

دیدگاه نوین کنترل کانال یونی در بیماری مالتیپل اسکلروزیس با استفاده از مدل آزمایشگاهی سلولی

زهره زارعی قانع: دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

عباس میرشبیعی: دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

علیرضاضوی: استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

عبدالفتاح صراف نژاد: استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نسترن عالیزاده: کارشناس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، هرمزگان، ایران

محمد رضا خرمی زاده: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، مرکز تحقیقات بیو تکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران - نویسنده رابط: khoramza@sina.tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۲/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۹/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: مولتیپل اسکلروزیس (MS) از بیماریهای التهابی شایع سیستم عصبی مرکزی در انسان است و در بیماران مشکلات فراوانی ایجاد می کند. ۴-آمینو پیریدین (4-AP) دارویی وسیع الطیف در مهار کانال K می باشد. این دارو در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس برای کاهش علائم خستگی و بی حالی استفاده میشود است. با توجه به گزارشاتی که در مورد اثرات دیگر این دارو ارائه شده است در این مقاله بر آن هستیم که با استفاده از مدل سلولی بیماری MS شناخت بهتری از مکانیزم عمل آن برای نیل به اهداف زیرمعرفی نماییم: ۱-تاثیر این ماده بر روی پرولیفراسیون و سایتوتوکسیسیته بر سلولهای عصبی مدل. ۲- تاثیر این ماده بر فعالیت آنزیم MMP-9 در این سلولها بررسی میگردد.

روش کار: لولههای U373-MG بعنوان مدل سلولی سیستم عصبی (آستروسایتما) بیماری MS کشت داده شده و با ماده 4-AP در غلظتهای مختلف تیمار شدند. سپس اثر سایتوتوکسیک (ایجاد مرگ سلولی) و پرولیفراتیو ماده 4-AP با استفاده از روش کالریمتریک MTT بررسی گردید و همچنین تاثیر این ماده بر روی فعالیت MMP-9 در سلولهای تیمار شده با روش زایموگرافی ارزیابی گردید.

نتایج: نتایج نشان میدهد که این دارو در غلظتهای ۰/۱ . ۱ اثرات سایتوتوکسیک ناچیز داشته ولی در همین غلظتها اثرات ممانعتی آن بر فعالیت بسیار چشمگیر میباشد ($p < 0/01$). علاوه بر آن بررسی نقش احتمالی پرولیفراتیو نشاندهنده پایداری اثرات دارو بر سلولهای بیمار شده میباشد.

نتیجه گیری: بطور کلی نتایج این پژوهش نشاندهنده تاثیر واضح داروی بر عملکرد سلولی و پایداری این اثرات در غلظتهای با سایتوتوکسیسیته ناچیز بوده که میتواند روشنگر کاربردهای درمانی آتی آن باشد.

واژگان کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، کانال پتاسیم، مدل سلولی، زایموگرافی

مقدمه

4-AP یکی از رایج ترین مهارکننده های کانال های K مورد استفاده می باشد (Judge et al. 2006). این دارو با حلالیت بسیار بالا به آسانی از Blood Brain Barrier (BBB) عبور کرده و برای مهار کانالهای K در CNS استفاده می شود اثرات این دارو با مسدود کردن کانال K بر روی اکسونهای دمیلینه یا انتهای سیناپس میباشد (Judge et al. 2006). مطالعات مختلف نشان میدهد که این دارو وابسته به دوز عمل میکند و دوزهای مختلف کانالهای K متفاوتی را مهار می کنند (Hu et al. 2006). با این وجود تاثیر این ماده بر پروليفراسيون و يا مهار سلولهای عصبی در بیماری MS همچنان ناشناخته است. مدل‌های سلولی مختلف نشان دهنده اهمیت مطالعات تاییدی در مورد نقش این دارو در سیستم عصبی می باشد (Hu et al. 2006). آستروسیت ها از فراوان ترین سلول ها در CNS محسوب میگردند (Falsig et al. 2004). نقش عمده آنها حفظ هموستاز CNS است. با تولید موادی در حفاظت نورون و فرایند ترمیم سلولی دخالت دارند. در پاسخهای التهابی با تولید مدیاتورهای التهابی، کموکاین ها و پروتئاز خارج سلولی ایفای نقش می کنند. بزرگ پروتئازهای همولوگوس وابسته به روی هستند. این آنزیم در تجزیه کردن اکثر پروتئینهای ماتریکس خارج سلولی، تخریب سد خونی-مغزی، مهاجرت سلولهای التهابی به CNS و تجزیه میلین نقش دارد (Waubant 2006; Karabudak et al. 2004; St-Pierre et al. 2003; Rosenberg et al. 2007; Boz et al. 2006). MMP به عنوان مارکی غیر اختصاصی در تخریب BBB محسوب می شود بررسی ها نشان می دهد MMP-9 می تواند در فرایند تخریبی MS دخالت داشته باشد. در مایع مغزی نخاعی این بیماران مقدار

از دست دادن میلین به فرایندی به فرایندی اطلاق می شود که در آن سیستم میلین عصبی مرکزی و محیطی آسیب می بیند. بیماریهای سیستم عصبی مرکزی نوع اکستابی و ارثی هستند (Hafler 2004). مولتیپل اسکلروزیس (MS) شایعترین بیماری اکتسابی و التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) می باشد که موجب دمیلینه شدن CNS می گردد (Judge et al. 2006). ویژگیهای پاتولوژیکی زیر برای دمیلینه شدن ذکر گردیده است:

۱- واکنش شعله شدن میلین میلین در ارتباط با اولیگودندروسایتهاست و موجب شکاف در غلاف میلین می شود.

۲- از دست دادن واقعی میلین با ساییدن غلاف میلین با واسطه ماکروفاژها صورت می گیرد.

۳- حضور آستروسیت ها در محل تخریب اولیگو دندروسایتهای میلین ساز (Waxman et al. 1994).

میزان شیوع MS در جمعیت‌های مختلف متفاوت است و سالانه ۱/۵ تا ۱۱ نفر در هر ۱۰۰۰۰ نفر به این بیماری مبتلا می شوند و این روند همچنان در حال افزایش است (Hafler 2004). حدود ۲/۵ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا هستند. MS رایج ترین بیماری اثرگذار در افراد جوان محسوب می گردد (Edwards et al. 2000). شروع علائم بین ۱۵ تا ۵۰ سال است و غالباً زنان بیشتر از مردان به این بیماری مبتلا می شوند (Hafler 2004). عامل شروع تخریب CNS ناشناخته است (Ewing and Bernard 1998; Fainardi et al. 2006). آسیب اکسون و دمیلینه شدن التهابی این بیماری اتو ایمنی در پاتورژنیماری دخالت دارد بدلیل شکایت بیماران از حالت خستگی پزشکان از داروهای مختلفی منجمله ۴-آمینوپیریدین (4-AP) بمنظور رفع علائم آن و بی رمقی استفاده می کنند (Judge et al. 2006).

در هر حفره با ۵ تکرار مشابه افزوده شد. توضیح آنکه غلظت صفر دارو بعنوان کنترل جهت مقایسه بکار رفته است.

۲. آزمون سایتوتوکسیسیته: سلولهای تیمار شده بمدت ۲۴ ساعت در شرایط فوق در انکوباتور سلولی قرار گرفته و سپس با استفاده از تکنیک **MTT** و بر اساس تجارب چاپ شده قبلی نویسندگان میزان اثرات سایتوتوکسیک ماده بر آنها بررسی گردید (Khorramizadeh et al. 2004) بطور خلاصه روش کار بدین صورت بود که پس از شمارش و تعیین تعداد سلولهای زنده به هر چاهک پلیت تعداد ۲۰۰۰۰ سلول زنده در ۵ تکرار برای هر دوز دارو افزوده میشود. سپس داروی **4-AP** (کمپانی مرک المان) در دوزهای ۰، ۱، ۱-۰، ۲-۰، ۴-۱۰ میلی مولار در هر حفره با ۵ تکرار مشابه افزوده شد. توضیح آنکه غلظت صفر دارو بعنوان کنترل جهت مقایسه بکار رفته است. پس از ۲۴ ساعت تیمار، محیط کشت سلول با محیط کشت حاوی ماده **MTT** غلظت ۱mg/ml تعویض شده و بمدت ۳-۵ ساعت مجدداً در انکوباتور قرار داده شدند. سپس محیط کشت خارج شده و هم حجم آن (۱۰۰ میکرولیتر) در هر حفره ماده **DMSO** (dimethyl sulfoxide) ریخته شد و پس از ۱۵ دقیقه دانسیته نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و ثبت گردید.

۳. آزمون پروليفراسیون: محیط کشت سلولهای تیمار شده پس از ۲۴ ساعت با محیط تازه عاری از ماده تعویض گردید و سلولها در شرایط جدید بمدت ۲۴ ساعت دیگر در انکوباتور سلولی نگهداری شده و نهایتاً با تکنیک **MTT** قدرت حیاتی سلولها بررسی گردید.

۴. آنالیز فعالیت آنزیم **MMP-9**: از سوپ رویی سلولهای کشت داده شده در مراحل قبل برای انجام این آزمون بر اساس تکنیک زایموگرافی نمونه برداری گردید و تا روز انجام آزمون در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد

آن افزایش می یابد (Avolio et al. 2005). با توجه به گزارشاتی که در مورد اثرات داروی **4-AP** ارائه شده است در این طرح بر آن هستیم که با استفاده از مدل سلولی آستروسایتوما (**U373-MG**) شناخت بهتری از مکانیسم آن برای نیل به اهداف زیر بدست آوریم:

تاثیر این ماده بر روی پروليفراسیون و سایتوتوکسیسیته سلولهای مدل در بیماری **MS** بررسی می گردد.

تاثیر دارو بر روی فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها (**MMP-9**) به علت اهمیت فراوان آنها در در تخریب سد خونی-مغزی بررسی می گردد.

روش کار

۱. کشت و تیمار سلولهای مدل: سلولهای رده سلولی **U-373MG**، انسانی است و از نظر مرفولوژی شبه اپی تلیال می باشد و اولین بار از تومور بدخیم یک خانم ۶۶ ساله قفقازی بدست آمد. رده سلولی **U-373MG** مورد استفاده در این مطالعه از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

بعد از انتقال آن به اتاق کشت سلولی از زیر میکروسکوپ بررسی گردید. تا از وضعیت سلولها اطلاع حاصل گردد. اگر به تعویض محیط کشت نیاز داشته باشد، محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم و آنتی بیوتیک به مقدار ۶-۴ میلی لیتر برای فلاسک **25cm2** اضافه کرده و در انکوباتور **۳۷** درجه و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار داده می شود. مدت دوره انکوباسیون تا زمانی ادامه می یابد که سلولها از نظر تراکم به میزان ۷۰ درصد برسند تا بتوان آنها را به پاساژ داده و به پلیتهای **۹۶** خانه کشت سلولی انتقال داد. در این هنگام، پس از شمارش و تعیین تعداد سلولهای زنده به هر چاهک پلیت تعداد ۲۰۰۰۰ سلول زنده در ۵ تکرار برای هر دوز دارو افزوده میشود. سپس داروی **4-AP** (کمپانی مرک المان) در دوزهای ۰، ۱، ۱-۰، ۲-۰، ۴-۱۰ میلی مولار

با استفاده از تست آزمون مستقل t-test ($p=0/05$) تایید شده است. به عبارت دیگر فقط از غلظت 2 تا 10 میلی مولار 4-AP حیات سلولی کاهش می یابد. یعنی اینکه داروی فوق در غلظت های 0,1 و 1 میلی مولار اثرسایتوتوکسیسیته بسیار ناچیز و قابل اغمازی دارد. این نکته از دیدگاه تاثیر داروی 4-AP بر عملکرد سلولی مانند فعالیت MMP و سایتو کاین ها اهمیت دارد که در ادامه توضیح داده می شود. نتایج حاصل از اثر بررسی پرولیفراسیون سلولی بر روی سلول های U-373MG پس از 24 ساعت تیمار سلولی نشان می دهد که در غلظت های 0 و 0,1 اثر پرولیفراتیو قابل انتظاری در سلول ها دیده می شود اما از غلظت 1 میلی مولار به بعد با وجود حذف دارو از محیط کشت، پرولیفراسیون سلولی به تدریج محدود و ممانعت می گردد. خاطر نشان می گردد این یافته از مقایسه پرولیفراسیون (نمودارهای با الگوی نقطه دار) با سایتوتوکسیسیته (نمودارهای با الگوی یک دست مشکی) به دست آمده است. این دارو در غلظت های 5 و 10 میلی مولار روند کاهش حیات سلولی را بدون در معرض قرار گیری با دارو ادامه می دهد. و آنالیز آماری در دو غلظت 5 و 10 میلی مولار نشان دهنده تفاوت معنی داری بین پرولیفراسیون و سایتو توکسیسیته می باشد

($p < 0/05$) این نکته تایید دیگری بر یافته جدید این پژوهش دال بر پایداری اثر داروی 4-AP می باشد. زیرا همان طور که در روش ها اشاره گردید در آزمون پرولیفراسیون بر خلاف آنچه که در آزمون سایتو توکسیسیته انجام شده است 24 ساعت بعد از تیمار محیط کشت سلول ها با محیط تازه بدون دارو تعویض شده و سلول ها مدت 24 ساعت دیگر در این محیط کشت کامل نگه داری گردیده و دیگر تحت تاثیر مستقیم دارو نیستند. 1- اثر مهاری داروی 4-AP بر روی فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز 9 در سلول های U373-MG با استفاده از روش زایموگرافی مورد بررسی قرار گرفت. آنگاه، نتایج

نگهداری شد. این آزمون بر اساس تجارب چاپ شده قبلی نویسندگان انجام شد (Hajiaghaiee et al. 2007). برای آنالیز آماری از آزمون t test استفاده گردید و $p \leq 0/005$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج بدست آمده از این پژوهش به ترتیب زیر ارائه میگردد.

1. کشت سلولهای U373-MG: در نمودار انمای کلی سلولهای کشت داده شده دیده می شود.
2. اثرات سایتوتوکسیک: نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف 4-AP در دوره زمانی 24 ساعت بر روی سلول های U-373MG در نمودار 2 ارائه می گردد.
3. اثرات پرولیفراتیو: نتایج این آزمون در نمودار 3 نشان داده می شود.
4. بررسی اثرات داروی 4-AP بر روی عملکرد سلول (فعالیت MMP-9) با استفاده از روش زایموگرافی

بحث

تاکنون نتایج جالبی در مورد اثرات متنوع دارویی ممانعت کننده های کانال یونی بر روی سلولهای سیستم عصبی مرکزی و بیماریهای مرتبط با آن مانند مالتیپل اسکلروزیس توسط پژوهشگران گزارش گردیده است (Franciosi et al. 2006; Putzki et al. 2008; Wulff et al. 2003; Ortega-Gutiérrez et al. 2005; Caggiano and Kraig 1998; Judge et al. 2006). با این وجود، یافته های پژوهش حاضر با توجه به بررسی دقیق اثرات سایتوتوکسیک و مقایسه آن با اثرات پرولیفراسیون و همچنین ارزیابی پایداری این اثرات بر فونکسیون سلولهای در تولید آنزیم مهم MMP-9 بی سابقه بوده است. نتایج آزمون سایتوتوکسیستی نشان دهنده تفاوت معنی دار اثر غلظت های بالای 2mM بر روی حیات سلولی می باشد. این تفاوت ها از نظر آماری

- ۱- ماده ۴-AP در غلظت‌های پایین اثرات سایتوتوکسیک ناچیزی دار. و
- ۲- در همین غلظت‌های پایین اثرات فانکشنال ماده ۴-AP در مهار آنزیم MMP9 پایدار و چشمگیر بوده است.
- ۳- بنابراین، مهار MMP9 میتواند در کاهش آسیب به سد خونی مغزی و عبور سلول‌های التهابی تاثیر گذار باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بصورت پایان نامه کارشناسی ارشد ایمنی شناسی در دانشکده بهداشت و در قالب طرح تحقیقاتی در دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد ثبت گردیده است.

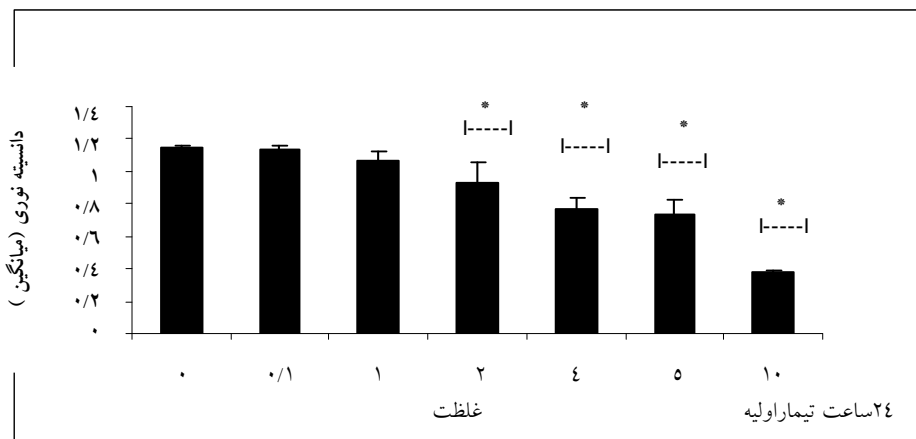
بدست آمده از دانسیتومتری با استفاده از آزمون آماری مستقل t-test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج نشان می دهد که این دارو اثر مهاری معنا داری ($p < 0.05$) بر روی فعالیت آنزیم دارد. اما آنچه که در مقایسه با نتایج آزمون های بررسی فعالیت حیاتی بسیار جالب توجه می باشد مهار فعالیت MMP9 در غلظت های بدون سایتوتوکسیسیته و یا با سایتوتوکسیسیته بسیار ناچیز می باشد. این نتایج از نظر کاربردهای آتی این دارو حائز اهمیت میباشد.

نتیجه گیری

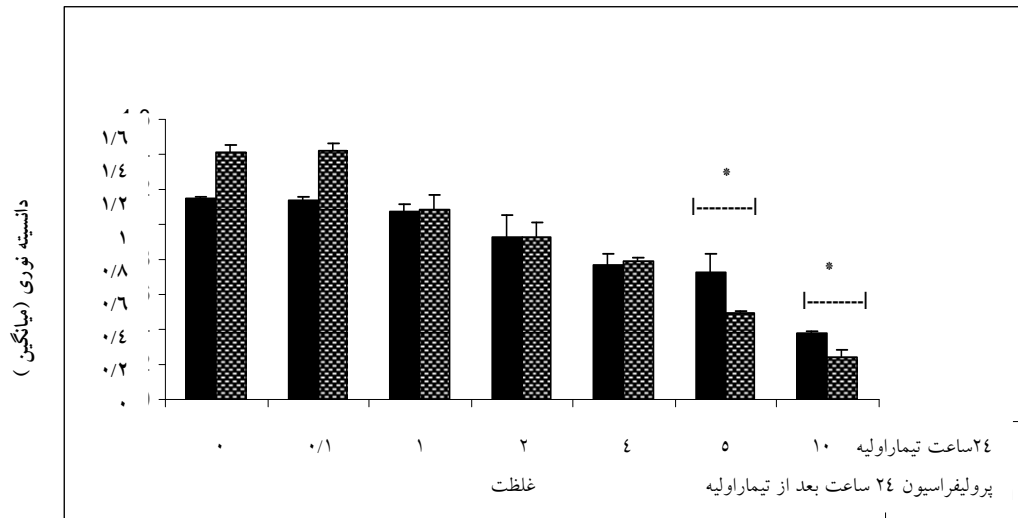
در یک نگاه کلی نتایج این پژوهش نشان میدهد که:



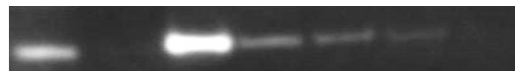
نمودار ۱- شمای کلی سلولهای U373-MG کشت داده شده X40



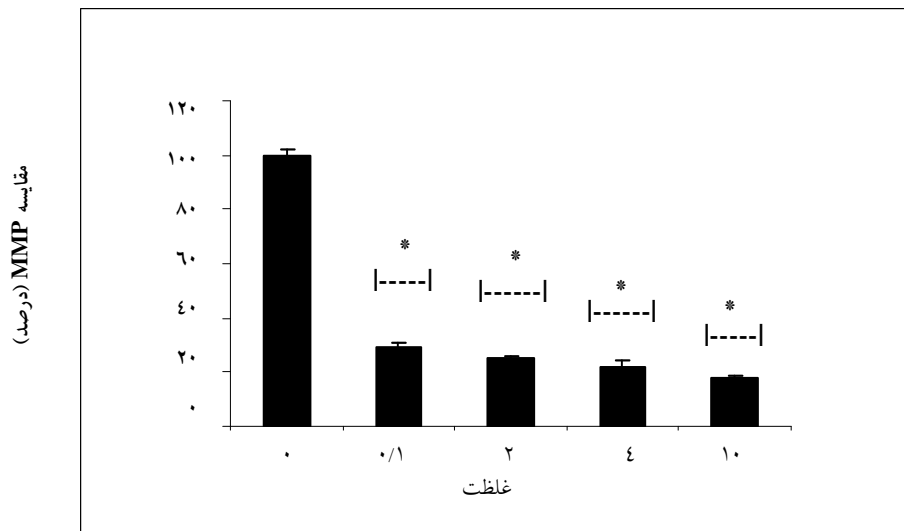
نمودار ۲- بررسی اثر سایتوتوکسیک 4-AP بر روی سلول های U373-MG پس از ۲۴ ساعت



نمودار ۳- بررسی اثرات پرولیفراتیو 4-AP بر روی سلولهای U-373MG

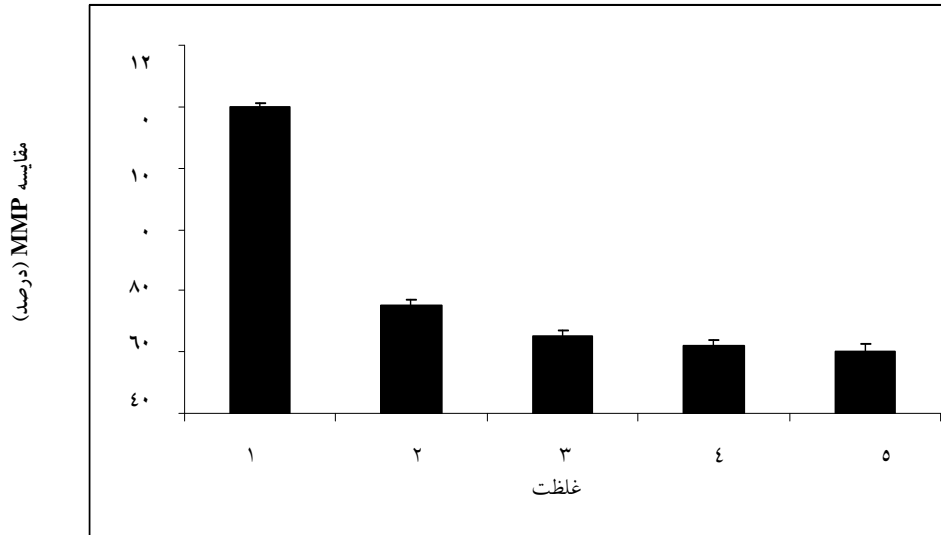


نمودار ۴- الف - عکس ژل زایموگرافی MMP-9 حاصل از تیمار سلولها با 4-AP



نمودار ۴- ب- نتایج آنالیز زایموگرافی پس از آزمون سایتوتوکسیسیته (مقادیر بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد میانگین بیان شده اند)

ب: پس از آزمون پرولیفراسیون:



نمودار ۴-ج- نتایج آنالیز زایموگرافی پس از آزمون پرولیفراسیون (مقادیر بر اساس میانگین \pm خطای استاندارد میانگین بیان شده اند)

References

- Avolio, C., Filippi, M., Tortorella, C., Rocca M.A., Ruggieri, M. and Agosta, F., 2005. Serum MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios in multiple sclerosis: relationships with different magnetic resonance imaging measures of disease activity during IFN-beta-1a treatment. *Mult Scler.* 11, pp. 441-6.
- Boz, C., Ozmenoglu, M., Velioglu, S., Kilinc, K., Orem, A. and Alioglu, Z., 2006. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 108, pp.124-8.
- Caggiano, A.O. and Kraig, R.P., 1998. Prostaglandin E2 and 4-Aminopyridine Prevent the Lipopolysaccharide-Induced Outwardly Rectifying Potassium Current and Interleukin-1; Production in Cultured Rat Microglia. *J Neurochem.* 70, pp. 2357-68.
- Edwards, J.A., Denis, F. and Talbot, P.J., 2000. Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. *Journal of Neuroimmunology*, 108, pp.73-81.
- Ewing, C. and Bernard, C.C.A., 1998. Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Cell Bio*, 76, pp. 47-54.
- Fainardi, E., Castellazzi, M., Bellini, T., Manfrinato, M.C., Baldi, E. and Casetta, I., 2006. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 12, pp. 294-301.
- Falsig, J., Pörzgen, P., Lotharius, J. and Leist, M., 2004. Specific Modulation of Astrocyte Inflammation by Inhibition of Mixed Lineage Kinases with CEP-1347. *J Immunol.* 15, pp. 2762-70.
- Franciosi, S., Ryu, J.K., Choi, H.B., Radov, L., Kim, S.U. and McLarnon, J.G., 2006. Broad-Spectrum Effects of 4-Aminopyridine to Modulate Amyloid beta

- 1-42-Induced Cell Signaling and Functional Responses in Human Microglia. *J Neurosci*, 26, pp. 11652-64.
- Hafler, D.A., 2004. Multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 113, pp. 788-94.
- Hajiaghvae, R., Monsef-Esfahani, H.R., Khorramizadeh, M.R., Saadat, F., Shahverdi, AR. and Attar, F., 2007. Inhibitory effect of aerial parts of *Scrophularia striata* on matrix metalloproteinases expression. *Phytother Res*, 21, pp.1127-9.
- Holmy, T., 2008. The immunology of multiple sclerosis: disease mechanisms and therapeutic targets. *Minerva Med*, 99, pp.119-40.
- Hu, C.L., Liu, Z., Zeng, X.M., Liu, Z.Q., Chen, X.H. and Zhang, Z.H., 2006. 4-aminopyridine, a Kv channel antagonist, prevents apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology*, 51, pp.737-46.
- Judge, S.I., Lee, J.M., Bever, C.T. and Hoffman, P.M., 2006. Voltage-gated potassium channels in multiple sclerosis: Overview and new implications for treatment of central nervous system inflammation and degeneration. *Journal of Rehabilitation Research & Development*, 43, pp.11-22.
- Karabudak, R., Kurne, A., Guc, D., Sengelen, M., Canpinar, H. and Kansu, E., 2004. Effect of interferon β -1a on serum matrix metalloproteinase—9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in relapsing remitting multiple sclerosis patients. *Journal of Neurology*, 251, pp. 279-83.
- Khorramizadeh, M.R., Falak, R., Pezeshki, M., Safavifar, F., Mansouri, P., Ghahary, A., Saadat, F. and Varshokar, K., 2004. Dermal Wound Fibroblasts and Matrix Metalloproteinases (MMPs): Their Possible Role in Allergic Contact Dermatitis. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 3, pp. 7-11.
- Ortega-Gutiérrez, S., Molina-Holgado, E. and Guaza, C., 2005. Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia*, 1, pp.163-8.
- Putzki, N., Katsarava, Z., Vago, S., Diener, H.C. and Limmroth, V., 2008. Prevalence and Severity of Multiple-Sclerosis-Associated Fatigue in Treated and Untreated Patients. *European Neurology*, 59, pp.136-42.
- Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y. and Mobashery, S., 2007. Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier opening in rodents: Differences in response based on strains and solvents. *Brain Research*, 1133, pp.186-92.
- St-Pierre, Y., Themsche, C.V. and Esteve, P.O., 2003. Emerging Features in the Regulation of MMP-9 Gene Expression for the Development of Novel Molecular Targets and Therapeutic Strategies. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 2, pp. 206-15.
- Waubant, E., 2006. Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Disease Markers*, 22, pp. 235-44.
- Waxman, S.G., Black, J.A., Sontheimer, H. and Kocsis, J.D., 1994. Glial cells and axo-glial interactions: implications for demyelinating disorders. *Clinical Neuroscience*, 2, pp.202-10.
- Wulff, H., Calabresi, P.A., Allie, R., Yun, S., Pennington, M. and Beeton, C., 2003. The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *The Journal of Clinical Investigation*, 111, pp.1703-13.