

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
Τμήμα Ηλεκτρολόγων & Ηλεκτρονικών Μηχανικών



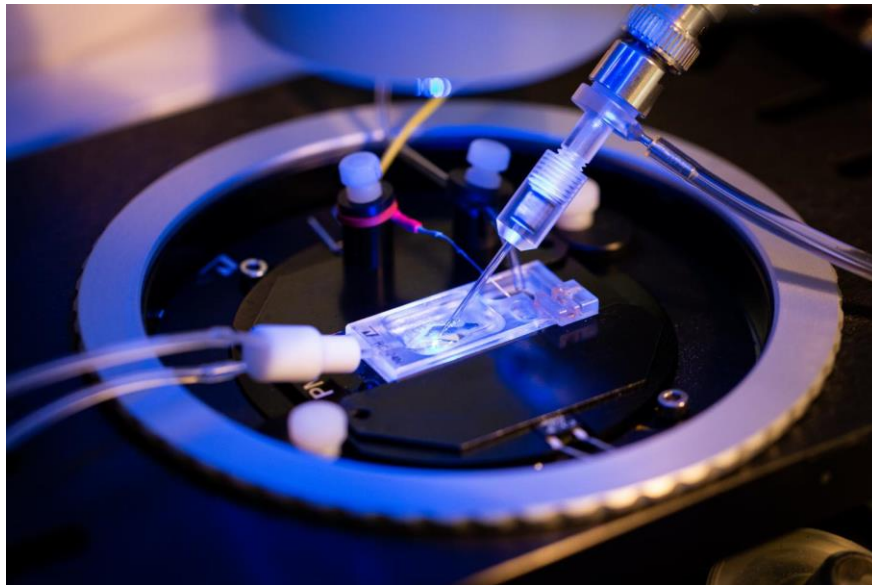
UNIVERSITY of WEST ATTICA  
FACULTY OF ENGINEERING  
Department of Electrical & Electronics  
Engineering

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
Διαδικτυωμένα Ηλεκτρονικά Συστήματα

Master of Science in  
Internetworked Electronic Systems

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Καταγραφή, ανάλυση και μοντελοποίηση βιοηλεκτρικών  
σημάτων από ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα



Μεταπτυχιακός Φοιτητής: Χαριτάκης Ιωάννης, ΑΜ: 0033

Επιβλέπουσα: Ραγκούση Μαρία, Καθηγήτρια

ΑΙΓΑΛΕΩ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2020

---

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
Τμήμα Ηλεκτρολόγων & Ηλεκτρονικών Μηχανικών



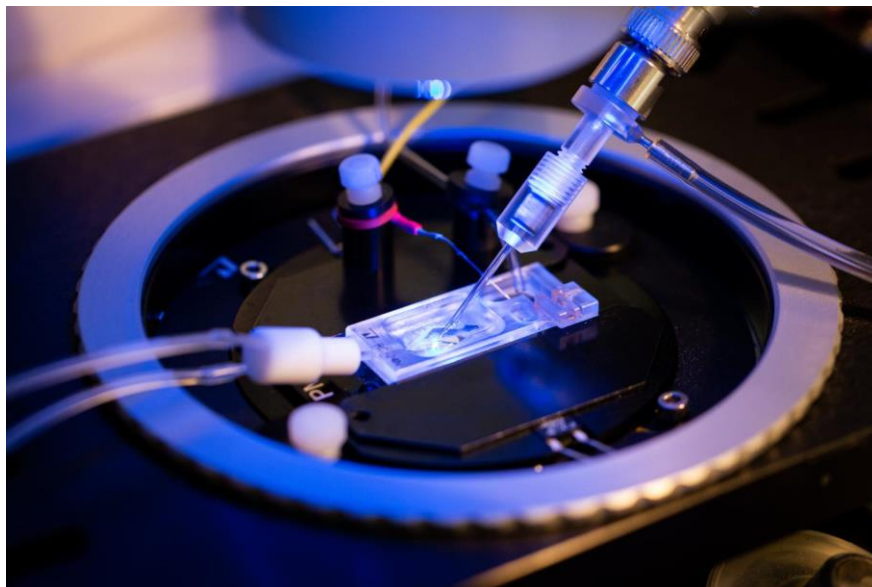
UNIVERSITY of WEST ATTICA  
FACULTY OF ENGINEERING  
Department of Electrical & Electronics  
Engineering

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
Διαδίκτυωμένα Ηλεκτρονικά Συστήματα

Master of Science in  
Internetworked Electronic Systems

## MSc Thesis

# Recording, analysis and modeling of bioelectrical signals from human T-lymphocytes



Student: Charitakis Ioannis, Registration Number: 0033

MSc Thesis Supervisor: Rangoussi Maria, Professor

**ATHENS-EGALEO, JANUARY 2020**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια των σπουδών του γράφοντος στο ΠΜΣ «Διαδικτυωμένα Ηλεκτρονικά Συστήματα», στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Ηλεκτρολόγων και Ηλεκτρονικών Μηχανικών, και πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Πειραματικής Νευροφυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας κ. Κορνηλίας Πουλοπούλου.

Η εργασία ασχολείται με την λήψη βιοηλεκτρικών σημάτων από κύτταρα (συγκεκριμένα, από ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα) και την επεξεργασία των σημάτων με στόχο την ανάλυση και τη μοντελοποίησή τους. Η διαδικασία αυτή εντάσσεται στον απώτερο στόχο της συγκριτικής μελέτης των αποτελεσμάτων από κύτταρα που λαμβάνονται από υγιή άτομα και από ασθενείς (εν προκειμένω, πάσχοντες από Πολλαπλή Σκλήρυνση - ΠΣ), για την ακριβέστερη διαφοροδιάγνωση της νόσου, την καλύτερη κατανόηση των χαρακτηριστικών της και τη βελτίωση της χορηγούμενης αγωγής.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται προηγμένες μέθοδοι λήψης, καταγραφής και ανάλυσης σημάτων. Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας την ηλεκτροφυσιολογική μέθοδο καθήλωσης δυναμικού τμήματος κυτταρικής μεμβράνης (patch-clamp) καταγράψαμε την ηλεκτρική δραστηριότητα των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Καλίου (Kv1.3) στα ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΣ. Η μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των διαύλων αυτών έγινε από καταγραφές ηλεκτρικών ρευμάτων επαγομένων από ορθογώνιες εκπολώσεις της κυτταρικής μεμβράνης των Τ-λεμφοκυττάρων από δυναμικό καθήλωσης  $-90$  mV. Από την τιμή των καταγεγραμμένων ρευμάτων κορυφής υπολογίσαμε τον αριθμό των λειτουργικών διαύλων ανά λεμφοκύτταρο βάση της αγωγιμότητας των  $12$  pS του διαύλου Kv1.3.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας κατέδειξε ότι α) οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες του διαύλου Kv1.3 δεν παρουσίαζαν καμία διαφορά μεταξύ υγιών μαρτύρων και ασθενών όλων των ομάδων και β) τα ρεύματα κορυφής ή αλλιώς ο αριθμός των διαύλων Kv1.3 ανά κυτταρική επιφάνεια ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με ΠΣ από ότι σε ασθενείς με άλλα νευρολογικά νοσήματα και υγιείς μάρτυρες.

Το εύρημα ότι μόνον τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΣ εκφράζουν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό λειτουργικών διαύλων Kv1.3 στην μεμβράνη τους αναδεικνύει τον δίαυλο αυτό ως πιθανό βιοδείκτη για την διαφοροδιάγνωση της νόσου αυτής από άλλες φλεγμονώδεις διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Επιπροσθέτως το εύρημά μας έρχεται να προστεθεί σε άλλες έρευνες που υποστηρίζουν ότι ο δίαυλος Kv1.3 θα μπορούσε να λειτουργήσει ως θεραπευτικός στόχος σε αυταάνοσα νοσήματα.

**ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ:** Βιοηλεκτρικά σήματα, Καταγραφή, Ανάλυση σημάτων, Μοντελοποίηση, Ηλεκτροφυσιολογία, T-λεμφοκύτταρο, ιοντικοί δίαυλοι, μέθοδος καθήλωσης δυναμικού τμήματος κυτταρικής μεμβράνης, patch clamp, πολλαπλή σκλήρυνση

## ABSTRACT

The present research thesis is submitted in partial fulfilment of the requirements for the Master degree program entitled «Internetworked Electronic Systems», in the department of Electrical & Electronics Engineering at the University of West Attica and was conducted in the laboratory of Experimental Neurophysiology of the A' Neurology department at the Medical school of Athens under the supervision of the head of the laboratory associate professor Dr. Cornelia Pouloupoulou.

In this research project I performed the recordings and the processing of bioelectrical signals from human cells and more specifically human T-lymphocytes in order to analyse them and model their activation and inactivation characteristics. This project is part of a comparative study that runs in the laboratory of Experimental Neurophysiology using human T-lymphocytes from peripheral blood of both healthy individuals and patients with neurological and autoimmune disorders (herein we used peripheral blood from patients with Multiple Sclerosis ) in order to find biomarkers that may help in the differential diagnosis of the disease on one hand while trying to unravel the pathophysiological mechanisms associated with the disease and thus help recognize cellular components as therapeutic targets for the treatments for the disease.

Using the electrophysiological method of patch clamp, we recorded the electrical activity of potassium dependent channels (Kv1.3) in human T-cells from peripheral blood of patients with Multiple Sclerosis (MS). The electrophysiological properties of these channels were studied in T-cell by recording electrical current responses to rectangular voltage steps from a membrane holding potential of -90 mV. The number of functional channels expressed in each T-cell was determined by dividing the peak value of the recorded current in response to +40mV rectangular voltage step by the single Kv1.3 channel conductance. From the recorded current data we calculated whole cell conductance, half maximal activity of the cell current ( $V_{1/2}$ ), voltage sensitivity ( $dx$ ) and activation and inactivation whole cell current kinetics ( $t$ ) as well as steady state inactivation characteristics.

The statistical analysis of our calculated values showed that a)Kv1.3 channels in both healthy controls and patients of all groups had similar endogenous electrophysiological properties and b) T-cells from MS patients showed higher whole cell Kv1.3 peak current responses than patients with other neurological diseases and healthy controls, suggesting that MS patients' lymphocytes express significantly higher KV1.3 functional channels in their membrane. This finding advocates the use of Kv1.3 channel level of expression as a potential biomarker for the differentiation of this disease from other inflammatory disorders of the central nervous system (CNS). Additionally our findings together with findings from other labs show that Kv1.3 channel could serve as a therapeutic target in autoimmune diseases.

**KEYWORDS:** Bioelectric signals, signal recording, signal analysis, modeling, electrophysiology, human T-cell, ion channels, electrophysiological method of patch clamp, multiple sclerosis

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Πειραματικής Νευροφυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας κ. Κορνηλίας Πουλοπούλου την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για όλη την καθοδήγηση, τη γνώση και τη βοήθεια που μου προσέφερε απλόχερα σε ό,τι χρειαζόμουν καθώς και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για να συμβάλω στην έρευνα του εργαστηρίου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτριά μου στο μεταπτυχιακό κ. Ραγκούση Μαρία για την βοήθεια και τις συμβουλές της καθόλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού και της διπλωματικής αυτής, καθώς και τον καθηγητή της τριμελούς μου κ. Ποτηράκη Στέλιο.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ τις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου Γαλάνη Μελπομένη και Ρεπούση Ελπίδα για όλη την βοήθεια που μου παρείχαν και για την καλή συνεργασία που είχαμε καθώς και τον Δρ. Μαρκάκη Ιωάννη που με εμπιστεύτηκε να συμμετέχω στην έρευνα του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που μου συμπαραστάθηκαν σε όλες τις δυσκολίες που ανέκυψαν.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

|   |    |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....   | 3  |
| ABSTRACT.....   | 5  |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....  | 7  |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....   | 8  |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Αντικείμενο, ερευνητικά ερωτήματα και διάρθρωση της εργασίας.....     | 10 |
| Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ) .....   | 11 |
| T-λεμφοκύτταρα .....  | 11 |
| Ηλεκτρικές ιδιότητες κυττάρου .....   | 12 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εργαστηριακός Εξοπλισμός .....                                      | 15 |
| Εργαστηριακός Εξοπλισμός .....  | 16 |
| 1.  Ενισχυτής.....  | 16 |
| 2.  Αναλογοψηφιακός Μετατροπέας .....   | 17 |
| 3.  Λογισμικό Επεξεργασίας.....   | 18 |
| 4.  Κεφαλή προσαρμογής καταγραφικού ηλεκτροδίου (Headstage).....                | 18 |
| 5.  Μικροσκόπιο και μικροχειριστήριο .....                                      | 19 |
| 6.  Κλωβός Faraday και αντικραδασμική βάση .....                                | 20 |
| Γείωση Συστήματος (ηλεκτρομαγνητικές παρεμβολές και βρόχος γειώσεων) .....      | 20 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Μεθοδολογία της έρευνας .....                                       | 24 |
| Παραλλαγές καταγραφής ηλεκτρικής δραστηριότητας με την μέθοδο patch clamp ..... | 25 |
| Πρωτόκολλα δυναμικού .....  | 27 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η προτεινόμενη μέθοδος – Θεμελίωση, Σχεδίαση, Ανάπτυξη.....         | 31 |
| Προετοιμασία κυττάρων και ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές .....                  | 31 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ανάλυση Αποτελεσμάτων – Συζήτηση.....                               | 33 |



|  |    |
|--|----|
| Εκ νίνο ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές ρευμάτων από ολόκληρα T-λεμφοκύτταρα  | 33 |
| Ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες τασοελεγχόμενων ρευμάτων καλίου, χαρακτηρισμός τους ως ρεύματα διαύλων K <sub>v</sub> 1.3..... | 34 |
| Αποτέλεσμα 1: .....  | 36 |
| Αποτέλεσμα 2: .....  | 37 |
| Αποτέλεσμα 3: .....  | 39 |
| Αποτέλεσμα 4: .....  | 43 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συμπεράσματα – Προτάσεις .....   | 46 |
| Συμπεράσματα.....  | 46 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΠΗΓΕΣ .....   | 49 |
| Βιβλιογραφία – Πηγές σε ξένες γλώσσες.....   | 49 |

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ:**

### **Αντικείμενο, ερευνητικά ερωτήματα και διάρθρωση της εργασίας**

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Πειραματικής Νευροφυσιολογίας της Α΄ Νευρολογικής κλινικής Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας κ. Κορηλίας Πουλοπούλου. Το εργαστήριο Πειραματικής Νευροφυσιολογίας έχει σαν κύριο ερευνητικό έργο την μελέτη της ρύθμισης των διαύλων καλίου που εκφράζονται στα ανθρώπινα T- λεμφοκύτταρα υγιειών ατόμων και ασθενών με νοσήματα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) ή αυτοάνοσα συστηματικά νοσήματα, από μόρια, που η δράση τους έχει μελετηθεί επι μακρόν στο νευρικό σύστημα και είναι γνωστά ως νευροδιαβιβαστές (γλουταμικό οξύ, ακετυλοχολίνη και ντοπαμίνη). Αυτά τα μόρια ωστόσο έχουν ανυχνευθεί και έχει δειχθεί ότι κυκλοφορούν και στον ορό του αίματος και στον εξωκυττάριο χώρο των ιστών, ενώ οι υποδοχείς τους εκφράζονται εκτός από τα κύτταρα του ΚΝΣ εκφράζονται και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Το εργαστήριο χρησιμοποιεί κυρίως ηλεκτροφυσιολογικές μεθόδους για αυτές τις μελέτες, γιατί όπως και στο ΚΝΣ έτσι και στο ανοσοποιητικό ένα μεγάλο κομμάτι της ρύθμισης της λειτουργίας των κυττάρων γίνεται μέσω της αλλαγής των ηλεκτρικών τους ιδιοτήτων.

Σε αυτή την εργασία, η οποία εντάσσεται στο γενικότερο πλαίσιο της μελέτης της δράσης του γλουταμικού οξέως στα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ), μελετήθηκαν οι ηλεκτρικές ιδιότητες των τασεοεξαρτώμενων διαύλων καλίου  $Kv1.3$  στα T-λεμφοκύτταρα ασθενών και υγιών παρόμοιας ηλικίας και δημογραφικής ταυτότητας. Τα δεδομένα από αυτή τη μελέτη μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες

α) για τη λειτουργία και την έκφραση αυτού του διαύλου στους ασθενείς, βοηθώντας στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας που μπορεί να συνοδεύει αυτά τα κεντρικής σημασίας για την ασθένεια κύτταρα

β) για την ανάπτυξη καλύτερης φαρμακευτικής αντιμετώπισης και

γ) για την ανάπτυξη ενός βιολογικού δείκτη για την διαφοροδιάγνωση της ασθένειας.

Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα είναι απαραίτητα και θα χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω διερεύνηση της τροποποίησης των ηλεκτρικών αυτών ρευμάτων από το γλουταμικό οξύ, τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή του ΚΝΣ του ανθρώπου και που ένας μεγάλος αριθμός μελετών εμπλέκει στο νευροεκφυλιστικό τμήμα της νόσου.

### **Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ)**

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση είναι μια αυτοάνοση φλεγμονώδης νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Κλινικά κατηγοριοποιείται σε τρεις μορφές: τη μορφή με εξάρσεις και υφέσεις (πιο συχνή), την δευτεροπαθώς προϊούσα και την πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή (1). Κύριο ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου θεωρείται ότι κατέχουν τα T-λεμφοκύτταρα.

### **T-λεμφοκύτταρα**

Τα T-λεμφοκύτταρα αποτελούν το 80% των λεμφοκυττάρων [T, B, φυσικοί δολοφόνοι (NK)] που κυκλοφορούν στο αίμα και το 90% των κυττάρων που απομονώνουμε από συνολικό αίμα με κλίση συγκέντρωσης πολυσακχαρίτη (Ficoll).

Τα κύτταρα αυτά παράγονται στο μυελό των οστών ενώ ωριμάζουν και παίρνουν ταυτότητα από τις ειδικές πρωτεΐνες που εκφράζουν στην μεμβράνη τους (Cluster of Differentiation-CD) στο θύμο αδένα. Από εκεί, κυκλοφορούν και μεταναστεύουν στο περιφερικό αίμα και τους λεμφαδένες και μετέχουν στην επίκτητη ανοσία (2).

Τα κύτταρα αυτά πριν συναντήσουν ένα ανοσολογικό ερέθισμα (κυτταροκίνες, σύνδεση με αντιγόνο-παραρσιαστικά κύτταρα κ.α.) είναι σε κατάσταση ηρεμίας και αναμονής ερεθίσματος.

Η ενεργοποίησή τους από ένα ανοσολογικό ερέθισμα μπορεί να οδηγήσει :

1. Σε έκκριση κυτταροκινών
2. Στην αλλαγή ταυτότητας, διαφοροποίηση
3. Σε πολλαπλασιασμό

Όλες οι παραπάνω λειτουργίες απαιτούν άνοδο του ενδοκυττάρου ασβεστίου το οποίο αρχικά ελευθερώνεται από ενδοκυττάρια αποθήκες ασβεστίου και στη συνέχεια από την εισροή του από τον εξωκυττάριο χώρο μέσω ενεργοποίησης (ανοίγματος) διαύλων ασβεστίου. Η άνοδος  $Ca^{2+}$  εσωτερικά του κυττάρου αυξάνει το θετικό ενδοκυττάριο φορτίο με αποτέλεσμα η διαφορά δυναμικού του κυττάρου να παίρνει θετικότερες τιμές (εκπόλωση της μεμβράνης).

Αυτή η εκπόλωση με τη σειρά της ενεργοποιεί τους διαύλους καλίου και έτσι ιόντα καλίου φεύγουν από το εσωτερικό του κυττάρου προς τον εξωκυττάριο χώρο. Η εκροή θετικών φορτίων από το κύτταρο στον εξωκυττάριο χώρο έχει σαν αποτέλεσμα την επαναφορά του δυναμικού της μεμβράνης σε αρνητικότερες τιμές (υπερπόλωση). Η αρνητική αυτή τιμή της μεμβράνης είναι η δύναμη που θα οδηγήσει τα ιόντα ασβεστίου στον ενδοκυττάριο χώρο μέσω των διαύλων ασβεστίου (3).

### **Ηλεκτρικές ιδιότητες κυττάρου**

Με τον όρο μελέτη των ηλεκτρικών ιδιοτήτων ενός κυττάρου εννοούμε την μελέτη των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της πλασματικής του μεμβράνης. Αυτό διότι οι ηλεκτρικές ιδιότητες των κυττάρων είναι παράγωγα των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της μεμβράνης τους. Αυτές οι ιδιότητες με τη σειρά τους απορρέουν από την μοριακή σύσταση των μεμβρανών η οποία μπορεί να εξομοιωθεί με ένα ηλεκτρικό κύκλωμα RC (εικόνα 1). Εν συντομία, οι κυτταρικές μεμβράνες σχηματίζονται από μια διπλολιπιδική στοιβάδα, με χαρακτηριστικά ηλεκτρικού μονωτή, ενώ εμβαπτισμένες σε αυτή είναι διάφορες πρωτεϊνικές δομές όπως οι

ιοντικοί διάλυτοι και οι αντλίες ιόντων που λειτουργούν ως αγωγοί φορτίου μεταξύ του ενδοκυττάριου και του εξωκυττάριου χώρου οι οποίοι έχουν εξαιρετικά διαφορετική χημική και ηλεκτρική σύσταση.

Η διαφορετική χημική και ηλεκτρική σύσταση μεταξύ ένδο- και έξω-κυττάριου χώρου έχει σαν φυσικό αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας κλίσης συγκέντρωσης ιόντων και μιας διαφοράς δυναμικού, του ονομαζόμενου ως διαμεμβρανικό δυναμικό.

Το ηλεκτροχημικό δυναμικό κάθε ιόντος λειτουργεί ως ηλεκτρεγερτική δύναμη η οποία κινεί το ιόν εκατέρωθεν της μεμβράνης. Βάσει του νόμου του Nernst, για κάθε ιόν όταν γνωρίζουμε την συγκέντρωση του μέσα και έξω από το κύτταρο μπορούμε να υπολογίσουμε το δυναμικό ισορροπίας του ιόντος και κατ' επέκταση να προβλέψουμε την φορά κίνησής του σε κάθε τιμή δυναμικού της μεμβράνης.

#### Εξίσωση Nernst

$$V_{Eq.} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[X]_{out}}{[X]_{in}} \right)$$

$V_{Eq.}$ : το δυναμικό ισορροπίας για ένα δεδομένο ιόν

R: η παγκόσμια σταθερά αερίου  $8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  (joules per kelvin per mole)

T: θερμοκρασία σε Kelvin ( $k=^{\circ}\text{C}+273,15$ )

z: το σθένος των ιοντικών στοιχείων

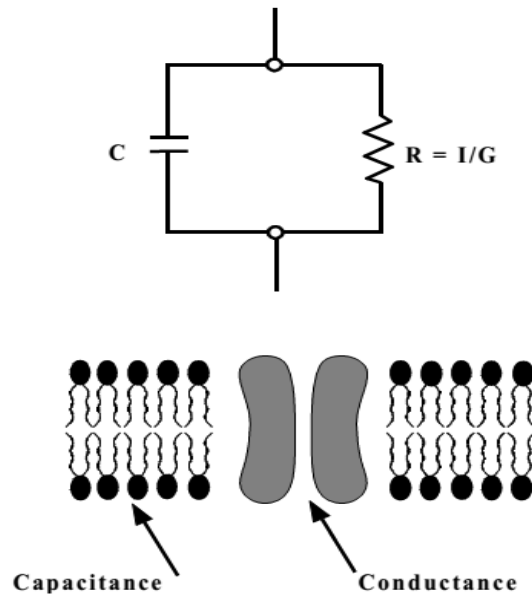
F: σταθερά Faraday και είναι ίση με  $96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$  (coulombs per mole)

$[X]_{out}$ : η συγκέντρωση ιόντος στο εξωκυττάριο υγρό

$[X]_{in}$ : η συγκέντρωση ιόντος στο ενδοκυττάριο υγρό

Άρα όπως συνάγεται από τα παραπάνω, η μεμβράνη μπορεί να αντιμετωπιστεί ως ένα κύκλωμα με έναν πυκνωτή σε παράλληλη σύνδεση με μια αντίσταση και η διαφορά δυναμικού και συγκέντρωσης ιόντων ως η απαραίτητη ηλεκτρεγερτική δύναμη για την ροή των ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Τα παραγόμενα ηλεκτρικά ρεύματα από τη ροή ιόντων μέσω των διαύλων είναι της τάξης μερικών pA. Όπως είναι κατανοητό, για να καταγράψουμε και να μελετήσουμε τα βιοηλεκτρικά φαινόμενα απαιτείται συγκεκριμένη διαμόρφωση ειδικών ηλεκτρονικών διατάξεων καταγραφής ηλεκτρικής δραστηριότητας. Συγκεκριμένα, για τη μελέτη των ηλεκτρικών ιδιοτήτων των κυττάρων πολύ μικρής διαμέτρου όπως τα T-λεμφοκύτταρα (7-10μm) απαιτούνται πολύ μικρά ηλεκτρόδια

καταγραφής για να μην καταστρέψουν το κύτταρο καθώς και ηλεκτρονικοί ενισχυτές πολύ χαμηλού θορύβου ώστε να μπορούν να καταγράψουν ηλεκτρικά σήματα της τάξης μεγέθους μερικών μέχρι εκατοντάδων pA. Η τεχνική που επιτρέπει αυτές τις καταγραφές ονομάζεται 'patch clamp' και εφαρμόζεται στο εργαστήριο που διαθέτει τον κατάλληλο εξοπλισμό.



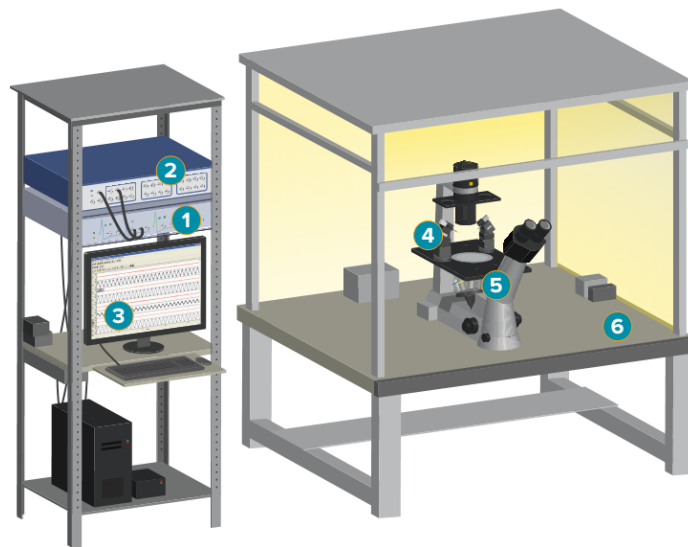
**Εικόνα 1: Εξομοίωση κυττάρου με κύκλωμα**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

### Εργαστηριακός Εξοπλισμός

Για την επίτευξη των στόχων αυτής της μελέτης χρησιμοποιήσαμε την ηλεκτροφυσιολογική μέθοδο καθήλωσης δυναμικού τμήματος μεμβράνης ή κυττάρου μικρής διαμέτρου, τη γνωστή και ως τεχνική patch clamp. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ύπαρξη ενός ενισχυτή ανάδρασης πολύ χαμηλού θορύβου ο οποίος συνδέεται με ένα προενισχυτή χαμηλού θορύβου με ικανότητα υψηλής ενίσχυσης σήματος στον οποίο προσαρμόζεται το ηλεκτρόδιο καταγραφής.

Οι περισσότερες διατάξεις voltage clamp περιλαμβάνουν ένα ενδοκυττάριο ηλεκτρόδιο συνδεδεμένο με κύκλωμα παρακολούθησης του διαμεμβρανικού δυναμικού και έναν ενισχυτή αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης που πολλαπλασιάζει τη διαφορά μεταξύ του μετρούμενου και του επιθυμητού δυναμικού, η έξοδος του οποίου χορηγεί διορθωτικές ποσότητες ρεύματος μέσω δευτέρου ενδοκυττάρου ηλεκτροδίου.



Εικόνα 2: Εργαστηριακός εξοπλισμός (Axon Instruments)

## Εργαστηριακός Εξοπλισμός

### 1. Ενισχυτής

Ο ενισχυτής με μικροηλεκτρόδιο Axon 200B μας παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης ηλεκτρικής δραστηριότητας που μπορεί να παραχθεί από την ενεργοποίηση ενός ή περισσότερων διαύλων της μεμβράνης ενός κυττάρου. Αυτός ο ενισχυτής διαθέτει μια πρωτοποριακή τεχνολογία χωρητικής ανάδρασης (capacitor-feedback) έναντι των ενισχυτών ωμικής ανάδρασης (resistor-feedback). Το κύκλωμα του capacitor-feedback μετρά ρεύμα ανάλογα με τον ρυθμό που αυξάνεται το δυναμικό κατά μήκος του πυκνωτή. Το δυναμικό αυτό είναι το ολοκλήρωμα του ρεύματος. Σε αντίθεση με το resistor feedback που μετρά ρεύμα από την πώση τάσης κατά μήκος της αντίστασης, αυτό έχει το μειονέκτημα ότι απαιτούνται εξαιρετικά μεγάλες αντιστάσεις που έχουν σαν αποτέλεσμα αυξημένο θόρυβο. Είναι γνωστό ότι μπορούν να κατασκευαστούν πυκνωτές χαμηλού θορύβου άρα η εφαρμογή της χωρητικής ανάδρασης (capacitor feedback) σε αυτόν τον ενισχυτή δίνει την δυνατότητα καταγραφής από ένα και μόνο δίαυλο με μεγάλη ευκρίνεια λόγω του χαμηλότερου θορύβου. Επιπροσθέτως, διαθέτει την δυνατότητα ψύξης των ενεργών στοιχείων με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται ο χαμηλότερος δυνατός ηλεκτρικός θόρυβος (4).



Εικόνα 3: Ενισχυτής Axon 200B (Axon Instruments)



## 2. Αναλογοψηφιακός Μετατροπέας

Το σήμα που παίρνουμε από τον ενισχυτή είναι ένα αναλογικό σήμα, αλλά για να εκτελέσουμε την ανάλυση δεδομένων που απαιτείται σε υψηλής ανάλυσης μετρήσεις patch-clamp, το αναλογικό σήμα πρέπει να μετατραπεί σε ψηφιακό. Έτσι, μεταξύ του ενισχυτή και του υπολογιστή ένας αναλογοψηφιακός μετατροπέας είναι απαραίτητος. Η ποιότητα σήματος που λαμβάνει ο υπολογιστής είναι εξαιρετικά σημαντική, και αυτό καθορίζεται από τη συχνότητα δειγματοληψίας ή το ρυθμό δειγματοληψίας. Η συχνότητα δειγματοληψίας ορίζεται από τον πειραματιστή και σχετίζεται με την ενδογενή συχνότητα του βιοηλεκτρικού φαινομένου που μελετά. Οι συχνότητες δειγματοληψίας που χρησιμοποιούμε είναι της τάξης των 2 έως 20 kHz το οποίο είναι λίγο υψηλότερο από αυτό που καθορίζει το θεώρημα δειγματοληψίας Nyquist σύμφωνα με το οποίο, ο ρυθμός δειγματοληψίας θα πρέπει να είναι (τουλάχιστον) διπλάσιος από το εύρος ζώνης του σήματος. Εμείς, όπως και άλλοι πειραματιστές, χρησιμοποιούμε υψηλότερους ρυθμούς δειγματοληψίας οι οποίοι φτάνουν πέντε ή περισσότερες φορές το εύρος ζώνης της συχνότητας. Αυτό γίνεται προκειμένου να μεγιστοποιήσουμε την πιστότητα ανιχνευμένων δεδομένων όταν μελετάμε τη ροή ιόντων από ένα δίαυλο ο οποίος μεταπίπτει από μια κατάσταση σε μια άλλη πολύ γρήγορα. Ο ψηφιοποιητής Digidata 1200 έχει τη δυνατότητα δειγματοληψίας με ακρίβεια 12 bits/sample σε ρυθμό 333 kHz, και άρα είναι κατάλληλος για τις συχνότητες δειγματοληψίας που χρησιμοποιούμε (4).



**Εικόνα 4: Ψηφιοποιητής Digidata 1200 (Axon Instruments)**

### **3. Λογισμικό Επεξεργασίας**

Τα ηλεκτρονικά στοιχεία της πειραματικής διάταξης είναι υπό τον έλεγχο ενός Η/Υ στον οποίο είναι εγκατεστημένο ένα εξειδικευμένο λογισμικό, το PClamp6, (4). Το λογισμικό δίνει την δυνατότητα στον πειραματιστή να κατασκευάσει πρωτόκολλα παλμών είτε ρεύματος είτε δυναμικού, με συγκεκριμένες ιδιότητες, όπως διάρκεια παλμού, χρόνος μεταξύ των παλμών, συχνότητα δειγματοληψίας κ.α. Τα πρωτόκολλα παλμών που κατασκευάζουμε και χρησιμοποιούμε υπαγορεύονται κάθε φορά από τα βιοηλεκτρικά χαρακτηριστικά που θέλουμε να μελετήσουμε. Επιπροσθέτως το λογισμικό έχει την δυνατότητα να προσλαμβάνει απεικονίζει και αποθηκεύει την ανταπόκριση της κυτταρικής μεμβράνης σε συγκεκριμένο πρωτόκολλο παλμών. Τέλος το ίδιο το λογισμικό διαθέτει και πρόγραμμα επεξεργασίας των δεδομένων.

### **4. Κεφαλή προσαρμογής καταγραφικού ηλεκτροδίου (Headstage)**

Σε αυτή την συσκευή προσαρτώνται στην μια πλευρά το ηλεκτρόδιο καταγραφής με την γυάλινη μικροπιπέτα και στην άλλη το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Το ηλεκτρόδιο καταγραφής είναι αυτό που έρχεται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη ενώ το ηλεκτρόδιο αναφοράς είναι εμβαπτισμένο στο εξωκυττάριο διάλυμα του τρυβλίου το οποίο εμπεριέχει και τα κύτταρα (θάλαμος καταγραφής). Επιπροσθέτως, η συσκευή αυτή εσωκλείει κύκλωμα μετάδοσης ηλεκτρικού σήματος από το ηλεκτρόδιο στον ενισχυτή και αντίστροφα καθώς και κύκλωμα capacitor-feedback παρέχοντας έτσι μεγάλη μείωση θορύβου και δυνατότητα καταγραφής από ένα κύτταρο ή ακόμη και από ένα μόνο δίαυλο.



**Εικόνα 5: Προενισχυτής Headstage (Axon Instruments)**

## 5. Μικροσκόπιο και μικροχειριστήριο

Το μικροσκόπιο είναι ένα εργαλείο για οπτική μεγέθυνση του αντικειμένου, το μικροσκόπιο που διαθέτει το εργαστήριο είναι ένα Zeiss Axiovert ανεστραμμένο μικροσκόπιο με προσοφθάλμιους φακούς 10x και φακούς μεγέθυνσης από 5x έως 40x. Το ανεστραμμένο μικροσκόπιο μας επιτρέπει την ευκολότερη πρόσβαση για τα ηλεκτρόδια και παρέχει επίσης μια μεγαλύτερη, πιο σταθερή πλατφόρμα για την τοποθέτηση του μικροχειριστηρίου.

Το μικροχειριστήριο είναι μια συσκευή για μηχανική μετακίνηση του ηλεκτροδίου με ακρίβεια νανομέτρων επιτρέποντας τρισδιάστατη κίνηση για την ακριβή και σταθερή προσέγγιση στην περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία είναι κρίσιμη για επιτυχή καταγραφή.



**Εικόνα 6: Μικροσκόπιο & μικροχειριστήριο**

## **6. Κλωβός Faraday και αντικραδασμική βάση**

Τα ηλεκτρικά σήματα που καταγράφουμε κατά τη διάρκεια ενός πειράματος είναι εξαιρετικά μικρά, της τάξης ελαχίστων pA, με αποτέλεσμα η όποια πηγή ηλεκτρομαγνητικής ή μηχανικής παρεμβολής όσο μικρή και αν είναι (<pA ή nm αντίστοιχα), να μπορεί να παραμορφώσει ή ακόμη και να καλύψει σήματα τα οποία εμπεριέχουν χρήσιμη πληροφορία. Για τον λόγο αυτό, για να προστατευτεί η πειραματική διάταξη από εξωτερικές παρεμβολές, το μικροσκόπιο τοποθετείται πάνω σε μια αντικραδασμική βάση μέσα σε ένα κλωβό faraday. Κάθε τι εντός του κλωβού πρέπει να είναι σταθερό και να φέρει σύστημα γείωσης.

### **Γείωση Συστήματος (ηλεκτρομαγνητικές παρεμβολές και θρόχος γειώσεων)**

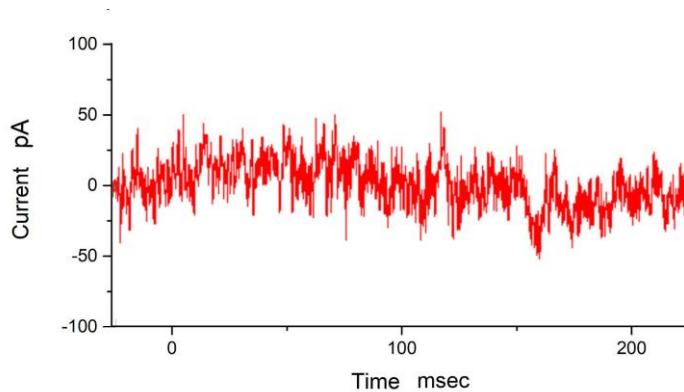
Ένα από τα σοβαρά και συχνά επανεμφανιζόμενα προβλήματα των εργαστηρίων ηλεκτροφυσιολογίας είναι η εκδήλωση και παρουσία ηλεκτρικών θορύβων στις καταγραφές. Ο θόρυβος σε μία καταγραφή μπορεί να προέρχεται από περισσότερες από μια διαφορετικές πηγές. Για να μπορέσει ο πειραματιστής να ελαχιστοποιήσει αποτελεσματικά τον θόρυβο πρέπει όχι μόνο να βρει αλλά και να κατανοήσει την πηγή του. Όπως είναι αυτονόητο, η εύρεση της πηγής του θορύβου και η ελαχιστοποίησή του είναι το ζητούμενο στις ηλεκτρικές καταγραφές από βιολογικά συστήματα αφού τα υπό μελέτη ηλεκτρικά φαινόμενα είναι εξαιρετικά γρήγορα, της τάξεως των msec, και το πλάτους τους μπορεί να είναι μερικά pA. Από αυτό γίνεται κατανοητό ότι το μέγεθος και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του θορύβου, καθορίζουν και τα βιοηλεκτρικά φαινόμενα που μπορούν να μελετηθούν, δηλαδή το επίπεδο του θορύβου οριοθετεί τα επιστημονικά ερωτήματα σε τέτοια πειράματα και βέβαια καθορίζει και το ελάχιστο μέγεθος του βιολογικού παρασκευάσματος, από το οποίο ο πειραματιστής μπορεί να καταγράψει βιοηλεκτρικά σήματα και να τα αναλύσει.

Στο εργαστήριο στο οποίο διενεργήθηκαν όλα τα πειράματα, διαθέτει όπως προανέφερα ένα ολοκληρωμένο ηλεκτροφυσιολογικό σύστημα patch-clamp, το οποίο

εγκαταστάθηκε και λειτουργεί από το 1998 και τα δυο τελευταία χρόνια αντιμετωπίζουν πολλά προβλήματα με το επίπεδο και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των διαφόρων θορύβων, με αποτέλεσμα να έχει μειωθεί η ποιότητα των καταγραφών και πολλές από αυτές να μην δύνανται να χρησιμοποιηθούν. Οι περισσότεροι πειραματιστές σε ένα εργαστήριο ηλεκτροφυσιολογίας, συνήθως δεν είναι εξοικειωμένοι με την διερεύνηση πιθανών πηγών παραγωγής θορύβου και έτσι βασίζονται κυρίως στις 2-3 πηγές που αναφέρονται στα εγχειρίδια.

Με τον χαμηλό θόρυβο να είναι το ζητούμενο για την καταγραφή και ανάλυση των βιοφυσικών χαρακτηριστικών των ιοντικών ρευμάτων από ένα μικρό κύτταρο όπως τα T-λεμφοκύτταρα ή της ηλεκτρικής δραστηριότητας ενός και μόνου διαύλου από ένα μικρό τμήμα της μεμβράνης ενός κυττάρου, ξεκίνησα την εργασία μου στο εργαστήριο Πειραματικής Νευροφυσιολογίας, με την προσπάθεια ανίχνευσης των πηγών θορύβου στο σύστημα.

Στην εικόνα 7 παραθέτω μια ηλεκτρική καταγραφή από ένα T-λεμφοκύτταρο με το δυναμικό της μεμβράνης του, καθηλωμένο στα  $-90\text{mV}$  και που δείχνει τα επίπεδα και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του θορύβου.



**Εικόνα 7**

Οι εξωγενείς ηλεκτρικές παρεμβολές εμπίπτουν σε τρεις κύριες κατηγορίες:

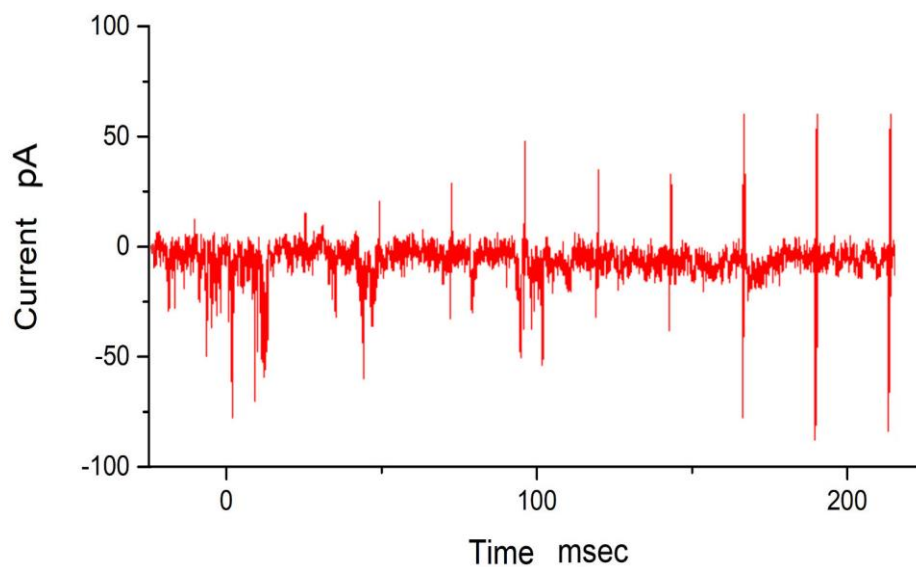
- εκπεμπόμενη ηλεκτρική παρεμβολή,
- μαγνητικά επαγόμενο φορτίο και
- θόρυβο βρόχου γείωσης.

Για την αποφυγή του θορύβου από μαγνητικά επαγόμενο φορτίο όλα τα τροφοδοτικά τοποθετήθηκαν μακριά από τα ευαίσθητα κυκλώματα. Όλες οι γειώσεις των εξαρτημάτων επανατοποθετήθηκαν με καινούργια καλώδια και συνδέθηκαν εκ νέου γιατί είχε παρατηρηθεί πρόβλημα θορύβου λόγω σύνδεσής τους σε πάνω από ένα σημείο γείωσης που δημιουργούσε βρόχο γείωσης.

Πηγές εκπεμπόμενης ηλεκτρικής παρεμβολής που βρέθηκαν αντιμέτωπος όπως θόρυβο υψηλής συχνότητας από τον υπολογιστή, την οθόνη υπολογιστή, φθαρμένα καλώδια BNC κ.α. απαλείφθηκαν με τον καθαρισμό των μηχανημάτων, αντικατάσταση της οθόνης, τοποθετώντας αγωγίμη θωράκιση γύρω από το θάλαμο και το ηλεκτρόδιο και χρησιμοποιώντας θωρακισμένα BNC καλώδια. Άλλη μια πηγή θορύβου που εμφανιζόταν ήταν από τα σωληνάκια απορροής και εκροής διαλυμάτων αλάτων στο petri(πιατάκι) των κυττάρων στο μικροσκόπιο μετατρέποντας τα σε κεραία απολαβής θορύβου. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού χρειάστηκε καθαρισμός και απομόνωση των σωληνώσεων αυτών. Τέλος ένας ασταθής θόρυβος που προέκυψε οφειλόταν σε φθαρμένο πυκνωτή του τροφοδοτικού του ενισχυτή όπου και αντικατέστησα.

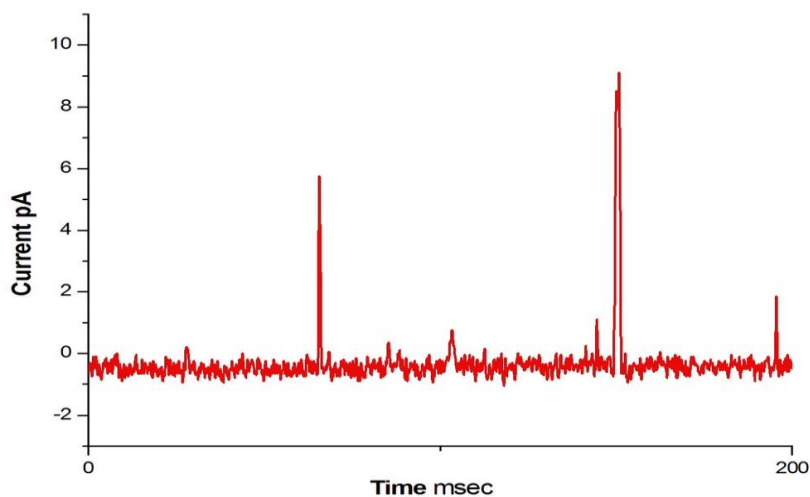
Σε αυτή τη τεχνική, οι περισσότερες πηγές θορύβου δεν σχετίζονται μεταξύ τους και άρα προστίθενται. Αυτό σημαίνει, ότι μία ή περισσότερες πηγές θορύβου μπορεί να επικρατεί στον συνολικό καταγραφόμενο θόρυβο. Έτσι όταν ελαχιστοποιήθηκε ο θόρυβος από τις προαναφερθείσες πηγές, έγινε πολύ εμφανές το πρόβλημα, με ένα θόρυβο ο οποίος εμφανιζόταν ξαφνικά κατά την διάρκεια μιας καταγραφής, και μέσα στα αποδεκτά όρια. Ο θόρυβος αυτός ήταν παροδικός, χωρίς όμως συγκεκριμένη διάρκεια, και είχε πολύ χαρακτηριστική συχνότητα (εικόνα 8). Ο θόρυβος αυτός προέκυπτε από αλλαγές που είχαν γίνει την τελευταία διετία στις ηλεκτρικές εγκαταστάσεις του κτιρίου (εγκατάσταση αξονικού τομογράφου) και στην αλλαγή του διαμοιραζόμενου ηλεκτρικού φορτίου στα διάφορα τμήματα και στις γειώσεις του κτιρίου. Το πρόβλημα αυτό ελαχιστοποιήθηκε και μειώθηκε σημαντικά η συχνότητα εμφάνισής του, με την διόρθωση της γείωσης της κτιριακής εγκατάστασης του εργαστηρίου και με την χρήση σταθεροποιητή τάσης, όπου συνέδεσα όλες της ηλεκτρικές παροχές των μηχανημάτων που μετέχουν στο σύστημα καταγραφής. Αυτό ανέδειξε την ανάγκη τα εργαστήρια που πραγματοποιούν βιοηλεκτρικές μελέτες να ελέγχουν τις ηλεκτρικές εγκαταστάσεις τους και να ζητούν να ενημερώνονται

για τυχόν αλλαγές στην ηλεκτροδότηση των κτιριακών εγκαταστάσεων, καθώς και να χρησιμοποιούν σταθεροποιητές τάσεις.



**Εικόνα 8**

Στην εικόνα 9 παρουσιάζω τα επίπεδα θορύβου που πέτυχα να έχει το σύστημα patch-clamp του εργαστηρίου και που επιτρέπει την καταγραφή, ανάλυση και μελέτη των βιοηλεκτρικών χαρακτηριστικών από την ενεργοποίηση ενός και μόνου διαύλου.



**Εικόνα 9**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

### Μεθοδολογία της έρευνας

Στην εργασία αυτή κατέγραψα την ενεργοποίηση ηλεκτρικών ρευμάτων μέσω των διαύλων Kv1.3 από ολόκληρα T-λεμφοκύτταρα των οποίων η μεμβράνη είχε καθλωθεί σε συγκεκριμένη τιμή δυναμικού, συνήθως τα  $-90\text{mV}$ . Αυτό επετεύχθη με την χρήση ενός καταγραφικού ηλεκτροδίου από άργυρο (Ag) το οποίο είχαμε σε πρότερο χρόνο χλωριώσει (AgCl). Αυτό το ηλεκτρόδιο επενδύεται με βοριοπιυριτικό γυαλί που περιείχε ένα υδατικό διάλυμα αλάτων (υψηλό σε KCl,  $140\text{mM}$ ) το οποίο κατά την διάρκεια της καταγραφής λειτουργεί ως το ενδοκυττάριο ιοντικό περιβάλλον του κυττάρου από το οποίο καταγράφουμε. Τα κύτταρα από τα οποία καταγράφω βρίσκονται σε δισκίο (τρυβλίο) Petri διαμέτρου  $25\text{mm}$  το οποίο είναι κατάλληλο για το συγκεκριμένο μικροσκόπιο που χρησιμοποιούμε. Τα κύτταρα είναι εμβλαπτισμένα σε υδατικό διάλυμα αλάτων (υψηλό σε NaCl,  $140\text{mM}$ ) που λειτουργεί ως το εξωκυττάριο ιοντικό περιβάλλον του κυττάρου. Όπως γίνεται κατανοητό, τα ηλεκτρικά ρεύματα καλίου που καταγράφω κατά την διάρκεια ενός πειράματος προέρχονται από την κίνηση των ιόντων καλίου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή από την αγωγιμότητα καλίου της κυτταρικής μεμβράνης μέσω των διαύλων καλίου. Ουσιαστικά, το ηλεκτρικό ρεύμα το οποίο καταγράφω είναι το ρεύμα που χρειάζεται να ενέσει το καταγραφικό ηλεκτρόδιο (AgCl) για να διατηρηθεί το διαμεμβρανικό δυναμικό σταθερό και ίσο με την εκάστοτε τιμή που έχω επιλέξει. Επομένως, το ηλεκτρόδιο καταγραφής εξυπηρετεί δύο σκοπούς: ο ένας είναι να ανιχνεύσει την αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης η οποία επέρχεται από την αλλαγή της αγωγιμότητας των διαύλων καλίου και ο άλλος να στείλει αυτή την πληροφορία στον ενισχυτή ο οποίος με την σειρά του αφού πάρει την πληροφορία θα στείλει ποσότητα ηλεκτρικού ρεύματος τόση όση χρειάζεται για να αντirroπιστεί η αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης και η οποία είναι το ρεύμα που καταγράφουμε.

Τα πειράματα έγιναν στην διαμόρφωση από ολόκληρα κύτταρα (whole cell) κρατώντας το δυναμικό του κυττάρου καθ' όλη τη διάρκεια σταθερό. Για τον σκοπό αυτό,



εφαρμόζοντας τη μέθοδο patch clamp, αρχικά χρειαζόμαστε ένα ηλεκτρόδιο καταγραφής το οποίο θα καταγράφει το δυναμικό της μεμβράνης και θα δίνει ρεύμα ανάλογο της αλλαγής του δυναμικού έτσι ώστε να έχουμε ένα σταθερό διαμεμβρανικό δυναμικό. Σε αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιείται γυάλινο μικροηλεκτρόδιο με στόμιο διαμέτρου  $>1 \mu\text{m}$ , που κατασκευάζεται έτσι ώστε το ελεύθερο χείλος του να σχηματίζει έναν κύκλο με λεία επιφάνεια και επαπτόμενες κάθετες προς τον επιμήκη άξονα του ηλεκτροδίου. Αντίθετα με τα κλασικά οξύαιχμα ηλεκτρόδια που διατιτραίνουν τα μελετώμενα κύτταρα, το ηλεκτρόδιο που χρησιμοποιείται στην τεχνική αυτή πιέζεται ελαφρά πάνω στην κυτταρική μεμβράνη και ακολούθως ασκείται αρνητική πίεση στο εσωτερικό του μέσω ελαφράς αναρρόφησης. Η αρνητική αυτή πίεση έλκει ένα τμήμα (patch) της μεμβράνης εντός του άκρου του ηλεκτροδίου και οδηγεί στο σχηματισμό στενής συνδέσεως (seal) μεταξύ τους, η ηλεκτρική αντίσταση της οποίας κυμαίνεται σε τάξη μεγέθους  $G\Omega$  (5).

#### ***Παραλλαγές καταγραφής ηλεκτρικής δραστηριότητας με την μέθοδο patch clamp***

Αρκετές παραλλαγές της τεχνικής αυτής έχουν αναπτυχθεί, ανάλογα με το αντικείμενο που μελετάται (εικόνα 10). Οι βιοφυσικές ιδιότητες μεμονωμένων ιοντικών διαύλων εξετάζονται σε τμήματα μεμβράνης που έχουν αποσπασθεί (excised patches) ή και σε τμήματα μεμβράνης που παραμένουν στο κύτταρο (cell-attached patches). Η συνολική ηλεκτρική συμπεριφορά της πλασματικής μεμβράνης μελετάται με τεχνικές στις οποίες το διάλυμα του ηλεκτροδίου ενώνεται με το κυτταρόπλασμα λόγω σπασίματος της πλασματικής μεμβράνης (καταγραφές από ολόκληρα κύτταρα -whole-cell recordings) ή έρχεται σε επαφή μαζί του μέσω τεχνητών πόρων της μεμβράνης (καταγραφές από τετρημένα κύτταρα-perforated patch recordings) (6).

**Καταγραφές από περιορισμένο τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης (cell-attached recordings):** το ηλεκτρόδιο παραμένει συνδεδεμένο στην περιφέρεια του μελετώμενου τμήματος της μεμβράνης, χωρίς αυτό να εξαιρεθεί από το υπόλοιπο κύτταρο. Η τεχνική αυτή μας επιτρέπει τη μελέτη των ιοντικών διαύλων που βρίσκονται στη συγκεκριμένη περιοχή της μεμβράνης. Για τον σωστό υπολογισμό της ιοντικής αγωγιμότητας θα πρέπει

να συνυπολογίζεται εκτός από το δυναμικό καθήλωσης και το δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου.

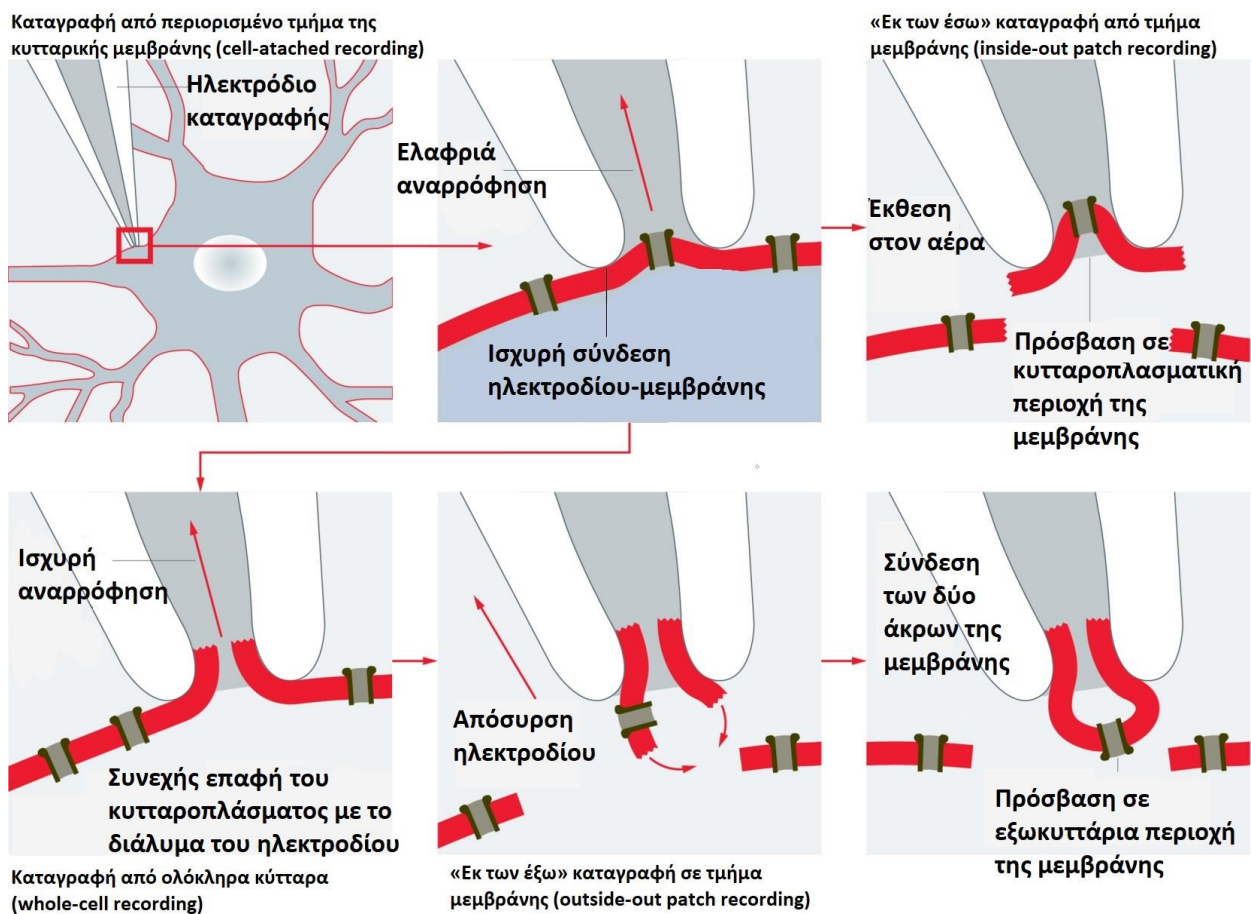
**«Εκ των έσω» καταγραφές από τμήμα μεμβράνης (inside-out patch recordings):**

Το τμήμα της μεμβράνης αποκολλάται από το υπόλοιπο κύτταρο μετά την προσκόλληση του στο χείλος του ηλεκτροδίου. Ως αποτέλεσμα, λαμβάνεται ένα ηλεκτρικά μεμονωμένο τμήμα μεμβράνης, η ενδοκυττάρια μεριά του οποίου είναι εκτεθειμένη στο εξωκυττάριο διάλυμα. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε πειράματα τροποποίησης του μικροπεριβάλλοντος της κυτταροπλασματικής πλευράς των ιοντικών διαύλων.

**«Εκ των έξω» καταγραφές σε τμήμα μεμβράνης (outside-out patch recordings):**

Μετά την δημιουργία στενής σύνδεσης και το σπάσιμο της μεμβράνης, το ηλεκτρόδιο απομακρύνεται και ένα τμήμα μεμβράνης αποκολλάται από το υπόλοιπο κύτταρο. Κατόπιν το τμήμα αυτό ξανασηματίζεται παίρνοντας τη μορφή σφαίρας, η επιφάνεια της οποίας αντιστοιχεί στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Η τεχνική προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης των επιδράσεων διαφόρων εξωκυττάρια παραγόντων στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των ιοντικών διαύλων.

**Καταγραφές από ολόκληρα κύτταρα (whole-cell recordings):** Μετά την δημιουργία στενής σύνδεσης ηλεκτροδίου και μεμβράνης, το σημείο επαφής ηλεκτροδίου μεμβράνης υφίσταται ρήξη με εφαρμογή ισχυρής αρνητικής πίεσης. Ως αποτέλεσμα, το διάλυμα του ηλεκτροδίου ενοποιείται με τον ενδοκυττάριο χώρο και λαμβάνονται καταγραφές από το σύνολο των διαύλων της μεμβράνης που ενεργοποιούνται στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η τεχνική αυτή έχει σημαντικά πλεονεκτήματα, δεδομένου ότι η χαμηλή αντίσταση του ρήγματος της μεμβράνης επιτρέπει την καλύτερη ηλεκτρική πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου. Το κυριότερο μειονέκτημα είναι η σταδιακή υποκατάσταση του κυτταροπλάσματος με το διάλυμα που περιέχεται στο ηλεκτρόδιο με αποτέλεσμα τελικά την αλλοίωση των βιοφυσικών ιδιοτήτων που εξαρτώνται από ενδοκυττάρια διαλυτούς παράγοντες.



Εικόνα 10: Παραλλαγές καταγραφής patch clamp

### Πρωτόκολλα δυναμικού

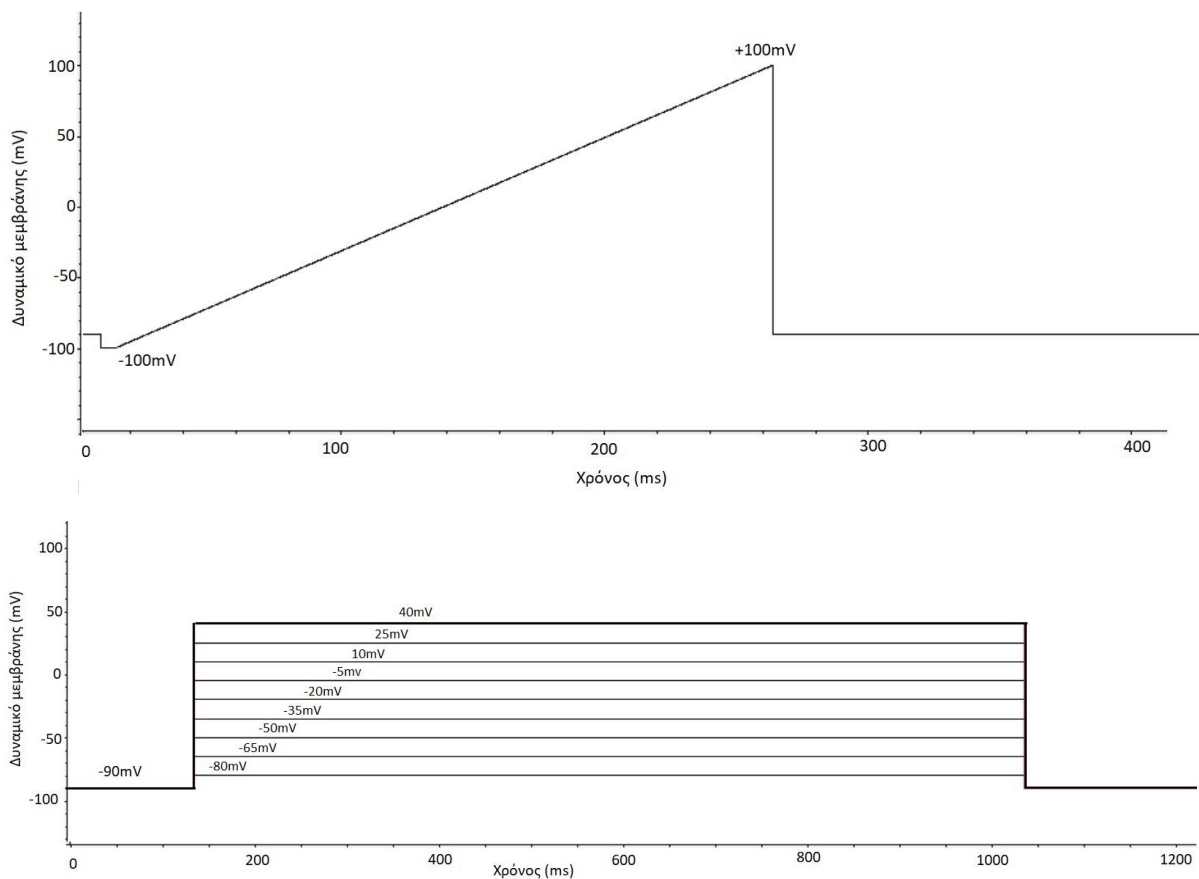
Όπως προαναφέρθηκε, οι καταγραφές μας έγιναν από ολόκληρα T-λεμφοκύτταρα. Μετά τον σχηματισμό στενής σύνδεσης (20 GΩ) και την ρήξη της μεμβράνης, οι καταγραφές των ρευμάτων ξεκίνησαν 15 λεπτά μετά, έτσι ώστε να έχει επιτευχθεί η πλήρης διάχυση του διαλύματος του γυάλινου ηλεκτροδίου στο κυτταρόπλασμα και να έχει επέλθει χημική ισορροπία. Σε όλα τα πειράματα (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), η κυτταρική μεμβράνη είναι καθλωμένη σε δυναμικό συγκράτησης -90 mV. Οι

χορηγούμενες ομάδες παλμών (πρωτόκολλα δυναμικών) που χρησιμοποιήθηκαν για να μελετήσουμε τους διαύλους καλίου είναι οι εξής:

**1. Πρωτόκολλα παλμών για την μελέτη των χαρακτηριστικών ενεργοποίησης και πλάτους των ρευμάτων  $Kv1.3$ .**

A. Τριγωνικός παλμός δυναμικού από τα  $-100$  mV στα  $100$  mV σε  $300$  msec.

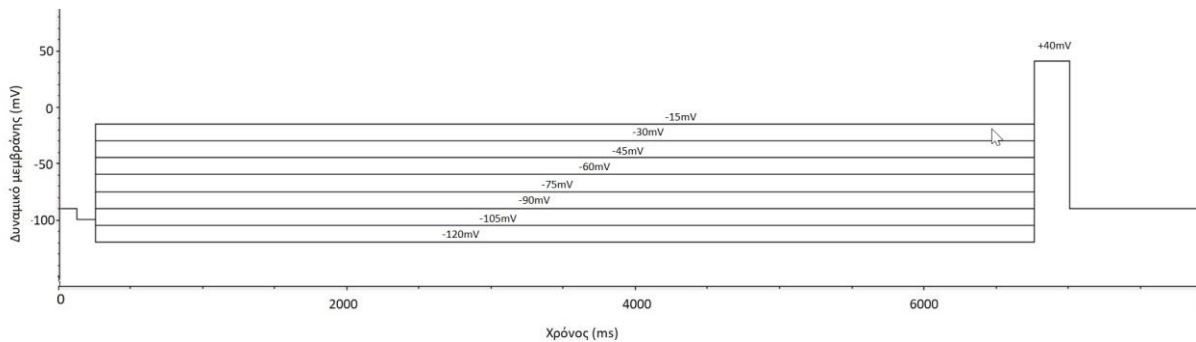
B. Ορθογώνιοι παλμοί δυναμικού σε βήματα των  $+15$  mV (από  $-80$  έως  $+40$  mV) με διάρκεια  $1000$  msec δίνονται κάθε  $60$  sec.



**Εικόνα 11: Πρωτόκολλα παλμών για την μελέτη των χαρακτηριστικών ενεργοποίησης και πλάτους των ρευμάτων  $Kv1.3$**

## **2. Πρωτόκολλο παλμών για την μελέτη των χαρακτηριστικών αδρανοποίησης σταθερής κατάστασης.**

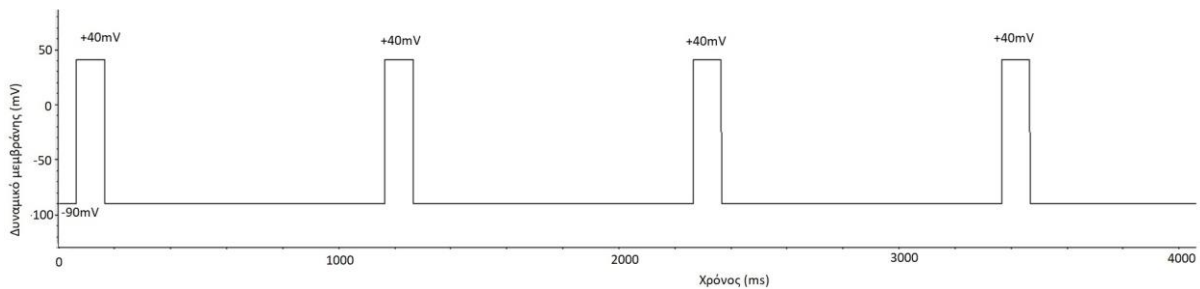
Σύνθετο πρωτόκολλο ορθογώνιων παλμών αποτελούμενο από ορθογώνιους παλμούς σε βήματα των 15 mV από -120 mV έως -15 mV διάρκειας 100 sec οι οποίοι ακολουθούνται από έναν ορθογώνιο παλμό στα +40 mV για 100 msec. Οι παλμοί δίνονται κάθε 60 sec.



**Εικόνα 12: Πρωτόκολλο παλμών για την μελέτη των χαρακτηριστικών αδρανοποίησης σταθερής κατάστασης.**

## **3. Πρωτόκολλο παλμών για την μελέτη των χαρακτηριστικών της αθροιστικής αδρανοποίησης των ρευμάτων Kv1.3.**

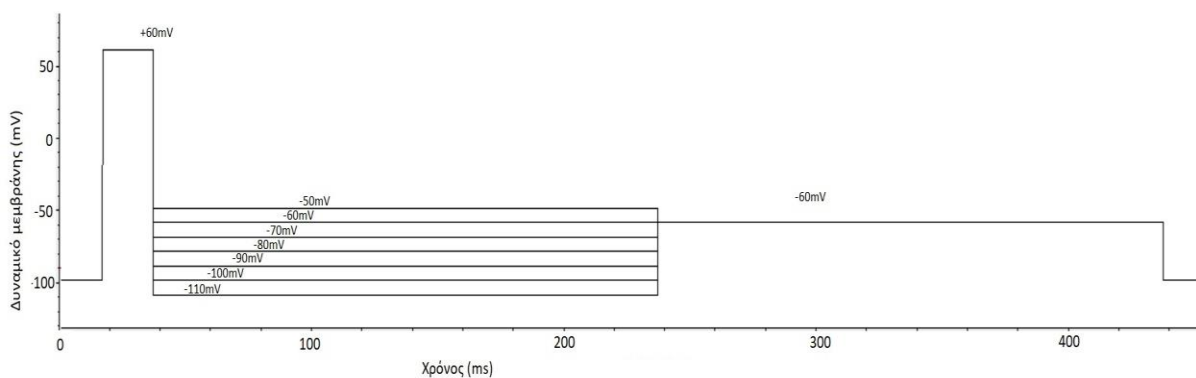
Πρωτόκολλο 8 ορθογώνιων παλμών σε σειρά από τα -90 mV στα +40 mV διάρκειας 100 msec κάθε 1 sec.



**Εικόνα 13: Πρωτόκολλο παλμών για την μελέτη των χαρακτηριστικών της αθροιστικής αδρανοποίησης των ρευμάτων Kv1.3.**

**4. Πρωτόκολλο παλμών για την μελέτη του δυναμικού αναστροφής των μεταγραφόμενων ρευμάτων .**

Σύνθετο πρωτόκολλο ορθογώνιων παλμών αποτελούμενο από έναν ορθογώνιο παλμό στα +60 mV διάρκειας 100 msec ακολουθούμενο από ομάδα παλμών από τα -110 έως τα +30 σε βήματα των 10 mV διάρκειας 300 sec. Οι παλμοί δίνονται κάθε 60 sec.



**Εικόνα 14: Πρωτόκολλο παλμών για την μελέτη του δυναμικού αναστροφής των μεταγραφόμενων ρευμάτων .**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

### Η προτεινόμενη μέθοδος – Θεμελίωση, Σχεδίαση, Ανάπτυξη

#### *Προετοιμασία κυττάρων και ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές*

Τα μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος διαχωρίστηκαν από ηπαρινισμένο αίμα, που συλλέχθηκε μετά από φλεβοκέντηση, με Ficoll-Hygraque μέσω φυγοκέντρησης βαθμίδωσης πυκνότητας. Η πρώτη φυγοκέντρηση του αίματος που επισιτίζεται στο διάλυμα Ficoll-Hygraque σε πλαστικό δοκιμαστικό σωληνάκι γίνεται στις 2000 στροφές/λεπτό (rpm) για 20 λεπτά και η σχηματιζόμενη υπόλευκη στιβάδα των μονοπύρηννων κυττάρων (Buffy coat) συλλέγεται με τη χρήση πλαστικής πιπέτας (πιπέτα Pasteur). Τα κύτταρα μεταφέρονται σε νέο πλαστικό δοκιμαστικό σωληνάκι και ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Solution, PBS) με δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 1500 στροφές (rpm)/λεπτό για 10 λεπτά (7). Μετά το δεύτερο ξέπλυμα με PBS, το ίζημα (pellet) των άμεσα απομονωμένων T-λεμφοκυττάρων αναδιαλυτοποιούνται και διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (500-700μl ανά γενική αίματος) και χρησιμοποιούνται για τις ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές την ίδια μέρα.

Η ηλεκτρική δραστηριότητα καταγράφηκε από ολόκληρη την κυτταρική διαμόρφωση της τεχνικής patch-clamp (5) χρησιμοποιώντας έναν ενισχυτή Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), διασυνδεδεμένο με έναν υπολογιστή με αναλογικό-σε-ψηφιακό μετατροπέα Digidata 1200 (Axon Instruments).

Οι πιπέτες δημιουργήθηκαν από τριχοειδή αγγεία βοριοπυριτικού γυαλιού (World Precision Instruments, Sarasota, FA) χρησιμοποιώντας έναν εξολκέα δύο σταδίων (L / M-3P-A, List Medical, Darmstadt, Γερμανία) και είχαν αντιστάσεις μεταξύ 3 και 5 MΩ. Αντιστάσεις

σφραγίσεως (seal) 10-20 GΩ ελήφθησαν μετά από ελαφρά αναρρόφηση στο εσωτερικό της πιπέτας.

Το εξωκυτταρικό διάλυμα περιείχε (σε mM): NaCl 135, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 12, MgCl<sub>2</sub>, HEPES 10 (pH 7.4, οσμωτικότητα 280 mOsm / kg). Το διάλυμα της πιπέτας (καταγραφής) αποτελείται από (σε mM): KCl 100, KF 40, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 10 και HEPES 10 (pH 7,4, οσμωτικότητα 290 mOsm / kg). Το ενδοκυτταρικό Ca<sup>2+</sup> ρυθμίστηκε σε συγκέντρωση ≈100 nM, για να αποτραπεί η ενεργοποίηση των εξαρτώμενων από το ασβέστιο διαύλων καλίου (K<sub>Ca</sub>).

Τα δυναμικά της μεμβράνης διορθώθηκαν σε σχέση με τα δυναμικά των υγρών συνδέσεων ενώ τα ρεύματα διαρροής ήταν αμελητέα και δε διενεργήθηκε διόρθωση. Τα πρωτόκολλα τάσης και η ανάλυση δεδομένων έχουν περιγραφεί προηγουμένως (κεφ. 2).

Η χωρητικότητα κυττάρων, ένα άμεσο μέτρο της επιφάνειας της κυτταρικής επιφάνειας, παρακολουθήθηκε συνεχώς κατά τη διάρκεια της καταγραφής. Ο αριθμός των καναλιών K<sub>v</sub>1.3 ανά κύτταρο προσδιορίστηκε διαιρώντας την αγωγιμότητα των καναλιών K<sub>v</sub>1.3 από ολόκληρο το κύτταρο με την τιμή αγωγιμότητας του ενός καναλιού (12 pS).

Η διεξαγωγή όλων των πειραμάτων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

### Ανάλυση Αποτελεσμάτων – Συζήτηση

#### *Ex vivo ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές ρευμάτων από ολόκληρα T-λεμφοκύτταρα*

Τα χαρακτηριστικά των ηλεκτρικών ρευμάτων τα οποία διέρχονται μέσω των ενεργοποιημένων διαύλων Kv1.3 της μεμβράνης T-λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΣ και υγιών ατόμων έχουν διερευνηθεί και από άλλα εργαστήρια σε προηγούμενες μελέτες (3,8,9). Εντούτοις, στις μελέτες αυτές τα T-λεμφοκύτταρα προέρχονταν από κυτταροκαλλιέργειες, δηλαδή τα κύτταρα μετά την απομόνωσή τους τοποθετούνται σε φιάλες με θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό αίματος από έμβρυα βοοειδών και επωάζονται για αρκετές ημέρες σε θαλάμους κυτταροκαλλιιεργειών (37 °C και 5% CO<sub>2</sub>) πριν χρησιμοποιηθούν για ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες. Οι μελέτες αυτές ονομάζονται *in vitro*. Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες μελέτες, στην παρούσα μελέτη οι καταγραφές των μεμβρανικών ρευμάτων που παράγονται από την ενεργοποίηση των διαύλων Kv1.3 έγινε από T-λεμφοκύτταρα που μόλις είχαν απομονωθεί από το ολικό περιφερικό αίμα ασθενών και υγιών ατόμων. Οι μελέτες αυτές ονομάζονται *ex vivo*. Το βασικό πλεονέκτημα των *ex vivo* μελετών έγκειται στο γεγονός ότι οι βιολογικές ιδιότητες των κυττάρων, των οργανιδίων τους και των πρωτεϊνών τους, παραμένουν πολύ κοντά στην κατάσταση που ήταν μέσα στον οργανισμό (*in vivo*) αντικατοπτρίζοντας πολύ καλύτερα την φυσιολογία ή την παθοφυσιολογία του υπό μελέτη κυττάρου.

Ο αριθμός των T-λεμφοκυττάρων από τα οποία πήραμε ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές χρησιμοποιώντας την μέθοδο patch-clamp είναι κατά μέσο όρο 60. Σε 20-25 κύτταρα από αυτά εφαρμόστηκαν σχεδόν όλα τα πρωτόκολλα δυναμικών τα οποία αναφέρονται στο κεφάλαιο 2 ενώ στα υπόλοιπα εφαρμόστηκαν 2-3 διαφορετικά πρωτόκολλα δυναμικών.

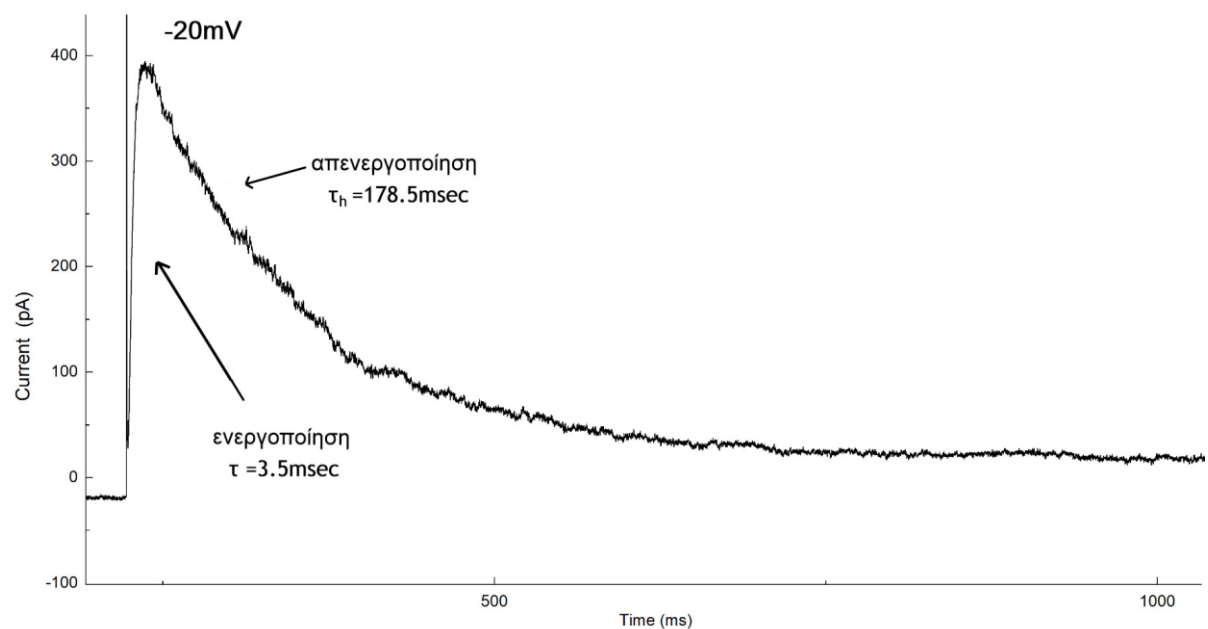
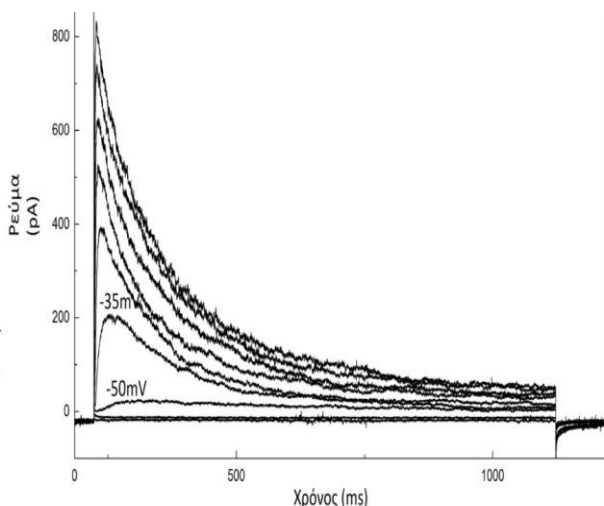
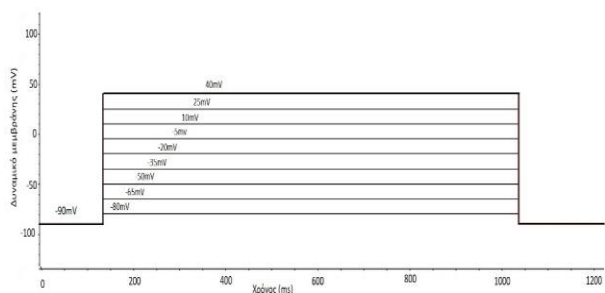
### **Ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες τασοελεγχόμενων ρευμάτων καλίου, χαρακτηρισμός τους ως ρεύματα διαύλων Kv1.3**

Τα ηλεκτρικά ρεύματα που καταγράψαμε όπως φαίνεται και στην εικόνα 15 ήταν σε απόκριση στις αλλαγές του δυναμικού της μεμβράνης από το δυναμικό καθήλωσης των -90 mV. Αυτές οι αποκρίσεις της μεμβράνης χαρακτηρίζονταν από ρεύματα τα οποία ενεργοποιούνταν όταν το δυναμικό της μεμβράνης ήταν πιο θετικό από τα -35 mV και είχαν κατεύθυνση από την ενδοκυττάρια περιοχή της μεμβράνης προς τον εξωκυττάριο χώρο (ανοδικό ρεύμα) με γρήγορη άνοδο του ρεύματος προς την κορυφή ή άλλως γρήγορη κινητική ενεργοποίησης ρεύματος ( $\tau=3.5\pm 0.5$  msec). Τα καταγραφόμενα ρεύματα παρουσιάζουν απενεργοποίηση, δηλαδή μετά από μία μέγιστη τιμή αρχίζουν και φθίνουν ενώ το βήμα του παλμού του δυναμικού παραμένει στην ίδια τιμή. Η σταθερά απενεργοποίησης των ρευμάτων όπως αυτή υπολογίστηκε από την εκθετική συνάρτηση

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C$$

είναι ( $\tau_h=178.5\pm 11$  msec).

Με την εφαρμογή του ειδικού πρωτοκόλλου δυναμικών κεφάλαιο 2, πρωτόκολλο 4 βρήκαμε ότι το δυναμικό αναστροφής των καταγραφόμενων ρευμάτων ήταν ίσο με -80 mV. Η τιμή αυτή αναστροφής είναι πολύ κοντά με το υπολογισθέν δυναμικό ισορροπίας του καλίου για τα διαλύματα μας βάσει της εξίσωσης του Nernst ( $V_K=-84,2$  mV). Από αυτό συνάγεται ότι το κύριο ιόν που κινείται μέσω των διαύλων είναι το κάλιο. Από τα ανωτέρω χαρακτηρίσαμε τα ρεύματα που καταγράψαμε από τα T-λεμφοκύτταρα με την χρήση των συγκεκριμένων πρωτοκόλλων παλμών δυναμικών, ως ρεύματα διαύλων καλίου όψιμης ανόρθωσης (delayed rectifier). Επιπροσθέτως, χαρακτηρίσαμε τους διαύλους καλίου ως Kv1.3, διότι α) η προσθήκη στο εξωκυττάριο διάλυμα 1 nM της τοξίνης ShK-1867, η οποία έχει δράση εκλεκτικού αναστολέα της λειτουργίας των διαύλων Kv1.3, προκαλούσε τον ολικό αποκλεισμό των ρευμάτων και β) λόγω της παρουσίας αθροιστικής αδρανοποίησης των ρευμάτων όταν οι παλμοί δυναμικών εφαρμόζονταν στην μεμβράνη με μεσοδιαστήματα μικρότερα των 50 sec.



**Εικόνα 15: Καταγραφή ηλεκτρικών ρευμάτων σε απάντηση ορθογώνιων εκπολωτικών παλμών και υπολογισμός των χαρακτηριστικών βιοφυσικών ιδιοτήτων τους.**

## **Αποτέλεσμα 1:**

### ***Αυξημένος αριθμός διαύλων Kv1.3 στα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με ΠΣ***

Οι καταγραφές των ρευμάτων που παρήχθησαν από την εφαρμογή ομάδων ορθογώνιων παλμών ανάλογων των χαρακτηριστικών που θέλαμε να μελετήσουμε αρχικά έδειξαν ότι η μεμβράνη των T-λεμφοκυττάρων από ασθενείς με ΠΣ έδιναν αποκρίσεις με σημαντικά υψηλότερο πλάτος (ύψος κορυφής) ρευμάτων καλίου απ' ότι η ομάδα των μαρτύρων σε δυναμικά ίσης έντασης (Εικόνα 16 , Πίνακας 1). Αυτό το εύρημα μπορεί να είναι το αποτέλεσμα από μια σειρά διαφορετικών υποκείμενων αιτιών όπως ότι: α) οι δίαυλοι μέσω των οποίων ρέουν τα ιόντα καλίου και παράγουν το καταγραφόμενο ρεύμα καλίου είναι διαφορετικού τύπου β) οι δίαυλοι είναι του ίδιου τύπου αλλά έχουν τροποποιημένες κάποιες από τις βιοφυσικές τους ιδιότητες σε αυτούς τους ασθενείς όπως π.χ γρηγορότερη μετάβαση στην ανοικτή κατάσταση ή επιβραδυμένη μετάβαση στην απενεργοποιημένη κατάσταση, με τελικό αποτέλεσμα οι δίαυλοι να άγουν μεγαλύτερο αριθμό ιόντων κάθε φορά που ενεργοποιούνται και έτσι η ενεργοποίηση του ίδιου αριθμού διαύλων να παράγει ρεύματα μεγαλύτερου πλάτους. Από τα ανωτέρω, είναι φανερό ότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων μας για να δείξουμε τι ακριβώς προκαλεί την καταγραφόμενη αύξηση των ρευμάτων στους ασθενείς με ΠΣ.

Είναι γνωστό ότι οι δίαυλοι που είναι εκλεκτικοί για το κάλιο αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα διαύλων στα διάφορα βιολογικά συστήματα και αριθμούν πάνω από 100 διαφορετικά είδη (10). Στα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα έχει αναφερθεί η ύπαρξη τουλάχιστον τριών διαφορετικών ειδών εκλεκτικών για το κάλιο διαύλων. Οι δίαυλοι αυτοί αποτελούνται από πολύ διαφορετικές πρωτεΐνες και μακροσκοπικά διαχωρίζονται κυρίως με βάση τον τύπο του ερεθίσματος που τους ενεργοποιεί (δυναμικό, ασβέστιο, pH) και το οποίο τους προσδίδει και διαφορετικές βιοφυσικές ιδιότητες. Από αυτά τα τρία διαφορετικά είδη διαύλων, τα δύο που ενεργοποιούνται από το δυναμικό και το ασβέστιο έχει αναφερθεί και δειχθεί από πλειάδα εργαστηρίων ότι εκφράζονται στα T-

λεμφοκύτταρα. Αντίθετα, οι δίαυλοι που ενεργοποιούνται από το pH πρωτοαναφέρθηκαν μόλις πριν από μια δεκαετία και μόνον ένας μικρός αριθμός δημοσιεύσεων, που προέρχεται κυρίως από την ίδια ερευνητική ομάδα, έχει επιβεβαιώσει την έκφραση τους στα T-λεμφοκύτταρα (11,12).

### **Αποτέλεσμα 2:**

#### **Τα καταγραφέντα ρεύματα καλίου από T-λεμφοκύτταρα ασθενών με ΠΣ εμφανίζουν παρόμοια βιοφυσικά χαρακτηριστικά με αυτά της ομάδας μαρτύρων**

Αρχικά εξετάσαμε και συγκρίναμε τις βασικές βιοφυσικές ιδιότητες των καταγραφόμενων ρευμάτων καλίου μεταξύ των ασθενών με ΠΣ και της ομάδας μαρτύρων. Για να γίνει άρση της παραμέτρου του πλάτους των καταγεγραμμένων ρευμάτων που όπως αναφέραμε διαφέρουν μεταξύ ασθενών και μαρτύρων (διαφορές στην τιμή κορυφής των ρευμάτων) εφαρμόσαμε κανονικοποίηση των καταγεγραμμένων ρευμάτων. Αυτή έγινε διαιρώντας την τιμή κορυφής ρεύματος σε κάθε δυναμικό (-80 έως +40 mV) με την τιμή της κορυφής ρεύματος στην μέγιστη τιμή δυναμικού που χρησιμοποιήσαμε σε κάθε πρωτόκολλο παλμών δυναμικού για την μελέτη της κατάστασης ενεργοποίησης και της κατάστασης σταθερής απενεργοποίησης. Έτσι, εξετάσαμε και συγκρίναμε τις ακόλουθες βιοφυσικές παραμέτρους:

A) την ουδό (κατώφλι) ενεργοποίησης των ρευμάτων δηλαδή το δυναμικό στο οποίο ξεκινούν να ενεργοποιείται το ρεύμα και B) την κινητική ενεργοποίησης και απενεργοποίησης ρεύματος. Η κινητική ενεργοποίησης αντικατοπτρίζεται από τον χρόνο που χρειάζεται το ρεύμα να πάει από την τιμή 0 στην τιμή κορυφής του. Από την άλλη, η κινητική απενεργοποίησης αφορά τον χρόνο που χρειάζεται το ρεύμα για να φτάσει στη σταθερή τιμή του από την τιμή κορυφής του κατά την διάρκεια εφαρμογής ενός παλμού δυναμικού. Αυτό γιατί, όπως προαναφέρθηκε, τα ρεύματα που καταγράψαμε μετά την άνοδό τους στη μέγιστη τιμή τους και ενώ ο παλμός δυναμικού συνεχίζει να εφαρμόζεται αυτά μειώνονται και φτάνουν σε ένα πλατό, μια σταθερή τιμή (ρεύμα σταθερής

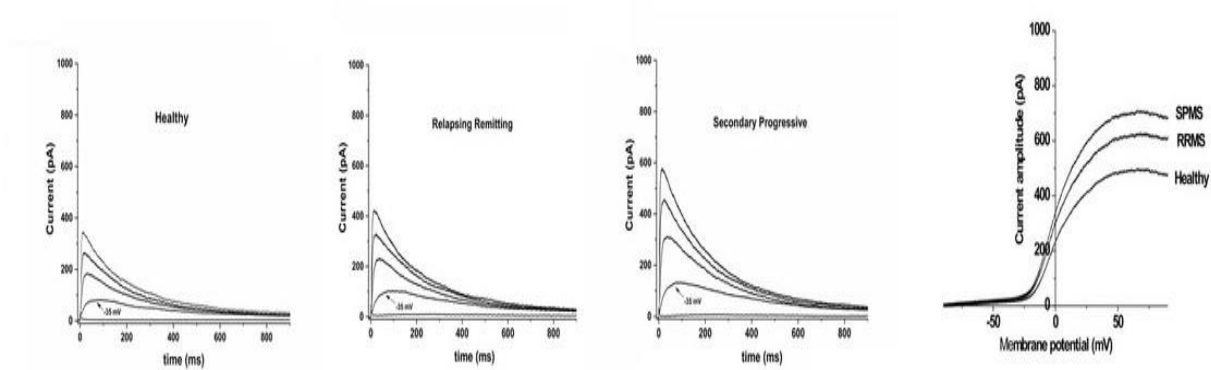
κατάστασης). Αυτές οι δύο παράμετροι μετρήθηκαν στα ρεύματα που ενεργοποιήθηκαν από τον ορθογώνιο παλμό στα -20 mV.

Γ) Το δυναμικό στο οποίο έχουμε την ενεργοποίηση του 1/2 (μισού) αριθμού από τον συνολικό αριθμό διαύλων που μπορούν να ενεργοποιηθούν ( $V_{1/2}$ ).

Δ) Το δυναμικό στο οποίο οι μισοί από τους ενεργοποιημένους διαύλους έχουν απενεργοποιηθεί μετά από κάποιο μεγάλο σχετικά χρονικό διάστημα (10 δευτερόλεπτα) σε αυτό το δυναμικό ( $V_{h1/2}$ ).

Ο υπολογισμός των ανωτέρω παραμέτρων για κάθε ομάδα και η σύγκριση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα καταγραφέντα ρεύματα από τα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με ΠΣ (Υ.Δ. και Δ.Π.), και μαρτύρων (Μ) είχαν την ίδια ουδό ενεργοποίησης και ίση με -35 mV, είχαν τον ίδιο μηχανισμό ενεργοποίησης δηλαδή ήταν τασεοεξαρτώμενα (από το δυναμικό) και παρουσίαζαν παρόμοιες κινητικές ενεργοποίησης και απενεργοποίησης καθώς επίσης και παρόμοιες τιμές  $V_{1/2}$  και  $V_{h1/2}$ . Οι αριθμητικές τιμές παρουσιάζονται και συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Τα ανωτέρω ευρήματα δείχνουν ότι οι διαύλοι καλίου σε ασθενείς με ΠΣ όπως προαναφέραμε παρουσιάζουν παρόμοιες βιοφυσικές ιδιότητες με τους διαύλους των μαρτύρων. Άρα το αυξημένο πλάτος πιθανότατα οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των ενεργών διαύλων και μάλιστα των  $Kv1.3$  (Εικόνα 16, Πίνακας 1) γιατί τα καταγεγραμμένα ρεύματα παρουσιάζουν αθροιστική αδρανοποίηση, που είναι το κύριο βιοφυσικό χαρακτηριστικό των διαύλων  $Kv1.3$ .



**Εικόνα 16: Καταγραφή ηλεκτρικών ρευμάτων από T-λεμφοκύτταρα υγιών μαρτύρων και ασθενών με Π.Σ με εξάρσεις και υφέσεις, την δευτεροπαθώς προϊούσα**

### **Αποτέλεσμα 3:**

**Τα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με ΠΣ δεν εκφράζουν λειτουργικούς διαύλους K2P5.1 (TASK)**

Σύμφωνα με δημοσιευμένο εύρημα μιας άλλης ερευνητικής ομάδας από την Γερμανία το 2010, τα T-λεμφοκύτταρα από ασθενείς με ΠΣ εκφράζουν υψηλότερα ρεύματα καλίου από τους μάρτυρες λόγω της σημαντικής αύξησης της έκφρασης των διαύλων καλίου που ενεργοποιούνται από το αλκαλικό pH και ονομάζονται K2P5.1 (TASK). Για το λόγο αυτό, αν και τα αποτελέσματά μας όπως φαίνεται από τις παραπάνω αναλύσεις μας δεν συνηγορούν σε μια τέτοια εξήγηση, εμείς διερευνήσαμε την πιθανή ύπαρξη λειτουργικών διαύλων K2P5.1 στα T-λεμφοκύτταρα αρχικά υγιών και μετά ασθενών ενώ διερευνήθηκε και η πιθανότητα η καταγραφόμενη αύξηση στο πλάτος των ρευμάτων από

τα T-λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΣ να οφείλεται στην αυξημένη έκφραση των διαύλων K2P5.1.

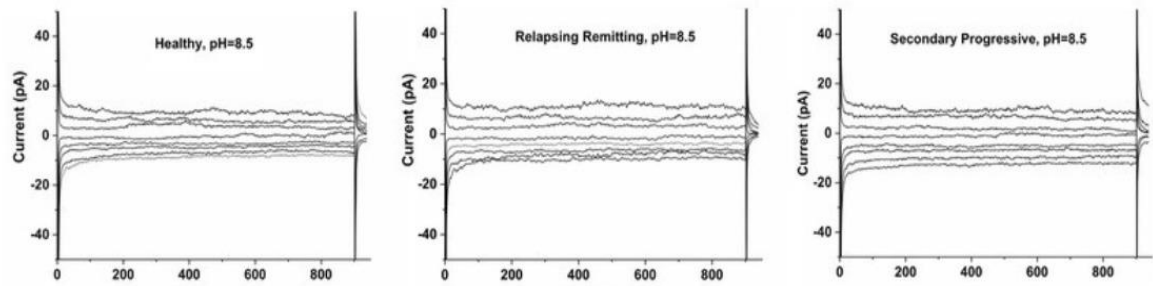
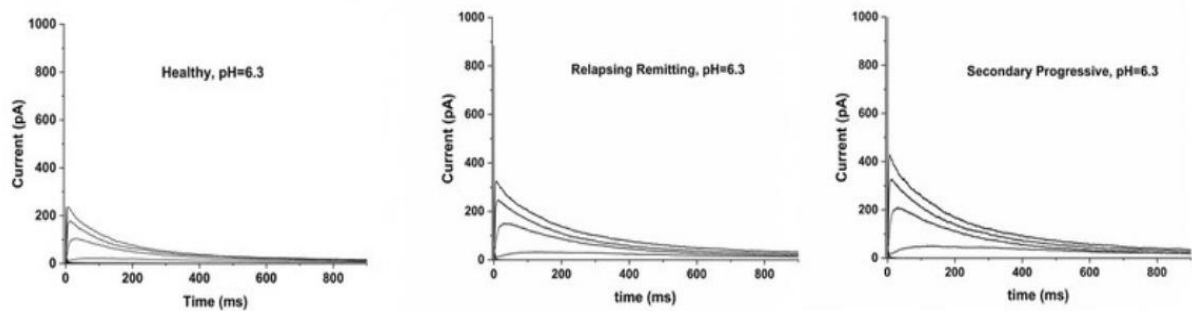
Για τον λόγο αυτό σχεδιάσαμε δύο διαφορετικές ομάδες πειραμάτων με τα οποία θα μπορούσαμε να διαχωρίσουμε τον τύπο των διαύλων καλίου που μετέχουν στην αγωγή του ρεύματος που καταγράφουμε εκμεταλλευόμενοι τους διαφορετικούς μηχανισμούς ενεργοποίησης (δυναμικό έναντι pH) και τις πολύ διαφορετικές βιοφυσικές ιδιότητες αυτών των δύο τύπων διαύλων (Εικόνα 17).

Δεδομένου ότι οι δίαυλοι Kv1.3 αδρανοποιούνται όταν η μεμβράνη παραμένει για 10 και πλέον δευτερόλεπτα σε εκπολωτικό δυναμικό και ότι η άρση της απενεργοποίησης των Kv1.3 διαύλων λόγω ενεργοποίησης απο εκπόλωση απαιτεί η μεμβράνη να μεταβεί και να παραμείνει σε πολύ αρνητικά δυναμικά (-90 mV) για 60 δευτερόλεπτα, η εφαρμογή ορθογώνιων παλμών δυναμικού με συχνότητα 1 παλμό κάθε 3 δευτερόλεπτα από δυναμικό καθήλωσης 0 mV μας επιτρέπει να αδρανοποιήσουμε όλους τους διαύλους Kv1.3 ενός κυττάρου (Εικόνα 17A). Επιπροσθέτως, γνωρίζουμε ότι οι δίαυλοι K2P5.1 δεν παρουσιάζουν καμία εξάρτηση από το δυναμικό αλλά η ενεργοποίησή τους εξαρτάται από το εξωκυττάριο ή ενδοκυττάριο pH. Σε όξινα εξω- ή ενδο-κυττάρια διαλύματα (6.3 pH) οι δίαυλοι αυτοί παραμένουν στην κλειστή διαμόρφωση ή παρουσιάζουν ελάχιστη ενεργοποίηση και άρα είτε δεν άγουν ιόντα καλίου ή αν άγουν είναι ελάχιστα, ενώ αντίθετα σε αλκαλικά διαλύματα (pH 8.5) παρουσιάζουν την μέγιστη αγωγιμότητα. Παίρνοντας υπ'όψιν αυτά τα χαρακτηριστικά των διαύλων, καταγράψαμε ηλεκτρικά ρεύματα επαγόμενα από ορθογώνια βήματα δυναμικού τα οποία α) τα εφαρμόζαμε με συχνότητα 1 κάθε 60 δευτερόλεπτα από δυναμικό καθήλωσης της κυτταρικής μεμβράνης στα -90 mV ενώ διαχέουμε εξωκυττάριο διάλυμα όξινου pH 6.3 στο T-λεμφοκύτταρο από το οποίο καταγράφουμε (Εικόνα 17B) και β) τα εφαρμόζουμε με συχνότητα 1 κάθε 10 δευτερόλεπτα από δυναμικό καθήλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των 0 mV και ενώ διαχέουμε στο κύτταρο από το οποίο καταγράφουμε εξωκυττάριο διάλυμα με αλκαλικό pH 8.5. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 17B, κάτω από πειραματικές συνθήκες που ευνοούν την ενεργοποίηση των διαύλων Kv1.3 και αναστέλλουν την ενεργοποίηση των διαύλων K2P5.1 (συνθήκη α) τα καταγραφέντα ρεύματα είχαν δυναμικό αναστροφής μεταξύ -75 και -80 mV το οποίο είναι πολύ κοντά στην υπολογισθείσα τιμή αναστροφής καλίου για τα



διαλύματά μας. Ταυτόχρονα, τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά των καταγραφόμενων ηλεκτρικών ρευμάτων είχαν ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά συμβατά με τα K<sub>v</sub>1.3 ρεύματα. Το πλάτος δε, των ρευμάτων K<sub>v</sub>1.3 ήταν σημαντικά υψηλότερο στις καταγραφές απο T-λεμφοκύτταρα ασθενών με ΠΣ έναντι των μαρτύρων. Από την άλλη, εφαρμογή των πειραματικών πρωτοκόλλων που ήταν ευνοϊκά για την ενεργοποίηση των διαύλων K<sub>2</sub>P<sub>5.1</sub> και ανασταλτικά ως προς τους διαύλους K<sub>v</sub>1.3 έδειξαν, όπως φαίνεται και στην εικόνα 17Α, ότι τα εκλειόμενα ρεύματα από τα βήματα δυναμικού είχαν πολύ μικρό πλάτος και είχαν παρόμοια τιμή σε όλες τις ομάδες (ασθενείς με ΠΣ, ασθενείς με άλλα νευρολογικά νοσήματα και υγιείς). Αξίζει μάλιστα να σημειωθεί ότι το δυναμικό αναστροφής, όπως αυτό υπολογίστηκε από την εφαρμογή πρωτοκόλλων ουράς ρευμάτων, είναι περίπου 0 mV, το οποίο είναι κοντά στο υπολογισθέν δυναμικό αναστροφής του χλωρίου ή μονοκατιόντων, συνολικά δηλαδή μη εκλεκτικών διαύλων που επιτρέπουν την ροή τόσο σε νάτριο όσο και σε κάλιο και πολύ μακριά από το υπολογισθέν για τα διαλύματά μας δυναμικό αναστροφής του καλίου (-83.5 mV).

Από τα παραπάνω πειράματα γίνεται ξεκάθαρο ότι τα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα τόσο των ασθενών όσο και των υγιών κάτω από τις δικές μας πειραματικές συνθήκες δεν εκφράζουν λειτουργικούς διαύλους K<sub>2</sub>P<sub>5.1</sub> στη μεμβράνη τους, τουλάχιστον σε αριθμό που να είναι τα ρεύματα ανιχνεύσιμα για να καταγραφούν.

**A****B**

**Εικόνα 17: Καταγραφή ηλεκτρικών ρευμάτων:**

**A. Επίδραση εκπολωτικού δυναμικού καθήλωσης της μεμβράνης (0mV) στην ηλεκτρική δραστηριότητα των Τ-λεμφοκυττάρων εμβαπτισμένων σε αλκαλικό εξωκυττάριο pH (pH =8.5)**

**B. Επίδραση του όξινου εξωκυττάρου διαλύματος (pH =6.3) στην ηλεκτρική δραστηριότητα των Τ-λεμφοκυττάρων όταν η μεμβράνη τους είναι καθηλωμένη σε υπερπολωμένο δυναμικό (-90 mV).**

#### **Αποτέλεσμα 4:**

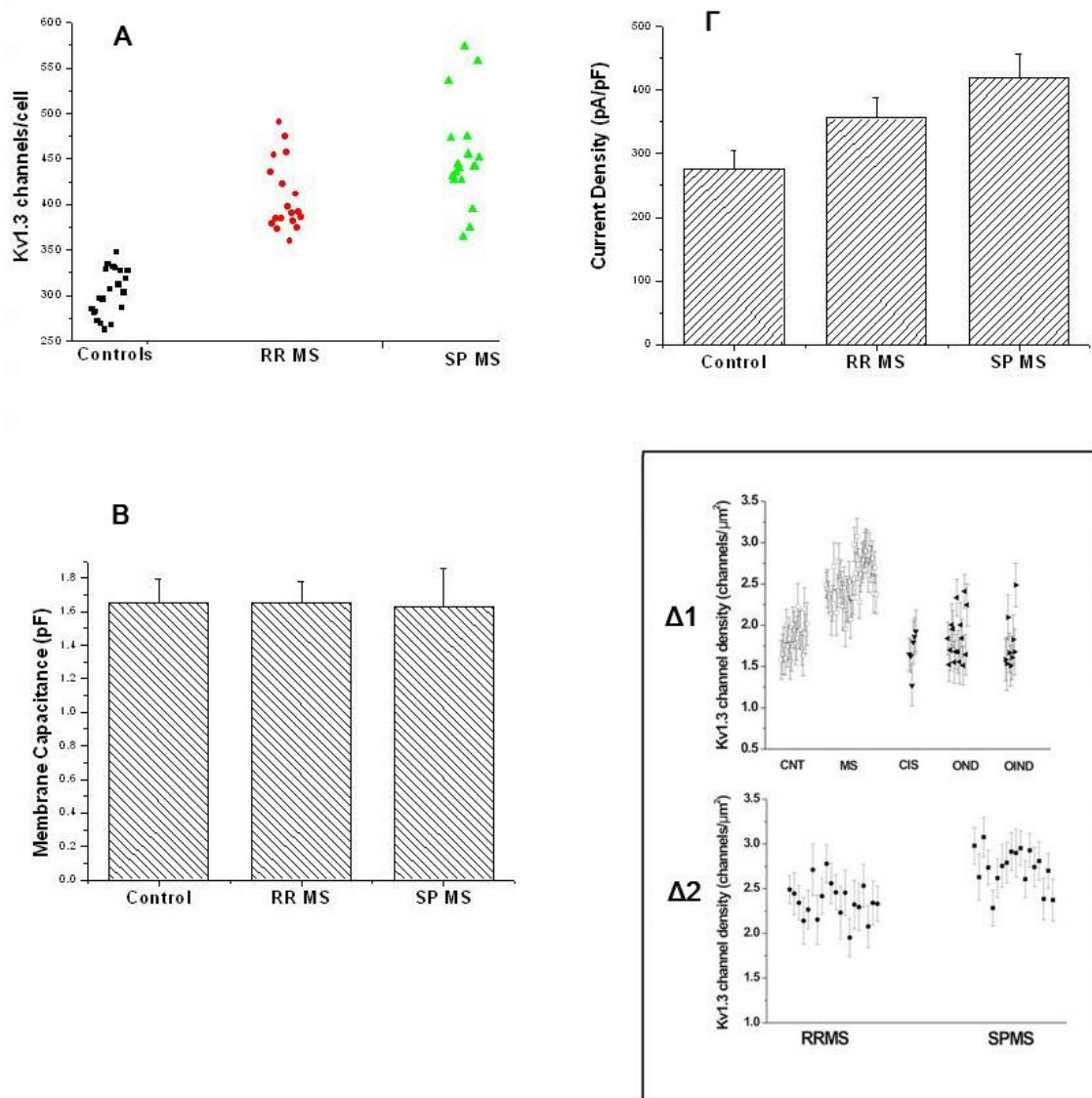
##### **Τα Τ-λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΣ εκφράζουν μεγαλύτερο αριθμό διαύλων Kv1.3 ανά $\mu\text{m}^2$ κυτταρικής επιφάνειας από ότι η ομάδα μαρτύρων.**

Αφού δείξαμε ότι οι δίαυλοι μέσα από τους οποίους κινούνται τα ιόντα καλίου στα ρεύματα που καταγράφουμε είναι οι Kv1.3 και δεν έχουμε μικτό πληθυσμό, το επόμενο βήμα μας ήταν να υπολογίσουμε τον αριθμό των διαύλων που ενεργοποιούνται από έναν ορθογώνιο παλμό δυναμικού. Για τον υπολογισμό αυτόν διαιρέσαμε την τιμή κορυφής του ρεύματος που επάγεται από παλμό δυναμικού +40 mV με την αγωγιμότητα που έχει ο ένας δίαυλος Kv1.3 σε αυτό το δυναμικό. Η αγωγιμότητα των διαύλων Kv1.3 έχει μετρηθεί άμεσα μέσω της καταγραφής ρευμάτων από μονήρεις διαύλους Kv1.3 στο εργαστήριο από τον Δρ. Ιωάννη Μαρκάκη στα +40 mV και έχει βρεθεί να είναι ίση με 12pS. Ο υπολογισμός αυτός του αριθμού των ενεργοποιημένων διαύλων στα +40 mV έδειξε ότι οι ασθενείς με ΠΣ έχουν σημαντικά υψηλότερο αριθμό διαύλων από τους μάρτυρες ( $\text{ΠΣ}=2.5\pm 0.04$ ,  $M=1.8\pm 0.05$  δίαυλοι/ $\mu\text{m}^2$ ) (Εικόνα 18Α).

Με την σειρά του αυτό το εύρημα θα μπορούσε να σημαίνει ότι τα Τ-λεμφοκύτταρα των ασθενών είναι μεγαλύτερα από αυτά των υγιών και έτσι η αύξηση της επιφάνειας να οδηγεί σε μεγαλύτερο αναλογικά αριθμό διαύλων. Για να διερευνήσουμε αυτή την εκδοχή προχωρήσαμε στην κανονικοποίηση του μεγέθους των κυττάρων χρησιμοποιώντας ως μέτρο αναφοράς την χωρητικότητα της μεμβράνης, η οποία καταγράφεται από το πρόγραμμα καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος (Εικόνα 18Β). Είναι γνωστό ότι χωρητικότητα 1 pF αντιστοιχεί με  $100 \mu\text{m}^2$  κυτταρικής επιφάνειας. Βάση αυτού του δεδομένου προσδιορίσαμε την πυκνότητα καναλιών Kv1.3 ανά  $\mu\text{m}^2$  κυτταρικής επιφάνειας διαιρώντας τον μέσο αριθμό διαύλων/κύτταρο με τη προσδιορισθείσα μέση τιμή κυτταρικής επιφάνειας. Η πυκνότητα των διαύλων Kv1.3 (δίαυλοι/ $\mu\text{m}^2$  κυτταρικής επιφάνειας) των Τ-λεμφοκυττάρων των ασθενών με ΠΣ ήταν ίση με  $2.5\pm 0.04$  που είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή των Τ λεμφοκυττάρων των μαρτύρων που ήταν ίση  $1.8\pm 0.05$  (Εικόνα 18Γ, Πίνακας 1,  $p < 0,001$ ). Η υψηλότερη πυκνότητα σε διαύλους Kv1.3 των Τ λεμφοκυττάρων των ασθενών με ΠΣ δεν φαίνεται να οφείλεται σε μια μειοψηφία κυττάρων που εκφράζουν μεγάλο αριθμό καναλιών Kv1.3 γιατί από τα 900 και πλέον Τ λεμφοκύτταρα που μελετήθηκαν, το 86% είχαν πυκνότητα διαύλων μεγαλύτερη από 2.1

δίαυλοι/ $\mu\text{m}^2$ , ενώ μόνο το 15% από τα 1258 T λεμφοκύτταρα μαρτύρων που μελετήθηκαν είχαν πυκνότητα καναλιών πάνω από αυτή την τιμή αποκοπής.

Το παραπάνω εύρημα υποδηλώνει ότι το Kv1.3 μπορεί να είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης για να διακρίνει την ΠΣ από άλλες φλεγμονώδεις διαταραχές του ΚΝΣ (Εικόνα 18Δ1 και 18Δ2, Πίνακας 1,  $p < 0.001$ ).



**Εικόνα 18:** Υπολογισμός πυκνότητας ρεύματος από την χωρητικότητα της μεμβράνης και του αριθμού των διαύλων Kv1.3/κύτταρο και επιφάνεια μεμβράνης.

| Group                   | Activation threshold | $\tau_n$ (ms) | $\tau_j$ (ms) | $V_n$ (mV) | $V_j$ (mV) | $I_{max}$ (pA) | $C_m$ (pF) | Kv1.3 channel density (channels/ $\mu\text{m}^2$ ) |
|-------------------------|----------------------|---------------|---------------|------------|------------|----------------|------------|--|
| <b>Definite MS</b>      | -35 mV               | 3.4±0.4       | 169±4.2       | -32.3±2.5  | -53.5±1.9  | 636.3±29.3     | 1.67±0.1   | 2.5±0.04   |
| Relapsing remitting     | -35 mV               | 3.5±0.3       | 167±3.2       | -31.8±2.1  | -53.1±2.2  | 596.7±32.2     | 1.68±0.1   | 2.4±0.04   |
| Secondary progressive   | -35 mV               | 3.4±0.5       | 171±5         | -32.7±2.6  | -53.7±2.1  | 680.5±28.4     | 1.65±0.2   | 2.7±0.05   |
| <b>CIS</b>              | -35 mV               | 3.5±0.3       | 169±4.7       | -31.9±2.5  | -52.8±2.3  | 432.6±36.8     | 1.80±0.1   | 1.8±0.09   |
| <b>OND</b>              | -35 mV               | 3.6±0.5       | 172±5.1       | -32.3±3    | -51.6±1.9  | 449.2±35.1     | 1.6±0.2    | 1.8±0.07   |
| <b>OIND</b>             | -35 mV               | 3.8±0.4       | 173±4.4       | -32±2.4    | -51.9±2    | 435.66±31.9    | 1.68±0.1   | 1.8±0.1  |
| <b>Healthy controls</b> | -35 mV               | 3.5±0.3       | 171±4.4       | -33.1±2.6  | -53.5±1.8  | 455.3±29.5     | 1.65±0.1   | 1.8±0.05   |

**Πίνακας 1: Βιοφυσικά χαρακτηριστικά των διαύλων KV1.3 στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:

### Συμπεράσματα – Προτάσεις

#### **Συμπεράσματα**

Τα αποτελέσματα της παρούσας ex vivo μελέτης έδειξαν ότι τα άμεσα απομονωμένα T-λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΣ εκφράζουν στην μεμβράνη τους μεγαλύτερο αριθμό λειτουργικών Kv1.3 διαύλων ανά επιφάνεια μεμβράνης απ' ότι τα αντίστοιχα κύτταρα υγιών ατόμων ή ασθενών με άλλα νευρολογικά νοσήματα, παρουσία ή απουσία φλεγμονής. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με μελέτη από άλλο εργαστήριο όπου επίσης μελετήθηκε η έκφραση των διαύλων Kv1.3 αλλά σε μια πολύ ειδική υπο-ομάδα T-λεμφοκυττάρων από ασθενείς με ΠΣ, τα μυελινο-ειδικά T-λεμφοκύτταρα, τα οποία διατηρούσαν σε κυτταροκαλλιέργεια. Στην μελέτη της η ομάδα αυτή αναφέρει επίσης αυξημένα επίπεδα διαύλων Kv1.3 (~ 1500 Kv1.3 δίαυλοι ανά κύτταρο), σε σύγκριση με υγιή άτομα (~ 580 Kv1.3 δίαυλοι ανά κύτταρο) (9) Επιπροσθέτως, δείξαμε ότι η αύξηση του πλάτους των ανορθωτικών ρευμάτων συνεχίζει να υπάρχει και κάτω απο συνθήκες όξινου pH και άρα αποκλείσαμε την πιθανότητα τα ιόντα καλίου να ρέουν μέσω των K2P5.1 διαύλων καλίου που είναι ανενεργοί σε όξινο pH. Επιπλέον, με την χρήση ειδικών πρωτοκόλλων και διαλυμάτων δείξαμε ότι τα T-λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΣ καθώς και όλων των ομάδων μαρτύρων (υγιών και ασθενών με άλλα νευρολογικά νοσήματα) δεν διαθέτουν ανιχνεύσιμους λειτουργικούς διαύλους καλίου K2P5.1. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα δημοσιευμένα ευρήματα των Bitter κ.α. (12) οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η καταγραφόμενη αύξηση των ανορθωτικών ρευμάτων καλίου στα T-λεμφοκύτταρα ασθενών με ΠΣ είναι λόγω της αυξημένης έκφρασης των διαύλων K2P5.1.

Στην παρούσα μελέτη δεν έχουμε διαχωρίσει τους διαφορετικούς υποπληθυσμούς T-λεμφοκυττάρων και άρα σε κάθε δείγμα μας έχουμε και καταγράψουμε ηλεκτρική

δραστηριότητα από όλους τους υποπληθυσμούς, δείχνοντας ότι η αύξηση στην πυκνότητα των διαύλων Kv1.3 δεν περιορίζεται μόνο στα μυελινο-ειδικά T-λεμφοκύτταρα αλλά αφορά όλες τις κατηγορίες λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος των ασθενών με ΠΣ. Επιπροσθέτως, εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι μοριακές μελέτες σε T-λεμφοκύτταρα από τους ίδιους ασθενείς και υγιείς που χρησιμοποιήθηκαν για τα ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα και που έγιναν από την υποψήφια διδάκτορα και ερευνήτρια του εργαστηρίου κ. Μελπομένη Γαλάνη δείχνουν ότι οι ασθενείς με ΠΣ παρουσιάζουν και αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου Kv1.3 σε mRNA (αδημοσίευτο εύρημα). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι οι ασθενείς με άλλα νευρολογικά νοσήματα και κυρίως αυτοί των οποίων το νευρολογικό νόσημα περιλαμβάνει στην παθοφυσιολογία του και φλεγμονή όπως η οπτική νευρίτιδα, δεν εμφανίζουν αύξηση στην έκφραση των Kv1.3 στα T-λεμφοκύτταρά τους. Αυτό το εύρημα καταδεικνύει ότι η αυξημένη έκφραση του Kv1.3 δεν είναι γενικό χαρακτηριστικό της φλεγμονής και άρα υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης αυτών των διαύλων θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως ένας βιοδείκτης για την νόσο.

Είναι γνωστό πλέον πως οι δίαυλοι Kv1.3 είναι αυτοί που όταν είναι ενεργοί οπλίζουν το T-λεμφοκύτταρο με αρνητικό δυναμικό και πως το αρνητικό δυναμικό αυτό είναι η κινητήρια δύναμη που χρειάζονται τα ιόντα ασβεστίου για να εισέλθουν στο κύτταρο μέσω των ειδικών διαύλων ασβεστίου CRAC. Ταυτόχρονα, γνωρίζοντας πως η απάντηση των T-λεμφοκυττάρων στο όποιο ανοσολογικό ερέθισμα έχει απόλυτη εξάρτηση και καθορίζεται από το ασβέστιο που θα εισέλθει στο κύτταρο (3), είναι εύκολο να συμπεράνουμε πως η όποια αύξηση στον αριθμό των λειτουργικών διαύλων Kv1.3 στα T-λεμφοκύτταρα θα οδηγήσει σε αυξημένη απόκρισή τους στα ανοσολογικά ερεθίσματα. Άρα βάσει των ευρημάτων μας και του ρόλου που διαδραματίζουν οι δίαυλοι αυτοί στο ανοσοποιητικό σύστημα, είναι δικαιολογημένο να αναφέρουμε ότι τα T-λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΣ είναι πιθανό να είναι υπερευαίσθητα σε ανοσολογικά ερεθίσματα. Αυτή η υπερευαίσθησία μπορεί να προδιαθέτει τα T-λεμφοκύτταρα για ενεργοποίηση και να βοηθά στην επέκταση των T-λεμφοκυττάρων που αντιδρούν με τη μυελίνη (μυελινο-ειδικών) και που είναι ο υποπληθισμός που έχει δειχθεί να σχετίζεται περισσότερο με την ΠΣ. Δεδομένου επίσης του ευρήματος ότι οι δίαυλοι Kv1.3 ρυθμίζουν και την κινητικότητα των T-λεμφοκυττάρων προς τους ιστούς που παρουσιάζουν φλεγμονή

(13), η αύξηση στην έκφραση του Kν1.3 στα T-λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΠΣ θα μπορούσε να προάγει την μεταφορά των κυττάρων αυτών στις φλεγμονώδεις θέσεις, που στους ασθενείς με ΠΣ είναι το ΚΝΣ, και έτσι να συνεισφέρουν στην απομυελίνωση.

Εν κατακλείδι, τα ευρήματά μας υποστηρίζουν μια σημαντική αύξηση των λειτουργικών διαύλων Kν1.3 στα περιφερικά (ή κυκλοφορούντα) T-λεμφοκύτταρα ασθενών με ΠΣ. Αν και χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος του διαύλου Kν1.3 στην παθογένεια της ΠΣ, αυτή η ανωμαλία επιβεβαιώνει τη σημασία που έχει η χρήση μορίων που παρεμποδίζουν την λειτουργία (αποκλειστές) του διαύλου αυτού και να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικό μέσο στην θεραπεία της νόσου.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΠΗΓΕΣ

### *Βιβλιογραφία – Πηγές σε ξένες γλώσσες*

1. Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, et al. CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108:1185-1194.
2. Rothenberg EV. Programming for T-lymphocyte fates: modularity and mechanisms. *Genes Dev.* 2019 Sep 1; 33(17-18):1117-1135. doi: 10.1101/gad.327163.119. Review. PubMed PMID: 31481536; PubMed Central PMCID: PMC6719619.
3. Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev* 2009; 231:59-87.
4. The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques, at <https://www.moleculardevices.com/sites/default/files/en/assets/brochures/dd/cns/axon-guide-to-electrophysiology-and-biophysics-laboratory-techniques.pdf>
5. Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981; 391:85-100.
6. Leois RA, Rae JL. Low-noise patch-clamp techniques. *Meth Enzym* 1998; 293:218-266.
7. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Invest* 1968; 21:77-83.
8. Rus H, Pardo CA, Hu L, et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:11094-11099.
9. Wulff H, Calabresi PA, Allie R, et al. The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* 2003;111:1703-1713.
10. Hille B. Ion channels of excitable membranes. Sinauer, Sunderland, MA, 2001.

11. Bittner S, Bobak N, Feuchtenberger M, Herrmann AM, Göbel K, Kinne RW, Hansen AJ, Budde T, Kleinschnitz C, Frey O, Tony HP, Wiendl H, Meuth SG. Expression of K2P5.1 potassium channels on CD4+ T lymphocytes correlates with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2011 Feb 11; 13(1):R21. doi:10.1186/ar3245. PubMed PMID: 21314928; PubMed Central PMCID: PMC3241365.
  12. Bittner S, Bobak N, Herrmann AM, Göbel K, Meuth P, Höhn KG, Stenner MP, Budde T, Wiendl H, Meuth SG. Upregulation of K2P5.1 potassium channels in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010 Jul; 68(1):58-69. doi: 10.1002/ana.22010. PubMed PMID:20582984.
  13. Matheu MP, Beeton C, Garcia A, et al. Imaging of Effector Memory T Cells during a Delayed-Type Hypersensitivity Reaction and Suppression by Kv1.3 Channel Block. *Immunity* 2008; 29:602-614.
-