

De invloed van simvastatine op de viabiliteit van de oligodendrogliale cellijn OLN-93

Debby BOLLEN

promotor :
dr. Ilse SMETS

co-promotor :
Prof. dr. Marcel AMELOOT

INHOUDSOPGAVE

INHOUDSOPGAVE	i
LIJST MET FIGUREN EN TABELLEN	ii
LIJST MET AFKORTINGEN	iii
VOORWOORD	v
SAMENVATTING	vi
HOOFDSTUK 1: INLEIDING	1
1.1 Multiple Sclerose	1
1.2 De verschillende vormen van MS	1
1.2.1 Relapsing-remitting MS	1
1.2.2 Primaire progressieve MS	2
1.2.3 Secundaire progressieve MS	2
1.3 De verschillende demyelinisatiepatronen bij MS	2
1.3.1 Patroon I, het macrofaaggemedieerde demyelinisatiepatroon	2
1.3.2 Patroon II, het antilichaamgemedieerde demyelinisatiepatroon	3
1.3.3 Patroon III, het distale-oligodendroglieopathie-geassocieerde demyelinisatiepatroon	3
1.3.4 Patroon IV, de primaire oligodendrocytdegeneratie	3
1.4 Oligodendrocyten	3
1.4.1 Het ontwikkelingsproces van de oligodendrocyten	4
1.4.2 De dubbele rol van de oligodendrocyten in het CZS	5
1.5 Hedendaagse therapieën voor MS	6
1.6 Statines: een alternatieve therapie?	7
1.6.1 Soorten statines	8
1.6.2 Het werkingsmechanisme en de pleiotropie van de statines	8
1.6.3 De therapeutische effecten van statines	9
1.6.3.1 De therapeutische effecten ter hoogte van de periferie en het immuunsysteem	9
1.6.3.2 De therapeutische effecten ter hoogte van het CZS	10
1.6.4 De nadelige effecten van statines	11
1.6.4.1 De nadelige effecten ter hoogte van de periferie en het cellulair niveau	12
1.6.4.2 De nadelige effecten ter hoogte van het CZS	13
1.7 Doelstelling van het onderzoek	15
HOOFDSTUK 2: MATERIALEN EN METHODEN	16
2.1 Oplossingen en reagentia	16
2.2 Celweek: OLN-93 cellijn	16
2.3 Celviabiliteitsmetingen	19
2.3.1 Spectrale overlap van calceïne en PI	20
2.3.2 Confocale laserscanning fluorescentiemicroscopie	21
2.3.3 Flowcytometrie	21
2.4 Statistiek	22
HOOFDSTUK 3: RESULTATEN	23
3.1 Het effect van simvastatine op de celvorm, intracellulaire esteraseactiviteit en membraanintegriteit	23
3.1.1 Confocale laserscanning fluorescentiemicroscopie	23
3.1.2 Flowcytometrie	27
HOOFDSTUK 4: DISCUSSIE	36
REFERENTIELIJST	43

LIJST MET FIGUREN EN TABELLEN

Figuren:

<i>Figuur 1.1:</i>	De zes fasen binnen de ontwikkelingslijn van de oligodendrocyten.	5
<i>Figuur 1.2:</i>	De chemische structuur van twee natuurlijke statines.	7
<i>Figuur 2.1:</i>	Beelden van OLN-93 cellen in cultuur, genomen met doorvallend licht op de Zeiss LSM 510 Meta confocale microscoop (PlanNeoFluar 10x objectief, zoom 4) bij 37°C.	17
<i>Figuur 2.2:</i>	Het excitatie- en emissiespectrum van calceïne in een buffer met pH 9 (groen) en propidiumjodide gebonden aan DNA (blauw).	20
<i>Figuur 2.3:</i>	De gebruikte instellingen op de confocale laserscanning fluorescentiemicroscoop voor de detectie van calceïne (A) en PI (B).	21
<i>Figuur 3.1:</i>	Confocale afbeeldingen van gedifferentieerde OLN-93 cellen in cultuur.	24
<i>Figuur 3.2:</i>	Flowcytometrische analyse van onbehandelde OLN-93 cellen (controlecellen, 48u).	28
<i>Figuur 3.3:</i>	Flowcytometrische analyse van STS-behandelde OLN-93 cellen.	29
<i>Figuur 3.4:</i>	Grafische weergave van het gemiddeld aantal levende (A) en het gemiddeld aantal apoptotische (B) cellen binnen de controlepopulatie (24u en 48u) en de STS-behandelde celpopulatie.	29
<i>Figuur 3.5:</i>	De scatterplot van controlecellen (48u) (A) en STS-behandelde OLN-93 cellen (B).	30
<i>Figuur 3.6:</i>	Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 24u behandeld met 0,01 µM simvastatine.	30
<i>Figuur 3.7:</i>	Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 48u behandeld met 0,01 µM simvastatine.	31
<i>Figuur 3.8:</i>	Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 24u behandeld met 0,1 µM simvastatine.	32
<i>Figuur 3.9:</i>	Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 48u behandeld met 0,1 µM simvastatine.	32
<i>Figuur 3.10:</i>	Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 24u behandeld met 1 µM simvastatine.	33
<i>Figuur 3.11:</i>	Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 48u behandeld met 1 µM simvastatine.	33
<i>Figuur 3.12:</i>	Een grafische weergave van het gemiddeld aantal levende cellen binnen de controlepopulatie en de met simvastatine behandelde OLN-93 cellen.	34
<i>Figuur 3.13:</i>	Een grafische weergave van het gemiddeld aantal apoptotische cellen binnen de controlepopulatie en de met simvastatine behandelde OLN-93 cellen.	35
<i>Figuur 3.14:</i>	Een grafische weergave van het gemiddeld aantal necrotische cellen binnen de controlepopulatie en de met simvastatine behandelde OLN-93 cellen.	35

Tabellen:

<i>Tabel 2.1:</i>	Protocol voor de viabiliteitsmetingen.	19
-------------------	--	----

LIJST MET AFKORTINGEN

AD	alzheimer disease
BCA	bicinchoninic acid
BHB	bloed-hersen-barrière
BP	band pass
BSA	bovine serum albumine
Calceïne-AM	acetoxymethylester (AM) vorm van calceïne
Ch	channel
CNP	2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
COP-1	co-polymeer-1
CP	choroïdale plexus
CRP	c-reactief proteïne
CZS	centraal zenuwstelsel
DIV	dagen in vitro
DM2	diabetes mellitus type 2
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EAE	experimental allergic encephalomyelitis
ECL	enhanced chemiluminiscence
FCS	foetaal kalfserum
FPP	farnesylpyrofosfaat
FSC	voorwaartse lichtverstrooiing
GalC	galactocerebroside
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GGPP	geranylgeranylpyrofosfaat
Gr-Ne	green-neon
HFT	main dichroic mirror
HMG	hydroxymethylglutaryl
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl Coenzyme A
IgG	immunoglobuline G
IFN- β	interferon- β
LDL	low density lipoprotein
MAG	myelin associated glycoprotein
MBP	myelin basic protein
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MS	multiple sclerosis

NFT	secondary dichroic mirror
NO	stikstof
OAT	organische anion transporter
OD	optische densiteit
OP	oligodendrocytprogenitor
PARP	poly-ADP-ribose-polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PDGFR- α	Platelet Derived Growth Factor- α -receptor
Pgp	P-glycoproteïne-P
PI	propidiumjodide
PLL	poly-L-lysine
PLP	phospholipid protein
PP-MS	primaire progressieve MS
P/S	penicilline/streptomycine
PSA-NCAM	polysialylated neural cell adhesion molecule
RR-MS	relapsing-remitting MS
SEM	standaardfout van het gemiddelde
SDS	sodium dodecyl sulfate
SP	short pass
SP-MS	secundaire progressieve MS
SSC	zijwaartse lichtverstrooiing
STS	staurosporine
TNF- α	tumor necrosis factor α
tpm	toeren per minuut
WP	wolfram protein

VOORWOORD

De afgelopen vier jaren waren een evenwichtige combinatie van inspanning en ontspanning. En ook al is mijn stage niet altijd rozengeur en maneschijn geweest en zijn er wel eens traantjes gevloeid, toch kan ik zeggen dat aan vier geweldige jaren een einde is gekomen met een nooit te vergeten stage. Vooraleer echter het studentenleven vaarwel te zeggen en het “echte” leven te betreden, zijn er een aantal mensen die een welgemeende dank je wel verdienen.

De eerste persoon die ik wil bedanken is mijn promotor, Dr. Ilse Smets. Ilse, je hebt me al die maanden met de glimlach met raad en daad bijgestaan. Als het even tegenzat wist je me op te beuren en me nieuwe moed te geven om weer verder te gaan. Onze gesprekken en jouw vele vragen hebben me leren nadenken over de dingen en structuur te brengen in wat ik deed. Het enthousiasme waarmee je mij begeleidt hebt, heeft er mede voor gezorgd dat ik de onderzoeksmicrobe te pakken heb. Bedankt voor de leuke tijd!

Daarnaast ook een woord van dank aan mijn co-promotor Prof. Dr. Marcel Ameloot en mijn tweede beoordeelaar Prof. Dr. Jean-Michel Rigo. Enerzijds bedankt voor het kritisch nalezen van mijn thesis en het luisteren naar mijn presentaties. Anderzijds bedankt voor de nuttige tips om zowel mijn onderzoek als mijn thesis verder te helpen.

Iemand die ook zeker niet in mijn lijstje mag ontbreken is Inge Smolders. Inge, bedankt om me de kneepjes van het vak te leren en de vele lachbuien die je me bezorgd hebt.

Verder wil ik aan iedereen van fysiologie een woordje van dank richten. Jullie hebben er met z'n allen voor gezorgd dat de laatste 6 maanden van mijn opleiding mij voor altijd zullen bijblijven! Ook Mieke, Nick, Ann en Kim verdienen een welgemeende merci! De gezellige momenten op ons bureautje konden de tegenslagen in het labo altijd wel even doen vergeten.

Dit is ook de ideale gelegenheid om mijn ouders de vermelding te geven die ze verdienen. Dank je wel om mij vier jaar geleden de grote stap naar Diepenbeek te laten maken. Jullie hebben mij de kans gegeven om op kot te gaan waardoor ik echt van het studentenleven heb kunnen proeven. In het weekend waren jullie altijd trouw op post met een luisterend oor, om zowel de leuke verhalen als de teleurstellingen van de afgelopen week te aanhoren. Ook tijdens de blokweek kon ik steeds thuis terecht, waar de nodige ontspanning en vitamientjes binnen handbereik lagen met als gevolg dat het studeren plots veel leuker werd. Mama, papa, bedankt voor alles!

Last, but not least, Remco, mijn vriend. Remco, ik ben best wel veel dank verschuldigd aan jou, mislukkingen in het labo werden immers steevast uitgewerkt op jou, ook al kon jij er helemaal niks aan doen. Bedankt voor de hulp en de steun, de troostende schouder (die met momenten zeer bruikbaar was) en de opbeurende woorden, niet alleen tijdens deze stage, maar gedurende de afgelopen vier jaar. Tevens bedankt voor het vertrouwen dat je in mij hebt gehad gedurende al die jaren en mij het gevoel te geven dat je toch wel trots bent op mij!

SAMENVATTING

Multiple Sclerose (MS) is een multifactoriële auto-immuunaandoening met inflammatie en lokale demyelinisatie als twee belangrijke pathofysiologische kenmerken. Statines werden recent naar voren gebracht als mogelijk geneesmiddel voor MS-patiënten en worden reeds jarenlang gebruikt als cholesterolverlagend middel zonder gerapporteerde nefaste effecten ter hoogte van het CZS. Toediening van statines aan MS-patiënten kan door de aanwezigheid van een beschadigde bloed-hersen-barrière (BHB) leiden tot hogere statineconcentraties in het cerebrospinaal vocht. Tot op heden is er weinig bekend over de mogelijke invloeden van statines op mature oligodendrocyten. De doelstelling van deze studie is het bestuderen van het effect van de actieve vorm van het lipofiele simvastatine op de viabiliteit van gedifferentieerde oligodendrocyten. Als *in vitro* model voor gedifferentieerde oligodendrocyten werd de oligodendrogliale cellijn OLN-93 gebruikt. De OLN-93 cellen werden gedurende twee incubatietijden (24u en 48u) blootgesteld aan drie verschillende simvastatineconcentraties, namelijk 0,01; 0,1 en 1 μ M. In deze studie werd een onderscheid gemaakt tussen apoptose en necrose met behulp van een co-kleuring met calceïne en propidiumjodide (PI). Hiervoor werd gekeken naar de invloed van simvastatine op verschillende parameters, namelijk de morfologie van de OLN-93 cellen, de intracellulaire esteraseactiviteit en de membraanintegriteit. De analyse met de confocale laserscanning fluorescentiemicroscop toont aan dat, naast een reductie in de celdensiteit, ook de morfologie van de OLN-93 cellen wijzigt door een behandeling met simvastatine. De cellen vertonen een ronder cellichaam en een gereduceerd aantal uitlopers. Vermits de uitlopers een belangrijke rol spelen in het myelinisatieproces, is inhibitie van de uitlopervorming een ongunstig statine-geïnduceerd effect. Uit de flowcytometrische analyse blijkt wel dat simvastatine in de gebruikte experimentele condities geen effect heeft op de celviabiliteit van de OLN-93 cellen, vermits geen significante wijzigingen in de intracellulaire esteraseactiviteit of de membraanintegriteit geobserveerd werden tussen controlecellen en simvastatinebehandelde OLN-93 cellen. Dit is niet consistent met eerder verschenen studies waarin een behandeling met simvastatine apoptose induceert bij primaire culturen van zowel vasculaire gladde spiercellen als oligodendrocyt-progenitoren (OPs) en bij neuronale cellijnen. Het verschil in het gebruikte celtype en in toegediende statine-concentratie en -incubatietijd verklaren naar alle waarschijnlijkheid de discordante resultaten tussen de literatuurgegevens en het voorliggend onderzoek.

Zowel uit de voorliggende studie als uit eerder beschreven literatuur, kan besloten worden dat bij een behandeling van MS met statines zowel de concentratie als de tijd van belang zijn. De literatuur suggereert immers dat een lange termijn behandeling met statines, in het bereik van de therapeutische concentraties, kan leiden tot celdood van meerdere celtypen. Vooral statines als gangbaar therapeutisch middel voor MS gebruikt kunnen worden, dient er verder onderzoek te gebeuren.

HOOFDSTUK 1: INLEIDING

1.1 Multiple Sclerose

Multiple Sclerose (MS) is de meest voorkomende neurologische aandoening bij jongvolwassenen. MS is een multifactoriële auto-immuunaandoening, gekenmerkt door inflammatie en demyelinisatie in het centrale zenuwstelsel (CZS), in de witte stof van zowel de hersenen als het ruggenmerg. Er ontstaan gebiedjes van demyelinisatie met een relatief behoud aan axonen, de MS-lesies of plaques, die zowel actief als inactief kunnen zijn. De lesies komen voornamelijk voor ter hoogte van de periventriculaire regio's, de optische zenuwen, de hersenstam, het cerebellum en het ruggenmerg. De demyelinisatie leidt tot verstoring van de neuronale signaaloverdracht resulterend in klinische symptomen zoals stoornissen van het zicht, de spraak en de tast, spierzwakheid en verlamming, coördinatieverlies en andere neurologische stoornissen. Bij sommige patiënten is er ook sprake van een cognitieve disfunctie (1 - 3).

De prevalentie van MS is hoog, gaande van 50 tot 130 gevallen per 100.000. Blanken die leven in Noord-Amerika en Europa hebben een grotere kans op het ontwikkelen van deze aandoening. Tevens is het zo dat vrouwen twee maal meer kans hebben om MS te krijgen dan mannen (1).

1.2 De verschillende vormen van MS

Het ziekteverloop van MS kan worden beschreven in drie verschillende vormen: relapsing-remitting MS (RR-MS), primaire progressieve MS (PP-MS) en secundaire progressieve MS (SP-MS) (1).

1.2.1 Relapsing-remitting MS

Ongeveer 85 % van alle MS-patiënten leidt aan RR-MS. Deze vorm wordt gekenmerkt door perioden van opflakkingen van de ziekte afgewisseld met perioden van remissie. Elk van deze opflakkingen resulteert in een variërende graad van invaliditeit waarvan de patiënt gedeeltelijk tot zelfs volledig kan herstellen tijdens de perioden van remissie (1, 3).

De opflakkingen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van inflammatoire infiltraten en demyelinisatie van de witte stof van het CZS, zowel in de hersenen als in het ruggenmerg en door een combinatie van neurologische symptomen en tekenen, zoals optische neuritis, verzwakking van de ledematen en een verstoring van de gevoelsprikkels, die binnen enkele dagen opduiken en daarna een plateaufase bereiken. Hierna volgt een verbetering, een remissie, die optreedt binnen enkele dagen tot weken. De remissieperiodes zijn variërend in tijd, gaande van enkele uren tot zelfs jaren, maar zijn zelden permanent (3).

1.2.2 Primaire progressieve MS

De overige 15 % van de groep van MS-patiënten leidt aan PP-MS. Deze vorm wordt gekenmerkt door een graduele klinische achteruitgang. Er treedt een trage maar steeds verergerende myelopathie op (1, 3).

1.2.3 Secundaire progressieve MS

De secundaire progressieve vorm van MS wordt ontwikkeld door ongeveer 65 % van de patiënten die leiden aan RR-MS, aangezien de remissie-frequentie afneemt naarmate de tijdsduur van de ziekte toeneemt. Hierdoor ontstaat er een progressieve neurologische disfunctie. Sommige van de patiënten die SP-MS ontwikkelen blijven erg uitgesproken opflakkingen vertonen (1, 3).

1.3 De verschillende demyelinisatiepatronen bij MS

Wat betreft de immunopathologische profielen van MS-lesies bij patiënten is er sprake van een uitgesproken heterogeniteit. Ondanks het feit dat alle lesies een inflammatoir infiltraat, bestaande uit T-cellen en macrofagen gemeenschappelijk hebben, kunnen ze onderverdeeld worden in vier verschillende patronen, die hieronder worden besproken. Deze onderverdeling gebeurt op basis van de expressie van myelineproteïnen, de geografie en de uitgebreidheid van de lesies, de patronen van oligodendrocytbeschadiging en de aanwezigheid van antilichaam- en geactiveerde complementafzettingen. Van deze vier patronen is patroon II het meest voorkomend. Het komt met name in 53% van alle MS-patiënten voor. 30% van de patiënten vertoont patroon III letsels, 12% patroon I letsels en 4% tenslotte heeft te maken met patroon IV MS-lesies. De demyelinisatiepatronen zijn heterogeen tussen verschillende MS-patiënten maar wel homogeen in de verschillende actieve lesies van een en dezelfde MS-patiënt (4, 5).

1.3.1 Patroon I, het macrofaaggemedieerde demyelinisatiepatroon

Patroon I is het patroon dat gelijkenis vertoont met de T-cel gemedieerde Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) en wordt ook gedefinieerd als de macrofaaggeassocieerde demyelinisatie. Het zijn namelijk de toxische producten van geactiveerde macrofagen en microglia, met name Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) en reactieve zuurstofradicalen, die verantwoordelijk zijn voor de vernietiging van de myelinescheden. De zone van actieve myelineafbraak is dan ook sterk geïnfilteerd met geactiveerde macrofagen. De patroon I-lesies bevinden zich gecentreerd rond kleine venen en venules, zijn sterk afgescheiden van de omgevende peri-plaque witte stof en kennen een radiale expansie (1 - 5).

1.3.2 Patroon II, het antilichaamgedieerde demyelisatiepatroon

Patroon II komt overeen met de T-cel en antilichaamgedieerde EAE. Dit patroon vertoont gelijkenis met patroon I wat betreft de situering en het gedrag van de lesies. De pathologie in dit patroon wordt veroorzaakt door de samenwerking tussen encephalitogene T-cellen, verantwoordelijk voor de inflammatie, en anti-*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* (MOG) antilichamen, verantwoordelijk voor de demyelisatie. De lesies van patroon II vertonen depositie van antilichamen, voornamelijk immunoglobuline G (IgG), en geactiveerd complement, C9 neo-antigen, in gebieden van actieve myelineafbraak (1- 5).

1.3.3 Patroon III, het distale-oligodendrogliegeassocieerde demyelisatiepatroon

In patroon III treedt distale oligodendroglie op. Belangrijke kenmerken van dit patroon zijn vasculitis van kleine bloedvaten met beschadiging van endotheliale cellen, trombose van microbloedvaten en degeneratie van de distale uitlopers van de oligodendrocyten. Dit laatste resulteert uiteindelijk in apoptose van de oligodendrocyten en demyelisatie van de axonen. In dit patroon zijn de oligodendrocyten het primaire target in het demyelisatieproces. De actieve lesies vertonen, in tegenstelling tot de andere patronen, geen simultaan verlies van alle myelineproteïnen maar wel een verschil in de expressie ervan. Zo gaan *Myelin Associated Glycoprotein* (MAG) en *2'3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase* (CNP) volledig verloren. *Myelin Basic Protein* (MBP) en *PhosphoLipid Protein* (PLP) komen enkel verminderd tot expressie, terwijl MOG nog een normale expressie kent. De lesies die in dit patroon ontstaan bevinden zich niet rond kleine venen, zoals in patroon I en II. Daarnaast zijn ze niet sterk afgebakend van de peri-plaque witte stof maar bezitten ze onduidelijke lesiegrenzen (1 - 4).

1.3.4 Patroon IV, de primaire oligodendrocytdegeneratie

Patroon IV is het patroon dat gekenmerkt wordt door primaire oligodendrocytdystrofie met secundaire demyelisatie. Dit patroon vertoont sterke gelijkenissen met patroon I en II, zoals de periveneuze distributie, de radiale expansie en de scherpe begrenzing van de lesies, de associatie van macrofagen met het beschadigde myeline en het simultaan verlies van alle myelineproteïnen. Het belangrijkste verschil met patroon I en II ligt in de pathologie van de oligodendrocyten. Deze zijn namelijk verdwenen in de inactieve lesies. Dit resulteert in een afwezigheid van remyelisatie, net zoals bij patroon III (1 - 5).

1.4 Oligodendrocyten

De cellen die in het CZS instaan voor de aanmaak van myeline en de vorming van de myelineschede rondom de axonen zijn de oligodendrocyten. Samen met de astrocyten en de microglia, behoren de oligodendrocyten tot de gliale cellen van het CZS. Gliale cellen maken

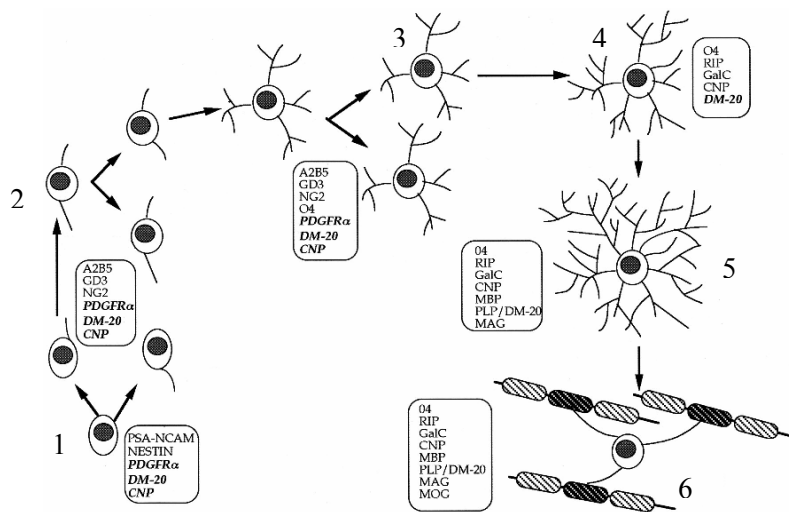
ongeveer de helft van het totale volume van de hersenen uit en vervullen verschillende essentiële functies, zowel in de ontwikkeling als tijdens de normale functie van het mature systeem. Tevens spelen gliale cellen ook een belangrijke rol in de reactie van het CZS tegen ziekte en trauma (6, 7). De oligodendrocyten zijn kleiner dan de astrocyten. Daarnaast hebben zij een grotere densiteit van het cytoplasma en de nucleus en geen intermediaire filamenten en glycogeen in het cytoplasma. Tot slot bezitten de oligodendrocyten in tegenstelling tot de astrocyten grote aantallen microtubuli in de uitlopers, die waarschijnlijk zorgen voor de stabiliteit van de uitlopers (7).

In het CZS bevinden zich twee verschillende types oligodendrocyten: de myeline-vormende oligodendrocyten en de satellietoligodendrocyten. Deze laatste zijn niet direct verbonden met de myelineschede, maar zijn perineuronaal en zorgen voor de regulatie van de micro-omgeving rondom de neuronen (7).

1.4.1 Het ontwikkelingsproces van de oligodendrocyten

De oorsprong van de oligodendrocyten in het ruggenmerg, en naar alle waarschijnlijkheid ook van die in de hersenen, is gelegen in een klein en smal gebied van de ventriculaire zone. Van daaruit migreren de oligodendrocytprogenitorcellen naar alle gebieden in het ruggenmerg. Tijdens deze migratie differentieert een gedeelte van deze cellen naar verschillende fasen in hun ontwikkeling en zal een ander gedeelte van de cellen in de celcyclus blijven. De differentiatie van de oligodendrocyten wordt gekenmerkt door het verlies van bepaalde oppervlaktemerkers of intracellulaire antigenen en het bekomen van anderen (6, 7).

De ontwikkelingslijn van de oligodendrocyten wordt verdeeld in verschillende fenotypische fasen op basis van de sequentiële expressie van verschillende ontwikkelingsmerkers aan het celoppervlak. In deze ontwikkelingslijn worden zes fasen beschreven, met name [1] precursoren, [2] progenitoren, [3] pre-oligodendrocyten, [4] immature oligodendrocyten, [5] niet myeliniserende mature oligodendrocyten en [6] myeliniserende mature oligodendrocyten (*figuur 1.1*) (7).



Figuur 1.1: De zes fasen binnen de ontwikkelingslijn van de oligodendrocyten. [1] precursoren, [2] progenitoren, [3] pre-oligodendrocyten, [4] immature oligodendrocyten, [5] niet myeliniserende mature oligodendrocyten en [6] myeliniserende mature oligodendrocyten (7). De fase-specifieke merkers worden weergegeven. Vet en cursief = enkel aanwezigheid van mRNA voor dat proteïne. CNP = 2'3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase; PDGFR α = Platelet Derived Growth Factor- α -receptor; PSA-NCAM = polysialylated neural cell adhesion molecule; GalC = galactocerebroside; MBP = Myelin Basic Protein; PLP = PhosphoLipid Protein; MAG = Myelin Associated Glycoprotein; MOG = Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

Elk van de ontwikkelingsfasen wordt gekarakteriseerd door specifieke proliferatieve en migratorische mogelijkheden. Tevens gaat de overgang van de ene naar de andere fase gepaard met de vorming van steeds meer en sterker vertakte uitlopers. Op het moment dat de oligodendrocyten contact maken met hun doelwitaxonen stopt de proliferatie en worden grote hoeveelheden aan myeline-genproducten tot expressie gebracht. Vanaf dit moment zijn deze post-mitotische oligodendrocyten in staat om de myelinescheden rondom de axonen te vormen. Het uiteindelijke aantal myeliniserende mature oligodendrocyten wordt bepaald door de proliferatieve graad van hun progenitoren en door het proces van apoptose dat tijdens de ontwikkeling plaatsvindt (6, 7).

De cellen die in het volwassen CZS behouden blijven, zijn volwassen oligodendrocytprecursoren. Dit celtype is op verschillende manieren gelijkend aan de vroege cellen in de ontwikkelingslijn van de oligodendrocyten. De mogelijkheid bestaat dat deze cellen deelnemen aan het herstel van myeline in bepaalde omstandigheden waar er sprake is van beschadiging aan of verlies van de myelineschede, zoals bijvoorbeeld in de vroege MS-lesies (6).

1.4.2 De dubbele rol van de oligodendrocyten in het CZS

Een enkele oligodendrocyt kan ongeveer 50 axonen myeliniseren aangezien ze verschillende uitlopers bezit die eindigen in een myelineschede. Deze myelineschede is een van de meest

gespecialiseerde cellulaire structuren in het lichaam. Het myeline vormt een isolatie rondom de zenuwvezels die een snelle transmissie van elektrische signalen in de hersenen mogelijk maakt. Een transmissie die 10 maal sneller is dan doorheen niet-gemyeliniseerde axonen met een gelijke diameter (6, 8).

Naast de vorming van de myelineschede zorgen de oligodendrocyten ook voor de trofische ondersteuning van de axonen door middel van myelineproteïnen, zoals MAG (9, 10), PLP/DM20 (8) en CNP (8). Afwezigheid van MAG resulteert in degeneratie van de axonen, demyelinisatie, gereduceerde fosforylatie van de subeenheden van de neurofilamenten en van de filamenten zelf. Tevens wordt de afstand tussen de neurofilamenten kleiner (9, 10). De binding tussen MAG, op het distale gedeelte van de oligodendrocytuitlopers, en de complexe gangliosiden GD1a en GT1b, aanwezig op de axonen, is immers noodzakelijk voor de axon-myeline stabiliteit. Deze binding zorgt voor de initiatie van signalisatiecascades die de axonale fysiologie controleren (10). In afwezigheid van PLP/DM20 of CNP zijn de axonen gezwollen en zijn ze gevuld met membraanorganellen (8). Het onderliggende mechanisme hiervan is nog niet duidelijk. Er wordt verondersteld dat deze myelineproteïnen instaan voor het behoud van de axonale homeostase. Zij zouden meer bepaald een rol spelen in het reguleren van het vloeistofvolume en de ionensamenstelling tussen het axon en de oligodendrocyt. Een verstoring in deze homeostase door afwezigheid van PLP/DM20 of CNP kan dus leiden tot axonale pathologie (8). Verder vervult CNP een belangrijke rol bij de vorming van oligodendrocytuitlopers. Dit proces wordt gecontroleerd door middel van binding van CNP aan microtubuli (11). Tenslotte zijn zowel MBP als PLP belangrijk om de compactheid van het myeline te garanderen: het cytoplasmatisch georiënteerd MBP om de cytoplasmatische zijden van de myelinemembranen samen te brengen en het transmembranaire PLP om via zijn extracellulaire lus interacties tussen buitenzijden van myelinemembranen te realiseren (12).

1.5 Hedendaagse therapieën voor MS

De huidige behandelingsmethoden voor MS zijn gebaseerd op Interferon- β (IFN- β) en Copolymeer-1 (COP-1 of Glaterameer acetaat). Beide stoffen zorgen voor een significante verandering in het natuurlijk verloop van de ziekte bij RR-MS-patiënten (1).

IFN- β 1 is een type 1 interferon met proliferatie-inhiberende en antivirale eigenschappen. Op basis van placebogecontroleerde klinische studies zijn voor de behandeling van RR-MS-patiënten twee vormen van dit geneesmiddel goedgekeurd, namelijk IFN β -1a en IFN β -1b. Een reductie in het aantal opflakkingen, een vertraging van de invaliditeitsprogressie en minder actieve MRI-hersenlesies zijn enkele van de gunstige effecten van IFN- β (1).

COP-1 is een mengeling van polypeptiden bestaande uit vier aminozuren in een willekeurige sequentie: Glutamine, Lysine, Alanine en Tyrosine. COP-1 is goedgekeurd voor algemeen gebruik in de kliniek. Subcutane toediening resulteert in een reductie van de klinische ziekte-

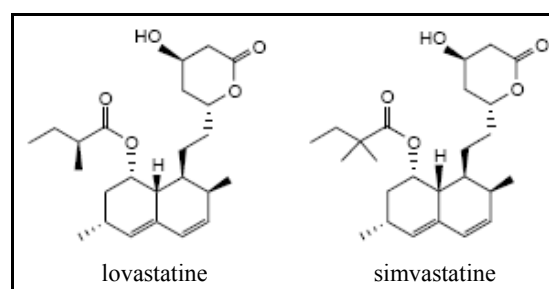
activiteit in patiënten met RR-MS. Het exacte werkingsmechanisme van COP-1 is nog niet gekend (1).

Het matige therapeutische succes in combinatie met de mogelijke inductie van neutraliserende antilichamen en de neveneffecten, zoals ondermeer griepachtige symptomen en huidreacties op de plaats van de injectie (13), toont aan dat er nood is aan meer effectieve en selectieve therapieën. Onder andere de onderverdeling van het demyelinisatieproces in vier patronen heeft fundamentele gevolgen voor de diagnose en de behandeling van MS. Door deze heterogeniteit in het ziekteproces zullen bepaalde behandelingen immers wel effectief zijn in de ene subgroep van patiënten, terwijl diezelfde behandeling geen effect heeft in een andere subgroep. Het is naar de toekomst toe een vereiste om de klinische en paraklinische parameters te definiëren die gebruikt kunnen worden om een onderscheid te maken tussen de verschillende pathologische patronen van de ziekte. Hierdoor kunnen immers nieuwe, betere en efficiëntere strategische therapieën uitgewerkt worden die patroon- en ook patiënt-specifiek zijn (1, 5).

1.6 Statines: een alternatieve therapie?

In de context van toekomstige behandelingsmogelijkheden voor MS worden de statines gesuggereerd (14). Naast onderzoek naar het gebruik van statines in de behandeling van MS moet er ook aandacht geschonken worden aan het feit dat de effecten van statines in inflammatoire omstandigheden, zoals bij neurodegeneratieve aandoeningen waaronder MS, verschillend kunnen zijn van de effecten in fysiologische omstandigheden (14).

Oorspronkelijk komen de statines enkel voor bij schimmels bij verdediging tegen andere micro-organismen via een inhibitie van de cholesterolbiosynthese. Deze micro-organismen hebben immers nood aan sterolen voor hun groei en voor hun membranen (15). Alle statines bezitten in hun structuur een hexahydronaftaleenskelet, het bicyclisch ringsysteem, met een 3,5-dihydroxyheptaanzuur (een lacton) (= een zijketen) en een esterbinding met methylbutyraat (= een zijketen) (*figuur 1.2*) (16).



Figuur 1.2: De chemische structuur van twee natuurlijke statines. Lovastatine en simvastatine zijn weergegeven in hun inactieve lactonvorm (16).

Ondanks de structuurgelijkenissen, vertonen de statines onderlinge verschillen wat betreft hun fysicochemische eigenschappen met betrekking tot orale absorptie, interactie met de voedselopname, passage doorheen cellulaire membranen en doorheen de bloed-hersenbarrière (BHB) (17).

De beschikbare statines kunnen onder twee verschillende vormen toegediend worden, ofwel onder de actieve open hydroxyvorm ofwel onder de inactieve lactonvorm (simvastatine en lovastatine), als pro-geneesmiddel. Indien de statines toegediend worden onder hun inactieve vorm, dienen ze eerst gemetaboliseerd te worden ter hoogte van de lever, via cytochroom P450-3A4, tot hun actieve open hydroxyvorm vooraleer ze hun werking kunnen uitoefenen (17).

1.6.1 Soorten statines

Statines kunnen enerzijds onderverdeeld worden in de natuurlijke en de synthetische statines en anderzijds in de lipofiele en de hydrofiele statines (15, 17).

Voorbeelden van natuurlijke statines (statines van het type 1) zijn mevastatine, lovastatine, simvastatine en pravastatine. Fluvastatine, cerivastatine, atorvastatine, pitavastatine en rosuvastatine zijn voorbeelden van synthetische statines (statines van het type 2). De synthetische statines zijn vaak chemische modificaties van reeds bestaande natuurlijke statines (15).

Lipofiele statines kunnen op een gemakkelijke en niet-selectieve manier, zoals passieve diffusie, doorheen cellulaire membranen passeren. Enkele voorbeelden van lipofiele statines zijn lovastatine, simvastatine, cerivastatine en rosuvastatine. Lovastatine en simvastatine zijn vooral sterk lipofiel in de inactieve lactonvorm. Rosuvastatine is slechts gedeeltelijk lipofiel. Hydrofiele statines daarentegen kunnen niet op een passieve manier doorheen de cellulaire membranen diffunderen, maar kunnen gebruik maken van transportmechanismen aanwezig ter hoogte van de membranen. Pravastatine en fluvastatine behoren tot deze groep van statines (17, 18).

1.6.2 Het werkingsmechanisme en de pleiotropie van de statines

Statines zijn geneesmiddelen die wereldwijd gebruikt worden voor de behandeling van hypercholesterolemie. Statines zorgen immers voor de inhibitie van het sleutelenzyme in de cholesterolbiosynthese, het 3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) reductase. Dit enzyme katalyseert de omzetting van hydroxymethylglutaryl (HMG) naar L-mevalonaat, de laatst gereguleerde en de snelheidsbepalende stap in de cholesterolbiosynthese. De veroorzaakte daling in de cholesterolbiosynthese zorgt voor een toename van de low density lipoprotein (LDL)-receptoren ter hoogte van de leverhepatocyten. Bijgevolg wordt een verhoogde hoeveelheid LDL-cholesterol uit het bloedplasma verwijderd. Zoals eerder besproken is de chemische structuur van de statines belangrijk voor het

uitoefenen van hun functie. Het 3,5-dihydroxyheptaanzuur vertoont immers structuuranalogie met het HMG-CoA wat resulteert in de reversibele en competitieve inhibitie tussen statines en HMG-CoA voor het enzyme HMG-CoA reductase. De affiniteit van de statines voor het HMG-CoA reductase is wel 1000 tot 10.000 keer groter dan die van het HMG-CoA (17, 19, 20).

Statines zorgen niet enkel voor een reductie in de plasmacholesterolniveaus maar hebben ook effecten die niet afhankelijk zijn van deze cholesterolreductie in het bloedplasma. Statines zorgen namelijk ook voor een inhibitie van de vorming van isoprenoïdintermediären, zoals farnesylpyrofosfaat (FPP) en geranylgeranylpyrofosfaat (GGPP). Mevalonaat is immers ook een precursor van deze niet-sterole isoprenoïdcomponenten. Deze actie heeft vooral een invloed op de kleine GTPasen van de Ras-, de Rho- en de Rac-familie of de kleine G-proteïnen. Deze proteïnen moeten immers geïsooprenyleerd worden om een juiste membraanverankering te bekomen die essentieel is voor het uitoefenen van hun functie in processen zoals celdifferentiatie, celproliferatie, celsignalisatie en celmotiliteit (19, 21, 22).

1.6.3 De therapeutische effecten van statines

Naast hun cholesterolverlagend effect kunnen statines ook andere therapeutische effecten hebben. Deze therapeutische effecten kunnen gesitueerd worden ter hoogte van de periferie en het immuunsysteem en ter hoogte van het CZS.

1.6.3.1 De therapeutische effecten ter hoogte van de periferie en het immuunsysteem

Statines worden omwille van hun cholesterolverlagend effect toegepast bij cardiovasculaire aandoeningen, zoals atherogenese. Statinetherapie is immers geassocieerd met een snelle verbetering in de cardiovasculaire morbiditeit en mortaliteit (15, 19). De gunstige effecten van statines op de vasculaire biologie gaan echter verder dan hun lipideverlagende effecten en zijn gerelateerd met wijzigingen in de endotheliale functie, meer bepaald een toename in de stikstof (NO)-beschikbaarheid. Verder zorgen statines voor een verminderde aggregatie van bloedplaatjes en bezit dit molecule anti-inflammatoire effecten. Tevens zorgen de statines voor een verhoogde apoptose en verminderde proliferatie en migratie van de gladde spiercellen, resulterend in een verminderde intimale verdikking. Ten slotte zorgen statines enerzijds voor een afname in de bloedcoagulatie resulterend in een afname in de trombusvorming en anderzijds in een toename in de plaquestabiliteit wat resulteert in een verminderde plaqueruptuur (19, 21). Verder zorgen statines voor een vermindering van de oxidatieve stress door het vangen van vrije radicaalmoleculen (23). Tevens werken statines in het algemeen ook immunomodulatoir en anti-inflammatoir. Zo zorgen statines onder andere voor een verminderde expressie en secretie van cytokines (24), een verminderde expressie van adhesiemoleculen (24, 25), matrixmetalloproteïnases (MMPs) (25), co-stimulatoren (24, 25), chemokines (24, 25) en chemokinereceptoren (25). Daarnaast resulteert statinebehandeling in

een vermindering in de T-cel- en macrofaagproliferatie (25, 26), in de activatie van B-lymfocyten (25), in de migratie van lymfocyten (25) en leukocyten en in de adhesie van leukocyten (15). De anti-inflammatoire eigenschappen van statines kunnen het gevolg zijn van de verstoring van de functie van kleine G-proteïnen die een rol spelen in de inflammatoire reacties (22).

Ook zorgt de behandeling met pravastatine, 40 milligram per dag (mg/dag), ervoor dat er een reductie is in de incidentie van type 2 Diabetes Mellitus (DM2). Een van de mogelijke mechanismen hiervoor is wederom het anti-inflammatoir effect van statines, dat zorgt voor een reductie in C-reactief proteïne (CRP). Hoge concentraties aan CRP zijn immers indicatief voor de mogelijke toekomstige ontwikkeling van DM2 (27). Daarnaast zorgen mevastatine, 3 tot 10 μM , en fluvastatine, 0,1 tot 10 μM , voor een toename in de botdensiteit door de calcificatie van de osteoblast te promoten (28). Tot slot wordt de prevalentie van Alzheimer Disease (AD) met 60% gereduceerd wanneer de patiënten lovastatine of pravastatine gebruiken in plaats van andere geneesmiddelen om hypertensie en cardiovasculaire aandoeningen te behandelen (29).

1.6.3.2 De therapeutische effecten ter hoogte van het CZS

Lipofiele statines kunnen gemakkelijk de BHB passeren door middel van niet-selectieve passieve diffusie (17). Hydrofiele statines diffunderen waarschijnlijk niet doorheen de BHB, maar zouden gebruik kunnen maken van transportmechanismen om zich door de BHB te verplaatsen. Echter, ondanks de aanwezigheid van verschillende transporters, onder andere voor geneesmiddelen, ter hoogte van de BHB en de Choroïdale Plexus (CP) zijn er nog geen studies die aangetoond hebben dat deze transporters ook instaan voor de influx van hydrofiele statines in het CZS (18). Studies van *Kikuchi et al. (2004)* en *Ayrton et al (2001)* hebben daarentegen aangetoond dat de mogelijkheid bestaat dat een aantal transporters, waaronder het P-glycoproteïne-P (Pgp) en organische anion transporters (OAT's), ter hoogte van de BHB kunnen zorgen voor de efflux van zowel hydrofiele als lipofiele statines uit het CZS (30, 31).

Een aantal recente studies tonen aan dat statines, door hun anti-inflammatoir en anti-proliferatief effect, kunnen zorgen voor een verbetering van de klinische symptomen en tekenen van EAE, wanneer de statines toegediend werden vóór het begin van de ziekte (32 - 34). Tevens laten een aantal klinische studies met statines op MS-patiënten een positief effect van de statines op het verloop van de ziekte vermoeden (35, 36). Bij de open-label studie van *Sena et al (2003)* (35) werd gedurende 12 maanden 40 mg lovastatine per dag aan zeven MS-patiënten toegediend. Er werden slechts weinig klinische effecten geobserveerd maar er was geen toename in de ziekte. Tevens werden geen negatieve effecten waargenomen. Toch is er veel kritiek op deze studie. De patiëntengroep omvatte slechts zeven personen en er was geen placebo-groep. De opvolgperiode (12 maanden) was te kort voor een chronische ziekte zoals

MS. Er kan immers niets gezegd worden over het inhiberend effect van de statines op de progressie van MS (35). In een andere open-label studie (fase II) van *Vollmer et al (2003)*(36) werd per dag 80 mg simvastatine gedurende zes maanden aan 28 patiënten gegeven. Er werd gemiddeld 44% reductie in het aantal letsels geobserveerd en daarnaast een gemiddelde reductie van 41% in het volume van de letsels. Ook deze studie is aan kritiek onderhevig. Er was immers geen placebo-groep, de patiënten werden slechts zes maanden gevolgd en er werden enkel patiënten met een actief verloop van de ziekte in deze studie opgenomen (36). Om in de toekomst betrouwbare resultaten te bekomen omtrent het gebruik van statines bij MS, moeten prospectieve placebo-gecontroleerde studies (zowel van fase II als van fase III) uitgevoerd worden. De patiëntengroep zou meerdere personen, met verschillende vormen van MS, moeten omvatten en de patiënten zouden gedurende een langere tijd gevolgd moeten worden (37).

Lovastatine, in een concentratie van 2 mg/kg lichaamsgewicht bij EAE-muizen en 1 μ M bij *in vitro* experimenten op oligodendrocyten in (co-)cultuur, heeft gunstige effecten ter hoogte van het CZS (38). De *in vivo* experimenten tonen aan dat behandeling van EAE-muizen met lovastatine resulteert in een verminderde afbraak van het myeline en een gemakkelijker myelineherstel. Tevens zorgt lovastatine voor een verhoogde overleving en differentiatie van de postmitotische oligodendrocyten en een verhoogde proliferatie en aantrekking van oligodendrocytprogenitoren (OPs) in het ruggenmerg van met lovastatine behandelde EAE-muizen. Deze effecten werden vooral tijdens de remissiefasen van de ziekte waargenomen. De *in vitro* experimenten tonen aan dat de toediening van lovastatine aan OPs in co-cultuur met meerdere geactiveerde gliale cellen zorgt voor een verhoogde overleving en proliferatie van de OPs. Daarnaast zorgt lovastatine voor een toegenomen differentiatie van oligodendrocyten in een primaire cultuur van gemengde gliale cellen. Tot slot resulteert de toediening van lovastatine ook in een verminderde reactieve gliosis en in de inductie van een pro-remyeliniserende omgeving, zowel in het CZS als in de co-culturen. Lovastatinebehandeling vóór het verschijnen van de EAE symptomen is noodzakelijk opdat lovastatine zijn eerder vernoemde gunstige effecten kan teweeg brengen. Dit laatste aspect bemoeilijkt het potentiële gebruik van statines bij MS-patiënten. De ziekte wordt immers pas gediagnosticeerd wanneer klinische tekenen waargenomen worden (38).

1.6.4 De nadelige effecten van statines

Bij het gebruik van statines voor de behandeling van hypercholesterolemie werden meerdere neveneffecten beschreven. Deze neveneffecten kunnen zowel waargenomen worden ter hoogte van de periferie en het cellulair niveau als ter hoogte van het CZS.

1.6.4.1 De nadelige effecten ter hoogte van de periferie en het cellulair niveau

De meest gerapporteerde nevenwerkingen van de statines zijn van gastro-intestinale aard, zoals diarree, abdominale pijnen, constipatie en winderigheid (17). Een van de eerste klinisch geobserveerde neveneffecten van de statines is myotoxiciteit. Dit komt voor bij minder dan 1% van de statinegebruikers (39). Statines kunnen namelijk abnormaliteiten in de skeletspieren, meer bepaald rhabdomyolysis en myopathie veroorzaken. Rhabdomyolysis wordt gekenmerkt door een disintegratie van de spieren die gepaard gaat met de excretie van myoglobuline in de urine en nierfalen (39, 40). Myopathie wordt gedefinieerd als spierpijn of spierzwakte en/of creatininekinaseniveaus die groter zijn dan 1000 U per liter (= tot 10 maal hoger dan normaal) (17, 40). Hepatitis, verlies van de eetlust, gewichtsverlies en asymptomatische stijgingen in levertransaminasen worden eerder zelden (minder dan 1%) en enkel bij het toedienen van hoge dosissen opgemerkt (40). Tot slot kunnen statines zorgen voor huiduitslag en lupus-achtige syndromen (huidaandoeningen) (40). De meeste nevenwerkingen van de statines zijn direct gerelateerd aan de inhibitie van de mevalonaatsynthese en zijn dosis-afhankelijk (17).

Door de pleiotropie van de statines kunnen ook op cellulair niveau een aantal neveneffecten waargenomen worden. Deze effecten zijn zowel te wijten aan de inhibitie van de isoprenylatie van proteïnen als aan de verstoring van de samenstelling van de cellulaire membranen en meer bepaald de cholesterolrijke *lipid raft* microdomeinen (41).

Proteïnen, zoals onder andere Ras, Rho, kleine G-proteïnen, nucleaire lamines en CNP (21), die behoren tot de familie van geïsooprenyleerde proteïnen, zijn betrokken bij een aantal cellulaire processen, waaronder transcriptionele regulatie (22), DNA-synthese (42), celsignalisatie, celmotiliteit, celdifferentiatie en celproliferatie (21). Daarnaast spelen geïsooprenyleerde proteïnen ook een rol in de myelinisatie, de dynamica van het cytoskelet, de fagocytose, het intracellulair transport en het endocytotisch/exocytotisch transport (22). Statines bezitten dus de mogelijkheid om de verschillende fasen van de celgroei aan te tasten door de signalisatiepathways die gebaseerd zijn op geïsooprenyleerde proteïnen te verstoren. Zo hebben verschillende *in vitro* studies aangetoond dat statines kunnen zorgen voor de inhibitie van de groei en de proliferatie van verschillende celtypes, zoals humane fibroblasten (mevastatine, $5 \cdot 10^{-5}$ tot $5 \cdot 10^{-3}$ μM (43) en 1 μM tot 40 μM (44)) en lymfocyten (mevastatine, 0 μM tot 100 μM) (45), vasculaire gladde spiercellen en mesangiale cellen (atorvastatine, fluvastatine en simvastatine, 1 μM tot 10 μM en atorvastatine, simvastatine, pravastatine en lovastatine, 3 tot 100 μM) (21, 46, 47) en rathepatocyten (pravastatine, 0,1 μM tot 10 μM) (48). Al deze effecten zijn het gevolg van de inhibitie van de isoprenylatie. De mechanismen hierachter zijn onder andere een inhibitie van de DNA-synthese (42), een verstoring van de signaaltransductie van de membraanreceptoren die betrokken zijn bij de proliferatie en de overleving (47), een inhibitie van de isoprenylatie van p21^{ras} waardoor dit proteïne niet

verankerd kan worden in de celmembraan (49) en zijn mature vorm m-p21^{ras} niet kan aannemen (50) en een inhiberend effect op de proteolytische maturatie van lamine A (50). Statines kunnen ook zorgen voor de verstoring van de cellulaire membranen en van de lipid rafts aangezien cholesterol een essentiële component is van deze structuren (41). De aanwezigheid van cholesterol draagt bij tot de unieke biofysische eigenschappen, in het bijzonder de vloeibaarheid, van de plasmamembranen en de lipid rafts (51). Daarnaast is cholesterol ook belangrijk voor de signaaltransductie door raftproteïnen. Wijzigingen in de cholesterolinhoud van het membraan of van de lipid rafts door een reductie in de cholesterolbiosynthese, zorgt voor een modulatie van de lipidevloeibaarheid resulterend in de aantasting van verschillende cellulaire functies en ook in de inhibitie van de raft-afhankelijke signalisatiegebeurtenissen. Signalen voor celgroei, celoverleving en andere fysiologische processen zijn *lipid raft* gemedieerd (42, 51). Zo kan simvastatine, 100 tot 200 mg/dag/kg lichaamsgewicht, bij muizen zorgen voor de inductie van cataractontwikkeling door het reduceren van de essentiële niveaus van de membraancholesterol in de ooglenzen (52).

1.6.4.2 De nadelige effecten ter hoogte van het CZS

Lipofiele statines kunnen makkelijk de BHB passeren en naast therapeutische effecten ook nadelige effecten uitoefenen in het CZS. Zo werden effecten als vermoeidheid (39), hoofdpijn, concentratieverlies, slaapstoornissen en slecht of levendig dromen (40) beschreven. Daarnaast kan mevastatine, in concentraties hoger dan 1 μM , neurotoxische effecten hebben (42). Cholesterol maakt immers deel uit van de hechte cellulaire membranen van de neuronen en zowel de uitgroei van de neurieten als de vorming van een neuronaal netwerk via synapsvorming zijn sterk afhankelijk van de beschikbaarheid aan cholesterol. Cholesterol speelt een kritische rol in de viabiliteit van de neuronen met als gevolg dat een reductie in de beschikbare cholesterol kan resulteren in neuronale dood (42). Daarnaast zorgt 10 μM lovastatine of mevastatine bij de HT22 cellijn voor neuropathie door een potentiëring van de caspase-3 activiteit. Dit resulteert in een verhoging van de neuronale apoptose (53). De verhoging van de caspase-3 activiteit door deze twee statines verloopt parallel aan de stijging in het proteïneniveau van het pro-apoptotische GTPase Rho-B, wat sterk toegenomen is bij neuronale apoptose. Tevens bestaat de mogelijkheid dat een aanhoudende blokkering van de cholesterolbiosynthese in het CZS een negatief effect heeft op de (re)myelinisatie aangezien cholesterol het grootste percentage van de totale lipide-inhoud van het myeline beslaat (40). Verder induceert 10^{-8} μM tot 10^{-2} μM lovastatine apoptose van astrocyten (54). Tot slot resulteert de toediening van simvastatine (μM concentraties die klinisch relevant zijn) aan OPs afkomstig van ratten na 24 uur in een sterke groei en vermeerdering van de uitlopers door de inhibitie van de isoprenoïdsynthese (55). Na 48 uur behandeling met simvastatine worden bij deze OPs een inkrimping van de uitlopers gedetecteerd en na 72 uur celdood geobserveerd. De mechanismen hierachter zijn zowel de inhibitie van de isoprenoïdsynthese

als de inhibitie van de cholesterolbiosynthese met een verstoring van de lipid raft-geassocieerde celoverlevingssignalisatie tot gevolg. Bij de humane OPs werden dezelfde effecten waargenomen als bij de OPs van de ratten, maar over een langere tijdspanne. Zo werd inkrimping van de uitlopers pas na 144 uur geobserveerd en celdood pas na meer dan 192 uur (55). Simvastatine heeft dus een impact op de dynamica van het cytoskelet en op de viabiliteit van OPs, die een belangrijke rol spelen in het remyelinisatieproces (55).

1.7 Doelstelling van het onderzoek

Inflammatie en demyelinisatie zijn de twee belangrijke pathofysiologische kenmerken van MS (1 - 3).

De anti-inflammatoire werking van statines is algemeen bekend (15, 24 - 26). Statines zorgen, dankzij hun anti-inflammatoire effecten, voor een verbetering van de klinische symptomen en tekenen van EAE (32 - 34). Tevens laten een aantal klinische studies met statines op MS-patiënten een positief effect van de statines op het verloop van de ziekte vermoeden (35, 36).

Het tweede belangrijke pathofysiologische kenmerk van MS is demyelinisatie. Echter, naast de gedemyeliniseerde regio's hebben MS-patiënten ook nog onaangetast hersenweefsel waarin zich gezonde mature oligodendrocyten bevinden die instaan voor de myelinisatie. MS wordt ook gekenmerkt door een beschadigde BHB. Toediening van statines aan MS-patiënten kan dus leiden tot hogere statineconcentraties in het cerebrospinaal vocht bij deze patiënten in vergelijking met gezonde individuen. Aangezien de bestaande literatuur tegenstrijdigheden bevat wat betreft het effect van simvastatine op de celviabiliteit, wordt in deze studie het *in vitro* effect van simvastatine op de viabiliteit van gedifferentieerde oligodendrocyten onderzocht. Als *in vitro* model voor oligodendrocyten wordt gebruik gemaakt van de oligodendrogiale cellijn OLN-93, daar deze cellijn naast de mogelijkheid om snel te prolifereren tevens de mogelijkheid bezit om te differentiëren.

De doelstelling van deze studie is het bestuderen van het *in vitro* effect van statines op de celviabiliteit van OLN-93 cellen. In dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van de actieve vorm van het lipofiele simvastatine dat in verschillende concentraties en gedurende verschillende incubatieperioden aan de OLN-93 cellen wordt toegediend. Bij de studie van het effect van simvastatine op OLN-93 cellen zal een onderscheid gemaakt worden tussen de twee verschillende types van celdood die kunnen optreden, namelijk apoptose en necrose. Meerdere parameters zullen hiervoor onderzocht worden, zoals wijzigingen in de celvorm, intracellulaire esteraseactiviteit, membraanintegriteit en caspaseactivatie.

HOOFDSTUK 2: MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Oplossingen en reagentia

De experimentele zoutoplossing (OLN-93 Ringer) die gebruikt werd voor het bereiden van de oplaadoplossing bij confocale laserscanning fluorescentiemicroscopie bevat (in mM): 145 NaCl (Merck, Darmstadt, Duitsland), 5,4 KCl (ACROS Organics, Geel, België), 1,8 MgCl₂ (ACROS Organics, Geel, België), 20 HEPES (ACROS Organics, Geel, België) (buffer, pK_a = 7,55) en 25 glucose (VWR, Leuven, België). De oplossing heeft een osmolaliteit van 320 mOsm/kg H₂O en werd op pH 7,4 gebracht met behulp van TRIS buffer (ACROS Organics, Geel, België) op kamertemperatuur. De oplossing werd verdeeld over flessen van 250 ml die vervolgens gesteriliseerd werden.

De Phosphate Buffered Saline (PBS) buffer 1x die gebruikt werd bij flowcytometrie bevat (in mM): 130 NaCl, 1,54 KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Duitsland) en 5,62 Na₂HPO₄·2H₂O (Merck, Darmstadt, Duitsland). De pH van de PBS-oplossing werd op pH 7,4 gebracht door middel van NaOH (Merck, Darmstadt, Duitsland). De oplossing werd verdeeld over flessen van 500 ml die vervolgens gesteriliseerd werden.

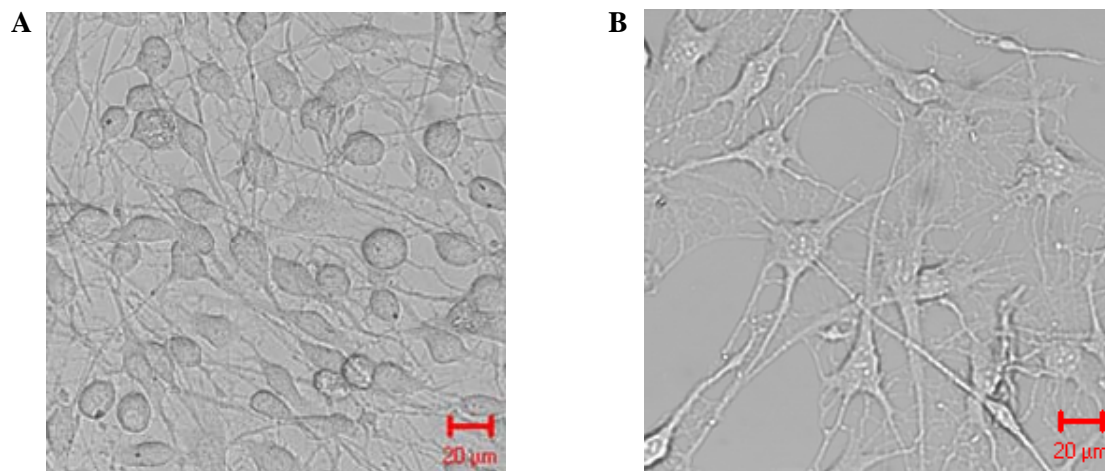
De acetoxy-methylester (AM) vorm van calceïne (calceïne-AM; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) werd gebruikt in een concentratie van 1 μM (confocale microscopie) of 20 nM (flowcytometrie) (verdund uit een 500 μM stock van calceïne-AM in Dimethyl Sulfoxide (ACROS Organics, Geel, België; DMSO) opgelost in respectievelijk OLN-93 Ringer of PBS. Propidiumjodide (PI; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) werd gebruikt in een concentratie van 1,5 μM (verdund uit een 3740 μM stock van PI in DMSO) opgelost in OLN-93 Ringer (confocale microscopie) of PBS (flowcytometrie). De actieve vorm van simvastatine (Calbiochem, Darmstadt, Duitsland) werd gebruikt in een concentratie van 0,01, 0,1 en 1 μM (verdund uit een 1 mM stock van simvastatine in DMSO) opgelost in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Gibco, Paisley, UK) voorzien van 0,5% foetaal kalfserum (FCS; Hyclone Europe S.A., Erembodegem-Aalst, België) en 1% Penicilline/Streptomycine (P/S; Gibco, Paisley, UK). Staurosporine (STS; SIGMA, Bornem, België) werd gebruikt in een concentratie van 1 μM (verdund uit een 214 μM stock van STS in DMSO) opgelost in DMEM voorzien van 0,5% FCS en 1% P/S.

Het FCS dat gebruikt werd in het gehele onderzoek werd hitte-geïnactiveerd door het 30 minuten bloot te stellen aan 56°C.

2.2 Celkweek: OLN-93 cellijn

In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van de OLN-93 cellijn (verkregen via dr. C. Richter-Landsberg, University of Oldenburg, Oldenburg, Duitsland). Het is een oligodendrogliale cellijn afkomstig van spontaan getransformeerde cellen in primaire gliale celculturen van de rat. Wanneer deze cellen gekweekt worden op een ongecoat substraat in medium voorzien van

10% FCS, wordt een snelle proliferatie geobserveerd en vertonen de cellen een bipolair karakter (56). Wanneer de cellen echter in een lage celdensiteit gekweekt worden op Poly-L-Lysine (PLL-) gecoat glasjes in medium met een lage FCS-concentratie, wordt een snelle differentiatie geobserveerd. Differentiatie van de OLN-93 cellen resulteert in een meer gearboriseerde celmorfologie. De OLN-93 cellen brengen galactocerebroside (GalC) en specifieke myelineproteïnen, zoals MBP, MAG, PLP en Wolfgram Protein (WP), tot expressie. De A₂B₅ oppervlaktemerker is echter afwezig, net zoals de specifieke astrocytmarkers vimentine en *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (56).



Figuur 2.1: Beelden van OLN-93 cellen in cultuur, genomen met doorvallend licht op de Zeiss LSM 510 Meta confocale microscoop (PlanNeoFluar 10x objectief, zoom 4) bij 37°C. (A) Immature OLN-93 cellen gekweekt op een PLL-gecoat dekglasje gedurende 72u in DMEM voorzien van 10% FCS. (B) Gedifferentieerde OLN-93 cellen gekweekt op een PLL-gecoat dekglasje gedurende 24u in DMEM met 10% FCS en daarna 48u in DMEM voorzien van 0,5% FCS.

In dit onderzoek werden de OLN-93 cellen gekweekt in ongecoate plasticen culturflessen van 25 cm² bij een temperatuur van 37°C en in een vochtige atmosfeer met 10% CO₂. De cellen werden gekweekt in DMEM voorzien van 10% FCS en 1% P/S. Onder deze niet-differentiërende condities prolifereren de OLN-93 cellen snel en bevinden ze zich in een immatuur stadium. De cellen vertonen in dat stadium een rond cellichaam met twee of meerdere uitlopers (*figuur 2.1: A*). Na zeven dagen werden de subconfluente cellen gesubcultiveerd door incubatie in trypsine (Gibco, Paisley, UK) (0,25%, 2 min bij 37°C), dat daarna geïnactiveerd werd met FCS (20 v/v %). Met de bekomen celsuspensie werden steeds nieuwe culturflessen uitgezet om de celkweek in stand te houden. Daarnaast werden voor de viabiliteitsmetingen met behulp van de confocale laserscanning fluorescentiemicroscoop (LSM 510 META, Zeiss) de OLN-93 cellen in een densiteit van 2000 cellen per 100 µl uitgezaaid op PLL (SIGMA, Bornem, België)-gecoat dekglasjes met een doorsnede van 12 mm in een 24-well plaat. Voor de viabiliteitsmetingen met behulp van flowcytometrie (FACScan of FACSCalibur, beiden Becton Dickinson) werden de OLN-93 cellen in een

densiteit van 8000 cellen per 500 μ l uitgezet op PLL-gecoate dekglasjes met een doorsnede van 24 mm in een 6-well plaat. De OLN-93 cellen bevinden zich onder deze condities in een gedifferentieerde toestand en bezitten een plat cellichaam en een netwerk van uitlopers (*figuur 2.1: B*). Bij alle experimenten werden de OLN-93 cellen na 24u in DMEM met 10% FCS, gedurende 24u of 48u verder gekweekt in DMEM met 0,5% FCS, al dan niet voorzien van de actieve vorm van simvastatine. De cellen werden aan 3 verschillende concentraties, 0,01, 0,1 en 1 μ M, en gedurende 2 verschillende tijdsperioden, 24u en 48u, blootgesteld aan simvastatine. Ook werd bij de verschillende experimenten een positieve controle voor apoptose gebruikt, met name OLN-93 cellen behandeld met 1 μ M STS, een apoptose-inducerend reagens, gedurende 24u. Het exacte behandelingsprotocol voor de viabiliteitsmetingen staat beschreven in *tabel 2.1*.

Tabel 2.1: Protocol voor de viabiliteitsmetingen.

	Dag 0	Dag 1	Dag 2	Dag 3
Handeling met de cellen				
<i>Controle (24u en 48u)</i>	Uitzaaien cellen op PLL ^a -gecoate glaasjes in DMEM ^b + 10% FCS ^c .	Omzetten van cellen naar DMEM + 0,5% FCS.	Verzamelen van de data (24u).	Verzamelen van de data (48u).
<i>24u – protocol simvastatine-behandeling</i>	Uitzaaien cellen op PLL-gecoate glaasjes in DMEM + 10% FCS.	Omzetten van cellen naar DMEM + 0,5% FCS.	Behandelen van cellen met simvastatine (0,01, 0,1 en 1 µM), in DMEM + 0,5% FCS.	Verzamelen van de data.
<i>48u – protocol simvastatine-behandeling</i>	Uitzaaien cellen op PLL-gecoate glaasjes in DMEM + 10% FCS.	Behandelen van cellen met simvastatine (0,01, 0,1 en 1 µM), in DMEM met 0,5% FCS.	/	Verzamelen van de data.
<i>STS - protocol</i>	Uitzaaien cellen op PLL-gecoate glaasjes in DMEM + 10% FCS.	Omzetten van cellen naar DMEM + 0,5% FCS.	Behandelen van cellen met STS ^d (1 µM), opgelost in DMEM + 0,5% FCS.	Verzamelen van de data.
Aantal dagen in vitro (DIV^e)	0	1	2	3

^aPLL = Poly-L-Lysine, ^bDMEM = *Dulbecco's modified Eagle's medium*, ^cFCS = foetaal kalfserum, ^dSTS = staurosporine, ^eDIV = dagen in vitro

2.3 Celviabiliteitsmetingen

Bij de uitvoering van de celviabiliteitsmetingen werd gebruik gemaakt van twee probes, namelijk calceïne-AM en PI.

Calceïne is een merker die gebruikt kan worden om de celviabiliteit in de meeste eukaryote cellen te bepalen en wordt aan de cellen toegediend onder de acetoxy-methyl estervorm, calceïne-AM. Het lipofiele calceïne-AM is niet fluorescent maar kan gemakkelijk doorheen de celmembraan van levende cellen diffunderen. Eens in de cel, wordt het door niet-specifieke intracellulaire esterases gehydrolyseerd tot het hydrofiele en sterk groen-fluorescente calceïne. Calceïne is sterk negatief geladen waardoor het niet meer doorheen de celmembraan kan diffunderen. Enkel levende cellen hebben een voldoende hoge cytosolaire esterase-activiteit, waardoor een fluorescentiesignaal verkregen wordt voor calceïne. In een vroeg stadium van celdood vermindert echter de esterase-activiteit van de cel, waardoor een significant zwakker signaal wordt verkregen. Bij dode cellen is calceïne-fluorescentie

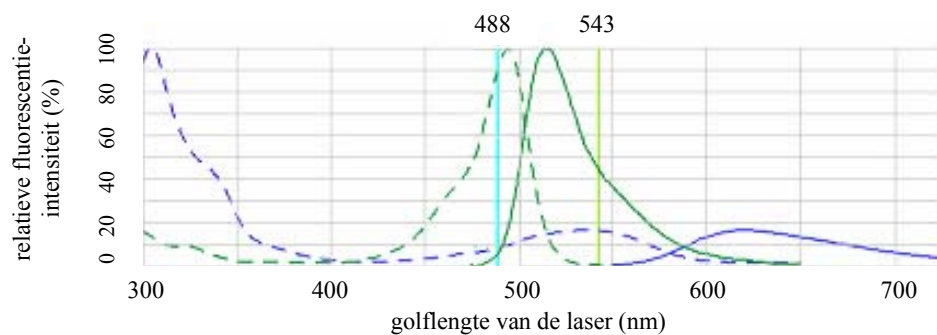
afwezig. Calceïne vertoont een maximum in het excitatiespectrum bij 490 nm en een emissiemaximum bij 515 nm (*figuur 2.2*).

PI kan enkel binnendringen in een cel wanneer de plasmamembraan stuk is, zoals bij necrose. PI kan zowel in het DNA als in het RNA van necrotische cellen intercaleren. Deze binding van PI aan nucleïne-zuren resulteert in een rood fluorescentiesignaal. PI vertoont een maximum in het excitatiespectrum bij 535 nm en een maximum in het emissiespectrum bij 617 nm (*figuur 2.2*).

Calceïne-AM en PI worden simultaan gebruikt zodat een onderscheid gemaakt kan worden tussen levende, apoptotische en necrotische cellen.

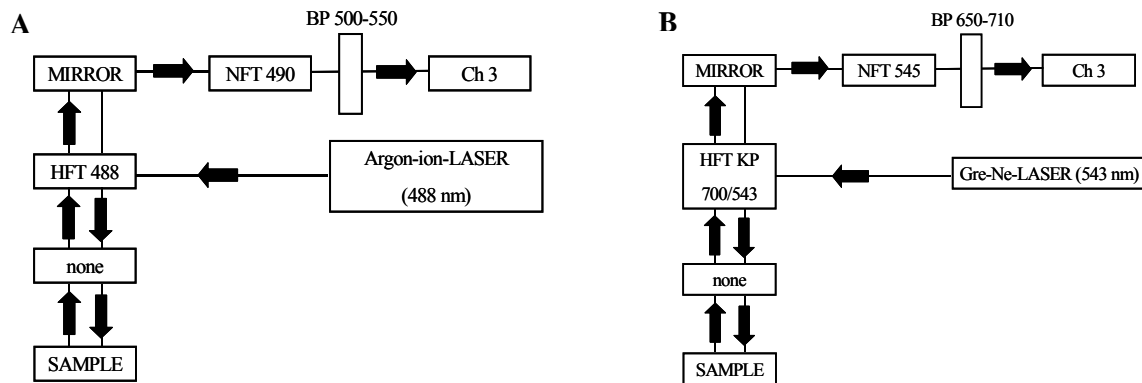
2.3.1 Spectrale overlap van calceïne en PI

Calceïne en PI vertonen spectrale overlap, zowel in het excitatie- als in het emissiespectrum (*figuur 2.2*). Deze overlap kan ervoor zorgen dat de detectie van de PI-fluorescentie verstoord wordt door de calceïne-fluorescentie. Dit werd vermeden op de volgende wijze.



Figuur 2.2: Het excitatie- en emissiespectrum van calceïne in een buffer met pH 9 (groen) en propidiumjodide gebonden aan DNA (blauw). De Argon-ion laserlijn (488 nm) staat aangeduid in licht blauw, de Green-Neon laserlijn (543 nm) in licht groen (57).

Bij de confocale laserscanning fluorescentiemicroscopie werden de twee probes met verschillende lasers aangeslagen. Calceïne werd aangeslagen met de Argon-ion laser met een golflengte van 488 nm en PI met de Green-Neon laser met een golflengte van 543 nm. In combinatie met specifieke emissiefilters voor de detector werd elke interferentie tussen de PI-fluorescentie en de calceïne-fluorescentie van cellen opgeladen met beide probes vermeden (*figuur 2.3*).



Figuur 2.3: De gebruikte instellingen op de confocale laserscanning fluorescentiemicroscop voor de detectie van calcëine (A) en PI (B). De zwarte pijl geeft aan in welke richting het laserlicht zich verplaatst. BP: Band Pass, KP: Short Pass, HFT: main dichroic mirror, NFT: secondary dichroic mirror, Gr-Ne: Green-Neon en Ch: channel.

Aangezien beide fluorescente probes bij flowcytometrie geëxciteerd werden bij 488 nm met de Argon-ion laser, kon er calcëinefluorescentie gedetecteerd worden ter hoogte van de PI-detector. Om deze reden was het belangrijk de gedetecteerde fluorescentie in het PI-kanaal te compenseren voor de bijdrage van calcëine in dit kanaal.

2.3.2 Confocale laserscanning fluorescentiemicroscopie

Bij de viabiliteitsmetingen met behulp van de confocale laserscanning fluorescentiemicroscop werden de dekglasjes met gekweekte OLN-93 cellen aangebracht in een speciale houder. De cellen werden opgeladen in het donker en bij 37°C met OLN-93 Ringer (zie sectie *oplossingen en reagentia*) die 1 μM calcëine-AM en 1,5 μM PI bevatte. Na 10 minuten incubatie werden een transmissiebeeld en fluorescentiebeelden voor calcëine en PI genomen.

2.3.3 Flowcytometrie

In een eerste stap van het protocol voor flowcytometrie dienen alle cellen (ook de losse cellen) per well verzameld te worden. Hiervoor werd het cultuurmedium uit elke well overgebracht naar afzonderlijke falconbuizen. Vervolgens werden de cellen losgemaakt van de dekglasjes uit de 6-well plaat door ze 2 minuten te incuberen met trypsine 0,25% bij 37°C, dat daarna met FCS (20 v/v %) geïnactiveerd werd. De met trypsine losgemaakte cellen werden bij het cultuurmedium van dezelfde well gebracht en de falconbuizen werden vervolgens 10 minuten gecentrifugeerd (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) bij 1300 toeren per minuut (tpm) op 37°C. De bekomen celpellet werd geresuspendeerd met PBS (zie sectie *oplossingen en reagentia*) en de celsuspensie van elke well werd in duplo overgebracht naar een 96-well plaat met een V-bodem die daarna gedurende 10 minuten werd gecentrifugeerd (Centrifuge 5810, Eppendorf) bij 1500 tpm op kamertemperatuur. Het supernatans werd

afgenomen en de bekomen celpellet werd geresuspendeerd met een oplaadoplossing bestaande uit PBS met 20 nM calceïne-AM, 1,5 μ M PI en 0,02 w/v % pluronzuur (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Na 10 minuten incubatie in het donker en bij kamertemperatuur werden de cellen (minimum 5000 bij de FACScan en minimum 2000 bij de FACSCalibur) geanalyseerd met behulp van flowcytometrie. In elk experiment werd minstens één controle meegenomen.

2.4 Statistiek

De resultaten werden steeds weergegeven als het gemiddelde \pm de standaardfout van N experimenten en n metingen (het aantal gemeten wellen per conditie). Om te controleren of de gemiddelde waarden significant verschillend waren, werden enerzijds *one-way ANOVA*-testen gevolgd door een Bonferroni posttest en anderzijds *two-way ANOVA*-testen uitgevoerd. Voor de statistische analyse van de data werd gebruik gemaakt van het softwarepakket Prism[®]4 (GraphPad Software, San Diego, USA) De gemiddelde waarden werden als significant verschillend beschouwd wanneer de p-waarde kleiner was dan 0,05, dit werd aangeduid met *. Indien de p-waarde kleiner was dan 0,001 werd dit weergegeven met ***.

HOOFDSTUK 3: RESULTATEN

3.1 Het effect van simvastatine op de celvorm, intracellulaire esteraseactiviteit en membraanintegriteit

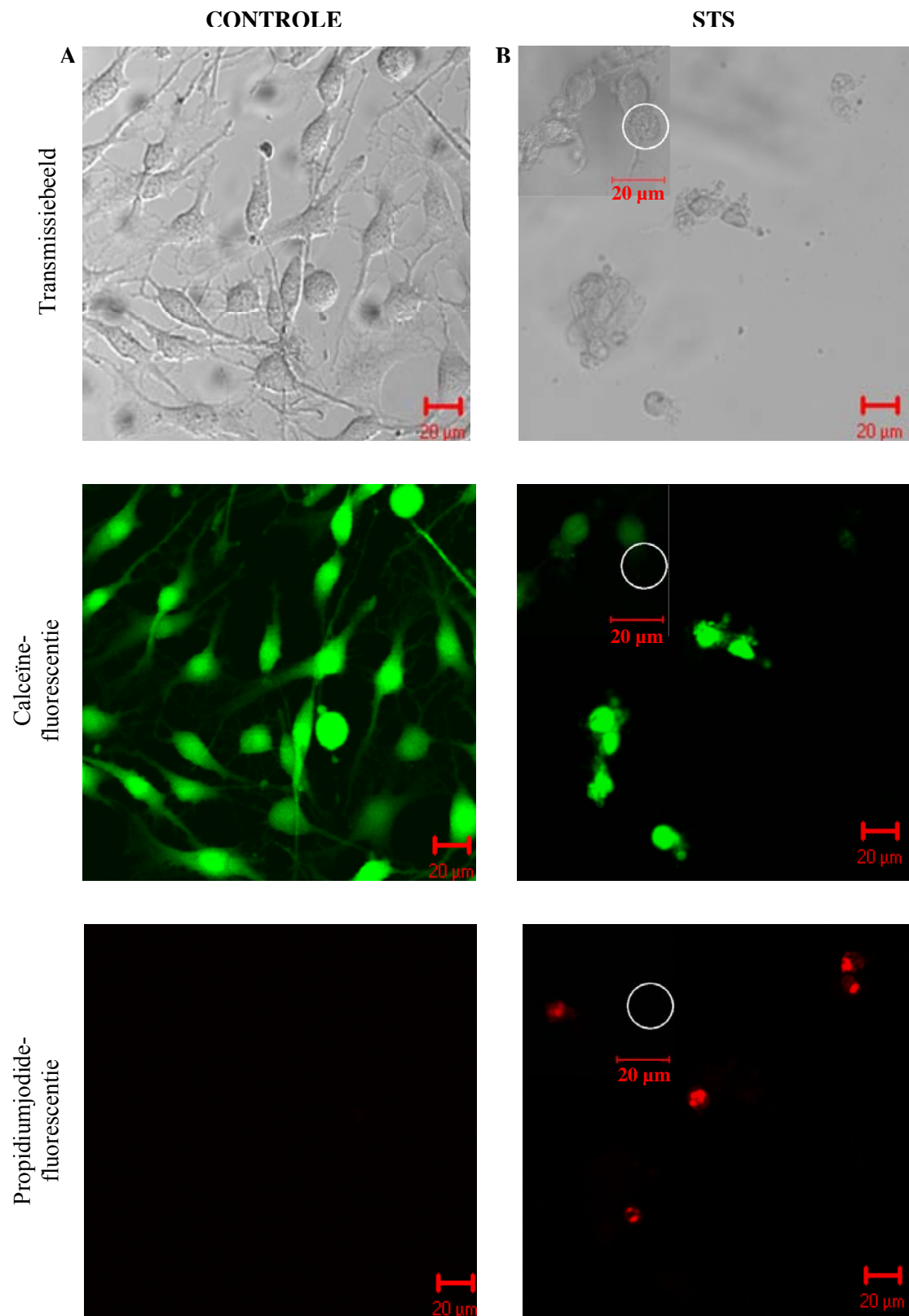
De doelstelling van deze studie is het bestuderen van de invloed van simvastatine op de viabiliteit van gedifferentieerde OLN-93 cellen. Om deze invloed na te gaan en om een onderscheid te kunnen maken tussen de twee verschillende types van celdood (apoptose en necrose) werd gebruik gemaakt van een co-kleuring met calceïne-AM en PI. De fluorescente signalen afkomstig van beide probes werden enerzijds gedetecteerd met behulp van een confocale laserscanning fluorescentiemicroscoop en anderzijds met behulp van een flowcytometer. Op deze manier kon gekeken worden naar de invloed van simvastatine op wijzigingen in de celvorm, op de intracellulaire esteraseactiviteit en op de membraanintegriteit.

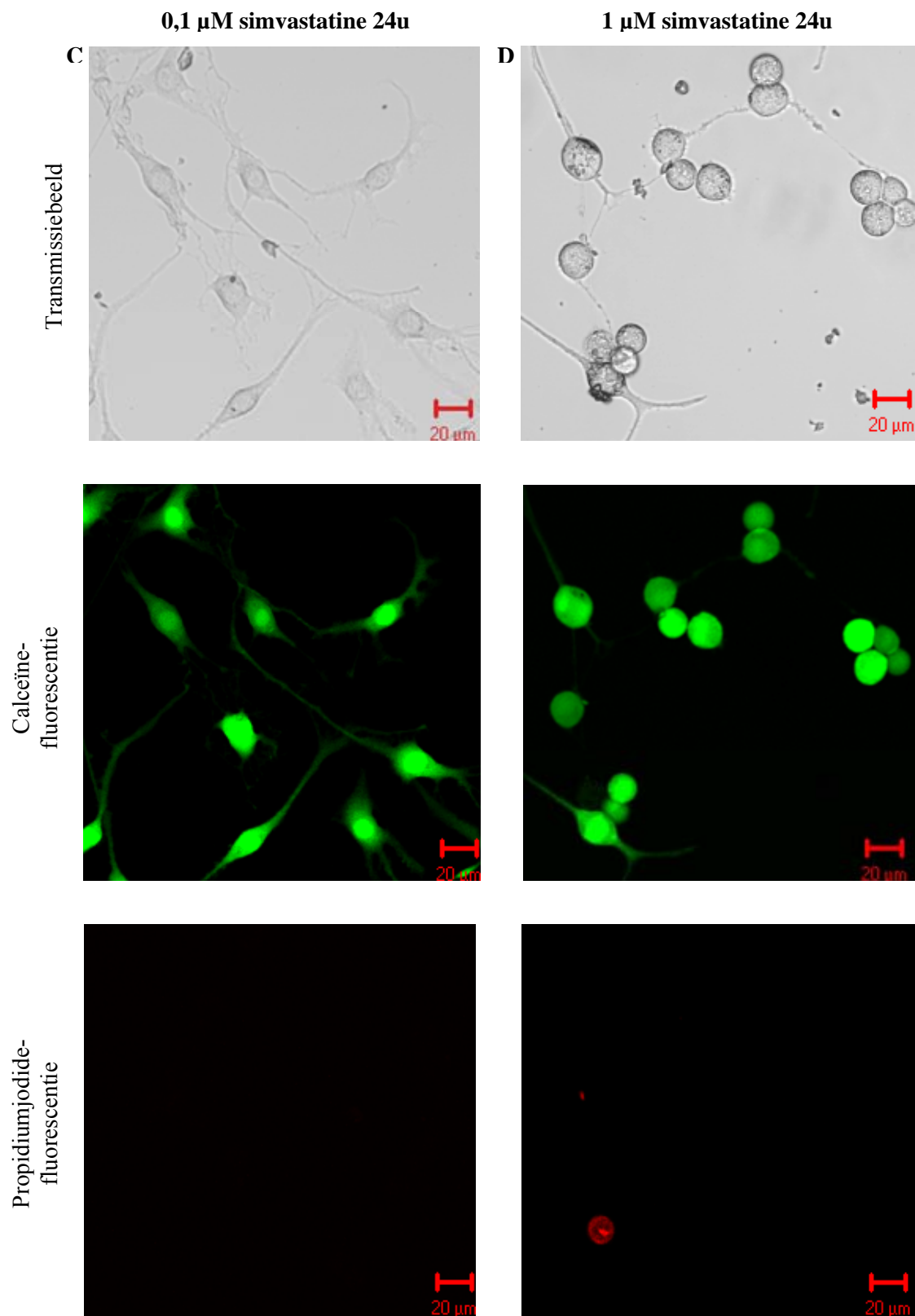
3.1.1 Confocale laserscanning fluorescentiemicroscopie

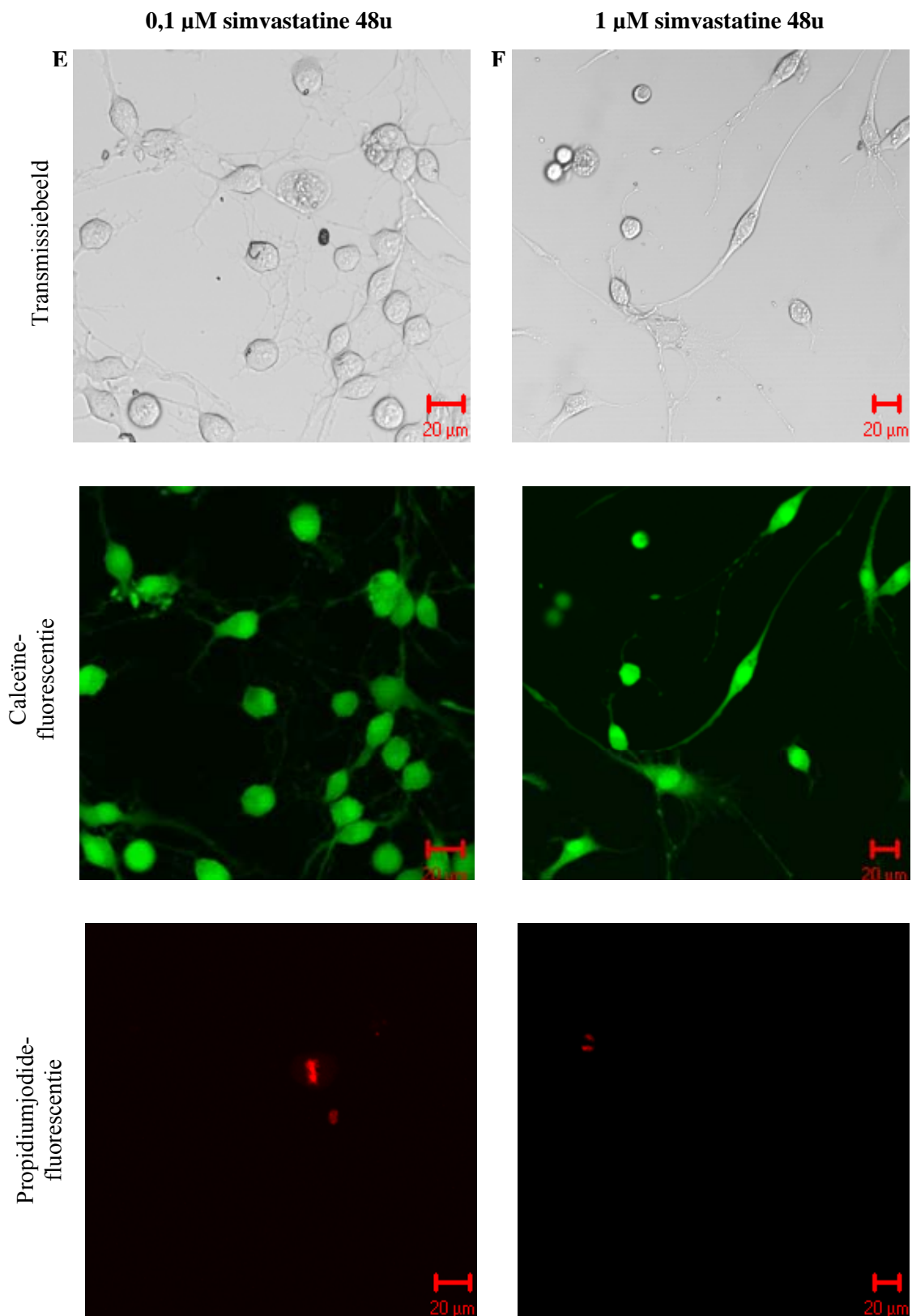
Confocale fluorescentiemicroscopie toont aan dat zowel de meeste controlecellen als de meeste simvastatine- en STS-behandelde OLN-93 cellen, calceïnefluorescentie vertonen (*figuur 3.1: A-F*). Deze fluorescentie is zowel in het cellichaam als in de uitlopers terug te vinden. De calceïnepositieve cellen bezitten actieve intracellulaire esterasen en worden gedefinieerd als levende cellen. Er wordt een zeer beperkt aantal OLN-93 cellen gevisualiseerd die hun membraanintegriteit verloren hebben en waarvan de celkern een positief signaal voor PI vertoont (*figuur 3.1: A-F*). Deze cellen vertegenwoordigen de populatie van de necrotische cellen. De dekglasjes met STS-behandelde OLN-93 cellen bezitten uitzonderlijk cellen die geen fluorescentie vertonen (*figuur 3.1: B: inzet*). Deze cellen worden aanzien als apoptotisch en bezitten nog wel een intacte membraan, maar niet langer intracellulaire esterasen.

Het belangrijkste verschil dat waargenomen wordt tussen de verschillende condities betreft de celdensiteit op de dekglasjes. De onbehandelde OLN-93 cellen (controlecellen) vertonen onder de confocale laserscanning fluorescentiemicroscoop een hoge celdensiteit. Dekglasjes met simvastatine-behandelde OLN-93 cellen (alle concentraties en incubatietijden) vertonen een gereduceerde celdensiteit in vergelijking met de controlecellen (*figuur 3.1: A en C-F*). Bij de STS-behandelde OLN-93 cellen tenslotte is het aantal cellen op het dekglasje drastisch gereduceerd in vergelijking met de controlecellen (*figuur 3.1, A en B*). Nochtans werd in elk van de condities initieel een zelfde aantal cellen uitgezaaid op het dekglas (zie sectie 2.2).

Wanneer de simvastatine-behandelde OLN-93 cellen vergeleken worden met de controlecellen, wordt ook een wijziging in de celvorm geobserveerd. (*figuur 3.1: A, C-F*).







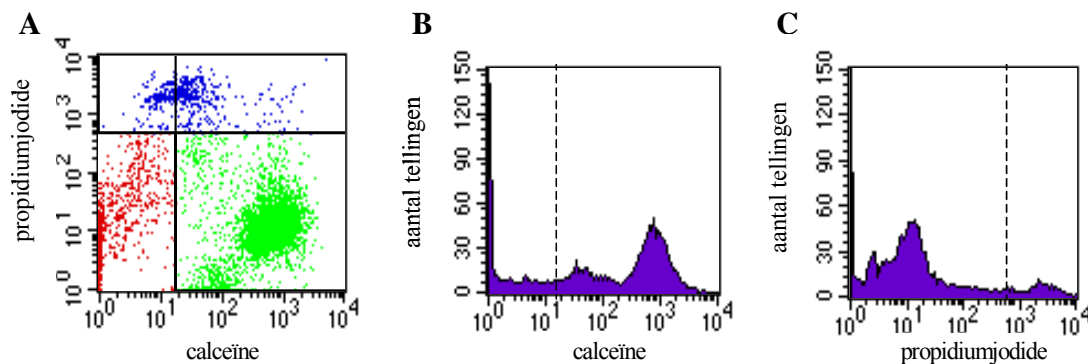
Figuur 3.1: Confocale afbeeldingen van gedifferentieerde OLN-93 cellen in cultuur. Transmissiebeelden werden telkens afgebeeld in rij 1 en de fluorescentiebeelden voor calceïne en PI op respectievelijk rij 2 en 3. Alle afbeeldingen, uitgezonderd E (PlanNeoFluar 10x objectief en zoom 3) werden genomen met een PlanNeoFluar 10x objectief en zoom 4, bij 37°C. Kolom A en B geven respectievelijk de controlecellen en de STS-behandelde OLN-93 cellen weer. De STS-behandelde OLN-93 cellen werden de laatste 24u voor de analyse geïncubeerd met 1 μM STS in DMEM voorzien van 0,5% FCS. In kolom C en D staan de OLN-93 cellen afgebeeld die de laatste 24u voor de analyse behandeld werden met respectievelijk 0,1 en 1 μM simvastatine in DMEM met 0,5% FCS. Kolom E en F tonen de OLN-93 cellen die gedurende de laatste 48u voor analyse blootgesteld werden aan respectievelijk 0,1 en 1 μM simvastatine in DMEM voorzien van 0,5 % FCS. De witte cirkel in de inzet van kolom B geeft een apoptotische cel weer. Deze afbeeldingen zijn afkomstig van een representatief experiment dat 7 keer herhaald werd.

Na een behandeling met simvastatine vertonen de OLN-93 cellen lichte wijzigingen in de celvorm. Zo vertonen een deel van de simvastatine-behandelde cellen een rond cellichaam en een verminderd aantal uitlopers in vergelijking met de controlecellen.

3.1.2 Flowcytometrie

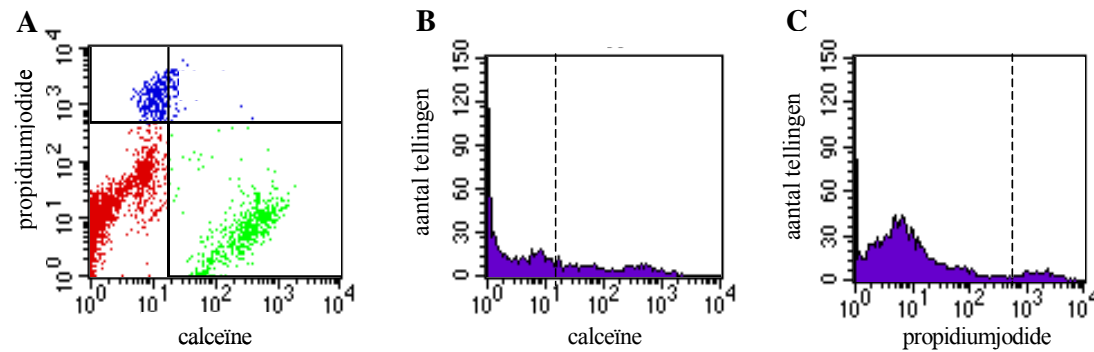
Om de data statistisch te kunnen analyseren en na te gaan of niet enkel de goede cellen werden geanalyseerd bij de confocale laserscanning fluorescentiemicroscop, werd een flowcytometrische bepaling van de celviabiliteit in de verschillende condities uitgevoerd.

De flowcytometrische analyse van de controlecellen ($N = 1$, $n = 3$ (24u) en $N = 9$, $n = 16$ (48u)) toont dat gemiddeld 71 ± 5 % (24u) en 74 ± 2 % (48u) van de OLN-93 cellen zich bevinden in het onderste rechterkwadrant van de kwadrantplot. Deze cellen vertonen een positief fluorescentiesignaal voor calceïne en een negatief fluorescentiesignaal voor PI en worden tot de populatie van de levende cellen gerekend. De controlecellen in het onderste linkerkwadrant van de kwadrantplot (9 ± 2 % (24u) en 10 ± 2 % (48u)) hebben een negatieve fluorescentie voor zowel calceïne als PI. Deze cellen worden als apoptotisch beschouwd. 20 ± 4 % (24u) en 16 ± 2 % (48u) van de OLN-93 cellen bevinden zich tenslotte in de twee bovenste kwadranten van de kwadrantplot. Deze cellen zijn positief voor PI en worden als necrotisch gedefinieerd. Een representatieve kwadrantplot en representatieve histogrammen voor controlecellen (48u) (*figuur 3.2*) geven duidelijk aan dat het grootste deel van de controlecellen nog actieve intracellulaire esterasen bezit en dus levend is.



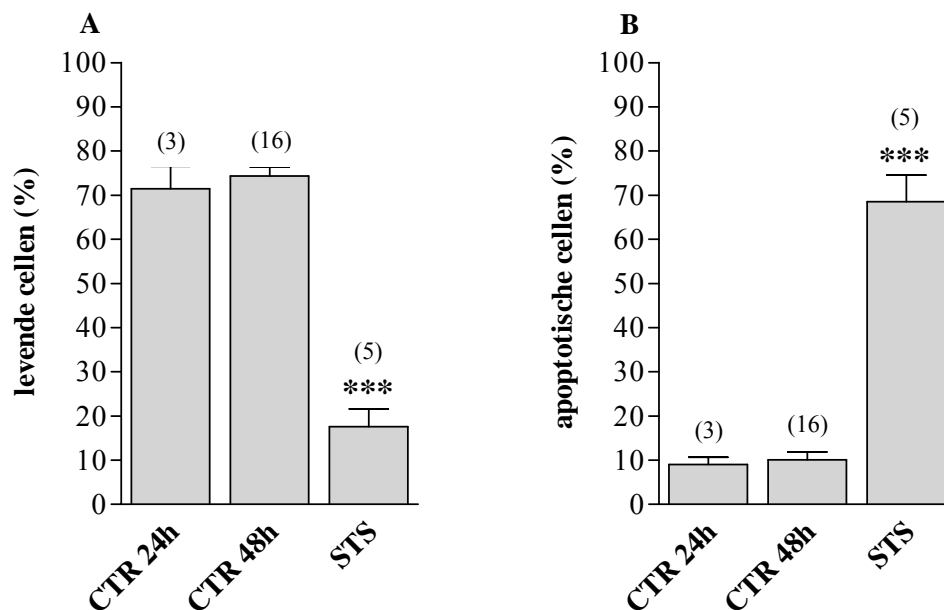
Figuur 3.2: Flowcytometrische analyse van onbehandelde OLN-93 cellen (controlecellen, 48u). De linkerfiguur (A) representeert de kwadrantplot van de FACS-analyse van een representatieve meting van controlecellen. Met behulp van vier kwadranten kan een onderscheid gemaakt worden tussen calceïne-positieve en PI-negatieve of levende cellen (groene punten in het onderste rechterkwadrant), calceïne- en PI-negatieve of apoptotische cellen (rode punten in het onderste linkerkwadrant) en PI-positieve of necrotische cellen (blauwe punten in de twee bovenste kwadranten). De histogrammen (B, C) zijn een weergave van het aantal cellen dat geteld is bij elke fluorescentie-intensiteit. De stippellijn (ingestelde drempelwaarde) in de histogrammen geeft de scheiding aan tussen calceïne-negatieve en calceïne-positieve cellen (B) of PI-negatieve en PI-positieve cellen (C), zoals gedefinieerd in de kwadrantplot. De kwadrantplot en de histogrammen zijn van een representatieve meting die 16 (48u) keer herhaald werd.

Om een positieve controle voor apoptose in de experimenten mee te nemen, werden de OLN-93 cellen behandeld met STS. Flowcytometrische analyse van met STS behandelde OLN-93 cellen ($N = 3$, $n = 5$) toont dat het type van celdood dat OLN-93 cellen ondergaan door een incubatie met $1 \mu\text{M}$ STS gedurende 24u, zoals verwacht hoofdzakelijk apoptose is. Het aantal apoptotische cellen bedraagt gemiddeld $68 \pm 6 \%$. Het aantal levende cellen beslaat $18 \pm 4 \%$, terwijl het aantal necrotische cellen $14 \pm 3 \%$ bedraagt. In het histogram voor calceïne (figuur 3.3: B) bevinden het grootste aantal cellen zich links van de ingestelde drempelwaarde en is calceïne-negatief. Dit is tegenstelling tot de calceïnepeik in het histogram van de controlecellen, die zich rechts van de drempelwaarde bevindt. (figuur 3.2: B). In het histogram voor PI bevindt de grootste celpopulatie zich, net zoals bij de controlecellen (figuur 3.2: C), aan de linkerzijde van de drempelwaarde en is PI-negatief (figuur 3.3: C).



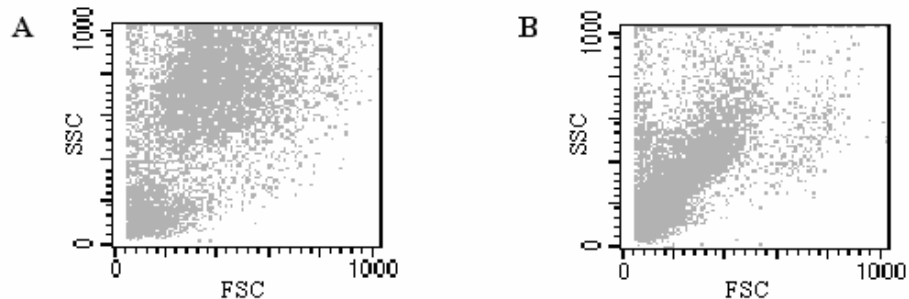
Figuur 3.3: Flowcytometrische analyse van STS-behandelde OLN-93 cellen. De laatste 24u voor analyse werden de OLN-93 cellen behandeld met STS (1 μ M) in DMEM met 0,5% FCS. De kwadrantplot (A) en de histogrammen van calceïne (B) en PI (C) geven de verschillende celpopulaties weer zoals beschreven in *figuur 3.2*. De kwadrantplot en de histogrammen zijn van een representatieve meting die 5 keer werd herhaald.

Het aantal levende cellen en het aantal apoptotische cellen binnen de STS-behandelde celpopulatie is respectievelijk significant ($p < 0,001$) gereduceerd en significant ($p < 0,001$) toegenomen ten opzichte van de controlecellen (24u en 48u) (*figuur 3.4*).



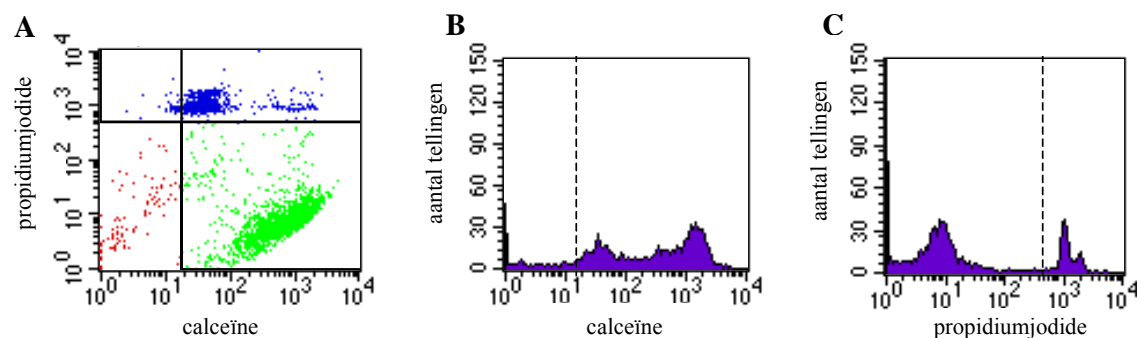
Figuur 3.4: Grafische weergave van het gemiddeld aantal levende cellen (A) en het gemiddeld aantal apoptotische cellen (B) binnen de controlepopulatie (24u en 48u) en de STS-behandelde celpopulatie. Op de X-as wordt de celpopulatie weergegeven (A en B), op de Y-as het gemiddeld aantal levende cellen (A) of het gemiddeld aantal apoptotische cellen (B). Van elke conditie wordt met behulp van foutbalken de standaardfout van het gemiddelde (SEM) weergegeven. Het aantal metingen per conditie wordt tussen haakjes weergegeven. *** = significant verschillend ten opzichte van de controlecellen ($p < 0,001$); CTR = controle; STS = staurosporine

Met STS behandelde OLN-93 cellen verschuiven naar links onder in de scatterplot (*figuur 3.5*). Hieruit kan afgeleid worden dat de OLN-93 cellen kleiner worden en een afgenomen granulariteit vertonen wanneer ze apoptose ondergaan.



Figuur 3.5: De scatterplot van controlecellen (48u) (A) en STS-behandelde OLN-93 cellen (B). Op de X-as wordt de voorwaartse lichtverstrooiing (FCS) weergegeven. Dit is een maat voor de grootte van de cel. Op de Y-as bevindt zich de zijwaartse lichtverstrooiing (SSC), een maat voor de granulariteit van de cel. Dit zijn representatieve kwadrantplots voor een meting die 16 keer (CTR) en 5 keer (STS) herhaald werd. CTR = controle; STS = staurosporine

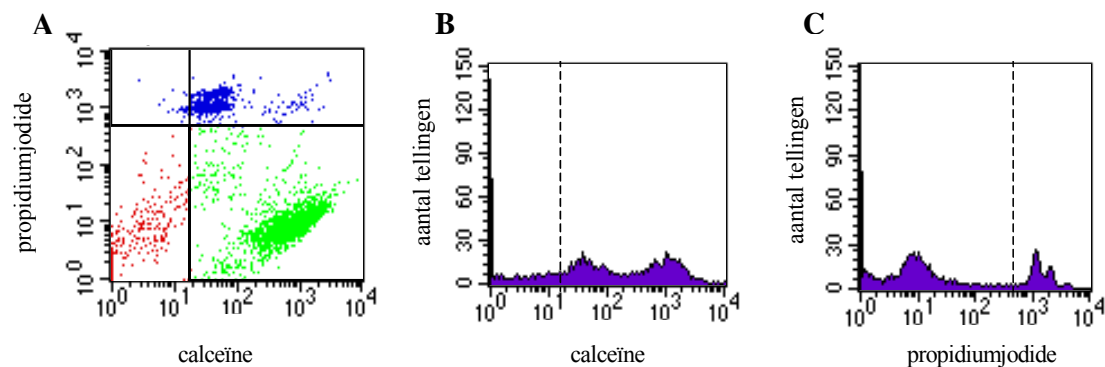
Wanneer de OLN-93 cellen gedurende 24u behandeld worden met 0,01 μM simvastatine (N = 3, n = 6), toont de FACS-analyse dat het gemiddeld aantal cellen dat nog actieve intracellulaire esterasen bezit 67 ± 10 % beslaat van de gehele populatie en het aantal cellen dat een verlies heeft van intracellulaire esteraseactiviteit 10 ± 4 %. De hoeveelheid cellen met een verlies van de membraanintegriteit bij deze conditie bedraagt 23 ± 7 %. Een representatieve kwadrantplot voor deze conditie wordt getoond in *figuur 3.6*. Het grootste aantal cellen bevinden zich in het histogram voor calceïne (*figuur 3.6: B*) aan de rechterzijde van de drempelwaarde en is calceïne-positief, terwijl in het histogram voor PI (*figuur 3.6: C*) een grote piek aanwezig is aan de linkerzijde van de drempelwaarde en een kleine piek aan de rechterzijde ervan.



Figuur 3.6: Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 24u behandeld met 0,01 μM simvastatine. De laatste 24u voor analyse werden de OLN-93 cellen behandeld met 0,01 μM simvastatine in DMEM voorzien van 0,5% FCS. De verschillende celpopulaties worden weergegeven door de kwadrantplot (A)

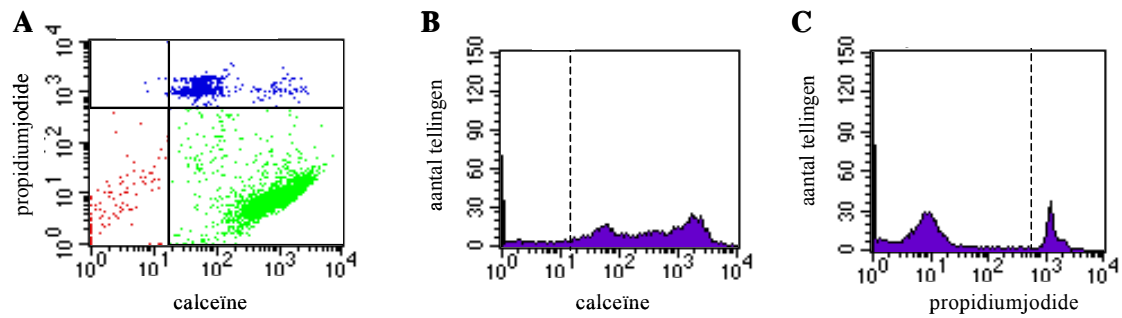
en de histogrammen van calceïne (B) en PI (C), zoals beschreven in *figuur 3.2*. De kwadrantplot en de histogrammen zijn van een representatieve meting die 6 keer werd herhaald.

Een behandeling van OLN-93 cellen gedurende 48u met 0,01 μM simvastatine ($N = 3$, $n = 6$) resulteert in gemiddeld $63 \pm 5\%$ levende cellen. Het aantal apoptotische cellen bedraagt $18 \pm 8\%$ en het aantal necrotische cellen $19 \pm 3\%$. Een representatieve kwadrantplot wordt getoond in *figuur 3.7*. In de histogrammen voor calceïne (*figuur 3.7: B*) en PI (*figuur 3.7: C*) bevindt het grootste aantal cellen zich inderdaad respectievelijk rechts en links van de drempelwaarde en bezitten dus actieve intracellulaire esterasen en een intacte celmembraan.



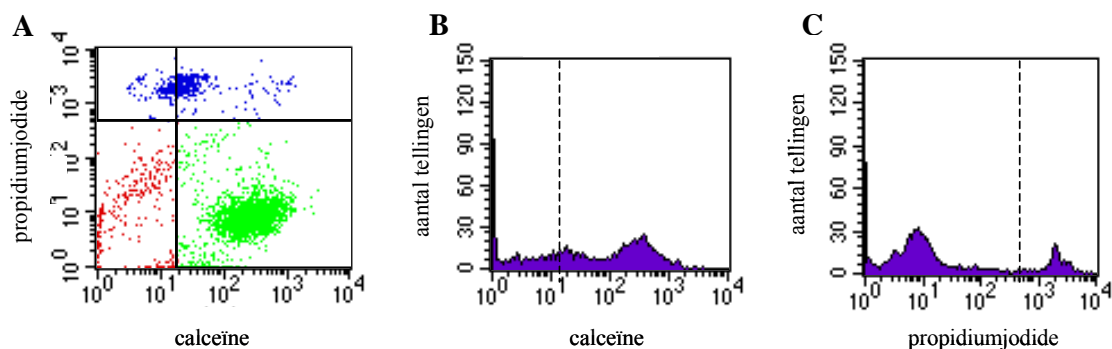
Figuur 3.7: Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 48u behandeld met 0,01 μM simvastatine. De OLN-93 cellen werden de laatste 48u voor de analyse gekweekt in DMEM voorzien van 0,5% FCS en 0,01 μM simvastatine. De kwadrantplot (A) en de histogrammen van calceïne (B) en PI (C) geven de verschillende celpopulaties weer zoals beschreven in *figuur 3.2*. De kwadrantplot en de histogrammen zijn afkomstig van een representatieve meting die 6 keer werd herhaald.

Als de OLN-93 cellen gedurende 24u blootgesteld worden aan 0,1 μM simvastatine ($N = 4$, $n = 8$) toont de flowcytometrische analyse dat deze behandeling resulteert in een gemiddelde van $69 \pm 2\%$ cellen met actieve intracellulaire esteraseactiviteit, $13 \pm 3\%$ cellen met het verlies van intracellulaire esterasen en $18 \pm 2\%$ OLN-93 cellen met een beschadigde celmembraan. Een representatieve kwadrantplot wordt in *figuur 3.8* getoond. Uit beide histogrammen (*figuur 3.8: B en C*) blijkt duidelijk dat het grootste aantal van de OLN-93 cellen wel fluorescentie voor calceïne maar geen fluorescentie voor PI vertonen na deze simvastatinebehandeling.



Figuur 3.8: Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 24u behandeld met 0,1 μ M simvastatine. De laatste 24u voor analyse werden de OLN-93 cellen geïncubeerd met 0,1 μ M simvastatine in DMEM voorzien van 0,5% FCS. De kwadrantplot (A) en de histogrammen van calceïne (B) en PI (C) geven de verschillende celpopulaties weer zoals beschreven in *figuur 3.2*. De kwadrantplot en de histogrammen zijn van een representatieve meting die 8 keer werd herhaald.

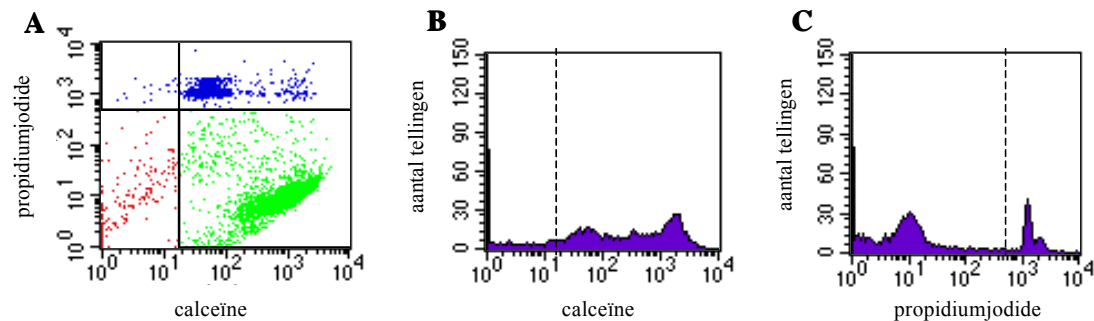
Een behandeling van OLN-93 cellen met 0,1 μ M simvastatine gedurende 48u (N = 5, n = 11) resulteert in een gemiddelde celpopulatie met actieve intracellulaire esterasen met een percentage van 73 ± 4 %. De hoeveelheid cellen zonder actieve intracellulaire esteraseactiviteit is 11 ± 3 % en het aantal cellen met een verlies van de membraanintegriteit bedraagt 15 ± 2 %. *Figuur 3.9* toont een kwadrantplot en histogrammen representatief voor deze behandeling. Uit de histogrammen (*figuur 3.9: B en C*) blijkt inderdaad dat het merendeel van de cellen wel fluorescentie voor calceïne maar geen fluorescentie voor PI vertonen.



Figuur 3.9: Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 48u behandeld met 0,1 μ M simvastatine. De OLN-93 cellen werden de laatste 48u voor de analyse gekweekt in DMEM met 0,5% FCS en 0,1 μ M simvastatine. De verschillende celpopulaties worden weergegeven door de kwadrantplot (A) en de histogrammen van calceïne (B) en PI (C), zoals beschreven in *figuur 3.2*. De kwadrantplot en de histogrammen komen van een representatieve meting die 11 keer werd herhaald.

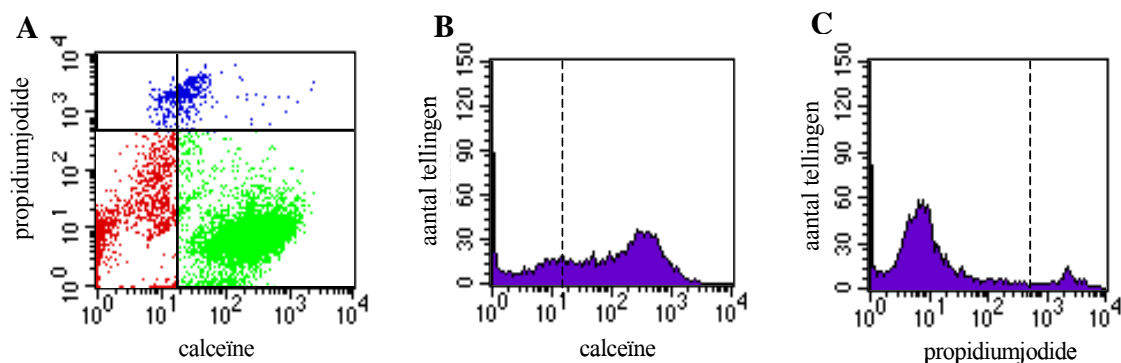
Een behandeling van 24u met 1 μ M simvastatine (N = 5, n = 9) resulteert in gemiddeld 69 ± 5 % levende cellen. Bij deze behandeling bedraagt de hoeveelheid apoptotische cellen 15 ± 4 % en zijn er 16 ± 3 % necrotische cellen. Een voor representatieve kwadrantplot deze conditie

wordt weergegeven in *figuur 3.10*. De histogrammen (*figuur 3.10: B en C*) tonen ook dat na deze statinebehandeling de OLN-93 cellen nog in het bezit zijn van actieve intracellulaire esteraseactiviteit en van een intacte celmembraan.



Figuur 3.10: Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 24u behandeld met 1 μ M simvastatine. De laatste 24u voor analyse werden de OLN-93 cellen behandeld met 1 μ M simvastatine in DMEM voorzien van 0,5% FCS. De kwadrantplot (A) en de histogrammen van calceïne (B) en PI (C) geven de verschillende celpopulaties weer zoals beschreven in *figuur 3.2*. De kwadrantplot en de histogrammen zijn van een representatieve meting die 9 keer werd herhaald.

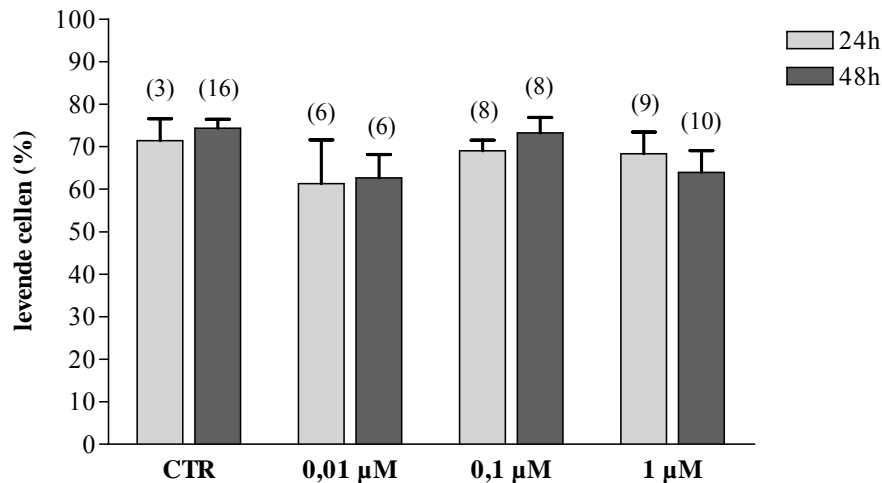
Wanneer de OLN-93 cellen gedurende 48u behandeld worden met 1 μ M simvastatine ($N = 6$, $n = 10$), bedraagt het gemiddeld aantal cellen met actieve intracellulaire esteraseactiviteit 64 ± 5 %. Het aantal cellen met een verlies van actieve intracellulaire esterasen bedraagt 21 ± 6 % en de hoeveelheid cellen zonder verlies van de membraanintegriteit is 15 ± 2 %. In *figuur 3.11* worden een representatieve kwadrantplot en histogrammen voor deze behandeling getoond. Uit de histogrammen (*figuur 3.11: B en C*) blijkt dat de meeste OLN-93 cellen inderdaad calceïne-positief en PI-negatief zijn.



Figuur 3.11: Flowcytometrische analyse van OLN-93 cellen gedurende 48u behandeld met 1 μ M simvastatine. De OLN-93 cellen werden de laatste 48u voor de analyse gekweekt in DMEM met 0,5% FCS en 1 μ M simvastatine. De kwadrantplot (A) en de histogrammen van calceïne (B) en PI (C) geven de verschillende celpopulaties weer zoals beschreven in *figuur 3.2*. De kwadrantplot en de histogrammen zijn van een representatieve meting die 10 keer werd herhaald.

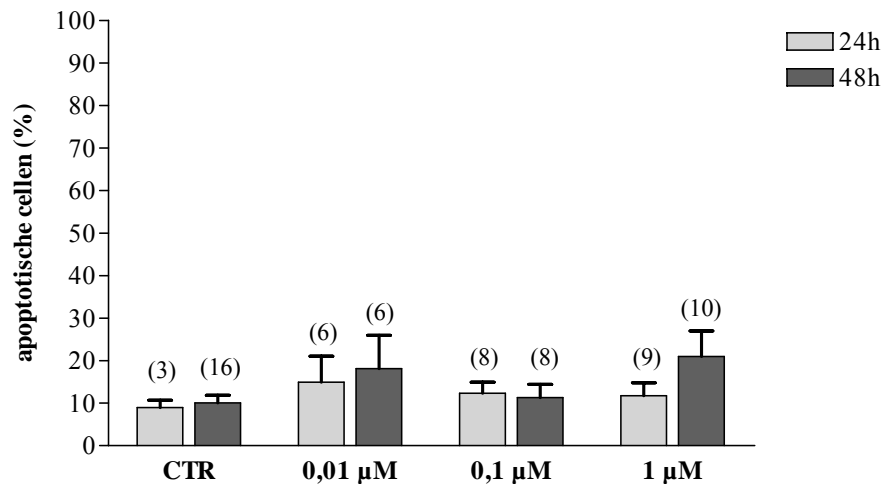
De scatterplot van met simvastatine behandelde OLN-93 cellen (niet weergegeven) is vergelijkbaar met de scatterplot van de controlecellen (*figuur 3.5: A*).

Het aantal levende cellen na een behandeling met simvastatine, in de drie verschillende concentraties (0,01; 0,1 en 1 μM) en zowel bij een incubatie gedurende 24u als 48u, is niet significant ($p > 0,05$) gereduceerd in vergelijking met het aantal levende cellen binnen de controlepopulatie (24u en 48u) (*figuur 3.12*).



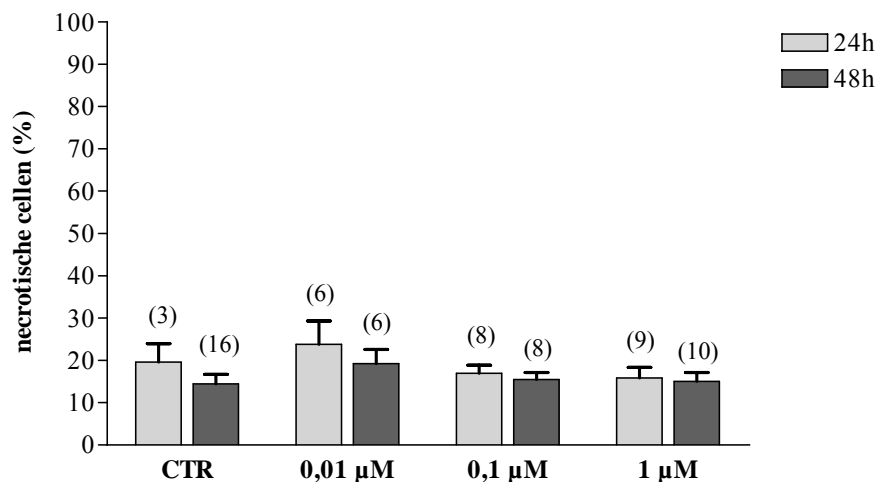
Figuur 3.12: Een grafische weergave van het gemiddeld aantal levende cellen binnen de controlepopulatie en de met simvastatine behandelde OLN-93 cellen. Op de X-as en de Y-as worden respectievelijk de verschillende celpopulaties en het gemiddeld aantal levende cellen in % weergegeven. Van elke conditie wordt de SEM weergegeven met behulp van foutbalken. Het aantal metingen per conditie wordt tussen haakjes weergegeven. CTR = controle

Ook met betrekking tot het aantal apoptotische cellen is er geen significant ($p > 0,05$) verschil aanwezig tussen enerzijds de controlecellen van 24u en 48u en anderzijds de OLN-93 cellen behandeld met simvastatine (*figuur 3.13*).



Figuur 3.13: Een grafische weergave van het gemiddeld aantal apoptotische cellen binnen de controlepopulatie en de met simvastatine behandelde OLN-93 cellen. Op de X-as staan de verschillende celpopulaties. Op de Y-as bevindt zich het gemiddeld aantal apoptotische cellen in %. Met behulp van standaardfoutbalken wordt van elke conditie de SEM weergegeven. Het aantal metingen per conditie wordt tussen haakjes weergegeven. CTR = controle

Wat betreft de hoeveelheid necrotische cellen, zijn er eveneens geen significante ($p > 0,05$) verschillen waarneembaar tussen de controlecellen (24u en 48u) en de simvastatinebehandelde OLN-93 cellen (figuur 3.14). Het aantal necrotische cellen binnen de verschillende condities bedraagt gemiddeld 17 ± 1 %.



Figuur 3.14: Een grafische weergave van het gemiddeld aantal necrotische cellen binnen de controlepopulatie en de met simvastatine behandelde OLN-93 cellen. De X-as geeft de verschillende celpopulaties weer. Op de Y-as bevinden zich het gemiddeld aantal necrotische cellen in %. De SEM van elke conditie wordt weergegeven met behulp van foutbalken. Het aantal metingen per conditie wordt tussen haakjes weergegeven. CTR = controle

HOOFDSTUK 4: DISCUSSIE

Statines werden recent naar voren gebracht als mogelijk geneesmiddel voor MS-patiënten en worden reeds jarenlang gebruikt als cholesterolverlagend middel zonder gerapporteerde nefaste effecten ter hoogte van het CZS. Een belangrijk kenmerk van MS-patiënten is een beschadigde BHB. Toediening van statines aan MS-patiënten kan bijgevolg leiden tot hogere statineconcentraties in het cerebrospinaal vocht in vergelijking met gezonde individuen. Deze verhoogde statineconcentraties kunnen gevolgen hebben voor de myeliniserende cellen van het CZS. Buiten de MS-plaques, gekenmerkt door demyelinisatie en oligodendrocytdepletie, bezitten MS-patiënten immers nog heel wat gezonde mature oligodendrocyten in onaangetast hersenweefsel. Tot op heden is er weinig bekend over de mogelijke effecten van deze hogere statineconcentraties op gedifferentieerde mature oligodendrocyten. Daarom werd in deze studie het effect van de actieve vorm van het lipofiele simvastatine op de viabiliteit van oligodendrocyten onderzocht. Hiervoor werden meerdere parameters in acht genomen, zoals wijzigingen in de celvorm, de intracellulaire esteraseactiviteit, de membraanintegriteit en de caspaseactivatie.

In eerste instantie was de keuze van het *in vitro* oligodendrocytmodel belangrijk. Er werd geopteerd om de studie uit te voeren op de oligodendrogliale cellijn OLN-93, afkomstig van een primaire oligodendrocytcultuur van de rat. Deze cellijn heeft de mogelijkheid behouden om snel te prolifereren maar bezit tevens de mogelijkheid om te differentiëren wanneer de cellen gekweekt worden op PLL-gecoate dekglasjes en wanneer het FCS-gehalte in het cultuurmedium wordt verlaagd. De OLN-93 cellijn brengt de antigeneigenschappen van mature oligodendrocyten tot expressie, namelijk de myelinspecifieke proteïnen GalC, MBP, MAG en PLP (56). In deze studie werden de OLN-93 cellen gekweekt onder deze differentiatie-inducerende condities.

Het gebruik van een cellijn biedt een aantal voordelen ten opzichte van het gebruik van een primaire cultuur, zoals het afwezig zijn van een invasieve isolatieprocedure, het steeds ter beschikking hebben van een voldoende groot aantal cellen en de zuiverheid.

Aan het gebruik van een dierlijke cellijn is ook een nadeel verbonden. Zo moet er rekening gehouden worden met de beperkte extrapoleerbaarheid van de data naar andere modellen. Daarnaast bestaat er een verschil tussen *in vitro* en *in vivo* studies. In het geval van *in vivo* studies zijn zowel andere cellen als regulatiemechanismen aanwezig. Bij *in vitro* studies, zoals met de OLN-93 cellen, zijn er geen andere celtypen, zoals neuronen, astrocyten, microglia, ... aanwezig wat een invloed kan hebben op het gedrag van de cellen. Dit probleem kan omzeild worden door experimenten uit te voeren op co-culturen van cellen in het CZS. Het voordeel echter van het gebruik van een *in vitro* model is de mogelijkheid om in gecontroleerde experimentele omstandigheden te werken.

In deze studie werden OLN-93 cellen behandeld met STS als positieve controle voor apoptose gebruikt. Uit de analyse met behulp van de confocale laserscanning microscoop van de met STS behandelde OLN-93 cellen blijkt dat de celdensiteit drastisch gereduceerd is in vergelijking met de controlecellen. Het proces van apoptose gaat gepaard met celkrimpings, de vorming van apoptotische lichaampjes en het loskomen van de cellen van het substraat waarop ze gekweekt worden. Dit kan de gereduceerde celdensiteit verklaren bij de met STS behandelde OLN-93 cellen. FACS-analyse van de met STS behandelde OLN-93 cellen bevestigt het optreden van apoptose na een incubatie met 1 μ M STS gedurende 24u. Het verschil in het gemiddeld aantal levende en apoptotische cellen is significant ($p < 0,001$) tussen de populatie van de controlecellen (24u en 48u) en de met STS behandelde OLN-93 cellen.

Uit de confocale analyse van dekglasjes met simvastatinebehandelde OLN-93 cellen blijkt dat deze een gereduceerde celdensiteit vertonen ten opzichte van de dekglasjes met controlecellen. Deze gereduceerde celdensiteit kan verschillende oorzaken hebben. De reductie kan het gevolg zijn van een afname in de proliferatie van de OLN-93 cellen ten gevolge van de behandeling met simvastatine. De mogelijkheid bestaat dat simvastatine de proliferatie van de OLN-93 cellen inhibeert daar uit eerder verschenen studies het anti-proliferatief effect van statines op verschillende celtypen blijkt. *Stuve et al* (2005)(25) en *Goodman et al* (1980) (45) beschrijven dat statines kunnen zorgen voor een verminderde proliferatie van T- en B-lymfocyten en het anti-proliferatief effect van statines op macrofagen werd eerder beschreven door *Capurso* (2001) (26). Verder zorgen statines voor een afname in de proliferatie van (vasculaire) gladde spiercellen (19, 21, 26, 46, 47) en van humane fibroblasten (43, 44). Om uitsluitel te verkrijgen omtrent het al dan niet afnemen van de proliferatie van de OLN-93 cellen onder invloed van statines, kunnen proliferatieassays uitgevoerd worden, zoals onder andere de colorimetrische 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)-assay of de ^3H -Thymidine assay.

Daarnaast kan de reductie in het aantal cellen te wijten zijn aan het feit dat de OLN-93 cellen het contact met het substraat verliezen, waardoor ze niet gevisualiseerd kunnen worden onder de confocale fluorescentiemicroscoop. Dit contactverlies met het substraat kan het gevolg zijn apoptose maar dit is niet noodzakelijk zo. Niet alleen de met STS behandelde OLN-93 cellen verliezen contact met het substraat, maar ook de met simvastatine behandelde OLN-93 cellen. Dit terwijl flowcytometrische analyse van de simvastatinebehandelde OLN-93 cellen aantoont dat er geen apoptose plaatsvindt.

Ondanks het voordeel ten opzichte van een flowcytometrische analyse, meer bepaald het afwezig zijn van een trypsinisatiestap, kan geconcludeerd worden dat bij het gebruik van de confocale laserscanning fluorescentiemicroscoop voor het uitvoeren van viabiliteitsmetingen enige voorzichtigheid geboden is. Bij het aanbrengen van het substraat, met daarop de

gekweekte cellen, in de speciale houder voor de analyses onder de confocale microscoop, blijven de cellen die losgekomen zijn van het substraat achter in het medium. Hierdoor kunnen deze cellen niet gevisualiseerd worden en is er geen kennis omtrent het dood of levend zijn van deze cellen. Het loslaten van het substraat is immers geen garantie voor celdood. Niet alleen de apoptotische met STS behandelde OLN-93 cellen, maar ook de niet-apoptotische met simvastatine behandelde OLN-93 cellen komen immers los van het substraat. Het kweken van de OLN-93 cellen in de speciale houder is geen oplossing, daar het medium, met daarin de losgekomen cellen, verwijderd dient te worden om fluorescentiemetingen te kunnen uitvoeren.

Confocale analyse van de OLN-93 cellen behandeld met simvastatine toont aan dat de OLN-93 cellen morfologische wijzigingen ondergaan, zonder dat de cellen in apoptose gaan, maar waarbij de uitlopers inkrimpen en de cellen een rond cellichaam vertonen. Uit onderzoek van *Braun et al* (1994, 2005) (11, 58) blijkt dat CNP een belangrijke rol vervult bij de vorming van de oligodendrocytuitlopers door middel van binding aan de microtubuli (11). Daartoe dient CNP verankerd te zijn in de plasmamembraan, waarvoor isoprenylatie noodzakelijk is (58). Het is mogelijk dat een verminderde isoprenylatie van CNP, ten gevolge van statinetoediening (19), correleert met een afname in de uitlopervorming van oligodendrocyten.

De flowcytometrische analyse van de gedifferentieerde OLN-93 cellen toont dat er geen significant ($p > 0,05$) verschil waarneembaar is wat betreft het gemiddeld aantal levende cellen in enerzijds de populatie van de controlecellen (24u en 48u) en anderzijds de OLN-93 cellen die behandeld werden met simvastatine, in de drie verschillende concentraties (0,01; 0,1 en 1 μM) en na de twee verschillende behandelingsperiodes (24u en 48u). Ook met betrekking tot het verlies van intracellulaire esteraseactiviteit of van celmembraanintegriteit is er geen significant ($p > 0,05$) verschil tussen de controlecellen (24u en 48u) en de met simvastatine behandelde OLN-93 cellen. Uit deze flowcytometrische analyse kan besloten worden dat simvastatine geen van beide types van celdood (apoptose en necrose) induceert in de oligodendrogliale cellijn OLN-93. Dit is niet consistent met eerder in de literatuur verschenen studies over de invloed van simvastatine op andere celtypen. Zo zorgt simvastatine in een concentratie van 1 tot 10 μM na 48u voor een inhibitie van de celcyclus en na 72 u voor een inductie van apoptose in primaire culturen van gladde spiercellen (21). *Egido et al* (1998) (47) tonen aan dat simvastatine (3 tot 100 μM gedurende 24u) kan zorgen voor een inductie van apoptose in primaire culturen van vasculaire gladde spiercellen. Een belangrijke opmerking bij deze studies is dat de toegediende simvastatineconcentraties hoger zijn dan in het voorliggend onderzoek. Een studie van *Antel et al* (2005) (55) op primaire culturen van dierlijke en humane oligodendrocytprogenitoren (OPs), wijst uit dat een

simvastatinebehandeling (μM -range) na 48u kan zorgen voor een inkrimping van de uitlopers en na 96u voor celdood van OPs afkomstig van ratten. Bij humane OPs worden dezelfde effecten geobserveerd, zij het pas respectievelijk na 144u en na meer dan 192u. Uit de studie van *Antel et al* (2005) (55) blijkt dat de behandelingsduur van de oligodendrocytculturen een belangrijke rol speelt, vermits celdood pas na 96u werd geobserveerd. In voorliggende studie werd geen statine-geïnduceerde celdood geobserveerd. Dit kan mogelijkwijze verklaard worden door het feit dat de maximale blootstellingsduur beperkt was tot 48u, waardoor de celdood mogelijks niet gevisualiseerd kon worden. Inkrimping van de uitlopers bij met simvastatine behandelde OLN-93 cellen was echter wel detecteerbaar na 48u blootstelling aan simvastatine. In voorliggend onderzoek was de maximale blootstellingsduur van de OLN-93 cellen aan simvastatine beperkt tot 48u (3 DIV) daar het OLN-93 model in de differentiatie-inducerende kweekcondities, met een sterk verlaagd FCS-gehalte, geen langere kweektijden toeliet. De controlecellen vertoonden na 4 DIV immers een verminderde kwaliteit in vergelijking met de controlecellen na 3 DIV. Een verschil met de eerder vernoemde statinestudies is ook dat er primaire culturen gebruikt werden en bovendien van andere celtypes dan de gedifferentieerde oligodendrocyten zoals gebruikt in de voorliggende studie, wat de discordante resultaten eventueel ook kan verklaren. Een cellijn is immers, zoals eerder beschreven, verschillend van een primaire cultuur en niet elk celtype reageert op dezelfde wijze op een blootstelling aan statines.

Wanneer gekeken wordt naar studies met andere statines op andere neurale cellijnen, wordt statine-geïnduceerde apoptotische celdood geobserveerd. Deze apoptose is zowel afhankelijk van de concentratie als van de blootstellingsduur. Zo tonen studies van *Altiok et al* (2004) (59) en *Jung et al* (1999) (60) dat incubatie van de C6 glioma cellijn met lovastatine in concentraties van respectievelijk, 10 μM en 10 – 25 μM , resulteert in apoptotische celdood. In de studie van *Altiok et al* (2004) werden na 24u morfologische wijzigingen gedetecteerd (de cellen werden ronder en kleiner) en slechts na 48u werd apoptose waargenomen. *Jung et al* (1999) observeerden reeds na 24u apoptotische celdood. Twee onderzoeken hebben het effect van lovastatine (respectievelijk 10 μM en 10 – 20 μM) op de E18 cellijn (neuroblasten) bestudeerd (61, 62). *Bragado et al* (2005) (61) observeerden na 24u apoptotische celdood. *Lorenzo et al* (2001) (62) namen zelfs na 12u reeds een significante toename in het aantal apoptotische cellen waar. Na 48u werd een maximale hoeveelheid apoptotische cellen gedetecteerd. *Föcking et al* (2004) (53) hebben de HT22 cellijn (neuronen), na een pre-incubatie met STS (300 nM), gedurende 10u geïncubeerd met 10 μM lovastatine en observeerden na deze blootstellingsduur reeds apoptose. Behalve *Föcking et al* (2004) (53), werd in deze studies apoptose aangetoond met behulp van een DNA-fragmentatie assay. De fragmentatie van het DNA is een stap in de apoptotische pathway die nog na caspaseactivatie plaatsvindt. Over het algemeen werd in deze cellijnen reeds na korte incubatietijden met statines apoptose gedetecteerd, maar wat betreft deze studies is er wel een belangrijk verschil

in concentratie in vergelijking met voorliggende studie. In deze studies is de laagste statineconcentratie 10 μM , terwijl in ons onderzoek de maximale concentratie 1 μM was. Dit kan verklaren waarom in voorliggende studie geen apoptotische celdood wordt geobserveerd. Men kan zich echter de vraag stellen of een statineconcentratie van 10 μM en hoger relevant is. De statineconcentratie in het bloedplasma, bij inname van 40 mg per dag, bedraagt 0,02 – 0,08 μM (simvastatine), 0,02 – 0,05 μM (lovastatine) en 0,11 – 0,13 μM (pravastatine) (21). Ondanks het feit dat zowel lipofiele statines, via passieve diffusie, als hydrofiele statines, via specifieke transporters, de BHB kunnen passeren (17, 18), bestaat de mogelijkheid dat er ook transportsystemen aanwezig zijn ter hoogte van de BHB die kunnen zorgen voor de efflux van zowel lipofiele als hydrofiele statines uit het CZS (30, 31). Bijgevolg is het weinig waarschijnlijk dat dergelijke hoge (10 μM) statineconcentraties in het cerebrospinaal vocht aanwezig zijn, zelfs ondanks het feit dat MS-patiënten een beschadigde BHB bezitten. Het is onwaarschijnlijk dat de concentratie in het cerebrospinaal vocht hoger kan worden dan de maximale concentratie in het bloedplasma. Op basis van bovenstaande gegevens en de therapeutisch relevante statineconcentraties (21, 63), werd in voorliggend onderzoek geopteerd voor het gebruik van drie statineconcentraties, 0,01; 0,1 en 1 μM .

In een studie van *Law et al* (1994) (64) werden twee humane maligne glioma cellijnen gedurende 72u geïncubeerd met een lagere dosis lovastatine, namelijk 0,1 μM . Deze incubatie resulteerde in apoptotische celdood na een blootstellingsduur van minimaal 72u. Hieruit blijkt dat de blootstellingsduur mogelijk ook een belangrijke rol speelt. Bij al deze studies moet de opmerking gemaakt worden dat de cellijnen verschillend zijn van de OLN-93 cellijn, waardoor er uiteraard ook verschil in de resultaten kan optreden, los van de verschillen in concentratie en blootstellingsduur.

Apoptose is een proces dat niet gedefinieerd kan worden door één enkele parameter, daarom is het aangewezen een combinatie van verschillende technieken te gebruiken om apoptotische celdood aan te tonen (65). Het aantonen van gekleefd PARP is een veel gebruikte en algemeen aanvaarde methode om caspase-afhankelijke apoptotische celdood op te sporen. Daarnaast hebben een aantal studies aangetoond dat statines kunnen zorgen voor de inductie van apoptose via caspaseactivatie. Zo is voor lovastatine reeds beschreven dat het de klieving van PARP kan induceren (66, 67). In een laatste fase van dit onderzoek werd met behulp van Western Blotting nagegaan of gekleefd PARP aanwezig is in de OLN-93 cellen na simvastatinebehandeling.

In de eerste pilootexperimenten werd voor een aantal condities geen of een zwak signaal waargenomen op de Western Blot ter hoogte van de intacte vorm van PARP (116 kb). De intacte vorm van PARP wordt in normale omstandigheden echter altijd teruggevonden in de cel. Vermoedelijk werd te weinig eiwit aangebracht op de gel.

Wat betreft de gekliefde vorm van PARP (85 kb), werd bij een aantal stalen een zwak bandje gevisualiseerd. De aanwezigheid van dit zwak signaal voor gekliefd PARP kan op basis van de FACS-resultaten verklaard worden. Daar wordt immers voor elke conditie een laag percentage aan apoptotische cellen gedetecteerd. De afwezigheid van gekliefd PARP in stalen van STS-behandelde OLN-93 cellen bevestigde dat er waarschijnlijk te weinig eiwitmateriaal werd aangebracht op de gel. Om uit de analyses met behulp van Western Blot conclusies te kunnen trekken, zijn bijkomende experimenten nodig.

Conclusie

Uit de FACS-resultaten kan geconcludeerd worden dat de incubatie van *in vitro* culturen van de oligodendrogliale cellijn OLN-93 met de actieve vorm van het lipofiele simvastatine in drie verschillende concentraties (0,01; 0,1 en 1 μ M) gedurende 24u en 48u, niet resulteert in wijzigingen in de intracellulaire esteraseactiviteit en de membraanintegriteit. Het gemiddeld aantal levende, apoptotische en necrotische cellen is immers niet significant ($p > 0,05$) verschillend tussen de controlecellen en de met simvastatine behandelde OLN-93 cellen. Na een incubatie met simvastatine werden onder de confocale microscoop echter wel reeds morfologische wijzigingen van de OLN-93 cellen waargenomen. Deze morfologische wijzigingen kunnen een eerste aanwijzing zijn dat de OLN-93 cellen in de richting van apoptotische celdood evolueren. Daarnaast kunnen deze morfologische wijzigingen veroorzaakt zijn door een gebrek aan de isoprenylatie van cellulaire proteïnen, waaronder CNP waardoor de uitlopervorming van de OLN-93 cellen verstoord wordt (68). Tot slot kunnen de morfologische wijzigingen ook verklaard worden door een wijziging in de membraanfluiditeit ten gevolge van statine-gemedieerde effecten op cholesterol (51). Vermits de uitlopers van belang zijn in het myelinisatieproces, is de statine-geïnhibeerde uitlopervorming een ongunstig effect. Daarnaast toonde de confocale analyse van met simvastatine behandelde OLN-93 cellen een gereduceerde celdensiteit op het substraat aan. Daar niet geweten is of de losgekomen cellen levend of dood zijn, kan geconcludeerd worden dat er voorzichtigheid geboden is bij het gebruik van de confocale laserscanning fluorescentiemicroscoop bij de analyse van celdood.

Naar de toekomst toe, is het in eerste instantie nodig onderzoek te verrichten naar de effecten van simvastatine op langere termijn. Dit zou bewerkstelligd kunnen worden door over te stappen op een ander celmodel, zoals primaire culturen van oligodendrocyten en (co-)culturen afkomstig van biopsies van humaan hersenmateriaal, dat wel langere observatieperiodes toelaat. Het gebruik van humane celculturen kan er ook voor zorgen dat de extrapolatie van de *in vitro* data naar de mens (*in vivo*) vergemakkelijkt wordt. Daarnaast dient gekeken te worden naar het effect van simvastatine op gedifferentieerde oligodendrocyten in inflammatoire omstandigheden, aangezien dit een belangrijk kenmerk

van MS is. Statines kunnen in inflammatoire condities immers bijkomende effecten hebben ten opzichte van fysiologische omstandigheden. Inflammatoire omstandigheden kunnen bekomen worden door cytokines aan het cultuurmedium toe te voegen. Deze cytokines kunnen toegediend worden voor of na de behandeling met simvastatine. Tot slot kan de invloed van andere lipofiele statines, zoals lovastatine, in de toekomst getest worden.

Binnen het kader van MS is voorliggende studie relevant. MS wordt ondermeer gekenmerkt door inflammatie. Ondanks de eerder aangetoonde gunstige anti-inflammatoire effecten van statines, moet toch enige voorzichtigheid geboden zijn bij het gebruik van statines als therapeutisch middel voor MS. Wanneer statines immers gebruikt zouden worden voor de behandeling van MS-patiënten, dan zal dit enerzijds voor een lange termijn behandeling zijn, maar anderzijds moet ook rekening gehouden worden met de beschadigde BHB bij MS-patiënten wat tot hogere statineconcentraties in het cerebrospinaal vocht kan leiden. De literatuur laat blijken dat lange termijn behandeling met statines, in het bereik van de therapeutische concentraties, kan leiden tot celdood. Vooraleer statines als gangbaar therapeutisch middel voor MS gebruikt kunnen worden, dient er verder onderzoek te gebeuren.

REFERENTIELIJST

1. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res* 2002;25(1):27-51.
2. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001;7(3):115-21.
3. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest* 2001;81(3):263-81.
4. Lassmann H. Mechanisms of demyelination and tissue destruction in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104(3):168-71.
5. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer J, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47(6):707-17.
6. Jessen KR. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(10):1861-7.
7. Baumann N, Pham-Dhin D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001;81(2):871-927.
8. Edgar JM, Garbern J. The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *J Neurosci Res* 2004;76(5):593-8.
9. Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu PH, Lee VMY, Li C, Roder J, Trapp BD. Myelin-Associated Glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 1998;18(6):1953-62.
10. Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, Schnaar RL. Myelin-associated glycoprotein and complementary ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and the PNS: Neuropathology and behavioural deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol* 2005;195(1):208-17.
11. Lee J, Gravel M, Zhang R, Thibault P, Braun PE. Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *J Cell Biol* 2005;170(4):661-73.
12. Lee AG. Myelin: Delivery by raft. *Curr Biol* 2001;11:R60-R-62.
13. Arnason BGW. Long-term experience with interferon beta-1b (Betaferon®) in multiple sclerosis. *J Neurol* 2005;252(3):III/28-III/33.
14. Menge T, Hartung HP, Stüve O. Statins – a cure-all for the brain? *Nat Rev Neurosci* 2005;6(4):325-31.
15. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 1992;33(11):1569-82.
16. Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23(10):482-6.
17. Hamelin BA, Turgeon J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19(1):26-37.
18. Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R. Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev* 2001;53(4):569-96.
19. Lechleitner M. Non lipid related effects of statins. *Journal of Clinical and Basic Cardiology*. 2002;5(3):205-8.
20. Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart* 2002;144(6):527-32.

-
21. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther* 1999;84(3):413-28.
 22. Cordle A, Koenigsnecht-Talboo J, Wilkinson B, Limpert A, Landreth G. Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. *J Biol Chem* 2005;280(40):34202-9.
 23. Mason RP, Walter MF, Jacob RF. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function? Role of microdomains and oxidative stress. *Circulation* 2004;109(21) Suppl 1:II34-41.
 24. Mach F. Towards a role for statins in immunomodulation. *Mol Interv* 2002;2(8):478-80.
 25. Menge T, von Budingen HC, Zamvil SS, Hartung HP, Kieseier BC, Stuve O. Statins for treatment of CNS diseases Status report from research and clinical practice. *Nervenarzt* 2005;76(4):426-37.
 26. Capurso A. The promise of statins. *Ital Heart J Suppl* 2001;2(3):224-9.
 27. Freeman DJ, Norrie J, Satar N, Neely RD, Cobbe SM, Ford I, Isles C, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, Shepherd J, Graw A. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001;103(3):357-62.
 28. Izumo N, Fujita T, Nakamuta H, Koida M. Lipophilic statins can be osteogenic by promoting osteoblast calcification in a Cbfa1- and BMP-2- independent manner. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2001;23(7):389-94.
 29. Wolozin B, Kellman W, Rousseau P, Celesia CG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme reductase inhibitors. *Arch Neurol*. 2000;57(10):1439-43.
 30. Kikuchi R, Kusuhara H, Abe T, Endou H, Sugiyama Y. Involvement of multiple transporters in the efflux of 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311(3):1147-53.
 31. Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 2001;31(8):469-07.
 32. Stanislaus R, Gilg AG, Singh AK, Singh I. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rats by Lovastatin. *Neurosci Lett* 2002;333(3):167-70.
 33. Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, Bravo M, Mitchell DJ, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 2002; 420(6911): 78-84.
 34. Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, Dorr J, Seeger B, Prozorovski T, Sallach S, Endres M, Brocke S, Nitsch R, Zipp F. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *J Exp Med* 2003;197(6):725-33.
 35. Sena A, Pedrosa R, Morais MG. Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *J Neurol* 2003;250(6):754-5.
 36. Vollmer T, Key L, Durkalski V et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2003;363(9421):1607-8.
 37. Neuhaus O, Stüve O, Zamvil SS, Hartung HP. Are statins a treatment option for multiple sclerosis? *Lancet Neurol* 2004;3(6):369-71.
 38. Paintlia AS, Paintlia MK, Khan M, Vollmer T, Singh AK, Singh I. HMG-CoA reductase inhibitor augments survival and differentiation of oligodendrocyte progenitors in animal model of multiple sclerosis. *FASEB J* 2005;19(11):1407-21.

-
39. Wood EJ. Are patients taking statins, which are HMG-CoA reductase inhibitors, to reduce their cholesterol, in danger of being deficient in coenzyme Q? *IUBMB Life* 2004;56(7):433-6.
40. Knopp RH. Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med* 1999;341(7):498-511.
41. Ghittoni R, Patrussi L, Pirozzi K, Pellegrini M, Lazzarini PE, Capecchi PL, Pasini FL, Baldari CT. Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. *FASEB J* 2005;19(6):605-7.
42. Michikawa M, Yanagisawa K. Inhibition of cholesterol production but not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J Neurochem* 1999;72(6):2278-85.
43. Kaneko I, Hazama-Shimada Y, Endo A. Inhibitory effects on lipid metabolism in cultured cells of ML-236B, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase. *Eur J Biochem* 1978;87(2):313-21.
44. Brown MS, Goldstein JL. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res* 1980;21(5):505-17.
45. Fairbanks KP, Witte LD, Goodman DS. Relationship between mevalonate and mitogenesis in human fibroblasts stimulated with platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1984;259(3):1546-51.
46. Habenicht AJ, Glomset JA, Ross R. Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1980;255(11):5134-40.
47. Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 1998;83(5):490-500.
48. Satoh T, Isobe H, Ayukawa K, Sakai H, Nawata H. The effects of pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on cell viability and DNA production of rat hepatocytes. *Life Sci* 1996;59(14):1103-8.
49. Jakobisiak M, Bruno S, Skierski JS, Darzynkiewicz. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(9):3628-32.
50. Sinensky M, Beck LA, Leonard S, Evans R. Differential inhibitory effects of lovastatin on protein isoprenylation and sterol synthesis. *J Biol Chem* 1990;265(32):19937-41.
51. Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman RM. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 2005;115(4):959-68.
52. Cenedella RJ, Kuszak JR, Al-Ghoul KJ, Qin S, Sexton PS. Discordant expression of the sterol pathway in lens underlies simvastatin-induced cataracts in Chbb: Thom rats. *J Lipid Res* 2003;44(1):198-211.
53. Föcking M, Besselmann M, Trapp T. Statins potentiate caspase-3 activity in immortalized murine neurons. *Neurosci Lett* 2004;355(1-2):41-4.
54. Pavlov OV, Bobryshev YuV, Balabanov YuV, Ashwell K. An in vitro study of the effects of lovastatin on human fetal brain cells. *Neurotoxicol Teratol* 1995;17(1):31-9.
55. Miron VE, Rajasekharan S, Jarjour AA, Zamvil SS, Kennedy TE, Antel JP. The effect of simvastatin on human and rodent oligodendrocyte progenitor cells. 2005. ABSTRACT
56. Richter-Landsberg C, Heinrich M. OLN-93: A new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *J Neurosci Res* 1996;45(2):161-73.
57. URL : <http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>

58. De Angelis DA, Braun PE. Isoprenylation of brain 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase modulates cell morphology. *J Neurosci Res* 1994; 39(4):386-97.
59. Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. *Neurosci Lett* 2004;370(2-3):212-7.
60. Choi JW, Jung SE. Lovastatin-induced proliferation inhibition and apoptosis in C6 glial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(1):572-9.
61. Cerezo-Guisado MI, Garcia-Marin LJ, Lorenzo MJ, Bragado MJ. Lovastatin inhibits the growth and survival pathway of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B in immortalized rat brain neuroblasts. *J Neurochem.* 2005;94(5):1277-87.
62. Garcia-Roman N, Alvarez AM, Toro MJ, Montes A, Lorenzo MJ. Lovastatin induces apoptosis of spontaneously immortalized rat brain neuroblasts: involvement of nonsterol isoprenoid biosynthesis inhibition. *Mol Cell Neurosci* 2001;17(2):329-41.
63. Corsini A, Pazzucconi F, Arnaboldi L, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti RS, Cesare R. Direct Effects of Statins on the Vascular Wall. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31(5):773-778.
64. Jones KD, Couldwell WT, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L, Law RE. Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205(3):1681-7.
65. Frey T. Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. *Cytometry* 1997;28(3):253-63.
66. Feleszko W, Meynarczuk I, Olszewska D, Jalili A, Grzela T, Lasek W, Hoser G, Korczak-Kowalska G, Jakobisiak M. Lovastatin potentiates antitumor activity of doxorubicin in murine melanoma via an apoptosis-dependent mechanism. *Int J Cancer* 2002;100(1):111-8.
67. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by lovastatin through activation of caspase-3 and DNase II in leukaemia HL-60 cells. *Pharmacol Toxicol* 2000;86(2):83-91.
68. Kim Rubens. Morfologische en CNP-gerelateerde effecten van simvastatine op OLN-93 cellen. Masterthesis Biomedische Wetenschappen. 2005-2006.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen en uw akkoord te verlenen.

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

De invloed van simvastatine op de viabiliteit van de oligodendrogliale cellijn

OLN-93

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

Debby BOLLEN

Datum: