



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85368 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61K 38/19

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ОСТЕОПОНТИНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ТА/АБО ЗАПОБІГАННЯ НЕВРОЛОГІЧНОМУ ЗАХВОРЮВАННЮ

1

2

(21) 20031110269

(22) 08.05.2002

(24) 26.01.2009

(86) PCT/EP02/05081, 08.05.2002

(31) 01111296.8

(32) 17.05.2001

(33) EP

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) БОШЕРТ УРСУЛА, ФЕГЕР ГЕОРГ, СЕЛЬВА-РАДЖУ РАГУРАМ, ПАПОЯН РУБЕН, БЕРНАСКО-НІ ЛІЛІЯ

(73) ЕПЛАЙД РІСЬОРЧ СИСТЕМЗ ЕРС ХОЛДІНГ Н.В.

(56) WO 0063241 A, 26.10.2000.

WO 0124831 A, 12.04.01.

WO 0037502 A, 29.06.2000.

ELLISON J. A. ET AL: "OSTEOPONTIN AND ITS INTEGRIN RECEPTOR ALPHAVBETA3 ARE UPREGULATED DURING FORMATION OF THE GLIAL SCAR AFTER FOCAL STROKE" STROKE, AMERICAN HEART ASSOCIATION, DALLAS TX, US, vol. 29, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 1698-1706.

WANG X. ET AL: "DELAYED EXPRESSION OF OSTEOPONTIN AFTER FOCAL STROKE IN THE RAT" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 18, no. 6, 15 March 1998 (1998-03-15), pages 2075-2083.

(PREVENTION OF RELAPSES AND DISABILITY BY INTERFERON B-1A SUBCUTANEOUSLY IN MULTIPLE SCLEROSIS) STUDY GROUP P: "Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis" LANCET, XX, XX, vol. 352, no. 9139, 7 November 1998 (1998-11-07), pages 1498-1504.

LEE M.-Y. ET AL: "TRANSIENT UPREGULATION OF OSTEOPONTIN MRNA IN HIPPOCAMPUS AND STRIATUM FOLLOWING GLOBAL FOREBRAIN ISCHEMIA IN RATS" NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, vol. 271, no. 2, 1999, pages 81-84.

TANAKA FUMI ET AL: "Association of osteopontin with ischemic axonal death in periventricular leukomalacia." ACTA NEUROPATHOLOGICA, vol. 100, no. 1, July 2000 (2000-07), pages 69-74.

ELLISON J. A. ET AL: "MATRIX REMODELING AFTER STROKE DE NOVO EXPRESSION OF MATRIX PROTEINS AND INTEGRIN RECEPTORS"

ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK, NY, US, vol. 890, 1999, pages 204-222. WO 0064460 A, 02.11.2000.

(57) 1. Застосування остеопонтину, вибраного з групи, яка включає:

(a) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 1;
(b) поліпептид, який містить амінокислоти 1-168 або 170 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(c) поліпептид, який містить амінокислоти 1-16 та 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(d) поліпептид, який містить амінокислоти 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(e) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 2;

(f) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 3;

(g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), амінокислотна послідовність якого має щонайменше 70%, або 80%, або 90% ідентичність з щонайменше однією з послідовностей поліпептидів (a)-(f);

(h) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який з поліпептидів (a)-(f) за дуже жорстких умов;

(i) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), причому всі мутації амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях поліпептидів (a)-(f);

(j) сіль, ізоформу або гібридний білок будь-якого з поліпептидів (a)-(f);

для виготовлення лікарського засобу для лікування неврологічного захворювання та/або запобігання неврологічному захворюванню.

2. Застосування за п. 1, причому неврологічне захворювання вибране з групи, яка включає травматичне пошкодження нерва, інсульт, демієлінізуючі захворювання центральної нервової системи або периферичної нервової системи, невропатії та нейродегенеративні захворювання.

3. Застосування за п. 1 або п. 2, причому неврологічне захворювання спричинене вродженим розладом обміну речовин.

4. Застосування за будь-яким із попередніх пунктів, причому неврологічним захворюванням є периферична невропатія.

5. Застосування за п. 4, причому неврологічним захворюванням є діабетична невропатія.

(13) C2

(11) 85368

(19) UA

6. Застосування за п. 4, причому неврологічним захворюванням є поліневропатія.

7. Застосування за п. 2, причому неврологічним захворюванням є невропатія, спричинена хіміотерапією.

8. Застосування за п. 2, причому демієлінізуючим захворюванням є розсіяний склероз (MS).

9. Застосування за п. 2, причому нейродегенеративне захворювання вибрано з-посеред хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хореї Гентингтона та бічного аміотрофічного склерозу (ALS).

Застосування за будь-яким із пп. 1-9, причому

10. остеопонтин злитий з молекулою-носієм, пептидом або білком, що стимулює подолання гематоенцефалічного бар'єра.

11. Застосування за будь-яким із пп. 1-9, причому остеопонтин є пепільованим.

12. Застосування за будь-яким із пп. 1-9, причому гібридний білок є білком, злитим з імуноглобуліном (Ig).

13. Застосування за будь-яким із попередніх пунктів, причому лікарський засіб додатково включає інтерферон для одночасного, послідовного або окремого застосування.

14. Застосування за п. 13, причому інтерфероном є інтерферон-β.

15. Застосування за будь-яким із попередніх пунктів, причому кількість застосовуваного остеопонтину становить від приблизно 0,001 мг/кг маси тіла до 100 мг/кг маси тіла, або від приблизно 1 мг/кг маси тіла до 10 мг/кг маси тіла, або приблизно 5 мг/кг маси тіла.

16. Застосування молекули нуклеїнової кислоти, яка містить послідовність, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка включає:

(a) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 1;

(b) поліпептид, який містить амінокислоти 1-168 або 170 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(c) поліпептид, який містить амінокислоти 1-16 та 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(d) поліпептид, який містить амінокислоти 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(e) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 2;

(f) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 3;

(g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), амінокислотна послідовність якого має щонайменше 70%, або 80%, або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей поліпептидів (a)-(f);

(h) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридизується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який з поліпептидів (a)-(f) за дуже жорстких умов;

(i) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), причому всі мутації амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях поліпептидів (a)-(f);

(j) сіль, ізоформу або гібридний білок будь-якого з поліпептидів (a)-(f);

для виготовлення лікарського засобу для лікування неврологічного захворювання та/або запобігання неврологічному захворюванню.

17. Застосування за п. 16, причому молекула нуклеїнової кислоти додатково містить послідовність вектора експресії.

18. Застосування вектора для індукування та/або стимулювання ендогенного продукування остеопонтину, вибраного з групи, яка включає:

(a) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 1;

(b) поліпептид, який містить амінокислоти 1-168 або 170 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(c) поліпептид, який містить амінокислоти 1-16 та 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(d) поліпептид, який містить амінокислоти 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(e) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 2;

(f) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 3;

(g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), амінокислотна послідовність якого має щонайменше 70%, або 80%, або 90% ідентичність з щонайменше однією з послідовностей поліпептидів (a)-(f);

(h) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридизується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який з поліпептидів (a)-(f) за дуже жорстких умов;

(i) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), причому всі мутації амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях поліпептидів (a)-(f);

(j) сіль, ізоформу або гібридний білок будь-якого з поліпептидів (a)-(f);

або агоніста активності остеопонтину у клітині при виготовленні лікарського засобу для лікування неврологічного захворювання та/або запобігання неврологічному захворюванню.

19. Застосування за будь-яким із пп. 16-18 для генної терапії.

20. Застосування клітини, яка була генетично модифікована, для продукування остеопонтину, вибраного з групи, яка включає:

(a) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 1;

(b) поліпептид, який містить амінокислоти 1-168 або 170 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(c) поліпептид, який містить амінокислоти 1-16 та 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(d) поліпептид, який містить амінокислоти 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

(e) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 2;

(f) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 3;

(g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), амінокислотна послідовність якого має щонайменше 70%, або 80%, або 90% ідентичність з щонайменше однією з послідовностей поліпептидів (a)-(f);

(h) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридизується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який з поліпептидів (a)-(f) за дуже жорстких умов;

(i) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), причому всі мутації амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях поліпептидів (a)-(f);

(j) сіль, ізоформу або гібридний білок будь-якого з поліпептидів (a)-(f);

або агоніста активності остеопонтину при виготовленні лікарського засобу для лікування неврологічного захворювання та/або запобігання неврологічному захворюванню.

21. Фармацевтична композиція, яка містить остеопонтин, визначений в одному з пп. 1 та 10-12, та

інтерферон, необов'язково - разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами, для лікування неврологічного захворювання та/або запобігання неврологічному захворюванню.

22. Спосіб лікування неврологічного захворювання, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості остеопонтину, можливо - разом із фармацевтично прийнятним носієм, причому остеопонтин вибрано з групи, яка включає:

- (a) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ №1;
- (b) поліпептид, який містить амінокислоти 1-168 або 170 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;
- (c) поліпептид, який містить амінокислоти 1-16 та 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;
- (d) поліпептид, який містить амінокислоти 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;
- (e) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 2;
- (f) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 3;
- (g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), амінокислотна послідовність якого має щонайменше 70%, або 80%, або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей поліпептидів (a)-(f);
- (h) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридизується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який з поліпептидів (a)-(f) за дуже жорстких умов;
- (i) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), причому всі мутації амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях поліпептидів (a)-(f);
- (j) сіль, ізоформу або гібридний білок будь-якого з поліпептидів (a)-(f).

23. Спосіб лікування неврологічного захворювання, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості остеопонтину та інтерферону, можливо - разом із фармацевтично прийнятним носієм, причому остеопонтин вибрано з групи, яка включає:

- (a) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 1;
 - (b) поліпептид, який містить амінокислоти 1-168 або 170 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;
 - (c) поліпептид, який містить амінокислоти 1-16 та 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;
 - (d) поліпептид, який містить амінокислоти 170-314 ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;
 - (e) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 2;
 - (f) поліпептид, який містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 3;
 - (g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), амінокислотна послідовність якого має щонайменше 70%, або 80%, або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей поліпептидів (a)-(f);
 - (h) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридизується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який з поліпептидів (a)-(f) за дуже жорстких умов;
 - (i) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(f), причому всі мутації амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях поліпептидів (a)-(f);
 - (j) сіль, ізоформу або гібридний білок будь-якого з поліпептидів (a)-(f).
24. Спосіб за п. 22, причому неврологічне захворювання вибрано з групи, яка включає травматичне пошкодження нерва, інсульт, демієлінізуючі захворювання центральної нервової системи або периферичної нервової системи, невротатії та нейродегенеративні захворювання.
25. Спосіб за п. 22, причому неврологічним захворюванням є периферична невротатія.
26. Спосіб за п. 22, причому неврологічним захворюванням є діабетична невротатія.
27. Спосіб за п. 22, причому неврологічним захворюванням є поліневротатія.
28. Спосіб за п. 22, причому неврологічним захворюванням є невротатія, спричинена хіміотерапією.
29. Спосіб за п. 22, причому демієлінізуючим захворюванням є розсіяний склероз (MS).

Цей винахід, взагалі, належить до галузі неврологічних захворювань та розладів. Він має відношення до захисту нервової системи, мієлінізації нервових волокон, утворення та регенерації мієлін-продукуючих клітин. Зокрема, він має відношення до демієлінізації та нейродегенеративних захворювань, невротатій, травматичного пошкодження нервових волокон, інсульту та неврологічних захворювань, що викликаються вродженими розладами обміну речовин. Конкретніше, цей винахід має відношення до застосування остеопонтину або агоніста активності остеопонтину для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або запобігання неврологічного захворювання.

Мієлінізація нервового волокна є основним процесом утворення та функціонування центральної нервової системи (ЦНС) та периферичної нервової системи. Мієлінова оболонка довкола аксонів є необхідною для відповідної провідності електричних імпульсів вздовж нервових волокон. Втрата мієліну відбувається при цілому ряді за-

хворювань, до яких належить розсіяний склероз, що уражає ЦНС, синдром Гієна-Барре (гострий первинний ідіопатичний полірадікулопневрит), хронічна запальна демієлінізуюча полірадікулопневротатія (CIDP) та інші (дивись Абрамські (Abramsky) та Овадіа (Ovadia), 1997; Тройаборг (Trojaborg), 1998, Гартунг (Hartung) та інші, 1998). Незважаючи на різну етіологію, наприклад, інфекційні патогенні мікроорганізми або автоімунні реакції, усі демієлінізуючі захворювання викликають втрату неврологічної функції і можуть призвести до паралічу та смерті. Незважаючи на те, що сучасні терапевтичні засоби послаблюють запальні реакції при розсіяному склерозі та уповільнюють прогресування захворювання, існує необхідність розробки терапевтичних заходів, які можуть призвести до ремієлінізації та відновлення неврологічної функції (Абрамські (Abramsky) та Овадіа (Ovadia), 1997; Поло (Pohlau) та інші, 1998).

Від пошкоджень центральної нервової системи, викликаних гострими ураженнями, у тому числі

травмами, гіпоксією та ішемією, можуть страждати як нейрони, так і біла речовина. Хоча більша увага приділяється процесам, які ведуть до загибелі нейронів, дані, обсяг яких зростає, дозволяють зробити припущення, суть якого полягає у тому, що пошкодження олігодендроцитів, які мієлінізують аксони, є також специфічною складовою ураження центральної нервової системи. Так, патологія олігодендроцитів була продемонстрована на дуже ранній стадії після інсульту (3 год) у пацієнтів, що дозволяє зробити припущення про те, що ці клітини є навіть більш уразливими до явищ підвищення токсичності, ніж нервові клітини (Пантоні (Pantoni) та інші, 1996). Одним із потенційних кандидатів, що опосередковують загибель клітин, є виражене підвищення концентрації глутамату, яке супроводжує багато гострих уражень центральної нервової системи (Ліптон (Lipton) та інші, 1994). Дійсно, було встановлено, що, окрім нейронів, олігодендроцити також експресують функціональні рецептори глутамату, що належать до AMPA (аденілова кислота)/каїнатного субтипу. Більше того, олігодендроцити демонструють високу вразливість до застосування глутамату (Макдональд (McDonald) та інші, 1998).

Травма являє собою ураження або пошкодження нервового волокна. Це може бути травма спинного мозку, яка являє собою пошкодження спинного мозку, що уражає усі нервові функції, які контролюються на рівні та нижче рівня пошкодження, у тому числі контролювання м'язів та чутливості, або травма головного мозку, наприклад, травма, викликана закритим пошкодженням черепа.

Гіпоксія головного мозку являє собою недостатність кисню, конкретно, для півкуль головного мозку. Цей термін частіше використовують для визначення недостатнього рівня забезпечення киснем головного мозку у цілому. У залежності від тяжкості гіпоксії, симптоми можуть варіювати у межах від сплутаності свідомості до необоротного пошкодження головного мозку, коми та смерті.

Причиною інсульту є, як правило, ішемія головного мозку. Його називають також апоплексією або апоплексичним ударом. Це група розладів головного мозку, що включає втрату мозкових функцій, яка має місце у разі припинення кровопостачання до будь-якої частини головного мозку. Головний мозок потребує приблизно 20% крові, що циркулює у тілі людини. Головне постачання головного мозку на кров здійснюється через 2 артерії на шиї (сонні артерії), які у подальшому розгалужуються у межах головного мозку на численні артерії, кожна з яких постачає кров до певної ділянки головного мозку. Навіть короточасне припинення кровотоку може викликати погіршення функціонування головного мозку (неврологічний розлад). Симптоми різняться у залежності від ураженої ділянки головного мозку і включають, як правило, такі проблеми, як зміни зору, зміни мовлення, обмеження рухового діапазону або чутливості у частині тіла або зміни рівня свідомості. У разі, якщо кровоток не відновлюється впродовж декількох секунд, клітини головного мозку на цій ділянці гинуть (відмирають), наслідком чого є по-

стійне пошкодження цієї ділянки головного мозку або навіть смерть.

Інсульт уражаються приблизно 4 з 1000 людей. Це третя головна причина смертності у більшості розвинених країн, у тому числі у Сполучених Штатах. Частота виникнення інсульту різко зростає з віком, причому ризик подвоюється кожні десять років після 35-річного віку. Приблизно 5% людей віком понад 65 років мали щонайменш один інсульт. Цей розлад у чоловіків трапляється частіше, ніж у жінок.

Як згадувалось перед тим, інсульт включає втрату мозкових функцій (неврологічний розлад), що спричинюється припиненням кровопостачання ділянок головного мозку. Конкретні неврологічні розлади можуть різнитись у залежності від місцезнаходження, ступеню пошкодження та причини розладу. Інсульт може викликатись обмеженням кровотоку (ішемія), наслідком чого є недостатнє кровопостачання та загибель тканин на цій ділянці (відмирання). Причиною ішемічних нападів є згустки крові, що утворюються у головному мозку (тромби) та згустки крові або частинки атеросклеротичних бляшок або іншого матеріалу, які дістаються до головного мозку з іншого місця (емболи). Кровотеча (крововилив) у межах головного мозку може викликати симптоми, які нагадують інсульт.

Найзагальнішим різновидом інсульту є інсульт унаслідок атеросклерозу (церебральний тромбоз). Атеросклероз ("затвердіння артерій") являє собою такий стан, при якому на внутрішній вистільці артерій з'являються жирові відкладення і утворюються атеросклеротичні бляшки (маса, яка складається з жирових відкладень та тромбоцитів). Оскільки артерії розвивається повільно. Атеросклеротичні бляшки не обов'язково спричинюють інсульт. Між різними мозковими артеріями існує багато невеликих сполучень. Якщо кровоток зменшується поступово, ці невеликі сполучення збільшуються у розмірах і "шунтують" закупорену ділянку (коллатеральний кровообіг). У разі достатнього коллатерального кровообігу, навіть повністю заблокована артерія може не викликати неврологічних розладів. Другий механізм безпечності у межах головного мозку полягає у тому, що артерії є настільки довгими, що закупореними можуть бути 75% кровоносної судини і, незважаючи на це, кровопостачання до цієї ділянки головного мозку все ще буде здійснюватись на належному рівні.

Тромботичний інсульт (інсульт, спричинений тромбозом) є найпоширенішим у літніх людей і першопричиною у цьому разі часто виявляється атеросклеротична хвороба серця або цукровий діабет. Інсульт цього типу може трапитись будь-коли, у тому числі під час відпочинку. Людина може втратити або ж залишитись при свідомості.

Апоплексичні удари, що спричинюються емболом (рухомим згустком крові) є, найчастіше, наслідком кардіогенної емболії, тобто згустків крові, що утворюються із причини серцевих розладів, і які у подальшому пересуваються до головного мозку. Емболія може виникати також на інших ділянках, особливо там, де є атеросклеротичні бляшки. Ембол пересувається із кровотоком і застряє у невеликій артерії головного мозку. Такий інсульт трапляється раптово з негайним максимальним

неврологічним розладом. Він не пов'язується з рівнями активності і може трапитись у будь-який час. При цьому розладі звичайним явищем є серцеві аритмії, які часто і виявляються причиною виникнення емболу. Пошкодження головного мозку часто є більш тяжким, ніж у разі інсульту, що спричинюється церебральним тромбозом. Людина може втрачати або ж залишатись при свідомості. Ймовірні наслідки погіршуються, якщо кровоносні судини, пошкоджені інсультом, розриваються і кровоточать (геморагічний інсульт).

Периферична невротія являє собою синдром втрати чутливості, слабкості та атрофії м'язів, ослаблення глибоких сухожильних рефлексів та вазомоторних симптомів, самостійно або у будь-якій комбінації.

Згадане захворювання може уражати один нерв (моновротія), два або більше нервів на різних ділянках (множинна моновротія) або багато нервів одночасно (поліневротія). Уражається може, першочергово, аксон (наприклад, при цукровому діабеті, хворобі Ліма, уремії або токсичними агентами), мієлінова оболонка або шванівські клітини (наприклад, у разі гострої або хронічної запальної поліневротії, лейкодистрофії або при синдромі Пійєна-Барре). Наслідком пошкодження невеликих немієлінізованих та мієлінізованих нервових волокон є, головним чином, втрата відчуття температури та болю; наслідком пошкодження великих мієлінізованих нервових волокон є рухові дефекти або пошкодження пропріоцептивних нервових закінчень. При деяких невротіях (наприклад, унаслідок отруєння свинцем, застосування дапсону, укусів кліщів, при порфірії або синдромі Пійєна-Барре) уражаються, головним чином, рухові нервові волокна; у разі інших (наприклад, при раковому гангліоніті заднього корінця спинного мозку, проказі, синдромі набутого імунodefіциту (СНІД), цукровому діабеті або хронічній інтоксикації піридоксином) уражаються, головним чином, ганглії заднього корінця спинного мозку або сенсорні нервові волокна з виникненням сенсорних симптомів. Подеколи уражаються також черепні нерви (наприклад, при синдромі Пійєна-Барре, хворобі Ліма, цукровому діабеті та дифтерії). Ідентифікування залучених різновидів допомагає визначити причину.

Травма є найбільш поширеною причиною локалізованого пошкодження одного нерва. Інтенсивна м'язова активність або примусове надмірне розтягнення суглобу може спричинити вогнищеву невротію. До цього ж наслідку можуть призвести і повторні невеликі травми (наприклад, щільне затискування невеликого знаряддя, надмірна вібрація пневматичних молотків). Параліч унаслідок здавлення або защемлення спинного мозку уражає, як правило, поверхневі нерви (ліктьовий, променевий, перонеальний) на виступах кісток (наприклад, під час глибокого сну або при анестезуванні худих або виснажених осіб і, часто, алкоголік) або у вузьких каналах (наприклад, синдром каналу зап'ястя). Параліч унаслідок здавлення або защемлення спинного мозку може бути також наслідком пухлин, розростання кісткової тканини, знімних протезів (гіпсових пов'язок), милиць або три-

вального знаходження у незручному положенні (наприклад, під час роботи на городі або у саду).

Крововилив до нерва та піддання нервового волокна впливу холоду або випромінювання може викликати невротію. Моновротія може бути наслідком прямого проростання пухлини.

Множинна моновротія є, як правило, наслідком судинних колагенозів (наприклад, нодозного поліартеріїту, системного червоного вовчака, ксеродерматозу, ревматоїдного артрити), саркоїдозу, хвороб обміну речовин (наприклад, діабету, амілоїдозу) або інфекційних захворювань (наприклад, хвороби Ліма, ВІЛ-інфекції). Мікроорганізми можуть викликати множинну моновротію шляхом безпосереднього проникнення до нерва (наприклад, при проказі).

Поліневротія унаслідок гострої гарячки може бути результатом дії токсину (наприклад, при дифтерії) або впливу автоімунної реакції (наприклад, при синдромі Гійєна-Барре); поліневротія, що іноді виникає після вакцинації, можливо також є автоімунною.

Токсичні речовини, зазвичай, викликають поліневротію, але, подеколи, моновротію. До їх числа належать еметин, гексобарбітал, барбітал, хлорбутанол, сульфонаміди, фенітоїн, нітрофурантоїн, алкалоїди барвінку (*Vinca minor*), важкі метали, моноксид вуглецю, триортокрезилфосфат, ортодинітрофенол, багато розчинників, інші промислові отрути та деякі лікарські засоби для лікування СНІДу (наприклад, зальцитабін, диданозин).

Поліневротію можуть викликати дефіцити поживних речовин та хвороби обміну речовин. Причиною поліневротії часто є дефіцит вітаміну В (наприклад, при алкоголізмі, аліментарному поліневриті (бері-бері), злоякісній анемії, ізоніазидіндукованої недостатності піридоксину, синдромах мальабсорбції та нестримному блюванні вагітних (*hyperemesis gravidarum*)). Поліневротія часто спостерігається при гіпотиреозі, порфірії, саркоїдозі, амілоїдозі та уремії. Цукровий діабет може викликати сенсорно-рухову дистальну поліневротію (найчастіше), множинну моновротію та вогнищеву моновротію (наприклад, окорухового або відвідного черепного нервів).

Розвиток злоякісної пухлини може викликати поліневротію через моноклональну гаммапатію (розсіяна мієлома, лімфома), залучення амілоїду до злоякісного процесу, дефіцити поживних речовин або у формі паранеопластичного синдрому.

Специфічні моновротії: Одиночна або множинна моновротії характеризуються болем, слабкістю та парестезією у розміщені ураженого нерва. Множинна моновротія є асиметричною; нерви можуть бути уражені усі разом або поступово. Екстенсивне ураження багатьох нервів може нагадувати поліневротію.

Параліч ліктьового нерва часто спричинюється травмою нерва у ліктьовій борозенці ліктя унаслідок частого спирання на лікоть або асиметричним розростанням кісткової тканини після перелому, який був перенесений у дитинстві (пізній параліч ліктьового нерва). Ліктьовий нерв часто може здавлюватись у ліктьовому каналі. Спостерігається парестезія та відсутність чутливості у п'ятому та середній половині четвертого пальців; привідний

м'яз великого пальця, відвідний м'яз п'ятого пальця та міккісткові м'язи є слабкими та атрофованими. Наслідком тяжкого хронічного паралічу ліктьового нерва є кіттиста кисть. Дослідженням нервової провідності можна визначити місце ураження. Перед тим, як вдаватись до хірургічного відновлення, слід спробувати провести консервативне лікування.

Синдром каналу зап'ястя є наслідком здавлювання серединного нерва у долонній частині поверхні зап'ястя між поперечною поверхневою зап'ястною зв'язкою та повздожними сухожиллями м'язів, що згинають кисть руки. Згаданий синдром може бути одно- або двобічним. Здавлювання викликає парестезію променево-долонної частини поверхні кисті руки та біль у зап'ясті та долоні; подеколи біль виникає проксимально до місця здавлювання у передпліччі та плечі. Біль може бути гострішим у нічний час. Може зникнути чутливість у долонній частині поверхні трьох перших пальців; м'язи, які контролюють відведення та протидію великого пальця, можуть стати слабкими та атрофованими. Цей синдром слід відрізнити від здавлювання корінця C-6 унаслідок цервікальної радикулопатії.

Параліч перонеального нерва є, як правило, наслідком здавлювання згаданого нерва проти бічної частини поверхні шийки маломілкової кістки. Такий параліч є найпоширенішим серед виснажених прикутих до ліжка хворих та худих осіб, які мають звичку схрещувати ноги. Спостерігається слабкість при згинанні ступні дозад та її вивороті (звисла ступня). Інколи спостерігається відсутність чутливості на передньо-бічній частині поверхні гомілки та затилля ступні або на перетинковому просторі між першим та другим плеснами. Лікування невротатії, спричинених здавлюванням нерва, є, як правило, консервативним (наприклад, уникнення схрещування ніг). У разі неповних невротатії; як правило, здійснюється клінічне спостереження і, зазвичай, відбувається спонтанне поліпшення. Якщо видужання не відбувається, показаним може бути хірургічне обстеження.

Параліч променевого нерва (параліч плечового сплетіння, що звичайно спостерігається у п'яниць (унаслідок тривалого сну при незручному положенні руки) спричинюється здавлюванням нерва проти плечової кістки, наприклад, у тому разі коли рука звисає зі спинки стільця у разі інтоксикації (сп'яніння) або глибокого сну. Симптоми включають слабкість зап'ястя і розгиначів пальців (звисла кисть) та, подеколи, втрату чутливості на дорсальній частині поверхні першого дорсального міккісткового м'яза. Лікування є подібним до того, яке провадять у разі перонеальної невротатії, спричиненої здавлюванням нерва.

Поліневротатії є відносно симетричними і часто уражають чутливі, рухові та вазомоторні нервові волокна одночасно. Вони можуть уражати аксон або мієлінову оболонку і, у будь-якій формі, можуть бути гострими (наприклад, синдром Гієна-Барре) або хронічними (наприклад, ниркова недостатність).

Поліневротатія, обумовлена хворобами обміну речовин (наприклад, цукровим діабетом) або нирковою недостатністю, розвивається повільно,

часто впродовж місяців та років. Вона часто починається з порушень чутливості у нижніх кінцівках, причому частіше набагато тяжче дистально ніж проксимально. Часто вираженим є периферичне поколювання, оніміння, пекучий біль або недостатність суглобової пропріоцепції та вібраційної чутливості. Біль часто стає інтенсивнішим у нічний час, і може погіршуватись у разі торкання ураженої ділянки або при зміні температури. У тяжких випадках існують об'єктивні ознаки втрати чутливості. Ділянки втрати чутливості, як правило, припадають на дистальні відділи кінцівок ("шкарпетки-рукавички"). Глибокі рефлексії п'яtkового та інших сухожиль є значно послаблені або відсутні. У разі глибокого ступеню втрати чутливості на пальцях можуть з'являтися безболісні виразки або розвиватись нейрогенна артропатія (суглоби Шарко). Недостатність чутливості або пропріоцепції може привести до розладів ходи. Наслідком ураження рухових нервових волокон є слабкість та атрофія м'язів. Додатково або вибірково може уражатись вегетативна нервова система, наслідком чого є нічна діарея, нетримання сечі та калу, імпотенція або ортостатична гіпотензія. Вазомоторні симптоми різняться. Шкіра може бути блідшою та сухішою за нормальну, подеколи з порушенням забарвлення; потіння може бути надмірним. У тяжких, тривалих випадках захворювання часто спостерігаються трофічні зміни (гладка та блискуча шкіра, нігті з заглибленнями або виступами, остеопороз).

Харчова поліневротатія є поширеною серед алкоголиків та осіб із недостатнім або порушеним харчуванням. Первинна аксонопатія може призвести до вторинної демієлінізації та розпаду аксонів найдовших та найбільших нервів. Незрозуміло, що є причиною: недостатність тіаміну або ж іншого вітаміну (наприклад, піридоксину, пантотенової кислоти, фолієвої кислоти). Невротатія, обумовлена недостатністю піридоксину, спостерігається, як правило, лише у осіб, що приймають ізоніазид із приводу туберкульозу; у піридоксин-дефіцитних або залежних немовлят можуть спостерігатись конвульсії. Ознаки виснаження та симетричної слабкості дистальних частин кінцівок з'являються, як правило, поступово, але можуть швидко прогресувати, подеколи супроводжуватись втратою чутливості, парестезією та болем. Біль (тривалий, тупий, але не інтенсивний), судороги, відчуття холоду, горіння та оніміння у задніх частинах гомілок та ступнях можуть погіршуватись у разі торкання. У разі невизначеної етіології можуть призначатись мультивітаміни, однак їхній благотворний вплив у цьому разі не має підтвердження.

Зрідка коли, виключно сенсорна поліневротатія розпочинається з периферичних болів та парестезії і прогресує до кори головного мозку із втратою усіх форм чутливості. Це відбувається, як віддалені наслідки карциноми (особливо бронхогенної), після прийняття піридоксину у надмірних дозах (>0,5г на добу) та при амілоїдозі, гіпотиреозі, мієломі та уремії. Викликана піридоксинем невротатія зникає у разі припинення прийняття піридоксину.

Спадкові невротатії класифікуються як сенсорно-рухові невротатії або сенсорні невротатії. М'язова атрофія перонеального типу (хвороба Шарко-

Марі-Тута) є найбільш поширеною спадковою сенсорно-руховою невропатією. Менш поширені сенсорно-рухові невропатії розпочинаються з народження і спричинюють більший ступень непрацездатності. При сенсорних невропатіях, які є рідкими, втрата больової чутливості дистальними відділами кінцівок та відчуття температури є більш вираженими, ніж втрата вібраційної чутливості та відчуття положення. Головною проблемою є каліцтво ступні унаслідок нечутливості до болю з частими інфекціями та остеомієлітом.

Спадкова рухова та сенсорна невропатія типів I та II (хвороба Шарко-Марі-Тута, м'язова атрофія перонеального типу) є відносно поширеним, як правило, автосомним розладом домінантного типу, що характеризується слабкістю та атрофією, головним чином, перонеальних та дистальних м'язів ніг. Пацієнти можуть також страждати на інші дегенеративні захворювання (наприклад, спадкова атаксія Фрідрейха) або мати їх у родинному анамнезі. У пацієнтів із хворобою Шарко-Марі-Тута типу I у дошкільному віці спостерігається звисла ступня та повільно прогресуюча атрофія дистальних м'язів, що призводить до появи "журавлиних ніг". Характерна виснаженість м'язів рук з'являється пізніше. Втрата вібраційної, больової та температурної чутливості відбувається за характерною схемою ("шкарпетки-рукавички"). Глибокі рефлексі сухожиль відсутні. Високе склепіння ступні або молотоподібні пальці ступні можуть бути єдиними симптомами у менш уражених членів родини, які страждають на це захворювання. Швидкість нервової провідності є низькою, дистальний латентний стан тривалим. Відбувається сегментна демієлінізація та ремієлінізація. Можуть пальпуватись збільшені периферичні нерви. Хвороба прогресує повільно і не скорочує тривалість життя. Розвиток хвороби типу II відбувається повільніше, слабкість, як правило, виникає на пізніших етапах життя. Пацієнти демонструють відносно нормальну швидкість нервової провідності, однак, мають низьку амплітуду викликаних потенціалів. Біопсійні проби показують вторинну дегенерацію нервових волокон.

Спадкова рухова та сенсорна невропатія типу III (інтерстиціальний гіпертрофічний прогресуючий поліневрит, гіпертрофічний неврит Дежеріна-Сотта), рідкий автосомний розлад рецесивного типу, починається у дитинстві із прогресивної слабкості, втрати чутливості та відсутності глибоких рефлексів сухожиль. Початково цей розлад нагадує хворобу Шарко-Марі-Тута, однак слабкість рухових м'язів прогресує з більшою швидкістю. Відбувається демієлінізація та ремієлінізація, наслідком чого є збільшення периферичних нервів та цибулинок, що спостерігається у разі біопсії нервової тканини.

Діагноз підтверджується характерним розподілом слабкості рухових м'язів, деформуванням ступнів, родинним анамнезом та електрофізіологічними порушеннями. Доступним є генетичний аналіз; специфічного лікування немає. Корисними можуть бути фахові рекомендації з метою підготовки пацієнтів молодого віку до прогресування хвороби. Імобілізація допомагає відкоректувати звис-

лу ступню; ортопедична хірургія може допомогти стабілізувати ступню.

До нейродегенеративних захворювань належать, разом з іншими, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хорея Гентингтона та бічний аміотрофічний склероз (ALS).

Хвороба Альцгеймера являє собою розлад, який викликає погіршення розумових функцій, що є наслідком змін тканин головного мозку. Сюди входить зморщування тканин головного мозку, що не спричинюється захворюваннями кровоносних судин, первинне дегенеративне слабоумство та дифузна атрофія головного мозку. Хворобу Альцгеймера називають також старечим слабоумством альцгеймерівського типу (SDAT). Це найбільш розповсюджена причина погіршення розумових здібностей з віком. Частота ураження цим захворюванням становить приблизно 9 випадків на 10000 людей. Ця хвороба уражає жінок дещо частіше, ніж чоловіків, і трапляється, головним чином, у літніх осіб.

Причина цієї хвороби невідома. До нейрохімічних факторів, які можуть приймати участь у виникненні цієї хвороби, належить відсутність субстанції, що використовуються нервовими клітинами для передачі нервових імпульсів (нейромедіаторів), у тому числі ацетилхоліну, соматостатину, субстанції Р та норепінефрину. До факторів навколишнього середовища належить вплив алюмінію, марганцю та інших речовин. До інфекційних факторів належать пріонні (вірусоподібні мікроорганізми) інфекції, що уражають головний та спинний мозок (центрально нервову систему). У деяких родинах (які становлять від 5% до 10% випадків) існує спадкова схильність до розвитку цієї хвороби, однак ця схильність не відповідає суворому (менделівському) характеру спадковості. Діагноз, як правило, ставлять шляхом виключення інших причин слабоумства.

Дослідники встановили, що у родинах, які мають численних членів із хворобою Альцгеймера, існує певна спадкова мінливість, спільна для усіх хворих на цю хворобу. Ген, що продукує речовину, яку називають аполіпопротеїном E4, не викликає хвороби Альцгеймера, однак його присутність просто збільшує ймовірність можливого виникнення цієї хвороби. Існує багато людей, які мають ген E4 і у яких ніколи не виникає хвороба Альцгеймера.

Початок хвороби характеризується ослабленням пам'яті з поступовою втратою розумових функцій. Можуть спостерігатись зміни настрою, ураження мовної здатності, зміни ходи та інші зміни у міру розвитку хвороби. Спостерігається зменшення розміру (атрофія) тканин головного мозку, збільшення шлуночків (промійки у межах головного мозку) та поява відкладень у тканинах головного мозку.

Хвороба Паркінсона являє собою хворобу головного мозку, що характеризується тремтінням та труднощами у ході, рухливості та координації рухів. Ця хвороба пов'язується з пошкодженням частини головного мозку, яка контролює рухливість м'язів. Хворобу Паркінсона називають також тремтучим паралічем (paralysis agitans).

Ця хвороба уражає приблизно 2 з 1000 людей і найчастіше розвивається після 50-річного віку.

Вона уражає як чоловіків, так і жінок, і є одним із найбільш розповсюджених неврологічних розладів у літніх людей. Термін "паркінсонізм" означає будь-який стан, що викликає комбінацію типів змін рухливості, що спостерігається у разі хвороби Паркінсона, яка видається найбільш розповсюдженим станом, що викликає цю групу симптомів. Паркінсонізм може спричинюватись іншими розладами або зовнішніми факторами (вторинний паркінсонізм).

Хвороба Паркінсона спричинюється прогресивним пошкодженням нервових клітин частини головного мозку, яка контролює рух м'язів (базальні ядра та екстрапірамідна зона). На цій ділянці, за нормальних умов, продукується допамін, що є однією з речовин, які використовуються клітинами для передачі імпульсів (медіатори). Руйнування цієї ділянки головного мозку зменшує кількість допаміну, доступну для тіла. Недостатність допаміну порушує рівновагу між допаміном та іншими медіаторами, такими як ацетилхолін. Без допаміну нервові клітини є неспроможними до відповідної передачі інформації, і це приводить до втрати м'язової функції. Точна причина того, чому деградує клітини головного мозку, є невідомою. Згаданий розлад може уражати один або обидві боки тіла з різним ступенем втрати функції.

На додаток до втрати м'язового контролю, деякі люди із хворобою Паркінсона впадають до стану тяжкої депресії. Хоча втрата розумових здібностей у молодому віці є рідким явищем, особи з тяжкою хворобою Паркінсона можуть демонструвати загальне погіршення розумових здібностей (у тому числі слабоумство, галюцинації тощо). Слабоумство може також бути побічним ефектом деяких лікарських засобів, що застосовуються для лікування цієї хвороби.

Хорея Гентингтона являє собою спадкову автосомну неврологічну хворобу домінантного типу. Ця хвороба не є поширеною і уражає приблизно 1 з 10000 індивідів (Брайтон (Breyhton) та Хайден (Hayden), 1981). Згадана хвороба набуває клінічних ознак не раніше п'ятої декади життя і викликає психіатричні відхилення, мимовільні рухові розлади та погіршення розумових здібностей, що пов'язується з невблаганним прогресуванням до смерті, яка настає, як правило, через 17 років після початку захворювання.

Ген, що відповідає за хорею Гентингтона, називають гентингтином. Він знаходиться на хромосомі 4p і являє собою ефективний засіб постановки передклінічного та антенатального діагнозу. Генетична аномалія полягає у надмірній кількості тандемно повторюваних нуклеотидних послідовностей CAG.

Збільшення розміру повтору CAG у осіб, хворих на хорею Гентингтона, демонструє високочастотну кореляцію з віком появи клінічних симптомів. Цей зв'язок є особливо вражаючим у осіб з появою хореї Гентингтона у юнацькому віці, у яких ця аномалія набуває дуже великих розмірів, як правило, більше за 50 повторів. Довжина повторів CAG у родин, хворих на хорею Гентингтона, демонструє деяку нестабільність, яка є особливо помітною, коли діти спадкують ген гентингтин від уражених батьків.

У разі хореї Гентингтона невідомим залишається те, яким чином цей широко експресований ген спричинює вибіркиму загибель нейронів. Крім того, за результатами секвенування не вдалось виявити очевидної гомології з іншими відомими генами. Не були встановлені також структурні мотиви або функціональні домени, які забезпечили б чітке розуміння його функцій. Зокрема, без відповіді залишається питання про те, яким чином ці широко експресовані гени спричинюють вибіркиму загибель нейронів.

Бічний аміотрофічний склероз (ALS) являє собою розлад, що викликає прогресивну втрату нервового контролю за довільно скоротними м'язами із причини знищення нервових клітин у головному та спинному мозку. Бічний аміотрофічний склероз, який називають також хворобою Шарко, являє собою розлад, що викликає втрату застосування та контролю довільно скоротних м'язів. Нерви, які контролюють ці м'язи, зморщуються і зникають, що веде до втрати м'язової тканини унаслідок відсутності нервового стимулювання. Сила та координація дії м'язів слабне, причому спочатку цьому піддаються довільно скоротні м'язи (м'язи, що знаходяться під свідомим контролем, такі як м'язи рук та ніг). Ступінь втрати м'язового контролю продовжує прогресувати і відбувається ураження все більшої та більшої кількості м'язових груп. Може спостерігатись втрата нервового стимулювання напівдовільно скоротних м'язів, таких як м'язи, які контролюють дихання та ковтання. Не спостерігається негативного впливу на здатність думати або міркувати. Причина цієї хвороби невідома.

Бічний аміотрофічний склероз уражає приблизно 1 зі 100000 людей. У деяких випадках на цю хворобу постійно страждають деякі родини. Згаданий розлад уражає чоловіків частіше ніж жінок. Симптоми, як правило, з'являються у дорослому віці, часто аж після 50 років.

Травматичне пошкодження нервів може стосуватись центральної або периферичної нервової системи. Черепно-мозкова травма (TBI), яку також просто називають травмою черепа або закритою черепною травмою (CHI), являє собою травму з пошкодженням головного мозку унаслідок зовнішнього удару по голові. Це найчастіше трапляється під час дорожньо-транспортних пригод, однак може бути і результатом утоплення без летального наслідку, серцевого нападу, інсульту та інфекцій. Травматичне пошкодження головного мозку такого типу могло б, звичайно, бути наслідком припинення постачання кисню або крові до головного мозку і його можна, таким чином, називати "гіпоксичною травмою".

Черепно-мозкова травма або закрита черепна травма є наслідком удару по голові, наприклад, під час дорожньо-транспортної пригоди або падіння. У цьому разі череп ударяється об нерухомий об'єкт, і головний мозок, що знаходиться усередині черепа, обертається та крутиться на своїй осі (стовбур мозку) зі спричиненням локалізованого або широкого пошкодження. Таким чином головний мозок, який являє собою м'яку масу, оточену рідиною, що надає йому можливість "плавання", може вдарились і відскакувати від черепа, що спричинює одержання додаткових пошкоджень.

Негайно слідом після травми може йти період непритомності, тривалість якого може визначатись хвилинами, тижнями або місяцями. З причини перекручування та відскакування, головний мозок пацієнта із травматичним пошкодженням одержує, як правило, численні травматичні пошкодження та забиті місця. Це називають дифузною травмою або "незосередженим пошкодженням" головного мозку. Типи мозкових травм, що трапляються під час незосереджених пошкоджень, можуть класифікуватись як первинні або вторинні.

Первинні травми головного мозку виникають під час пошкодження, головним чином, на місцях удару, зокрема, у разі наявності тріщини черепа. Великі контузії можуть пов'язуватись із внутрішньомозковим крововиливом або супроводжуватись розривами кори мозку. Розсіяні пошкодження аксонів виникають як наслідок зсувів та відносної деформації розтягненням відростків нейронів, які спричинюються ротаційними рухами головного мозку у межах черепа. Можуть виникати невеликі геморагічні ураження або розсіяні травми аксонів, які можуть виявлятися лише шляхом мікроскопічного дослідження.

Вторинні травми головного мозку виникають як результат ускладнень, що розвиваються після моменту пошкодження. До їх числа належить внутрішньочерепний крововилив, травматичне пошкодження екстрацеребральних артерій, утворення внутрішньочерепної грижі, гіпоксичне пошкодження головного мозку або менінгіт.

Відкрита черепно-мозкова травма є видимим результатом удару по голові і може бути наслідком вогнепальної рани, дорожньо-транспортної пригоди або виникнути під дією предмету, що проходить через череп до головного мозку ("зосереджене пошкодження головного мозку"). У разі черепної травми такого типу більш ймовірним є пошкодження конкретної зони головного мозку.

Так звані легкі травми головного мозку можуть траплятись без втрати свідомості або, можливо, лише з нетривалим відчуттям приголомшення або сплутаності свідомості. Хоча медична допомога, що надається, може бути мінімальною, особа із травмою головного мозку без коми може зазнавати симптомів та порушень, подібних до тих, що були перенесені особою, що вижила після коматою травми.

Як реакція на травму, у головному мозку відбуваються зміни, що потребують постійного контролювання для запобігання додаткового пошкодження. Розмір головного мозку після тяжкої черепно-мозкової травми часто збільшується. Це називають набуханням мозку, і воно відбувається у разі збільшення кількості крові, що надходить до головного мозку. На пізніших стадіях перебігу хвороби у головному мозку може збиратись вода, що називають набряком мозку. Наслідком як набухання, так і набряку є надмірне підвищення тиску у головному мозку, який називають внутрішньочерепним тиском ("ICP").

Травми спинного мозку є причиною більшості випадків госпіталізування із приводу паралепії та тетраплегії. Більше за 80% є результатом дорожньо-транспортних пригод. Клінічно розпізнаються

дві головні групи пошкоджень: відкриті травми та закриті травми.

При відкритих травмах відбувається безпосереднє пошкодження спинного мозку та нервових корінців. Наскрізні травми можуть спричинювати широкі розриви та кровотечі. Закритими травмами є більшість спінальних травм, і вони, як правило, пов'язуються з переломом/вивихом хребта, що, як правило, виявляється при рентгеноскопічному обстеженні. Пошкодження спинного мозку залежить від ступеню пошкодження кісток і може під-розділятися на два головні етапи: первинне пошкодження, яким є контузії, розсікання нервових волокон та геморагічний некроз, і вторинне пошкодження, яким є екстрадуральна гематома, інфаркт, інфекція та набряк.

Залишковими явищами пошкодження спинного мозку є: вторинна дегенерація пошкоджених висхідних або низхідних нервових волокон, пост-травматична сирингомієлія та системні явища паралепії, наприклад, інфекція сечових шляхів та грудної клітки, пролежні та виснаження м'язів.

Неврологічні розлади можуть додатково викликатись вродженими захворюваннями обміну речовин. Мієлінові оболонки, що вкривають багато нервових волокон, складаються з ліпопротеїнових шарів, що утворюються на початку життя. Мієлін, утворений олігодендроцитом у центральній нервовій системі, відрізняється хімічно та імунологічно від мієліну, який був утворений шванівськими клітинами периферичної нервової системи, однак мієлін обох типів має однакову функцію: стимулювати передачу нервового імпульсу вздовж аксона.

Багато вроджених захворювань обміну речовин (наприклад, фенілкетонурія та інші аміноацидурії; хвороба Тея-Сакса (рання дитяча амавротична ідіотія), хвороба Німанна-Піка (лішоїдний гістіоцитоз) та хвороба Гоше (спадковий глікоцереб्रोлизидоз); синдром Гурлера (мукополісахаридоз I типу); хвороба Краббе (глободно-клітинна лейкоцистозія Краббе) та інші лейкоцистозії) негативно впливають на мієлінову оболонку, що розвивається, головним чином, у центральній нервовій системі. Якщо біохімічний дефект не буде виправлений або компенсований, наслідком являться постійні, часто широкі, неврологічні розлади.

Наприклад, хвороба Краббе або глободно-клітинна лейкоцистозія Краббе являє собою розлад, при якому відбувається ураження білої речовини периферичної та центральної нервових систем. Наслідком мутацій гена лізосомного ферменту галактоцеребозидози (GALC) є низька ферментативна активність та ослаблена здатність до розщеплення галактоліпідів, які знаходяться майже виключно у мієліні. Процес мієлінізації та/або ремієлінізації, що триває у пацієнтів, потребує функціональних ендогенних олігодендроцитів або трансплантування нормальних олігодендроцитів чи стовбурових клітин, які можуть диференціюватись у олігодендроцити, з метою забезпечення достатнього рівня експресії GALC (Венгер (Wenger) та інші, 2000).

Нейрофіброматоз 1 (NF1) являє собою загальний автосомний розлад із широким діапазоном неврологічних проявів.

Множинна системна атрофія (MSA) являє собою спорадичне нейродегенеративне захворювання невідомої етіології, що з'являється у дорослому віці. Цей стан може займати унікальне місце серед нейродегенеративних захворювань завдяки помітній, якщо не головній, ролі, яка відіграється олігодендрогліальними клітинами у патогенетичному процесі. Головна відмінність від хвороби Паркінсона полягає у тому, що пацієнти, хворі на множинну системну атрофію, не реагують на лікування L-ДОФА.

Демієлінізація на пізніших етапах життя є характерною ознакою багатьох неврологічних розладів; вона може бути результатом пошкодження нервових волокон або мієліну унаслідок місцевої травми, ішемії, впливу токсичних речовин або захворювань обміну речовин. Існують також дані, що демієлінізація може додавати свій внесок до шизофренії. Слідом за екстенсивною втратою мієліну іде, як правило, переродження аксонів і, часто, переродження тіла клітини. Обидва згадані процеси можуть бути необоротними. Однак у багатьох випадках відбувається ремієлінізація і репарація, регенерація та повне відновлення нервової функції може бути швидким процесом. Демієлінізація нервових волокон центральної нервової системи (тобто спинного мозку, головного мозку або зорових нервів) є переважним наслідком первинних демієлінізуючих захворювань, етіологія яких є невідомою. Найвідомішим із цих захворювань є розсіяний склероз (MS).

Характерними ознаками гострого дисемінованого енцефаломієліту, постінфекційного енцефаломієліту є периваскулярна демієлінізація центральної нервової системи, яка може відбуватись спонтанно, але, як правило, відбувається після вірусної інфекції або вакцинації вірус-вакциною (або, дуже рідко, вакцинації бактеріальною вакциною), що дозволяє припустити імунологічну причину. Гострі запальні периферичні невротії після вакцинації вірус-вакциною або синдрому Гійєна-Барре (гострий первинний ідіопатичний полірадікулоневрит) є подібними демієлінізуючими розладами з таким саме гіпотетичним імунопатогенезом, однак вони уражають лише периферичні структури.

Метахроматична лейкодистрофія являє собою ще одне демієлінізуюче захворювання. Адренолейкодистрофія та адреномієлонеуропатія є рідкими зчепленими із X-хромосомою захворювання обміну речовин рецесивного типу, які характеризуються дисфункцією надниркових залоз та широкою демієлінізацією нервової системи. Адренолейкодистрофія трапляється у молодих хлопців, адреномієлонеуропатія у підлітків. Можуть мати місце погіршення розумових здібностей, м'язова спастичність та сліпота. Адренолейкодистрофія є незмінно фатальною. Вивчаються харчовий та імуномодуляторний методи лікування.

Спадкова атрофія зорового нерва Лебера та споріднені мітохондріальні розлади характеризуються, головним чином, двобічною втратою центрального зору і уражають, як правило, молодих чоловіків віком 19-20 років. Спадкова атрофія зорового нерва Лебера може нагадувати ретробульбарний неврит при розсіяному склерозі. Були

встановлені мутації мітохондріальної ДНК, що спадкується по материнській лінії.

HTLV-асоційована мієлопатія (HTLV - вірус людського Т-клітинного лейкозу), повільно прогресуюче захворювання спинного мозку, що пов'язується з інфікуванням людським Т-клітинним лімфотрофним вірусом, характеризується спастичною слабкістю обох ніг.

Додаткові неврологічні розлади включають невротії з аномальною мієлінізацією; огляд цих розладів наведено нижче.

Імунні: гостра невротія, синдром Гійєна-Барре, хронічна невротія, хронічна імунна демієлінізуюча полірадікулоневротія (CIDP), багатогнищова CIDP, багатогнищова невротія рухових нервів (MMN), анти-MAG (міннесотський антилімфобластний глобулін) синдром, синдром GALOP, синдром анти-сульфатидних антитіл (із сироватковим М-білком), синдром анти-GM2 антитіл, синдром POEMS, поліневротична органомегалія, ендокринопатія або набряк, М-білок, переродження шкіри, периневрит, синдром (періодичний) IgM анти-GD1b антитіл.

Токсини: дифтерія, жостер, гексахлорофен, ціанат натрію, телур.

Лікарські засоби: Головним чином, демієлінізуючі: хлороквін (chloroquine), FK506 (такролім (tacrolimus)), пергексилін (perhexiline), прокаїнамід (procainamide), цимельдин (zimeldine); змішані демієлінізуючі/аксонні: аміодарон (amiodarone), синдром еозинofilії-міалгії, голд (gold), сурамін (suramin), таксол (taxol).

Спадкові: вуглевод-дефіцитна глікопротеїнова невротія, катаракти/лицьовий дисморфізм, синдром Коккейна, вроджена гіпомієлінізація, вроджена м'язова дистрофія: мерозин-дефіцитна, синдром Фарбера (вроджений дисемінований злоякісний ліпогранулематоз), HMSN (спадкова багатогнищова склеротизуюча невротія)/хронічний розсіяний тендіт домінуючого типу: IA, IB, III, HNPP, EGR2, термочутлива, рецесивного типу: III (гіпертрофічний неврит Дежеріна-Сотта); 4A; 4B; 4B2; 4C; 4D (LOM), 4E, 4F; HMSN-R (спадкова багатогнищова склеротизуюча невротія рецесивного типу); ЦНС, зчеплена з X-хромосомою: IX, хвороба Краббе (дифузний інфантильний склероз Краббе), синдром Марінеску-Шегрена, метахроматична лейкодистрофія, хвороба Німанна-Піка (ліпоїдний гістіоцитоз), хвороба Пуліцеуса-Мерцбахера (суданогілія лейкодистрофія) (PLP), синдром Рефсума, пріонний білок (PrP27-30): мутація Glu200Lys, хвороба Крейтцфельда-Якоба (кортико-стріоспинальна дегенерація), мишача модель: надекспресія пріонів, хвороба Салла, SOX10, тенасцин-ХА, нерівномірне ущільнення периферичних мієлінових оболонок, синдром Елерса-Данлоса (гіпереластична шкіра).

Обміну речовин (незвичні): діабет (унаслідок одночасної хронічної імунної демієлінізуючої поліневротії), гіпотиреоз, хвороби печінки.

Мітохондріальні: синдром MNGIE, міопатія/зовнішня хронічна офтальмоплегія, невротія, енцефалопатія шлунково-кишкового тракту, синдром NARP, невротія, атаксія, ретиніт, пігментоза.

Інфекції: хвороба Крейтцфельда-Якоба (кортико-стріоспінальна дегенерація), дифтерія, ВІЛ: асоційована хронічна імунна демієлінізуюча поліневропатія, проказа: лепроматоз; змішана аксон-демієлінізуюча невропатія; колонізовані шванівські клітини, різновид хвороби Крейтцфельда-Якоба.

Додаткові подробиці можна одержати на наведеному далі інтернет-сайті: <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/other/myelin.html>.

Розсіяний склероз (MS) являє собою запальне демієлінізуюче захворювання центральної нервової системи (ЦНС), яке набуває рецидивно-ремітуючого або прогресуючого перебігу. Розсіяний склероз є не тільки демієлінізуючим захворюванням. Двійником цього захворювання у периферичній нервовій системі є хронічна запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія (CIDP). Крім того, існують гострі монофазні розлади, такі як запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія, яку називають синдромом Гійєна-Барре (GBS) у периферичній нервовій системі та гострий дисемінований енцефаломієліт (ADEM) у центральній нервовій системі. Як розсіяний склероз, так і синдром Гійєна-Барре є гетерогенними синдромами. У разі розсіяного склерозу різні екзогенні фактори разом із генетичними факторами можуть призвести до перебігу захворювання, який, врешті-решт, відповідатиме діагностичним критеріям. При обох захворюваннях пошкодження аксонів може додаватися до переважно демієлінізуючого ураження і спричинювати постійні неврологічні розлади.

Розсіяний склероз є найбільш поширеним із вищезгаданих демієлінізуючих захворювань. Це захворювання характеризується як автоімунний розлад, під час якого лейкоцити імунної системи "атакують" білу речовину центральної нервової системи (ЦНС). Може також уражатись сіра речовина. Незважаючи на те, що точна етіологія розсіяного склерозу є невідомою, сприяючими факторами можуть бути генетичні, бактеріальна та вірусна інфекція. У своєму класичному прояві (85% усіх випадків) розсіяний склероз характеризується почерговими рецидивно/ремітуючими фазами, які відповідають нападам порушення неврологічних функцій, що тривають впродовж декількох тижнів після значного або повного видужання (Нозворті (Noseworthy), 1999). Періоди ремісії з часом стають коротшими. Після цього багато пацієнтів вступають до кінцевої фази захворювання, яка характеризується поступовою втратою неврологічних функцій із частковим відновленням або без відновлення. Це називають вторинним прогресивним розсіяним склерозом. Невелика частка (~15% усіх пацієнтів, хворих на розсіяний склероз) страждає від поступового та безперервного погіршення неврологічних функцій з самого початку захворювання (первинний прогресивний розсіяний склероз). Зараз не існує певних способів лікувального впливу на найтяжчі форми розсіяного склерозу, які, як правило, є фатальними.

Головною ознакою розсіяного склерозу є демієлінізаційні бляшки з утворенням реактивного гліального рубця, які спостерігаються у білій речовині головного та спинного мозку. Демієлінізація пов'язується з функціональним погіршенням або блоку-

ванням провідності нервових імпульсів. У пацієнтів, хворих на розсіяний склероз, спостерігається також розсікання та загибель аксонів (Б'яртмар (Bjartmar) та інші, 1999). Результати досліджень патологічного матеріалу показали, що основне ураження обмежується зоровими нервами, перивентрикулярною білою речовиною, стовбуром мозку та спинним мозком (Сторч (Storch) та інші, 1998). Наслідками цих дефектів ЦНС є симптоми гострої диплопії, оніміння та непевна хода, а також хронічні симптоми, наприклад, спастичний паралез та нетримання.

Молекулярні механізми, що лежать у основі патогенезу розсіяного склерозу, як видається, коріняться у генетичних факторах та факторах навколишнього середовища, у тому числі вірусних та бактеріальних інфекціях. Ці механізми стимулюють посилену міграцію Т-лімфоцитів та макрофагів через гематоенцефалічний бар'єр до тканини центральної нервової системи.

Демієлінізація спричинюється нападом на мієлін активованих макрофагів та мікроглії, а також пошкодженням мієлінізуючих клітин, механізм якого коріниться у передачі сигналу Fas-лігандом та комплемент- або антитіло-опосередкованій цитотоксичності. Таким чином, демієлінізація відбувається унаслідок як безпосереднього нападу на мієлінові оболонки, так і унаслідок знищення клітин, які продукують та підтримують мієлін.

Генетичні елементи та елементи навколишнього середовища викликають підвищений приплив запальних клітин через гематоенцефалічний бар'єр. Наслідком цього є посилена міграція автореактивних Т-лімфоцитів та макрофагів до тканини центральної нервової системи. Секретування цитокіну Т-клітинами активує антиген-презентуючі клітини (APCs). Коли автореактивні Т-клітини у контексті молекул головного комплексу гістосумісності класу II на антиген-презентуючих клітинах зустрічають гіпотетичні "антигени розсіяного склерозу", якими часто є білкові складові мієлінової оболонки, вони можуть активуватись. У такому разі можуть спрацювати декілька подальших механізмів із пошкодженням олігодендроцитів та мієліну. Більша частина пошкоджень у деяких пацієнтів може спричинюватись комплемент- та антитіло-опосередкованою цитотоксичністю, у той час як у інших біла речовина може піддаватись нападу у результаті передачі сигналу Fas-лігандом та виділення CD4⁺ Т-клітинами передзапальних цитокінів, наприклад, TNF (некротичний пухлинний фактор)- α . Активовані макрофаги можуть також відігравати роль за посередництвом підсиленого фагоцитозу та секретування факторів. Це викликає широку демієлінізацію та подальшу втрату провідної ефективності серед аксонів центральної нервової системи. Подальші репараційні механізми можуть, однак, започаткувати ремієлінізацію після припинення запального процесу. Ремієлінізовані аксони пацієнтів, що страждають на розсіяний склероз, розпізнаються при дослідженні патологічного матеріалу завдяки тонким оболонкам довкола ремієлінізованих аксонів. У демієлінізованих аксонних мембранах часто виявляються додаткові натрієві канали, які компенсують втрату провідної ефективності. Попередники олігодендроцитів

можуть стимулювати ремієлінізацію уражень, що виникають у разі розсіяного склерозу.

Олігодендроцит виконує численні функції, пов'язані із продукуванням ним та підтримкою мієлінової оболонки. Він забезпечує ізоляцію, підтримку та стимулювання провідності для аксонів численних нейронів. Один олігодендроцит може мієлінізувати до 50 різних аксонів. Мієлінізація обмежується лише певними аксонами великого діаметру; дендрити та інші відростки клітини, наприклад, відростки астроцитів, залишаються немієлінізованими. Аксони, як видається, здійснюють контроль над рядом мієлінізуючих олігодендроцитів, оскільки розсікання аксонів у парадимі зорового нерва пацюка пригнічує відновлення мієліну та продукування попередника олігодендроциту (оглядова стаття Баррес (Barres) та Рафф (Raff), 1999). Проліферація та міграція олігодендроцитів може стимулюватись факторами, що виділяються аксонами у процесі розвитку. Таким чином, кількість олігодендроцитів та аксонів чітко узгоджується у межах центральної нервової системи.

Олігодендроцити, перинейронні опорні клітини центральної нервової системи, мієлінізують провідні шляхи аксонів і служать для підсилення трансдукції імпульсів. Вони відіграють роль у виживаності та функціонуванні аксонів. Слід звернути увагу на те що, як показано на схемі, олігодендроцит простягає лише один відросток до кожного аксона, який він мієлінізує.

Багатошарова мієлінова оболонка є спеціалізованою ділянкою плазматичної мембрани гліальних клітин, що є багатою на ліпіди і бідною на білок. Вона використовується для підтримування аксонів та поліпшення ефективності проведення електричних сигналів у центральній нервовій системі шляхом запобігання втрати заряду до навколишньої тканини. Перехвати Ранв'є являють собою ділянки оболонки вздовж аксона, де відбувається стрибкоподібна провідність.

У головному мозку дорослої особи олігодендроцити розвиваються із все ще слабо вивчених клітин-попередників у субвентрикулярній зоні та у спинному мозку (Найт-Умесмар (Nait-Oumesmar) та інші, 1999). Ці попередники є проліферативними і експресують мієлінові транскрипти та білки; спершу вони з'являються у вентральній ділянці спинного мозку зародка за декілька тижнів до мієлінізації (Хайгоссейні (Hajihosseini) та інші, 1996). Процес мієлінізації відбувається у постнатальному головному мозку. У процесі постнатального розвитку ці попередники мігрують до нейронних шляхів, які повинні мієлінізуватись.

Олігодендроцити визрівають зі своїх клітин-попередників визначеним та специфічним чином (дивись огляд, наприклад, у Роджістер (Register) та інші, 1999). Розвиток олігодендроциту проходить певним шляхом, кожен етап якого позначається декількома клітинно-специфічними маркерами: фактор адгезії ендотеліальних невротитів (E-NCAM), віментин, A2B5, фактор транскрипції POU Tst-1/Oct6/SCIP, передолігодендробластний антиген (POA), галактоцереброзид (GA1C), O1, O4 та мієлін-специфічні білки PLB, MBP та MOG. Нейронні стовбурові клітини породжують біполярні перед-GD3⁺ клітини, які стають попередниками

O2A. Ці клітини можуть породжувати олігодендроцити або астроцити типу 2. Розвиток продовжується через передолігодендрогліальні та перед-GA1C⁺ стадії перед фактичною диференціацією на олігодендроцити. Кінцеві етапи олігодендрогліального напрямку диференціації визначаються нездатністю цих клітин до проліферації. Зрілі олігодендроцити, разом з експресією мієлін-специфічних білків, експресують клітинно-специфічні маркери GA1C та сульфатид (SUL).

Олігодендроцити, таким чином, диференціюються із мітотично активних мігруючих клітин-попередників. Після того як ці клітини стають постмітотичними, вони транскрибують та транскують гени, що кодують мієлін-специфічні білки. Вироблення мієлінової оболонки, що обгортає аксон, запускається прямим контактом між відростками зрілого олігодендроциту та самим аксоном. Процес утворення оболонок аксонів центральної нервової системи завершується ущільненням мієлінової оболонки, яка, у своїй кінцевій формі, нагадує рідкий кристал, що містить макромолекули у складній формації (Шерер (Scherer), 1997). Стимулювання мієлінізації потребує розгляду точного стехіометричного відношення між окремими структурними білками мієлінової оболонки, оскільки наслідком збільшення або зменшення кількості однієї складової може бути порушення усієї структури оболонки.

Нездатність олігодендроцитів до підтримування репарації демієлінованих аксонів додає свій внесок до кумулятивної неврологічної дисфункції, що характеризує розсіяний склероз. Стимулювання ремієлінізації у пацієнтів, хворих на розсіяний склероз, може захистити від втрати аксонів і, тим самим, обмежити прогресування непрацездатності, пов'язаної із загибеллю аксонів у центральній нервовій системі.

Демієлінізуючий фенотип розсіяного склерозу обумовлює необхідність проведення екстенсивних досліджень відносно природи активних склеротичних уражень. Оголені аксони та відсутність мієлінізуючих олігодендроцитів вказує на руйнування нормального мієліну та відхилення у процесі ремієлінізації, пов'язані з розсіяним склерозом. Було показано, що приблизно 40% склеротичних уражень демонструє ознаки передчасно припиненої ремієлінізації, зокрема, на початкових стадіях захворювання (Прінеас (Prineas) та інші, 1993). Це показує реальні перспективи щодо того, що розвиток стратегій стимулювання відновлення мієліну може запобігти постійному пошкодженню нервової системи. Ймовірність успіху є особливо високою у разі ушкоджень центральної нервової системи, які з'явилися дещо пізніше, і які, як уже було показано, були піддані початковій ремієлінізації. Однак мієлінізуючий або ремієлінізуючий олігодендроцит є клітиною, що знаходиться у стані надзвичайного метаболічного стресу, і яка під тиском навіть незначних додаткових пошкоджень може бути необоротно зруйнованою (Сколдінг (Scolding) та Лассман (Lassmann), 1996). Це зменшує ймовірність спонтанного відновлення у активному склеротичному ушкодженні, де запалення та інші пошкодження стають перешкодою для ремієлінізації. Стратегії, що стимулюють відновлення мієліну,

можуть, таким чином, забезпечити додаткові переваги на користь ремієлінізації та захисту аксонів у активних склеротичних ураженнях.

Було показано, що центральна нервова система дорослої людини включає в себе клітини-попередники олігодендроцитів, які є здатними до проліферації, і які можуть визрівати у мієлінізуючі олігодендроцити. Видається, крім того, що популяції ендегенних попередників олігодендроцитів, прилеглі до склеротичних уражень, вичерпуються під час хронічних стадій захворювання унаслідок пригнічення здатності цих попередників до проліферації та диференціації (Волсвік (Wolswijk), 1998). Такі клітини-попередники знаходяться, як правило, у стані спокою у оточенні хронічного склеротичного ураження, що перешкоджає їм прийняти активну участь у ремієлінізації. Ситуація при хронічних склеротичних ураженнях, таким чином, залучає фактори, що перешкоджають регенерації олігодендроцитів або при ній бракує факторів, необхідних для стимулювання популяції клітин-попередників олігодендроцитів (Волсвік (Wolswijk), 1998). Ця концепція веде до гіпотези, яка полягає у тому, що ефективна терапія розсіяного склерозу не повинна обмежуватись пригніченням запалення, але повинна також сприяти ремієлінізації. Ремієлінізуючі клітини можуть походити з різноманітних джерел, у тому числі вони можуть бути з числа нативних для цього ураження олігодендроцитів, що залишились живими, клітин, які одержали зі згаданих олігодендроцитів, що залишились живими, або прилеглих клітин-попередників. Було показано, що індукування зрілих олігодендроцитів до дедиференціації та проліферації може здійснюватись такими факторами, наприклад, як основний фактор росту фібробластів (bFGF), що дозволяє припустити існування механізму регенерації олігодендроцитів напрямку диференціації після демієлінізуючої хвороби (Грінспан (Grinspan) та інші, 1996; Грінспан (Grinspan) та інші, 1993).

Додаткові свідчення щодо позитивних ефектів ремієлінізації при демієлінізуючих розладах, таких як розсіяний склероз, надаються дослідженнями, проведеними з факторами росту глії як лікувальними засобами на тваринних моделях цього захворювання. На мишачій моделі (експериментальний автоімунний енцефаломієліт) розсіяного склерозу було показано, що фактор росту глії 2 (нейрогулін/GGF-2), фактор росту центральної нервової системи, який, як відомо, стимулює проліферацію та виживаність олігодендроцитів, затримує початок захворювання, полегшує клінічну тяжкість та скорочує частоту рецидивів (Маркони (Marchionni) та інші, 1999). Було показано, що нейрогулін має позитивний ефект на виживаність зрілих олігодендроцитів і продукується аксонами (Фернандес (Fernandez) та інші, 2000).

Було показано, що інші фактори росту, у тому числі тромбоцитарний фактор росту (PDGF) та інсуліноподібний фактор росту (IGF-1), стимулюють ремієлінізацію і демонструють терапевтичні ефекти на моделях експериментального автоімунного енцефаломієліту (огляд у Дюбуа-Дальк (Dubois-Dalcq) та Муррей (Murray), 2000). Успіх, досягнутий зі стимулюванням ремієлінізації шляхом індукування проліферації та/або диференціа-

ції клітин олігодендроцитарного напрямку диференціації, вказує на позитивні перспективи ремієлінізації як терапевтичної стратегії для розсіяного склерозу. Важливо було б також ідентифікувати молекули, які пригнічують синтез мієліну, оскільки вони можуть знижувати ефективність стратегій відновлення, наприклад, трансплантування олігодендроцитальних клітин при розсіяному склерозі.

Процес ремієлінізації міг би спрацювати у сполученні із протизапальними шляхами загоєння пошкодження та захисту аксонів від розсікання та загибелі.

Олігодендроцити можуть бути індуковані до ремієлінізації аксонних трактів у центральній нервовій системі, з внесенням, тим самим, вкладу до поліпшення хворобливого стану. Стимулювання ремієлінізації могло б протидіяти попередньому пошкодженню, яке було спричинене вторгненням клітин імунної системи до тканини центральної нервової системи та їх нападом на мієлінові оболонки.

Деякі аналізи диференціації олігодендроцитальних клітин та уражень при розсіяному склерозі здійснили із застосуванням візуалізації мікропослідовностей диференційної експресії генів (DGE, Scarlato (Скарлато) та інші, 2000; Уїтні (Whitney) та інші, 1999). Для аналізу різних наборів генів були використані суттєво інші методики одержання послідовностей. Результати аналізу експресії генів як у олігодендроцитів у процесі диференціації, так і при склеротичних ураженнях, продемонстрували значні зміни у експресії мієлін-специфічних генів. Крім того, були точно визначені інші гени як такі, що регулюються диференційовано. Було відомо, що багато з них є залученими до таких процесів, як контроль клітинного циклу, реорганізація цитоскелету та спрямована черезоболонкова міграція (Скарлато (Scarlato) та інші, 2000).

Остеопонтин являє собою високофосфорилований сіалопротейн, що є одним із головних компонентів мінералізованих екстрацелюлярних матриксів кісток та зубів. Характерним для остеопонтину (OPN) є присутність послідовності поліаспарагінової кислоти, ділянок фосфорилювання Ser/Thr, яке опосередковує зв'язування гідроксипатиту, та висококонсервативного мотиву RGD, який опосередковує прикріплення клітин/передачу сигналу. Експресія остеопонтину у різноманітних тканинах вказує на численні функції, що залучають один або декілька з цих консервативних мотивів. У той час як відсутність явно вираженого фенотипу у мишей з "нокаут" OPN не дозволяє встановити точно визначену роль остеопонтину у будь-якій тканині, результати нещодавніх досліджень надали деякі нові та цікаві факти щодо універсальності цього білка у різних біологічних явищах, у тому числі еволюційних процесах, заживленні ран, імунологічних реакціях, онкогенезі, резорпції кісток та кальцифікації. Здатність остеопонтину до стимулювання активності клітин через численні рецептори, пов'язані з декількома інтерактивними сигнальними шляхами, може служити поясненням більшої частини його функціональної універсальності (Содек (Sodek) та інші).

Було показано також, що остеопонтин експресується первинними сенсорними нейронами у спинному мозку та трійчастому нерві пацюків як у тілі нервових клітин, так і у аксонах (Ішікава (Ichikawa) та інші, 2000).

Як показано результатами гібридизації *in situ*, мРНК остеопонтину експресується у головному мозку дорослої особи. Експресію було виявлено у нейронах нюхової цибулини та стовбура головного мозку, причому експресія у нейронах стовбура головного мозку була виявлена на функціонально різних ділянках, у тому числі на ділянках, пов'язаних з руховими нервами, у сенсорній системі та у ретикулярній формації (Шін (Shin) та інші, 1999).

Під час проведення іншого дослідження вивчали просторову та часову експресію мРНК остеопонтину після перебіжної ішемії переднього мозку у пацюків. Перебіжна індукція мРНК OPN після глобальної ішемії відбувалась раніше у смугастому тілі, аніж у гіпокампі. Перед тим як клітини мікроглії стали більш реактивними, індукція була явно вираженою у дорсомедіальному смугастому тілі поблизу від бічного шлуночка, у субзоні CA1 та у опорній структурі гіпокампа. Індукція могла також виявлятися у зубчастих воротах та, на зникаюче малому рівні, у субзоні CA3 (Лі M.I. (Lee M.Y.), Шін С.Л. (Shin S.L.), Чоу I.C. (Choi Y.S.), Кім Е.Дж. (Kim E.J.), Ча Дж.Х. (Cha J.H.), Чан М.Х. (Chun M.H.), Лі СБ. (Lee S.B.), Кім С.І. (Kim S.Y.), *Neurosci Lett*, 1999, Aug 20 271:2 81-4).

Остеопонтин називають також Eta-1. У [WO 00/63241] розкривають способи модулювання імунних реакцій, зокрема, способи модулювання імунних реакцій типу 1 із застосуванням модуляторів Eta-1 (активація ранніх Т-лімфоцитів-1)/остеопонтину. Повідомляють, що модулятори остеопонтину є придатними для лікування інфекцій, імунних розладів та захворювань, аутоімунних розладів, у тому числі розсіяного склерозу, різних імунодефіцитів та раку. Усі модулятори остеопонтину, розкриті у [WO 00/63241], які розглядаються як придатні при аутоімунних захворюваннях, у тому числі розсіяному склерозі, є інгібіторами остеопонтину/Eta-1, як докладно пояснюється у [розділі V "Clinical Applications of the Modulatory Methods of the Invention", D "Autoimmune Diseases" на сторінках 51-53 WO 00/63241].

Інтерферони є субкласом цитокінів, що демонструють протизапальну, антивірусну та антипроліферативну активність. На основі біохімічних та імунологічних властивостей, природні людські інтерферони об'єднуються у три класи: інтерферон альфа (лейкоцит), інтерферон бета (фібробласт) та інтерферон гамма (імунний). Альфа-інтерферон зараз схвалено у Сполучених Штатах та інших країнах для лікування волосатоклітинного лейкозу, гострокінцевих кондилом, саркоми Капоші (рак, який звичайно уражує пацієнтів, що страждають на синдром набутого імунодефіциту людини (СНІД)) та хронічного ні-А, ні-В гепатиту.

Далі, інтерферони (IFNs) є глікопротеїнами, що продукуються організмом у відповідь на вірусну інфекцію. Вони пригнічують розмноження вірусів у захищених клітинах. Інтерферони складаються з низькомолекулярного білка і є надзвичайно неспецифічними за своєю дією, наприклад, інтер-

ферон, індукований одним вірусом, є ефективним проти цілого ряду інших вірусів. Вони, однак, є видоспецифічними, тобто інтерферон, продукований одним видом, буде стимулювати антивірусну активність лише у клітинах того саме або тісноспорідненого виду. Інтерферони були першою групою цитокінів, які почали використовувати завдяки їх протипухлинній та антивірусній активності.

Три головні інтерферони позначають як IFN- α , IFN- β та IFN- γ . Такі головні види інтерферонів були початково класифіковані відповідно до їхніх клітин походження (лейкоцит, фібробласт або Т-клітина). Однак стало зрозумілим, що однією клітиною можуть продукуватися інтерферони декількох типів. Таким чином, лейкоцитарний інтерферон зараз називають IFN- α , фібробластний інтерферон є IFN- β та Т-клітинний інтерферон є IFN- γ . Існує також інтерферон четвертого типу, лімфобластоїдний інтерферон, що продукується лінією клітин "Namalwa" (яка була одержана з лімфоми Бьоркі-та), і яка, як видається, продукує суміш як лейкоцитарного, так і фібробластного інтерферонів.

Інтерферонова одиниця є критерієм активності інтерферону, яка визначається (дещо необґрунтовано), як кількість, необхідна для захисту 50% клітин проти пошкодження вірусом.

Кожен клас інтерферонів включає декілька різних типів. Кожен з IFN- β та IFN- γ є продуктом одного гена. Різниця між окремими типами головним чином обумовлюється, як видається, варіаціями процесу глікозилювання.

Інтерферони альфа є найбільш різноманітною групою, що включає приблизно 15 типів. На хромосомі 9 існує кластер генів IFN- α , що включає щонайменш 23 члени, 15 з яких є активними і транскрибуються. Зрілі інтерферони альфа не глікозилюються.

IFN- α та IFN- β мають однакову довжину (165 або 166 амінокислот) і однакову біологічну активність. Інтерферони гамма мають у довжину 146 амінокислот і не так близько нагадують класи α та β . Лише IFN- γ можуть активувати макрофаги або індукувати визрівання Т-клітин-кілерів. Фактично ці терапевтичні агенти нових типів можуть називатися модифікаторами біологічної реакції (BRMs), оскільки вони мають ефект на реакцію організму на пухлину і впливають на розпізнавання через імуномодуляцію.

Зокрема, людський фібробластний інтерферон (IFN- β) має антивірусну активність і може також стимулювати природні клітини-кілери проти неопластичних клітин. Він являє собою поліпептид масою приблизно 20000Да, що індукується вірусами та двонитковими РНК. З нуклеотидної послідовності гена фібробластного інтерферону, клонованого методом рекомбінантних ДНК, Деринк та інші (Деринк Р. (Derynk R.) та інші, 1980) вивели повну амінокислотну послідовність цього білка. Він складається у довжину із 166 амінокислот.

Шепард та інші (Шепард Х.М. (Shepard H.M.) та інші, 1981) описав мутацію на основі 842 (Cys \rightarrow Tyr у положенні 141), яка знищує його антивірусну активність, та варіантний клон із делецією нуклеотидів 1119-1121.

Марк та інші (Марк Д.Ф. (Mark D.F.) та інші, 1984) вставив штучну мутацію шляхом заміни основи 469 (Т) на (А), унаслідок чого відбулась заміна амінокислоти Cys→Ser у положенні 17. Повідомлялось, що IFN-β, який одержали, мав таку саме активність, що і "нативний" IFN-β і залишався стабільним впродовж довгострокового зберігання (-70°C).

Rebif® (рекомбінантний людський інтерферон бета) являє собою останню розробку у інтерферонній терапії розсіяного склерозу і є значним досягненням у лікуванні. Rebif® являє собою інтерферон (IFN)-бета 1a, який продукується лініями клітин осавців і є фактично ідентичним до природної людської молекули.

Механізми, за посередництва яких інтерферони здійснюють свої ефекти, є не повністю зрозумілими. Однак у більшості випадків їхня дія полягає у впливі на індукцію або транскрипцію певних генів, і, таким чином, у впливі на імунну систему. Дослідження *in vitro* показали, що інтерферони є здатними до індукування або супресії приблизно 20 генних продуктів.

IFN-β може діяти у разі розсіяного склерозу трьома головними шляхами:

- регуляція Т-клітинних функцій, наприклад, активації, проліферації та функціонування супресорних клітин;
- модуляція продукування цитокінів: супресія передзапальних цитокінів та активація пригнічувальних, протизапальних цитокінів;
- регуляція міграції та інфільтрації Т-клітин до центральної нервової системи через гематоенцефалічний бар'єр (BBB).

Дослідженням PRISMS була встановлена ефективність інтерферону бета-1a, який вводили підшкірно тричі на тиждень при лікуванні рецидивно-ремітуючого розсіяного склерозу (RR-MS). Результати цього дослідження показали, що інтерферон бета-1a може мати позитивний ефект на довгостроковий перебіг розсіяного склерозу шляхом зменшення кількості та послаблення тяжкості рецидивів та зменшення важкості хвороби та її активності за результатами визначення засобами ЯМР-томографії. (Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Interferon beta-1a in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis", The Lancet 1998; 352 (7 november, 1998); 1498-1504).

Цитування будь-якого документа у цьому описі не повинно розглядатись як визнання того, що такий документ має відношення до попереднього рівня техніки або розглянутий матеріал до патентоздатності будь-якого пункту формули цієї заявки. Будь-яке твердження щодо вмісту або дати будь-якого документа ґрунтується на інформації, доступній заявникам на момент подання цієї заявки, і не є визнанням правильності такого твердження.

Метою цього винаходу є надання нових засобів для лікування та/або запобігання неврологічно-го захворювання.

Цей винахід ґрунтується на встановленні того факту, що білок остеопонтин стимулює проліферацію та диференціацію гліальних клітин і тим самим стимулює мієлінізацію та регенерацію нервів. За цим винаходом додатково було встановлено, що остеопонтин має позитивний ефект на тваринні

моделі розсіяного склерозу та периферичних невропатій.

Таким чином, цей винахід має відношення до застосування остеопонтину або агоніста активності остеопонтину при неврологічному захворюванні, наприклад, травматичному пошкодженні нервів, інсульті, демієлінізуючих захворюваннях центральної нервової системи або периферичної нервової системи, невропатіях та нейродегенеративних захворюваннях.

За цим винаходом остеопонтин може також застосовуватись у поєднанні з інтерфероном для лікування та/або запобігання неврологічних захворювань. У межах обсягу цього винаходу знаходиться також застосування нуклеїновокислотних молекул, векторів експресії, що включають остеопонтин, та клітин, що експресують остеопонтин, для лікування та/або запобігання неврологічного захворювання. Цей винахід додатково надає фармацевтичні композиції, що включають остеопонтин та інтерферон, факультативно разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами.

На Фіг.1А показана гістограма, що відображає рівні експресії остеопонтину (за результатами аналізу TaqMan®) після періодів обробки купризонам різної тривалості. 3/5т.куп.=три або п'ять тижнів обробки купризонам, 5т.куп.+1/3/6т.=п'ять тижнів обробки купризонам і, після припинення обробки купризонам, один/три або шість тижнів відновлення.

На Фіг.1В показане регулювання конформації мРНК остеопонтину, MBP та PLP, порівняно з контрольними рівнями C1, за визначенням TaqMan®, на різних стадіях розвитку мозочка. C1-20=постнатальний мозочок на день 1-20, CA=мозочок дорослої особи.

На Фіг.2 схематично показана структура остеопонтину та його відомих ізоформ, а також C- та N-кінцевих генно-інженерних конструкцій.

На Фіг.3 схематично показана плазмідна Рас, що містить кодувальну послідовність остеопонтину.

На Фіг.4 показана гістограма, яка ілюструє активацію конформації мРНК остеопонтину у лінії олігодендроцитарних клітин oli-neu, що оброблялись cAMF впродовж 6 год (1), 2 днів (2), 6 днів (3) або 10 днів (4), у порівнянні з контролем. Столпчики 5 та 6 відображають рівні мРНК остеопонтину з експерименту з купризонам. (5): 3 тижні обробки купризонам, (6): 5 тижнів обробки купризонам.

На Фіг.5 схематично показана плазмідна pDEST 12.2, що містить кодувальну послідовність остеопонтину.

На Фіг.6 схематично показана плазмідна pDEST 12.2, що містить кодувальну послідовність остеопонтину плюс кодувальну послідовність EGFP, флуоресцентного маркера.

На Фіг.7 схематично показана плазмідна pDEST 12.2, що містить кодувальну послідовність остеопонтину з HIS-міткою.

На Фіг.8 показана проліферація клітин лінії oli-neu після вирощування на мінімальному безінсуліновому живильному середовищі та 24 год обробки остеопонтином, експресованим у бакуловірусі (Baculo-OPN) або остеопонтином, експресованим

клітинами НЕК (культура клітин нирки людського ембріона) (НЕК-OPN). Зчитується флуоресценція Alamar Blue, фарбника для забарвлювання живих клітин.

На Фіг.9 показана дозозалежна крива проліферації клітин лінії oli-neu після вирощування на мінімальному безінсуліновому живильному середовищі та 24год обробки остеопонтином, експресованим бакуловірусом (BAC-OPN) або остеопонтином, експресованим клітинами НЕК (НЕК-OPN).

На Фіг.10 показана проліферація клітин лінії oli-neu після вирощування на мінімальному безінсуліновому живильному середовищі та обробки непроесованим остеопонтином, експресованим бакуловірусом (BacOPN) або N-кінцевим фрагментом остеопонтину (N-кінцевий BacOPN).

На Фіг.11 показана імуногістохімія MBP (основний мієліновий білок) у змішаних кортикальних культурах, що піддавались обробці 100nM експресованого бакуловірусом рекомбінантного остеопонтину. контроль ; оброблені OPN; C=збільшення B; D=інше поле змішаних кортикальних клітин, оброблених OPN, де не видно аксонів.

На Фіг.12 показане збільшення об'єму MBP у процесі мієлінізації змішаних кортикальних культур після обробки LIF (фактор індукування лімфоцитів) та остеопонтином, експресованим бакуловірусом, за результатами визначення за допомогою ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз).

На Фіг.13 показана проліферація клітин CG4 після обробки різними дозами (10pM, 10nM, 100nM) фосфорилуваного in vitro, експресованого E.coli остеопонтину (OPN-E.coli) або остеопонтину, експресованого бакуловірусом (OPN Bac).

На Фіг.14 показані периваскулярні запальні інфільтрати, присутні у спинних мозгах EAE мишей, яким підшкірно вводили носій (забуферений фосфатом фізіологічний розчин), носій плюс 0,1% сироваткового альбуміну великої рогатої худоби, 1мкг/кг, 10мкг/кг або 100мкг/кг AS900011 (остеопонтин) або комбінацію 100мкг/кг AS900011 та 20000Од/мишу мишачого інтерферону бета (mIFN-β) або 20000Од/мишу лише mIFN-β.

На Фіг.15 показано відсоток демієлінізованої площі у спинному мозку EAE мишей, яким підшкірно вводили носій (забуферений фосфатом фізіологічний розчин), носій плюс 0,1% сироваткового альбуміну великої рогатої худоби, 1мкг/кг, 10мкг/кг або 100мкг/кг AS900011 (остеопонтин) або комбінацію 100мкг/кг AS900011 та 20000Од/мишу мишачого інтерферону бета (mIFN-β) або 20000Од/мишу лише mIFN-β.

На Фіг.16 показано клінічні оцінки у балах на кінці обробки запальної інфільтрації та демієлінізації у EAE мишей, яким підшкірно вводили носій (забуферений фосфатом фізіологічний розчин), носій плюс 0,1% сироваткового альбуміну великої рогатої худоби, 1мкг/кг, 10мкг/кг або 100мкг/кг AS900011 (остеопонтин) або комбінацію 100мкг/кг AS900011 та 20000Од/мишу мишачого інтерферону бета (mIFN-β) або 20000Од/мишу лише mIFN-β.

На Фіг.17 показана маса тіла мишей із невропатією, індукованою роздробленням однічного нерва, які піддавались обробці носієм, 1мкг/кг, 10мкг/кг або 100мкг/кг остеопонтину (Ost), 10мкг/кг

позитивної контрольної сполуки (4-MC, 4-метилкатехол) або 100мкг/кг денатурованого остеопонтину (Ost-D).

На Фіг.18 показана амплітуда м'язового потенціалу дії сполуки у невропатичних мишей, які піддавались обробці носієм, 1мкг/кг, 10мкг/кг або 100мкг/кг остеопонтину (Ost), 10мкг/кг позитивної контрольної сполуки (4-MC) або 100мкг/кг денатурованого остеопонтину (Ost-D).

На Фіг.19 показана латентність м'язового потенціалу дії сполуки у невропатичних мишей, які піддавались обробці носієм, 1мкг/кг, 10мкг/кг або 100мкг/кг остеопонтину (Ost), 10мкг/кг позитивної контрольної сполуки (4-MC) або 100мкг/кг денатурованого остеопонтину (Ost-D).

На Фіг.20 показана тривалість м'язового потенціалу дії сполуки у невропатичних мишей, які піддавались обробці носієм, 1мкг/кг, 10мкг/кг або 100мкг/кг остеопонтину (Ost), 10мкг/кг позитивної контрольної сполуки (4-MC) або 100мкг/кг денатурованого остеопонтину (Ost-D).

На Фіг.21 показано відсоток дегенерованих волокон у невропатичних мишей, які піддавались обробці носієм, 1мкг/кг, 10мкг/кг або 100мкг/кг остеопонтину (Ost), 10мкг/кг позитивної контрольної сполуки (4-MC) або 100мкг/кг денатурованого остеопонтину (Ost-D).

На Фіг.22 показана загальна кількість волокон на поле у невропатичних мишей, які піддавались обробці носієм, 1мкг/кг, 10мкг/кг або 100мкг/кг остеопонтину (Ost), 10мкг/кг позитивної контрольної сполуки (4-MC) або 100мкг/кг денатурованого остеопонтину (Ost-D).

Цей винахід ґрунтується на встановленні того факту, що остеопонтин по-різному експресується під час диференціації олігодендроцитів та під час розвитку мозочка. Додатково було встановлено, що експресія кДНК остеопонтину у олігодендроцитів веде до диференційованого фенотипу цих клітин in vitro. У разі експресії остеопонтину олігодендроцити демонструють фенотип, подібний до фенотипу мієлінізуючих клітин, що диференціюються. Окрім цих, встановлених in vitro фактів, було показано, що остеопонтин і, зокрема, комбінація остеопонтину та інтерферону, має позитивний ефект у встановленій моделі розсіяного склерозу. У експериментальній моделі периферичної невропатії, остеопонтин мав явно виражений позитивний ефект на активність нервів і значно зменшував відсоток дегенерації та стимулював обсяг мієлінізації.

Експериментальні дані, наведені у цьому описі, надають, таким чином, нову можливість лікування неврологічних захворювань, зокрема, захворювань, пов'язаних із функціонуванням нервових та гліальних клітин. Ці дані викликають особливий подив, оскільки у [WO 00/63241] вказується на необхідність інгібування остеопонтину з метою лікування розсіяного склерозу.

Цей винахід, таким чином, пов'язується з застосування остеопонтину або агоніста активності остеопонтину для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або запобігання неврологічних захворювань.

Термін "остеопонтин", який використовується у цьому описі, означає непроесований людський

остеопонтин, який має амінокислотну послідовність, відому з кінця вісімдесятих років (Олдберг (Oldberg) та інші, 1986; Кіфер (Kiefer) та інші, 1989). Послідовність людського остеопонтину наводиться у цьому описі як Послідовність №1 у лістингу послідовностей, що додається. Термін "остеопонтин", який використовується у цьому описі, додатково означає будь-який остеопонтин, одержаний від тварин, наприклад, остеопонтин мишачий, великої рогатої худоби або пацючий, доти, доки існує достатній ступінь ідентичності для підтримання активності остеопонтину та доти, доки одержана молекула не буде імуногенною для людей.

Термін "остеопонтин", який використовується у цьому описі, додатково означає біологічно активні мутеїни та фрагменти, наприклад, природні ізоформи остеопонтину. Остеопонтин експресується у функціонально різних формах, які різняться на рівні транскрипції (альтернативний сплайсинг) та посттрансляційних модифікацій (фосфорилювання, глікозилювання). Поки що відомо три розщеплені варіанти остеопонтину, які позначаються як OPN-a (який у цьому описі називають також "непроцесованим" остеопонтином), OPN-b та OPN-c (Послідовності №1, №2 та №3 лістингу послідовностей, що додається, а також зображені на Фіг.2). Ізоформи були описані, наприклад, Кон (Kon) та іншими (2000); характеристики ізоформ були визначені, наприклад, Сайто (Saitoh) та іншими (1995) та Кон (Kon) та іншими (2002).

Розщеплення тромбіну дає два фрагменти, що піддаються протеолітичному розщепленню *in vivo* і включають N- та C-кінцеві ділянки білка. Фосфорилювання остеопонтину, зокрема, C-кінцевої частини білків, може бути важливим для функціонування остеопонтину. Термін "остеопонтин", який використовується у цьому описі, означає, таким чином, також ці протеолітичні фрагменти та диференційовано фосфорилювані форми остеопонтину.

Термін "остеопонтин", який використовується у цьому описі, додатково означає ізоформи, мутеїни, гібридні білки, функціональні похідні, активні фракції або фрагменти, кільцево пермутовані похідні або їхні солі. Ці ізоформи, мутеїни, гібридні білки або функціональні похідні, активні фракції або фрагменти, кільцево пермутовані похідні зберігають біологічну активність остеопонтину. За варіантом, якому віддається перевага, вони мають біологічну активність, яка є поліпшеною, порівняно до остеопонтину дикого типу.

Термін "агоніст активності остеопонтину", який використовується у цьому описі, означає молекулу, яка стимулює або імітує активність остеопонтину, наприклад, агоністичні антитіла рецептора остеопонтину або низькомолекулярні агоністи, що активізують передачу сигналу через рецептор остеопонтину. Остеопонтин опосередковує свою функцію через щонайменш дві групи рецепторів. По-перше, він взаємодіє з αv -інтегринами (рецепторами інтегринів $\alpha v\beta 3$ та $\alpha v\beta 5$) через мотив прикріплення клітин RGD (Arg-Gly-Asp) під позитивним впливом марганцю (Куніцкі (Kunicki) та інші, 1997). По-друге, він взаємодіє з варіантними ізоформами CD44 v6-v10. C-кінцева частина остеопонтину, як гадають, залучається до взаємодії з CD44, у той

час як N-кінцева частина остеопонтину, як гадають, залучається до взаємодії з рецепторами інтегрину, проліферації, виживаності та диференціації макрофагів. N-кінцева частина остеопонтину також індукує виділення IL (інтерлейкіну)-12 та IL-10. Будь-який агоніст, стимулятор або енхансер будь-якого з цих рецепторів охоплюється терміном "агоніст активності остеопонтину", який використовується у цьому описі.

Термін "агоніст активності остеопонтину", який використовується у цьому описі, додатково означає агенти, що стимулюють активність, опосередковану остеопонтином, наприклад, стимулювання прикріплення клітин до складових екстрацелюлярного матриксу, морфогенез клітин олігодендроцитарного напрямку диференціації на мієлінопродукуючі клітини, стимулювання рекрутмента, проліферацію, диференціацію або визрівання клітин олігодендроцитарного напрямку диференціації (наприклад, клітин-попередників), стимулювання захисту клітин олігодендроцитарного напрямку диференціації від апоптозу та пошкодження.

Терміни "лікування" та "запобігання", які використовуються у цьому описі, слід розуміти як запобігання, пригнічення, послаблення, поліпшення або реверсування одного або декількох симптомів або причини (причин) неврологічного захворювання, а також симптомів, захворювань або ускладнень, що супроводжують неврологічне захворювання. У разі "лікування" неврологічного захворювання, речовини за цим винаходом вводяться після початку захворювання, "запобігання" означає введення речовин до того, як у пацієнта будуть помічені ознаки захворювання.

Термін "неврологічні захворювання", який використовується у цьому описі, охоплює усі відомі неврологічні захворювання, розлади або пошкодження центральної нервової системи або периферичної нервової системи, із включенням тих захворювань, докладний опис яких наведено у розділі "Передумови створення винаходу".

Неврологічні захворювання включають розлади, пов'язані з порушенням функціонування центральної нервової системи або периферичної нервової системи, наприклад, захворювання, пов'язані з передачею нервових імпульсів, головним болем, черепно-мозковими травмами, інфекціями центральної нервової системи, розладами нейроофтальмологічних та черепних нервів, функціонуванням та розладом функцій часток головного мозку, розладами руху, ступором та комою, демієлінізуючими захворюваннями, делірієм та слабумством, аномаліями краніоцервікального стику, епілептичними нападами, розладами спинного мозку, розладами сну, розладами периферичної нервової системи, цереброваскулярними захворюваннями або розладами функціонування м'язів. Визначення цих розладів дивись, наприклад, на <http://www.merck.com/pubs/mmmanual/section14/sec14.htm>.

За варіантом, якому віддається перевага, неврологічні захворювання за цим винаходом вибирають з групи, що включає травматичне пошкодження нервів, інсульт, демієлінізуючі захворювання центральної нервової системи або

периферичної нервової системи та нейродегенеративні захворювання.

Травматичне пошкодження нервів може мати відношення до периферичної нервової системи або центральної нервової системи, це може бути черепно-мозкова травма або травма спинного мозку, у тому числі, параплегія, як описано у наведеному вище розділі "Передумови створення винаходу".

Інсульт може спричинюватись гіпоксією або ішемією головного мозку. Його називають також цереброваскулярним захворюванням або апоплексичним ударом. Інсульт може викликати втрату мозкових функцій (неврологічний розлад), що спричинюється припиненням кровопостачання до ділянок головного мозку. Причиною припинення кровопостачання можуть бути згустки крові, що утворюються у головному мозку (тромби) або частинки атеросклеротичних бляшок або іншого матеріалу, які дістаються до головного мозку з іншого місця (емболи). Кровотеча (крововилив) у межах головного мозку може викликати симптоми, які нагадують інсульт. Найзагальнішим різновидом інсульту є інсульт унаслідок атеросклерозу (церебральний тромбоз) і, таким чином, цей винахід також має відношення до лікування атеросклерозу.

Периферична невропатія може пов'язуватись із синдромом втрати чутливості, слабкості та атрофії м'язів, ослаблення глибоких сухожильних рефлексів та вазомоторних симптомів, самотійно або у будь-якій комбінації. Невропатія може уражати один нерв (моновропатія), два або більше нервів на різних ділянках (множинна моновропатія) або багато нервів одночасно (поліневропатія). Першочергово може уражатись аксон (наприклад, при цукровому діабеті, хворобі Ліма, уремії або токсичними агентами), мієлінова оболонка або шванівські клітини (наприклад, у разі гострої або хронічної запальної поліневропатії, лейкоцистрофії або при синдромі Гійєна-Барре). Додаткові невропатії, які можуть лікуватись за цим винаходом, можуть виникати, наприклад, унаслідок отруєння свинцем, застосування дапсону, укусів кліщів, при порфірії або синдромі Гійєна-Барре, і вони можуть уражати, головним чином, рухові нервові волокна. Інші невропатії, наприклад, при раковому гангліоніті заднього корінця спинного мозку, проказі, синдромі набутого імунodefіциту (СНІД), цукровому діабеті або хронічній інтоксикації піридоксином, можуть уражати, головним чином, ганглії заднього корінця спинного мозку або сенсорні нервові волокна з виникненням сенсорних симптомів. Можуть уражатись також черепні нерви, наприклад, при синдромі Гійєна-Барре, хворобі Ліма, цукровому діабеті та дифтерії.

Хвороба Альцгеймера являє собою розлад, який викликає погіршення розумових функцій, що є наслідком змін тканин головного мозку. Сюди входить зморщування тканин головного мозку, первинне дегенеративне слабоумство та дифузна атрофія головного мозку. Хворобу Альцгеймера називають також старечим слабоумством альцгеймерівського типу (SDAT).

Хвороба Паркінсона являє собою хворобу головного мозку, що характеризується тремтінням та

труднощами у ході, рухливості та координації рухів. Ця хвороба пов'язується з пошкодженням частини головного мозку, яка контролює рухливість м'язів, і її називають також тремтучим паралічем (paralysis agitans).

Хорея Гентингтона являє собою спадкову автосомну неврологічну хворобу домінантного типу.

Бічний аміотрофічний склероз (ALS) являє собою розлад, що викликає прогресивну втрату нервового контролю за довільно скоротними м'язами із причини знищення нервових клітин у головному та спинному мозку. Бічний аміотрофічний склероз, який називають також хворобою Шарко, являє собою розлад, що викликає втрату застосування та контролю м'язів.

Розсіяний склероз (MS) являє собою запальне демієлінізуюче захворювання центральної нервової системи (ЦНС), яке набуває рецидивно-ремітуючого або прогресуючого перебігу. Розсіяний склероз є не тільки демієлінізуючим захворюванням. Двійником цього захворювання у периферичній нервовій системі є хронічна запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія (CIDP). Крім того, існують гострі монофазні розлади, наприклад, запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія, яку називають синдромом Гійєна-Барре (GBS) у периферичній нервовій системі та гострий дисемінований енцефаломієліт (ADEM) у центральній нервовій системі.

Додаткові неврологічні розлади включають невропатії з аномальною мієлінізацією, наприклад, невропатії, перелік яких наведено у наведеному вище розділі "Передумови створення винаходу", а також синдром каналу зап'ястя. Травматичне пошкодження нервів може супроводжуватись ортопедичними ускладненнями спинного мозку, які також входять до числа захворювань за цим винаходом.

Неврологічні розлади можуть додатково викликати вродженими розладами обміну речовин. За варіантом втілення цього винаходу, якому віддається перевага, неврологічне захворювання, таким чином, спричинюється вродженим розладом обміну речовин.

Вродженими захворюваннями обміну речовин, що входять до обсягу цього винаходу, можуть бути, наприклад, фенілкетонурія та інші аміноацидурії; хвороба Тея-Сакса (рання дитяча амавротична ідіотія), хвороба Німанна-Піка (ліпоцний гістіоцитоз) та хвороба Гоше (спадковий глюкоцереброзидоз), синдром Гурлера (мукополісахаридоз I типу); хвороба Краббе (глобально-клітинна лейкоцистрофія Краббе) та інші лейкоцистрофії. Вони можуть уражати мієлінову оболонку, що розвивається, головним чином, у центральній нервовій системі.

Неврологічні захворювання, які спричинюються вродженими розладами обміну речовин, також докладно обговорювались у розділі "Передумови створення винаходу".

Менш відомі неврологічні захворювання також входять до обсягу цього винаходу, наприклад, нейрофіброматоз або множинна системна атрофія (MSA). Додаткові розлади, що можуть лікуватись за цим винаходом, докладно описувались у наведе-

деному вище розділі "Передумови створення винаходу".

За додатковим варіантом втілення, якому віддається перевага, неврологічним захворюванням є периферична невропатія, за варіантом, якому віддається найбільша перевага, діабетична невропатія. Перевага за цим винаходом віддається також невропатіям, пов'язаним із хіміотерапією.

Термін "діабетична невропатія" означає будь-яку форму діабетичної невропатії або один (декілька) симптом(-ів) чи розлад(-ів), що супроводжують або спричинюються діабетичною невропатією, або ускладнення діабету, що уражають нерви, як докладно описано у наведеному вище розділі "Передумови створення винаходу". Діабетична невропатія може бути поліневропатією. У разі діабетичної поліневропатії одночасно уражаються багато нервів. Діабетична невропатія може також бути мононевропатією. У разі вогнищевої мононевропатії, наприклад, захворювання уражає один нерв, наприклад, окоруховий або відвідний черепний нерв. Це може також бути множинна мононевропатія, коли на різних ділянках уражаються два або декілька нервів.

За ще іншим варіантом втілення, якому віддається перевага, неврологічне захворювання є демієлінізуючим захворюванням. До числа демієлінізуючих захворювань, за варіантом, якому віддається перевага, належать демієлінізуючі стани центральної нервової системи, наприклад, гострий дисемінований енцефаломієліт (ADEM) та розсіяний склероз, а також демієлінізуючі захворювання периферичної нервової системи. До числа останніх належать такі захворювання, як хронічна запальна демієлінізуюча полірадікулоневропатія (CIPD) та гості монофазні розлади, наприклад, запальна демієлінізуюча полірадікулоневропатія, яку називають синдромом Гієна-Барре (GBS).

Додатковий варіант втілення цього винаходу, якому віддається перевага, має відношення до лікування та/або запобігання нейродегенеративного захворювання. Нейродегенеративне захворювання вибирають із групи, що включає хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, хорею Гентингтона та бічний аміотрофічний склероз.

За варіантом, якому віддається перевага, остеопонтин вибирають з-посеред пептиду, поліпептиду або білка, які вибирають із групи, що включає:

- (a) Поліпептид, що містить Послідовність №1;
- (b) Поліпептид, що містить амінокислоти 1-168 або 170 Послідовності №1;
- (c) Поліпептид, що містить амінокислоти 1-16 та 170-314 Послідовності №1;
- (d) Поліпептид, що містить амінокислоти 170-314 Послідовності №1;
- (e) Поліпептид, що містить Послідовність №2;
- (f) Поліпептид, що містить Послідовність №3;
- (g) Мутеїн будь-якого поліпептиду з (a) до (f), де амінокислотна послідовність має щонайменш 40% або 50%, або 60%, або 70%, або 80%, або 90% ідентичність із щонайменш однією з послідовностей поліпептиду (a)-(f);
- (h) Мутеїн будь-якого поліпептиду з (a) до (f), який кодується послідовністю ДНК, що гібридує-

ється з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який із поліпептидів (a)-(f) за помірно жорстких або за дуже жорстких умов;

(i) Мутеїн будь-якого поліпептиду з (a) до (f), де будь-які мутації амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замшами амінокислотних послідовностей у поліпептидах (a)-(f);

(j) Сіль або ізоформу, гібридний білок, функціональну похідну, активну фракцію або кільцево пермутовану похідну будь-якого з поліпептидів (a)-(f).

Активні фракції або фрагменти можуть включати будь-яку частину або ділянку будь-якої ізоформи остеопонтину, наприклад, N-кінцеву ділянку або C-кінцеву ділянку або будь-яку з-посеред OPN-a, -b або -c, як показано на Фіг.2. Мотив GRGDS може бути присутнім, відсутнім або мутованим. Місце зв'язування гепарину може бути мутованим, завдяки чому остеопонтин позбавляється здатності до зв'язування гепарину. Непроцесований остеопонтин або будь-який активний фрагмент остеопонтину може фосфорилуватись на одному або декількох із нижченаведених серинових залишків, наприклад, серинових залишків у таких положеннях: 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, 254, 259, 264, 275, 287, 292, 294, 295. На додаток до цього, місця фосфоритування серину можуть мутувати з серину на глутаматні залишки для імітації фосфорилування.

Фахівцям у цій галузі буде зрозуміло, що навіть невеликі частини остеопонтину можуть бути достатніми для здійснення його функцій, наприклад, активний пептид, що включає залишки незамінних амінокислот, необхідні для здійснення функцій остеопонтину.

Фахівцям у цій галузі буде також зрозуміло, що мутеїни, солі, ізоформи, гібридні білки, функціональні похідні остеопонтину, активні фракції або кільцево пермутовані похідні остеопонтину будуть зберігати подібну, або навіть кращу, біологічну активність остеопонтину. Біологічна активність остеопонтину та мутеїнів, ізоформ, гібридних білків або функціональних похідних, активних фракцій або фрагментів, кільцево пермутованих похідних або його солей може визначатись шляхом аналізу методом спільного культивування, наприклад, як описано далі у Прикладі 8. Змішані кортикальні культури включають олігодендроцити, а також інші клітини, що походять із центральної нервової системи (наприклад, нейрони, астроцити, мікроглія), і індують або активують типові гени, залучені до мієлінізації, наприклад, P0, MBP або MAG, після інкубування з OPN або мутеїном, ізоформою, фрагментом, активною фракцією, функціональною похідною або сіллю. Експресія цих генів може визначатись кількісним аналізом RT-PCR (ревертазно-полімеразна ланцюгова реакція) (TaqMan® RT-PCR) у реальному масштабі часу, що докладно пояснюється у наведених нижче прикладах. Додатковим простим аналізом для визначення активності остеопонтину є аналіз проліферації олігодендроцитів, що включає інкубування відповідної лінії олігодендроцитарних клітин, наприклад, клітин лінії oli-neu або CG4, з остеопонтином або мутеї-

ном, ізоформою, фрагментом, активною фракцією, функціональною похідною або сіллю, як описано, наприклад, у наведеному нижче Прикладі 7.

Активні фракції, яким віддається перевага, мають активність, яка дорівнює або є кращою за активність непроцесованого остеопонтину, або які мають додаткові переваги, наприклад, крашу стабільність або слабкішу токсичність чи імуногенність, або їх легше одержати у більших кількостях чи легше очищати. Досвідченим у цій галузі фахівцям буде зрозуміло, що мутеїни, активні фрагменти та функціональні похідні можна одержати шляхом клонування відповідних кДНК у відповідних плазмідах і перевірки їх аналізом за методом спільного культивування, як згадувалось вище.

Білки за цим винаходом можуть бути глікозилованими або неглікозилованими, вони можуть бути одержаними із природних джерел, наприклад, рідин у тілі людини, або вони можуть бути, за варіантом, якому віддається перевага, продуктовані рекомбінантними методами. Рекомбінантну експресію можна здійснювати у прокаріотичних системах експресії, наприклад, *E.coli*, або у еукаріотичних, наприклад, клітинах комах, та за варіантом, якому віддається перевага, у системах експресії ссавців, наприклад, клітинах CHO (культура клітин яєчника китайського хом'ячка) або клітинах НЕК (культура клітин нирки людського ембріона).

Термін "мутеїни", який використовується у цьому описі, означає аналоги остеопонтину, у яких один або декілька амінокислотних залишків природного остеопонтину замінені іншими амінокислотними залишками або піддані делеції, або один чи декілька амінокислотних залишків додані до природної послідовності остеопонтину, без значної зміни активності одержаних продуктів, порівняно з остеопонтином дикого типу. Ці мутеїни одержують відомими методами синтезу та/або методами сайт-спрямованого мутагенезу, або іншими відомими придатними для цього методами.

Мутеїни остеопонтину, які можуть використовуватись за цим винаходом, або нуклеїнові кислоти, які їх кодують, включають кінцевий набір по суті відповідних послідовностей у вигляді пептидів або поліпептидів заміщення, які можуть бути просто одержані пересічним фахівцем у цій галузі без зайвого експериментування, скориставшись цим описом та представленими у ньому роз'ясненнями.

Мутеїни за цим винаходом включають білки, які кодуються нуклеїновою кислотою, наприклад, ДНК або РНК, що гібридизується з ДНК або РНК, яка кодує остеопонтин за цим винаходом за помірно або дуже жорстких умов. Термін "жорсткі умови" означає умови гібридизації та подальшого промивання, на які пересічні фахівці у цій галузі звичайно посилаються, як на "жорсткі". [Дивись Осубел (Ausubel) та інші, *Current Protocols in Molecular Biology*, supra. Interscience, N.Y., §6.3 та §6.4 (1987, 1992) та Сембрук (Sambrook) та інші (Сембрук Дж.К. (Sambrook J.C.), Фрітш Е.Ф. (Fritsch E.F.) та Маніатіс Т. (Maniatis T.) (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)].

Без обмежень, приклади жорстких умов включають умови промивання при температурі на 12-

20°C нижче розрахованої T_m (температура плавлення ДНК) експериментального гібрида, наприклад, 2×SSC (стандартний цитратний фізіологічний розчин) та 0,5% SDS (додецилсульфат натрію) впродовж 5хв, 2×SSC та 0,1% SDS впродовж 15хв; 0,1×SSC та 0,5% SDS при температурі 37°C впродовж 30-60хв, після чого 0,1×SSC та 0,5% SDS при температурі 68°C впродовж 30-60хв. Пересічному фахівцю у цій галузі зрозуміло, що жорсткість умов залежить також від довжини послідовностей ДНК, олігонуклеотидних зондів (наприклад, 10-40 основ) або змішаних олігонуклеотидних зондів. У разі використання змішаних зондів, перевага віддається застосуванню тетраметиламонію хлориду (TMAC) замість SSC. Дивись Осубел (Ausubel) вище.

За варіантом втілення, якому віддається перевага, будь-який з таких мутеїнів має 40% ідентичність або гомологію з Послідовністю №1, Послідовністю №2 або Послідовністю №3 лістингу послідовностей, що додається. За варіантом, якому віддається більша перевага, він має щонайменш 50%, щонайменш 60%, щонайменш 70%, щонайменш 80% або за варіантом, якому віддається найбільша перевага, щонайменш 90% ідентичності або гомологію з нею.

Ідентичність відбиває взаємозв'язок між двома або декількома поліпептидними послідовностями або двома чи декількома поліпептидними послідовностями, визначений шляхом порівняння послідовностей. Взагалі, ідентичність означає точну відповідність між нуклеотидами або амінокислотами двох поліпептидних або двох поліпептидних послідовностей, відповідно, за довжиною послідовностей, які порівнюються.

У разі послідовностей, що не мають точної відповідності, може бути визначений "процент ідентичності". Взагалі, дві послідовності до порівняння впорядковано розміщуються для забезпечення максимальної кореляції між послідовностями. Це може включати введення "проривів" до будь-якої або обох послідовностей для підвищення ступеню впорядкованого розміщення. Процент ідентичності може визначатись вздовж усієї довжини кожної з послідовностей, що порівнюються (так зване глобальне впорядковане розміщення), що є особливо прийнятним для послідовностей однакової або дуже подібної довжини, або вздовж коротшої, визначеної довжини (так зване локальне впорядковане розміщення), що є більш прийнятним для послідовностей різної довжини.

Методи порівняння ідентичності та гомології двох або декількох послідовностей є добре відомі у цій галузі. Так, наприклад, програми, доступні у пакеті програм Wisconsin Sequence Analysis Package, версія 9.1 (Деверо Дж. (Devereux J.) та інші, 1984), наприклад, програми BESTFIT та GAP, можуть використовуватись для визначення процента ідентичності між двома поліпептидами і процента ідентичності та процента гомології між двома поліпептидними послідовностями. Програма BESTFIT використовує алгоритм "локальної гомології" Сміта (Smith) та Уотермана (Waterman) (1981) і знаходить одну найкращу ділянку подібності між двома послідовностями. У цій галузі відомі також інші програми для визначення ідентичності

та/або подібності між послідовностями, наприклад, сімейство програм BLAST (Альтшуль С.Ф. (Altschul S.F.) та інші, 1990, Альтшуль С.Ф. (Altschul S.F.) та інші, 1997, доступні на сайті NCBI за адресою www.ncbi.nlm.nih.gov) та FASTA (Пірсон В.Р. (Pearson W.R.), 1990; Пірсон (Pearson), 1988).

Змінами, яким віддається перевага, для мутеїнів за цим винаходом є такі, що відомі як "консервативні" заміни. Консервативні амінокислотні заміни поліпептидів остеопонтину можуть включати синонімічні амінокислоти у межах групи, яка має достатньо подібні фізико-хімічні властивості для того, щоб заміна між членами групи зберігала біологічну функцію молекули (Грантем (Grantham), 1974). Зрозуміло, що інсерції та делеції амінокислот можуть також здійснюватись у вищевизначе-

них послідовностях без зміни їхньої функції, зокрема, якщо інсерції або делеції залучають лише декілька амінокислот, наприклад, менше тридцяти, а за варіантом, якому віддається перевага, менше десяти, і не видаляють або заміщують амінокислот, які є критичними для функціональної конформації, наприклад, цистеїнові залишки. Білки та мутеїни, продуковані такими делеціями та/або інсерціями, входять до обсягу цього винаходу.

За варіантом, якому віддається перевага, групами синонімічних амінокислот є групи, визначені у Таблиці I. За варіантом, якому віддається більша перевага, групами синонімічних амінокислот є групи, визначені у Таблиці II; та за варіантом, якому віддається найбільша перевага, групами синонімічних амінокислот є групи, визначені у Таблиці III.

ТАБЛИЦЯ I

Групи синонімічних амінокислот, яким віддається перевага

Амінокислота	Синонімічна група
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
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
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
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

ТАБЛИЦЯ II

Групи синонімічних амінокислот, яким віддається більша перевага

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

ТАБЛИЦЯ III

Групи синонімічних амінокислот, яким віддається найбільша перевага

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Приклади здійснення амінокислотних замінів у білках, які можуть використовуватись для одержання мутеїнів остеопонтину, поліпептидів або білків для використання за цим винаходом, включають будь-які відомі методи, наприклад, наведені у [патентах США №4,959,314, №4,588,585 та №4,737,462 на ім'я Марк (Mark) та інші; №5,116,943 на ім'я Коте (Koths) та інші; №4,965,195 на ім'я Неймен (Namen) та інші; №4,879,111 на ім'я Чонг (Chong) та інші; та №5,017,691 на ім'я Лі (Lee) та інші]; та білків із заміщенням лізину, наведені у [патенті США №4,904,584 (Шоу (Shaw) та інші)].

Термін "гібридний білок" означає поліпептид, що містить остеопонтин або мутеїн чи його фрагмент, злитий з іншим білком, який, наприклад, має подовжений час перебування у рідинах у тілі людини. Остеопонтин може, таким чином, зливатися з іншим білком, поліпептидом тощо, наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом.

Термін "функціональні похідні", який використовується у цьому описі, означає похідні остеопонтину, їхні мутеїни та гібридні білки, які можуть одержуватись із функціональних груп, які існують у вигляді бічних ланцюгів на залишках або N- чи C-кінцевих групах, засобами, відомими у цій галузі, і включаються до винаходу доти, доки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не знищують активності білка, яка є по суті подібною до активності остеопонтину, і не надають токсичних властивостей композиціям, що їх містять.

До цих похідних можуть, наприклад, належати бічні ланцюги поліетиленгліколю, які можуть маскувати ділянки детермінанти та подовжувати час перебування остеопонтину у рідинах у тілі людини. До інших похідних належать аліфатичні складні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп, які одержують шляхом реакції з аміаком або з первинними чи вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, утворених з ацильними складовими (напри-

клад, алканоїльними або карбоциклічними ароїльними групами) або О-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, вільних гідроксильних груп серилових або треонілових залишків), які одержують з ацильними складовими.

Як "активні фракції" остеопонтину, мутеїни та гібридні білки, цей винахід включає будь-які фрагменти або попередники поліпептидного ланцюга білкової молекули самостійно або разом з асоційованими молекулами або залишками, зв'язаними з ними, наприклад, цукровими або фосфатними залишками, або агрегати білкових молекул або цукрових залишків самих по собі, за умови, що згадана фракція має по суті активність, подібну до активності остеопонтину.

Термін "солі" у цьому описі означає як солі карбоксильних груп, так і солі, що одержують доданням кислоти, аміногруп молекули остеопонтину або його аналогів. Солі карбоксильної групи можуть одержуватись засобами, відомими у цій галузі, і включають неорганічні солі, наприклад, солі натрію, кальцію, амонію, заліза або цинку тощо, і солі з органічними основами, наприклад, солі, які одержують, наприклад, з амінами, такими як триетаноламін, аргінін або лізин, піперидин, прокаїн тощо. Солі, що одержують доданням кислоти, включають, наприклад, солі з мінеральними кислотами, наприклад, хлористоводневою кислотою або сірчаною кислотою, та солі з органічними кислотами, такими як оцтова кислота або щавлева кислота. Звичайно, будь-яка з таких солей повинна зберігати біологічну активність остеопонтину за цим винаходом, тобто проявляти проліферативний ефект відносно олігодендроцитів.

За варіантом втілення цього винаходу, якому віддається перевага, остеопонтин зливається з молекулою-носієм, пептидом або білком, що стимулює проникнення через гематоенцефалічний бар'єр ("BBB"). Це прислугується відповідному цілеспрямованню молекули до місця дії у тих випадках, коли до захворювання є залучено центральна нервова система. Способи доставки лікарського засобу через гематоенцефалічний бар'єр включають розрив гематоенцефалічного бар'єра осмотичними засобами або біохімічним шляхом завдяки застосуванню вазоактивних речовин, наприклад, брадикініну. Інші стратегії проходження через гематоенцефалічний бар'єр включають застосування ендогенних транспортних систем, у тому числі транспортерів, опосередкованих носієм, наприклад, глюкозними та амінокислотними носіями; рецептор-опосередкованого трансцитозу для інсуліну або трансферину; та активних відтокових транспортерів, наприклад, р-глікопротеїну. Стратегії для доставки лікарського засобу через гематоенцефалічний бар'єр додатково включають інтрацеребральну імплантацію.

Функціональні похідні остеопонтину можуть спрягатись із полімерами з метою поліпшення властивостей білка, наприклад, стабільності, часу напівжиття, біодоступності, стерпності людським організмом або імуногенності. Для досягнення цієї мети, остеопонтин може зв'язуватись, наприклад, із поліетиленгліколем (PEG). Пегілування може здійснюватись відомими методами, опис яких наведено, наприклад, у [WO 92/13095].

Таким чином, за варіантом втілення цього винаходу, якому віддається перевага, остеопонтин є пегільованим.

За додатковим варіантом втілення цього винаходу, якому віддається перевага, гібридний білок одержують шляхом злиття з імуноглобуліном (Ig). Злиття може бути безпосереднім або здійснюватись за посередництва короткого лінкерного пептиду, довжина якого може становити усього від 1 до 3 амінокислотних залишків, або він може бути довшим, наприклад, довжиною 13 амінокислотних залишків. Такий лінкер може бути, наприклад, трипептидом із послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met) або 13-амінокислотною лінкерною послідовністю, що містить Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, і вводиться, наприклад, між послідовністю остеопонтину і послідовністю імуноглобуліну. Одержаний гібридний білок має поліпшені властивості, наприклад, подовжений час перебування у рідинах у тілі людини (час напівжиття) або підвищену питому активність, підвищений рівень експресії. Злиття з імуноглобуліном може також полегшити очищення гібридного білка.

За ще іншим варіантом втілення, якому віддається перевага, остеопонтин зливається з константною ділянкою молекули імуноглобуліну. За варіантом, якому віддається перевага, він зливається з ділянками важкого ланцюга, наприклад ділянками CH2 та CH3 людського IgG1. Інші ізоформи імуноглобулінових молекул є також придатними для одержання гібридних білків за цим винаходом, наприклад, ізоформи IgG2 або IgG4, або імуноглобуліни інших класів, наприклад, IgM. Гібридні білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними. Імуноглобулінова частина гібридного білка може додатково модифікуватись таким чином, щоб не активувати зв'язування комплекменту, шляху активації комплекменту або зв'язування з Fc-рецепторами.

Цей винахід має додаткове відношення до застосування комбінації остеопонтину та імуносупресорного агента для одержання лікарського засобу для лікування та/або запобігання неврологічних розладів, для одночасного, послідовного або окремого застосування. Імуносупресорними агентами можуть бути стероїди, метотрексат, циклофосфамід, антилейкоцитарні антитіла (наприклад, CAMPATH-1) тощо.

Цей винахід має додаткове відношення до застосування комбінації остеопонтину та інтерферону для одержання лікарського засобу для лікування та/або запобігання неврологічних розладів, для одночасного, послідовного або окремого застосування.

Значення терміну "інтерферон", який використовується у цій заявці на патент, поширюється на будь-яку молекулу, яка визначається як така у літературі, з включенням, наприклад, інтерферонів будь-якого виду, що згадувались у вищевизначеному розділі "Передумови створення винаходу". Інтерферон у варіанті, якому віддається перевага, може бути людським, однак він може одержуватись і від інших видів доти, доки його біологічна активність є подібною до активності людських інтерферонів, і молекула не є імуногенною для людини.

Зокрема, вищенаведене визначення включає будь-які види IFN- α , IFN- β та IFN- γ . Інтерфероном, якому віддається перевага, за цим винаходом є IFN- β .

Термін "інтерферон бета (IFN- β)", який використовується у цьому винаході, включає людський фібробластний інтерферон, який одержують шляхом виділення з біологічних рідин або методами рекомбінантних ДНК із прокаріотних або еукаріотних клітин-хазяїв, або його солі, функціональні похідні, варіанти, аналоги та фрагменти.

Термін "функціональні похідні", який використовується у цьому описі, означає похідні, які можуть одержуватись із функціональних груп, які існують у вигляді бічних ланцюгів на залишках або N- чи C-кінцевих групах, способами, відомими у цій галузі, і включаються до цього винаходу доти, доки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не знищують біологічної активності білків, як описувалось вище, наприклад, здатності до зв'язування відповідного рецептора та ініціювання передачі сигналу рецептором, і не наділяють токсичними властивостями композиції, до складу яких вони входять. Похідні можуть мати хімічні складові, наприклад, вуглеводи або фосфатні залишки, за умови, що така похідна зберігає біологічну активність білка і залишається фармацевтично прийнятною.

До числа похідних можуть бути віднесені, наприклад, аліфатичні складні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп, які одержують шляхом реакції з аміаком або з первинними чи вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, утворених з ацильними складовими (наприклад, алканоїльними або карбоциклічними ароїльними групами) або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, вільних гідроксильних груп серилових або треонілових залишків), які одержують з ацильними складовими. Такі похідні і можуть також включати, наприклад, бічні ланцюги поліетиленгліколю, які можуть маскувати ділянки детермінанти та подовжувати час перебування молекули у рідинах у тілі людини.

Особливе значення має білок, який дериватизували або об'єднали з комплексоутворювальним агентом для подовження тривалості його існування. Застосовуватись за цим винаходом можуть, наприклад, пегільовані варіанти, як згадувалось перед тим, або білки, які одержали засобами генної інженерії і які демонструють довготривалу активність у організмі.

Термін "похідні" включає лише ті похідні, які не замінюють одну амінокислоту з числа двадцяти розповсюджених природних амінокислот на іншу.

Термін "солі" у цьому описі означає як солі карбоксильних груп, так і солі, що одержують доданням кислоти, аміногруп білків, опис яких було наведено вище, або їхніх аналогів. Солі карбоксильної групи можуть одержуватись засобами, відомими у цій галузі, і включають неорганічні солі, наприклад, солі натрію, кальцію, амонію, заліза або цинку тощо, і солі з органічними основами, наприклад, солі, які одержують, наприклад, з амінами, наприклад, триетаноламіном, аргініном або лізином, піперидином, прокаїном тощо. Солі,

що одержують доданням кислоти, включають, наприклад, солі з мінеральними кислотами, наприклад, хлористоводневою кислотою або сірчаною кислотою, та солі з органічними кислотами, наприклад, з оцтовою кислотою або щавлевою кислотою. Звичайно, будь-яка з таких солей повинна зберігати біологічну активність білків (остеопонтину та інтерферону бета, відповідно) за цим винаходом, тобто проявляти здатність до зв'язування з відповідним рецептором та ініціювати передачу сигналу рецептором.

Інтерферони можуть також спрягатись із полімерами з метою поліпшення стабільності білків. Опис кон'югату інтерферону бета та поліолполіетиленгліколю наведено, наприклад, у [WO 99/55377].

За іншим варіантом втілення цього винаходу, якому віддається перевага, інтерферон є інтерфероном бета (IFN- β), та за варіантом, якому віддається більша перевага, IFN- β 1a.

Остеопонтин за варіантом, якому віддається перевага, застосовується з інтерфероном одночасно, послідовно або окремо.

За варіантом втілення цього винаходу, якому віддається перевага, остеопонтин застосовується у кількості приблизно 0,0001-100мг/кг маси тіла, або приблизно 0,01-10мг/кг маси тіла, або приблизно 1-5мг/кг маси тіла, або у кількості приблизно 2мг/кг маси тіла.

Цей винахід додатково має відношення до застосування молекули нуклеїнової кислоти для одержання лікарського засобу для лікування та/або запобігання неврологічного захворювання, де згадана молекула нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність, яку вибирають із групи, що включає:

- (a) Поліпептид, що включає Послідовність №1;
- (b) Поліпептид, що включає амінокислоти 1-168 або 170 Послідовності №1;
- (c) Поліпептид, що включає амінокислоти 1-16 та 170-314 Послідовності №1;
- (d) Поліпептид, що включає амінокислоти 170-314 Послідовності №1;
- (e) Поліпептид, що включає Послідовність №2;
- (f) Поліпептид, що включає Послідовність №3;
- (g) Мутеїн будь-якого поліпептиду з (a) до (f), де амінокислотна послідовність має щонайменш 40%, або 50%, або 60%, або 70%, або 80%, або 90% ідентичність із щонайменш однією з послідовностей поліпептиду (a)-(f);
- (h) Мутеїн будь-якого поліпептиду з (a) до (f), який кодується послідовністю ДНК, що гібридизується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який із поліпептидів (a)-(f) за помірно жорстких або за дуже жорстких умов;
- (i) Мутеїн будь-якого поліпептиду з (a) до (f), де будь-які мутації амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замінами амінокислотних послідовностей у поліпептидах (a)-(f);
- (j) ізоформу, гібридний білок, функціональну похідну, активну фракцію або кільцево пермutowану похідну будь-якого з поліпептидів (a)-(f).

Нуклеїнова кислота може, наприклад, вводитись у вигляді "оголеної" молекули нуклеїнової

кислоти, наприклад, шляхом внутрішньом'язової ін'єкції.

Вона може додатково містити векторні послідовності, наприклад, вірусну послідовність, придану для експресії гена, що кодується молекулою нуклеїнової кислоти у організмі людини, за варіантом, якому віддається перевага, у відповідних клітинах або тканинах.

Таким чином, за варіантом втілення, якому віддається перевага, молекула нуклеїнової кислоти додатково включає послідовність вектора експресії. Послідовності векторів експресії є добре відомими у цій галузі, вони включають додаткові елементи, які служать для експресії необхідного гена. Вони можуть включати регуляторну послідовність, наприклад, промоторні та енхансерні послідовності, послідовності селективного маркера, точки ініціації розмноження тощо. Таким чином, для лікування та/або запобігання захворювання застосовують генно-терапевтичний підхід. Перевага полягає у тому, що експресія остеопонтину у такому разі буде відбуватись *in situ*.

За варіантом втілення, якому віддається перевага, вектором експресії є вектор лентивірусного походження. Було показано, що вектори на основі лентивірусу є дуже ефективними у перенесенні генів, зокрема, у межах центральної нервової системи. За цим винаходом можуть застосовуватись також інші добре відомі вектори на основі вірусів, наприклад, вектори аденовірусного походження.

З метою стимулювання проходження остеопонтину через гематоенцефалічний бар'єр може застосовуватись цілеспрямований вектор. Такі вектори можуть спрямовуватись, наприклад, на рецептори трансферину або інші ендотеліальні транспортні механізми.

За варіантом втілення цього винаходу, якому віддається перевага, вектор експресії може вводитись шляхом внутрішньом'язової ін'єкції.

За цим винаходом передбачається також застосування вектора для індукування та/або стимулювання ендогенного продукування остеопонтину у клітині, яка за нормальних умов остеопонтину не експресує або яка експресує кількості остеопонтину, що є недостатніми. Згаданий вектор може включати регуляторні послідовності, функціональність яких проявляється у клітинах, які повинні експресувати остеопонтин. Такі регуляторні послідовності можуть бути, наприклад, промоторами або енхансерами. Згадана регуляторна послідовність може у подальшому вводиться до відповідного локусу геному шляхом гомологічної рекомбінації, завдяки чому згадана регуляторна послідовність стає функціонально зв'язаною з геном, експресія якого повинна бути індукована або стимульована. Цю технологію, звичайно, називають "ендогенною активацією генів" (EGA) і опис її наведено, наприклад, у [WO 91/09955].

Цей винахід додатково має відношення до застосування клітини, яка була піддана генетичному модифікуванню, для продукування остеопонтину при виготовленні лікарського засобу для лікування та/або запобігання неврологічних захворювань.

Цей винахід додатково має відношення до клітини, яка була піддана генетичному модифікуванню для продукування остеопонтину для виготов-

лення лікарського засобу для лікування та/або запобігання неврологічних захворювань. Таким чином, клітинно-терапевтичний підхід може застосовуватись із метою доставки лікарського засобу до відповідних частин людського тіла.

Цей винахід додатково має відношення до фармацевтичних композицій, особливо придатних для запобігання та/або лікування неврологічних захворювань, які включають терапевтично ефективну кількість остеопонтину та терапевтично ефективну кількість інтерферону, факультативно з додатковою терапевтично ефективною кількістю імунодепресанту.

Визначення "фармацевтично прийнятний" охоплює будь-який носій, який не перешкоджає ефективності біологічної активності активного інгредієнта і, тим самим, не є токсичним для хазяїна, якому він вводиться. Наприклад, у разі парентерального введення, активний білок (білки) може включатись до складу дозованої лікарської форми для введення шляхом ін'єкції у таких носіях, як фізіологічний розчин, розчин декстрази, сироватковий альбумін або розчин Рінгера-Локка.

Активні інгредієнти фармацевтичної композиції за цим винаходом можуть вводиться особі різними шляхами. Шляхи введення включають інтрадермальний, черезшкірний (наприклад, композиції пролонгованої дії), внутрішньом'язовий, внутрішньоочеревинний, інтравенозний, підшкірний, пероральний, епідуральний, місцевий, підболонокковий, ректальний та інтраназальний. Може застосовуватись будь-який інший терапевтично ефективний шлях введення, наприклад, абсорбування через епітеліальну або ендотеліальну тканину або генна терапія, де пацієнту вводиться молекула ДНК, що кодує активний агент (наприклад, за допомогою вектора), що примушує активний агент експресуватись та секретуватись *in vivo*. На додаток до цього, білок (білки) за цим винаходом можуть уводитись разом з іншими компонентами біологічно активних агентів, наприклад, фармацевтично прийнятними поверхнево-активними речовинами, наповнювачами, носіями, розчинниками та розріджувачами.

Для парентерального (наприклад, інтравенозного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення, активний білок (білки) може вводиться до складу розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку у поєднанні з фармацевтично прийнятним парентеральним носієм (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрази) та домішками, які підтримують ізотонічність (наприклад, маніт) або хімічну стабільність (наприклад, консерванти та буфери). Композиція стерилізується за допомогою традиційних способів.

Біодоступність активного білка (білків) за цим винаходом також може поліпшуватись шляхом застосування процедур спряження, які підвищують час напівжиття молекули у людському тілі, наприклад, шляхом зв'язування згаданої молекули з поліетиленгліколем, як описується у заявці на [патент PCT WO 92/13095].

Терапевтично ефективні кількості активного (-их) білка (-ів) будуть залежати від багатьох змінних, у тому числі від типу білка, спорідненості білка, будь-якої залишкової цитотоксичної активності,

що демонструється антагоністами, шляху введення, клінічного стану пацієнта (у тому числі бажаності підтримування нетоксичного рівня активності ендогенного остеопонтину).

"Терапевтично ефективною кількістю" є така кількість, у разі введення якої остеопонтин демонструє позитивний ефект щодо неврологічного захворювання. Доза, введена особі (разова або багаторазова), буде змінюватись у залежності від ряду факторів, у тому числі фармакокінетичних властивостей остеопонтину, шляху введення, стану та характеристик (стать, вік, маса тіла, стан здоров'я, розміри) пацієнта, тяжкості симптомів, одночасного лікування, частоти лікування та бажаного ефекту.

Як згадувалось вище, остеопонтин за варіантом, якому віддається перевага, може застосовуватись у кількості приблизно 0,0001-10мг/кг маси тіла, або приблизно 0,01-5мг/кг маси тіла, або приблизно 0,1-3мг/кг маси тіла, або приблизно 1-2мг/кг маси тіла. Додатковими кількостями остеопонтину, яким віддається перевага, є кількості приблизно 0,1-1000мг/кг маси тіла, або приблизно 1-100мг/кг маси тіла, або приблизно 10-50мг/кг маси тіла.

Шляхом введення, якому віддається перевага за цим винаходом, є введення підшкірним шляхом. Додаткова перевага за цим винаходом віддається внутрішньом'язовому введенню.

За додатковими варіантами втілення, яким віддається перевага, остеопонтин вводиться щоденно або через день.

Добові дози, як правило, вводяться розділеними дозами або у вигляді лікарської форми пролонгованої дії, ефективною щодо одержання бажаних результатів. Друге або подальше введення можуть здійснюватись у дозі, яка є такою саме, меншою або більшою за початкову або попередні дози, введені особі. Друге або подальше введення можуть здійснюватись під час або перед початком захворювання.

За цим винаходом остеопонтин може вводиться особі профілактично або терапевтично перед, одночасно або послідовно із застосуванням інших схем лікування або лікарських засобів (наприклад, схема багаторазового приймання лікарського засобу) у терапевтично ефективній кількості, зокрема, з інтерфероном. Активні агенти, що вводяться одночасно з іншими терапевтичними агентами, можуть вводиться у тих саме або інших композиціях.

Цей винахід додатково має відношення до способу лікування неврологічного захворювання, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості остеопонтину або агоніста активності остеопонтину, факультативно разом із фармацевтично прийнятним носієм.

Спосіб лікування неврологічного захворювання, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості остеопонтину або агоніста активності остеопонтину та інтерферону, факультативно разом із фармацевтично прийнятним носієм, також входить до обсягу цього винаходу.

Усі посилання, наведені у цьому описі, у тому числі журнальні статті або реферати, опубліковані

або неопубліковані американські або зарубіжні заявки на патент, видані американські або зарубіжні патенти або будь-які інші посилання, включені до цього опису у повному обсязі, із включенням усіх даних, таблиць, фігур та тексту, наведених у згаданих посиланнях. На додаток до цього, вміст посилань у повному обсязі, цитованих у посиланнях, цитованих у цьому описі, включено до цього опису, як посилання.

Посилання на відомі стадії способів, традиційні стадії способів, відомі способи або традиційні способи у жодному разі не є визнанням того, що будь-який аспект, опис або варіант втілення цього винаходу розкривається, роз'яснюється або підказується відомим рівнем техніки.

Наведений далі опис конкретних варіантів втілення настільки повно розкриє загальну природу цього винаходу, що інші зможуть, завдяки використанню знань, що знаходяться у межах цієї галузі (із включенням вмісту посилань, що цитуються у цьому описі), легко модифікувати та/або адаптувати для різних варіантів застосування такі конкретні варіанти втілення, без зайвого експериментування, без відхилення від загальної концепції цього винаходу. Таким чином, такі адаптації та модифікації знаходяться у діапазоні еквівалентів розкритих варіантів втілення, виходячи з роз'яснень та настанов, представлених у цьому описі. Слід розуміти, що фразеологія або термінологія цього опису призначена для опису, а не для обмеження, завдяки чому згадана термінологія або фразеологія цього опису повинна інтерпретуватись досвідченим фахівцем у світі роз'яснень та настанов, представлених у цьому описі, у поєднанні зі знаннями пересічного фахівця у цій галузі.

Винахід, що його було описано вище, може бути легше зрозумілим завдяки посиланню на представлені далі приклади, які наводяться для ілюстрації і не призначені для обмеження цього винаходу.

Приклади

Приклад 1: Остеопонтин диференційовано експресується у *in vivo* та *in vitro* моделях демієлінізації нервових заворувань

Методи

In vitro модельні системи

Лінію клітин Oli-neu одержали шляхом іморталізації олігодендрогліальних попередників реплікаційно-дефективним ретровірусом, що кодує t-neu онкоген, конститутивно активну тирозинкіназу; було показано, що диференціація цієї лінії клітин індукується у присутності 1мМ дибутирил-цАМФ у культуральному середовищі (Янг (Jung) та інші, 1995). Це забезпечило можливість дослідження олігодендроцитів у вигляді ізольованих клітин.

Морфологія та антигенні характеристики лінії клітин мишачих олігодендроцитів Oli-neu, яку одержали з попередників мишачих олігодендроцитів A2B5, у стані без обробки та після 6 днів переддиференціаційної обробки 1-5мМ дибутирил-цАМФ значно різняться. У той час як клітини лінії Oli-neu, які не піддавались обробці, мають круглу форму і є переважно біполярними, подібно до клітин-попередників олігодендроцитів, у клітин, які піддавались обробці цАМФ, з'явилися численні вирости, вони демонстрували плаский фенотип і

навіть утворювали пласкі, довгасті "оболонкоподібні" структури.

На додаток до цього, аналіз мієлінізації *in vitro* із застосуванням змішаних кортикальних культур може використовуватись для забезпечення візуалізації функціонального мієліну *in vitro*. Ця система забезпечує можливість дослідження того, яким чином олігодендроцити контактують та мієлінізують аксони у присутності клітин центральної нервової системи інших типів (Любецькі (Lubetzki) та інші, 1993). У цій системі можуть перевірятись біологічні фактори, які можуть впливати на проліферацію попередників олігодендроцитів або діяти на диференціацію та виживаність олігодендроцитів, наприклад, шляхом впливання на утворення реальних мієлінових сегментів. Необхідність вивчення процесу мієлінізації *in vitro* призвела до розробки цілому ряду аналізів, у тому числі аналізу агрегування культур клітин головного мозку (Метью (Matthieu) та інші, 1992), аналізу культур зрізів мозочка (Ноттерпек (Notterpek) та інші, 1993) та систем спільного культивування (Шоу (Shaw) та інші, 1996; Баррес (Barres) та інші, 1993). Перевага цих моделей полягає у тому, що вони надають можливість дослідження поведінки олігодендроцитів у поєднанні із клітинами інших типів і того, яким чином ці клітини стимулюються до продукування мієліну. Шляхом специфічних пошкоджень у цих системах може також провокуватись демієлінізація, і може вивчатись також відповідний процес ремієлінізації.

In vivo модельні системи

Існує широкий діапазон експериментальних *in vivo* та *in vitro* моделей для вивчення розсіяного склерозу. У більшості *in vivo* моделей використовується класична тваринна модель розсіяного склерозу, експериментальний алергічний енцефаломієліт (EAE). Існує багато варіантів цієї моделі, які були адаптовані для застосування на широкому діапазоні видів ссавців, у тому числі на мишах, пацюках та приматах (огляд дивись у Петрі (Petry) та інші, 2000). На додаток до цього, були сформульовані методики для "імітації" запропонованої вірусної складової розсіяного склерозу на тваринних моделях, наприклад, модель розсіяного склерозу на основі енцефалітогенного вірусу мишей Тейлера (Theiler) (Даль Канто (Dal Canto) та інші, 1995).

Тваринні моделі для виключного дослідження мієлінізації у центральній та периферичній нервових системах використовуються не так часто. Була доведена корисність спостереження за процесом еволюційної мієлінізації для одержання даних щодо механізмів, які лежать у основі диференціації, міграції та проліферації олігодендроцитальних або шванівських клітин, відповідно до "гіпотези рекапітуляції" (Франклін (Franklin) та Хінкс (Hinks), 1999). Однак для порівняння еволюційної мієлінізації, яка відбувається у той час, коли центральна нервова система або периферична нервова система ще знаходяться у стадії формування, та ремієлінізації, яка відбувається у дорослій парадигмі, необхідно було сформулювати моделі, які безпосередньо адресувались би до процесу ремієлінізації.

Купризона модель

Однією з найбільш відомих та широко використовуваних моделей ремієлінізації є купризона модель ремієлінізації у мишей. Ця модель включає оральне введення органічної сполуки, купризону, хелатора міді, яка, як було показано, є вибірково токсичною для олігодендроцитів (Морелл (Morell) та інші, 1998).

Демієлінізація та ремієлінізація відбувається у мозолистому тілі мишей, що піддаються обробці купризonom. Ці патологічні умови можуть візуалізуватись шляхом забарвлювання антитілом проти циклічної нуклеотидфосфодіестерази (CNPase) або антитілом проти МБР (основного мієлінового білка). Мієлін забарвлюють барвником Luxol Fast Blue-періодною кислотою-шифоваю основою (LFB-PAS). Попередники олігодендроцитів, які піддаються ремієлінізації, можуть візуалізуватись за допомогою антитіл для рецептора PDGF α (тромбоцитарний фактор росту) або NG2.

Наслідком введення купризону мишам впродовж 3-5 тижнів є екстенсивна демієлінізація мозолистого тіла. Одночасно з демієлінізацією, через 3 тижні після введення купризону, активізується синтез транскриптів мієлін-специфічних генів (Морелл (Morell) та інші, 1998).

Після припинення введення купризону створюється середовище, яке сприяє відновленню, завдяки чому через 6 тижнів після припинення згодовування купризону миші демонстрували екстенсивну ремієлінізацію у мозолистому тілі. Таким чином, купризона модель забезпечує повну *in vivo* парадигму, у межах якої можливим є дослідження аспектів демієлінізації та ремієлінізації. До переваг цієї системи належить відсутність інфільтрації Т-клітин до тканин центральної нервової системи, що надає можливість більш виключного дослідження процесів мієлінізації, а також відтворюваності результатів (Хіремат (Hiremath) та інші, 1998).

Для обробки купризonom у цьому дослідженні були використані миші-самці лінії C57BL/6 (віком 8 тижнів, 20 \pm 3г), яких підрозділяли на 6 груп, кожна з яких складалась з 6 тварин.

Група 1: контрольна група, якій згодовували нормальний порошкоподібний корм;

Група 2: впродовж 3 тижнів згодовували порошкоподібний раціон, що містив 0,2% купризону (Куп3т);

Група 3: впродовж 5 тижнів згодовували порошкоподібний раціон, що містив 0,2% купризону (Куп5т);

Група 4: впродовж 5 тижнів згодовували порошкоподібний раціон, що містив 0,2% купризону, з подальшим 1-тижневим періодом відновлення, впродовж якого тваринам згодовували нормальний порошкоподібний раціон (1тР);

Група 5: впродовж 5 тижнів згодовували порошкоподібний раціон, що містив 0,2% купризону, з подальшим 3-тижневим періодом відновлення, впродовж якого тваринам згодовували нормальний порошкоподібний раціон (3тР);

Група 6: впродовж 5 тижнів згодовували порошкоподібний раціон, що містив 0,2% купризону, з подальшим 6-тижневим періодом відновлення, впродовж якого тваринам згодовували нормальний порошкоподібний раціон (6тР).

Після завершення кожної обробки у певні періоди часу у тварин кожної групи збирали головний мозок. Мишей спочатку анестезували, і здійснювали перфузію через лівий шлуночок. Головні мозки збирали, і робили серійні зрізи на рівні мозолистого тіла-хвостатого ядра (смугасте тіло) та піпокампа. Зрізи тканини головного мозку заливали парафіном для імуногістохімічних досліджень та гібридизації *in situ*.

Одержання гістологічних препаратів

Формалін одержували шляхом розведення 1 об'єму формальдегіду (Fluka, 36%, аналітичної чистоти) та 1 об'єму забуференого фосфатом фізіологічного розчину 8 об'ємами стерильної води. До силіконової пробірки, пристосованої до перистальтичного насоса та спорядженої голкою 20G, 1-1/5, вносили 10мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину. Після цього пробірку постійно заповнювали 40мл формаліну. Це слід робити з обережністю для запобігання утворення повітряних бульбашок.

Тварин анестезували пентобарбіталом натрію (Sanofit®), розбавленому 1:1 стерильним забуференим фосфатом фізіологічним розчином до концентрації 3мг/100мл, перед проведенням внутрішньосерцевої перфузії фіксатором для забезпечення можливості подальшого гістологічного аналізу органів та тканин. Кожній миші здійснили внутрішньоочеревинну ін'єкцію 0,05мл (0,75мг/кг). Коли тварини стали сонними, їхні кінцівки зафіксували булавками (голки 25G 5/8) через шкіру до пінополістиролової плити. Живіт кожної тварини дезинфікували етанолом, і по зовнішній стороні у шкірі стерильними ножицями зробили розріз. Після цього живіт був додатково розрізаний до правого та лівого боку. Зовнішній клапоть шкіри підіймали пінцетом, діагональним розрізом відкривали діафрагму, і робили двосторонній розріз перпендикулярно до ребер для розкриття порожнини грудної клітки з серцем, що пульсувало у середній частині. Серце утримували пінцетом, і праве передсердя негайно розрізали з венозною кровотокою. Для перфузії використовували 10мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину з подальшим вливанням 40мл формаліну кожній миші. Головний та спинний мозок кожної тварини обережно вирізали і вмішували до 50мл пробірки Falcon® із 10мл формалінового розчину на 2год. Після цього формаліновий розчин замінювали 10мл стерильного забуференого фосфатом фізіологічного розчину, і матеріал витримували при температурі +4°C впродовж ночі. Після цього забуферений фосфатом фізіологічний розчин знову замінювали, і матеріал витримували при температурі +4°C впродовж декількох годин. Напівкулі головного мозку і спинний мозок розрізали на зрізи товщиною приблизно 0,5см і вмішували до пластикових піддонів, сумісних з машиною для заливання. Заливання головного та спинного мозку парафіном здійснювали за допомогою автоматичної установки Tissue Tek Vacuum Infiltration Processor E150/E300 (Miles Inc. Diagnostics) за програмою, наведеною нижче:

30хв у 50% розчині етанолу
60хв у 70% розчині етанолу
60хв у 70% розчині етанолу

60хв у 80% розчині етанолу
90хв у 80% розчині етанолу
30хв у 96% розчині етанолу
90хв у 96% розчині етанолу
120хв у 96% розчині етанолу
30хв у 100% розчині ксилолу
60хв у 100% розчині ксилолу

Чотири 60хв інкубування у парафіні (Histosec, Merck 11609); остання стадія для заливки.

Усі розчини витримували при температурі 40°C із парафіном при температурі 65°C. Після одержання гістологічних зрізів, зрізи головного та спинного мозку вмішували з необхідною орієнтацією до пластикових камер для заливання парафіном. Камери заливали рідким парафіном і витримували зі швидким охолодженням до температури 0°C на охолоджувальній плиті. Парафінові блоки розрізували за допомогою мікротому (зрізи товщиною 5-10мкм). Після цього зрізи вмішували на оброблені силаном предметні скельця (SuperFrost-Plus™, номер за каталогом Menzel 041300). Після встановлення зрізи зберігали у вільному від пилу середовищі.

Культура клітин

Oli-neu: Клітини лінії клітин мишачих олігодендроцитів (Oli-neu) збагачували центрифугуванням і ресуспендували у живильному середовищі Сато (Троттер (Trotter) та інші, 1989). Клітини культивували при контрольованих умовах у 75мл колбах при температурі 37°C та 5% CO₂. Диференціацію здійснювали шляхом безпосереднього додання до клітинного культурального середовища 1мМ dbцАМФ. РНК екстрагували за методом Trizol (дивись нижче).

Виділення РНК

Загальну РНК виділяли із клітин Oli-neu, зрізів головного мозку мишей, які одержували купризон, та з цільного постнатального головного мозку мишей на різних стадіях розвитку за протоколом екстрагування Tri-ZOL® (Life Technologies AG, Basel, Switzerland). Полі(А)⁺ РНК одержували зі зразків загальної РНК із застосуванням колонок QiaGen OLIGOTEX™ (QIAGEN Inc., 28159 Stanford Avenue, Valencia, CA91355, USA).

Аналіз диференційної експресії генів (DGE) із застосуванням мікропослідовностей кДНК

Експерименти з мікропослідовностями були здійснені фірмою Incyte Genomics (Incyte Genomics Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, California 94304, USA). DGE аналіз здійснювали із застосуванням мікропослідовності експресії мишачого гена Mouse GEM™ 1 фірми Incyte (<http://www.incyte.com/reagents/gem/products.shtml>).

На чіпи фірми Incyte, які використовували під час проведення цих аналізів, наносили молекули кДНК, що відповідали 8734 генам, як відомим та і невідомим (послідовності EST). Технологія фірми Incyte забезпечувала можливість піддання мікрорізків кожного з цих генів спот-тесту на одну послідовність. Кожна молекула кДНК, що відповідала відомому гену або EST, мала довжину у 500-5000п.н. Специфікації фірми Incyte забезпечували динамічний діапазон виявлення у межах від 2пг до 2000пг для окремої мРНК у зразку. Кількість РНК, необхідна для кожного експерименту з послідовностями, становила 600нг полі(А)⁺ РНК. Встанов-

лені рівні диференційної експресії, що піддавались виявленню, встановлювались у вигляді співвідношень, більших за 1,75.

Нормалізація сигналу та визначення рівнів експресії

Співвідношення, обчислені за двома інтенсивностями флуоресценції, забезпечували кількісний критерій відносного рівня експресії генів 2-лункових зразків, що піддавались аналізу. Співвідношення, які надавались кожному гену, обчислюють, виходячи з нормалізованих рівнів експресії. Коефіцієнт нормалізації обчислюють шляхом поділу загальної експресії другого зразка (P_2) на загальну експресію першого зразка (P_1). Потім цей коефіцієнт застосовують до рівня експресії кожного гена у P_2 . Після здійснення цієї стадії нормалізації, співвідношення генів вираховують за наведеним далі правилом:

Нехай E_1 буде рівнем експресії даного гена у зразку 1 і нехай E_2 буде нормалізованим рівнем експресії того самого гена у зразку 2: якщо $E_2 > E_1$,

тоді співвідношення E_2/E_1 у іншому разі співвідношення $= E_1/E_2$.

Оскільки гібридизація зразків здійснюється одночасно за конкурентних умов, технологія чіпів фірми Incyte є більш точною щодо визначення відносних змін експресії і стає менш надійною для визначення абсолютних рівнів експресії. Однак ці значення рівнів експресії можна використовувати для порівняння пар популяцій РНК зразків, які фактично фізично на чіпі не порівнювались. Такі порівняння *in silico* є менш надійними, однак вони можуть надати додаткову інформацію щодо механізмів, які можуть застосовуватись до систем, що піддаються аналізу.

Результати

Моделі, що використовувались для аналізу диференційної експресії остеопонтину

У Таблиці IV показані моделі, що використовувались для екстрагування мРНК та чіпової гібридизації (DGE аналіз), як описувалось вище.

Таблиця IV

Моделі, застосовані при DGE аналізі

Моделі	Обробки	Контролі
1. Модель диференціації олігодендроцитів <i>in vitro</i>	Клітини лінії o1-peu+дибутирил-цАМФ (6 год)	Клітини лінії o1-peu (обробці не піддавались)
	Клітини лінії o1-peu+дибутирил-цАМФ (6 днів)	Клітини лінії o1-peu (обробці не піддавались)
2. Купризонова модель демієлінізації/ремієлінізації <i>in vivo</i>	Передній мозок дорослої особи+купризон (3 тижні)	Передній мозок дорослої особи, що не піддавався обробці
	Передній мозок дорослої особи+купризон (5 тижнів)	Передній мозок дорослої особи, що не піддавався обробці
	Передній мозок дорослої особи+купризон (3 тижні)	Передній мозок дорослої особи+купризон (5 тижнів)
3. Еволюційна мієлінізація	Постнатальний (день 10-P10) мишачий мозочок	Постнатальний (день 2-P2) мишачий мозочок

Позитивний контроль для DGE: Регуляція мієлін-специфічних генів.

Вперше, як позитивний контроль, було перевірено, чи може бути показане диференційне регулювання мієлін-специфічних генів за допомогою DGE.

У Таблиці V показана регуляція, що спостерігалась для мієлін-специфічних генів, присутніх у мікропослідовностях фірми Incyte. Значення диференційної експресії для кожного гена повідом-

ляються з 3-тижневої та 5-тижневої часових точок обробки купризомом. Ці дані є позитивним контролем для перевірки надійності чіпів. Оскільки регуляція структурних генів мієліну за наших експериментальних умов є добре визначеною, експресія цих генів, що спостерігалась і визначалась на чіпах, може використовуватись для вказання а) точності технології та б) відтворюваності наших моделей.

Таблиця V

Регуляція *in vivo* мієлін-специфічних генів у аналізах мікропослідовностей на моделях мієлінізації *in vivo*

Назва гена	Номер депонування	Куп. 3т.	Куп. 5т.	P 2/10*
Основний мієліновий білок	AA059540	113,6	11,3	+7,9
Мієліновий везикулярний білок (MVP/MAL)	AA519027	33,5	11,7	0
Циклічна нуклеотидфосфодіестераза 1 (CNPase)	W63987	22,9	11,1	+2,9

*Постнатальний мозочок день 2/10

Вищенаведена таблиця показує, яким чином деякі мієлін-специфічні гени були регульовані у аналізах мікропослідовностей, які здійснювали на РНК різних моделей *in vivo*, що використовувались для дослідження демієлінізації, ремієлінізації та еволюційної мієлінізації. Зміни експресії цих мієлін-специфічних генів вказують, яким чином процес мієлінізації може досліджуватись на рівні транскрипційної регуляції з використанням мікропослідовностей.

Після 3 тижнів введення купризону, демієлізацийний ефект обробки може візуалізуватись на певних ділянках мишачого головного мозку. Так, на 3 тижні очікувалось спостереження негативної модуляції різних генів, пов'язаних із синтезом мієліну та/або підтриманням мієліну. Супресія мієлін-специфічних генів, що спостерігалась за допомогою аналізу мікропослідовностей, є підтвердженням точності та надійності експериментальної системи. Дані, представлені у Таблиці V, показують, що рівні мРНК для MBP, супресовані у 13,6 рази, і циклічної нуклеотидфосфодіестерази 1 (CNPase), супресовані у 2,9 рази, зменшилися через 3 тижні обробки купризоном, порівняно з контролем. Однак рівні РНК для обох цих генів повернулись до рівнів, у 1,3 та 1,1 рази нижчих за нормальні рівні, відповідно, після 5 тижнів обробки купризоном, що вказує на те, що біологічна система намагалась здійснити ремієлінізацію шляхом підсилення синтезу структурних мієлінових білків.

Диференційна регуляція остеопонтину.

Через 3 тижні (+2,2) та 5 тижнів (+2,8) обробки купризоном на чіпі спостерігалась активація остеопонтину.

Приклад 2: Підтвердження диференційної експресії гена остеопонтину за допомогою кількісної ревертазно (RT)-полімеразної ланцюгової реакції (PCR) у реальному масштабі часу (TaqMan®)

Методи

Синтез матриці кДНК

Матриці кДНК для аналізу TaqMan® синтезували зі зразків загальної РНК за допомогою зворотної транскрипції (RT) із застосуванням зворотнотранскрипційних реактивів TaqMan® (P/N №808-0234). Усі реакції зворотної транскрипції здійснювали у 100мкл об'ємі, що містив: 10мкл RT буфера

TaqMan, 22мкл 25мМ розчину MgCl₂ (5,5мМ), 20мкл суміші дезоксинуклеозид-5'-трифосфатів (500мкМ кожного з dNTP), 5мкл довільних гексамерів (2,5мкМ), 2мкл інгібітора РНКаз (0,4Од/мкл), 2,5мкл зворотної транскриптази MultiScribe™ (1,25Од/мкл) та 38,5мкл зразка РНК (1мкг загальної РНК) у вільній від РНКазі H₂O. Реакції здійснювали на установці Eppendorf MasterCycler при температурі 25°C впродовж 10хв (інкубація), 48°C впродовж 30хв (зворотна транскрипція) та 95°C впродовж 5хв (інактивація). Усі синтезовані кДНК зберігали при температурі -20°C у 20мкл об'ємах.

Конструювання та верифікація праймерів

Прямий та зворотний праймери для полімеразної ланцюгової реакції (PCR) у реальному масштабі часу з барвником SYBR Green для усіх підтверджених генів та GAPDH (глцеральдегід-3-фосфат) (облігатний контроль) конструювали із застосуванням програми Primer Express™ від фірми PE Biosystems за опублікованими послідовностями і замовляли з концентрацією 0,02мкМ від фірми Interactiva (Interactiva: The Virtual Laboratory, Sedanstrasse 10, D-89077 Ulm). Специфічність та оптимальні концентрації праймерів перевіряли для кожного набору праймерів. Потенційну контамінацію геномної ДНК контролювали шляхом проведення полімеразних ланцюгових реакцій на негативних контрольних зразках кДНК, які піддавали реакціям зворотної транскрипції за відсутності зворотної транскриптази (RT). Відсутність неспецифічної ампліфікації підтверджували шляхом аналізування продуктів полімеразної ланцюгової реакції за допомогою електрофорезу на агаровому гелі на 3,5% гелях MetaPhor або передформованих 4% гелях NuSieve®.

У наведеній таблиці показані послідовності генспецифічних праймерів, сконструйованих для проведення аналізу TaqMan® на підтвердження диференційної експресії генів, які, як було показано, диференційно регулюються на мікропослідовностях. Включені також назви генів, що відповідають кожній парі праймерів, та номер депонування у GenBank послідовності, що використовувалась для конструювання кожного праймера за допомогою програми PrimerExpress™.

Таблиця VI

Праймери, використані для RT-PCR аналізу

Назва гена	Номер депонування	Назва TaqMan® OLIGO	Послідовність TaqMan® OLIGO
Секретований фосфопро- теїн 1 (остеопонтин)	AA108928	Остеопонтин-166F	AGCCTGCACCCAGATCCTATAG
		Остеопонтин-235R	GCGCAAGGAGATTCTGCTTCT

Реакції TaqMan

SYBR Green PCR у реальному масштабі часу здійснювали з 5мкл/лунку продуктів реакції зворотної транскрипції (0,5нг загальної РНК), 25мкл/лунку маточної суміші SYBR Green PCR (Applied Biosystems, CA, USA) з урацил N-глікозилазою (UNG) AmpErase (0,5Од/лунку) та 20мкл праймерів (300нМ). PCR здійснювали при температурі 50°C впродовж 2хв (для інкубування AmpErase UNG із метою ліквідації будь-якого потенційного перенесення шляхом видалення урацилу, включеного до продуктів PCR, які були одержані з попередніх серій TaqMan), 95°C впродовж 10хв (для активації AmpliTaq Gold). Після цього зразки піддавали 40 циклам при температурі 95°C впродовж 15с, 60°C впродовж 1хв на системі детекції послідовностей ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System. Після цього зразки кДНК, піддані зворотній транскрипції, ампліфікували і визначали значення їхнього порогового циклу (C_T). Усі значення C_T нормалізували до облігатного гена GAPDH. У разі можливості, зразки піддавали згаданий процедурі двічі або тричі для визначення відтворюваності результату. При проведенні елек-

жани з попередніх серій TaqMan), 95°C впродовж 10хв (для активації AmpliTaq Gold). Після цього зразки піддавали 40 циклам при температурі 95°C впродовж 15с, 60°C впродовж 1хв на системі детекції послідовностей ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System. Після цього зразки кДНК, піддані зворотній транскрипції, ампліфікували і визначали значення їхнього порогового циклу (C_T). Усі значення C_T нормалізували до облігатного гена GAPDH. У разі можливості, зразки піддавали згаданий процедурі двічі або тричі для визначення відтворюваності результату. При проведенні елек-

трофоретичного аналізу для усіх підтверджених генів та GAPDH спостерігалась одна специфічна смуга ДНК.

Обчислення регуляції гена за допомогою порогового циклу (C_T)

Принцип детекції у реальному масштабі часу з використанням маточної суміші SYBR Green PCR ґрунтується на безпосередньому виявленні продукту PCR шляхом визначення посилення флуоресценції, яка утворюється унаслідок зв'язування фарбника SYBR Green із двонитковою ДНК. Це надає можливість кількісного визначення відносно збільшення ген-специфічного продукту ампліфікації, виходячи з кривих росту PCR.

Визначення специфічних різновидів кДНК відносно контрольного зразка здійснюють шляхом кількісного визначення кДНК, перетвореної з матричної РНК, що відповідає специфічному гену, відносно калібруючого зразка, який використовується як фізіологічний еталон. Калібрування забезпечується зразком, який одержують за контрольних умов або за умов без обробки. Відносне кількісне визначення різновидів кДНК завершують шляхом нормалізації до ендogenous контролю (у цьому разі GAPDH), для пояснення змінності початкової концентрації та якості загальної РНК, яка була використана для синтезування матричних кДНК, та ефективності перетворення реакцій зворотної транскрипції. Обчислення відносних кількісних значень здійснювали шляхом прийняття середнього значення C_T для повторних реакцій для кожного зразка, обчислення різниці (ΔC_T) середнього значення C_T між цільовими зразками та ендogenous контролю, віднімання середнього значення C_T калібруатора для мішені від ΔC_T цієї мішені ($\Delta \Delta C_T$) і, нарешті, вираження відносного кількісного значення для мішені як $2^{-\Delta \Delta C_T}$ для визначення ступеня активації та супресії експресії генів.

Нормалізація Флуоресцентних сигналів у TaqMan® реакціях

Флуоресцентні сигнали комплексу барвника SYBR Green та двониткової ДНК нормалізуються до реакцій пасивного еталону або негативного контролю, що не містять матричної ДНК. Нормалізацію здійснювали шляхом ділення інтенсивності емісії комплексу барвника SYBR Green та двониткової ДНК у експериментальній реакції на інтенсивність емісії пасивного еталону. Таким чином одержали R_n (нормалізоване репортерне) відношення для реакції:

- R_n^+ = значення R_n для реакції, що включає усі складові, у тому числі, матричну ДНК

- R_n^- = значення R_n зразка, що не реагував (матрична ДНК відсутня)

- $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, де:

R_n^+ = (інтенсивність емісії комплексу барвника SYBR Green та двониткової ДНК) / PCR із матрицею (інтенсивність емісії пасивного еталону)

R_n^- = (інтенсивність емісії комплексу барвника SYBR Green та двониткової ДНК) / Матриця відсутня (інтенсивність емісії пасивного еталону)

Обчислення регулювання конформації за значеннями порогового циклу (C_T)

ΔR_n являє собою величину сигналу, який утворюється даним набором умов PCR для специфіч-

ної реакції. Параметр порогового циклу становить критерій відносного збільшення ампліфікації ген-специфічного продукту, який відображає відношу представленість специфічного транскрипту у популяції експериментальної кДНК. Це значення фіксується як точка циклу, у якій вперше виявляється статистично значуще зростання ΔR_n . Порогове значення визначають, як середнє стандартне відхилення R_n для початкових циклів, помножене на поправковий коефіцієнт. Параметр порогового циклу використовують для кількісного визначення диференційної експресії гена. Конкретні значення обчислюють для кожної ген-специфічної графічної функції росту, виходячи з точки або циклу, під час якого виявляється збільшення, яке перевищує інтенсивність фонові флуоресценції.

Усі обчислення відносних кількісних значень здійснювали шляхом прийняття середнього значення C_T для повторних реакцій для кожного зразка, обчислення різниці (ΔC_T) середнього значення C_T між цільовими зразками та ендogenous контролю та віднімання середнього значення C_T калібруатора для мішені від ΔC_T цієї мішені ($\Delta \Delta C_T$). І, нарешті, відносне кількісне значення для мішені виражали як $2^{-\Delta \Delta C_T}$ для визначення ступеня активації та супресії експресії генів.

Результати

Кількісна ревертазно (ЯТ)-полімеразна ланцюгова реакція (PCR) у реальному масштабі часу (TaqMan) є чутливим та надійним підходом до підтвердження та виявлення змін у експресії гена. Детектор послідовностей TaqMan (ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, Каліфорнія) об'єднує аналіз на основі PCR із програмним/апаратним оснащенням з наданням системи для вискоєфективного кількісного визначення нуклеїнових кислотних послідовностей. Цей детектор об'єднує термоциклічну обробку, детектування флуоресценції та спеціалізоване програмне забезпечення, пов'язане з конкретним застосуванням, із наданням можливості поциклового виявлення збільшення кількості специфічного продукту PCR.

Експресія декількох високорегульованих генів, виявлена за допомогою аналізу мікропослідовностей, була перевірена на платформі TaqMan®. У кожному випадку, наскільки це було можливим, включали часовий графік для кожної модельної системи, що використовувалась. Це забезпечило можливість збирання більшого обсягу даних відносно того, яким чином поводити себе специфічні гени під час повного процесу.

Зміни експресії генів можуть піддаватись кількісному визначенню за допомогою реакції TaqMan® шляхом безпосереднього детектування зростання продукту PCR вимірюванням рівня флуоресценції, що утворюється завдяки зв'язуванню барвника SYBR Green із двонитковою ДНК, представленою продуктами ампліфікації, специфічними для гена, що піддається перевірці. Визначення специфічних різновидів кДНК відносно контрольного зразка здійснюють шляхом кількісного визначення кДНК, перетвореної з матричної РНК, що відповідає специфічному гену, відносно калібруючого зразка, який використовується як фізіологічний еталон. Калібрування забезпечується

зразком, який одержують за контрольних умов або за умов без обробки. Відносно кількісне визначення різновидів кДНК здійснюють із нормалізацією до GAPDH для пояснення будь-якої змінності початкової концентрації та якості загальної РНК, яка була використана для синтезування матричних кДНК, та ефективності перетворення реакцій зворотної транскрипції.

Експресію секретованого гена фосфопротеїну 1 (остеопонтину) аналізували у процесі дослідження часового графіка, що охоплює парадигму демієлінізації/ремієлінізації, пов'язану з купризиновою моделлю.

Результати TaqMan експериментів з експресією остеопонтину у моделі ремієлінізації із застосуванням купризону показані на Фіг.1(A). Встановили, що рівні мРНК остеопонтину у передньому мозку мишей після 3 тижнів введення купризону були активовані у 18 разів (3 т. куп.) і у 25 разів після 5 тижнів обробки (5 т. куп.).

Експресія остеопонтину супресувалась після 1, 3 та 6 тижнів відновлення, які додавались до 5 тижнів обробки купризonom (5 т. куп.+1 т., 3 т. та 6 т.) Ці дані вказують на важливу роль остеопонтину на стадії демієлінізації та ремієлінізації згаданої

моделі, оскільки ремієлінізація розпочинається тоді, коли все ще відбувається демієлінізація.

На Фіг.1(B) показані результати визначення рівнів експресії остеопонтину у мозочку, що розвивається. мРНК остеопонтину тимчасово активується на початковому етапі постнатального розвитку, дні C4-C8; цей самий часовий період є моментом започаткування мієлінізації у мозочку.

Результати аналізу мікропослідовностей вказали на активацію остеопонтину у передньому мозку мишей під час обробки купризonom. Цей аналіз розширює профіль експресії остеопонтину з включенням як фази демієлінізації, так і фази ремієлінізації під час обробки купризonom і показує, що профіль експресії остеопонтину досягає максимального рівня на етапі демієлінізації під час обробки купризonom, а під час періоду відновлення повертається майже до базових рівнів.

Результати показані у наведеній нижче Таблиці VII.

Результати TaqMan® аналізу експресії остеопонтину підтвердили її активацію у головному мозку мишей, яким згодовували купризон впродовж 3 та 5 тижнів.

Таблиця VII

TaqMan® аналіз регуляції остеопонтину на купризonomовій моделі

Тип тканини	Експеримент	Рівні експресії	Регуляція
Передній мозок	Куп. контроль	1,00	Контрольний рівень
Передній мозок	Куп. контроль	-1,32	Супресія
Передній мозок	3 т. куп.	17,51	Активация
Передній мозок	3 т. куп.	23,43	Активация
Передній мозок	5 т. куп.	20,25	Активация
Передній мозок	5 т. куп.	23,43	Активация
Передній мозок	5 т. куп. + 1 т. R.	1,79	Активация
Передній мозок	5 т. куп. + 1 т. R.	3,32	Активация
Передній мозок	5 т. куп. + 3 т. R.	2,95	Активация
Передній мозок	5 т. куп. + 3 т. R.	4,56	Активация
Передній мозок	5 т. куп. + 5 т. R.	-1,16	Супресія
Передній мозок	5 т. куп. + 5 т. R.	1,04	Контрольний рівень
Передній мозок	5 т. куп. + 5 т. R.	1,07	Контрольний рівень

Приклад 3: Підтвердження диференційованої експресії остеопонтину на зерн-блотингом

Методи

Одержання блотів

Для конкретних генів, тканиноспецифічність експресії аналізували із застосуванням мишачих мультитканинних назерн-блотингів (Clontech Labs, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, Каліфорнія). Вони включали 2мкг полі(A)⁺ РНК на смугу з різних тканин статевозрілої миші. Окремі блоти готували для аналізу диференційної експресії генів у *in vitro* та *in vivo* ситуаціях. Для одного набору блотів використовували РНК, виділену з головного мозку мишей, що піддавались обробці купризonom, на 3 тижні та 5 тижнів і на 1 тижні, 3 тижні та 6 тижнів під час процесу відновлення (до 6 тижнів). Для другого набору використовували РНК цільного головного мозку, яку відбирали у різні дні після народження. І, нарешті, з лінії клітин Oli-neu, яку культивували і впродовж різних періодів часу об-

робляли дибутирил-цАМФ, одержали хронологічну серію РНК. Цю РНК використали для одержання третього набору блотів. Нові блоти використовували з кожним ген-специфічним зондом для забезпечення максимальної ефективності виявлення та зведення до мінімального рівня змінності результатів унаслідок нерівномірного очищення мембрани після гібридизації. Усі блоти гібридизувались двічі, по-перше, із зондом проти необхідного гена і потім, після очищення, із зондом проти мишачого гліцеральдегід-3-фосфату (mGAPDH) для контролювання змінності вмісту РНК.

РНК (10мкг/лунку) вводили до 1,2% денатураційного агарозного гелю, що включав формальдегід та 5X MOPS (209,27г 3-(N-морфоліно)-пропансульфонові кислоти, 20,5г ацетату натрію, 50мл 0,5М розчину етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA) (рН 8,0) у 5л стерильної H₂O, до рН 7,0 із 12М розчином NaOH). Кожен зразок РНК змішували з 2мкл етидію броміду (0,01мг/мл), 2мкл

5× 3-(N-морфоліно)-пропансульфонової кислоти (MOPS), 3,5мл 37% розчину формальдегіду та 10мл формаміду. Після цього зразки нагрівали при температурі 65°C впродовж 10хв і швидко охолоджували на льоду. До кожного зразка безпосередньо перед нанесенням на гель додавали два мікролітри буфера для введення РНК (50% розчин гліцерину, 1мМ розчин EDTA, 0,4% розчин фарбника бромфенолового синього та 0,4% розчин ксилолціанолового барвника).

Кожну серію експериментів на гелі здійснювали впродовж ~3год у протоковому буфері їх MOPS (1л=330мл 37% розчину формальдегіду, 400мл 5× MOPS, 270мл H₂O, обробленої DEPC (діетилпірокарбонат)) при 5В см⁻¹ (товщина гелю). Після цього впродовж ночі здійснювали перенесення РНК на позитивно заряджену нейлонову мембрану (HybondTM-N, Amersham Life Sciences, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, England HP7 9NA) із застосуванням розчину SSC за описом (Terry Brown, Unit 4.9, Current Protocols, 1993 [редактори Ф.М. Осубел (F.M. Ausubel), Р. Брент (R.Brent), Р.Е. Кінгстон (R.E.Kingston), Д.Д. Мур (D.D.Moore), Дж.Г. Сайдман (J.G.Seidman), Дж.А. Сміт (J.A.Smith) та К. Струл (K.Struhl)]). Ефективність перенесення РНК визначали візуальною перевіркою мембрани та сплющеного гелю при УФ освітленні. РНК зшивались із мембраною за допомогою лінкера Stratilinker (Stratagene, USA). Блоти перед гібридизацією зберігали між листами фільтрувального паперу Whatman 3MM при кімнатній температурі.

Одержання зондів

Зонди з радіоактивною (³²P) міткою одержували з використанням очищених на гелі рестрикційних фрагментів клонів кДНК (довжиною ~500>800п.н.), що відповідали необхідним генам. Фрагменти ДНК довільно мітили ³²P-dCTP (дезоксидцитидин-5'-трифосфат) до питомої активності >10⁹ імпульс·хв⁻¹·мл⁻¹ за допомогою системи мічення HighPrimeTM (Roche Diagnostics AG, Industriestraße 7, 6343 Rotkreuz, Switzerland). Невключений ³²P-dCTP видаляли елюванням зондової суміші під власною вагою на колонці Pharmacia NAPTM-5, заповнений Sephadex[®] G-25 (розчин для роботи з ДНК у дистильованій воді з включенням Kathon[®] CG (хоріонічний гонадотропін)/ICP (білок інфікованої клітини) Biocide[®]).

Гібридизація та детектування сигналу

Гібридизацію зонда здійснювали за допомогою ExpressHybTM (Clontech Labs, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, Каліфорнія) за інструкціями виробника. Блоти після гібридизації експонувались на плівку HyperfilmTM MP (Amersham Pharmacia Biotech, England) при температурі -80°C у авторадіографічних касетах. Очищення мембрани від зонда після експозиції здійснювали шляхом інкубування блоту впродовж 10хв у суміші стерильної H₂O/0,5% розчину додецилсульфату натрію (SDS) при температурі 90-100°C із подальшим охолодженням блоту впродовж 10хв. Очищені мембрани герметизували пластиком і зберігали при температурі -20°C до виникнення потреби у повторному зондуванні.

Результати

Раніше назерн-блотинг використовували як другорядну методику підтвердження під час великомасштабних досліджень диференційної експресії генів (Чанг (Chang) та інші, 2000). Його чутливість та точність дозволяють аналізувати не лише тканиноспецифічність експресії даного необхідного гена, але і величину диференційної регуляції між експериментальними та контрольними умовами. Завдяки цьому назерн-блотинг стає надійним методом для підтвердження результатів DGE, одержаних шляхом аналізу мікропослідовностей. Крім того, назерн-блотинг забезпечує інформацію відносно розмірів транскрипту і можливих альтернативних сплайсингових ізоформ, що відповідають потрібному гену.

Традиційні назерн-блоти одержували з використанням РНК, виділеної з головного мозку мишей, що одержували купризон та контрольних мишей. Блоти зондували радіоактивно міченими фрагментами ДНК із клонів, надісланих нам фірмою Incyte Genomics. Здатність назерн-блотів до репродукування результатів, що спостерігаються у разі TaqMan[®] аналізу експресії генів, перевіряли за допомогою радіоактивно міченого зонда проти мишачого остеопонтину, гібридизованого з блотом РНК, виділених із головного мозку мишей, що піддавались обробці купризеном. Таким чином, з'явилась можливість порівняння результатів назерн-блотингу з результатами TaqMan[®] аналізу щодо експресії остеопонтину у купризонній моделі.

На Фіг.3 показана відкрита рамка зчитування для мишачого остеопонтину, вставлена до вектора pT7T3D-Pac у тому вигляді, у якому він був замовлений від фірми Incyte Genomics. Ділянка сірого кольору є кодувальною послідовністю, стрілка відображає повну кДНК для остеопонтину. Клонова вставка фланкувалась сайтами рестрикції EcoRI та NotI. З метою одержання зонда для використання у назерн-блотингу для аналізу тканинної експресії цього гена, фрагмент довжиною 893п.н. вирізували з клону за допомогою рестриктаз HincII та Styl. Цей фрагмент очищали у лунках із гелем та мітили для використання у ролі зонда.

Експресію мишачого остеопонтину підтверджували назерн-блотингом із використанням звичайного блоту, який одержували з РНК із головного мозку мишей кожної стадії купризонної моделі, з включенням відновлення та необроблюваних контрольних тварин. Згаданий блот спочатку зондували радіоактивно міченим фрагментом кДНК мишачого остеопонтину, очищеним після експозиції, після чого повторно зондували радіоактивно міченим фрагментом мишачого GAPDH. Він використовувався як позитивний контроль для пояснення різниць у рівнях експресії, що спостерігались, виходячи із змін у загальних кількостях РНК на кожній смузі блоту.

Експресія остеопонтину у головному мозку мишей, що піддавались обробці купризеном, досягала максимального рівня через 3 тижні та 5 тижнів згодовування купризону, з дещо вищим рівнем експресії через 5 тижнів. Впродовж стадії відновлення, рівні мРНК остеопонтину зменшувались відносно швидко, зі значним зниженням експресії через 1 тиждень після припинення згодовування купризону. Рівні мРНК остеопонтину повернулись

до приблизно нормальних рівнів після 6-тижневого відновлення. Це є якісно порівнянним із результатами, які одержали у разі TaqMan® аналізу експресії остеопонтину на купризоновій моделі (дивись Фіг.1A).

Приклад 4: Регуляція остеопонтину у клітинах лінії oli-neu

Експресію остеопонтину у олігодендроцитах (лінія oli-neu), що піддавались обробці цАМФ, визначали за допомогою TaqMan аналізу. Результати представлені на Фіг.4. Стовпчики 1-4 показують результати, одержані у олігодендроцитах. Порівняно з контролем (значення=1), наслідком обробки цАМФ впродовж 6 год (стовпчик 1) була активація мРНК остеопонтину. Після обробки цАМФ впродовж 2 днів (стовпчик 2) спостерігалась 12-кратна активація. Наслідком тривалої обробки впродовж 6-10 днів (стовпчики 3, 4) було зниження рівнів мРНК остеопонтину. Порівняння з регуляцією мРНК остеопонтину на купризоновій моделі (стовпчики 5, 6) показало, що активація остеопонтину після 3 та 5 тижнів обробки купризоном у передньому мозку було порівнянним з активацією у олігодендроцитів після 2 днів обробки цАМФ.

Приклад 5: Експресія остеопонтину у олігодендроцитах

Метод

Клітини лінії oli-neu тимчасово трансфікували за методом осадження фосфатом кальцію. Стисло, клітини лінії oli-neu експоненціальної фази росту висівали (10^5 /мл) на 6-лушковий планшет за день до здійснення трансфекції. Розчин 100мкл 250мМ CaCl_2 змішували з 5мкг плазмідної ДНК. До одержаного розчину Ca /ДНК додавали рівний об'єм (100мкл) розчину $2\times$ ГЕПЕС-буфера (140мМ розчин NaCl , 50мМ розчин ГЕПЕС-буфера, pH 7,05), доповненого фосфатом із 300мМ концентрованого розчину Na_2HPO_4 та NaH_2PO_4 при pH 7,05. Точно через 1хв згадану суміш обережно додавали до культурального планшета та інкубували впродовж 4 год при температурі 37°C у CO_2 -інкубаторі. Після завершення інкубування, живильне середовище замінювали на свіже, після чого клітини інкубували впродовж 24-72 год, збирали та піддавали аналізу вестерн-блотингом.

Результати

Клітини лінії oli-neu трансфікували різними генно-інженерними конструкціями мишачого остеопонтину у векторі pDEST12.2 (pDEST12.2-остеопонтин-EGFP, pDEST12.2-остеопонтин-His6, pDEST12.2-остеопонтин, дивись Фіг.4-7, та pCIE-EGFP, як контрольна плазміда). Білок продукувався та секретувався клітинами, що виявлялось специфічними комерційно досяжними антитілами (R&D Systems, AF808). EGFP-мічена генноінженерна конструкція полегшувала контролювання трансфекції і через 24 год після трансфекції виявлялась специфічна зміна клітинної морфології (збільшення олігодендроцитарних виростків), порівняно з контрольною плазмідною pCIEGFP (не показано), яка вказувала на те, що остеопонтин спонукає лінію клітин oli-neu мишачих олігодендроцитів у напрямку більш зрілого морфологічного фенотипу. Морфологія, представлена клітинами лінії oli-neu, трансфікованими остеопон-

тином, буде дуже подібною до морфології мієлінізуючого олігодендроциту.

Ці результати показують, що експресія остеопонтину у олігодендроцитах є благотворною для спонукання цих клітин у напрямку мієлінізації і, таким чином, вказують на благотворний ефект остеопонтину у разі захворювань, пов'язаних з дисфункцією олігодендроцитів.

Приклад 6: Експресія білка остеопонтину на специфічних ділянках головного мозку на купризоновій моделі

Імуногістохімічні дослідження остеопонтину здійснювали у різні часові точки впродовж де- та ремієлінізації на купризоновій моделі. Сильні сигнали були знайдені у демієлінізованому мозолистому тілі і пучках смугастого тіла через 5 тижнів обробки купризоном, тобто у часовій точці, пов'язаній із суттєвим рівнем рекрутмента мікроглії до ділянок демієлінізації. Для візуалізації активованих мікрогліальних клітин здійснили забарвлювання послідовних зрізів за допомогою CD68, і подібні картини експресії дозволяють припустити можливість експресії остеопонтину мікроглією.

Цікаво, що остеопонтин був знайдений також у клітинах, що вистилають передні шлуночки. Ця ділянка була описана, як зріла субвентрикулярна зона, яка несе поліпотентні стовбурові клітини для продукування нейронів, астроцитів та олігодендроцитів. Подвійне забарвлювання за допомогою NG2, PSA-NCAM, рецептора $\text{PDGF}\alpha$ буде здійснено для визначення клітин-попередників олігодендроцитів, що експресують остеопонтин.

Приклад 7: Ефекти білка остеопонтину на проліферацію олігодендроцитів

У цьому експерименті була використана лінія клітин первинних мишачих олігодендроцитів (олігодендрогліальні клітини), іморталізованих онкогеном t-neu (лінія клітин "oli-neu"). Процес одержання та властивості лінії клітин oli-neu, а також умови культивування описані у Юнг (Jung) та інших (1995).

Метою цього дослідження було визначення ефектів остеопонтину на проліферацію олігодендроцитів у аналізі проліферації лінії клітин oli-neu. Клітини висівали субконфлюентно. Перед обробкою контрольними або рекомбінантними білками клітини вирощували на мінімальному безінсуліновому живильному середовищі впродовж 24 год. Кількість клітин визначали шляхом забарвлювання барвником аламаровим синім (Alamar blue), який забезпечував зчитування флуоресценції. Обчислення потенціювання базувалося на порівнянні зі стандартною кривою IGF1 (контроль). Обчислення пригнічення проліферації базувались на порівнянні зі стандартною кривою dbцАМФ.

Матеріал

Обладнання і програмне забезпечення
Універсальний лічильник WallacVictor 2
(збудження при 530-560нм, емісія при 590нм)
Програмне забезпечення Graph Pad Prism
Реактиви

Лінія клітин oli-neu (Eur. J. Neuro., 7:125-1265 (1995))

Барвник Alamar blue (BioSourceIntl. Inc., Camarillo, CA93012)

Компоненти живильного середовища Сато:

Продукт	Постачальник	Концентрація	Мкл на 500мл
Модифіковане за способом Дульбекко живильне середовище Ігла (DMEM)	Seromed F0435	500мл	
Трансферті	Sigma T-2252	100мг/мл (1мг у 10мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS))	50
Селеніт натрію	Sigma S-9133	1мг/2,56мл PBS	50
Інсулін	Sigma I-1882	10мг/мл (100мг/10мл PBS)	500
Путресцин	Sigma P-7505	80,5мг/мл (PBS)	500
Прогестерон	Sigma P-0130	0,62мг/мл (EtOH)	50
Трийодотиронін (TIT)	Sigma T-5516	1,7мг/мл (1/3 HCl 1N+2/3 EtOH)	100
L-тироксин	Sigma T-0397	2,88мг/мл+1 крапля 1N розчину NaOH	100
L-глутамін	Gibco 25030-024	200mM	5000
Гентаміцин	Gibco 15750-037	50мг/мл	250
Бікарбонат натрію	Gibco 25080-052	7,50%	13000
Коняча сироватка			5000

Планшет із плоским дном BioCoat, сенсibiliзований полі-D-лізином (356461) від фірми Becton Dickinson); R3-IGF1 (I1146 від фірми Sigma); dbцАМФ (D-0627 від фірми Sigma).

Метод

Культивування клітин для біоаналізу in vitro

Лінію клітин oіi-пеи вирощували з прикріпленням до субстрату (полі-L-лізин). Клітини висівали на 96-лунковий планшет BioCoat™, сенсibiliзований полілізином. Клітини ділились 2-3 рази/тиждень. Для того, щоб розділили клітини, їх спочатку промивали PBS, після чого відокремлювали за допомогою PBS плюс 1мМ розчин етилендіамінтетрафтороцтової кислоти. Клітини вирощували у 10% CO₂-інкубаторі.

Середовищем для заморожування було живильне середовище Сато з 20% фетальної телячої сироватки (FCS) та 10% диметилсульфоксиду. У цьому експерименті використовували клітини лінії oіi-пеи не старіше 16 пасажу. Клітини використовувались із кінцевою концентрацією 4000 клітин на лунку на 96-лунковому планшеті після 24-годинного вирощування на живильному середовищі Сато без інсуліну.

Забарвлювання барвником аламаровий синій

Через 48год у CO₂-інкубаторі, до лунок додавали 10мкл концентрованого розчину барвника аламарового синього і інкубування додатково здійснювали впродовж 2,5год. Флуоресценцію контролювали при довжині хвилі збудження 530-560нм і при довжині хвилі емісії 590нм. Планшети могли зчитуватись до 4год і до 1 мільйона відносних одиниць флуоресценції.

Схема експерименту

Як контроль використовували R3-IGF-1 (100нг/мл, позитивний контроль), dbцАМФ (1мМ розчин, негативний контроль), живильне середовище без інсуліну або прокип'ячений остеопонтин (100нМ). Експериментальні зразки включали 1нМ, 10пМ, 0,1пМ, 0,01пМ або 100нМ рекомбінантного остеопонтину. Контролі та експериментальні зразки розбавляли до бажаних концентрацій з кінцевим об'ємом 50мкл у живильному середовищі Сато без інсуліну і додавали до лунок. Клітини лінії oіi-пеи вирощували на безінсуліновому живильному середовищі впродовж 24год, після чого оброб-

ляли контролю або експериментальними зразками впродовж 48год. Відокремлені клітини лінії oіi-пеи, які повторно вирощували впродовж 24год на живильному середовищі без інсуліну, збирали з колб для культивування за допомогою PBS плюс 1мМ розчин етилендіамінтетрафтороцтової кислоти. Клітини доводили до концентрації 300000 клітин на мл і додавали з розрахунку 50мкл на лунку. Після цього клітини інкубували впродовж 48год при температурі 37°C у CO₂-інкубаторі. Додавали 10мкл барвника аламарового синього, і клітини повертали до інкубатора на 2,5год. Після цього 70мкл із кожної лунки переносили на 96-лункові планшети чорного кольору і негайно визначали флуоресценцію.

Проліферацію недиференційованих клітин лінії oіi-пеи визначали через 24год, як реакцію на різні кількості остеопонтину, який продукувався з використанням клітин комах (VasOPN) або системи експресії ссавців (HEK-OPN). Швидкість росту визначали шляхом визначення клітинної метаболічної активності з флуориметричним/колориметричним індикатором росту, аламаровим синім. Цей агент включає окисно-відновний індикатор, який показує як флуоресценцію, так і зміни забарвлення у відповідь на хімічне відновлення живильного середовища унаслідок росту клітин. Згаданий агент і застосована процедура аналізу описані у [Ахмед (Ahmed) та інші (1994) та у патенті США №5,501,959].

Результати

Результати представлені на Фіг.8-10.

Дозозалежність спостерігалась із рекомбінантним остеопонтином, як експресованим бакуловірусом, так і експресованим клітинами HEK. Деградація білка кип'ятінням зруйнувала його біологічну активність, як і очікувалось. Наслідком додавання остеопонтину, експресованого бакуловірусом (VasOPN) і експресованого клітинами HEK (HEK OPN), виявилось дозозалежне посилення проліферації клітин (Фіг.8) з IC₅₀ для VasOPN 3,7нМ і 0,05нМ для HEKOPN (Фіг.9). На додаток до цього, у клітинах комах експресувалась генно-інженерна конструкція N-кінцевого остеопонтину, що відповідала амінокислотам 1-168 ізоформи остеопонтину (дивись Фіг.2, N-кінцевий остеопонтин-а). Очище-

ний білок перевіряли аналізом проліферації у порівнянні з непроцесованим білком. "Скорочений" білок був активним (10нМ, 100нМ), дивись Фіг.10.

Приклад 8: Ефекти остеопонтину на експресію мієлінізаційних маркерів у змішаних кортикальних культурах

Змішані кортикальні культури, що вирощувались на накривних стеклах, обробляли ВасOPN (100нМ) впродовж 12 днів із DIV (днів in vitro) 5-17. Через 17 днів in vitro культури фіксували і забарвлювали анти-MBP антитілом. Результати показали, що накривні скла з ВасOPN мали набагато більше розгалужених MBP-позитивних олігодендроцитів, ніж контролю (Фіг.11). На додаток до цього, у той час як у контрольних культурах (Фіг.11A) мієлінізуючі олігодендроцити не спостерігались, культури, оброблені OPN (Фіг.B, Фіг.C та Фіг.D) були багатими на олігодендроцити, які обгортали аксони і утворювали мієлінові сегменти та ділянки нервового волокна між сусідніми перехватами Ранв'є (Фіг.11B-D). Підрахунок сегментних кластерів показав, що у той час як у контролів сегментів не спостерігалось, три різні зразки, оброблені OPN, продемонстрували 16, 22 та 18 сегментних кластерів. Ці результати вказують на те, що наслідком обробки змішаних кортикальних клітин остеопонтином є диференційований фенотип олігодендроцитів, який є характерним для мієлінізуючих олігодендроцитів.

Приклад 9: Ефекти остеопонтину на експресію MBP у змішаних кортикальних культурах за результатами визначення за допомогою MBP ELISA

MBP ELISA використовували для контролювання збільшення об'єму білка MBP і, тим самим, мієлінізації змішаних кортикальних культур, які обробляли OPN та LIF.

Первинні культури

Джерелом матеріалу була тканина головного мозку мишачих зародків, які одержували від вагітних мишей-саміць лінії NMR1 через 16 днів після спарювання. Зародки розрізали за методикою Любецькі (Lubetzki) та інших, кору головного мозку відокремлювали шляхом розщеплення трипсином і 1 відокремлені клітини (у тому числі нейрони, астроцити, олігодендроцити, мікроглію та попередники нейронів) висівали з концентрацією 1×10^5 клітин на лунку на передсенсibiliзовані полі-L-лізином 96-лункові культуральні планшети (з початковим об'ємом 50мкл).

Обробка рекомбінантним білком

Обробку здійснювали із застосуванням рекомбінантних білків (позитивний контроль, мишачий рекомбінантний фактор пригнічення лейкозу (LIF), закуплений від фірми AMRAD Laboratories, при концентраціях 1мкг/мл, 100нг/мл та 10нг/мл; мишачий бакуловірус-продукований непроцесований остеопонтин при концентраціях 100нМ, 10нМ та 10пМ). Усі білки розбавляли у культуральному середовищі до відповідних концентрацій з концентрованого матеріалу перед доданням до клітин in vitro. Культури вирощували впродовж 5 днів in vitro, після чого обробляли впродовж 17 послідовних днів. Живильне середовище замінювали через кожні 3 дні.

Збирання зразків за методикою мікролункових планшетів

Клітини піддавали лізису і зразки збирали після 17 днів in vitro (DIV17). Лізис клітин здійснювали із застосуванням потрійного детергентного буфера.

Потрійний детергентний буфер

	Кінцева концентрація
50мл 0,1М розчину трис-буфера	50мМ
8,77г NaCl	150мМ
2мл розчину NaN ₃ (10%)	0,02%
5мл 20% розчину додецилсульфату натрію	0,1%
10мл NP40 (нафтилпіперазин)	1%
5г дезоксихолату натрію	0,5%

Перед використанням до 10мл розчину потрійного детергентного буфера додавали одну таблетку інгібітора протеази (Roche №1836170).

Живильне середовище видаляли із зразків змішаних кортикальних культур, які висівали на 96-лункові передсенсibiliзовані планшети. Клітини обережно двічі промивали 50мкл 1X PBS, після чого до кожної лунки додавали 50мкл потрійного детергентного буфера. Після цього усі мікролункові планшети, що містили лізовані зразки, зберігали при температурі -20°C до проведення аналізу.

Аналіз білка на основі бііинхонінової кислоти (BCA)

Аналіз білка на основі бііинхонінової кислоти (BCA) фірми Pierce являє собою детергент-сумісну композицію, основу якої становить бііинхонінова кислота (BCA), для колориметричного виявлення та кількісного визначення загального білка. Цей метод об'єднує добре відоме відновлення Cu^{+2} до Cu^{+1} білком у лужному середовищі з високочутливим та селективним колориметричним виявленням катіону одновалентної міді (Cu^{+1}) із застосуванням унікального реагенту, що включає бііинхонінову кислоту.

Пурпурово забарвлений реакційний продукт цього аналізу одержують завдяки утворенню хелатної сполуки між двома молекулами бііинхонінової кислоти та одним іоном одновалентної міді. Цей водорозчинний комплекс демонструє сильну оптичну густину при 562нм, яка є лінійною зі зростанням концентрацій білка у широкому робочому діапазоні від 20мкг/мл до 2000мкг/мл. Метод BCA не є дійсним методом визначення до кінцевої точки, оскільки кінцеве забарвлення продовжує розвиватись, однак, після інкубування, швидкість розвитку забарвлення уповільнюється у ступеню, достатньому для забезпечення одержання великої кількості зразків за один раз. Повідомляють, що відповідними за утворення забарвлення з BCA є макромолекулярна структура білка, кількість пептидних зв'язків та присутність чотирьох амінокислот (цистеїну, цистеїну, триптофану та тирозину).

Визначення вмісту загального білка за методикою мікролункових планшетів

25мкл кожного стандарту (концентрація BSA (сироватковий альбумін великої рогатої худоби): 2000мкг/мл, 1500мкг/мл, 1000мкг/мл, 750мкг/мл, 500мкг/мл, 250мкг/мл, 125мкг/мл, 25мкг/мл) та зра-

зків додавали до відповідних лунок мікролункового планшета. До контрольних лунок (робочий діапазон 20-2000мкг/мл) вносили 25мкл розчинника (потрійний детергентний буфер).

До кожної лунки додавали 200 мкл робочого реактиву (суміш 50 частин реактиву А ВСА з 1 частиною реактиву В ВСА). Після цього планшет струшували впродовж 30с і інкубували при температурі 37°C впродовж 30хв. Після інкубування значення оптичної густини визначали при 570nm.

Імуноферментний твердофазний сендвіч-аналіз MBP

96-лункові стерильні мікропланшети з плоским дном (Costar) інкубували впродовж ночі при температурі +4°C з анти-MBP антитілом (Chemicon, MAB5274), розбавленим 1:5000 у 1X PBS. До кожної лунки вносили 50мкл розбавленого розчину антитіла.

Наступного дня розчин антитіла видаляли з усіх лунок планшетів і за допомогою 50мкл 1% розчину BSA у 1X PBS здійснювали блокаду кожної лунки. Блокаду здійснювали впродовж 1год при температурі навколишнього середовища. Планшети тричі піддавали роботизованій промивці з подальшою блокадою із застосуванням суміші PBS/Твін.

Інкубування здійснювали після додання серійних розведень пептидного стандарту MBP або зразків у 1% суміші BSA/PBS до мікролункових планшетів. Концентрований розчин пептиду MBP (100нг/мл) розбавляли 2:2. Розведення, які використовували під час проведення цього експерименту, визначали після визначення вмісту загального білка за результатами аналізу білка на основі BCA. Вони були такими:

100мкг; 50мкг; 25мкг; 12,5мкг; 6,2мкг; 3,1мкг.

Після інкубування зі стандартом MBP та зразками білка, планшети знову тричі промивали у 1% суміші BSAPBS.

Друге інкубування здійснювали із застосуванням поліклонального анти-MBP антитіла (Zymed 10-0038, 1:300), розведеного у 1% суміші BSAPBS. Планшети інкубували впродовж 2год при температурі навколишнього середовища. Після цього інкубування, планшети знову промивали 3 рази, як вказувалось вище.

Інкубування з козячим анти-кролячим біотином (Vector BA-1000, 1:10000), доданим у 50мкл об'ємах до кожної лунки після розведення у 1% суміші BSA/PBS, здійснювали впродовж 1год при температурі навколишнього середовища. Планшети знову промивали після інкубування, як вказувалось вище.

Завершувальне інкубування здійснювали з 50мкл стрептавідин-кон'югованої пероксидази із хрому (strep-HRP) (Amersham RPN 1051, 1:8000), розведеної у їх PBS, яку додавали до кожної лунки. Планшети інкубували впродовж 1год при температурі навколишнього середовища.

Після етапу промивання реакцію проявляли за допомогою ортофенілендіаміну дигідрохлориду (OPD) (Sigma, розчин одержували шляхом додання 1 таблетки до 20мл об'єму води). Цю реакцію блокували доданням 3М розчину HCl або 30% розчину H₂SO₄. Оптичну густину визначали за допомогою багатоканального спектрофотометра для

прочитування планшетів (Labsystems Multiskan EX) при 492nm.

Результати

Як показано на Фіг.12, рівні білка MBP у культурах, які піддавались обробці VasOPN (10нМ) на DIV17, збільшились утричі, порівняно з контрольними культурами. Це спостереження підтримує попередні результати, що показують позитивний ефект бакуловірус-експресованого OPN на проліферацію та мієлінізацію попередників олігодендроцитів.

Приклад 10: Ефект остеопонтину на проліферацію CG4

Лінія клітин CG4 являє собою лінію пацючих іморталізованих олігодендроцитарних клітин, яка була спонтанно одержана з лінії A2B5 первинних попередників олігодендроцитів. Клітини CG4 є розповсюдженою лінією клітин для дослідження диференціації та виживаності олігодендроцитів. Лінія клітин CG4 має такі переваги:

- Висока швидкість проліферації, подібно до попередників олігодендроцитів (O2A-подібна) (GD3, A2B5-позитивні клітини);

- Низькі витрати на підтримання у кондиціонованому середовищі (з ефективними концентраціями фактора росту), який одержують із лінії нейробластомних клітин пацюка B104 (Луїс Дж.К. (Louis J.C.) та інші, 1992), одержаної з ATCC (Американська колекція типових культур);

- Для проліферації впродовж нетривалих періодів часу замість кондиціонованого живильного середовища B104 може використовуватись живильне середовище визначеного складу (без FBS) (доповнене FGF2+PDGF);

- Диференціація на олігодендроцити (O4, GA1C-позитивні) може запускатись живильним середовищем визначеного складу;

- Диференціація на астроцити (GFAP-позитивні) може запускатись у присутності FBS.

Пасаж номер 35 клітин CG4 було використано для перевірки ефекту двох білків OPN (експресованих E.coli або клітинами комах) на проліферацію. Для цього аналізу було використано остеопонтин, продукований R&D System E.coli (номер за каталогом 441-OP), який після цього фосфорилували in vitro із протеїнкіназою 2 (зливою з GST) у 60мкл об'ємі таким чином:

Кіназний буфер 6x: Буфер для зразка 2xрН 6
50мМ розчин гепес-Трис-Cl 0,125
буфера

10мМ розчин MgCl₂ 20% розчин гліцерину
1мМ розчин дитіот-0,2М розчин дитіотреїто-
реїтолу лу
0,2мМ розчин вана-0,02% розчин барвника
дату натрію бромфенолового синього
25мМ розчин бета-
гліцеролфосфату

Суміш АТФ (60мкМ)
30мкл АТФ при 600мкМ
5мкл ³²P АТФ
265мкл H₂O₂

Для започаткування реакції додавали суміш АТФ і інкубування здійснювали при температурі 30°C впродовж 1год. Після 90хв інкубування при

температурі 30°C (із перемішуванням) до реакційної суміші, яку перед цим промивали PBS із метою видалення протеїнкінази, додавали 100мкл глутатіонсефарози у формі кульок (Pharmacia). Після цього одержану реакційну суміш інкубували впродовж 1 год при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Суспензію центрифугували при 500g впродовж 5хв для осадження кульок. Після цього супернатант діалізували впродовж ночі при температурі 4°C проти PBS. Кількісне визначення білка здійснювали за допомогою BCA (Pierce).

Кіназна реакційна суміш:

10мкл казеїнкінази при 0,05мкг/мкл

10мкл E.coli OPN при 0,5мкг/мкл

20мкл 50мМ розчину трис-HCl, pH 8

10мкл кіназного буфера 6×

10мкл суміші АТФ

Аналіз проліферації

Вплив Вас OPN та *in vitro* фосфорилованих білків OPN на проліферацію клітин CG4 перевіряли при концентраціях 10пМ, 10нМ та 100нМ. Для зчитування застосовували бромуриндин (BrdU) (Amersham), як описано у Авеллана (Avellana) та інших (1996). Клітини культивували у 70% живильному середовищі визначеного складу N1 (модифіковане за способом Дюльбекко живильне середовище Ігла (DMEM), що містить глюкозу (4,5г/л), 2мМ розчин глутаміну, 100Од/мл пеніциліну, 100мкг/мл стрептоміцину та 1мМ розчин пірвату натрію, і доповнене 5мкг/мл трансферину, 100мМ розчином путресцину, 30нМ розчину селеніту натрію та 10нг/мл біотину) та 30% кондиціонованому живильному середовищі B104 (N1 без біотину) (ЛуїсДж.К. (Louis J.C.) та інші, 1992). Аналіз здійснювали на 24-лунковому планшеті, обробленому поліорнітином (100мкг/мл), який засівали 3×10^4 клітинами/лунку. Одночасно додавали 10нМ розчин BrdU і клітини інкубували впродовж 18год. Після фіксування здійснювали імуноцитохімічні дослідження з анти-BrdU антитілом для виявлення поділу клітин. Клітини також забарвлювали барвником Hoechst 44432 (Sigma) для забезпечення можливості підрахунку загальної кількості клітин. Зображення одержували і аналізували за допомогою системи для аналізу зображень Leica Qwin Image Analysis System.

Результати

Результати відображені на Фіг.13.

Бакуловірус-експресований остеопонтин викликає підвищення проліферації клітин CG4. Найбільш виражений ефект може спостерігатись при концентрації остеопонтину 10нМ, хоча проліферація викликала і при 100нМ концентрації остеопонтину. Фосфорилований *in vitro* E.coli-експресований OPN викликав незначну проліферацію клітин CG4.

Порівняльний аналіз морфології клітин CG4, які піддавались обробці і не оброблялись остеопоном, показав, що у той час як у контрольних клітин диференціація не спостерігалась, клітини CG4, оброблені остеопоном, диференціювались таким чином, що у більшості клітин розвивались відростки. Хоча диференціація була більш вираженою у разі застосування бакуловірус-експресованого остеопонтину, фосфорилований *in*

vitro E.coli-експресований OPN також викликав диференціацію клітин CG4 (не показано).

Приклад 11: Ефект остеопонтину на MOG-індукований експериментальний автоімунний енцефаломієліт (ЕАЕ) у мишей

Ціль дослідження

Остеопонтин (OPN; AS900011) являє собою цитокін із плейотропними функціями, у тому числі при адгезії, міграції, диференціації, виживаності та секретуванні цитокіну клітинами різних типів. OPN був ідентифікований при диференційній експресії генів (DGE) для виявлення тих генів, які можуть регулювати ремієлінізацію та функцію олігодендроцитів (дивись Приклад 1). Обробка попередників олігодендроцитів рекомбінантним бакуловірус-експресованим остеопоном (AS900011) підвищувала проліферацію дозозалежним чином (IC₅₀: 3,7пМ, дивись приклад 7). На додаток до цього, AS900011 продемонстрував вплив на диференціацію клітин лінії CG4 та первинних нейросфер (дивись приклад 8). OPN експресується у демієлінізованому мозолистому тілі головного мозку мишей, які одержували купризон, причому експресія була найсильнішою у мікрогліальних клітинах (дивись приклад 1). На додаток до цього, експресія OPN спостерігалась у субвентрикулярній зоні (SVZ), яка, за припущеннями, продукує попередників олігодендроцитів, які приймають участь у ремієлінізації (дивись приклад 4). Висувають гіпотезу, суть якої полягає у тому, що OPN, цитокін із різноманітними імунно-регуляторними властивостями, може також відігравати роль модулятора нейронної та гліальної функції.

Ціль цього дослідження полягала у перевірці терапевтичного ефекту OPN на моделі MOG-індукованого ЕАЕ у мишей.

Експериментальний метод

Метод індукування ЕАЕ, який використовували у цьому дослідженні, було адаптовано з протоколу, опублікованого Сарбахером (Sahrbacher) та іншими (1998). Захист тварин, які використовувались у цьому експерименті, відповідає вимогам Директиви 86/609/ЄЕС, примусове виконання якої забезпечується італійською директивою №116 від 27 січня 1992 року. Фізичні засоби та обладнання для розміщення та здійснення догляду за тваринами відповідають вимогам Директиви Ради ЄЕС 86/609. Інститут повністю уповноважений компетентними органами ветеринарного нагляду. Усі частини цього протоколу відносно догляду за тваринами були ухвалені державною ветеринарною службою. Цей протокол є санкціонованим італійським Міністерством охорони здоров'я (Декрет №51/99-В).

Тест-система

Вид, порода, лінія та стать:

Миші-самці лінії C57 BL/6JICO з колонії IFFA CREDO (Saint Germain sur l'Arbresle, France) були поставлені фірмою Charles River Italia (Calco, Lecco, Italy).

Обґрунтування вибору тест-системи:

Мишей лінії C57 BL/6JICO вибрали як експериментальну модель; задокументована сприйнятливість вибраної породи до ЕАЕ.

Постачальник:

фірма Charles River Italia S.p.A.

Via Indipendenza, 11

23885-Calco (Lecco)

Акліматизація:

Розпочалась щонайменш за 5 днів до експерименту. Впродовж цього періоду часу за тваринами вели щоденне спостереження для перевірки їхньої придатності для проведення дослідження.

Вік та маса тіла (при довільному розподілі):

Вік приблизно 8 тижнів; 18-22г

Розміщення:

10 тварин на клітку у кондиціонованих приміщеннях.

Температура: 22±2°C

Відносна вологість: 55%±10%

Повітрообмін: приблизно 15-20/год із фільтруванням через HEPA (високоєфективний сухий фільтр для повітря) 99,99%

Освітлення: 12-годинний цикл (7 година ранку-7 година вечору)

Клітка: клітка Makrolon®, 42,4×26,6×15, кожна споряджена решітчастою годівницею з нержавіючої сталі. Дно клітки покрите решіткою. Відходи, що падають через решітку на дно клітки, періодично видаляються.

Ідентифікація тварин:

Вушна бирка. У карті на клітку наведено номер експерименту, доза для групи та дата введення сполуки.

Раціон:

Гранульований сертифікований корм GLP 4RF25, який виробляється фірмою Mucedola S.r.l., Settimo Milanese за ліцензією фірми Charles River Italia. Для полегшення годування хворих тварин із 7 дня вологі гранули кожного дня вкладаються на дно кліток. Виробник надає сертифікат аналізу поживних речовин та забруднювачів, рівні яких знаходяться у межах, запропонованих EPA-TSCA (44FR:44053-44093, 26 липня 1979 року). Лабораторія інституту піддає корм тварин щонайменш двічі на рік повторній перевірці на бактеріальне забруднення. Корм є доступним для тварин "ad libitum".

Вода:

З міського водопроводу. Вода фільтрується і розподіляється тваринам "ad libitum" за допомогою автоматичної клапанної системи. Разом з автоматизованою системою водопостачання використовуються пластикові пляшки. Питна вода періодично аналізується на мікробіологічне забруднення, вміст важких металів, інші забруднювачі (наприклад, розчинники, пестициди) та інші хімічні та фізичні характеристики. Межі прийнятності якості питної води визначені у директиві ЄЕС 80/778.

У кормі або питній воді відсутні забруднювачі, які можуть перешкодити досягненню цілей цього дослідження.

Експериментальні речовини:

Мишачий, 6His-мічений остеопонтин (AS900011) та mIFNβ

Процедура імунізації:

Мишей імунізували (день=0) шляхом підшкірної ін'єкції до лівого боку 0,2мл емульсії, що складається з 200мкг пептиду MOG₃₅₋₅₅ (Neosystem, Strasbourg, France) у повному ад'юванті Фрейнда (CFA, Difco, Detroit, U.S.A.), що включає 0,5мг Mycobacterium tuberculosis. Негайно після цього

тварини одержали внутрішньоочеревинну ін'єкцію 500нг коклюшного токсину (List Biological Lab., Campbell, CA, U.S.A), розчиненого у 400мкл буфера (0,5М розчин NaCl, 0,017% Тритону X-100, 0,015М розчин трис-буфера, pH=7,5). На день 2 тварини одержали другу внутрішньоочеревинну ін'єкцію 500нг коклюшного токсину. На день 7 мишей одержали другу 200мкг дозу пептиду MOG₃₅₋₅₅ у CFA, введену підшкірно до правого боку. Унаслідок цієї процедури, приблизно з дня 8-10, у тварин з'явився поступово прогресуючий параліч, починаючи від хвоста і підіймаючись до передніх кінцівок.

Схема дослідження:

Дослідження проводили на 7 групах, кожна з яких включала 15 тварин. Усі групи імунізували пептидом MOG₃₅₋₅₅ у CFA та коклюшним токсином у відповідності до протоколу імунізації і лікували таким чином:

Група 1: позитивна контрольна група, якій вводили лише носій OPN (PBS+0,1% BSA) підшкірно.

Група 2. позитивна контрольна група, якій вводили лише носій mIFNβ (PBS) підшкірно.

Група 3: підшкірно вводили остеопонтин (AS900011) у дозі 1мкг/кг.

Група 4: підшкірно вводили остеопонтин (AS900011) у дозі 10мкг/кг.

Група 5: підшкірно вводили остеопонтин (AS900011) у дозі 100мкг/кг.

Група 6: підшкірно вводили остеопонтин (AS900011) у дозі 100мкг/кг плюс mIFNβ підшкірно у дозі 20000Од/мишу.

Група 7: підшкірно вводили mIFNβ у дозі 20000Од/мишу.

Кількість тварин на групу є мінімальною кількістю, яка забезпечує точну оцінку фармакологічних ефектів, що спостерігаються.

Носій:

PBS плюс 0,1% BSA будуть використовуватись для розведення остеопонтину до відповідної концентрації. PBS буде використовуватись для розведення mIFNβ до відповідної концентрації.

Шлях введення:

Остеопонтин (AS900011) у дозі 1, 10 та 100мкг/кг вводили підшкірно у об'ємі 10мл/кг. mIFNβ у дозі 20000Од/мишу буде вводиться підшкірно у об'ємі 200мкл/мишу. Групі 1 буде вводиться підшкірно з PBS плюс 0,1% BSA у об'ємі 10мл/кг і групі 2 буде вводиться підшкірно з PBS у об'ємі 200мкл/мишу.

Тривалість обробки:

Обробку кожної тварини груп у цьому дослідженні розпочинали у разі одержання клінічної оцінки у балах ≥1; обробка буде здійснюватись впродовж 35 послідовних днів.

Форма введення:

Згадана сполука та mIFNβ вводились у вигляді розчинів у відповідному носії. Відповідні композиції будуть виготовлятися за інструкцією спонсора.

Клінічні спостереження:

Розпочинаючи з постімунізаційного дня 7 усі тварини обстежувались індивідуально на присутність ознак паралічу із клінічною оцінкою у балах:

0 = ознак захворювання немає

0,5 = частковий параліч хвоста

1 = параліч хвоста

1,5 = параліч хвоста + частковий однобічний параліч задніх кінцівок

2 = параліч хвоста + слабкість задніх кінцівок або частковий параліч задніх кінцівок

2,5 = параліч хвоста + частковий параліч задніх кінцівок (опущений таз)

3 = параліч хвоста + повний параліч задніх кінцівок

3,5 = параліч хвоста + повний параліч задніх кінцівок + нетримання

4 = параліч хвоста + параліч задніх кінцівок + слабкість або частковий параліч передніх кінцівок

5 = вмираюча або мертва тварина

Спостереження за тваринами здійснювали у тихій кімнаті. Клінічні ознаки контролювались щоденно у кожній групі всліпу зоотехніком, який не знав про лікувальні заходи.

Маса тіла тварин перевірялась щоденно.

Тварини, які знаходились у стані больового шоку або вмираючі, оглядалися штатним ветеринарним лікарем або уповноваженим персоналом і, у разі необхідності, гуманно умертвлялись для зведення до мінімуму непотрібного болю або страждань.

Відбирання зразків крові:

Через двадцять чотири години після останньої обробки від кожної тварини будуть відбиратись зразки крові (з анестезуванням пентобарбіталом). Сироватка буде відокремлюватись традиційними способами, і зразки сироватки будуть зберігатись при температурі -20°C. Заморожені зразки сироватки будуть у подальшому спрямовуватись до лабораторії для відповідного визначення концентрації сполуки у сироватці.

Гістопатологічні дослідження:

Після закінчення обробки тварини (з анестезуванням пентобарбіталом) будуть фіксуватись шляхом перфузії 4% розчином формальдегіду через лівий шлуночок. Потім їхній спинний мозок буде обережно відокремлюватись і фіксуватись у формаліні. Зрізи спинного мозку будуть заливатись парафіном. Будуть виготовлені зрізи з подальшим забарвлюванням гематоксиліном-еозином для виявлення запалення та барвником Kluever-PAS (барвник Luxol fast blue плюс періодна кислота та шифова основа) для виявлення демієлінізації.

Оцінка даних:

Результати клінічних досліджень виражають у вигляді середнього балу (\pm середня квадратична помилка середнього) для кожної групи. Ефекти експериментальних речовин будуть порівнюватись з ефектами у позитивній контрольній групі, яка піддавалась обробці носієм. Різниця клінічних оцінок у балах серед груп будуть аналізуватись за критерієм Крускала-Уолліса (Kruskal-Wallis) і, у разі виявлення статистичної значущості, за парним критерієм Уїлкоксона (Wilcoxon) для кожного часового моменту визначення. Дані щодо маси тіла будуть піддаватись однофакторному дисперсійному аналізу з подальшим аналізом, у разі виявлення статистичної значущості, за критерієм Такі (Tukey). Буде застосовуватись програма S-Plus®.

Результати:

Результати цього дослідження показані на Фіг.14-16.

Гістологічний аналіз периваскулярних запальних інфільтратів показав існування тенденції до зниження кількості периваскулярних інфільтратів у тварин, які піддавались обробці OPN, зокрема, при мінімальній введеній кількості, що дорівнювала 1мкг/кг. Комбінація OPN та IFN β , що є сполукою з відомою активністю при лікуванні розсіяного склерозу, була більш ефективною, аніж окреме введення OPN та IFN, відповідно (Фіг.14).

Далі, визначали відсоток демієлінізованої площини (Фіг.15). Знову таки, у тварин, що піддавались обробці OPN, спостерігалась тенденція до меншої площини демієлінізації. Наслідком введення комбінації IFN та OPN було високоефективне зменшення демієлінізації, яка була навіть набагато нижчою, аніж рівень демієлінізації, що спостерігалось у разі застосування лише IFN (Фіг.15).

На Фіг.16 узагальнюються клінічні оцінки у балах, що спостерігались на кінець обробки; під час проведення цього дослідження визначали запальні інфільтрати та демієлінізацію. Хоча клінічні оцінки у балах, що спостерігались у мишей, підданих обробці OPN, були незначно нижчими за оцінки у контрольних тварин, наслідком застосування комбінації OPN та IFN був явно виражений ефект на клінічні оцінки у балах, який був таким саме низьким, що і у разі позитивного контролю, інтерферону бета. Це спостереження узгоджується з визначенням запальних інфільтратів та ступенем демієлінізації. Обидва параметри значно знизились після введення OPN та IFNP (Фіг.16).

Взагалі, при проведенні цього дослідження одержали такі результати:

Остеопонтин (AS900011), який випробувався окремо у дозах 1мг/кг, 10мг/кг та 100мг/кг підшкірно, не знижував периваскулярних інфільтратів та демієлінізації зі статистичною значущістю. Обробка mIFN β (20000Од/мишу підшкірно) викликала зниження периваскулярних інфільтратів (55%) та демієлінізації (53%). У разі, коли mIFN β у тій самій дозі об'єднували з AS900011 у дозі 100мг/кг підшкірно, спостерігалось значуще і явно виражене зменшення запальних інфільтратів (71%) та демієлінізації (81%).

Гістологічні дані корелюють із клінічними оцінками у балах, що спостерігались на день 35 (кінець обробки), коли тварин умертвляли, і спинний мозок збирали для проведення гістологічного аналізу. Остеопонтин (AS900011), що випробувався окремо у дозах 1мг/кг, 10мг/кг та 100мг/кг підшкірно, незначно послаблював тяжкість захворювання. Обробка mIFN β (20000Од/мишу підшкірно) значно послаблювала тяжкість захворювання. У разі, коли mIFN β у тій самій дозі об'єднували з AS900011 у дозі 100мг/кг підшкірно, спостерігалось статистично значуще зменшення клінічних симптомів.

Ці дані дозволяють зробити припущення про те, що комбіноване лікування остеопонтином та mIFN β є ефективним щодо зниження як клінічних, так і патологічних ефектів на мишачій моделі EAE і може бути, таким чином, ефективним лікуванням розсіяного склерозу.

Приклад 12: Захисний ефект остеопонтину у разі невропатії, індукованої роздроблення сідничного нерва

Скорочення

CMAP: м'язовий потенціал дії сполуки

EMG: електроміографія

IGF-1: інсуліноподібний фактор росту

SC: підшкірний

s.e.m.: середня квадратична помилка середнього

vs: у зіставленні з

Вступ

Невропатії є, як правило, селективними щодо типу ураженого нейрону периферичної нервової системи (наприклад, сенсорний у зіставленні з автономним), а також щодо підтипу нейронів (малі у зіставленні з великими). Аксотомія периферичних нервів є найпоширенішою тваринною моделлю для визначення нейрозахисних ефектів нейротропних факторів. Травматичне пошкодження нервів, ураження сплетення та ураження корінців є серйозним ускладненням нещасних випадків. Крім того, тиск на периферичний нерв, який може викликати пошкодження мієліну, часто спостерігається при розладах, наприклад, при синдромі каналу зап'ястя або асоціюється з ортопедичними ускладненнями спинного мозку. Аксотомія викликає такі явища, наприклад, як загибель клітин, зниження швидкості провідності аксонами нервових імпульсів та змінені рівні нейротрансмітерів у пошкоджених нейронах. Травми, що супроводжуються роздробленням нервів, надають можливість регенерації, додаткового процесу, що становить інтерес, відносно невропатичних станів (Макмагон С (McMahon S.), Прістлі Дж.В. (Priestley J.V.), 1995).

Фундаментальним питанням клітинної нейробіології є регуляція регенерації нервів після травми або захворювання. Функціональна регенерація нервів потребує не тільки розростання та подовження аксонів, але також і нового синтезу мієліну. Ремієлінізація є необхідною для відновлення нормальної провідності нервових імпульсів та для захисту аксонів від нових нейродегенеративних імунологічних нападів. Головною метою дослідження у галузі нейродегенеративних захворювань є, у кінцевому рахунку, розробка втручань, які будуть запобігати загибелі нейронів, підтримувати фенотип нейронів та забезпечувати відновлення пошкодження нейронів та мієліну. Багато досліджень було присвячено з'ясуванню молекулярних та клітинних механізмів, що несуть відповідальність за повну регенерацію аксотомованих рухових нейронів спинного мозку (Фосетт (Fawcett) та інші, 1990; Фунакоші (Funakoshi) та інші, 1993). Індукована травмою експресія нейротропних факторів та відповідних рецепторів може відіграти важливу роль у здатності до регенерації нервів. Попередні дослідження показали значне поліпшення регенерації нервів за допомогою пептидів та непептидних сполук, наприклад, інсуліноподібного фактора росту (IGF-1) АКТН (адренокортикотропного гормону) (Льюїс (Lewis) та інші, 1993; Стренд (Strand) та інші, 1980), тестостерону (Джоне (Jones), 1993), SR57746A (Фурньє (Fournier) та інші, 1993) та 4-

метилкатехолу (Кечі К. (Kechi K.) та інші, 1993, 1995; Ханаока Й. (Hanaoka Y.) та інші, 1992).

Ці дослідження було здійснено з метою визначення регенерації нервів у мишей, яким вводили остеопонтин у різних дозах. На цій моделі позитивним впливом OPN на виживаність та регенерацію нейронів та аксонів (сенсорних та рухових нейронів), на мієлінізацію та макрофагальне запалення, могло б бути відновлення рухової функції. Ступінь регенерації може визначатись за ступенем відновлення сенсорно-рухових функцій та за допомогою морфологічних досліджень. Таким чином, у цій роботі паралельно здійснювали електрофізіологічну реєстрацію та гістоморфометричний аналіз.

Матеріали та методи

Тварини

У цьому експерименті використали вісімдесять чотири миші-саміці лінії C57b1/6 RJ віком 8 тижнів (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Тварини були поділені на 7 груп (n=12): (а) група, якій вводили носій і здійснювали симульовану операцію; (b) група, якій вводили носій і здійснювали операцію з роздробленням нерва; (c) роздроблення нерва/остеопонтин (1мкг/кг); (d) роздроблення нерва/остеопонтин (10мкг/кг); (e) роздроблення нерва/остеопонтин (100мкг/кг); (f) роздроблення нерва/4-метилкатехол (10мкг/кг); (g) роздроблення нерва/денатурований остеопонтин (100мкг/кг).

Тварин утримували групами (5 тварин на клітку) у інкубаторі з контрольованою температурою (21-22°C), циклом чергування світла та темряви (12год/12год) і доступністю їжі та води ad libitum. Усі експерименти здійснювались у відповідності до настанов лікувального закладу.

Ураження сідничного нерва

Тварин анестезували внутрішньоочеревинною ін'єкцією 60мг/кг кетаміну хлорідату (Imalgene 500®, Rhone Merieux, Lyon, France). Правий сідничний нерв оголювали хірургічним шляхом у середній частині стегна і роздроблювали на відстані 5мм проксимально до точки розростання сідничного нерва. Нерв роздроблювали двічі впродовж 30с кровоспинним затискачем (ширина 1,5мм; Koenig; Strasbourg; France) з обертанням на 90° після кожного роздроблення.

Планування експериментів та фармакологічна обробка

Електроміографічні (EMG) випробування здійснювали один раз перед днем хірургічного втручання (базовий рівень) і кожного тижня впродовж 3 тижнів після операції.

День проведення хірургічної операції з роздробленням нерва позначається як день (D) 0. Впродовж 4 днів після роздроблення нерва жодних випробувань не робили.

Маса тіла та коефіцієнт виживаності реєструвались кожного дня.

З дня пошкодження нерва та до кінця дослідження остеопонтин та денатурований остеопонтин вводили щоденно підшкірним шляхом, у той час як щоденні ін'єкції 4-метилкатехолу робили внутрішньоочеревинно.

На четвертому тижні 4 тварини на групу умертвляли і видаляли сідничний нерв для проведення морфологічного аналізу.

Реєстрація електрофізіологічних показників

Реєстрацію електрофізіологічних показників здійснювали за допомогою електроміографа Neuromatic 2000M (EMG) (Dantec, Les Ulis, France). Мишей анестезували внутрішньоочеревинною ін'єкцією 100мг/кг кетаміну хлоридату (Imalgene 500®, Rhone Merieux, Lyon, France). Нормальну температуру тіла підтримували на рівні 30°C за допомогою нагрівальної лампи і контролювали за допомогою контактного термометра (Quick, Bioblock Scientific, Illkirch, France), розміщеного на хвості.

М'язовий потенціал дії сполуки (СМАР) вимірювали у м'язі *gastrocnemius* після одноразового стимулювання (тривалість 0,2мс) сідничного нерва з надмаксимальною інтенсивністю (12,8мА). Визначали амплітуду (мВ), латентність (мс) та тривалість (час, необхідний для циклу деполяризації та реполяризації) потенціалу дії. Амплітуда свідчить про кількість активних рухових одиниць, у той час як дистальна латентність опосередковано відбиває провідність рухового нерва та швидкість передачі нервово-м'язового збудження.

Морфометричний аналіз

Морфометричний аналіз здійснили через 3 тижні після роздроблення нерва. Для цього аналізу були використані чотири довільно відібрані з групи тварини. Вони були анестезовані внутрішньоочеревинною ін'єкцією 100мг/кг Imalgene 500®. Для гістологічних досліджень вирізували 5мм сегмент сідничного нерва. Тканину фіксували впродовж ночі 4% водним розчином глутаральдегіду (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, France) у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (pH=7,4) і витримували у 30% розчині цукрози при температурі +4°C до використання. Нерв фіксували у 2% розчині тетроксиду осмію (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, France) у забуференому фосфатом фізіологічному розчині впродовж 2год, зневоднювали у звичайних спиртових розчинах і заливали епоном (Epon). Після цього залили тканини витримували при температурі +70°C впродовж 3 днів для полімеризації. Мікротомом робили поперечні 1,5мм зрізи, забарвлювали їх 1% розчином барвника толюїдинового синього (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, France) впродовж 2хв, зневоднювали і заливали еукітом (Eukitt). Двадцять зрізів на зразок досліджували під оптичним мікроскопом (Nikon, Tokyo, Japan), а морфометричному аналізу піддавали 6 довільно вибраних зрізів зразка нерва із застосуванням напівавтоматизованої програми цифрового аналізу зображень (Biocom, France). Досліджували два поля на зріз. Обчислювали такі параметри: відсоток дегенерованих волокон (на поле) і загальну кількість волокон.

Аналіз даних

Загальний аналіз даних здійснювали шляхом однофакторного дисперсійного аналізу чи дисперсійного аналізу повторних вимірів та однобічного дисперсійного або із застосуванням непараметричних критеріїв (критерій Манна-Уїтні). У разі потреби, додатково вдавались до критерію Даннетта. Рівень статистичної значущості було встановлено на $p < 0,05$. Результати виражали у вигляді середнього+середня квадратична помилка середнього (s.e.m.).

Результати

Після процедури роздроблення нерва усі тварини вижили. Миші (роздроблення нерва/носії, №2) загинули на день 7 і 2 (група, якій вводили носії і здійснювали симульовану операцію, №3 та №6) на день 14 унаслідок анестезії під час реєстрації EMG показників.

Маса тіла тварин

Як показано на Фіг.17, впродовж дослідження спостерігалась значна міжгрупова різниця у зміні маси тіла [$F(6, 132)=1,93$ та $p < 0,001$; повторні визначення піддавались дисперсійному аналізу].

В усіх групах впродовж дослідження спостерігалось збільшення маси тіла.

Електрофізіологічні виміри

Амплітуда м'язового потенціалу дії сполуки (Фіг.18):

Впродовж дослідження спостерігалась значна міжгрупова різниця амплітуди СМАР [$F(6, 18)=49,185$ та $p < 0,001$; повторні визначення піддавались дисперсійному аналізу] (Фіг.18).

Після пошкодження нерва усі тварини, що перенесли його роздроблення, демонстрували значне зниження амплітуди СМАР, порівняно з групою, що піддавалась симульованій операції ($p < 0,001$; критерій Даннетта).

Більше того, на D 7 та D 14 амплітуда СМАР у мишей, які одержували остеопонтин у дозі 100мг/кг або 4-метилкатехол у дозі 10мг/кг, була значно більшою, ніж у мишей групи, яка була піддана роздробленню нерва/введенню носія один ($p < 0,05$; критерій Даннетта).

Між групою, яку було піддано роздробленню нерва/введенню носія та групою, яку було піддано роздробленню нерва/введенню D-остеопонтину у дозі 100мг/кг, статистично значущої різниці зареєстровано не було.

Латентність м'язового потенціалу дії сполуки (Фіг.19):

Як показано на Фіг.19, була встановлена значна міжгрупова різниця у латентності СМАР [$F(6, 18)=2,521$ та $p < 0,001$; повторні визначення піддавались дисперсійному аналізу]. На D 21 групи, що були піддані роздробленню нерва, демонстрували підвищену латентність СМАР, порівняно з групою, що піддавалась симульованій операції ($p < 0,001$; критерій Даннетта). Більше того, введення остеопонтину у дозі 10мг/кг та 100мг/кг продемонструвало значний ефект; латентність цих груп була значно меншою, ніж латентність у групі, що була піддана роздробленню нерва/введенню носія один ($p = 0,017$; критерій Даннетта).

Між групою, яку було піддано роздробленню нерва/введенню носія та групою, яку було піддано роздробленню нерва/введенню D-остеопонтину у дозі 100мг/кг, статистично значущої різниці зареєстровано не було.

Тривалість м'язового потенціалу дії сполуки (Фіг.20):

Впродовж дослідження спостерігалась значна міжгрупова різниця тривалості СМАР [$F(6, 18)=25,15$ та $p < 0,001$; повторні визначення піддавались дисперсійному аналізу] (Фіг.20).

Розпочинаючи з D 7 у групах, які були піддані роздробленню нерва, спостерігалось значне збільшення тривалості СМАР (група, якій здійснюва-

ли симульовану операцію, у зіставленні з групами, які були піддані роздробленню нерва: $p < 0,001$; критерій Даннетта). Більше того, на D 7, група, яка піддавалась роздробленню нерва/введенню остеопонтину у дозі 100мкг/кг, демонструвала значно коротшу тривалість, аніж тривалість у групі, яка піддавалась роздробленню нерва/введенню носія ($p < 0,001$; критерій Даннетта).

На D 14 та D 21 три групи демонстрували значне зменшення тривалості, порівняно з групою, яка піддавалась роздробленню нерва/введенню носія: (a) роздроблення нерва/остеопонтин (10мкг/кг); (b) роздроблення нерва/остеопонтин (100мкг/кг); (c) роздроблення нерва/4-метилкатехол (10мкг/кг).

Крім того, між групою, яку було піддано роздробленню нерва/введенню носія та групою, яку було піддано роздробленню нерва/введенню D-остеопонтину у дозі 100мкг/кг, статистично значущої різниці зареєстровано не було.

Морфометричний аналіз

Відсоток дегенерованих волокон (Фіг.21).

Статистичний аналіз виявив значну міжгрупову різницю відсотка дегенерованих волокон на поле ($p < 0,001$; однобічний дисперсійний аналіз) (Фіг.21). Усі групи, які піддавались роздробленню нерва, демонстрували значно збільшений відсоток дегенерованих волокон ($p < 0,001$; критерій Даннетта). Більше того, група, якій вводили D-остеопонтин (100мкг/кг), демонструвала підвищений відсоток дегенерованих волокон, порівняно з групою, якій вводили остеопонтин ($p < 0,001$; критерій Даннетта).

Загальна кількість волокон (Фіг.22):

Зрізи досліджували за допомогою оптичного мікроскопа; морфометричний аналіз здійснювали за допомогою програми Visiolab 2000 (Biocom, Paris, France). Аналізу піддавали п'ять зрізів на тварину, 2 поля на зріз. Комп'ютером реєструвались лише функціональні мієлінізовані волокна (усі дегенеровані волокна, тобто волокна з пошкодженою мієліновою оболонкою, не реєструвались).

Висновки

Модель із роздробленням нерва є дуже ефективною моделлю периферичної невропатії. Негайно після роздроблення нерва більшість волокон великого діаметра втрачається унаслідок механічного пошкодження, що викликає значне зменшення амплітуди СМАР. Латентність СМАР негайному ушкодженню не піддається, але через 21 день реєструється зростання унаслідок додаткової дегенерації волокон невеликого діаметра з причини вторинної, імуноопосередкованої дегенерації (макрофаги, гранулоцити). Тривалість СМАР зростає на день 7, досягає максимального рівня на день 14, і на день 21 повертається до рівнів, які є порівнянними з рівнями дня 7. Це пояснюється тим, що на 21 день розпочинається регенерація травм, що супроводжуються роздробленням. Процес регенерації є додатковим процесом, що становить інтерес, відносно невропатичних станів. Цей процес розростання/регенерації аксонів через три тижні спостерігався також у контрольній групі.

Остеопонтин продемонстрував захисний ефект на мишачій моделі роздроблення нерва. Сенсорно-рухові функції значною мірою віднови-

лись на 7 дні, 14 дні та 21 дні після травми дозозалежним чином і морфологічні дослідження, проведені через 21 день після роздроблення, показали значне зменшення відсотка дегенерованих волокон та зростання загальної кількості волокон. OPN є ефективним засобом, у той час як контрольні молекули, які були застосовані у цьому дослідженні, 4-метилкатехол та термоінактивованний дегенерований білок OPN, не продемонстрували жодного значного ефекту відносно функціональних або гістологічних параметрів. Цей позитивний вплив на функціональне та гістологічне відновлення може обумовлюватись ефектами OPN на:

- прямий захист волокон від вторинної імуноопосередкованої дегенерації;
- прискорену ремієлінізацію та захист аксонів;
- прискорену регенерацію/розростання пошкоджених аксонів;
- посилене видалення мієлінового дебрису макрофагами.

Посилання

1. Abramsky, O. and Ovadia, H. (1997) *Frontiers in Multiple Sclerosis, clinical research and therapy*. Martin Dunitz publisher, London.
2. Altschul S.R 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., and Raff, M.C. Axonal control of oligodendrocyte development. *Journal of Cell Biology* 147(6): 1123-8, 1999.
4. Barres, B.A., Schmid, R., Sendtner, M., and Raff, M.C. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118(1): 283-95, 1993.
5. Bjartmar, C., Yin, X., and Trapp, B.D. Axonal pathology in myelin disorders. *Journal of Neurocytology* 28: 383-395, 1999.
6. Breighton, B. and Hayden, M.R.: *S. Afr. Med. J.* 1981 Feb 21; 59(8): 250.
7. Dal Canto, M.C., Melvold, R.W., Kim, B.S., and 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.* 32(3): 215-29, 1995.
8. Derynk R. et al., *Nature* 285, 542-547, 1980.
9. Devereux J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 12, 387-395, 1984.
10. Dubois-Dalcq, M., Feigenbaum, V., and Aubourg, P. The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends in Neurosciences* 22(1): 4-12, 1999.
11. Dubois-Dalcq, M., and Murray, K. Why are growth factors important in oligodendrocyte physiology? *Pathol Biol (Paris)* 48(1): 80-6, 2000.
12. Fernández, P.A., Tang, D.G., Cheng, L., Prochiantz, A., Mudge, A.W., and Raff, M.C. Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron* 28(1): 81-90, 2000.
13. Franklin, R.J., and Hinks, G.L. Understanding CNS remyelination: clues from developmental and regeneration biology. *Journal of Neuroscience Research* 58(2): 207-13, 1999.
14. Grantham, Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974).

15. Grinspan, J.B., Reeves, M.F., Coulaloglou, M.J., Nathanson, D., and Pleasure, D. Re-entry into the cell cycle is required for bFGF-induced oligodendroglial dedifferentiation and survival. *Journal of Neuroscience Research* 46(4): 456-64, 1996.
16. Grinspan, J.B., Stern, J.L., Franceschini, B., and 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* 36(6): 672-80, 1993.
17. Hajihosseini, M., Tham, T.N., and Dubois-Dalcq, M. Origin of oligodendrocytes within the human spinal cord. *Journal of Neuroscience* 16(24): 7981-94, 1996.
18. Hartung, H.P., van der Meche, F.G., Pollard, J.D. (1998) Guillain-Barre syndrome, CIDP and other chronic immune-mediated neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.*, 11, 497-513
19. Hiremath, M.M., Saito, Y., Knapp, G.W., Ting, J.P., Suzuki, K., and Matsushima, G.K. Microglial/macrophage accumulation during Cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology* 92(1-2): 38-49, 1998.
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., Kramer, E., Grzenkowski, M., Tang, K., Blakemore, W.F., Aguzzi, A., Khazaie, K., Chlichlia, K., von Blankenfeld, G., Kettenmann, H., and 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* 7(6): 1245-65, 1995.
22. Kiefer et al. The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin. *Nucleic Acids Res.* 1989 Apr 25;17(8):3306.
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. (2000) Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *Journal of Cellular Biochemistry* 77(3): 487-98.
24. Kon S., Yokosaki Y., Maeda M., Segawa T., Horikoshi Y., Tsukagoshi H., Rashid M.M., Morimoto J., Inobe M., Shijubo N., Chambers A.F., Uede T. (2002) Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences. *Journal of Cellular Biochemistry* 84(2): 420-32.
25. Kunicki, T.J., Annis, D.S., and Felding-Habermann, B. Molecular determinants of arg-gly-asp ligand specificity for β 3 integrins. *Journal of Biological Chemistry* 272(7): 4103-7, 1997.
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.
27. Lipton, S.A., and Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl. J. Med.*, 330, 613-22.
28. Loius J.C., Magal E., Muir D., Manthorpe M., Varon S. (1992) 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* 31, 193-204.
29. Lubetzki, C., Demerens, C., Anglade, P., Villarroya, H., Frankfurter, A., Lee, M.Y., and Zalc, B. Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 6820-6824, 1993.
30. Marchionni, M.A., Cannella, B., Hoban, C., Gao, Y.L., Garcia-Arenas, R., Lawson, D., Happel, E., Noel, F., Tofilon, P., Gwynne, D., and Raine, C.S. Neuregulin in neuron/glia interactions in the central nervous system. GGF2 diminishes autoimmune demyelination, promotes oligodendrocyte progenitor expansion, and enhances remyelination. *Advances in Experimental and Medical Biology* 468: 283-95, 1999.
31. Mark et al. (Mark D.F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (18) 5662-5666, 1984).
32. Matthieu, J.M., Comte, V., Tosic, M., and Honegger, P. Myelin gene expression during demyelination and remyelination in aggregating brain cell cultures. *Journal of Neuroimmunology* 40(2-3): 231-4, 1992.
33. McDonald, J.W., Althomson, S.P., Hyrc, K.L., Choi, D.W., and Goldberg, M.P. (1998). Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat. Med.*, 4, 291-7.
34. Morell, P., Barrett, C.V., Mason, J.L., Toews, A.D., Hostettler, J.D., Knapp, G.W., and Matsushima, G.K. Gene expression in brain during Cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Molecular and Cellular Neurosciences* 12(4/5): 220-227, 1998.
35. Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., and Van Evercooren, A.B. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *European Journal of Neuroscience* 11(12): 4357-66, 1999.
36. Ng, W.P., Cartel, N., Roder, J., Roach, A., and Lozano, A. Human central nervous system myelin inhibits neurite outgrowth. *Brain Research* 720(1-2): 17-24, 1996.
37. Noseworthy, J.H. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399: A40-A47, 1999.
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., and Gutierrez, J.A. (1996). Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke*, 27, 1641-6.
40. Pearson W.R., *Methods in Enzymology*, 183, 63-99, 1990.
41. Pearson W.R. and Lipman D.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85, 2444-2448, 1988.
42. Petry, K.G., Boullerne, A.I., Pousset, F., Brochet, B., Caille, J.M., and Dousset, V. Experimental allergic encephalomyelitis animal models for analyzing features of multiple sclerosis. *Pathol. Biol. (Paris)* 48(1): 47-53, 2000.
43. Pohlau, D., Aktas, O., Epplen, C., Hartung, H.P., Hoffmann, V. and Prineas, H. (1998) Promoting remyelination as a future therapeutic principle in Multiple Sclerosis. *Nervenarzt*, 69, 841-850.
44. Prineas, J.W., Barnard, R.O., Kwon, E.E., Sharer, L.R., and Cho, E.S. Multiple sclerosis: remyelination

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

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. and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
57. Smith and Wateman. *J. Mol. Biol.*, 147, 195-197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482-489, 1981.
58. Storch, M.K., Piddlesden, S., Haltia, M., Iivanainen, M., Morgan, P., and Lassmann, H. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Annals of Neurology* 43(4): 465-71, 1998.
59. Trojaborg W. (1998) Acute and chronic neuropathies: new aspects of Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, an overview and an update. *Electroencephalogr Clin. Neurophysiol.*, 107, 303-316.
60. Trotter, J., Bitter-Suermann, D., and 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* 22(4): 369-83, 1989.
61. Wiechelman, K., Braun, R. and Fitzpatrick, J. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 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., and Biddison, W.E. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Annals of Neurology* 46(3): 425-8, 1999.

ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТІ

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

<120> Застосування остеопонтину для лікування та/або запобігання
неврологічних захворювань

<130> WO 473

<150> 01111296

<151> 2001-05-17

<160> 5

<170> PatentIn version 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

100 105 110

Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu

115 120 125

Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr Glu

130 135 140

Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly

145 150 155 160

95	85368	96
Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg		
165	170	175
Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His		
180	185	190
Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala		
195	200	205
Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser		
210	215	220
Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His		
225	230	235
Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu		
245	250	255
His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu		
260	265	270
Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp		
275	280	285
Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His		
290	295	300
Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn		
305	310	
<210> 2		
<211> 299		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		
Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala		
1	5	10
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 Leu Pro Ser Lys Ser Asn		
50	55	60
Glu Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp		

97	85368	98
65	70	75
80		
His Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val		
85	90	95
Asp Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp		
100	105	110
Glu Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr		
115	120	125
Glu Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg		
130	135	140
Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg		
145	150	155
160		
Arg Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser		
165	170	175
His Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val		
180	185	190
Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp		
195	200	205
Ser Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser		
210	215	220
His Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn		
225	230	235
240		
Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg		
245	250	255
Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val		
260	265	270
Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser		
275	280	285
His Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn		
290	295	

<210> 3

<211> 286

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

99	85368	100
Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala		
1	5	10
Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Asn Ala		
20	25	30
Val Ser Ser Glu Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser		
35	40	45
Lys Ser Asn Glu Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp		
50	55	60
Asp Asp Asp His Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser		
65	70	75
Asp Asp Val Asp Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His		
85	90	95
His Ser Asp Glu Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu		
100	105	110
Pro Ala Thr Glu Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr		
115	120	125
Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys		
130	135	140
Lys Phe Arg Arg Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp		
145	150	155
Ile Thr Ser His Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala		
165	170	175
Ile Pro Val Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg		
180	185	190
Gly Lys Asp Ser Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu		
195	200	205
Thr His Ser His Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp		
210	215	220
Glu Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys		
225	230	235
Val Ser Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met		
245	250	255
Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe		
260	265	270

101 85368 102
 Arg Ile Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn

275 280 285

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 4

agcctgcacc cagatcctat ag

22

<210> 5

<211> 21

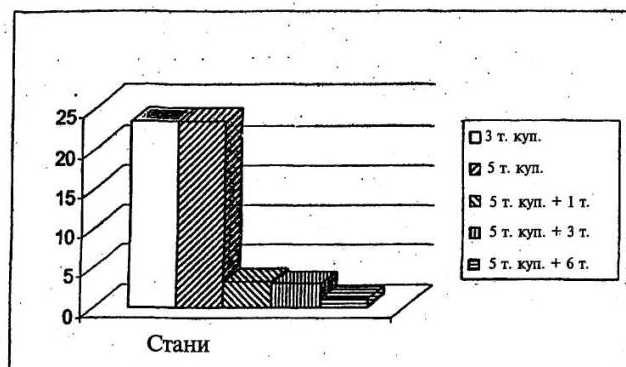
<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 5

gcgcaaggag attctgcttc t

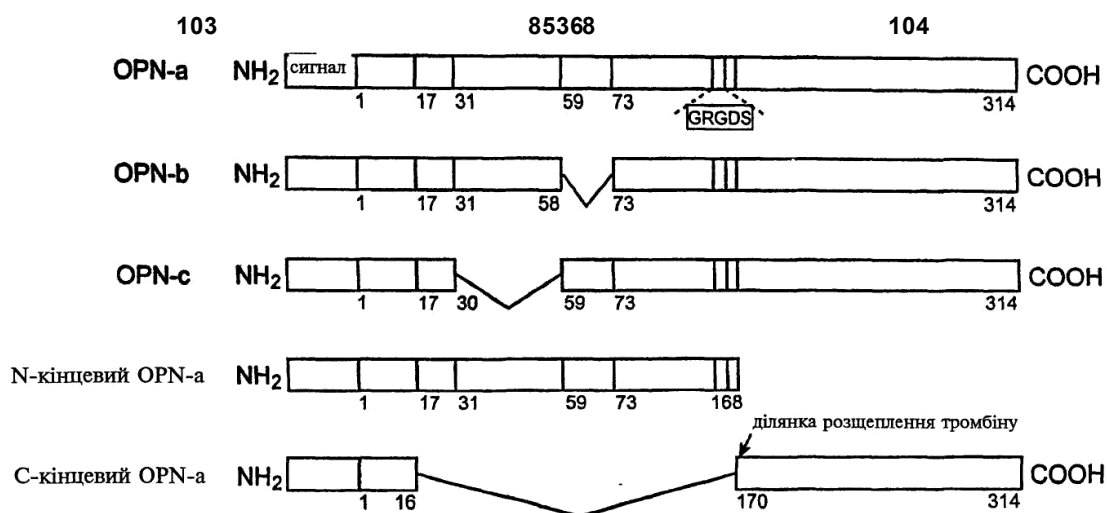
21



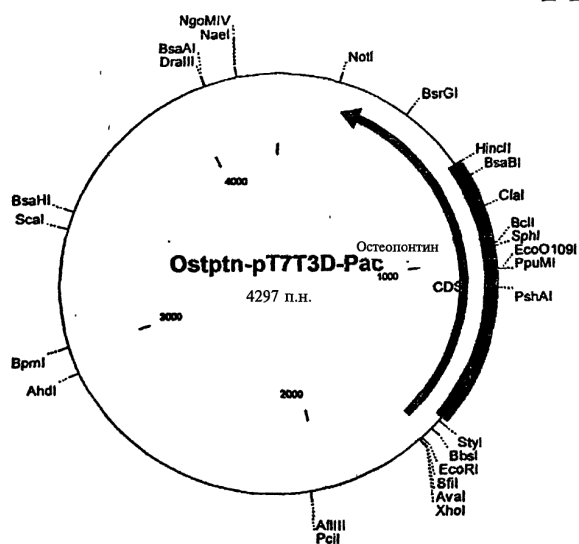
ФІГ. 1А

Мозочок, що розвивається	Остеопонтин	Білок МВР	Білок РЛР
C1	1	1	1
C2	2	2	2
C4	5	6	5
C5	9	6	4
C6	10	16	14
C8	9	?	?
C10	1	26	56
C12	1	32	111
C14	1	32	104
C20	2	26	137
CA	3	9	39

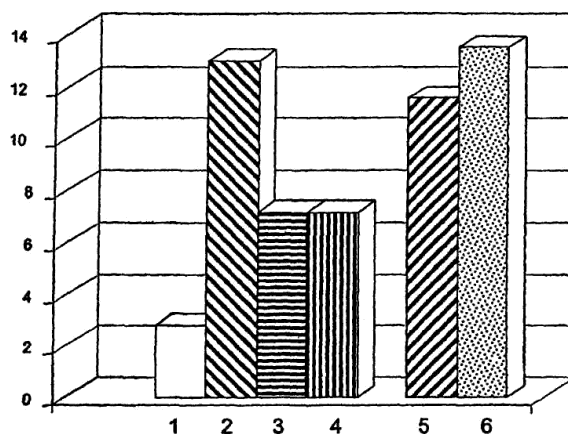
ФІГ. 1В



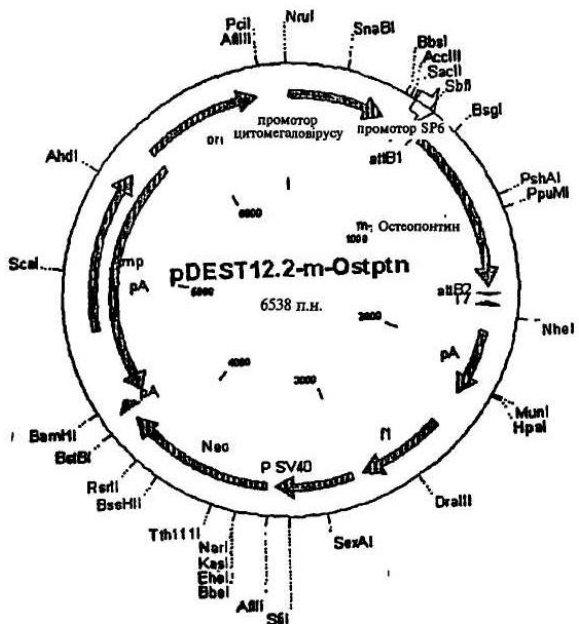
ФІГ. 2



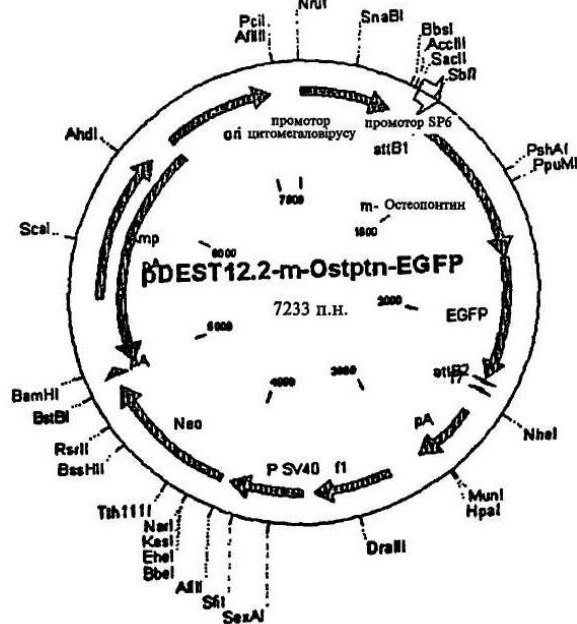
ФІГ. 3



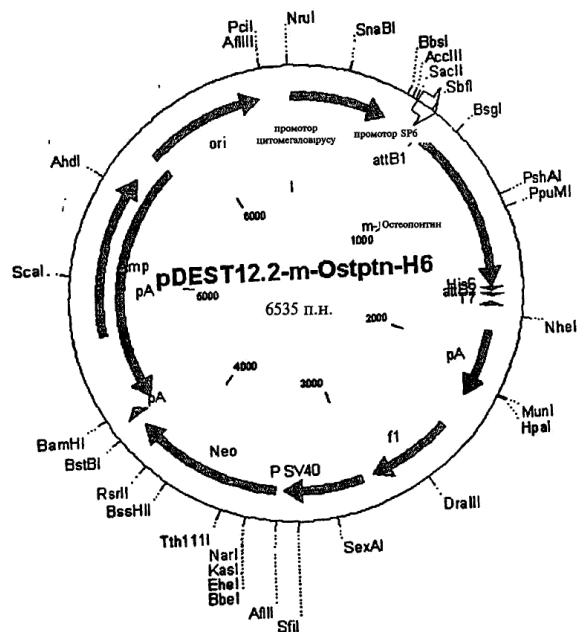
ФІГ. 4



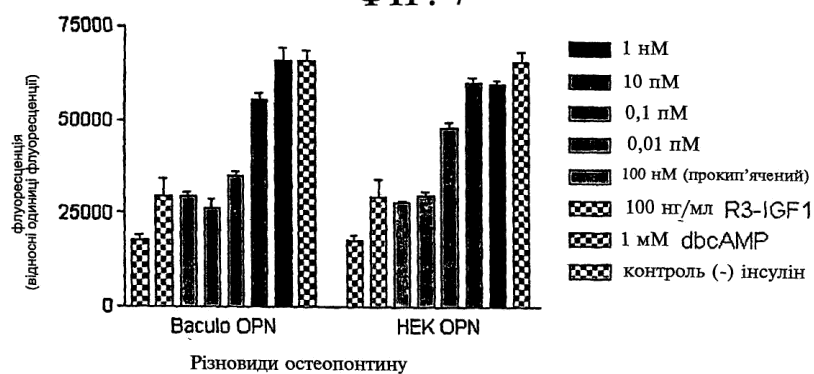
ФІГ. 5



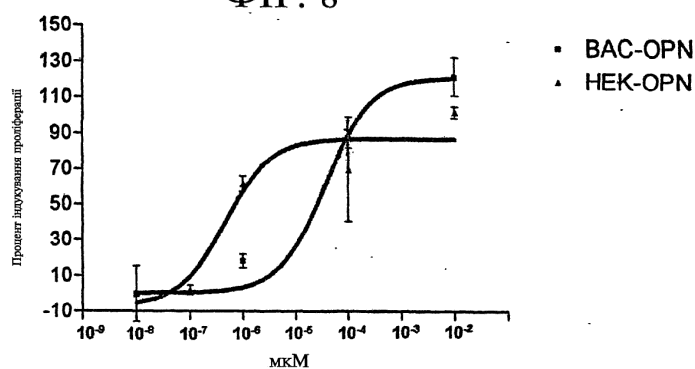
ФІГ. 6



ФІГ. 7

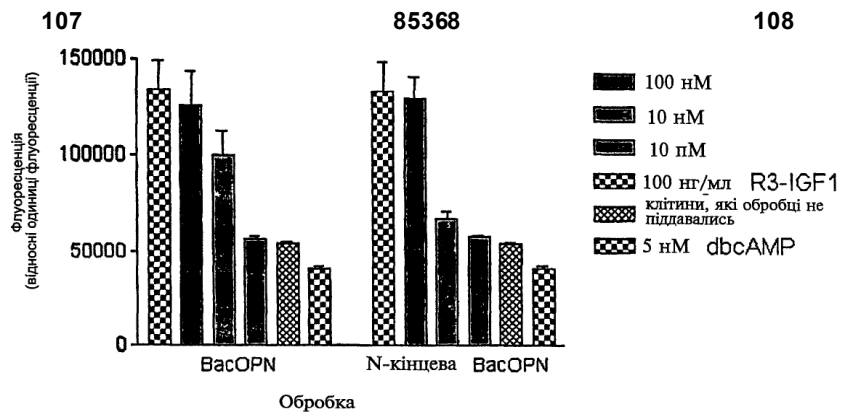


ФІГ. 8

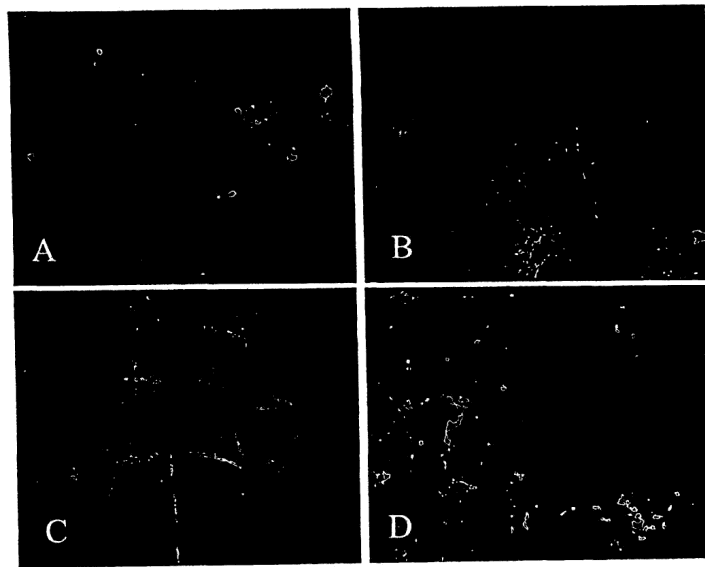


	BAC-OPN	HEK-OPN
EC50	3.689	0.04781

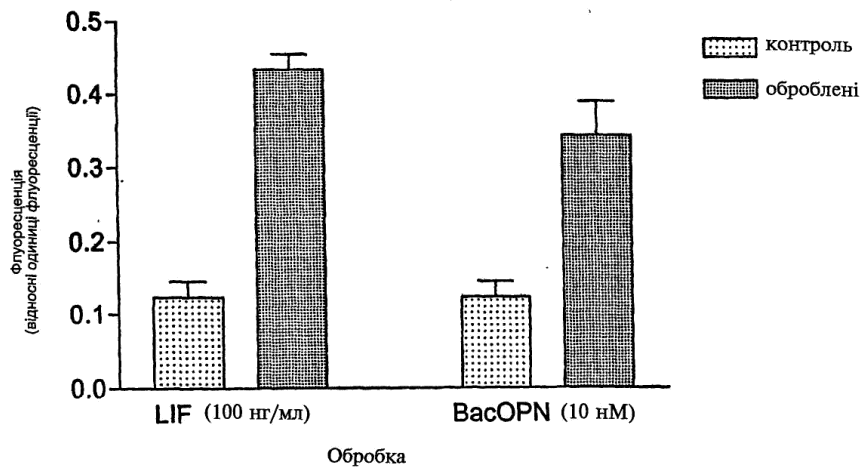
ФІГ. 9



ФІГ. 10



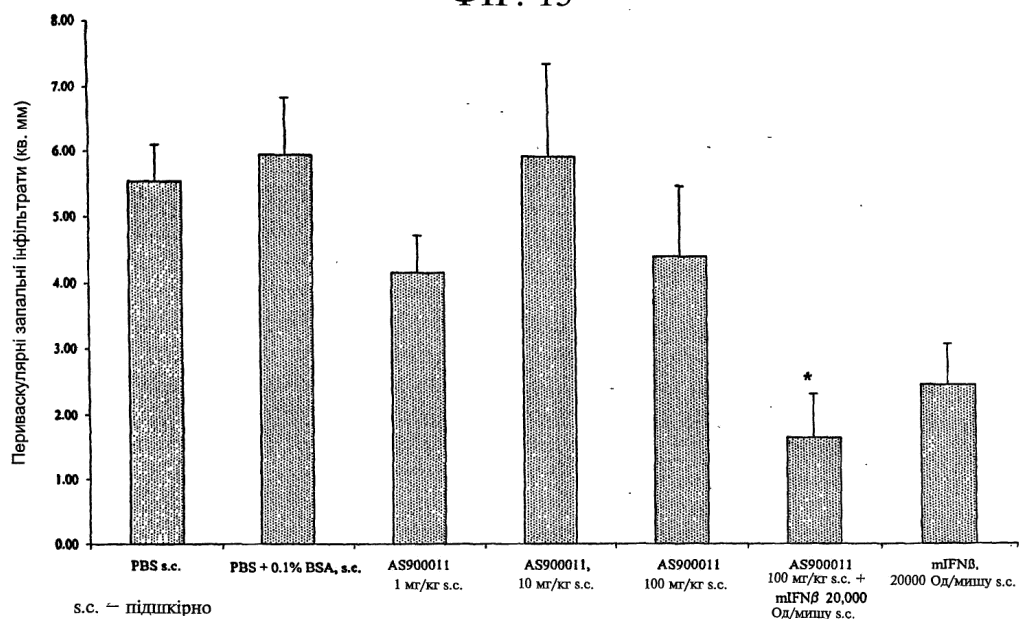
ФІГ. 11



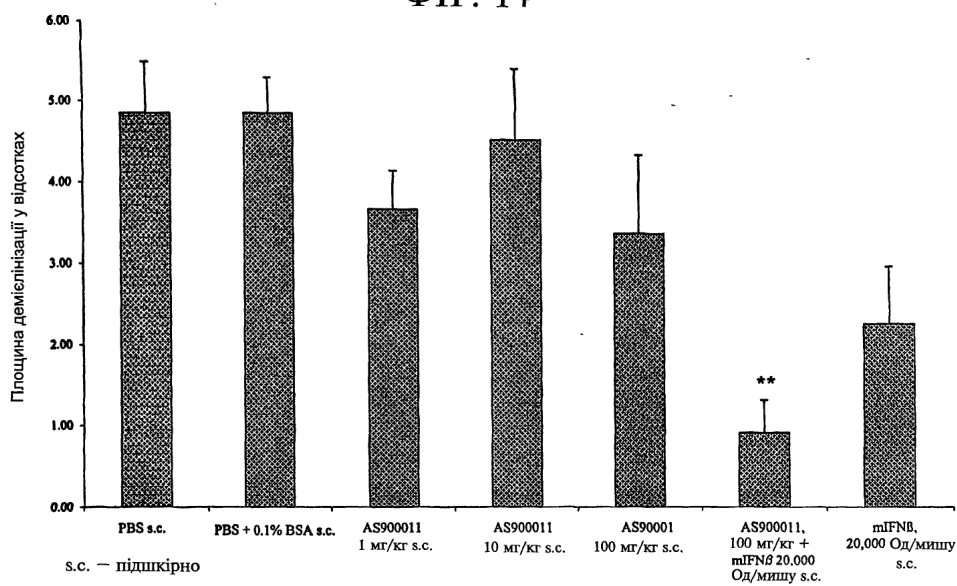
ФІГ. 12

	OPN E-coli	OPN Bac
10 пМ	3.2%	6.1%
10 нМ	5.4%	29.8%
100 нМ	не визначалось	14.8%
КОНТРОЛЬ	1.4%	1.4%

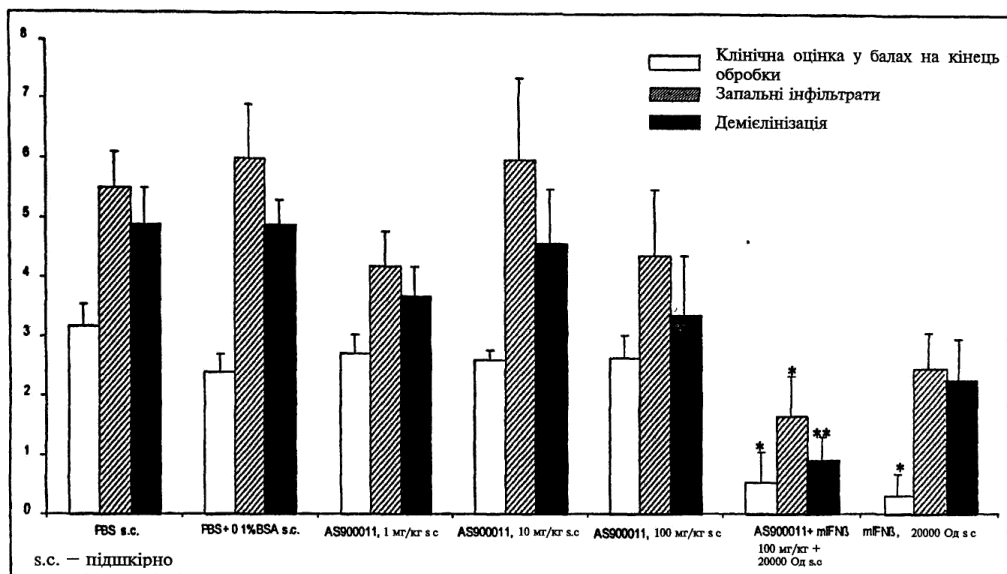
ФІГ. 13



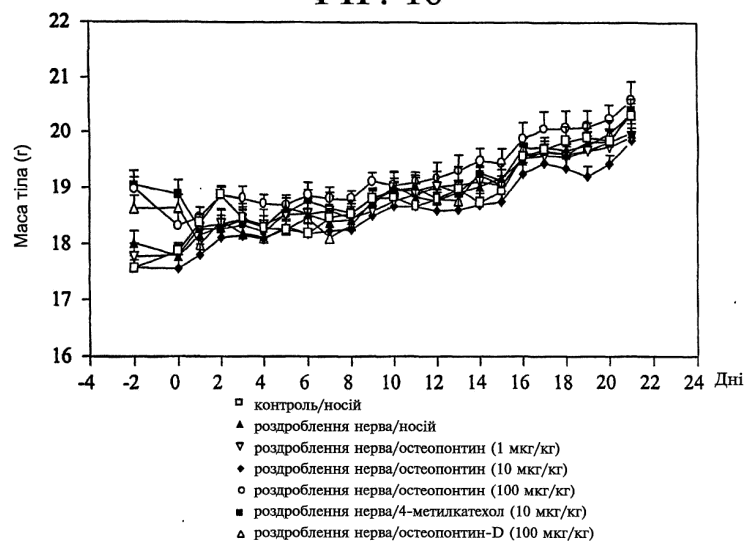
ФІГ. 14



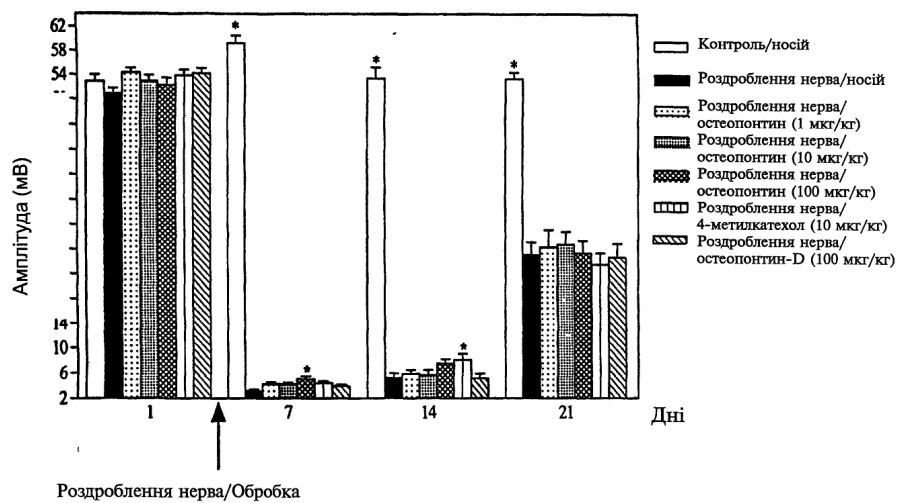
ФІГ. 15



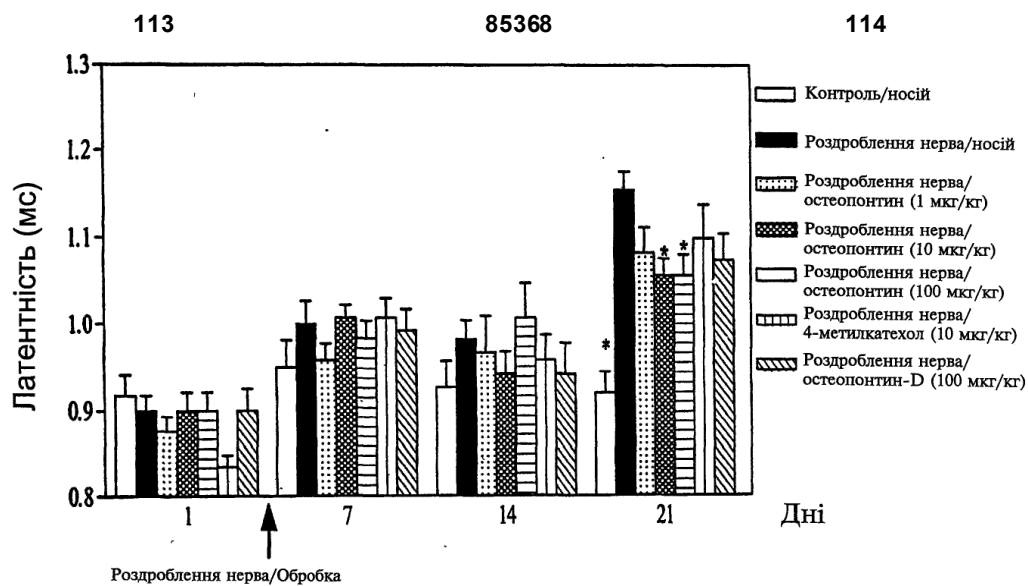
ФІГ. 16



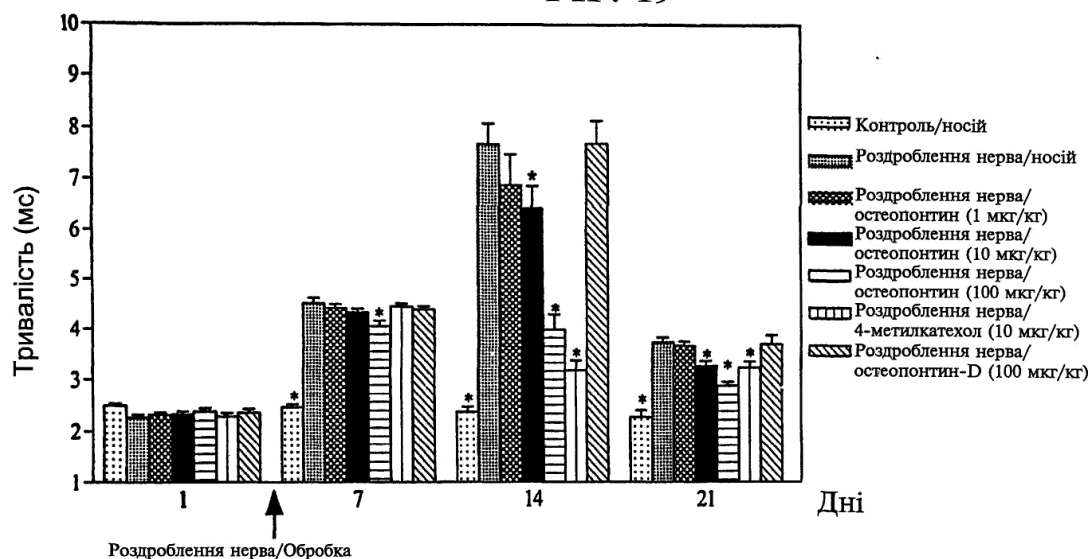
ФІГ. 17



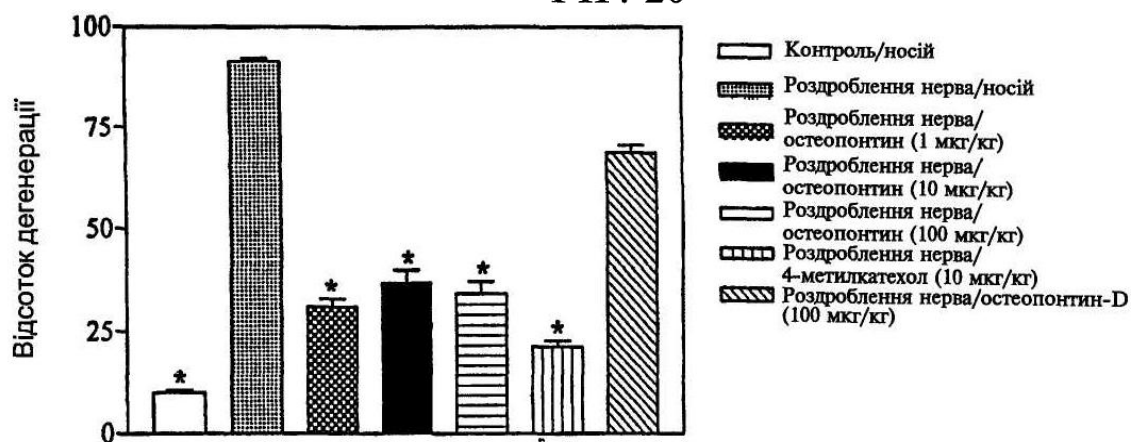
ФІГ. 18



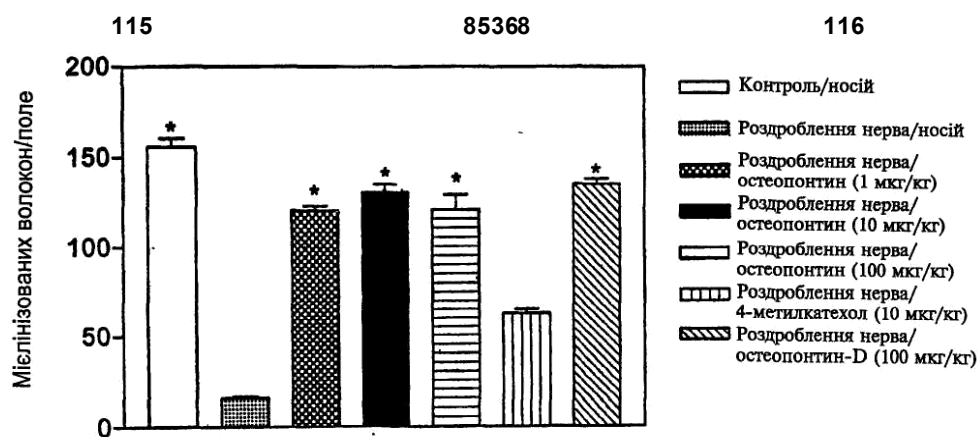
ФІГ. 19



ФІГ. 20



ФІГ. 21



ФІГ. 22