

Nederlandse samenvatting

Hoe opereren maden?

De onderliggende werkingsmechanismen van de madentherapie

Het doel van dit proefschrift was om inzicht te verkrijgen in de onderliggende microbiologische en immunologische werkingsmechanismen van de madentherapie. Het gunstige resultaat van madentherapie wordt waarschijnlijk bewerkstelligd door effecten op het gebied van desinfectie, debridement en stimulatie van wondgenezing. De invloed van levende maden en/of madenexcreten op elk gebied werd in dit proefschrift nader onderzocht.

Hoofdstuk 1

Madentherapie is een oude en succesvolle methode om ernstig geïnfekteerde wonden te behandelen. In deze tijd van antibioticaresistentie, waarin moeilijk behandelbare infecties steeds frequenter voorkomen, is het belangrijk om mogelijke, nieuwe behandelmethoden te onderzoeken. De basale mechanismen van het proces van wondgenezing, debridement, biofilmvorming en complementactivatie worden in *Hoofdstuk 1* beschreven. Overmatige complementactivatie na weefselschade en/of (bacteriële) infectie kan leiden tot een verlengde inflammatoire fase in het proces van wondgenezing. Dit verstoort het fysiologische proces en resulteert in het ontstaan van een chronische wond. De inflammatoire fase wordt gekenmerkt door debris op het wondoppervlakte. In biofilm-geassocieerde wondinfecties maakt biofilm deel uit van het debris. Debridement, inclusief biofilmreductie, is essentieel om het wondgenezingsproces te kunnen voortzetten. Het is bewezen dat maden zorgen voor effectief wonddebridement en dat ze chronische wonden helen. In dit proefschrift werden gecontroleerde in-vitro experimenten uitgevoerd om de verschillende, mogelijke invloeden van maden en/of hun excreten te onderzoeken op planktonische cellen, antibiotica, biofilmvorming en complementactivatie.

Hoofdstuk 2

Eén van de belangrijkste hypothesen over madentherapie is dat maden directe antibacteriële activiteit bezitten. In dit onderzoek werd getest of levende maden dan wel hun excreten de groei van zes verschillende bacteriesoorten, die frequent uit wonden worden geïsoleerd, konden beïnvloeden. Het bleek dat levende larven de groei van alle bacteriesoorten stimuleren. Een turbidimetrische assay is uitgevoerd met madenexcreten en toont geen inhibitie van de bacteriële groei. Integendeel, de groei van alle bacteriesoorten, met uitzondering van *Pseudomonas aeruginosa*, wordt gestimuleerd. Deze studie concludeert dat er geen directe antibacteriële activiteit is van levende maden of madenexcreten in-vitro, ondanks dat in klinische setting madentherapie effectief is gebleken. Het is mogelijk dat de desinfectie van de wond wordt veroorzaakt door, indirecte, immunologische antibacteriële activiteit.

Hoofdstuk 3

Klinische observaties laten een snellere wondheling zien bij patiënten die tijdens madentherapie met antibiotica worden behandeld in vergelijking met patiënten die geen antibiotica krijgen. Daarom werden in dit onderzoek in-vitro experimenten uitgevoerd om te testen of madenexcreten de antibacteriële activiteit van verschillende antibiotica konden versterken. Minimaal inhibitoire concentraties (MIC) en minimaal bactericide concentraties (MBC) van negen combinaties van antibiotica en bacteriesoorten werden bepaald door middel van een zogenoemde schaakbordtitratie. De antibacteriële activiteit van gentamicine tegen *Staphylococcus aureus* wordt versterkt in aanwezigheid van madenexcreten. Dit effect is dosisafhankelijk. De MBC van flucloxacilline en madenexcreten tegen *S. aureus* wordt ook verlaagd. Andere combinaties van antibiotica en madenexcreten laten een indifferent effect zien. Deze studie toont wederom geen directe antibacteriële eigenschappen van madenexcreten tegen verscheidene bacteriesoorten. De synergie tussen gentamicine en madenexcreten kan in de klinische praktijk van belang zijn, omdat het lagere doses gentamicine zou toestaan en op die manier de ernstige nefro- en ototoxische bijwerkingen kan reduceren.

Hoofdstuk 4

Dit hoofdstuk bevat twee studies. *Hoofdstuk 4.1* beschrijft de onderzoeksresultaten van het effect van madenexcreten op *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1)

biofilmvorming, getest op titanium, roestvrij staal en polyethyleen in-vitro en *Hoofdstuk 4.2* toont de resultaten van biofilmvorming door vijf andere bacteriën en de invloed van madenexcreten op biofilms van *Staphylococcus aureus* en *Staphylococcus epidermidis*. Biofilm-geassocieerde infecties op biomaterialen zijn zeer moeilijk behandelbaar, omdat de bacteriële pathogenen in de biofilm resistent zijn tegen antibiotica en immunologische afweer. Daarom is het van belang om mogelijke, nieuwe methoden voor de behandeling van ernstige, biofilm-geassocieerde infecties te onderzoeken. In de huidige toepassing van madetherapie worden de larven in permeabele netjes op het wondoppervlakte geplaatst. Door de permeabele membranen kunnen madenexcreten migreren naar de wond. Observaties van wonden, die suspect zijn voor biofilmvorming, tonen dat het debris wordt opgelost met maden in netjes. Daarom werd verwacht dat madenexcreten zouden kunnen interfereren met biofilmvorming. Biofilms werden in-vitro gevormd op speciaal ontwikkelde en geproduceerde kammodellen van titanium, roestvrij staal en polyethyleen die in een 96-microtiter wells plaat konden hangen. Voor alle geteste bacteriën geldt dat de meeste biofilmvorming wordt bereikt binnen ongeveer 7 dagen. De minste *P. aeruginosa* biofilm wordt gevormd op roestvrij staal, terwijl *S. aureus* en *S. epidermidis* biofilms de zwakste aanhechting hebben op titanium. De biofilms van de andere, geteste bacteriën werden in onvoldoende mate gevormd en konden niet worden gekwantificeerd. Dus, de hoeveelheid biofilm is afhankelijk van het biomateriaal, maar ook van de bacteriesoort die de biofilm vormt. Madenexcreten voorkomen en remmen biofilmvorming en breken zelfs bestaande biofilms af. Een maximum van 92% biofilmreductie werd gemeten in de experimenten. Excreten van volgroeide maden zijn effectiever dan die van de neonatale maden. Madenexcreten hebben na een maand opslag bij kamertemperatuur nog steeds de capaciteit om biofilms te reduceren. De bovenstaande onderzoeksresultaten suggereren dat (substanties uit) madenexcreten in de toekomst mogelijk een nieuwe behandelmethode kunnen vormen voor biofilm-geassocieerde infecties rond implantaten.

Hoofdstuk 5

De inflammatoire respons, die plaatsvindt gedurende het proces van de wondgenezing, is het resultaat van complementactivatie en is essentieel voor het weefselherstel. Overmatige complementactivatie kan echter ook leiden tot

weefselschade. Als er sprake is van een verstoord wondgenezingsproces, is de inflammatoire fase verlengd. Dit is het resultaat van excessieve complementactivatie. Wellicht stimuleren madenexcreten de wondgenezing door de complementactivatie te beïnvloeden. In deze studie werden twee verschillende testmethoden gebruikt, die ook klinisch worden toegepast om complementactivatie van patiënten te bepalen. Het onderzoek toont dat madenexcreten complementactivatie in gezonde en post-operatief opgevangen donor sera inhiberen tot 99.9%, middels alle drie de routes van het complement systeem. Gekookte madenexcreten (100°C) reduceren complementactivatie het sterkst. Madenexcreten zijn zeer thermostabiel, want de complement-inhiberende capaciteit blijft gelijk na een maand opslag bij kamertemperatuur. Degradatie van proteïnen in madenexcreten vermindert het complement-inhiberende effect. Deze studie toont de eerste niet-specifieke complement-inhibitor, mogelijk een klein thermostabiel eiwit, die reeds succesvol wordt toegepast in de klinische praktijk. De inhibitie van complement activatie verklaart gedeeltelijk de gunstige wondgenezing door madentherapie. De complement-inhibitoren in madenexcreten zouden een nieuwe behandeling kunnen betekenen voor alle aandoeningen, die het gevolg zijn van een (over)actief complement systeem, zoals bijvoorbeeld immuungemedieerde interne ziekten of ernstige inflammatoire reacties na traumata of operaties (Severe Inflammatory Response Syndrome).

Hoofdstuk 6

Dit hoofdstuk geeft een overzicht van de klinische indicaties voor het gebruik van maden, beschrijft de belangrijkste hypothesen over de onderliggende werkingsmechanismen van madentherapie in de literatuur, inclusief de resultaten uit dit proefschrift, behalve die van de complementstudie, die zullen worden besproken in *Hoofdstuk 7*. Tot slot worden suggesties gegeven voor mogelijk toekomstig onderzoek en eventuele toepassingen. Een deel van het onderliggende werkingsmechanisme van madentherapie zou kunnen worden verklaard door de invloed op de componenten uit de extracellulaire matrix en door biofilmreductie. Maden en/of madenexcreten bezitten geen directe antibacteriële eigenschappen, zoals beschreven in *Hoofdstuk 2*. Het review suggereert dat madenexcreten een immuungerelateerd effect zouden kunnen hebben, dat resulteert in de inhibitie van de pro-inflammatoire respons. Deze hypothese wordt bevestigd in *Hoofdstuk 5* van

dit proefschrift. Behalve basaal wetenschappelijk onderzoek, zijn ook gerandomiseerde en gecontroleerde klinische multicenter trials nodig om meer wetenschappelijke ondergrond voor madentherapie te verkrijgen. Madenexcreten lijken een essentiële rol te spelen in het wondgenezingsproces. Toekomstige studies moeten de compositie van de madenexcreten onderzoeken en de effectieve substanties isoleren om uiteindelijk een mogelijke, nieuwe therapie te kunnen ontwikkelen voor (bepaalde) inflammatoire ziekten.

Hoofdstuk 7

In dit hoofdstuk wordt de hoofdvraag uit dit proefschrift (gedeeltelijk) beantwoord: Hoe opereren maden? Als maden de wond koloniseren, produceren zij excreten. Deze madenexcreten, die verschillende proteïnen bevatten, reduceren het (biofilm)debris op het wondoppervlakte en remmen het complementsysteem van het betreffende organisme. De complementremming veroorzaakt een inhibitie van de inflammatoire respons, die tegelijkertijd zorgt voor minder chemotaxis, bijvoorbeeld van neutrofielen. Suppressie van de inflammatoire respons resulteert in minder wond debridement. De maden en/of hun excreten zullen nu het wond debridement verzorgen. Doordat er minder ontsteking is, zal verdere weefselschade worden voorkomen en kan het wondgenezingsproces continueren. Madenexcreten beïnvloeden tegelijkertijd de proteolytische activiteit in de wond. Gedurende de proliferatieve fase van de wondgenezing, veranderen de madenexcreten de aanhechting en verspreiding van fibroblasten op de extracellulaire matrix en zorgen ze voor proliferatie van endotheliale cellen, waardoor angiogenese wordt bevorderd. Verder hebben de excreten een effect op de verspreiding van keratinocyten, die het wondoppervlakte bedekken. Uiteindelijk zal het gehele wondoppervlakte weer sluiten.

Dit proefschrift toont aan dat madenexcreten potentiële, therapeutische biofilm- en/of complementremmers zijn. Toekomstig onderzoek is gericht op verdere identificatie en ontwikkeling van een nieuw, effectief farmacologisch substraat, dat kan worden gebruikt voor de behandeling van infecties en/of immuungemedieerde ziektes, geïsoleerd uit het madenexcreet van de *Lucilia sericata*.