مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی
دوره ۸ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۹، صفحات : ۹٤ - ۸۷

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

زهره زارعی قانع: دانشجو دوره کارشناسی ارشد،گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
عباس میرشفیعی: دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
علیرضارضوی: 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
محمدرضا 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 دریافت: ۱۳۸۸/۹/۳۰ **تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۲/۲۸**

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.٤-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 میشده است. با توجه به گزارشاتی که در مورد اثرات دیگر این دارو ارائه شده است در این مقاله بر آن هستیم که با استفاده ازمدل سلولی بیماری MS شناخت بهتری از مکانیزم عمل آن برای نیل به اهداف زیرمعرفی نماییم: ۱-تاثیر این ماده برروی پرولیفراسیون وسایتوتوکسیسیته برسلولهای عصبی مدل. ۲- تاثیراین ماده بر فعالیت آنزیم MMP-9در این سلولها بررسی میگردد.

روش کار: لولهای U373-MG بعنوان مدل سلولی سیستم عصبی(آستروسایتوما)بیماریMS کشت داده شده وبا ماده 4-AP در غلظتهای مختلف تیمارشدند. سپس اثر سایتوتوکسیک (ایجاد مرگ سلولی) و پرولیفراتیو ماده4-AP با استفاده از روش کالریمتریکMTT بررسی گردید و همچنین تاثیر این ماده برروی فعالیت MMP-9 در سلولهای تیمارشده 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($p<۰/۰۱$) . علاوه برآن بررسی نقش احتمالی پرولیفراتیو نشاندهنده پایداری اثرات دارو بر سلولهای تیمار شده میباشد.

نتیجه گیری: بطور کلی نتایج این پژوهش نشاندهده 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

ازدست دادن میلین به فرایندی بـه فراینـدی اطـلاق می شود که در آن سیستم میلین عصبی مرکـزی و محیطـی آسیب می بینـد.بیماریهـای سیـستم عـصبی مرکـزی نـوع اکـستابی و ارثـی هـستند(Hafler 2004). مولتیپـل اسکلروزیس (MS) شایعترین بیمـاری اکتـسابی والتهـابی مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) می باشد که موجـب دمیلینـه شـدن CNS مـی گـردد(Judge et al. 2006). ویژگیهای پاتولوژیکی زیربرای دمیلینه شدن ذکـر گردیـده است:

۱-واکوئولـه شـدن میلـین میلـین در ارتبـاط بـا اولیگودندروسایتهاست وموجب شـکاف در غـلاف میلـین می شود.

۲- ازدست دادن واقعی میلین با ساییدن غـلاف میلـین بـا واسطه ماکروفاژها صورت می گیرد.

۳- حـضور آستروسـیت هـا در محـل تخریـب اولیگـو دندروسایتهای میلین ساز(Waxman et al. 1994).

میزان شیوع MS در جمعیتهـای مختلـف متفـاوت است و سالانه ۱/۵ تا ۱۱نفردر هر۱۰۰۰۰۰نفربه این بیماری مبـتلا مـی شـوندواین رونـد همچنـان در حـال افـزایش است(Hafler 2004). حدود۲/۵ میلیون نفردر جهان بـه این بیماری مبتلا هستند. MS رایج ترین بیمـاری اثرگـذار در افراد جـوان محـسوب مـی گـردد (Edwards et al. 2000.) شروع علائم بین ۱۵تا ۵۰ سال است وغالبا زنـان بیشتر از مردان به این بیماری مبـتلا مـی شـوند (Hafler 2004.) عامـل شـروع تخریـب CNS ناشـناخته است (Ewing and Bernard 1998; Fainardi et al 2006.) آسیب اکسون ودمیلینه شدن التهابی ایـن بیمـاری اتو ایمیون در پاتوژنزبیماری دخالـت دارد بـدلیل شـکایت بیماران از حالت خستگی پزشـکان از داروهـای مختلفـی منجمله ٤-آمینوپیریدین(4-AP) بمنظور رفع علائـم آن و بی رمقی استفاده می کنند(Judge et al. 2006).

4-AP یکی از رایج ترین مهارکننده هـای کانـال هـای K مورد استفاده می باشد (Judge et al. 2006). ایـن دارو بـا حلالیـت بـسیار بـالا بـه آسـانی از Blood Brain Barrier (BBB) عبورکرده وبرای مهار کانالهای K در CNS استفاده می شوداثرات ایـن دارو بـا مـسدود کـردن کانال K بـر روی اکـسونهای دمیلینـه یـا انتهـای سـیناپس میباشد (Judge et al. 2006). مطالعات مختلـف نـشان میدهد که این دارو وابسته به دوز عمل میکنـد و دوزهـای مختلـف کانالهـای K متفـاوتی را مهـار مـی کننـد (Hu et al. 2006). بـا ایـن وجـود تـاثیر ایـن مـاده بـر پرولیفراسیون ویا مهار سـلولهای عـصبی در بیمـاری MS همچنان ناشناخته است.مدلهای سلولی مختلف نشان دهنده اهمیت مطالعات تاییدی در مورد نقش این دارو در سیستم عصبی می باشـد(Hu et al. 2006). آستروسـیت هـا از فـراوان تـرین سـلول هـا در CNS محـسوب میگردنـد (Falsig et al. 2004). نقش عمده آنها حفظ هموسـتاز CNS است.با تولید موادی در حفا ظت نـورون و فراینـد تـرمیم سـلولی دخالـت دارنـد. در پاسـخهای التهـابی بـا تولیـد مـدیاتورهای التهـابی ، کموکـاین هاوپروتئـاز خـارج سـلولی ایفـای نقـش مـی کننـد. MMPs (Matrix Metallo Proteinases) خـانواده بزرگ پروتئازهای همولوگوس وابسته به روی هستند. ایـن آنزیم در تجزیه کردن اکثـر پروتئینهـای مـاتریکس خـارج سـلولی، تخریـب سـد خـونی-مغزی،مهـاجرت سـلولهای التهـابی بـه CNS وتجزیـه میلـین نقـش دارد (Waubant 2006; Karabudak et al. 2004; St-Pierre et al. 2003; Rosenberg et al. 2007; Boz et al. 2006). MMP بـه عنـوان مـارکی غیـر 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

آن افزایش می یابد(Avolio etal. 2005). با توجه به گزارشاتی که در مورد اثرات دارو ی 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 پرولیفراسیون 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 ٦٦ ساله قفقازی بدست آمد. رده سلولی U-373MG مورد استفاده در این مطالعه از بانک سلولی انستیتو پاستورایران 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 ٦-٤ 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 در صد برسند تا بتوان آنها را به پاساژ داده و به پلیتهای ۹٦ 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 ۰-۰,۱- ۱ -۲ -٤ - ۱۰میلی مولار در هر حفره با ۵ تکرار مشابه افزوده شد. توضیح انکه غلظت صفر دارو بعنوان کنترل جهت مقایسه بکار رفته است.

۲. آزمون سایتوتوکسیسیته: سلولهای تیمار شده بمدت ٢٤ 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 ۰-۰,۱- ۱ -۲ -٤ - ۱۰میلی مولار در هر حفره با ۵ تکرار مشابه افزوده شد. توضیح انکه غلظت صفر دارو بعنوان کنترل جهت مقایسه بکار رفته است. پس از ٢٤ ساعت تیمار، محیط کشت سلول با محیط کشت حاوی ماده MTT غلظت 1mg/ml تعویض شده و بمدت ۳-۵ ساعت مجددا 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 وثبت گردید.

۳. آزمون پرولیفراسیون: محیط کشت سلولهای تیمارشده پس از ٢٤ ساعت با محیط تازه عاری از ماده تعویض گردید و سلولها در شرایط جدید بمدت ٢٤ ساعت دیگر در انکوباتور سلولی نگهداری شده ونهایتا با تکنیک MTT قدرت حیاتی سلولها بررسی گردید.

٤. آنالیزفعالیت 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 ازمون در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد

نگهداری شد. این آزمون بر اساس تجارب چاپ شده قبلی نویسندگان انجام شد(Hajiaghaiee et al. 2007). برای آنالیز آماری ار آزمون t test استفاده گردید و $p\leq$۰/۰۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

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

۱. کشت سلولها ی U373-MG: در نمدار ۱نمای کلی سلولهای کشت داده شده دیده می شود.

۲. اثرات سایتوتوکسیک: نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف 4-AP در دوره زمانی ٢٤ ساعت بر روی سلول-های U-373MG در نمودار ۲ ارائه می گردد.

۳. اثرات پرولیفراتیو: نتایج این آزمون در نمودار ۳ نشان داده می شود.

٤. 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 سایتوکسیک و مقایسه آن با اثرات پرولیفراسیون وهمچنین ارزیابی پایداری این اثرات بر فونکسیون سلولهای در تولید آنزیم مهم MMP-9 بی سابقه بوده است. نتایج آزمون سایتوتوکسیستی نشان دهنده تفاوت معنی داراثر غلظت ها ی بالای 2mM بر روی حیات سلولی می باشد. این تفاوت ها از نظر آماری با استفاده از تست آزمون مستقل t-test (p=۰/۰۵) 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 ۰,۱ و ۱ میلی مولار اثرسایتوتوکسیسیته بسیار ناچیز و قابل اغماضی دارد. این نکته از دیدگاه تاثیر داروی 4-AP بر عملکرد سلولی مانند فعالیت MMP و سایتو کاین‌ها اهمیت دارد که در ادامه توضیح داده می‌شود. نتایج حاصل از اثر بررسی پرولیفراسیون سلولی بر روی سلول‌های U-373MG پس از ٢٤ ساعت تیمار سلولی نشان می‌دهد که در غلظت‌های ۰ و ۰/۱ اثر پرولیفراتیو قابل انتظاری در سلول ها دیده می شود اما از غلظت ۱ 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 غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی مولار روند کاهش حیات سلولی را بدون در معرض قرار گیری با دارو ادامه می دهد. و آنالیز آماری در دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی مولار نشان دهنده تفاوت معنی داری بین پرولیفراسیون و سایتو توکسیسیتی می باشد (p <۰/۰۵) این نکته تایید دیگری بر یافته جدید این پژوهش دال بر پایداری اثر داروی 4-AP می باشد. زیرا همان طورکه در روش ها اشاره گردید در آزمون پرولیفراسیون بر خلاف آنچه که در آزمون سایتو توکسیسیتی انجام شده است ٢٤ ساعت بعد از تیمار محیط کشت سلول ها با محیط تازه بدون دارو تعویض شده و سلول ها مدت ٢٤ ساعت دیگر در این محیط کشت کامل نگه داری گردیده و دیگر تحت تاثیر مستقیم دارو نیستند.

۱- اثر مهاری داروی 4-AP بر روی فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در سلول های U373-MG با استفاده از روش زایموگرافی مورد بررسی قرار گرفت. آنگاه، نتایج

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 ($p <$ ۰/۰۵) بر روی فعالیت آنزیم دارد. اما آنچه که در مقایسه با نتایج آزمون های بررسی فعالیت حیاتی بسیارجالب 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:

۱- ماده AP-٤ در غلظتهای پایین اثرات سایتوتوکسیک ناچیزی دار. و

۲- در همین غلظتهای پایین اثرات فانکشنال ماده AP-٤ در مهار آنزیم MMP9 پایدار وچشمگیربوده است.

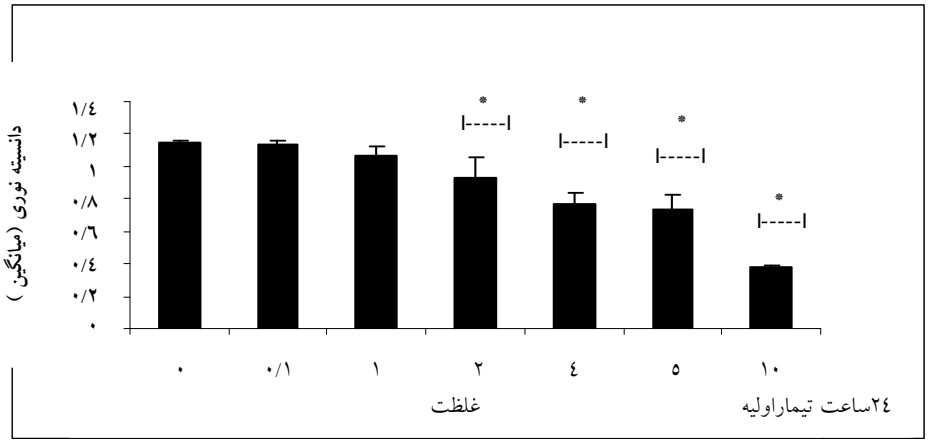
۳- بنابراین، مهار MMP9 میتواند در کاهش آسیب به سد خونی مغزی و عبور سلول های التهابی تاثیر گذار باشد.

تشکر و قدردانی

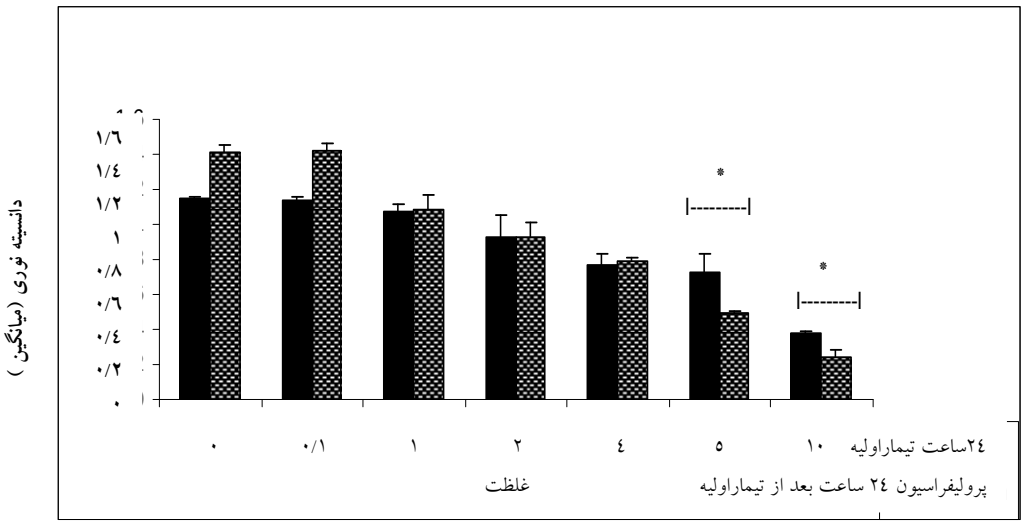
این پژوهش بصورت پایان نامه کارشناسی ارشد ایمنی شناسی در دانشکده بهداشت و در قالب طرح تحقیقاتی دردانشگاه

علوم پزشکی تهران با کد ٦٨٩٠ثبت گردیده است.

نمودار ۱- شمای کلی سلولهای U373-MGکشت داده شده X40

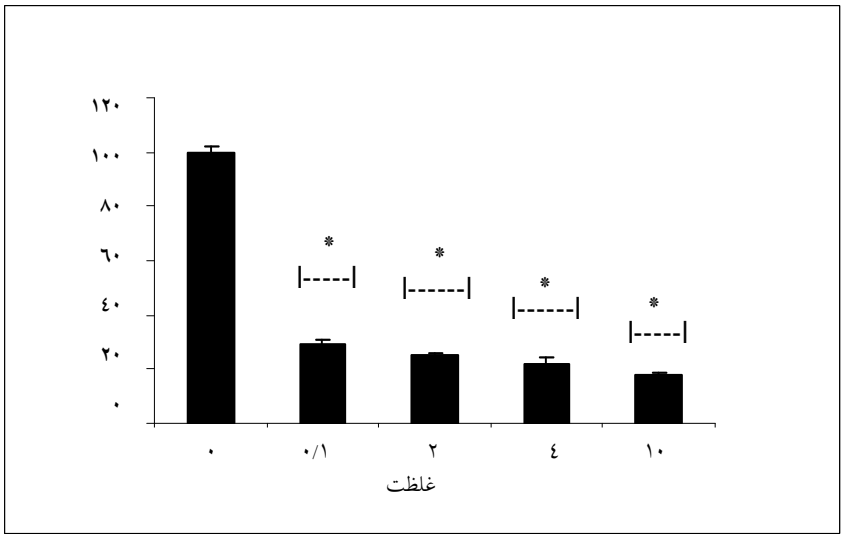


نمودار ۲- بررسی اثر سایتوتوکسیک 4-AP بر روی سلول های U373-MG پس از ۲٤ ساعت



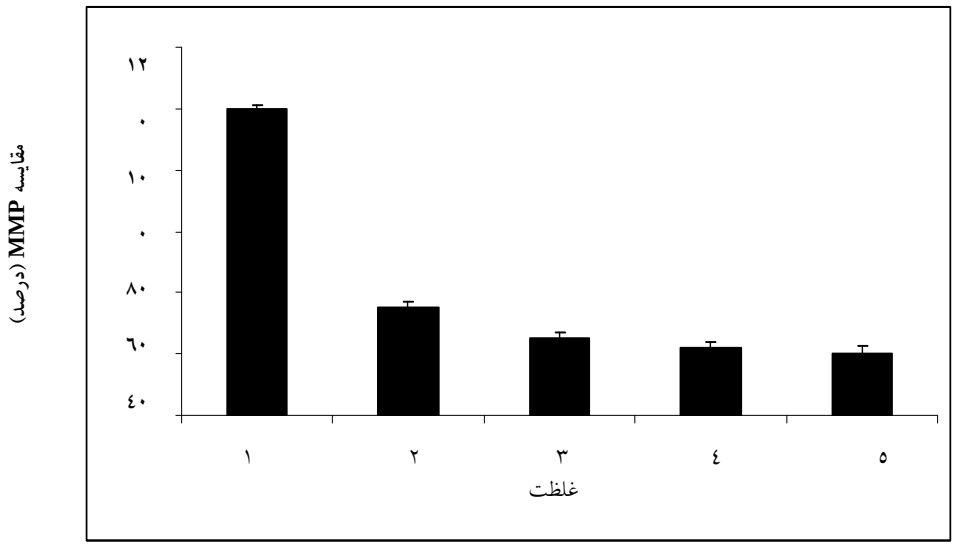
نمودار۳- بررسی اثرات پرولیفراتیو4-AP بر روی سلولهای U-373MG

نمودار ٤- الف - عکس ژل زایموگرافی MMP-9حاصل از تیمار سلولها با 4-AP



نمودار ٤-ب- نتایج آنالیز زایموگرافی پس از آزمون سایتوتوکسیسیته(مقادیر بر اساس میانگین±خطای استانداردمیانگین بیان شده اند)

ب: پس ازآزمون پرولیفراسیون:



نمودار ٤- ج- نتایج آنالیز زایموگرافی پس از آزمون پرولیفراسیون (مقادیر بر اساس میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده اند)

Refrences

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, HB., 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.

Hajiaghaee, 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. *Jonrnal 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 ß-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 Metaloproteinases (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 & Allerg, 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.