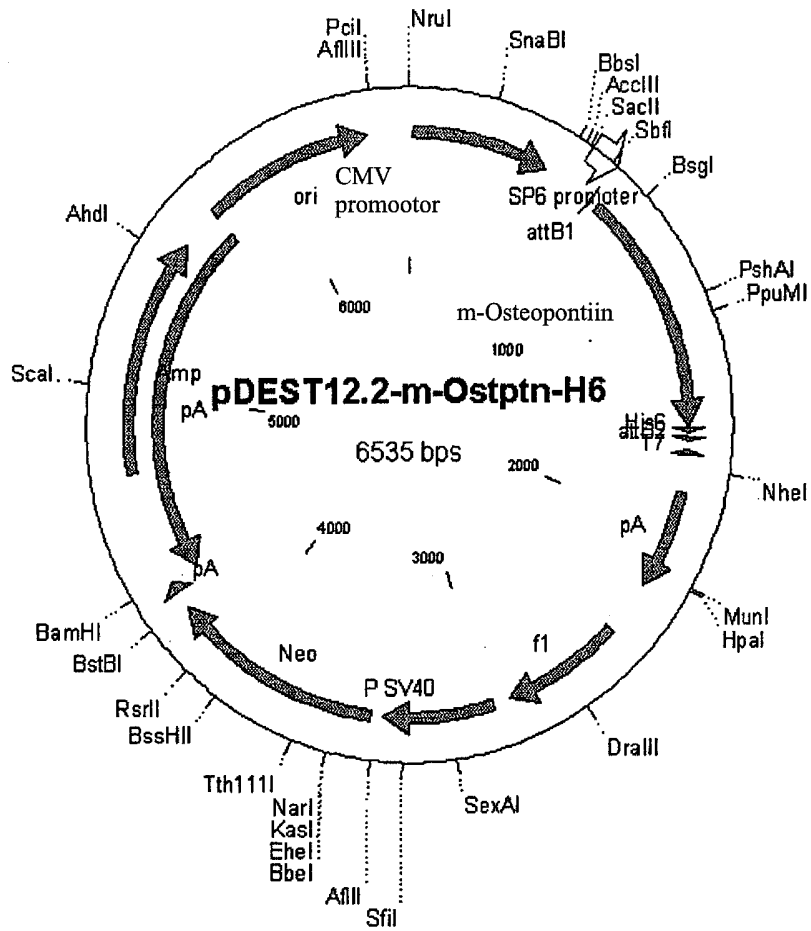


FIG 7

7/20

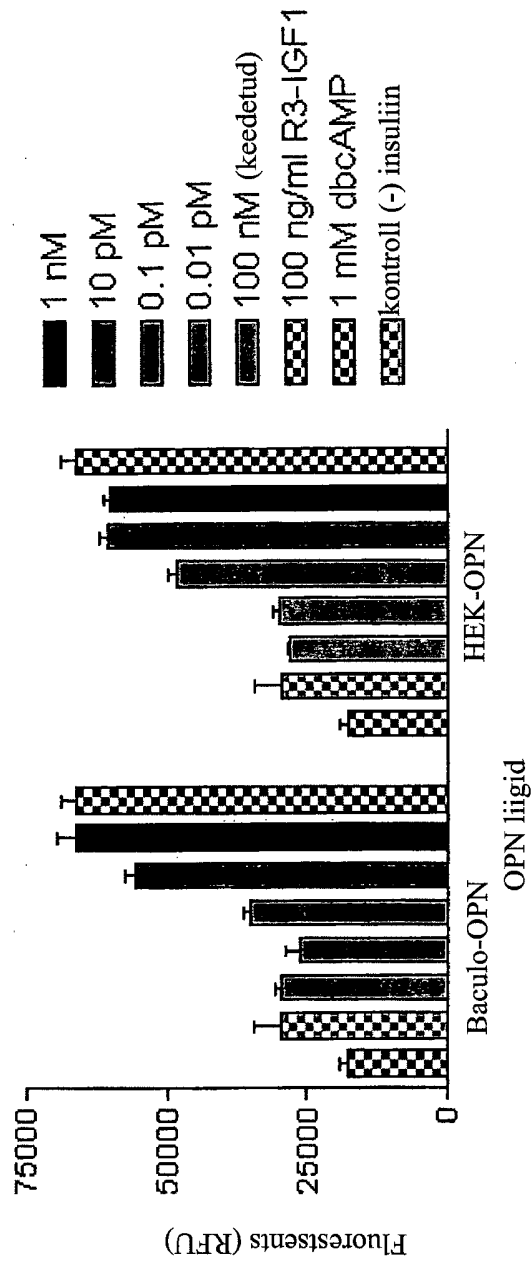


FIG 8

8/20

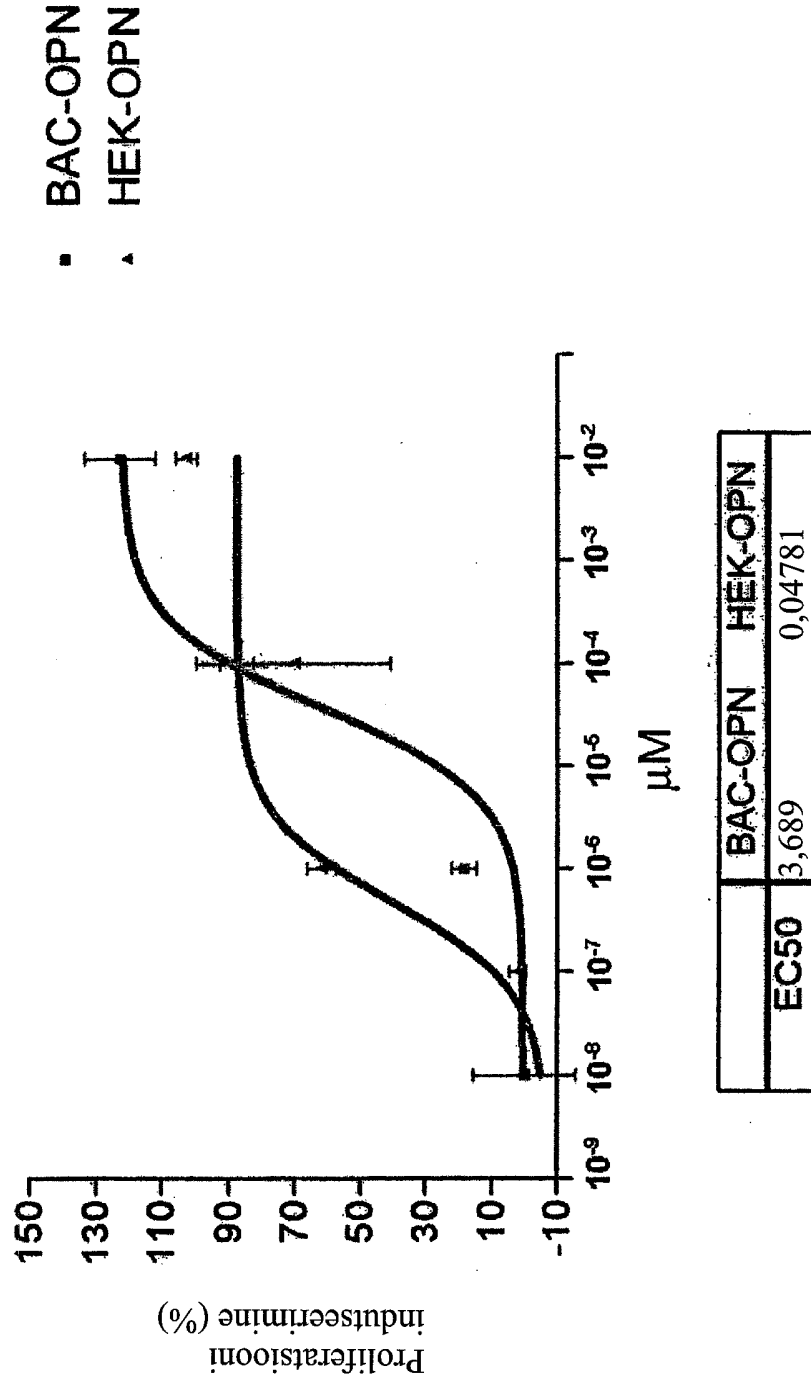


FIG 9

9/20

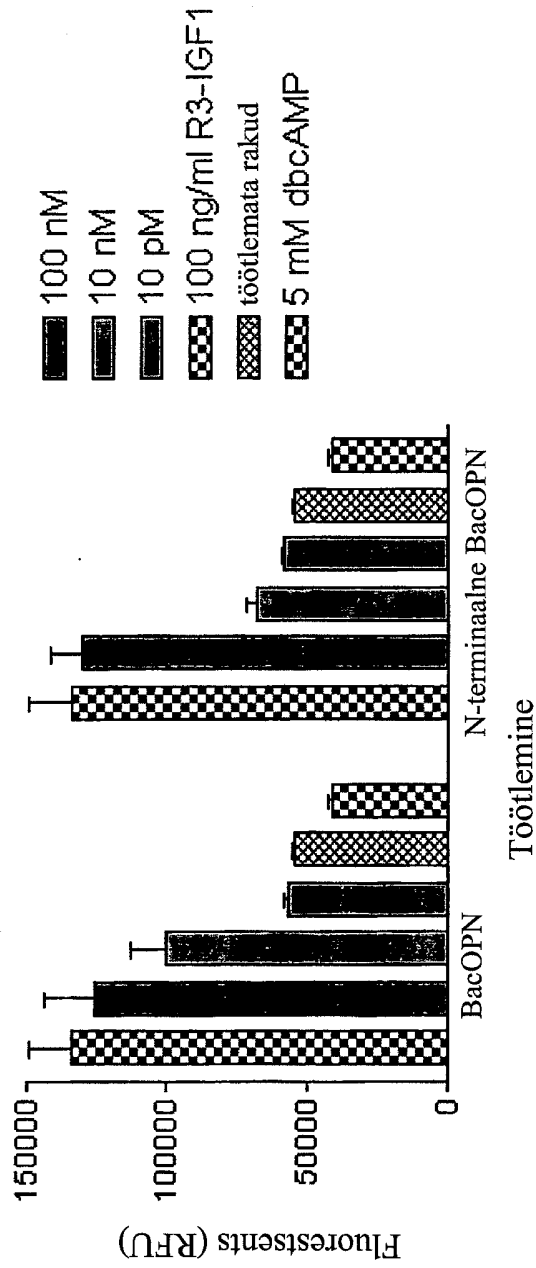


FIG 10

10/20

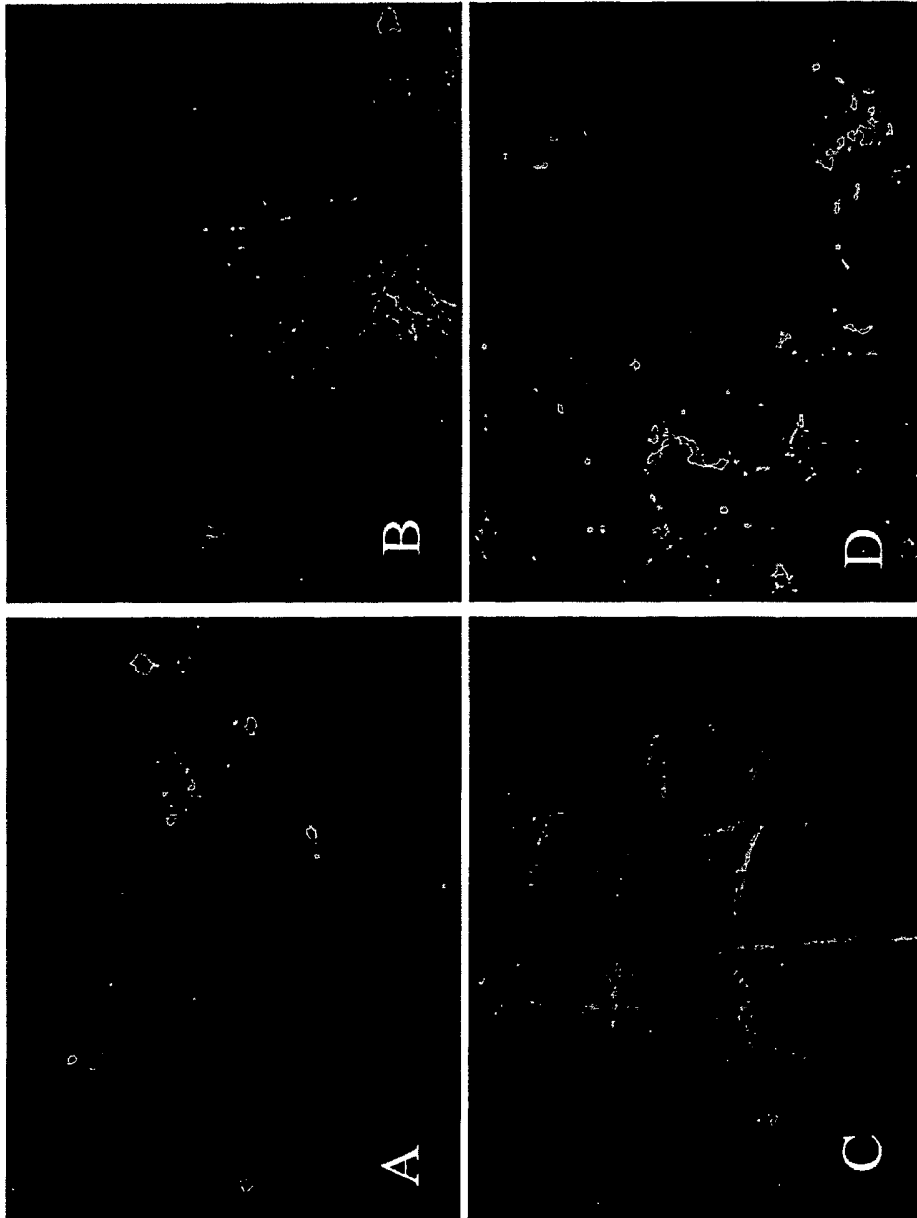


FIG 11



11/20

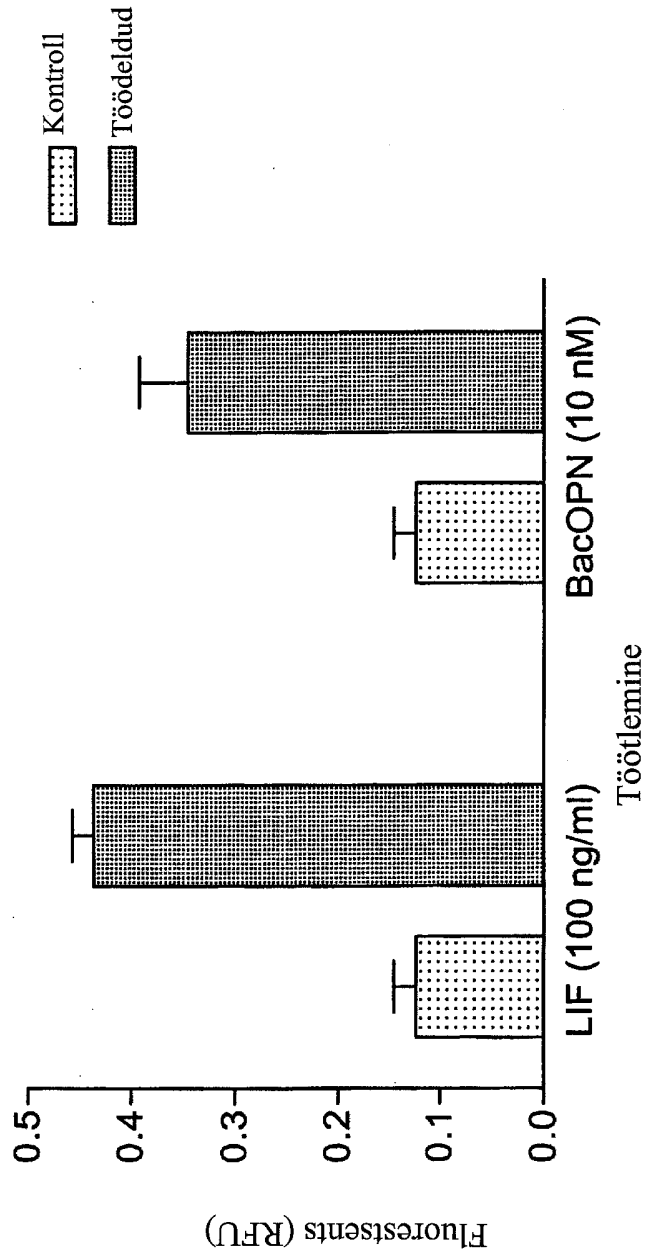


FIG 12

12/20

|                 | OPN- E.coli | OPN-Bac |
|-----------------|-------------|---------|
| <b>10 pM</b>    | 3,2%        | 6,1%    |
| <b>10 nM</b>    | 5,4%        | 29,8%   |
| <b>100 nM</b>   | <b>ND</b>   | 14,8%   |
| <b>KONTROLL</b> | 14%         | 1,4%    |

FIG 13

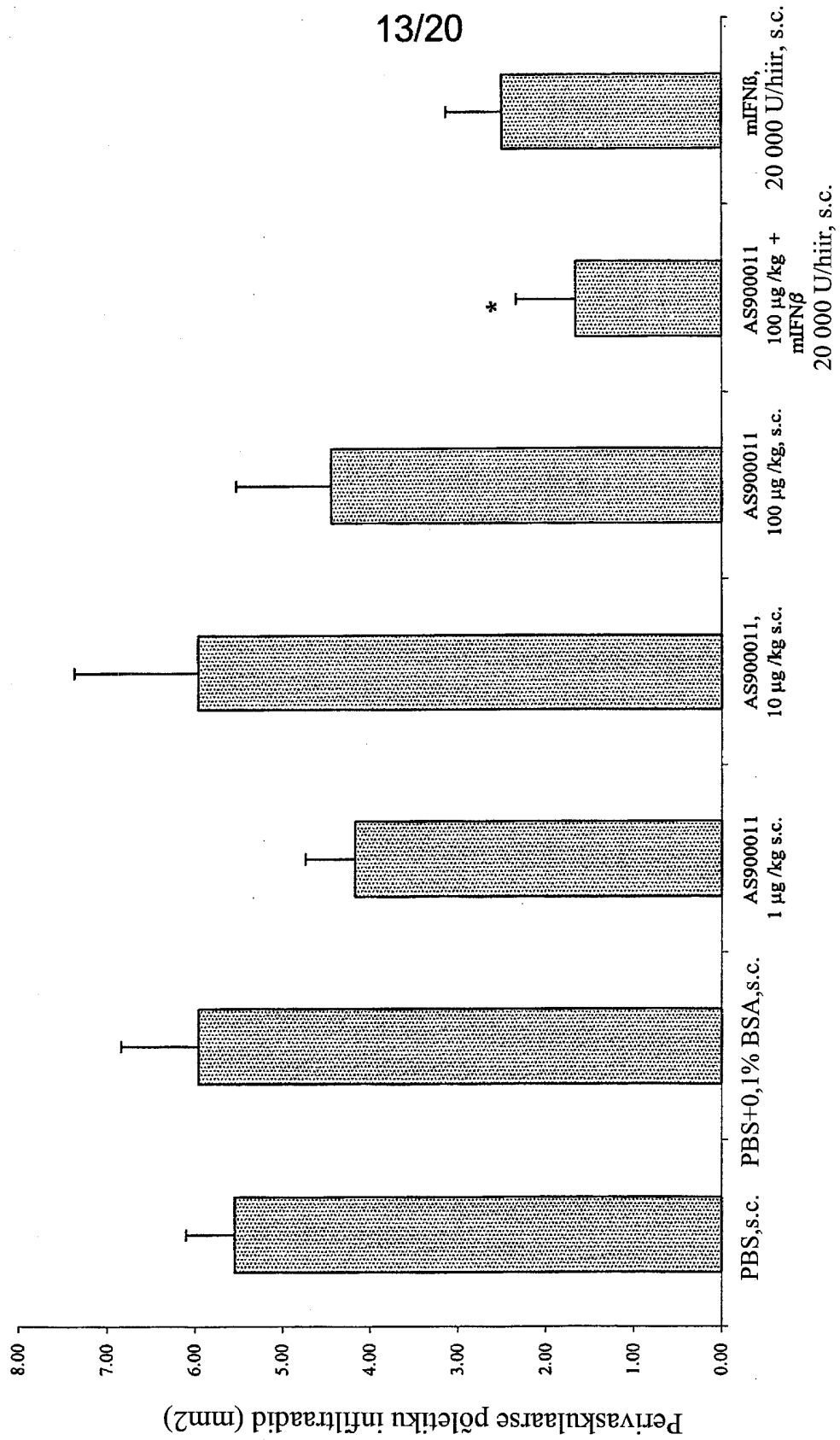


FIG 14

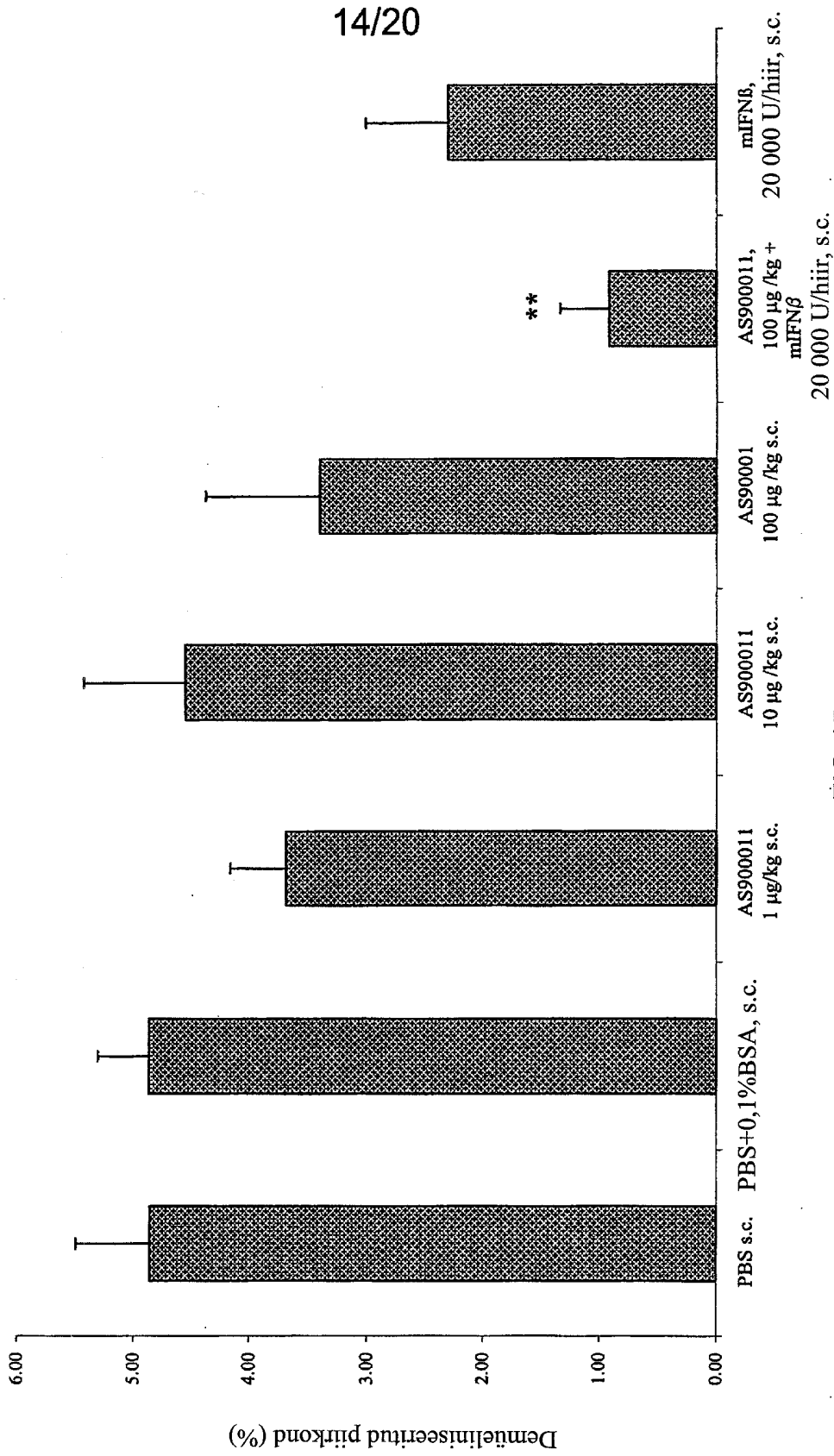


FIG 15

15/20

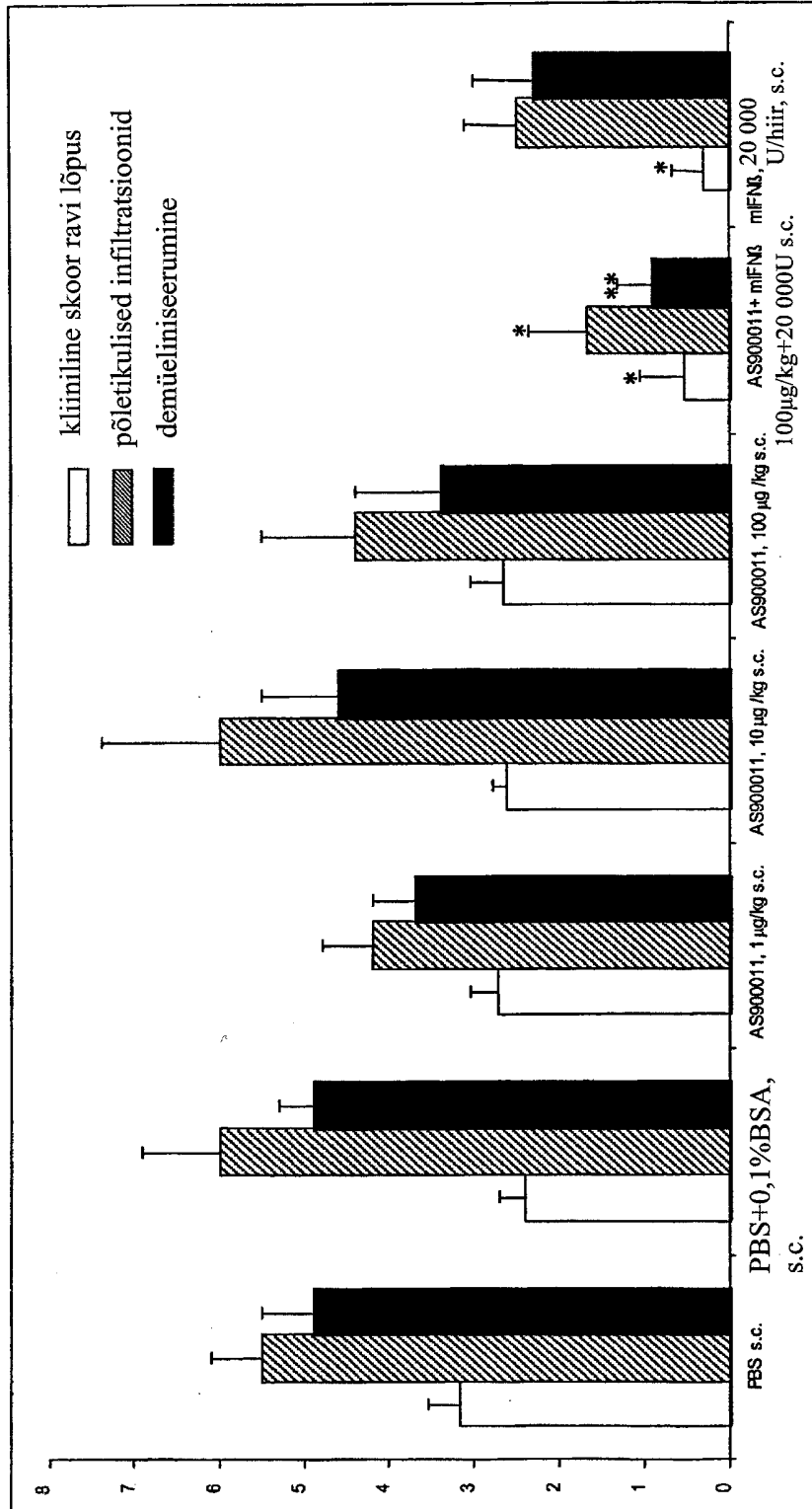


FIG 16

16/20

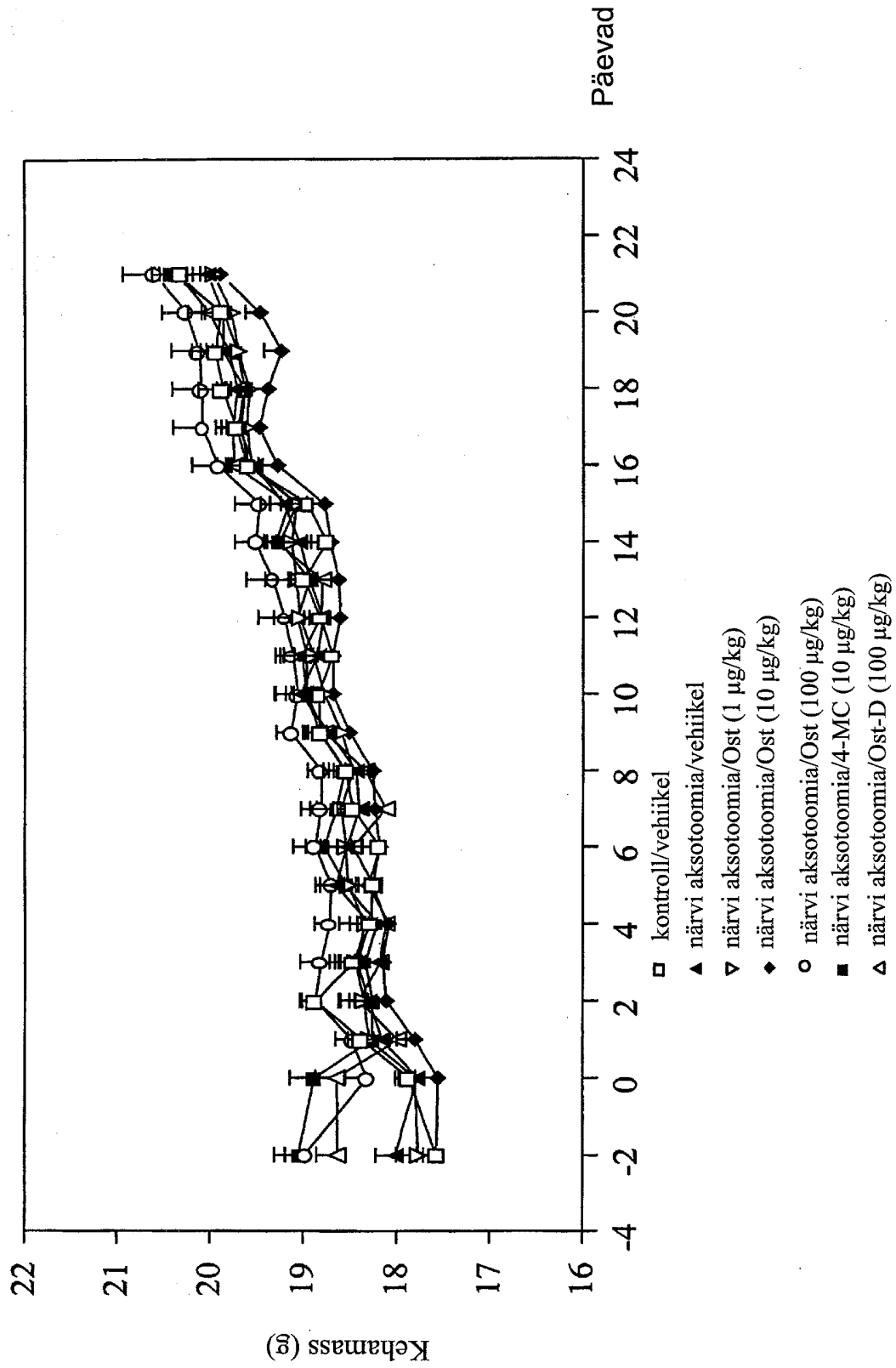


FIG 17

17/20

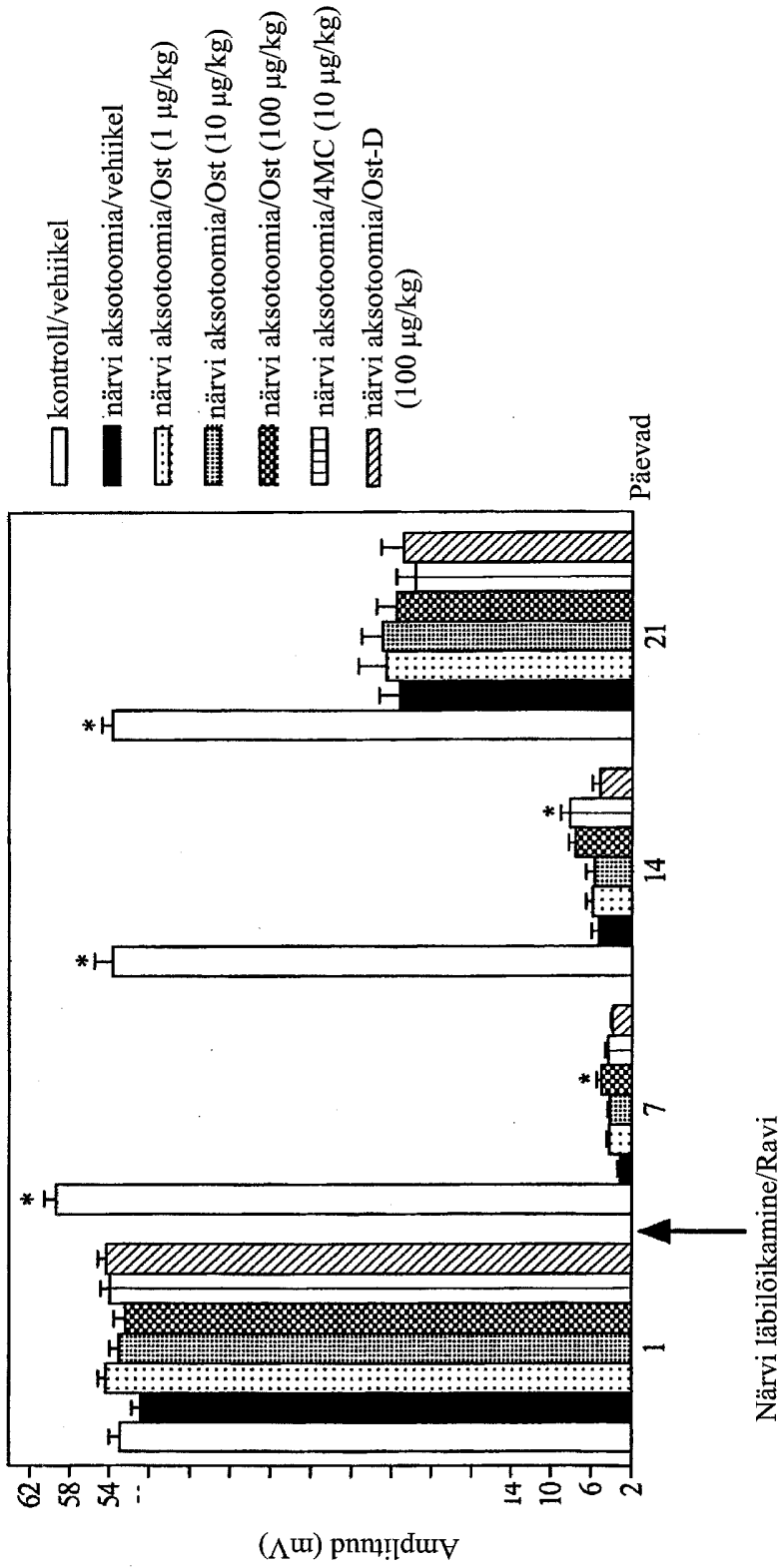


FIG 18

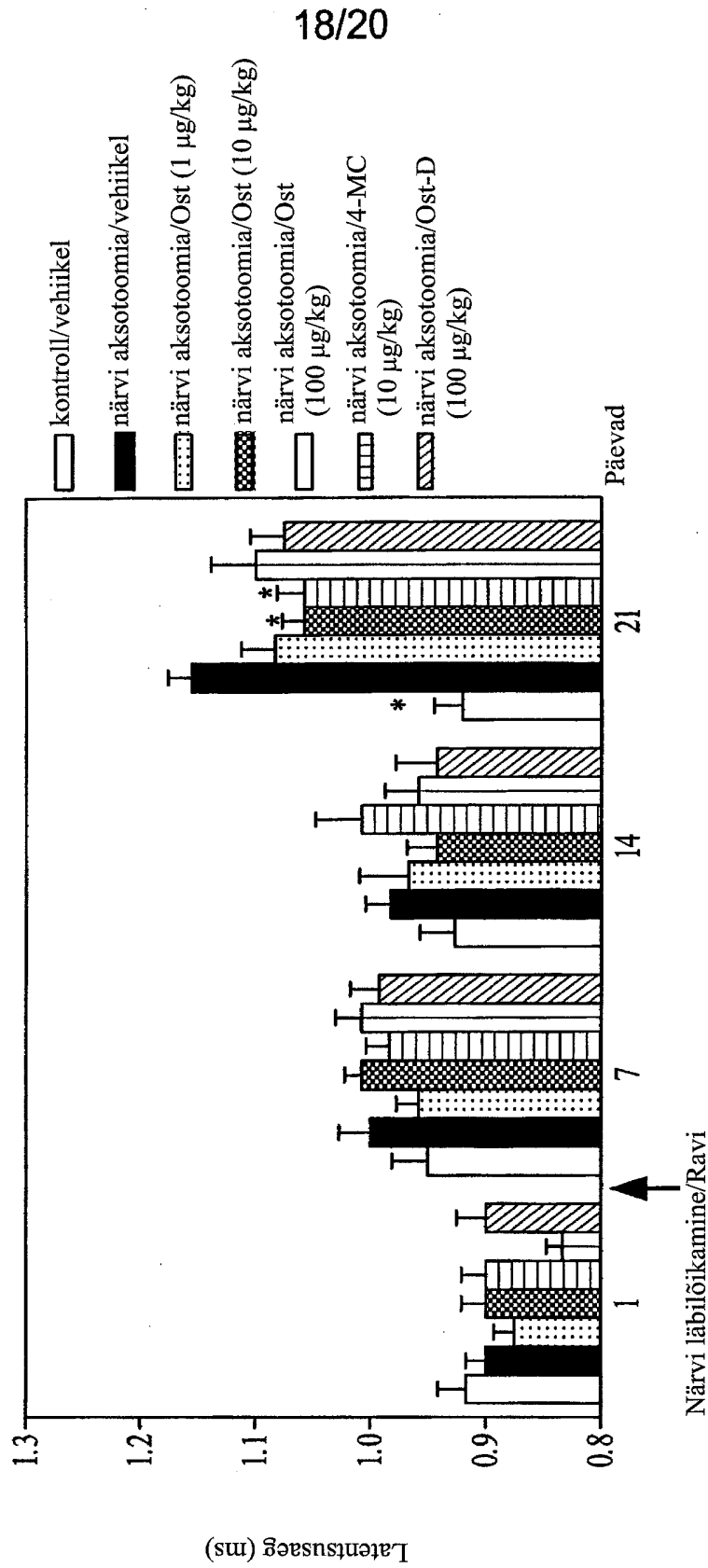


FIG 19



19/20

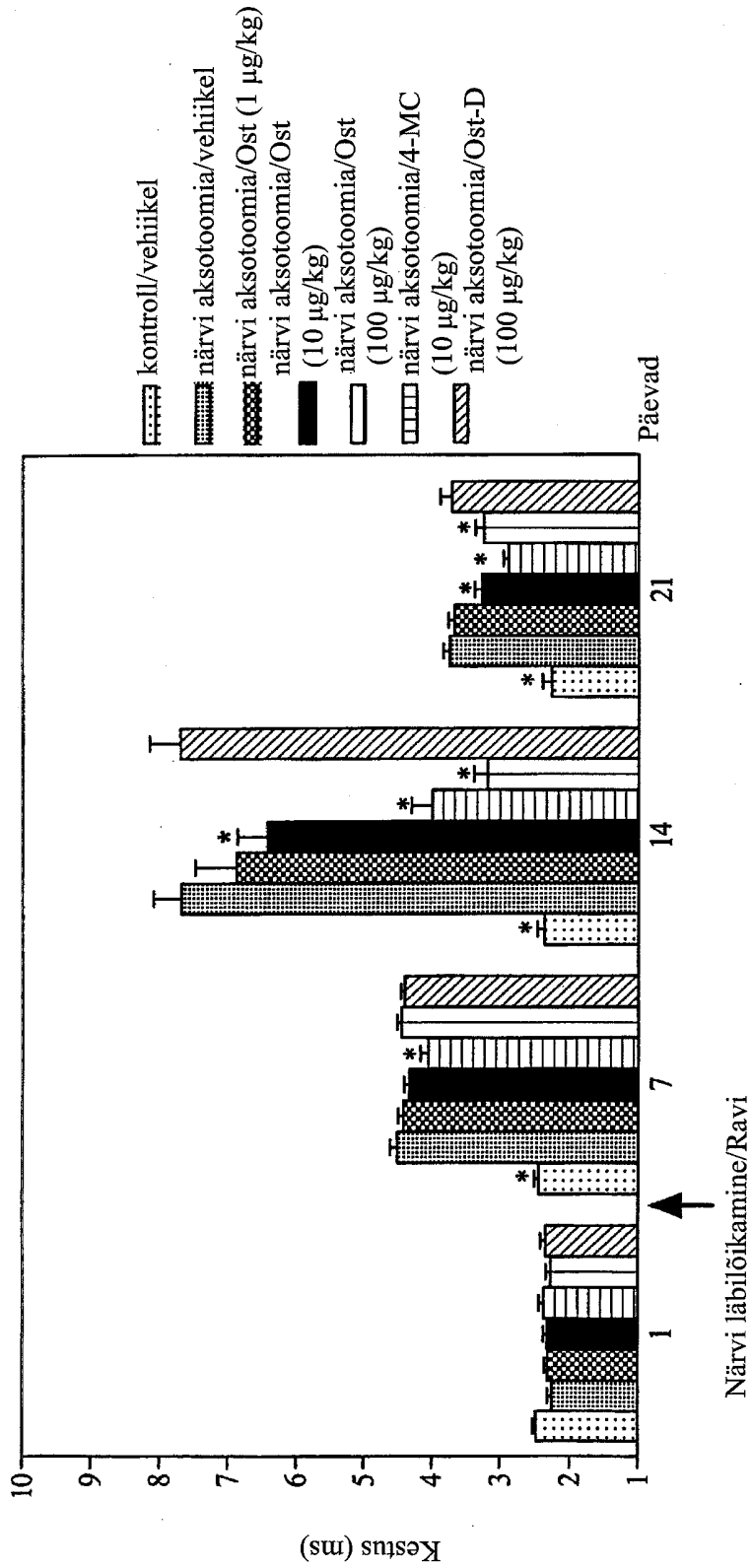


FIG 20

20/20

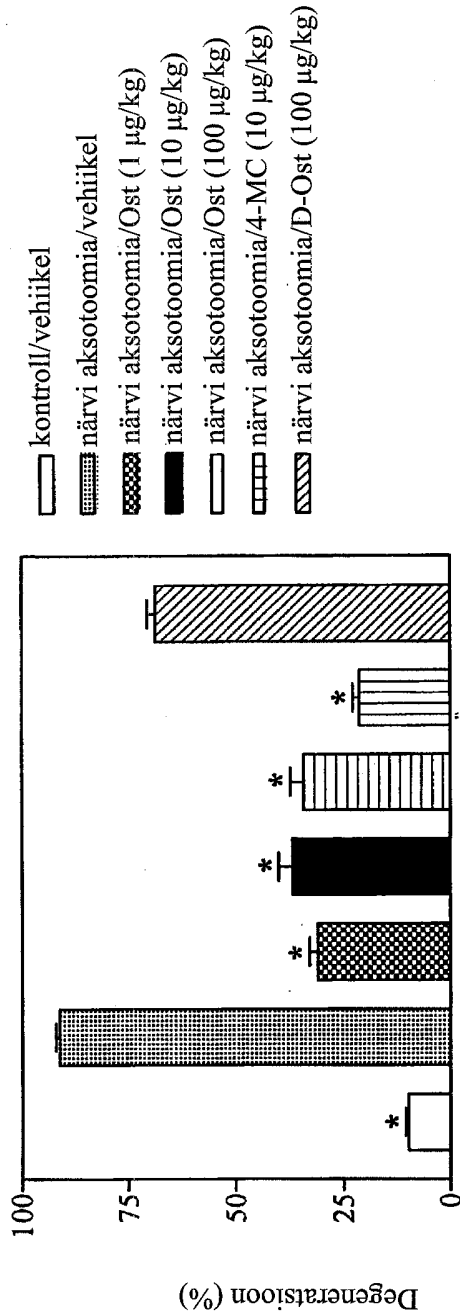


FIG 21

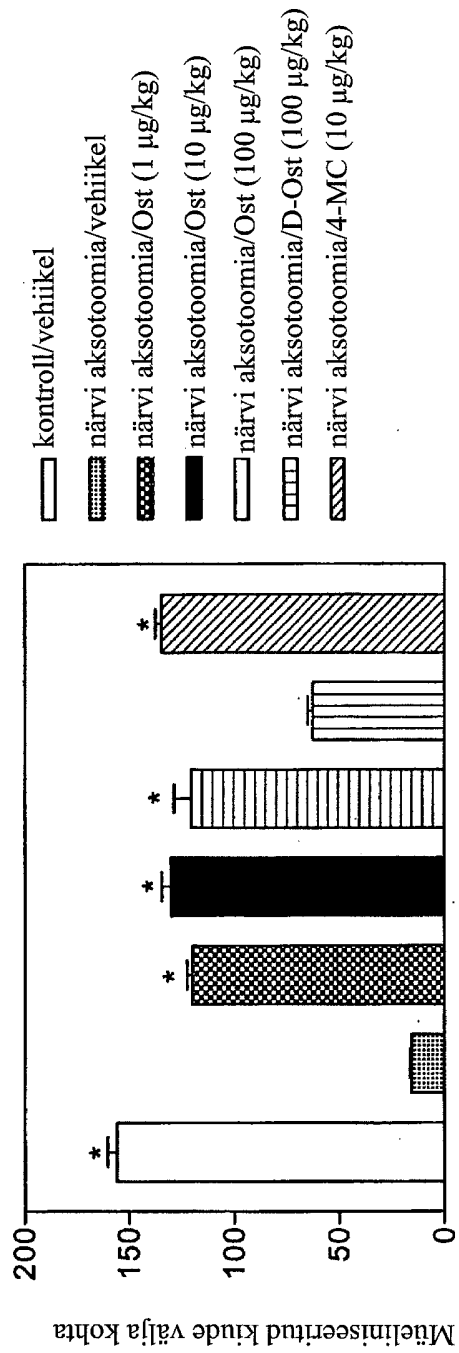


FIG 22

JÄRJESTUSE LOETELU

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> Osteopontiini kasutamine neuroloogiliste haiguste raviks ja/või vältimiseks

<130> WO 473

<150> 01111296

<151> 2001-05-17

<160> 5

<170> PatentIn versioon 3.1

<210> 1

<211> 314

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala  
1 5 10 15

Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu  
20 25 30

Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro  
35 40 45

Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu  
50 55 60

Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu  
65 70 75 80

Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His  
85 90 95

Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp







