

# Multippeliskleroosi (MS) ja sen tutkimuksen eläintautimallit

LuK-tutkielma

Emma Helka Erkkilä

Biologian tutkinto-ohjelma, biotieteet

Oulun yliopisto

Marraskuu 2019

## Sisällysluettelo

1.	Johdanto .....	1
2.	MS-tauti .....	1
2.1	Patofysiologia .....	1
2.2	Epidemiologia ja sairaudelle altistavat tekijät .....	3
2.3	Oireet .....	4
2.4	Tautimuodot .....	4
2.5	Diagnosointi .....	5
2.6	Hoito .....	6
3.	MS-taudin tutkimus .....	7
3.1	Koe-eläimet .....	7
3.2	Tautimallit .....	8
3.2.1	Kokeellinen autoimmuuninen enkefalomyeliitti .....	8
3.2.2	Toksiset demyelinisaatiomallit .....	11
3.2.3	Virusperäiset demyelinisaatiomallit .....	14
3.3	Tutkimuksen eettisyydestä huolehtiminen .....	14
4.	Yhteenveto .....	15
5.	Lähteet .....	16

## 1. Johdanto

Multipeliskleroosi eli MS-tauti on ihmisillä esiintyvä krooninen ja invalidisoiva keskushermoston autoimmuunisairaus. MS-tauti diagnosoidaan tyypillisesti nuorilla aikuisilla 20-40 vuoden iässä. Sairaudesta voidaan erottaa eri muotoja riippuen siitä, esiintyykö hermostollisia oireita aaltomaisesti vai tasaisesti lisääntyen. Tehokkaiden hoitomuotojen kehittäminen on tärkeää, sillä nuorten työikäisten potilaiden toimintakyvyn heikentymisellä on myös yhteiskunnallinen merkitys. (Kidd ym., 2017)

MS-taudin etiologia on vielä huonosti ymmärretty, eikä sairauteen ole olemassa parannuskeinoa (Denic ym., 2011). Tällä hetkellä käytössä olevilla immunomodulatorisilla lääkkeillä voidaan vaikuttaa taudinkulkuun. Kantasolujen uskotaan tarjoavan tehokkaan tavan hoitaa MS-tautia, mutta sen riskit ja haittavaikutukset ovat vielä huonosti tunnetut. MS-taudin hoitomuotojen kehittäminen ja turvallinen käyttäminen vaatii vielä runsaasti tutkimusta. (Cuascut & Hutton, 2019)

Potilaiden biopsianäytteitä on mahdollista hyödyntää tutkimuksissa rajoitetusti. Kokeellisten kontrolloitujen olosuhteiden muodostaminen on helpompaa koe-eläimillä, minkä takia MS-taudin tutkimus ja lääkkeiden kehitys nojautuukin suurelta osin eläinkokeisiin. Eniten käytetyimpiä tautimalleja ovat kokeellinen autoimmuuninen enkefalomyyeliitti, toksiset demyelinisaatiomallit kuten cuprizone ja virusperäiset demyelinisaatiomallit kuten Theilerin enkefalomyyeliittivirus. Yksinään mallit eivät riitä kuvaamaan taudin monimutkaisia patologisia, geneettisiä ja kliinisiä ominaisuuksia, vaan malleja hyödynnetään toisiaan täydentävästi. (Denic ym., 2011)

## 2. MS-tauti

### 2.1 Patofysiologia

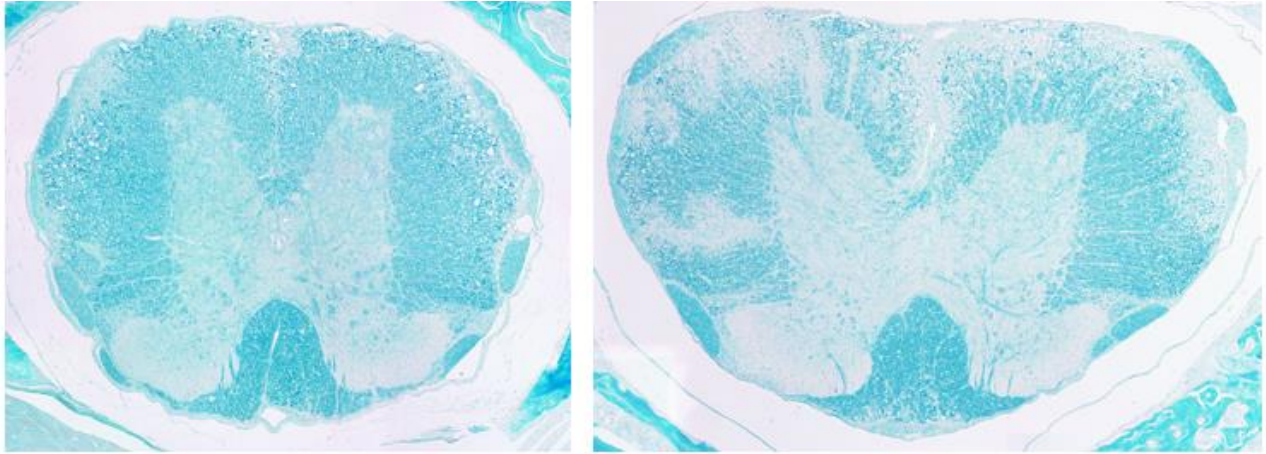
MS-tauti on keskushermoston tulehdussairaus, jossa elimistön immuunipuolustus hyökkää omia kudoksia vastaan (Kidd ym., 2017). Antigeenejä esittelevät dendriittisolut vaikuttavat imusolujen aktivoitumiseen, minkä seurauksena ne alkavat erittää immuunipuolustusta ohjaavia sytokiineja. T-imusolut tunkeutuvat heikentyneen veriaivoesteen läpi keskushermostoon. Niiden

aktivoituminen keskushermostossa aiheuttaa tulehduskaskadin. Imusolujen aktivoituminen houkuttelee paikalle myös muita tulehdussoluja. (Constantinescu, Farooqi, O'Brien, & Gran, 2011) Seurauksena keskushermostossa tapahtuu myeliinin ja oligodendrosyyttien tuhoutumista, gliosia sekä neurodegeneraatiota eli hermosolujen rappeutumista (Gao & Tsirka, 2011). Keskushermostoon tunkeutuvista imusoluista tyypillisesti suurin osa on CD8+-T-imusoluja. Myös CD4+-T-imusolujen ja B-imusolujen toiminta häiriintyy MS-taudissa. (Lassmann & Bradl, 2017) Ei ole varmuutta siitä, mikä aiheuttaa immuunisolujen virheellisen toiminnan. Ei myöskään tiedetä, mikä tulehdussolujen hyökkäyksen primaarinen kohde on, joten aihe vaatii lisää tutkimusta. (Kipp, Nyamoya, Hochstrasser, & Amor, 2017)

Aksonia ympäröivä myeliinituppi nopeuttaa aktiopotentiaalin johtumisnopeutta (Kipp ym., 2017). Tulehdussolut hyökkäävät myeliinin kimppuun, minkä seurauksena myeliinitupet tuhoutuvat, eli tapahtuu demyelinisaatiota (Barrett ym., 2016). Demyelinisaatio hidastaa hermoimpulssien kulkua ja aiheuttaa ionikanavien uudelleen organisoitumista (Kipp ym., 2017). Myeliinikato johtaa kaliumionien vuotamiseen ionikanavien läpi, hyperpolarisaatioon ja sen seurauksena aktiopotentiaalin johtumisen epäonnistumiseen (Barrett ym., 2016). Seurauksena voi olla jopa impulssien kulun täydellinen estyminen (lat. *functio laesa*). Hermoimpulssin johtumista hidastaa lisäksi turvotus keskushermostossa. Nämä patologiset vauriot näkyvät potilaan hermostollisina oireina. (Kipp ym., 2017)

Taudin alkuvaiheessa myelinisoivat oligodendrosyytit säilyvät, jolloin keskushermostossa tapahtuu remyelinisaatiota eli myeliinin uudismuodostusta. Remyelinisaation lisäksi turvotuksen laskeminen helpottaa potilaan hermostollisia oireita. Laajan myeliinikadon seurauksena katkenneita aksoneita ei ole mahdollista korjata, joten tällaisen vahingoittumisen aiheuttama kliininen vammautuminen on pysyvää. Lievästi vahingoittuneet aksonit voivat toipua. Ei ole selvää miten suuri merkitys aksonien vahingoittumisella on oireiden pahentumiselle tai toisaalta remyelinisaatiolla toipumiselle. (Kipp ym., 2017)

MS-tauti vaikuttaa keskushermoston valkeaan ja harmaaseen aineeseen. Histologisista näytteistä on mahdollista havaita eteneviä tulehdussolukertymiä, sekä muita MS-taudin patologisia tunnusmerkkejä. Selkäytimen valkeassa aineessa nähdään usein demyelinisaatiota (kuva 1). (Kipp ym., 2017)



Kuva 1: Histologiset leikkeet EAE-MOG hiirien luxol fast blue-värjäytyistä selkäytimestä. Myeliini näkyy näytteissä sinisenä. Oikean puoleisessa selkäytimessä havaittavissa runsasta ja vasemman puoleisessa lievää demyelinisaatiota valkean aineen alueella. (Dos. Joni Mäki, kuvan käyttöön saatu lupa 18.10.2019)

## 2.2 Epidemiologia ja sairaudelle altistavat tekijät

Arvioidaan, että noin 2-3 miljoonaa ihmistä maailmassa sairastaa MS-tautia (Sen, Mahns, Coorsen, & Shortland, 2019). Tauti puhkeaa tyypillisesti 20-40 vuoden iässä. Sairastuminen ei vaikuta merkittävästi elinajanodotteeseen. (Kidd ym., 2017) MS-tautia pidetään yleisimpänä nuorten aikuisten invalidisoivista keskushermoston sairauksista (Barrett ym., 2016). MS-taudin esiintyvyys vaihtelee eri populaatioiden ja alueiden välillä. Karkeasti tarkasteltuna sairautta esiintyy sitä enemmän, mitä kauemmaksi päiväntasaajalta mennään. Suomi ja muut Pohjoismaat kuuluvat korkean riskin alueisiin. Suomessa alueellisten erojen uskotaan johtuvan demografisista, sosiaalisista ja geneettisistä tekijöistä. (Pirttisalo, Soilu-Hänninen, & Sipilä, 2019)

MS-taudin esiintyvyydessä on havaittu kasvavaa trendiä viime vuosikymmeninä, erityisesti naisilla. Ei ole varmuutta siitä onko syy taudin lisääntyminen vai kehittynyt diagnostiikka. (Pirttisalo ym., 2019) Sairaus on naisilla kahdesta kolmeen kertaa yleisempi kuin miehillä (Sen ym., 2019).

MS-taudin aiheuttavia tekijöitä ei tiedetä varmuudella, mutta sairastumisen ajatellaan johtuvan perintö- ja ympäristötekijöiden yhteisvaikutuksesta. Mahdollisia ympäristön riskitekijöitä ovat esimerkiksi auringonvalon ja D-vitamiinin saannin vähäisyys, tupakointi, sairastettu Epstein-Barrin virus (EBV) sekä ylipaino. Pohjoismaissa D-vitamiinin saanti on talvella heikompaa johtuen auringonvalon vähäisyydestä. D-vitamiini vaikuttaa immuunijärjestelmän toimintaan monella

tapaa. Nämä riskitekijät selittävät siten myös osaltaan sairauden maantieteellistä esiintyvyyttä. Perinnöllisistä tekijöistä adaptiivista immuunipuolustusta säätelevillä geeneillä on vaikutus sairastumisriskiin. (Sundström & Salzer, 2015)

### 2.3 Oireet

Potilailla ilmenee monenlaisia kliinisiä oireita tulehduspesäkkeiden sijainnin ja koon mukaan. Usein ilmeneviä oireita ovat näköhäiriöt, motoriset vaikeudet, kognitiivisten toimintojen heikentyminen, univaikeudet, uupumus ja ahdistuneisuus. Näistä voi aiheutua potilaalle psykologista, ekonomista tai sosiaalista haittaa, vaikeuttaen arjesta selviytymistä ja heikentäen elämänlaatua. (Sen ym., 2019) Nuorten aikuisten työ- ja toimintakyvyn heikentymisellä on myös yhteiskunnallinen merkitys (Kidd ym., 2017).

### 2.4 Tautimuodot

MS-tauti on hyvin monimuotoinen sairaus. Taudista voidaan erottaa eri muotoja riippuen siitä, esiintyykö oireita aaltomaisesti vai tasaisesti lisääntyen. Aaltomainen MS-tauti (engl. relapsing-remitting MS, RRMS) on tyypillinen erityisesti sairauden alkuvaiheessa. (Kipp ym., 2017) RRMS diagnosoidaan arviolta 85%:lla kaikista MS-diagnoosin saaneista (Sen ym., 2019). Aaltomaiseen taudinkulkuun kuuluvat pahenemis- ja toipumisvaiheet. Pahenemisvaiheissa (engl. relapse) potilaalle ilmestyy nopeasti paljon uusia neurologisia oireita johtuen valkean aineen demyelinisaatiosta, aksonien vahingoittumisesta ja immuunisolujen aktivoitumisesta. Valkean aineen myeliinin vahingoittuminen heikentää aktiopotentiaalien kulkua, mikä aiheuttavaa kliinisiä oireita. Pahenemisvaihetta seuraa toipumisvaihe (engl. remission), jolloin potilaan oireet helpottuvat tai lähes katoavat plastisuuden ja remyelinisaation ansiosta. (Kipp ym., 2017)

Suurella osalla (65-75%:lla) RRMS-diagnoosin saaneista tauti kehittyy toissijaisesti etenevään tautimuotoon (engl. secondary progressive course/non-relapsing MS, SPMS) 8-20 vuoden kuluttua sairastumisesta (Sen ym., 2019). Toissijaisesti etenevässä vaiheessa neurologiset vauriot ja oireet pahenevat tasaisesti, eikä huomattavaa toipumista enää tapahdu. Selvästi erotettavia pahenemisvaiheita esiintyy vain harvoin. Taudin toissijaisesti etenevän vaiheen voidaan katsoa johtuvan etenevästä neurodegeneraatiosta, mutta siitä mikä tähän johtaa ei ole varmuutta.

Hypoteeseja on esitetty mikrogliasolujen aktivaatioon, mitokondrion toimintahäiriöön ja reaktiivisiin happiradikaaleihin liittyen. Aihe vaatii lisää tutkimusta. (Kipp ym., 2017)

Ensisijaisesti etenevästä MS-taudista (engl. primary progressive MS, PPMS) kärsii arviolta noin 10% diagnosoiduista potilaista. Tälle tautimuodolle on tyypillistä, että oireet pahenevat vähittäin alusta alkaen. (Sen ym., 2019) PPMS puhkeaa tyypillisesti myöhemmällä iällä kuin RRMS, mikä viittaa siihen, että iän mukana tulleet muutokset aivoissa vaikuttaisivat siihen, millainen taudinkulku tulee olemaan (Lassmann & Bradl, 2017).

Kaikkein harvinaisinta MS-taudin muotoa (engl. progressive relapsing MS, PRMS) esiintyy arviolta vain 5%:lla potilaista. Tälle tautimuodolle on tyypillistä, että se puhkeaa varhaisessa vaiheessa ja siihen kuuluvien pahenemisvaiheiden ja taudin progressiivisuuden kliininen ennustaminen on vaikeaa. (Sen ym., 2019)

Edellä esiteltyjen neljän tautimuodon lisäksi MS-taudista voidaan erottaa oireiden vakavuuden mukaan akuutit ja/tai kroonisen vaiheet. Akuutista, todella aggressiivisesta muodosta (Marburg type) voidaan puhua, mikäli potilas kuolee 1-2 vuoden sisällä taudin puhkeamisesta. Kroonisuus puolestaan viittaa jatkuvaan pitkäaikaiseen vammautumiseen. (Sen ym., 2019)

Potilaan iän on kliinisesti todistettu vaikuttavan taudinkulkuun. Iän avulla voidaan esimerkiksi ennustaa taudin etenemistä toissijaisesti etenevään tautimuotoon. Alle 30-vuotiailla potilailla MS-tauti alkaa tyypillisesti aaltomaisena, kun taas yli 40-vuotiailla potilailla ensisijaisesti etenevänä. Tutkimuksissa on havaittu, että regeneratiiviset prosessit vähentyvät iän myötä. Ikääntyneiden koe-eläinten tutkiminen voi siten auttaa ymmärtämään SPMS- ja PPMS-tautimuotojen takana olevia patologisia mekanismeja. (Kipp ym., 2017)

## 2.5 Diagnosointi

MS-tauti todetaan kliinisesti magneettikuvauksella (MRI) pesäkemäisten tulehdusplakkien sekä potilaan oireiden perusteella (Sen ym., 2019). Aivo-selkäydinnestetutkimuksella on mahdollista todeta MS-taudille tyypilliset oligoklonaaliset immunoglobuliinijuosteet (Barrett ym., 2016). Diagnoosin tekee neurologi McDonaldin kriteerien pohjalta (Pirttialo ym., 2019). Potilaalla tulee esiintyä tietty määrä oirejaksoja ja uusia tulehdusplakkeja ennen kuin diagnoosi on mahdollista tehdä (Constantinescu ym., 2011).

## 2.6 Hoito

Tällä hetkellä käytössä olevat MS-taudin hoitomuodot pyrkivät helpottamaan pahenemisvaiheen aikaisia oireita tai vähentämään pahenemisvaiheiden esiintymisfrekvenssiä (Kipp ym., 2017). Lääkkeet hillitsevät tai viivästyttävät oireiden ilmenemistä, mutta eivät pysäytä taudin etenemistä (Gao & Tsirka, 2011). Lisää tutkimusta tarvitaan, jotta voidaan kehittää taudin etenemisen pysäyttäviä hoitoja (Kipp ym., 2017).

Systeeminen kortikosteroidi on yksi vakiintuneimmista MS-taudin akuuttien pahenemisvaiheiden hoitoon käytetyistä lääkkeistä. Hoito vakauttaa veriaivoestettä sekä helpottaa aktivoituneiden immuunisolujen apoptoosia. Lisäksi tärkeä vaikutus on kudosoödeeman lievittymisellä ja siten aksonien kompression vähentymisellä. Hoidon tarkkaa toimintatapaa ei kuitenkaan vielä täysin ymmärretä. Arvellaan, että hoidon myönteinen vaikutus ei niinkään perustu regeneraatioon, vaan että se johtuisi ennemminkin sen anti-inflammatorisesta ominaisuudesta. Ei tiedetä sitä, miksi anti-inflammatoriset hoitomuodot eivät ole tehokkaita taudin progressiivisessa vaiheessa. (Kipp ym., 2017)

Immunomodulaariset hoidot ovat usein hyödyllisiä muun muassa silloin kun pyritään vähentämään taudin pahenemisvaiheiden esiintymistiheyttä, eli hillitsemään taudinkulkua. Tällaisia lääkkeitä on olemassa useita erilaisia ja muun muassa niiden toimintatapa, sivuvaikutukset ja käyttöluvut vaihtelevat. (Kipp ym., 2017) Esimerkki immunomodulatorisesta lääkkeestä on beetainteferoni (Gao & Tsirka, 2011). Muita MS-taudin hoitamiseen käytettyjä lääkkeitä ovat glatirameeriasetaatti, natalitsumabi, rituksimabi ja fingolimodi (Barrett ym., 2016).

MS-potilaiden kantasoluhoidoilla on ollut jopa mullistavia vaikutuksia, mutta näiden hoitojen haitta- ja pitkäaikaisvaikutuksista, sekä tehokkuudesta ei ole vielä tarpeeksi tutkimustietoa. Tämän takia niitä ei ole vielä voitu vakiinnuttaa MS-taudin kliiniseksi hoitovaihtoehdoksi. Esimerkiksi autologinen hematopoieettinen kantasoluterapia (HSCT) on antanut lupaavia tuloksia aaltomaisesta MS-taudista kärsivien potilaiden hoidossa. Siinä potilaan oma immuunijärjestelmä aluksi tuhoetaan, jonka jälkeen tehdään kantasoluhoido potilaasta itsestä eristetyillä kantasoluilla. (Kidd ym., 2017)



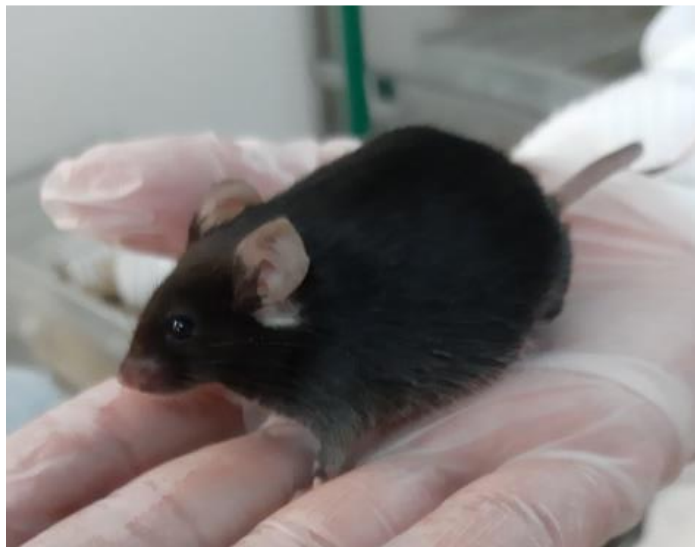
### 3. MS-taudin tutkimus

#### 3.1 Koe-eläimet

Useita eri eläinlajeja on käytetty tautimalleja kehitettäessä (Gao & Tsirka, 2011). Biologisia malliorganismeja ovat esimerkiksi banaanikärpänen (lat. *Drosophila melanogaster*), sukkulamato (lat. *Caenorhabditis elegans*) ja seeprakala (lat. *Danio rerio*). Tutkimuksissa käytetään myös monia eri nisäkkäitä kuten hiiriä, rottia ja sikoja, sillä ne ovat fylogeneettisesti lähempänä ihmistä. (Andersen & Winter, 2019)

MS-potilaiden biopsianäytteet ja autopsia antavat runsaasti tietoa sairauden histopatologiasta (Kipp ym., 2017). Koe-eläimiä käytetään esimerkiksi silloin kun halutaan tunnistaa biomarkkereita tai silloin kun tutkitaan uusien lääkkeiden vaikuttavuutta (Sen ym., 2019). Ihmisillä esiintyviä sairauksia tutkittaessa hyödynnetään usein trans- tai poistogeenisiä eläimiä. Erityisen paljon käytetään jrsijöitä. (Lieschke & Currie, 2007)

Hiiret ovat jo pitkään olleet suosittuja koe-eläimiä tutkittaessa MS-tautia (kuva 2) (Lieschke & Currie, 2007). Näiden lajien lisäksi MS-tautia on mallinnettu myös esimerkiksi apinoilla ja marsuilla (Constantinescu ym., 2011). Tällä hetkellä suurin osa MS-taudin patologian ymmärtämisestä on koe-eläimillä tehdyn tutkimuksen ansiota (Kipp ym., 2017).



Kuva 2: MS-tauti tutkimuksen C57Bl/6 koe-eläinhiiri. Kuva otettu Oulun Yliopiston koe-eläinkeskuksessa.

(Emma Helka Erkkilä, 2019)

### 3.2 Tautimallit

Eläintautimallien käytön ja kehittämisen tavoitteena on parantaa MS-taudin biologisen perustan ymmärtämistä, kehittää parempia hoitomuotoja ja helpottaa diagnosointia (Lieschke & Currie, 2007). MS-taudin monimutkaiset patologiset prosessit vaikeuttavat tautimallien kehittämistä (Gao & Tsirka, 2011). Yksikään malleista ei pysty tarjoamaan täydellistä kuvausta MS-taudin kliinisistä, patologisista ja immunologisista ominaisuuksista, sillä MS-tauti on vain ihmisillä esiintyvä sairaus (Lassmann & Bradl, 2017). Se miten hyvin ja millä laajuudella tautimalli kuvaa MS-taudin kliinisiä oireita riippuu käytetystä mallista ja sen protokollasta (Sen ym., 2019). Mikään malleista ei siten riitä yksinään mallintamaan sairauden kirjoa sen kompleksisessa kokonaisuudessaan (Kipp ym., 2017).

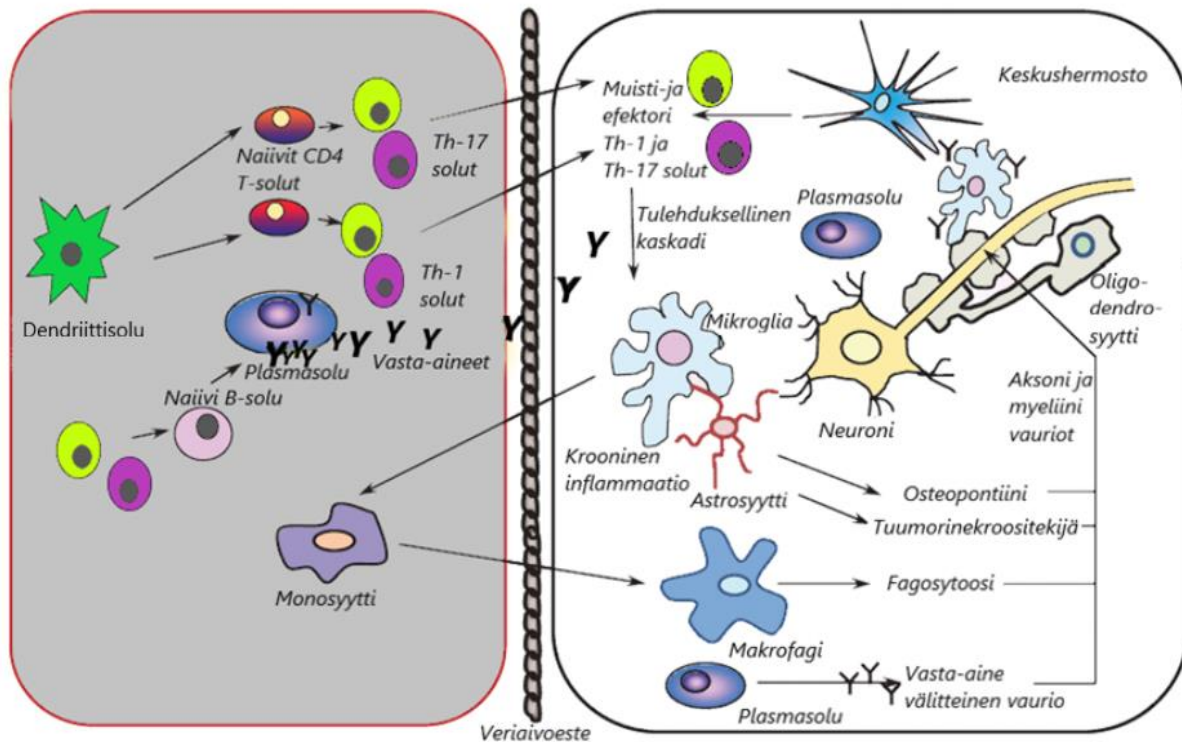
Käytetyimpiä tautimalleja ovat kokeellinen autoimmuuninen enkefalomyeliitti ja toksinen demyelinisaatiomalli cuprizone. Erityisesti kokeellisen autoimmuunisen enkefalomyeliitin suosiosta ja MS-taudin etiologian tutkimiseen ja lääkkeiden kehitykseen nähdystä vaivannäöstä kertoo se, että heinäkuussa 2018 PubMed-tietokannassa oli 12,629 julkaistua artikkelia kokeellisesta autoimmuunista enkefalomyeliitistä. (Sen ym., 2019)

#### 3.2.1 Kokeellinen autoimmuuninen enkefalomyeliitti

EAE eli kokeellinen autoimmuuninen enkefalomyeliitti on käytetyin tautimalli tutkittaessa MS-tautia koe-eläimillä, sillä malli jäljittelee erinomaisesti MS-taudin autoimmuunista patogeneesiä. EAE-tautimalleja voidaan käyttää myös muiden autoimmuunivälitteisten sairauksien tutkimiseen. (Kipp ym., 2017) EAE-protokollia on olemassa useita erilaisia ja ne jäljittelevät MS-taudin eri puolia (Croxford, Kurschus, & Waisman, 2011).

Tällä hetkellä käytössä olevat EAE-protokollat perustuvat pääsääntöisesti CD4+ T-auttajasolujen kautta välittyvään immuunivasteeseen (Lassmann & Bradl, 2017). EAE-mallissa T-solut aktivoituvat keskushermoston ulkopuolella antigeenien ja dendriittisolujen toimesta ja erikoistuvat sytokiineja tuottaviksi Th-17- tai Th-1-soluiksi. Sytokiinit aktivoivat immuunipuolustusta, jonka seurauksena käynnistyy autoimmuunivaste. Aktivoituneet T-solut pääsevät ylittämään veriaivoesteen, sillä lisääntynyt integriinien määrä on heikentänyt sen permeabiliteettia. Tästä seuraa tulehduksellinen kaskadi. Myös vasta-aineet, B-solut ja makrofagit pääsevät keskushermostoon. Plasmasolut syntyvät aktivoituneista B-soluista ja alkavat erittää vasta-aineita aiheuttaen neurodegeneraatiota.

Myeliinin fagosytoosia tapahtuu makrofagien toimesta. Myös muut neurodegeneratiiviset ja toksiset vaikutukset lisäävät tulehdusta keskushermostossa. (Constantinescu ym., 2011) Kuvassa kolme esitetään edellä kuvattu EAE-mallin patogeneesi pääpiirteissään.

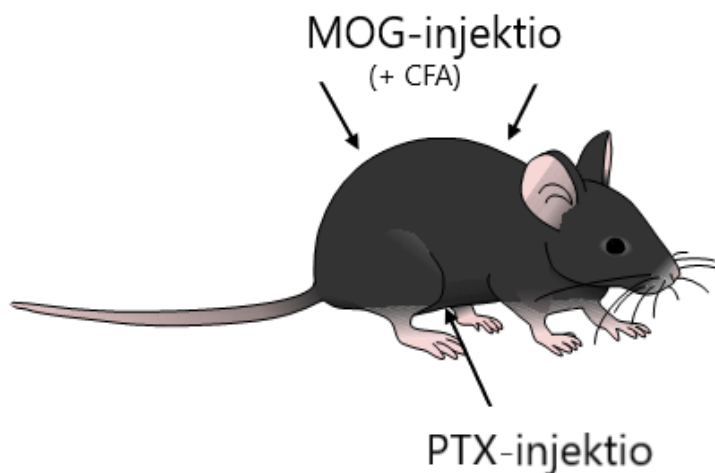


Kuva 3: EAE-tautimallin patogeneesin pääpiirteet (kuva mukailtu Constantinescu ym., 2011).

Mallissa koe-eläimeen injektoidaan antigeeniä, joka voi olla esimerkiksi myeliini oligodendrosyytti glykoproteiini (MOG), myeliinin emäksinen proteiini (MBP) tai proteolipidi proteiini (PLP). Tietty antigeeni on sopiva juuri tietylle lajille ja sen kannalle. (Gao & Tsirka, 2011) Antigeenin yhteydessä koe-eläimeen injektoidaan myös kulloinkin sopivaa voimakasta adjuvanttia. Esimerkiksi Freudin täydellistä adjuvanttia (CFA) käytetään usein. Adjuvantin tarkoituksena on vahvistaa annetun antigeenin vaikutusta tehostamalla perifeerisiä immuunisoluja sekä parantaa mallin toistettavuutta. Petrussis-toksiinia (PTX) käytetään veriaivoesteen aukaisemiseen, jonka seurauksena immuunisolut pääsevät tunkeutumaan keskushermostoon. (Sen ym., 2019)

Immunisaatio voi olla joko aktiivinen tai passiivinen. Aktiivisessa immunisaatiossa elimistöön tuodaan tiettyä antigeeniä yhdessä adjuvantin ja PTX:n kanssa (kuva 4). Passiivisessa immunisaatiossa käytetään puolestaan myeliinille spesifejä aktivoituja T-soluja toisesta yksilöstä. Tämä saa koe-eläimessä aikaan autoimmuunireaktion, mistä puolestaan seuraa enkefalomyeliitti

eli keskushermoston tulehdustila. Kuten ihmisellä esiintyvässä MS-taudissa, niin myös EAE-mallissa keskushermostossa tapahtuva gliosisi, neurodegeneraatio, demyelinisaatio ja tulehdustila johtavat lopulta asteittaiseen halvaantumiseen. (Gao & Tsirka, 2011) EAE siis aiheutetaan koe-eläimelle aina ulkoisen immunisaation avulla. Tällä pyritään jäljittelemään MS-taudin immuunivastetta huolimatta siitä, että ihmisen MS-taudin aiheuttavia antigeenejä ei olla toistaiseksi onnistuttu tunnistamaan. (Constantinescu ym., 2011)



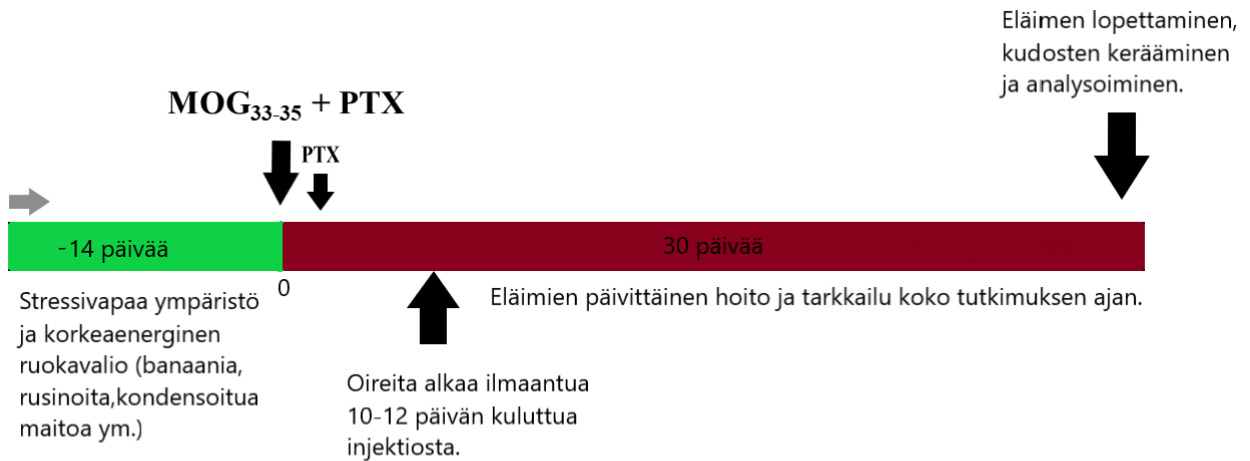
Kuva 4: EAE:n aktiivinen immunisaatio MOG35-55- peptidillä C57Bl/6- naarashiirelle.

(Kuva mukailtu Dos. Joni Mäki, 2019)

Eri EAE- mallit sopivat MS-taudin eri tautimuotojen tutkimiseen, sillä antigeeninä käytetty peptidi, indusointimenetelmä sekä koe-eläimen ikä ja geneettinen kanta määräävät millainen taudinkulku tulee olemaan (Kipp ym., 2017). Esimerkiksi usein käytetty hiirikanta C57BL/6 on altis MOG-antigeenille, mutta ei MBC-immunisaatiolle. Puolestaan usein hyödynnetty rottakanta Lewis on herkkä niin MOG- kuin MBC-antigeenille. Myös antigeenin annoksella ja käytetyllä adjuvantilla on vaikutus taudinkulkuun. (Gao & Tsirka, 2011)

Yksi eniten käytetyistä EAE-malleista on MOG (35–55) -peptidillä indusoitu C57BL/6 hiirikanta (kuva 4). Tässä EAE-protokollassa koe-eläin alkaa halvaantua asteittain noin 10-12 päivää immunisaation jälkeen (kuva 5). Halvaantuminen lähtee hännästä ja takaraajoista. Demyelinisaatio ja inflammaatio vähenevät ennen seuraavaa pahenemisvaihetta, joten tätä mallia ei voida hyödyntää MS-taudin progressiivisuuden tutkimisessa. Myöskään PLP (139-151)-indusoitua EAE-mallia ei voida hyödyntää taudin etenemisen ymmärtämisessä. Sen sijaan vähemmän käytetty

Biozzi ABH EAE-hiirimalli sekä MOG-indusoitu EAE-malli normaalipainoisilla diabeettisilla hiirillä (NOD) soveltuvat taudin progressiivisuuden tutkimiseen. (Kipp ym., 2017)



Kuva 5: EAE:n aktiivinen immunisaatio C57Bl/6-hiirelle. MOG35-55-peptidin injektio yhdessä PTX:n kanssa. Toinen PTX-injektio seuraavana päivänä. Hiiren on oltava 10-13 viikon ikäinen injektioiden aikaan. Ennen immunisaatiota 14 päivän ajan stressivapaa ympäristö. Koe-eläimen lopettaminen 30 päivän kuluttua ensimmäisestä injektiosta. (Kuva mukailtu Dos. Joni Mäki, 2019)

EAE-mallien ansiosta on saatu todella tärkeää tietoa MS-taudin autoimmuunista patologiasta. Tätä tutkimuksista saatua tietoa on voitu hyödyntää muun muassa hoitomuotojen kehittämisessä. (Kipp ym., 2017) Monet käytössä olevista MS-taudin hoitoon kehitetyistä lääkkeistä on kehitetty, testattu ja validoitu EAE-tutkimusten perusteella (Constantinescu ym., 2011). Lääkkeiden avulla pahenemisvaiheiden esiintymistiheyttä on onnistuttu rajoittamaan. Etenevän neurodegeneraation pysäyttävää hoitoa ei mallin avulla ole onnistuttu kehittämään. (Kipp ym., 2017)

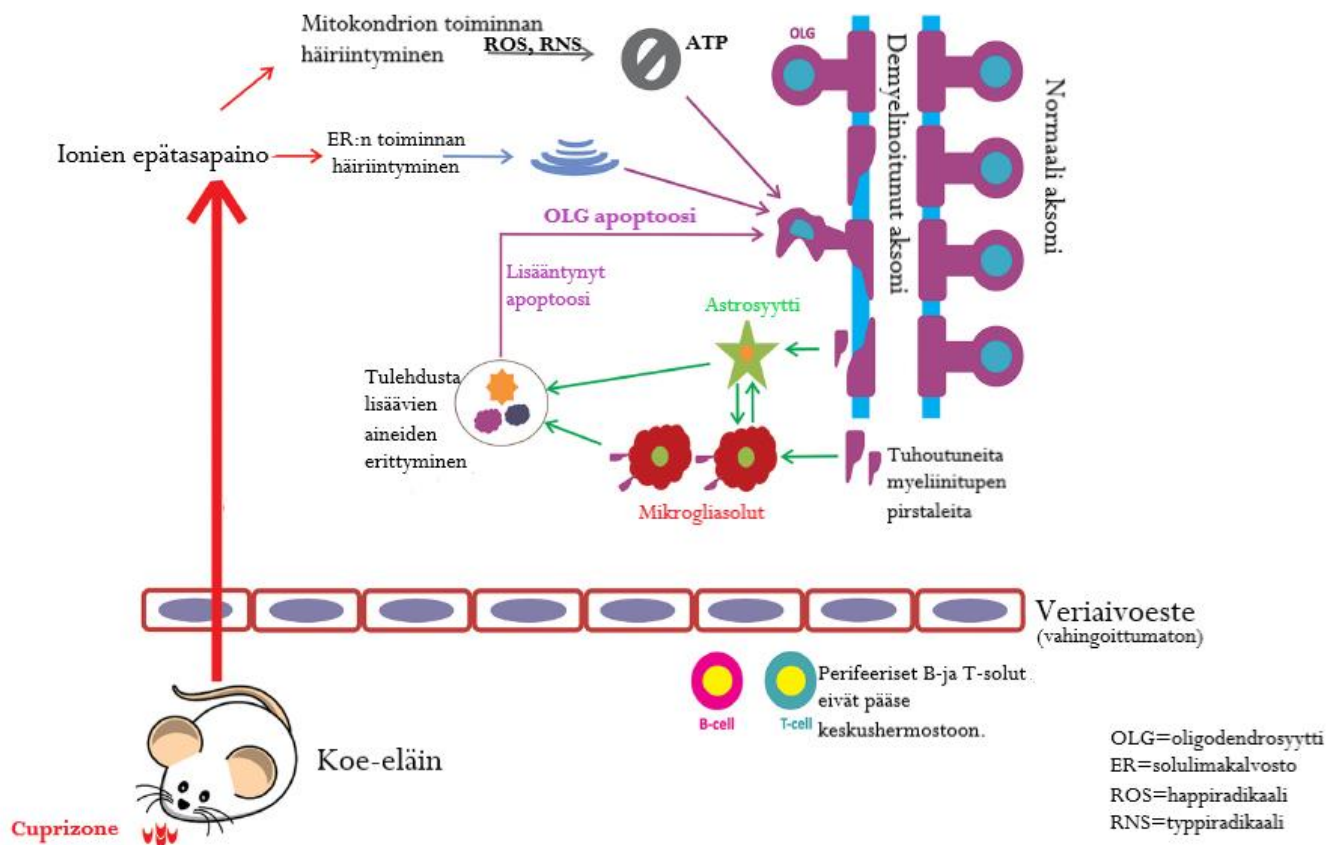
### 3.2.2 Toksiset demyelinisaatiomallit

Toksisissa demyelinisaatiomalleissa koe-eläimeen injektoidaan tai sitä ruokitaan toksisella aineella kuten cuprizonella, lysolesitiinilla tai etidiumbromidilla. Näitä malleja käytetään, kun halutaan tutkia demyelinisaatiota, remyelinisaatiota ja aksonaalisten vaurioiden synty- ja

korjausmekanismeja. (Gao & Tsirka, 2011) Toksiset demyelinisaatiomallit eivät aiheuta imusolujen tunkeutumista keskushermostoon, sillä veriaivoesteen permeabiliteetti ei heikenny. T-soluvastetta ei siis synny kuten EAE-malleissa, vaan demyelinisaatio johtuu oligodendrosyyttien etenevästä apoptoosista. (Sen ym., 2019)

Cuprizonemallissa koe-eläintä (usein hiirtä) syötetään viidestä kuuteen viikkoa cuprizonia (CPZ) sisältävällä ruokavaliolla. Se saa aikaan etenevää demyelinisaatiota keskushermoston rakenteissa, kuten aivokurkiaisessa (lat. *corpus callosum*), hippokampuksessa (lat. *hippocampus*), talamuksessa (lat. *thalamus*) ja pikkuaivoissa (lat. *cerebellum*). Oligodendrosyyttien apoptoosi alkaa, kun CPZ:n aloittamisesta on kulunut yhdestä kolmeen viikkoa. Noin neljän viikkoa kuluttua CPZ:n aloittamisesta tapahtuu gliosia voimakkaasta demyelinisaatiosta johtuen. Tätä vaihetta kutsutaan akuutiksi vaiheeksi. Jos CPZ:n syöttäminen lopetetaan varhaisessa vaiheessa, niin uusia oligodendrosyyttejä alkaa kypsyä niiden esiastesoluista (eng. oligodendrocyte progenitor cell), jonka seurauksena gliosis vähenee, tapahtuu remyelinisaatiota ja koe-eläin alkaa toipua. Mikäli CPZ:n syöttämistä jatketaan 12-14 viikkoa, niin on kyse kroonisesta vaiheesta, mikä kuvaa paremmin ihmisen MS-taudin myöhempiä vaiheita. (Sen ym., 2019)

Cuprizonemallin toimintatapaa ei ymmärretä täysin. Arvellaan, että CPZ estää mitokondriaalisten entsyymien toimintaa soluhengityksessä, sillä se kelatoi kuparia. Kuparin funktio on toimia soluhengityksessä kofaktorina. (Kipp ym., 2017) Uskotaan, että kuparin kelatoiva aine CPZ saisi aikaan myös metalli-ionien kuten sinkin, raudan, natriumin ja mangaanin fysiologista epätasapainoa soluissa eri puolilla kehoa. CPZ aiheuttaa oksidatiivista stressiä, jonka seurauksena lisääntyneet typpi- ja happiradikaalit sekä adenosiinitrifostaatin tuotannon heikentyminen johtavat oligodendrosyyttien apoptoosiin ja lopulta demyelinisaatioon. Oligodendrosyyttien stressiin vaikuttaa mitokondrioiden heikentyneen energiantuotannon lisäksi haitallisia aineita vaarattomaan muotoon pelkistävien entsyymien, kuten glutathioniperoksidaasin vähentynyt määrä. Myeliinin tuhoutumista seuraa astrosyytti- ja mikroglia-solujen aktivoituminen. Kyseiset gliasolut alkavat raivaamaan pois myeliinin pirstaleita. Tässä yhteydessä toksisia aineita kuten typpioksidia alkaa erittyä, mikä puolestaan johtaa lisääntyneeseen oligodendrosyyttien apoptoosiin ja edelleen demyelinisaatioon (kuva 6). (Sen ym., 2019)



Kuva 6: Kaavio cuprizone-tautimallin esitetystä toimintamekanismista.

(Kuva mukailtu Sen ym.,2019)

Oligodendrosyyttien apoptoosi on havaittavissa noin kaksi päivää CPZ-ruokavaliion aloittamisesta. Demyelinisaatio, mikroglioosi, astrogliaosi ja aksoneiden tuhoutuminen ovat edenneet pitkälle 4-5 viikkoa CPZ:n aloittamisesta. Endogeeninen korjausprosessi käynnistyy voimakkaan remyelinisaation ansiosta, mikäli CPZ:n antaminen lopetetaan ja eläintä aletaan syöttämään normaalilla ruokavaliolla. Tämän ansiosta cuprizone-mallia onkin voitu käyttää remyelinisaation tutkimiseen. Cuprizone-mallin koe-eläimissä ja MS-tautidiagnoosin saaneiden potilaiden ruumiinavauksissa on havaittu samoja patologisia muutoksia, kuten aktiivisen kaspasi-3:n ilmentyminen pre-apoptoottisissa oligodendrosyyteissa neurologisten vaurioiden muodostumisen aikana. (Kipp ym., 2017)

Toksisissa tautimalleissa käytettäviä toksineja ovat CPZ:n lisäksi myös lysolesitiini ja etidiumbromidi. Myös näitä toksineja käytettäessä myeliinin tuhoutumista seuraa remyelinisaatio. Lysolesitiiniä ja etidiumbromidia käytetään injektoimalla toksiini

keskushermoston valkeaan aineeseen. Lysolesitiini vaurioittaa myeliinitupen lipidikalvoa. Etidiumbromidi puolestaan aiheuttaa oligodendrosyyttien ja astrosyyttien degeneraatiota. (Lassmann & Bradl, 2017)

### 3.2.3 Virusperäiset demyelinisaatiomallit

Virusperäisissä demyelinisaatiomalleissa tulehduksellinen demyelinisaatio on viruksen aiheuttama. On olemassa arveluita siitä, että jokin virusinfektio vaikuttaisi MS-taudin puhkeamiseen. On ehdotettu, että Epstein–Barrin viruksen infektiolla tai endogeenisten retrovirusten (ERV) aktivaatiolla olisi merkitys MS-taudin synnyn taustalla. Siitä huolimatta, että todisteita MS-taudin aiheuttavasta viruksesta ei ole, niin virusperäisiä kokeellisia malleja voidaan hyödyntää tulehduksellisen demyelinisaation, neurodegeneraation ja taudinaiheuttajien tutkimiseen, tarjoten tietoa MS-taudin patologisista mekanismeista. (Lassmann & Bradl, 2017)

Threilerin enkefalomyeliittivirus (TMEV) on esimerkki virusperäisissä tautimalleissa käytetyistä viruksista (Gao & Tsirka, 2011). TMEV:n lisäksi paljon käytetty on hiiren hepatiittivirus (MHV), joka on iso koronavirus. Näitä kahta virusta käytetään indusoimaan keskushermoston enkefalomyeliitti. Käytetyn viruksen virulenssi ja isäntäeläimen geneettiset ominaisuudet vaikuttavat enkefalomyeliitin etenemiseen ja koe-eläinten hengissä säilymiseen. Esimerkiksi koe-eläimen kyvyllä kehittää spesifinen T-imusoluvaste on merkitystä. Virusperäisten mallien käyttöön liittyy kuitenkin suuria haasteita johtuen niiden monimutkaisesta patogeneesistä. (Lassmann & Bradl, 2017)

### 3.3 Tutkimuksen eettisyydestä huolehtiminen

Koe-eläintutkimuksiin liittyy eettisiä kysymyksiä liittyen käytettyjen eläinten hyvinvointiin ja eläintenoikeuksiin. Erityisen paljon eettisiä kysymyksiä liittyy lajeihin, jotka ovat geneettisesti samankaltaisia ihmisten kanssa. Tutkijoiden täytyy tuntea käyttämiensä lajien käyttäytyminen ja biologia. Lisäksi heillä tulee olla täysi ymmärrys käytetyn tautimallin toimintamekanismista. (Andersen & Winter, 2019)

William Russell ja Rex Burch (1959) ovat tunnettuja koe-eläimiin kohdistuvia toimenpiteitä ohjaavien 3R:n periaatteiden muodostamisesta. Nämä kolme periaatetta ovat nykyään



universaaleja ja suojaavat tieteellisessä tutkimuksessa käytettyjä eläimiä lainsäädännön ohella. Ensimmäinen periaate on eläinkokeiden korvaaminen (eng. replacement) mikä tarkoittaa sitä, että eläimet korvataan jollain toisella tutkimusmenetelmällä, jos sellainen on olemassa. Seuraava periaate (eng. refinement) tarkoittaa eläimiin kohdistuvan kärsimyksen minimoimista esimerkiksi käyttämällä nukutusta ja kipulääkkeitä toimenpiteiden aikana sekä eläimen turvallisesta ja siististä elinympäristöstä huolehtimista. Kolmannen periaatteen (eng. reduction) päämäärä on vähentää tutkimukseen otettavien eläinten lukumäärä. Tutkimukseen tarvitaan kuitenkin tietty, tarpeeksi suuri määrä koe-eläimiä, jotta tulokset ovat tieteellisesti valideja. (Andersen & Winter, 2019) Nämä periaatteet tulee huomioida myös tutkittaessa MS-tautia eläinmalleilla.

#### 4. Yhteenveto

Multippeliskleroosi (MS) on krooninen ja etenevä demyelinisoiva keskushermoston sairaus, joka puhkeaa tyypillisesti varhaisaikuisuudessa. Hermostolliset oireet vaihtelevat vaurioiden sijainnin mukaan, johtaen lopulta potilaan halvaantumiseen. Sairaudesta on mahdollista erottaa eri muotoja riippuen siitä, esiintyykö oireita aaltomaisesti vai tasaisesti lisääntyen.

MS-taudin taustalla olevan patofysiologian ymmärtäminen on edellytys tehokkaiden ja turvallisten hoitojen kehittämiseksi. Tällä hetkellä käytössä olevat lääkkeet ovat suurilta osin koe-eläimillä tehtyjen tutkimusten ansiota. Erityisen paljon käytetty tautimalli on kokeellinen autoimmuuninen enkefalomyeliitti. Myös virusperäisiä ja toksisia demyelinisaatio malleja hyödynnetään usein.

Immunomodulatorisilla lääkkeillä kuten beetainterferonilla on mahdollista vaikuttaa taudinkulkuun, mutta taudin pysäyttävää tai siitä parantavaa hoitoa ei kuitenkaan vielä ole. Kantasoluhoidoissa uskalletaan varoivaisesti nähdä mahdollinen ratkaisu tähän. Kantasoluhoidoihin liittyvät riskit ja pitkäaikaisvaikutukset vaativat kuitenkin vielä runsaasti lisää tutkimusta. Tieteellinen tutkimus edellyttää koe-eläimillä tehtävän tutkimuksen turvallisuudesta ja eettisyydestä huolehtimista.

## 5. Lähteet

- Andersen, M. L., & Winter, L. M. F. (2019). Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 91
- Barrett, K. E., Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., Brooks, H. L., Ganong, W. F., . . . Brook, H. L. (2016). *Ganong's review of medical physiology* (25th edition ed.). New York: McGraw-Hill Education. Haettu: <https://oula.finna.fi/Record/oula.1494971>
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1079-1106.
- Croxford, A. L., Kurschus, F. C., & Waisman, A. (2011). Mouse models for multiple sclerosis: Historical facts and future implications. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(2), 177-183.
- Cuascut, F. X., & Hutton, G. J. (2019). Stem cell-based therapies for multiple sclerosis: Current perspectives. *Biomedicines*,
- Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., & Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 18(1), 21-29.
- Gao, Z., & Tsirka, S. E. (2011). Animal models of MS reveal multiple roles of microglia in disease pathogenesis. *Neurology Research International*, 2011

- Kidd, T., Carey, N., Mold, F., Westwood, S., Miklaucich, M., Konstantara, E., . . . Cooke, D. (2017). A systematic review of the effectiveness of self-management interventions in people with multiple sclerosis at improving depression, anxiety and quality of life. *PLoS ONE*, *12*(10)
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., & Amor, S. (2017). Multiple sclerosis animal models: A clinical and histopathological perspective. *Brain Pathology*, *27*(2), 123-137.
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: Experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, *133*(2), 223-244.
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, *8*(5), 353-367.
- Pirttialo, A. -, Soilu-Hänninen, M., & Sipilä, J. O. T. (2019). Multiple sclerosis epidemiology in finland: Regional differences and high incidence. *Acta Neurologica Scandinavica*, *139*(4), 353-359.
- Sen, M. K., Mahns, D. A., Coorssen, J. R., & Shortland, P. J. (2019). Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *107*, 23-46.
- Sundström, P., & Salzer, J. (2015). Vitamin D and multiple sclerosis-from epidemiology to prevention. *Acta Neurologica Scandinavica*, *132*(S199), 56-61.