

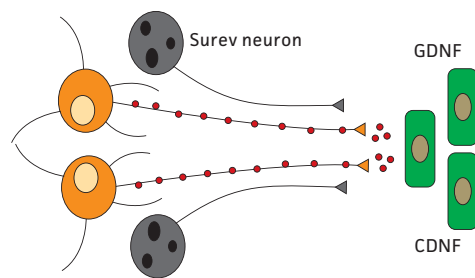
Biotehnoloogilisi lähenemisi neurodegeneratiivsete haiguste raviks

Mart Saarma – Helsingi Ülikooli biotehnoloogia instituut, Tallinna Tehnikaülikooli geenitehnoloogia instituut, Eesti Teaduste Akadeemia

Võtmesõnad: neurodegeneratiivsed haigused, Parkinsoni tõbi, närvikasvufaktorid, CDNF, GDNF

Vananemine, vigastused ja neurodegeneratiivsed haigused põhjustavad närvirakkude kängumist ja surma. Parkinsoni tõve haigetel juhtub see eelkõige keskaju mustaine dopamiini tootvates närvirakkudes. Parkinsoni tõve raviks kasutatavad ravimid leevendavad haiguse sümptomeid, kuid ei kõrvalda haiguse põhjuseid ega pidurda närvirakkude surma. Närvikasvufaktorid GDNF ja NRTN suudavad Parkinsoni tõve näriliste ja primaatide loomudelites dopamiini närvirakkude surma pidurdada ning isegi känguvaid närvirakke taastada. Paraku on kliinilised katsetused nende faktoritega seni andnud tagasihoidlikke tulemusi. Närvikasvufaktorid on rakkude poolt eritatavad väikesed valgud, mis seonduvad närvirakkude pinnal paiknevate retseptoritega, kaitsevad neuroneid vigastuste eest ning hoiavad neid elus. Hiljuti avastatud CDNF on loomkatsetes tõhusamate raviomadustega kui GDNF või NRTN. Kuna CDNFil ja tema sugulaskasvufaktor MANFil on muude närvikasvufaktoritega võrreldes hulk uusi omadusi, siis loodetakse neist läbimurret Parkinsoni tõve raviks.

Aju on inimese kõige keerulisem ja samas ka kõige põnevam elund. Närvirakke ehk neuroneid on ajuis 10^{11} ja seni arvati, et gliia- ehk tugirakke on närvirakkudest veel 10 korda rohkem. Täpsemad uuringud on nüüd näidanud, et ajuis on gliia- ja närvirakkude arv ligikaudu võrdne. Närvirakkude peamiseks ülesandeks on vastu võtta, säilitada, töödelda ja edasi anda informatsiooni. Seda tehakse põhiliselt kahel viisil: kasutades keemilist ja elektrilist signaali. Selleks et oma ülesandeid täita, peab neuron olema otsese ühenduses teise rakuga erilise organelli – sünapsi – kaudu. Ilma sünaptilise kontaktita on närvirakk teovõimetu (vt joonis 1A). Üksik närvirakk võib samal ajal olla kontaktis kuni 10 000, tavaliselt siiski umbes tuhande eri rakuga, võttes vastu, töödeldes ja edastades infot. Ajuis



Joonis 1A. GDNF ja CDNF/ManF perekonna närvikasvufaktorid.

Närvikasvufaktorid reguleerivad neuronite arvukust arengus. Embrüonaalseid neuroneid luuakse rohkem, kui neid hiljem on vaja. Arengus nende aksonid kasvavad innerveeritava koe suunas (rohelistes rakkudes), mis sekreteerivad närvikasvufaktoreid, näiteks GDNF ja CDNF (punased kerakesed). Vaid need neuronid (kollased), mis innerveerivad õigeid rakke ja moodustavad toimiva sünapsi, jäävad ellu. Hilinevad või vale sünaptilise kontakti teinud neuronid (mustad) surevad.

moodustavad närvirakud kontakte teiste närvirakkudega, luues keerulisi närvirakkude võrgustikke. Närvirakkude infotöötlemise võime on uskumatu. Kujutage ette, et räägiksite samal ajal telefonis 1000 inimesega ja saaksite ka aru, mida teile räägitakse! Meie aju närvirakud suudavad seda! Seega on inimese aju närvirakkudel vähemalt 10^{14} kontakti, mis on astronoomiline arv, kui võrrelda, et Linnuteel on 2×10^{11} tähte. Närvirakkude-vaheliste kontaktide suur arv koos nende rakkude võimega edasi saata, töödelda ning moduleerida keemilisi ja elektrilisi signaale ongi aju infomahukuse, mõtlemisvõime ning mälu realiseerumise peamiseks aluseks.

Erinevalt enamikust keharakkudest suur osa inimese närvirakke ei jagune, s.t nad ei uuene. Selleks et mitukümmend aastat vastu pidada, vajavad närvirakud pidevalt „eluspüsimise” signaale. Tähtsaimad närvirakke elus hoidvad molekulid on rakkude poolt eritatavad väikesed valgud, mida kutsutakse närvikasvufaktoriteks (ingl *neurotrophic factors*, NTF). NTFid seonduvad närvirakkude pinnal paiknevate retseptoritega ja saadavad neisse „eluspüsimise” keemilise signaali (vt joonis 1A) (1). Peab siiski rõhutama, et osa inimese närvirakke suudab jaguneda ja seetõttu ka uueneda. Näiteks haistmissibula nn olfaktoorsed neuronid, aga ka mälu eest osaliselt vastutavad nn hipokampuse neuronid uuenevad päris tõhusalt. Paraku suurel osal inimese närvirakkudest on vaid kaks valikut: kas püsida elus või känguda ja surra. Vananemine, vigastused ja neurodegeneratiivsed haigused põhjustavad närvirakkude kängumist ja surma. Kängudes kaob sünaptiline kontakt ning närvirakk ei suuda oma ülesandeid täita, vaatamata sellele et rakk ise on veel elus. Katseloomades suudavad NTFid hoida neuroneid elus ning vigastuste ja haiguste korral isegi närvirakke ja nende vahelisi kontakte taastada. Arvestades seda, et praegu pole meditsiinis kasutusel ühtegi ravimit, mis aeglustaks või pidurdaks närvirakkude degeneratsiooni, pakuvad NTFid

väga suurt huvi uut tüüpi ravimitena. Artikli **eesmärgiks** on kirjeldada närvikasvufaktoreid ja nende võimet hoida närvirakke elus Parkinsoni tõve (PD) loomudelites ning anda ülevaade NTFide kliinilistest katsetustest PD-haigetel.

NEURODEGENERATIIVSED HAIGUSED

Levinumate neurodegeneratiivsete haiguste hulka kuuluvad Alzheimeri tõbi, Parkinsoni tõbi, Huntingtoni tõbi, dementsus ja amüotroofne lateraalskleroos (ALS). Neurodegeneratiivsete haiguste puhul närvirakud esmalt känguvad ja seejärel surevad. Viimase aja uuringud näitavad, et tihti algab neuronite kängumine sünaptilise kontakti hävimisega. Sellele järgneb närvirakkude jätkete ehk aksonite ja dendriitide kärbumine ning seejärel närvirakk sureb. Pärilike neurodegeneratiivsete haiguste uurimisel moodsate molekulaargeneetika meetoditega on avastatud hulk geene, mille muutused ja mutatsioonid põhjustavad nimetatud haigusi. Vaatamata geneetiliste uuringute edusammudele on neurodegeneratiivsete haiguste tekke ja kulu mehhanismide selgitamine endiselt veel lapsekingades. Olukorra teeb veelgi keerulisemaks asjaolu, et vaid 3–10% neurodegeneratiivsetest haigustest on pärilikud ja ülejäänud 90–97% nn sporaadiliste haiguste tekkepõhjused on jäänud peaaegu täielikult ebaselgeks.

Lisaks patogeneesi puudulikule mõistmisele on teiseks suureks probleemiks neurodegeneratiivsete haiguste õigeaegne diagnoosimine haiguse alguses. Praegu suudame märgata haiguste tunnuseid alles siis, kui nende kulg ja närvirakkude degeneratsioon on juba väga kaugele edenenu. Näiteks Parkinsoni tõve puhul on esimeste haigustunnuste ilmnedes patsiendi keskaju dopamiini tootvatest närvirakkudest üle 60% juba pöördumatult hävinud ning nende neuronite sünaptilistest kontaktidest juttukeha (*striatum*) neuronitega on alles vaid 20% (2). Viimase aja uuringud näitavad, et kaks-kolm NTFi suudavad degenerее-

ruvaid närvirakke isegi osaliselt taastada ja nende talitlust normaalseks muuta. Seega on NTFide katsetamine neurodegeneratiivsete haiguste raviks igati põhjendatud.

Neurodegeneratiivsed haigused on väga valuline sotsiaalne probleem nii kogu maailmas kui ka Eestis. Ekspertide arvates kannatab umbes 3–4% Lääne-Euroopa ja Põhja-Ameerika rahvastikust nende haiguste all. Haigete arv kasvab pidevalt, sest tervishoiuteenused paranevad, inimesed elavad kauem ja meil puudub tõhus ravi. Süingeima ennustuse kohaselt võib 2050. aastal 8–10% inimestest kannata neurodegeneratiivsete haiguste all. Nende haiguste arstiteaduslike ja sotsiaalsete probleemide lahendamine eeldab suuri pingutusi ja intensiivset uurimistööd, et leida põhimõtteliselt uusi ravimeid neurodegeneratiivsete haiguste raviks.

PARKINSONI TÕBI

PD on üks peamine liikumishäireid põhjustav haigus, mille all kannatab umbes 5 miljonit inimest maailmas. Sarnaselt muude neurodegeneratiivsete haigustega kasvab PD-haigete arv, korreleerudes hästi rahvastiku vananemisega. PD puhul degenerereeruvad ning seejärel surevad eelkõige keskajas paiknevad mustaine (*substantia nigra*) dopamiini tootvad närvirakud. Need neuronid moodustavad sünaptilisi kontakte juttkehas paiknevate neuronitega ja vabastavad sinna neuromediaator dopamiini. Nendel neuronitel on keskne osa inimese liigutuse ja koordinaatsiooni kontrollis. Lisaks dopamiini neuronite kängumisele ja dopamiini taseme dramaatilisele alanemisele juttkehas esineb paljudel haigetel dopamiini neuronites alfa-sünukleiini sisaldavaid tsütoplasmaatilisi agregate, mida kutsutakse Lewy kehadeks. Lisaks keskajule on tuvastatud haiguslikke muutusi ka ajutüves, ajukoos ja mõnedes koorealustes piirkondades.

Paarikümne viimase aasta jooksul on L-DOPA (1-3,4-dihüdrosüfenüülalaniin) ja dopamiini agonistide kasutamine

võimaldanud haiguse algstaadiumis patsientide liikumishäireid tõhusalt leevendada. Haiguse progresseerudes liikumishäireid kahjuks süvenevad ning dopamiini neuronite kängumine ja surm jätkuvad (2). Tänu geenitehnoloogia ja molekulaargeneetika meetodite kasutamisele on suudetud tuvastada kümnekond pärilikku PDd põhjustavat geeni. Vaatamata nende geenide intensiivsele uurimisele ei ole toimunud otsustavat läbimurret, et mõista PD teket ja haiguse arenemist. Lisagem, et päriliku PD all kannatab vaid paar protsenti haigetest. Kokkuvõttes on meie arusaamine PD patogeneesist tagasihoidlik ning piiratud eelkõige dopamiini neuronite patogeneesi uurimisega. Vaatama sellele, et meie käsutuses on nii neurotoksiinidel põhinevad kui ka geenmutatsioonidega PD-katseloomade mudelid, ei vasta ükski neist piisavalt inimese haiguspildile. Sarnaselt kõigi teiste neurodegeneratiivsete haigustega on ka kõik PD raviks kasutatavad ravimid ja ravimeetodid võimelised vaid sümptomeid leevendada ega suuda kõrvaldada haiguse põhjust ja pidurdada või peatada dopamiini närvirakkude surma. Viimase kümne aasta katsed PD-loommudelitel on näidanud, et mõned närvikasvufaktorid suudavad dopamiini närvirakkude kängumist pidurdada ning paremal juhul isegi känguvaid närvirakke taastada.

NÄRVIKASVUFAKTORID

Esimese närvikasvufaktori NGFi (ingl *nerve growth factor*) avastas Itaalia teadlane Rita Levi-Montalcini (3). Ta näitas elegantsete katsetega, et NGF edendab närvirakkude jätkete kasvu ja hoiab närvirakke elus tingimustes, kus nad muidu sureksid. NGFi avastamine oli murdepunktiks bioloogiateaduse ja meditsiini arengus, sest olid leitud rakkudevahelise suhtlemise molekulid kasvufaktorid – valgud, mida ühed rakud toodavad, et mõjutada teisi rakke. NGFi ja kasvufaktorite avastamise eest anti Rita Levi-Montalcinile ja tema kolleegile Stanley Cohenile, kes NGFi ja hiljem ka epider-

Tabel 1. Närvikasvufaktorite mõju dopamiini neuronitele *in vivo* ja potentsiaal teiste neurodegeneratiivsete haiguste ravimiseks

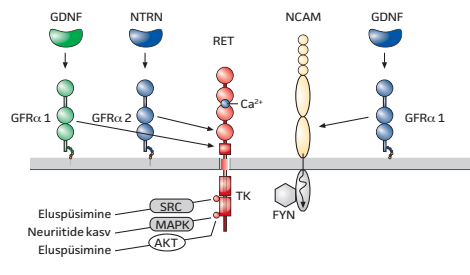
Perekond	Faktor	Retseptor	Mõju dopamiini neuronitele <i>in vivo</i>		Muud haigused
			Kaitse	Regeneratsioon	
GDNF pere	GDNF	Ret/GFR α 1, NCAM/GFR α 1	Jah	Jah	ALS, HD
	NRTN	Ret/GFR α 2, NCAM/GFR α 2	Jah	Jah	ALS
CNTF/MANF pere	CDNF	Tundmatu	Jah	Jah	Alz
	MANF	Tundmatu	Jah	Jah	
NGF pere	NGF	TrkA, p75NTR	Jah	ND	Alz
	BDNF	TrkB, p75NTR	Jah	ND	Alz, ALS, HD
Neurokiinid	CNTF	gp130, LIFR β , CNTFR α	Jah	ND	ALS
	LIF	gp130, LIFR β	ND	ND	ALS
	IL-6	gp130, IL6R α	ND	ND	ALS
	CT-1	gp130, LIFR β	ND	ND	ALS
Muud faktorid	TGF β	TGFBR1-3	Jah	ND	
	bFGF	FGFR1-4	Jah	ND	
	VEGF	VEGFR1-3	Jah	Jah	

Tabelis on esitatud sellised närvikasvufaktorid, mis on andud efekti kas loomkatsetes või kliinilistes katsetes. Lühendid: Alz – Alzheimeri tõbi; ALS – amüotroofne lateraalsklerooos; HD – Huntingtoni tõbi; ND – pole testitud.

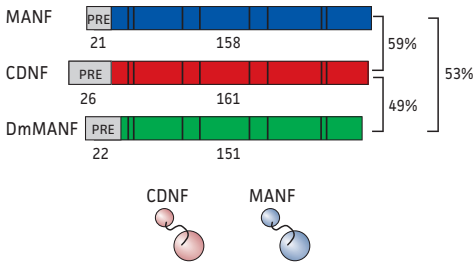
maalse kasvufaktori (EGFi) biokeemiliselt puhastas, 1986. aastal Nobeli füsioloogia- ja meditsiiniauhind (3).

Tänapäeval tuntakse nelja närvikasvufaktorite klassi: **NGFi ehk neurotrofiinide perekond**, kuhu lisaks NGFi kuuluvad aju närvikasvufaktor (BDNF), neurotrofiin 3 (NT3) ja neurotrofiin 4 (NT4). Neurodegeneratiivsete haiguste seisukohalt on olulisemad NGF ning BDNF, sest mõlemad faktorid suudavad kaitsta Alzheimeri tõve loomudelistes känguvaid neurooneid (vt tabel 1) (4). BDNF kaitseb ka dopamiini neurooneid, kuid ei suuda vigastatud neurooneid regenereerida (vt tabel 1). On meeldiv tõdeda, et Eesti teadlane prof Tõnis Timmusk on üks rahvusvaheliselt tuntumaid BDNFi uurijaid. **Neurotroofiliste tsütokiinide (neurokiinide) rühma** kuulub hulk valke, millest terapeutiliselt olulisemad on tsiliaarne närvikasvufaktor (CNTF), interleukiin 6 (IL-6) ja kardiotrofiin 1 (CT-1) (1). Need faktorid kaitsevad loomkatsetes motoneurooneid, mistõttu neist loodetakse abi ALSi ravis. PD ravi suhtes kõige huvitavamaks tuleb pidada gliia **närvikasvufaktori (GDNF) perekonda** (vt joonis 1B), kuhu lisaks GDNFi kuuluvad ka neurturiin (NRTN), artemiin (ARTN) ja persefiin (PSPN). Neist neljast valgust nii GDNF kui ka NRTN kaitsevad

ja regenereerivad loomkatsetes dopamiini neurooneid, mistõttu neid faktoreid on katsetatud ka PD-haigetel (5–7) (vt joonis 1B).

**Joonis 1B.** GDNFi ja CNTFi/MANFi perekonna närvikasvufaktorid.

GDNFi perekonna kasvufaktorite interaktsioon retseptoritega. GDNF on 134 aminohappest koosnev valk, mis on bioloogiliselt aktiivne homodimeerin. Sugulasvalk NRTN koosneb 100 aminohappest ja on struktuurilt väga sarnane GDNFiga. GDNFi dimeer seondub alul raku pinnal paikneva GFR α 1 retseptoriga ja stimuleerib viimase paardumist, NRTN seondub spetsiifiliselt retseptoriga GFR α 2. GDNF-GFR α 1 kompleks seondub seejärel membraani läbiva retseptor türosiini kinaasi RETi rakuvälise osaga, kutsudes esile RETi paardumise ja rakusise osa türosiini kinaasi (TK) aktiveerumise. RETi aktiveerimine TK-ala seob ATPd ja transfosforüübil paardunud RETi TK-ala aminohappe türosiini jäägid. Sarnaselt GDNFiga aktiveerib ka NRTN RETi, kuid kasutab sidumiseks GFR α 2 retseptorit. Dopamiini neuronites ei esine GFR α 2 retseptorit ja seetõttu NRTN aktiveerib neis RETi GFR α 1 kaudu. GDNFi ja NRTNi poolt aktiveeritud RETi fosfotürosiinidega seonduvad rakusised valgud, mis aktiveeritakse. Viimased omakorda aktiveerivad rakusised signaalirajad, millest olulisemad on SRC, AKT ja MAPK. AKT ja SRC aktiveerimine hoiab neurooneid elus ja MAPK aktiveerimine on vajalik neuroitide kasvuks. GFR α valgud on membraaniga seotud glükolipiidide GPI-antru kaudu. GDNF ja NRTN võivad teatud rakkudes aktiveerida rakusiseid protsesse, kasutades neuaalses adhesioonimolekuli NCAM alternatiivse retseptorina. GDNF ja NRTN vajavad GFR α retseptorit, et NCAMi kaudu aktiveerida rakkudes Fyn kinaasi.



Joonis 1C. GDNFi ja CDNFi/MANFi perekonna närvikasvufaktorid.

CDNFi ja MANFi ehitus. Vertikaalsed jooned tähistavad konserveerunud aminohappe tüsteiini paiknemist. Numbrid näitavad valggu eri osades paiknevate aminohapete arvu. Pre tähistab valgumolekuli osa, mis lõigatakse ära enne valkude sekreteerimist rakust välja. Küps inimese MANF koosneb 158 aminohappest ja omab 59% aminohappest sarnasust inimese CDNFiga, mis omakorda koosneb 161 aminohappest. Äädikakärbse *Drosophila* MANF (DmMANF) molekul on 151 aminohappe pikkune ja omab vastavalt 53% ja 49% aminohappest sarnasust inimese MANFi ja CDNFiga. Mõlemad valgud koosnevad kahest struktuurselt iseseisvast alast ehk domeenist.

Tserebraalse dopamiini närvikasvufaktori (ingl *cerebral dopamine neurotrophic factor*, CDNF) avastasime paar aastat tagasi (8). CDNF ja tema sugulasmolekul mesentsefaalne astrotsüütide närvikasvufaktor (MANF) ilmnevad imetajate ajus, kaitstes ning taastades väga tõhusalt dopamiini neuroneid PD-loommudelites (9). **Imetajate CDNF ja MANF erinevad nii struktuurilt kui ka toimelt kõigest senistest närvikasvufaktoritest ning moodustavad koos selgrootute homoloogilise valguga uue närvikasvufaktorite perekonna** (10) (vt joonis 1C). Äädikakärbse ortoloogiline valk DmMANF vastutab dopamiini neuronite arengu eest ja reguleerib äädikakärbse dopamiini taset (11). Kuna seni kirjeldatud närvikasvufaktoritest GDNF ja NRTN ning eriti CDNF ja MANF on PD-loommudelites võimelised mitte ainult kaitsma, vaid ka osaliselt taastama känguvaid dopamiini närvirakke, siis on allpool käsitletud eelkõige nende faktorite terapeutilisi omadusi.

NÄRVIKASVUFAKTORITE TOIME PARKINSONI TÕVE LOOMMUDELITES

GDNF avastati 1993. aastal selle alusel, et see faktor suutis kultuuris elus hoida

dopamiini neuroneid (12). Tänapäeval me teame, et GDNF mõjutab ka hipokampuse, väikeaju ja ajukoore neuroneid ning veel hulka perifeerse närvisüsteemi närvirakke. GDNF vastutab eelkõige enteraalse närvisüsteemi arengu ja eluspüsimise eest. Sellele lisaks reguleerib GDNF ka neuru arengut ning spermatogeneesi. GDNF on 134 aminohappest koosnev valk, mis on bioloogiliselt aktiivne homodimeerinina (vt joonis 1B) (6–7). Selleks et saata neuro- nitesse eluspüsimise signaal, seondub GDNF esmalt raku pinnal paikneva GDNF perekonna retseptori GFR α 1-ga ja stimuleerib viimase paardumist. Seejärel seondub GDNF-GFR α 1 kompleks raku membraani läbiva retseptor türosiini kinaasi RETiga, vallandades viimase dimerisatsiooni ja aktiivsiooni. Retseptori aktiivsioonil toimub RETi rakusise türosiini kinaasi alade interaktsioon ja vabade türosiini aminohappe jääkide fosforüleerimine. Fosfotürosiinid on omakorda RETi retseptoris need aktiivsed kohad, kuhu rakusisesed nn ankurvalgud ja ensüümid seonduvad ning kus need valgud RETi poolt aktiveeritakse (vt joonis 1B) (13). Sellisel viisil aktiveerib GDNF raku sees hulga biokeemilisi radasid, millest olulisemad on AKT, MAPK, SRC ja PLC-gamma signaalirajad. AKT ja SRC radade aktiveerimine hoiab neuroneid elus ja MAPK aktiveerimine osaleb neurii- tude kasvu regulatsioonis. NRTN toimib GDNFiga sarnase mehhanismiga, kuid kasutab RETiga liitumiseks eelkõige GFR α 2 retseptorit. On oluline rõhutada, et GDNF ja NRTN võivad rakusiseid protsesse aktiveerida ka närvirakkude adhesiooni- molekuli NCAM kaudu (14) (vt joonis 1B). Kokkuvõttes peab tõdema, et on veel kaunis vähe teada selle kohta, milliseid signaalira- dasid GDNF ja NRTN aktiveerivad vana- nevates, vigastatud või haigetes dopamiini neuronites. AKT raja aktiveerimise kohta dopamiini neuronites on siiski mõnevõrra andmeid.

Avastasime CDNFi 2007. aastal kui dopamiini neuroneid kaitsva valguga (8).

CDNF ja MANF koosnevad umbes 160 aminohappest ja erinevalt teistest närvikasvufaktoritest ei mõjuta nad koekultuuris üldse perifeerseid närvirakke (vt joonis IC). CDNFi ja MANFi toimemehhanismi kohta teame, et nad ei aktiveeri tavalisi rakusiseid signaaliradasid, vaid pidurdavad otseselt raku programmeeritud surma molekule ja kaitsevad rakke oksüdeeritud lipiidide kahjuliku toime eest (10).

PD loomudelites hävitatakse mustaine dopamiini neuroneid eelkõige spetsiifiliste närvimürkide 1-metüül-4-fenüül-1,2,3,6-tetrahüdropüridiini (MPTP) või 6-hüdroksüdopamiini (6-OHDA) abil. Mõlemad närvimürgid kutsuvad esile kiire ja laialdase dopamiini neuronite surma, mis kahjuks siiski ei vasta täielikult PD kliinilisele pildile patsientidel. Näiteks ei tapa MPTP dopamiini neuroneid, vaid takistab neis ajutiselt dopamiini sünteesi (15). Geneetilistest PD-mudelitest on enam kasutusel α -sünukleiini ja LRRK2 mutatsioonid kandvad katseloomad, kuid mõlemal juhul jäävad dopamiini neuronid ellu ja esineb vaid tagasihoidlik dopamiini aksonite degeneratsioon. Kasutusel olevad geneetilised PD-mudelid on kahjuks palju kehvemad ja kaugemal tegelikust haiguspildist kui närvimürkide mudelid. Nii näriliste kui ka primaatide PD mudelites kaitsevad ning regenereerivad GDNF ja NRTN dopamiini neuroneid ning suudavad „ravida” haigeid loomi (vt tabel 1) (16). Nende faktorite võime pidurdada dopamiini neuronite surma ja regenereerida aksonite ning stimuleerida uute sünapsite teket on väga unikaalne ja inimeste PD ravi seisukohalt lootustandev. Paraku on nendel valkude terapeutilises profiilis ka hulk puudusi. Vaatamata tõhusale neuronite kaitsmise võimele teatud loomudelites ei suuda GDNF pärast näriliste aju kahjustamist MPTPga enam dopamiini neuroneid kaitsta. Üllataval kombel ei ole GDNFi ka mingit kaitsvat efekti α -sünukleiini loomudelites (17). Nii GDNF kui ka NRTN on suhteliselt suured valgumolekulid

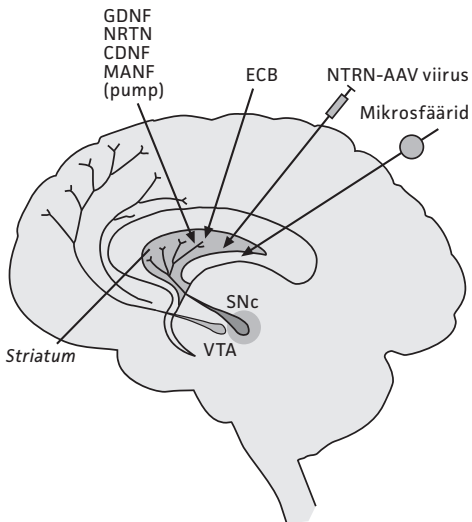
(umbes 30 kDa), mistõttu nad ei suuda läbida hematoentsefaalbarjääri ning seetõttu peab neid süstima otse aju. Mõlemad on ka väga aluselised valgud ja seetõttu kleepuvad kudede rakuvaheaines hepariinsulfaatidele ning see takistab omakorda nende levimist ja seeläbi jõudmist ajus vigastatud rakkudeni (18).

UUED NÄRVIKASVUFAKTORID

Meie avastatud CDNF ja tema sugulasvalk MANF suudavad vähemalt osaliselt ületada GDNFi ja NRTNi loomkatsetes ilmnevaid puudusi. Meie andmed näitavad, et CDNF kaitseb ja taastab erinevates PD-loomudelites dopamiini närvirakke palju tõhusamalt kui GDNF või NRTN (vt tabel 1). Lisaks sellele levivad CDNF ja MANF näriliste ajus palju paremini kui GDNF ning NRTN. Võib eeldada, et inimese ajus, mis on ligi tuhat korda suurem roti ajust, on difusiooni erinevustel veelgi suurem mõju ainete toimele. Meie uusimad tulemused näitavad, et CDNF ja MANF toimivad täiesti erinevalt seni tuntud närvikasvufaktoritest. Neil on unikaalne omadus siduda oksüdeeritud lipiide, mis tekivad närvirakkude kängumisel ja mis omakorda kiirendavad närvirakkude surma. Meie hüpoteesi kohaselt toimivad CDNF ja MANF aju n-ö kojameestena, puhastades närvirakkude kängumise koldeid oksüdeeritud lipiididest ja andes nii neuronitele lisakaitset. See on täiesti uus mehhanism neuronite kaitseks. Seega on CDNF ja MANF väga tõhusad uued närvikasvufaktorid ja on igati põhjust eeldada, et neil on suur potentsiaal ka Parkinsoni tõve ravis. Tuleb siiski rõhutada, et erinevalt GDNFist ja NRTNist pole CDNFi ja MANFi seni veel kliiniliselt katsetatud.

NÄRVIKASVUFAKTORITE KLIINILISED KATSETUSED

Biomolekule võib viia aju mitmel viisil (vt joonis 2). Tänu biotehnoloogia arengule on võimalik toota suuri koguseid bioloogilisel aktiivseid inimese rekombinantseid valke ja



Joonis 2. Uusi vaatenurki Parkinsoni tõve raviks.

Dopamiini neuronid, mis känguvad ja surevad Parkinsoni tõve haigete ajus, paiknevad mustaines (*Substantia Nigra pars compacta*, SNc) ning moodustavad sünaptilisi kontakte neuronitega juttkehas (*striatum*). Inimese käitumise seisukohalt on väga oluline ka dopamiini neuronitest koosnev *tegmentum*'i ventraalne ala (VTA). Närvikasvufaktorid kaitsevad ja regenereerivad dopamiini närvirakke ja neid testitakse loomkatsetes ning kliinilistes katsetes. Terapeutilisi valke manustatakse otse inimese juttkeha regiooni. GDNFi, NRTNi, CDNFi või MANFi biotehnoloogiliselt toodetud inimese rekombinantseid valke pumbatakse spetsiaalsete pumpadega läbi juuspeenikeste kateetrite otse ajju. GDNFi manustatakse ka kapseldatud rakkude teraapia abil, kus rakud toodavad inimese GDNFi (*encapsulated cell biodelivery*, ECB). NRTNi teraapia haigetel on õnnestunud adeno-assotsieeritud viirusvektoreid (NTRN-AAV) abil, mis süstituna juttkehasse suudavad rakkudes toota inimese NRTN faktorit. NTFe võib ajju viia ka looduslikest ja sünteetilisest polümeeridest agregaatide, nn mikrosfääride abil, mis sisaldavad kasvufaktoreid ja neid reguleeritult ajju vabastavad.

neid siis ajju süstida. Teiseks tõhusaks viisiks on kasutada viirusvektoreid, mis vastavat kasvufaktorit kodeerivad. Kolmandal juhul kasutatakse rakutehnoloogiliselt muudetud rakke, mis sünteesivad ja eritavad soovitud valku. Taani firma NsGene Ltd. on välja töötanud perspektiivika nn kapseldatud rakkude teraapia meetodi, kus NGFi või GDNFi tootvad rakud paigaldatakse poolläbilaskva membraaniga metallkapslisse (20) (vt joonis 2). See viiakse ajju, kust seda saab vajaduse korral ka ohutult eemaldada ja uuega asendada. Neljanda lähenemise puhul kasutatakse looduslikest ja sünteetilisest polümeeridest agregaatide, nn mikro-

sfääre, mis sisaldavad kasvufaktoreid ja neid reguleeritult vabastavad (vt joonis 2). Arendatakse ka väikese molekulmassiga keemilisi ühendeid, mis matkivad närvikasvufaktorite toimet. Need nn närvikasvufaktorite mimeetikumid võivad otse seonduda närvikasvufaktorite retseptoritega, aktiveerides neid või siis stimuleerides endogeensete närvikasvufaktorite sünteesi. Autor arendab koostöös prof Mati Karelsoni rühmaga GDNFi toimet matkivaid molekule, mis aktiveerivad GDNFi retseptorid ja kaitsevad seeläbi neuroneid surma eest.

VALKUDE SÜSTIMINE AJJU

Vaatamata loomkatsete edukusele on nii GDNFi kui ka NRTNi kliiniliste katsete tulemused olnud seni tagasihoidlikud ja mõnevõrra vastukäivad. GDNFi on katsetatud kliinilistes uuringutes neli korda. Esimeses katses süstiti 50 PD-haigele geeni- tehnoloogiliselt loodud inimese rekombinantset GDNFi ajuvatsakesse. Kahjuks need katsed ebaõnnestusid, sest GDNF ei levinud süstimiskohast dopamiini närvirakkudeni. GDNFi annuse suurendamine ei aidanud, vaid kutsus uuritavatel esile ebasoovitavaid kõrvalnähte (21). Need kehvalt planeeritud katsed vähendasid investorite usku närvikasvufaktorite ravi- toimesse, mistõttu alles viie aasta pärast võis dr Steven Gill Bristolis haiglas (UK) teha uued katsetused. Seekord hästi läbi mõeldud katses süstis dr Gill GDNFi viie PD-patsiendi juttkehasse, kus dopamiini närvirakud moodustavad kontakte teiste närvirakkudega ja kuhu nad vabastavad dopamiini (22). Dr Don Gash Kentucky Ülikoolis USAs kordas sõltumatult neid katseid kümnel haigel (23). Mõlemad katsed õnnestusid suurepäraselt ja näitasid, et GDNF on turvaline ning tal on selge raviv toime. Eraldi tasub rõhutada, et enamiku haigete liikumine, koordinatsioon ja enese- tunne paranesid uuringu käigus väga olu- lisele ning neil ei esinenud kõrvalnähte. Seejärel kasutasid firma Amgen teadlased teise faasi kliinilistes katsetes 34 patsiendil

(kellest 17-le manustati GDNFi ja 17-le kontrollahust) põhimõtteliselt dr Gilli lähenemist, kuid tegid kahjuks hulga muudatusi katsekorralduses. Kasutati erinevat GDNFi doosi ning palju jämedamat kateetrit GDNFi süstimiseks haigete aju. Kuue kuu pärast selgus, et GDNFil puudus neis katsetes statistiliselt usaldusväärne raviefekt (24). Hiljem on dr Don Gashi labor testinud Amgeni kateetrit ahvidel ning leidnud, et ka ahvidel ei saavutata Amgeni kateetri abil dopamiini närvirakkude kaitset ja ravi. Õhema kateetriga manustatud GDNF oli aga raviva toimega. Hiljuti on teatavaks saanud väga üllatav uus informatsioon nende katsete kohta. 17 GDNFiga ravitud patsiendist tekkisid kuuel üllataval kombel vereplasmasse GDNFi antikehad (25). Kuna aju ei suuda antikehasid tekitada, siis tekkis kahtlus, et GDNF on sattunud vereringesse. Nüüd ongi selgunud, et ravimipumba lekke tõttu on kuuel patsiendil suur osa GDNFist pumbatud aju asemel vereringesse. Eelnevast lähtudes on täiesti selge, et teise faasi kliinilised katsed GDNFiga vajavad kiiresti kordamist.

GEENITERAAPIA

Viirusvektorid süstitakse samuti otse aju, kus nad siis vastavat kasvufaktorit tekitavad. USA firma Ceregene Inc. on õnnestunult sooritanud NRTNi geeniteraapia esimese faasi katsed 12 haigel, kasutades adeno-assotsieeritud viiruse (ingl *adeno-associated virus*, AAV) 2. serotüübi vektorit (26). Need katsed näitasid, et nii NRTN kui ka viirusvektor on turvalised. Hiljuti teatas Ceregene Inc. teise faasi kliiniliste katsetuste tulemustest NRTN-geeniteraapia ravimiga 58 haigel. 12 kuud pärast ravi algust Parkinsoni tõve haigetel selget paranemist ei tuvastatud, aga 18 kuu pärast saadi väga tagasihoidlik, kuid siiski selge paranemine (R. T. Bartus, isiklik teadaanne). Kahe teistel põhjustel surnud patsiendi aju analüüs näitas, et NRTN levis ajus väga piiratud alal. NRTNi aeglane ja piiratud levimine ajus selgitab vähemalt osaliselt ka

geeniteraapia aeglase toime. Kokkuvõttes näitavad kliinilised katsed GDNFiga ning NRTN geeniteraapiaga, et närvikasvufaktoritel on selge ravitoime. Samas on ravimeetodites ilmnenu hulk puudusi, mida peab kiiresti parandama.

TULEVIKUPERSPEKTIIV

Tunneme veel väga pinnapealselt närvikasvufaktorite toimet vananevatele, vigastatud ning haigetele dopamiini neuronitele. Närvikasvufaktorite edukas kasutamine PD raviks nõuab veel palju sellekohaseid lisauuringuid ja -ressursse. Teiseks, me teame väga vähe närvikasvufaktorite neuronite kaitse- ja regeneratsioonimehhanismidest molekulaarsel ning rakulisel tasemel. Võib-olla kõige suuremaks probleemiks on siiani olnud närvikasvufaktorite aju viimise õige meetodi leidmine. Lisaks valkude aju süstimisele ja geeniteraapiale on viimasel ajal kasutatud ka rakuteraapiat. Valkude süstimise puhul on suurimateks probleemideks süstitava valgu kvaliteet, süstimise tehnoloogia ning võimaliku nakkuse oht. Geeniteraapia suurimaks puuduseks on see, et me ei suuda praeguste vektorite tööd kontrollida. Nüüd on konstrueeritud uusi vektoreid, mida saab vastavalt vajadusele sisse ja välja lülitada ning mis peaksid senistest ravivektoritest ohutumad olema. Lisaks seni kasutatud närvikasvufaktoritele pakuvad suurt lootust uued närvikasvufaktorid CDNF ja MANF. Eriti CDNF on loomkatsetes tõhusamate raviomadustega kui GDNF ning NRTN. Kuna CDNFil ja MANFil on muude närvikasvufaktorite võrreldes hulk uusi omadusi, siis loodame oma töörühmaga, et kliinilistes katsetes on nende ravitoime palju tõhusam kui GDNFil ja NRTNil. Seetõttu tuleks alustada CDNF-i kliinilisi katsed Parkinsoni tõve haigetel nii ruttu kui võimalik.

TÄNUAVALDUS

Täna Ave Eesmaad, Erik Palmi ja Maria Lume kriitiliste märkuste ning heade nõuannete eest.

mart.saarma@helsinki.fi

KIRJANDUS

1. Saarma M, Lindholm P, Arumäe U. Neurotrophic factors. In: Watts RL, Standaert DG, Obeso JA, eds. *Movement Disorders*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 2011. In press.
2. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med* 2010;16:653–61.
3. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154–62.
4. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:677–736.
5. Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 1999;13:313–25.
6. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:383–94.
7. Bernal MM, Saarma M. GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:68–74.
8. Lindholm P, Voutilainen MH, Lauren J, et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 2007;448:73–7.
9. Voutilainen M H, Bäck S, Pörsti L, et al. Neurotrophic factor MANF is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience* 2009;29:9651–9.
10. Lindholm P, Saarma M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol* 2010;70:360–71.
11. Palgi M, Lindström R, Peränen J, et al. Evidence that DmMANF is an invertebrate neurotrophic factor supporting dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:2429–34.
12. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993;260:1130–32.
13. Saarma M. GFL Neurotrophic Factors: Physiology and Pharmacology. In: Squire LR, ed. *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press; 2009;4:711–20.
14. Andressoo JO, Saarma M. Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopamine neurons. *Curr Opin Neurobiol* 2008;18:297–306.
15. Kowsky S, Pöppelmeier C, Kramer ER, et al. RET signaling does not modulate MPTP toxicity but is required for regeneration of dopaminergic axon terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20049–54.
16. Dawson TM, Ko HS, and Dawson VL. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* 2010;66:646–61.
17. Lo Bianco C, Dégion N, Pralong W, et al. Lentiviral nigral delivery of GDNF does not prevent neurodegeneration in a genetic rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2004;17:283–9.
18. Piltonen M, Bernal MM, Ervasti D et al. Heparin-binding determinants of GDNF reduce its tissue distribution but are beneficial for the protection of nigral dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 2009;219:499–506.
19. Björklund T, Kirik D. Scientific rationale for the development of gene therapy strategies for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:703–13.
20. Lindvall O, Wahlberg LU. Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Exp Neurol* 2008;209:82–8.
21. Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 2003;60:69–73.
22. Gill SS, Patel NK, Hotton GR, et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 2003;9:589–95.
23. Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, et al. Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg* 2005;102:216–22.
24. Lang AE, Gill SS, Patel NK, et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2006;59:459–66.
25. Barker RA. Parkinson's disease and growth factors - are they the answer? *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(Suppl 3):S181–4.
26. Marks WJ Jr, Ostrem JL, Verhagen L, et al. Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adenoviral-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* 2008;7:400–8.

SUMMARY

Novel biotechnological approaches for treatment of neurodegenerative diseases

Key words: Neurodegenerative diseases, Parkinson's disease, neurotrophic factors, CDNF, GDNF

Neurons degenerate and die with aging, and in the case of trauma and neurodegenerative diseases. In Parkinson's disease (PD) dopamine neurons located in the substantia nigra and projecting to the striatum degenerate progressively and die. Currently available drugs can only alleviate the symptoms in PD patients, but none of the drugs is able to slow down neurodegeneration or reverse progression of the disease. In rodent and

primate models of PD two neurotrophic factors (NTF), GDNF and neurturin, have neuroprotective and neurorestorative effects and are able to stop neuronal death. However, in clinical trials these factors have shown modest effects. NTFs are small secretory proteins which, by binding to their specific receptors on the surface of neurons, activate intracellular signalling that can protect neurons from lesions, death and sometimes repair them. Recently discovered NTF CDNF can, more efficiently than GDNF and neurturin, protect and repair dopamine neurons in animal models of PD. Since CDNF and the related factor MANF act on neurons differently from other known NTFs, we believe that they will be efficient in clinical trials of PD.