

Bijna 75% van alle jonge kinderen heeft minstens een keer middenoorontsteking met ophoping van vocht (effusie) in het middenoor (otitis media met effusie; OME). Dit gaat soms gepaard met een tijdelijk gehoorverlies. Meestal gaat de ontsteking vanzelf weer over, maar als de effusie aanwezig blijft krijgt ongeveer 15% van deze kinderen een chronische vorm van middenoorontsteking. Hierbij kunnen langdurige gehoorproblemen ontstaan. Tevens kan hierdoor blijvende schade aan het trommelvlies of de gehoorbeentjes optreden. Chronische OME kan zelfs doofheid tot gevolg hebben.

De twee belangrijkste factoren bij het ontstaan van middenoorontsteking zijn gram-negatieve bacteriële infectie en slecht functioneren van de buis van eustachius. Gram-negatieve bacteriën (GNB) bevatten het lipopolysaccharide endotoxine (LPS) in hun buitenste membraan. De toxische eigenschappen van endotoxine worden vertegenwoordigd door het lipide A, wat bij alle verschillende GNB identiek is.

Endotoxine is aangetoond in middenooreffusies en is tevens in staat gebleken inflammatoire reacties in het middenoor en in de buis van eustachius op te wekken. Wanneer de buis van eustachius slecht functioneert of verstopt is kan overtollig vocht niet meer uit het middenoor verwijderd worden. Dit gebeurt normaal gesproken door het mucociliaire clearance systeem (MCS), wat bestaat uit slijmcellen en cellen met ciliën. Door beweging van de ciliën kan het slijm met daarin eventueel aanwezige bacteriën of bacterie producten verwijderd worden uit het middenoor. Als door GNB-infectie en/of obstructie van de buis van eustachius het MCS ontregeld raakt blijven deze producten in het middenoor aanwezig en kunnen zo de ontstekingsreactie opnieuw induceren zodat een chronische OME ontstaat. Zo ontstaat er een vicieuze cirkel. Om deze te doorbreken was het idee om endotoxine te

neutraliseren in het middenoor zodat het MCS weer zou kunnen herstellen.

In dit proefschrift is daarom allereerst de rol van endotoxine bij het ontstaan van chronische OME onderzocht. Vervolgens is gekeken of de effecten van endotoxine op het middenoorweefsel geneutraliseerd kunnen worden met behulp van een endotoxine neutraliserend eiwit (BPI). Dit eiwit is een endogeen eiwit van 55 kDa en is gezuiverd uit granula van witte bloedcellen van konijn en mens. Het is voor het eerst beschreven als antibiotisch eiwit in 1978. BPI bindt sterk aan de verschillende endotoxine chemotypes van GNB en neutraliseert zijn activiteit. Tevens remt BPI de groei van GNB. BPI bindt aan LPS nabij het lipide A deel en vormt zo het LPS-BPI complex dat de schadelijke respons tegen het LPS blokkeert, zoals de LPS-gemedieerde stimulatie van witte bloedcellen. Tevens wordt de door LPS-gemedieerde productie van cytokines (ontstekingsmediatoren) geneutraliseerd. BPI heeft verder ook een toxische activiteit tegen GNB.

Tot op heden worden kinderen met middenoorontsteking vooral behandeld met trommelvliesbuisjes, antibiotica of met het verwijderen van de neusamandelen. Vanwege de nadelen van trommelvliesbuisjes (voortijdige uitval, verkleefing trommelvlies etc.), de groeiende resistentie van bacteriën voor antibiotica en het niet volledig kunnen verwijderen van de ontstekingshaard, is het belangrijk nieuwe therapeutische mogelijkheden voor middenoorontsteking te ontwikkelen.

In hoofdstuk 2 is onderzocht in welke hoeveelheid endotoxine aanwezig is in middenooreffusies van kinderen met middenoorontsteking. Verder is onderzocht of de endotoxine concentratie gerelateerd is met de TNF- α concentratie. TNF- α is een cytokine geproduceerd door macrofagen als reactie op een ontsteking. Voor dit experiment zijn 140 effusies van

101 kinderen verzameld en geanalyseerd. Het merendeel van deze effusies (53,6%) werd getypeerd als mucopurulent (slijmerig + bacteriën), 23,6% van deze effusies werd getypeerd als sereus (waterig), en slechts 22,8% als mucus (slijmerig). 55% van de kinderen had een chronische middenoorontsteking (langer dan 6 maanden), 18,6% tussen de 3 en 6 maanden (sub-acute), en 22,8% had acute middenoorontsteking (minder dan 3 maanden). Bij 61% van de kinderen werd tevens bovenste luchtweg infectie vastgesteld. De hoogste concentratie endotoxine werd gemeten in mucopurulente effusies (12 ± 3 ng/mg Totaal Eiwit). Ook de TNF- α concentratie was het hoogst in de mucopurulente effusies (61 ± 21 pg/mg Totaal Eiwit). Kinderen met chronische OME en bovenste luchtweg infectie hadden significant hogere endotoxine en TNF- α concentraties. Deze resultaten wijzen op een relatie tussen endotoxine en TNF- α in middenooreffusies en 1) het type effusie, 2) de duur van de voorafgaande middenoorontsteking, en 3) de aanwezigheid van bovenste luchtweg infectie. Kinderen met mucopurulente effusie hebben waarschijnlijk grote kans op ontwikkeling van chronische OME, zeker als ze ook een bovenste luchtweg infectie hebben. Hoge endotoxine concentraties in middenooreffusies zijn een indicator voor de ernst van de ziekte. Endotoxine speelt dus een belangrijke rol in de pathogenese van middenoorontsteking.

In hoofdstuk 3 is het effect van endotoxine onderzocht op humaan middenoorweefsel, gekweekt volgens de air-exposed methode. Endotoxin concentraties van 1 en 100 ng/ml zijn 2 keer per week toegevoegd aan het kweekmedium. Vervolgens zijn de histologische veranderingen kwantitatief onderzocht met behulp van licht microscopie (LM), scanning electronen microscopie (SEM) en transmissie electronen microscopie (TEM). Onder invloed van endotoxine was er na 21 dagen een toename in de proliferatie van de epitheellaag zichtbaar. Tevens was er een toename

van het aantal slijmcellen en van het aantal microvilli, welke ook in lengte waren toegenomen. Uit deze resultaten kunnen we concluderen dat endotoxine een belangrijke factor is in de verstoring van het middenoorepitheel. Deze verstoring kan verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van chronische OME. Deze kweekmethode is tevens een goed model gebleken voor verdere studies met humaan middenoorepitheel.

In hoofdstuk 4 is onderzocht of de effecten van endotoxine op humaan middenoorepitheel geneutraliseerd kunnen worden door een recombinant fragment van BPI (rBPI₂₁). Humaan middenoorepitheel werd hiertoe air-exposed gekweekt gedurende 4 weken in kweekmedium waaraan gedurende verschillende periodes endotoxin (1 ng/ml) en/of rBPI₂₁ (1 μ g/ml) was toegevoegd. Endotoxine induceerde een toename in de proliferatie van de epitheellaag en een toename van het aantal slijmcellen. Wanneer eerst endotoxine en daarna rBPI₂₁ werd toegevoegd aan het medium was er geen verdikking van de epitheellaag, maar het aantal slijmcellen was nog steeds toegenomen. Ook was er onder invloed van rBPI₂₁ een toename van het aantal ciliën, maar deze waren niet afwijkend. Wanneer endotoxine gelijktijdig met rBPI₂₁ werd toegediend was er alleen nog een toename van het aantal cellen met ciliën. Het lijkt erop dat rBPI₂₁ in staat is de veranderingen in het middenoorepitheel door endotoxin te remmen.

In hoofdstuk 5 zijn de effecten van endotoxine en obstructie van de buis van eustachius (ETO) bij ratten onderzocht. Hiertoe is met behulp van LM en SEM na 1, 2, 4 en 12 weken de histologie van het middenoor bekeken. Vergeleken met een onbehandeld middenoor bleek dat de epitheellaag door endotoxine (5 μ g/or) of door ETO veranderd was naar meerlagig, cubisch of cilindrisch epitheel met een toename van het aantal slijmcellen per strekkende oppervlakte eenheid. Eerst werd een toename van het aantal cellen met ciliën gezien, maar na 12 weken was er een

duidelijke afname van deze cellen. Een combinatie van ETO en endotoxine injectie induceerde dezelfde veranderingen behalve dat er een directe afname van het aantal cellen met ciliën werd waargenomen. Tevens was er een toename van het aantal ontstekingscellen (macrofagen, lymfocyten en neutrofielen) die in de subepitheliale laag aanwezig waren. Deze veranderingen resulteerden in een beschadiging van het MCS. Hieruit blijkt dat een combinatie van endotoxine injectie en ETO in staat is om OME bij ratten te induceren. Zowel endotoxine als ETO spelen dus een belangrijke rol bij het ontstaan van langdurige veranderingen in het middenoorepithel waardoor de middenoorontsteking voortduurt.

In hoofdstuk 6 is onderzocht in hoeverre rBPI₂₁ in staat is om de bij de rat geïnduceerde effecten van endotoxine en ETO te voorkomen. Hiertoe werd rBPI₂₁ twee dagen na inductie van middenoorontsteking rechtstreeks in het middenoor toegediend. De histologie werd bestudeerd na 1, 2, 4 en 12 weken. Het bleek dat toediening van rBPI₂₁ het verlies van ciliën kon voorkomen. Tevens werd door rBPI₂₁ de significante toename van het aantal slijmcellen voorkomen. Uit deze resultaten blijkt dus dat rBPI₂₁ in staat is om het middenoorepithel te beschermen tegen verstoringen van het MCS, en wellicht een therapie kan zijn ter preventie van chronische OME.

In hoofdstuk 7, tenslotte, is gekeken of rBPI₂₁ ook in staat is om geïnduceerde effecten van endotoxine en ETO te herstellen. Hiertoe is rBPI₂₁ twee weken na de inductie van middenoorontsteking bij ratten rechtstreeks in het middenoor toegediend. Histologie werd vervolgens na 4 en 12 weken bestudeerd. Het bleek dat rBPI₂₁ in staat was om het verlies van ciliën en de toename van het aantal slijmcellen te herstellen. Na 12 weken was er slechts een lichte toename van het aantal macrofagen in de subepitheliale laag. Uit de resultaten blijkt dat de geïnduceerde veranderingen in het MCS hersteld kunnen worden door

rBPI₂₁ behandeling. rBPI₂₁ kan wellicht een belangrijke rol gaan spelen bij de behandeling van middenoorontsteking en andere ontstekingen van de (bonveste) luchtwegen.

Samengevat heeft dit onderzoek aangetoond dat endotoxine een belangrijke rol speelt bij het ontstaan van middenoorontsteking en tevens bij de continuering van de ontstekingsreactie. Het blijkt vooral in combinatie met obstructie van de buis van eustachius in staat om langdurige verstoring van het mucociliaire clearance systeem te veroorzaken waardoor ontstekingsmediatoren en bacterie producten in het middenoor aanwezig kunnen blijven en de ontstekingsreactie kunnen blijven activeren. Het endotoxine neutraliserende eiwit BPI is in staat gebleken om histologische veranderingen, zowel in het kweekmodel als in het rattenmodel voor OME, te voorkomen en zelfs te herstellen. Dit kan betekenen dat behandeling met rBPI₂₁ in de toekomst een nieuwe therapie voor middenoorontsteking zal zijn.