



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Maggot therapy's modes of action : effect of maggot secretions on microbiological, haematological and immunological processes**

Plas, M.J.A. van der

### **Citation**

Plas, M. J. A. van der. (2009, October 27). *Maggot therapy's modes of action : effect of maggot secretions on microbiological, haematological and immunological processes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14259>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14259>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

**CHAPTER**

**E-2**



Chronische (niet-helende) wonden zijn wereldwijd een groot maatschappelijk probleem. De patiënten kunnen door hun fysieke achteruitgang emotionele problemen krijgen en sociaal geïsoleerd raken. Dit leidt tot een verminderde kwaliteit van leven en kan gepaard gaan met hoge kosten voor de patiënten, maar ook voor hun families en de samenleving. Chronische wonden kunnen worden veroorzaakt door zowel lokale als algemeen lichamelijke factoren. Voorbeelden van lokale factoren zijn bacteriële infecties, zuurstofgebrek, verweking van het weefsel, eeltvorming en druk (bijvoorbeeld doorligwonden) terwijl algemeen lichamelijke factoren te maken hebben met slechte voeding, leeftijd, vaatlijden, immuunsysteemonderdrukkende medicijnen en onderliggende ziektes. Een voorbeeld van een onderliggende ziekte is diabetes mellitus. Van de 200 miljoen diabeten in de wereld krijgt tot wel 15% te maken met één of meerdere niet-helende voetwonden, die leiden tot meer dan 1 miljoen amputaties per jaar. Chronische wonden komen vaak voor in de onderbenen van mensen ouder dan 60. De verwachting is dat het aantal patiënten zal toenemen.

Er zijn veel verschillende manieren om chronische wonden te behandelen. Verwijdering van beschadigd, geïnfecteerd en/of dood weefsel (debridement) is één van deze behandelingsmethoden en kan worden uitgevoerd door maden van de groene vlieg. Het gebruik van maden voor de genezing van wonden is waarschijnlijk al eeuwenoud en wordt bijvoorbeeld toegeschreven aan de maya's en de aboriginals. De oudst bekende tekst die melding maakt van de positieve effecten van maden in wonden is geschreven door Baron D.J. Larrey (1766-1842), inspecteur-generaal in het leger van Napoleon. Verdere bronnen komen van chirurgen die de gunstige effecten van maden op wonden beschreven ten tijde van de Amerikaanse Burgeroorlog. De grondlegger van de moderne madentherapie is de orthopedisch chirurg William Baer (1872-1931). Tijdens de Eerste Wereldoorlog behandelde hij soldaten, die van het slagveld waren gehaald, waarvan de wonden vol zaten met maden. Toen hij de maden verwijderde bleek dat de wonden heel schoon waren. In 1928 startte Baer met de behandeling van wonden met maden en hij ontwikkelde manieren om maden te kweken en te steriliseren. In de 30-er jaren werd madentherapie een zeer populaire behandelingsmethode, wat af te leiden is aan de vele wetenschappelijke artikelen over dit onderwerp. Door de ontwikkeling van verbeterde chirurgische methoden en de ontdekking van antibiotica stopte het gebruik van maden en raakte deze therapie vergeten. In de jaren 90 werd madentherapie echter opnieuw geïntroduceerd als behandeling van chronische wonden besmet met antibiotica-resistente bacteriën. Tegenwoordig wordt deze therapie over de hele wereld weer gebruikt. In Nederland is madentherapie eens of meerdere keren toegepast in 70% van alle ziekenhuizen terwijl 25% zelfs regulier gebruiker is. Er zijn echter geen goede richtlijnen voor het gebruik van maden en de gepubliceerde literatuur is vaak onsamenhangend en/of onwetenschappelijk. Verder is er zeer weinig bekend over het werkingsmechanisme van de therapie. Hierdoor is madentherapie bij veel artsen nog niet echt geaccepteerd.

Het doel van het beschreven onderzoek in dit proefschrift is de werkingsmechanismen van madentherapie te verklaren. Hiertoe bekijken we het effect van madensecreten (speeksel) op 1) bacteriën, 2) de vorming en afbraak van bloedstolsels, 3) op de werking van verschillende soorten witte bloedcellen (neutrofielen en monocytten) en 4) op de ontwikkeling van monocytten tot ontstekingsbevorderende macrofagen en ontstekingsremmende/herstelbevorderende macrofagen.

**Hoofdstuk 1** geeft een samenvatting van normale wondgenezingsprocessen. Deze processen kunnen worden verdeeld in drie overlappende fasen: ontsteking, weefselvorming, en herstructurering van nieuw weefsel. Verder worden de stoornissen in deze fasen beschreven die het ontstaan van chronische wonden kunnen verklaren en worden verschillende behandelingsmethoden voor deze wonden genoemd. Ten slotte wordt een overzicht gegeven van de geschiedenis van madentherapie.

Eén van de effecten die wordt toegeschreven aan maden is het doden van bacteriën door middel van de productie van antimicrobiële moleculen en enzymen. Om dit te bewijzen hebben we de antimicrobiële activiteit van madensecreten met behulp van verschillende methoden onderzocht (**Hoofdstuk 2**). We vonden echter dat de bacteriën niet gevoelig waren voor de secreten; slechts bij concentraties die aanzienlijk hoger waren dan in wonden verwacht wordt, zagen we een afname van het aantal *Staphylococcus aureus*, maar niet van *Pseudomonas aeruginosa* (twee veelvoorkomende bacteriën in chronische wonden). Bacteriën komen echter niet alleen als vrije cellen voor in chronische wonden, maar ook in biofilms. Biofilms zijn een samenleving van bacteriën die vastzitten aan een substraat of aan elkaar en zijn omgeven door een zelfgeproduceerde matrix. De bacteriën in deze biofilms zijn beschermd tegen zowel antibiotica als de werking van het immuunsysteem. Dit komt doordat de bacteriën hun metabolisme verlagen (inactief worden) en door de aanwezigheid van de beschermende matrix. We ontdekten dat madensecreten de vorming van *S. aureus* biofilms kunnen voorkomen en dat ze al gevormde biofilms kunnen afbreken (**Hoofdstuk 2**). In tegenstelling tot *S. aureus* biofilms kan de vorming van *P. aeruginosa* biofilms niet worden voorkomen door secreten. Wel vonden we dat relatief hoge concentraties secreten de gevormde biofilms konden afbreken, terwijl lage concentraties leidden tot vergroting van de biofilms. Verder is bekend dat *S. aureus* geen effect heeft op het overleven van de maden, terwijl *P. aeruginosa* maden kan doden. Daarom is onze conclusie dat meer maden nodig zijn voor de behandeling van wonden die geïnfecteerd zijn met *P. aeruginosa* dan met *S. aureus*. De bacteriën uit de biofilms werden echter niet gedood door de madensecreten. Daarom onderzochten we het effect van combinaties van antibiotica en secreten op biofilms en op de bacteriën die uit de biofilms kwamen (**Hoofdstuk 3**). We ontdekten dat de afbraak van *S. aureus* biofilms door secreten niet veranderde in de aanwezigheid van antibiotica. De bacteriën die uit de biofilm kwamen werden echter niet efficiënt gedood door de antibiotica. Dit komt waarschijnlijk doordat de bacteriën niet actief waren; zodra de bacteriën in vers

medium werden overgebracht en begonnen te groeien konden ze worden gedood door de antibiotica. Wel zagen we een groot verschil in de effectiviteit van de antibiotica. Clindamycin en vancomycine, antibiotica die alleen effectief zijn tegen groeiende cellen, zorgden voor maximaal 99% afname van het aantal bacteriën, terwijl daptomycine, een antibioticum dat zowel tegen groeiende als inactieve cellen werkt, veel sneller werkte en uiteindelijk alle bacteriën doodde. Verder ontdekten we dat madensecreten de werking van daptomycine tegen bacteriën uit biofilms verhoogde. Samenvattend, madensecreten breken biofilms af. De vrijgekomen bacteriën zijn echter niet actief en kunnen daarom alleen gedood worden door specifieke typen antibiotica, zoals daptomycine. Omdat secreten de bacteriën zelf niet kunnen doden, mogen maden nooit gebruikt worden ter vervanging van antibiotica (wat soms wel wordt gedaan). In plaats hiervan zouden maden en antibiotica samen moeten worden gebruikt om infecties te bestrijden. Dit is ook belangrijk, omdat we ontdekten dat sommige typen antibiotica (vancomycine, daptomycine en flucloxacilline) ervoor zorgden dat biofilms van *S. aureus* juist groter werden, terwijl andere antibiotica (clindamycine en linezolid) de biofilms slechts gedeeltelijk afbraken (**Hoofdstuk 3**). In alle gevallen blijven de bacteriën aanwezig en kunnen weer uitgroeien en opnieuw een infectie veroorzaken.

Naast antibiotica kunnen bacteriën ook gedood worden in het spijsverteringskanaal van de maden en door bepaalde typen witte bloedcellen. We ontdekten dat neutrofielen (**Hoofdstuk 5**) en monocytten (**Hoofdstuk 6**) net zo effectief waren in het opruimen van bacteriën in de aanwezigheid van madensecreten als in de afwezigheid.

Bacteriën en bacteriële producten leiden tot de migratie en activatie van witte bloedcellen. In normale wonden is dit belangrijk om de infectie te bestrijden. In chronische wonden kunnen deze ontstekingsreacties echter weefselbeschadiging veroorzaken, mede doordat witte bloedcellen de biofilms niet goed kunnen bestrijden en daardoor de ontstekingsreactie ontspoord raakt. Daarom hebben we onderzocht wat het effect van maden is op deze processen. We ontdekten dat madensecreten de migratie van neutrofielen (**Hoofdstuk 5**) en monocytten (**Hoofdstuk 6**) remden. Secreten zorgden ook voor een verandering in de productie van migratiebevorderende moleculen (chemokines) door monocytten (**Hoofdstuk 6**) en macrofagen (**Hoofdstuk 7**). Dit veranderde de migratieremming echter niet.

Witte bloedcellen kunnen bacteriën doden met behulp van zuurstofafhankelijke en -onafhankelijke mechanismen. Ook al zagen we geen verandering in het aantal en de snelheid waarmee bacteriën gedood werden door de cellen, de twee mechanismen werden wel onderdrukt door de maden in neutrofielen (**Hoofdstuk 5**). Monocytten en de daaruit voortkomende macrofagen zijn ook belangrijk voor de regulatie van wondprocessen door middel van de productie van ontstekingsbevorderende en -remmende moleculen. Omdat in chronische wonden de balans tussen deze moleculen is verstoord, hebben we onderzocht wat de effecten zijn van madensecreten op de productie van bepaalde ontstekings-

bevorderende moleculen (cytokines) door de cellen. We ontdekten dat de productie van deze cytokines door gezuiverde monocyten, door cellen in volbloed en door ontstekingsbevorderende macrofagen werd geremd in de aanwezigheid van secreten (**Hoofdstuk 6 en 7**). Het uiteindelijke resultaat van het onderdrukken van celmigratie en ontstekingsreacties in chronische wonden is vermindering van weefselbeschadiging door de witte bloedcellen.

De aanwezigheid van bacteriën in de wond en de daarmee samenhangende ontstekingsreacties leiden tot beschadiging van de aanwezige bloedstolsels en het omringende gezonde weefsel. Als gevolg hiervan kunnen er geen nieuwe huid en onderliggende weefsels worden gevormd. Daarom moet het aangetaste weefsel worden verwijderd. Dit kan echter niet door het lichaam zelf worden gedaan omdat in chronische wonden het proces dat verantwoordelijk is voor de verwijdering van bloedstolsels, fibrinolyse genaamd, vaak niet goed werkt door de aanwezigheid van een overmaat aan fibrinolyseremmers ten opzichte van de activatoren. We ontdekten dat madensecreten een specifiek enzym bevatten, een serine protease, die de werkzaamheid van het fibrinolyse proces verhoogt (**Hoofdstuk 4**). De reden hiervoor is dat dit enzym een interactie aangaat met plasminogeen (een essentiële fibrinolysecomponent) waardoor de afgenomen hoeveelheden van de activatoren alsnog voldoende zouden kunnen zijn om de fibrinolyse te activeren. Madensecreten hadden geen effect op de vorming van bloedstolsels en de enzymen in madensecreten konden de gevormde bloedstolsels niet afbreken. Het is waarschijnlijk wel zo dat de secreten de aangetaste weefsels in chronische wonden kunnen afbreken.

Het bestrijden van de bacteriën, het remmen van de ontstekingsreactie en het verwijderen van aangetast weefsel door maden leiden gezamenlijk tot bevordering van het wondherstelproces. We ontdekten echter dat de secreten dit proces ook direct beïnvloeden door middel van de verhoging van de productie van groeifactoren door monocyten en ontstekingsremmende/herstelbevorderende macrofagen (**Hoofdstuk 7**). Deze groeifactoren zijn belangrijk voor de vorming van nieuwe bloedvaten en weefsels.

De resultaten in dit proefschrift laten zien dat maden verschillende effecten hebben die verstoorde processen in chronische wonden kunnen onderbreken en de balansen kunnen herstellen. Het is daarom interessant om te onderzoeken welke moleculen in de secreten van de maden verantwoordelijk zijn voor deze effecten. Zoals alle dieren produceren maden een grote variëteit aan antimicrobiële moleculen. Met behulp van verschillende technieken hebben we een aantal peptiden/eiwitten geïsoleerd uit de maden die potentieel antimicrobieel zijn. Een deel van deze moleculen, die nog nageemaakt en verder getest moeten worden, is ook aanwezig in de secreten. Verder vonden we dat de afbraak van *S. aureus* biofilms werd veroorzaakt door hittegevoelige moleculen, waarschijnlijk enzymen, terwijl hitteongevoelige moleculen leidden tot de afbraak van *P. aeruginosa* biofilms. De

actieve moleculen in de secreten die verantwoordelijk zijn voor het ontstekingsremmende effect op witte bloedcellen zijn tot nu toe onbekend. We weten echter wel hoe de actieve componenten deze cellen beïnvloeden, namelijk door verhoging van cyclisch AMP (**Hoofdstuk 5 en 6**). Dit 'boodschappermolecuul' is verantwoordelijk voor de remming van ontstekingsprocessen in de cellen.

Madensecreten breken biofilms af waardoor de bacteriën gevoelig worden voor antibiotica, het immuunsysteem en voor digestie door maden zelf. Bovendien produceren de maden enzymen die het fibrinolyseproces bevorderen en ervoor zorgen dat dood weefsel wordt opgeruimd. Verder onderdrukken maden de ontstekingsreacties van witte bloedcellen zonder dat het opruimen van bacteriën door deze cellen wordt verstoord. Ten slotte wordt de productie van groeifactoren juist bevorderd door de secreten. Al deze effecten zijn positief voor de heling van chronische wonden. De vraag die dan overblijft is waarom maden dit doen. Het antwoord op deze vraag is eigenlijk heel simpel...overleven. Zoals voor alle organismen geldt, kunnen bacteriën schadelijk of zelfs dodelijk zijn voor maden. Daarom hebben maden mechanismen ontwikkeld om de bacteriën te bestrijden. Verder leven maden van dood weefsel. Door middel van de productie van veel verschillende enzymen zijn maden in staat om dit weefsel te verteren. Verder is het niet ongewoon voor parasieten om het immuunsysteem van de gastheer te onderdrukken, aangezien ontstekingsreacties schadelijke effecten kunnen hebben. Ook al zijn maden dus eigenlijk parasieten, ze beschadigen wonden in de mens niet. Dit heeft te maken met het type maden. Medische maden produceren factoren die voornamelijk dood weefsel aantasten (saprofage maden). Het is echter wel bekend bij dieren, bijvoorbeeld schapen, dat ongecontroleerde aanwezigheid van dit type maden in wonden tot ziekte en uiteindelijk tot de dood kan leiden. Daarom moet de therapie altijd worden toegepast door goed opgeleide artsen. Uit onze resultaten blijkt dat de secreten van de maden de componenten bevatten die werkzaam zijn in de wond. Het is daarom mogelijk dat de maden uiteindelijk kunnen worden vervangen door de secreten, of zelfs beter, door actieve moleculen die geïsoleerd zijn uit de secreten. Tot slot, er is geen enkele therapie die alle chronische wonden kan genezen; ook maden niet. Maden beïnvloeden echter veel verschillende processen in wonden en dit is waarschijnlijk de reden van het succes van madetherapie.



