

Endotoxine detoxificatie bij sepsis: hoe goed zijn nu de experimentele methoden en middelen voor een reductie in letaliteit

Een review artikel over de meest veelbelovende methoden en middelen

Datum: 28 september 2018
Auteur: R.M. Vriend
Studentnummer: S2836815
Opleiding: Bachelor Farmacie, Rijksuniversiteit Groningen
Basiseenheid: Farmacokinetiek, Toxicologie en Targeting (FTT)
Begeleider: Dr. L. Beljaars
Eerste beoordelaar: Dr. L. Beljaars
Tweede beoordelaar: Prof. Dr. K. Poelstra

Samenvatting

Endotoxine, een lipopolysaccharide (LPS), vormt een deel van de celwand van gramnegatieve bacteriën. Het komt van nature voor in het menselijk lichaam, voornamelijk in de darm. Wanneer LPS de circulatie betreedt kunnen echter levensbedreigende inflammatoire reacties ontstaan door activatie van het immuunsysteem. Deze systemische inflammatoire respons wordt sepsis genoemd. Sepsis is een serieus ziektebeeld waarin symptomen als hypotensie, hypoperfusie, weefselschade en meervoudig orgaanfalen zich manifesteren. Ondanks de hoge letaliteit van sepsis, is een effectieve therapie nog niet gevonden. In deze scriptie wordt daarom een selectie van veelbelovende experimentele methoden en middelen van endotoxine detoxificatie voor een reductie van de letaliteit bij sepsis gepresenteerd.

De methoden en middelen van endotoxine detoxificatie zijn uitgewerkt in verschillende categorieën. De endotoxine complexerende middelen detoxificeren het endotoxine door middel van binding en complexvorming in het bloed. In deze categorie vallen het lama antilichaam fragment VHH 5G, het endotoxine neutraliserend eiwit, het synthetische peptide BNEP, de lipopolyamine DOSPER, triglyceride rijke lipoproteïnen en macrofaag-achtige nanopartikels. De tweede categorie bestaat uit de enzymatische deactivatie van endotoxine. Het enzym alkalische fosfatase valt hieronder en detoxificeert door middel van defosforylatie van het LPS. De derde categorie die wordt besproken bestaat uit de hemoperfusie methoden, die endotoxine verwijderen uit het bloed door binding en complexvorming in de dialysator. Hieronder vallen de polymyxine B geïmmobiliseerde vezelkolom hemoperfusie (Toraymyxine) en de sialzuur geïmmobiliseerde polysulfon dialysator.

De conclusie van dit literatuuronderzoek is dat de meest veelbelovende therapie uit de endotoxine complexerende middelen die met de macrofaag-achtige nanopartikels is. Deze methode heeft de meeste voordelen en is het recentst onderzocht. Verder is therapie met alkalische fosfatase ook een goede kandidaat, maar kent dit eiwit waarschijnlijk stabiliteitsproblemen doordat het onderhevig is aan modificatie- en degradatieprocessen. De hemoperfusie met sialzuur is in vitro veelbelovend ten opzichte van die met polymyxine (Toraymyxine), maar nog niet bewezen effectief in vivo. Voorlopig zal de therapie van sepsis daarom ondersteunend blijven door toediening van vocht, vasopressors en breed spectrum antibiotica. De methoden en middelen in deze scriptie bieden echter wel hoop op een effectievere behandeling van sepsis in de toekomst en om de letaliteit bij dit ziektebeeld te reduceren.

Inhoud

1.	Inleiding	3
2.	Experimentele methoden en middelen van endotoxine detoxificatie	5
2.1	Endotoxine complexerende middelen	5
2.1.I	Lama enkele keten antilichaam fragment: VHH 5G	5
2.1.II	Endotoxine neutraliserend eiwit (anti-lipopolysaccharide factor).....	6
2.1.III	Lipopolyamines: DOSPER.....	7
2.1.IV	Synthetisch peptide BPI: BNEP.....	8
2.1.V	Triglyceride rijke lipoproteïnen	9
2.1.VI	Macrofaag-achtige nanopartikels	10
2.2	Enzymatische deactivatie van endotoxine	12
2.2.I	Alkalische fosfatase	12
2.3	Hemoperfusie methoden	13
2.3.I	Polymyxine B geïmmobiliseerde vezel kolom hemoperfusie (Toraymyxine)	13
2.3.II	Siaalzuur geïmmobiliseerde polysulfon dialysator	14
3.	Vergelijkende discussie en conclusie	15
4.	Literatuurlijst	18

1. Inleiding

Endotoxine bevindt zich in de celwand van gramnegatieve bacteriën en is een negatief geladen lipopolysaccharide (LPS) (1). Het bevat een toxische eenheid, lipide A, welke twee fosfaatgroepen bevat die essentieel zijn voor zijn biologische werking (2). Wanneer bacteriën groeien of wanneer het complementsysteem van de gastheer of antibiotica de bacterie verwoesten komt LPS vrij (3). Het LPS kan vervolgens binden aan de CD14 receptor op macrofagen. Dit zorgt voor een verandering in de activiteit van de immuuncel, zoals de inductie van stikstofmonoxide (NO) productie (4). Het bacteriële LPS kan ook binden aan de Toll-Like Receptor 4 (TLR4) die zich op verschillende immuuncellen van de gastheer bevindt, zoals op macrofagen. Na binding van LPS aan TLR4 wordt intracellulair NF- κ B geactiveerd wat leidt tot verhoogde transcriptie van de pro-inflammatoire cytokinen TNF- α , IL-6 en IL-1 (5). Het toxische endotoxine kan op deze manier inflammatoire reacties veroorzaken in mensen. Wanneer endotoxine de systemische circulatie betreedt kan deze systemische inflammatie en sepsis induceren. (3)

Sepsis is een systemische inflammatoire respons als reactie op weefselschade of een ernstige infectie. Het gaat gepaard met ongebalanceerde en hoge levels van pro-inflammatoire mediators wat leidt tot endotheel activatie en activatie van immuuncellen zoals macrofagen. Deze activatie zorgt voor symptomen als veranderingen in het hartritme, verhoging van de vasculaire permeabiliteit, verandering van de metabole balans en coagulatie in alle vaten wat leidt tot capillaire stolsels. Dit kan op zijn beurt leiden tot meervoudig orgaanfalen, hypotensie, weefselschade, hypoperfusie en uiteindelijk de dood. (5) Sepsis is verantwoordelijk voor ten minste een derde van alle sterfte in het ziekenhuis (6). Statistieken uit 2001 laten zien dat meer dan 750.000 patiënten jaarlijks te maken krijgen met sepsis, waarvan 210.000 overlijden. Verder laten voorspellingen een stijging zien tot 1.110.000 jaarlijkse gevallen van sepsis in 2020 (5).

Sepsis is dus een serieus ziektebeeld waar jaarlijks veel mensen aan overlijden. Effectieve behandelingen voor sepsis ontbreken momenteel echter nog in de kliniek (4). Al meer dan 40 klinische trials van middelen die pathogeenherkenning, inflammatoire signaaltransductieroutes of cytokines blokkeren hebben universeel gefaald (6). Zo zijn bijvoorbeeld teleurstellende resultaten verkregen in grootschalige gerandomiseerde klinische trials van immunomodulators als glucocorticosteroïden, ibuprofen, monoklonale anti-tumor necrosis factor (TNF) antilichamen en de interleukine- of bradykinine receptor 1 (7). De huidige behandeling van sepsis is daarom vooral ondersteunend en bestaat uit vochttoediening, toediening van vasopressors, onmiddellijke toediening van breed spectrum antibiotica en het verwijderen van de focus van infectie (8).

De enige methode die al langer wordt getest en effectief en veilig blijkt te zijn bij de behandeling van gramnegatieve sepsis is Toraymyxine. Dit is een bloed endotoxine verwijderingscassette welke sinds 1994 bij ernstige sepsis patiënten in Japan wordt toegepast. Het maakt gebruik van polymyxine B als adsorbens (9). In 1998 ontving Toraymyxine een productcertificatie voor gebruik in Europa, en is geclassificeerd als een klasse IIb medisch apparaat. In verschillende Europese landen, waaronder in Nederland, wordt Toraymyxine echter alleen nog gebruikt in klinische trials (10). Studies naar de mechanismen van Toraymyxine in de verbetering van hemodynamische en respiratoire dysfunctie en naar de effectiviteit bij sepsis zijn namelijk nog nodig om deze hemoperfusie methode als de echte behandeling voor sepsis en septische shock vast te stellen (9).

Op Toraymyxine na zijn er dus nog weinig middelen of methoden op de markt om bij gramnegatieve sepsis de toxische endotoxine levels direct aan te pakken. Het is echter van groot belang dat er effectieve therapieën beschikbaar komen voor dit, vaak letale, ziektebeeld. Endotoxine is een geschikt aangrijpingspunt omdat dit lipopolysaccharide veelal de oorzaak is voor sepsis, zoals eerder genoemd. Er wordt dan ook veel onderzoek gedaan naar endotoxine detoxificatie. De huidige scriptie behandelt daarom een selectie van de meest veelbelovende methoden en middelen van endotoxine

detoxificatie, die op dit moment experimenteel worden onderzocht, om letaliteit van sepsis in de toekomst te reduceren. Hiernaast zal de recente ontwikkeling in Toraymyxine, de polymyxine B geïmmobiliseerde hemoperfusie, worden besproken en worden vergeleken met de experimentele methoden en middelen van endotoxine detoxificatie.

2. Experimentele methoden en middelen van endotoxine detoxificatie

Er zijn verschillende methoden en middelen van endotoxine detoxificatie in de literatuur te vinden die experimenteel zijn onderzocht op toepassing bij sepsis. Deze methoden zijn in te delen in verschillende categorieën. Er zijn de endotoxine complexerende middelen welke in het algemeen endotoxine detoxificeren door binding aan deze stof. De tweede categorie bestaat uit methoden met enzymatische activiteit om endotoxine te detoxificeren. Als laatste kan endotoxine uit het bloed van de patiënt worden gefilterd door hemoperfusie. Hierbij wordt het bloed extern gefilterd via een apparaat met endotoxine adsorberende deeltjes.

2.1 Endotoxine complexerende middelen

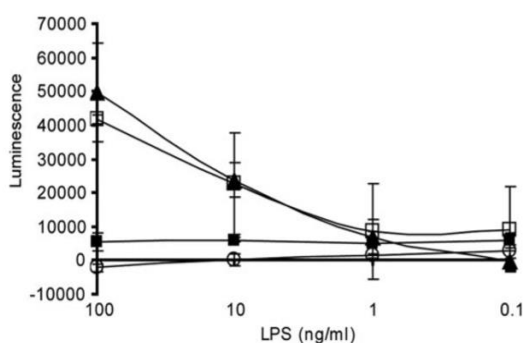
2.1.1 Lama enkele keten antilichaam fragment: VHH 5G

In een studie uit 2006 is het lama enkele keten antilichaam fragment VHH 5G, gericht op het LPS van de bacterie *N. Meningitidis*, geselecteerd uit een VHH faag bibliotheek. Het antilichaam fragment herkent en bindt direct aan een epitoom in de lipide A- en KDO regio (2-keto-3-deoxyoctulosonzuur) van het LPS molecuul, en voorkomt zo binding van LPS met effectorcellen (11).

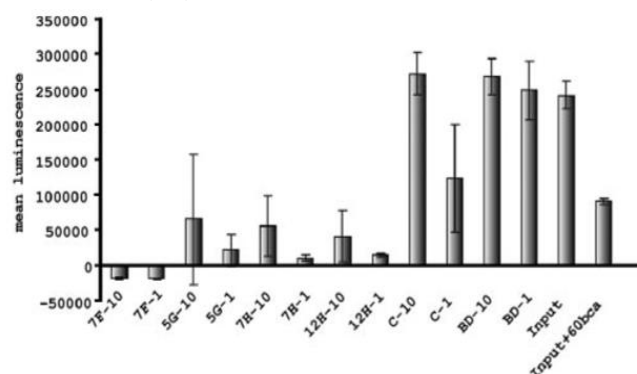
VHH 5G is specifiek geselecteerd in deze studie omdat het niet alleen specificiteit heeft voor het LPS van *N. Meningitidis*, maar ook cross-reactiviteit vertoont met het LPS van andere gramnegatieve bacteriën. Hiernaast heeft het een grote LPS bindingscapaciteit (11).

Humane perifere mononucleaire bloedcellen (PMBC's) bevatten hoog-affiene CD-14 receptoren waar LPS aan bindt. Een bewijs voor effectiviteit van VHH 5G is dat het antilichaam fragment in staat is om deze binding van LPS aan PMBC's effectief te blokkeren. De inhibitie van deze binding zorgt vervolgens voor een blokkering van de oxidatieve respons van de PMBC's op LPS (11).

Dit is bewezen door een grote oxidatieve respons uit te lokken in bloed door N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) te injecteren na priming met L3 LPS van *N. Meningitidis*, in aan- en afwezigheid van VHH 5G. In figuur 1 zijn de resultaten weergegeven. De blokkerende activiteit van VHH 5G met betrekking tot een oxidatieve respons was bijna gelijk aan die van anti-CD14 MAb 60bca, een stof die de bindingsplek van LPS op effectorcellen blokkeert. VHH 5G blokkeert dus effectief de in vitro respons van targetcellen op LPS in het gehele bloed (11).



Figuur 1: Inhibitie oxidatieve respons door VHH 5G in *N. Meningitidis* L3 LPS bevattende oplossingen. De oxidatieve respons is in luminescentie op de y-as weergegeven. Tienvoudige verdunningen van bloed werden geïncubeerd met LPS (open vierkanten), met LPS na voorincubatie met VHH 5G (gesloten vierkanten), met LPS na voorincubatie met het irrelevante antilichaam VHH C (gesloten driehoeken) of met LPS na voorincubatie met de inhibitor anti-CD14 MAb 60bca (open cirkels). De VHH's hadden een concentratie van 100 µg/ml en de inhibitor een concentratie van 1 µg/ml (11).



Figuur 2: Detoxificatie van L3 LPS van *N. Meningitidis* van een waterige oplossing door verschillende VHH's, waaronder VHH 5G. De grafiek geeft de luminescentie weer van de input (LPS oplossing van 2 µ/ml) en de luminescentie na incubatie met de verschillende aangegeven VHH's. Bij een 1 achter de VHH naam is eenzelfde volume onbehandelde als geïncubeerde oplossing gebruikt. Een 10 geeft weer dat tien keer zoveel onbehandelde oplossing is gebruikt. C geeft de irrelevante VHH C aan en BD lege Talon Beads, welke allebei zijn gebruikt als controle. 60bca geeft de inhibitie van de luminescentie door de inhibitor anti-CD14 MAb 60bca aan (11).

Figuur 2 demonstreert dat VHH 5G in staat is om het L3 LPS van *N. Meningitidis* van waterige oplossingen te detoxificeren. De luminescentie (oxidatieve respons) geproduceerd door een LPS oplossing voor (input) en na incubatie met verschillende anti-VHH's is weergegeven (11). De gemiddelde luminescentie werd 90% gereduceerd bij gelijkwaardige volumes van de geïncubeerde en onbehandelde oplossing. Wanneer tien keer meer onbehandelde oplossing werd gebruikt was de reductie in gemiddelde luminescentie nog steeds hoog, namelijk rond de 70%. VHH 5G kan dus gebruikt worden om LPS concentraties te reduceren in verschillende oplossingen, waaronder plasma (11). Een tweede in vitro bewijs voor zijn mogelijke effectiviteit bij sepsis.

Voordelen en beperkingen van de studie en de mogelijke therapie

Het antilichaam fragment VHH 5G kan goedkoop geproduceerd worden door micro-organismen. Dit maakt mogelijk toekomstige therapie van sepsis met VHH 5G betaalbaar. Verder was het antilichaam nog bruikbaar na een denaturatie-renaturatie cyclus. Op deze manier kunnen oplossingen van VHH 5G eerst gedecontamineerd worden, voordat zij bijvoorbeeld intraveneus worden toegediend (11). Hiernaast vertoont VHH 5G cross-reactiviteit met LPS van verschillende gramnegatieve bacteriën. Door deze brede specificiteit zou VHH 5G toegepast kunnen worden bij een brede groep patiënten, die door verschillende bacteriën ziek zijn geworden (11).

Een nadeel van therapie met VHH 5G is dat het een antilichaam fragment is, toepassing in landen als Afrika zal daarom lastig zijn. Hier is geen koeling aanwezig wat het transport lastig maakt.

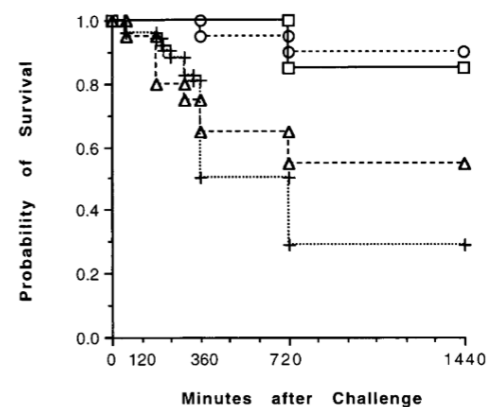
Een nadeel van deze studie is dat de 'phage display' methode is gebruikt voor het selecteren van een speciaal domein van een antigeen. Deze methode is in *E. Coli* bacteriën niet de beste manier om te screenen voor VHH's tegen LPS. De anti-LPS VHH's kunnen namelijk interactie aangaan met de endogene LPS van *E. Coli*, waardoor de gastheer in groei wordt geremd en interessante anti-LPS VHH's verloren gaan (11).

2.1.II Endotoxine neutraliserend eiwit (anti-lipopolysaccharide factor)

In 1993 is een onderzoek gepubliceerd over het effect van het endotoxine neutraliserend eiwit (ENP) op de LPS toxiciteit in vitro en in vivo. Het ENP is een recombinante vorm van de geïsoleerde anti-lipopolysaccharide factor van de Amerikaanse hoefijzerkrab *Limulus Polyphemus*. Het ENP bindt het LPS en zorgt zo voor neutralisatie omdat het LPS niet meer aan immuuncellen kan binden (12).

Resultaten uit het in vitro onderzoek van de studie uit 1993 tonen aan dat ENP het LPS in vitro detoxificeert. Aorta ringen van de rat werden 16 uur lang met *E. Coli* LPS/ENP (1:5) of met *E. Coli* LPS geïncubeerd. Alleen de aorta ringen die vooraf met LPS/ENP geïncubeerd waren lieten een normale contractie zien als reactie op noradrenaline. Vasculair weefsel wordt dus beschermd door ENP tegen LPS. Dit is van belang omdat een verstoorde vasculaire functie vaak een van de redenen is voor letaliteit bij LPS shock (12).

ENP detoxificeert LPS ook in vivo. *E. Coli* LPS/albumine (1:1) en *E. Coli* LPS/ENP (1:1) mengsels werden geïncubeerd en vervolgens werd een letale dosis intraveneus geïnjecteerd in ratten. Acht uren na de injectie vertoonde de groep ratten die LPS/ENP geïnjecteerd had gekregen significant minder fysische signalen van acute LPS toxiciteit, vergeleken met de LPS/albumine groep. Verder zorgde ENP ook voor een reductie van LPS geïnduceerd gewichtsverlies en LPS geïnduceerde letaliteit. Na 48 uur was er namelijk 100% overleving van ratten in de LPS/ENP groep, vergeleken met 50% overleving in de LPS/albumine groep (12).



Figuur 3: 24 uren overlevingskans voor alle groepen konijnen na een LD₈₀ *E. Coli* endotoxine injectie. De overleving is weergegeven voor de verschillende groepen: 5 mg/kg ENP toediening 30 minuten voor LPS (90%, cirkels), 2,5 mg/kg ENP toediening 5 minuten voor LPS (85%, vierkanten), 5 mg/kg ENP toediening 30 minuten na LPS (55%, driehoeken) of de controles (29%, plus tekens). N=20 per groep, N=56 in de controlegroep (13).

Een andere studie uit 1994 bevestigt dat het ENP voor een verhoogde overleving zorgt. Bij een injectie van *E. Coli* LPS die 80% mortaliteit veroorzaakt (LD₈₀) in konijnen, was de overleving zowel voor als 30 minuten na injectie van LPS hoger vergeleken met de controles (zie figuur 3) (13).

In een latere studie uit 1996 is bewezen dat ENP ook de LPS-gestimuleerde synthese van IL-1 β , IL-6 en TNF- α door PMBC's inhibeert. Dit heeft een inhibitie van de sepsis cascade tot gevolg (14).

Voordelen en beperkingen van de studies en mogelijke therapie

Een nadeel van de studie uit 1993 is dat 8 aorta ringen per groep zijn gebruikt tijdens het in vitro experiment, en 10 ratten per groep tijdens het in vivo experiment. De experimenten zijn dus niet grootschalig uitgevoerd wat de resultaten minder betrouwbaar maakt. De studie uit 1996 gebruikte 20 konijnen per groep en 56 konijnen in de controlegroep en is dus betrouwbaarder.

Een nadeel van het ENP, wanneer dit gebruikt zou worden als therapie, is dat het multifocale gebieden van peracute hepatocellulaire necrose veroorzaakt wanneer het wordt geïnjecteerd. ENP zou dus hepatotoxisch kunnen zijn, en daarom is verder onderzoek nodig (12). Verder is ENP een eiwit, welke vaak onderhevig zijn aan degradatie- en modificatieprocessen zoals denaturatie en acetylatie. Wel laat het ENP effectiviteit zien in konijnen én ratten, wat een effectieve werking in de mens waarschijnlijker maakt.

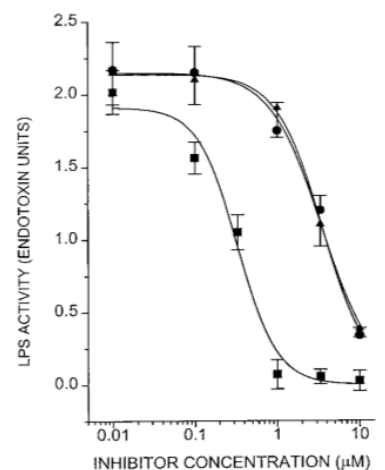
2.1.III Lipopolyamines: DOSPER

In een studie uit 1999 is het in vitro en in vivo effect van de lipopolyamine DOSPER op LPS toxiciteit gekarakteriseerd. DOSPER (1,3-di-oleoyloxy-2-(6-carboxyspermyl)-propylamide) gaat een interactie aan met de lipide A regio van het LPS molecuul en bindt op deze manier het LPS. De ontstane LPS-DOSPER complexen zijn biologisch inactief. DOSPER wordt nu gebruikt als een DNA transfectiemiddel, maar misschien is een rol als therapeuticum bij sepsis in de toekomst mogelijk (15).

Bewijs voor effectiviteit van DOSPER is dat het concentratie-afhankelijk de LPS geïnduceerde activatie van de *Limulus* stollingscascade (LAL respons, zie figuur 4) in vitro inhibeert, en dus de biologische activiteit van het LPS molecuul inhibeert. Deze inhibitie is voor DOSPER tien keer zo laag als voor polymyxine B, een hoog affiene binder van LPS (15).

DOSPER inhibeert in vitro ook nitriet, TNF- α en IL-6 productie in LPS-gestimuleerde J774.A1 cellen (macrofaagcellijn van muizen). De inhibitie van de cytokinen TNF- α en IL-6 gaan gepaard met verminderde steady-state levels van TNF- α mRNA en IL-6 mRNA. DOSPER inhibeert hiernaast de nucleaire translocatie van NF- κ B. De lipopolyamine bindt dus het LPS en zorgt vervolgens voor een blokkering van de downstream signalen en cellulaire activatie die normaalgesproken leiden tot de productie van pro-inflammatoire mediators (15).

Een ander bewijs voor effectiviteit van DOSPER is dat het in vivo bescherming geeft tegen LPS geïnduceerde letaliteit. Dit is het geval wanneer een mengsel van LPS en DOSPER in muizen wordt geïnjecteerd, maar ook wanneer DOSPER 15 minuten voor injectie van LPS wordt geïnjecteerd (zie tabel 1). Dit resultaat toont aan dat DOSPER ook in staat is om complexen te vormen met het circulerende LPS, en op deze manier het LPS te neutraliseren. DOSPER werkt echter wel minder goed als het LPS al even in de bloedbaan aanwezig is, zoals



Figuur 4: Inhibitie van de LPS-geïnduceerde chromogene LAL respons (y-as) door de lipopolyamines DOSPER (gesloten cirkels), DOGS (gesloten driehoeken) en het peptide antibioticum polymyxine B (gesloten vierkanten) (15).

Tabel 1: Effect van de tijd van lipopolyamine toediening (DOSPER) op LPS geïnduceerde letaliteit in een D-galactosamine gevoelig gemaakt muismodel (N=12 per groep) (15).

Group ^a	Time of lipopolyamine administration ^b	No. of dead mice/total no. of mice tested
DOSPER		
1	Control	11/12
2	-1 h	10/12
3	-15 min	3/12 ^c
4	0 h	1/12 ^c
5	+1 h	7/11
6	+2 h	7/12
7	+4 h	7/12

bij de meeste patiënten met sepsis. Hiernaast werkt DOSPER minder goed wanneer het een uur voor toediening van LPS wordt toegediend. Dit is te wijten aan de snelle klaring van DOSPER, optimalisatie van deze verbinding is in dat opzicht dus nodig (15).

Een andere studie uit 2001 bevestigt de eigenschap van DOSPER om endotoxine- en IL-6 levels in het bloed significant te verlagen. Resultaten uit deze studie laten echter ook zien dat DOSPER geen significant effect heeft op een bacteriëmie, dus op gehele bacteriën in de bloedbaan. DOSPER heeft alleen effect in combinatie met antibiotica. Endotoxine blokkade door binding aan DOSPER is dus niet voldoende om een invasieve gramnegatieve bacteriële infectie te voorkomen (16).

Voordelen en beperkingen van de studies en mogelijke therapie

In de in vitro studie uit 1999 is LPS van *E. Coli* gebruikt en voor de in vivo studies is LPS van *S. Abortus Equi* gebruikt. DOSPER heeft effect op LPS van beide bacteriën, wat een brede specificiteit aangeeft. Een ander voordeel van DOSPER is dat het tot wel 4 uur na injectie van LPS partiële bescherming geeft. Dit is gunstig omdat men in de praktijk sepsis constateert als het LPS zich al in de circulatie bevindt. Verder laat DOSPER geen toxiciteit zien bij J774.A1 cellen en laat het geen hemolytische activiteit tegen humane erythrocyten zien. Het is een niet-toxische verbinding wat gunstig is wanneer het gebruikt gaat worden als geneesmiddel. Een ander voordeel van lipopolyamines in therapie bij sepsis is dat zij makkelijk te synthetiseren zijn. Complexen van DOSPER en LPS zijn hiernaast voldoende stabiel in de aanwezigheid van serum, zowel in vitro als in vivo. Dit is van belang om de LPS toxiciteit significant te remmen. (15).

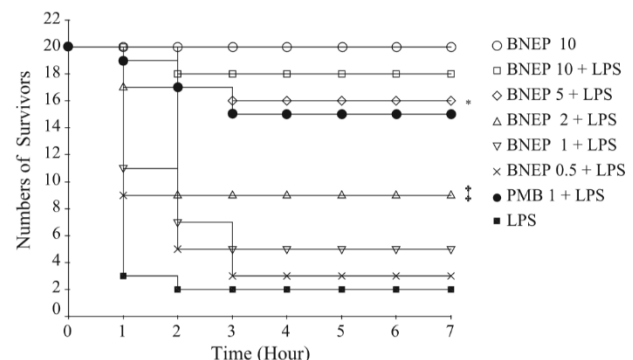
Een nadeel van DOSPER als mogelijke therapie voor sepsis is zijn snelle eliminatie uit het bloed, zoals eerder genoemd (15). Om deze reden heeft het waarschijnlijk geen langdurig werking en is optimalisatie vereist.

2.1.IV Synthetisch peptide BPI: BNEP

De auteurs van een artikel uit 1991 concluderen uit hun onderzoek dat het N terminale deel van het bactericide/permeabiliteit verhogende eiwit (BPI) determinanten bevat om LPS te herkennen en te binden (17). Andere onderzoekers hebben verschillende peptiden van deze N terminus van BPI gesynthetiseerd en getest. In een artikel uit 2004 beschrijven zij de anti-endotoxine activiteit van een van deze peptiden, BNEP, in vitro en in vivo (18).

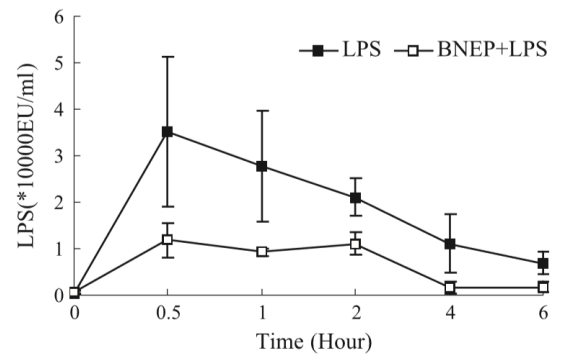
Resultaten van een affiniteitssensorassay demonstreren dat BNEP het LPS en lipide A van *E. Coli* O55:B5 en *Salmonella Re 595* bindt met eenzelfde affiniteit en capaciteit als polymyxine B (PMB), een hoog affiene binder van het LPS. Alleen de bindingsaffiniteit van BNEP voor lipide A was iets lager dan die van PMB. Hiernaast leidt binding van BNEP en PMB in vitro tot neutralisatie van het LPS op een dosisafhankelijke manier. Bij lagere concentraties LPS inhibeert PMB het LPS sterker dan BNEP (18).

BNEP is in vivo ook bewezen effectief. Muizen werden geïnjecteerd met verschillende concentraties BNEP voorafgaand aan een letale injectie van LPS. De resultaten laten zien dat BNEP op een dosisafhankelijke manier de muizen significant beschermde tegen LPS geïnduceerde letaliteit (zie figuur 5). Bij een hogere dosis BNEP was de bescherming zelfs sterker dan bij de positieve controle polymyxine B (PMB) (18).



Figuur 5: De overleving van muizen (N=20 per groep) na toediening van verschillende concentraties BNEP (aangegeven in mg/kg), PMB (Polymyxine B, positieve controle) en 20 mg/kg LPS. Het experiment is in triplo uitgevoerd (18).

In een ander in vivo experiment zijn de serum TNF- α en IL-6 levels in een endotoxine model in ratten getest. Voorbehandeling met 5 en 10 mg/kg BNEP reduceerde de TNF- α en IL-6 pieklevels op een dosisafhankelijke manier in de ratten. Deze lagere cytokinelevels gingen gepaard met een verlaagd endotoxine level. BNEP reduceerde het endotoxine level significant, al na een half uur na toediening van LPS (zie figuur 6). Het effect van BNEP was waar te nemen tot zes uur na de LPS injectie (18).



Figuur 6: De reductie van plasma endotoxine levels in ratten (N=4 per groep) door BNEP. Het experiment is in triplo uitgevoerd (18).

De resultaten uit figuur 5 en 6 zijn bewijs voor de in vivo effectiviteit van BNEP tegen LPS, mits het voor of tegelijkertijd met LPS wordt toegediend.

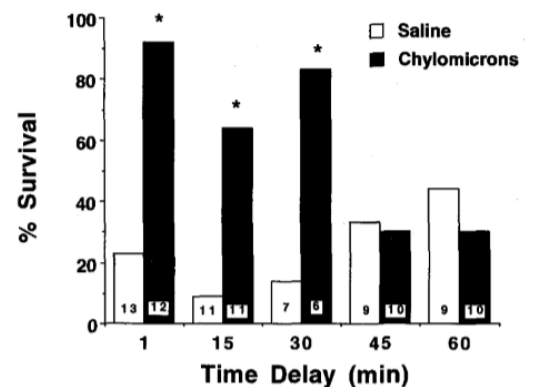
Voordelen en beperkingen van de studie en mogelijke therapie

Een voordeel van de uitgevoerde in vitro en in vivo studies in het onderzoek uit 2004 is dat alle experimenten in triplo zijn uitgevoerd (18). Dit verhoogt de betrouwbaarheid van de resultaten. Een voordeel van BNEP is dat het geen bijwerkingen laat zien wanneer een hogere dosis dan 10 mg/kg in muizen wordt gebruikt (18). Dit is een belangrijke eigenschap wanneer het eventueel in de toekomst als therapeutisch middel wordt toegepast. Een nadeel van BNEP is dat het een peptide is. Eiwitten en peptiden zijn niet zo stabiel in formuleringen.

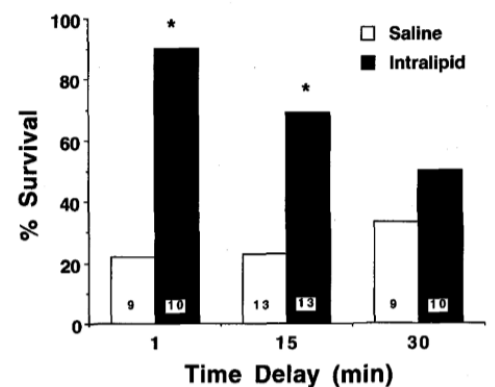
2.1.V Triglyceride rijke lipoproteïnen

Er zijn meerdere studies gedaan naar de effecten van triglyceride rijke lipoproteïnen op het endotoxine. In vitro studies hebben laten zien dat lipoproteïnen het bacteriële endotoxine kunnen binden en zijn activiteit kunnen inhiberen (19). Een studie uit 1990 demonstreerde al dat dieren beschermd konden worden tegen sterfte bij een letale injectie van endotoxine, als lipoproteïnen gelijktijdig werden geïnjecteerd (20). Twee latere studies uit 1995 hebben de effecten van lipoproteïnen op toepassing bij sepsis verder onderzocht.

Een van deze studies bepaalde of triglyceride-rijke lipoproteïnen de toxiciteit van circulerend endotoxine in vivo konden limiteren. Nu werden de triglyceride rijke lipoproteïnen dus later ingespoten in plaats van gelijktijdig met endotoxine, zoals uitgevoerd in het onderzoek uit 1990. De overleving van ratten werd gemeten na een toegediende letale dosis van endotoxine gevolgd door een infusie van fysiologische zoutoplossing of mesenterisch ratten lymfe met chylomicronen op verschillende tijdstippen na LPS toediening (zie figuur 7). Dit experiment werd herhaald, maar dan werd de synthetische triglyceride rijke lipide emulsie 'Intralipid' in plaats van de chylomicronen gebruikt (zie figuur 8). Chylomicronen en Intralipid deeltjes bevatten namelijk allebei veel triglyceriden en hebben dezelfde grootte. Wanneer Intralipid hetzelfde resultaat geeft, is bewezen dat dit resultaat afkomstig is van chylomicronen en niet van andere substanties in het rattenlymfe (21).

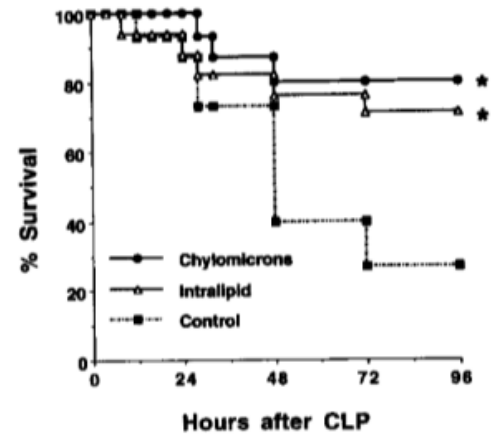


Figuur 7: De overleving van ratten bij behandeling met chylomicronen of fysiologische zoutoplossing op verschillende tijdstippen na een letale injectie van endotoxine. Het nummer in elke staaf representeert het aantal ratten in elke groep (21).



Figuur 8: De overleving van ratten bij behandeling met Intralipid of fysiologische zoutoplossing op verschillende tijdstippen na een letale injectie van endotoxine. Het nummer in elke staaf representeert het aantal ratten in elke groep (21).

De overleving van ratten verbeterde significant bij de toediening van chylomicronen en Intralipid tot 15 minuten na toediening van LPS. Voorbehandeling met de triglyceride rijke lipide emulsie of chylomicronen is dus niet noodzakelijk om een protectief effect te verkrijgen, de triglyceride rijke lipoproteïnen neutraliseren de toxische effecten van endotoxine in de circulatie. Toediening moet echter niet later plaatsvinden dan 30 minuten na LPS injectie, dan is er geen effect waar te nemen (21). De infusie van chylomicronen zorgt bij ratten ook voor een versnelde klaring van endotoxine uit het bloed en een verhoogde opname van endotoxine door de lever (21).



Figuur 9: De overleving van ratten na CLP bij infusies van chylomicronen (N=15), Intralipid (N=17) of fysiologische zoutoplossing (N=15) elke 4 uur gedurende 28 uur (22).

De andere studie uit 1995 demonstreerde dat lipoproteïnen de overleving bij polymicrobiële gramnegatieve sepsis kunnen verbeteren. Dit is onderzocht in ratten die tegelijkertijd met een cecale ligatie en punctie (CLP), om polymicrobiële sepsis te induceren, triglyceride rijke lipoproteïnen toegediend hebben gekregen. De overleving 96 uur na CLP was significant verbeterd in ratten die chylomicronen (80%) of Intralipid (71%) toegediend hadden gekregen vergeleken met de controles (27%) (zie figuur 9) (22).

Verder waren de serum endotoxine- en TNF levels ook significant gereduceerd na toediening van chylomicronen. De verlaagde TNF levels zorgen voor een verminderde endotoxine geïnduceerde stimulatie van macrofagen (22).

Voordelen en beperkingen van de studies en mogelijke therapie

Een voordeel van de mogelijke therapie is dat triglyceride rijke lipoproteïnen behoren tot het natuurlijke verdedigingsmechanisme van de gastheer tegen een infectie (22). Behandeling met chylomicronen of Intralipid kan dus worden gezien als een verhoging van de natuurlijke afweer, in plaats van een interventie met chemicaliën. Hierdoor zullen waarschijnlijk minder bijwerkingen optreden, dit is nog niet bewezen.

Een nadeel van de mogelijke therapie met triglyceride rijke lipoproteïnen is dat het effect van endotoxine neutralisatie alleen is waargenomen in de circulatie tot 30 minuten na injectie van LPS (21). Wanneer chylomicronen of Intralipid in de praktijk als therapie toegepast worden, moeten zij dus zeer snel na de eerste symptomen worden toegediend om effectief te zijn. Dit nadeel geldt voor alle besproken methoden en middelen in deze categorie. Verdere studies zijn daarom nodig om alle endotoxine complexerende middelen langer te laten werken.

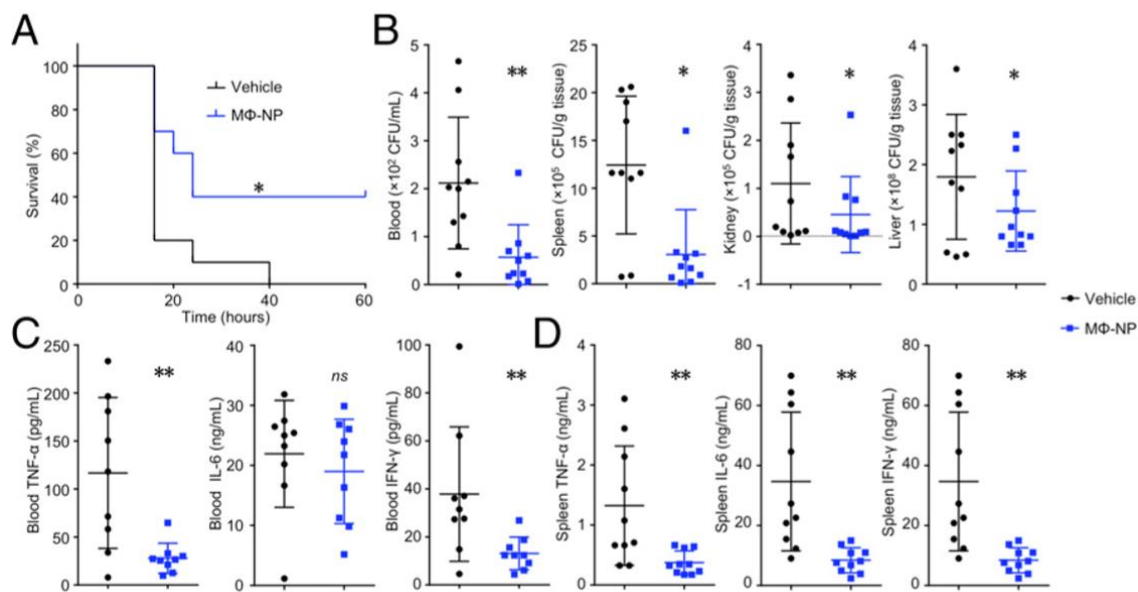
2.1.VI Macrofaag-achtige nanopartikels

Auteurs van een zeer recente studie uit 2017 rapporteren over het effect van biomimetische macrofaag nanopartikels (MΦ-NPs) op endotoxine bij gramnegatieve sepsis. De nanopartikels bestaan uit polymere kernen met celmembranen van J774 muismacrofagen eromheen gewikkeld. Op deze manier bezitten de nanopartikels een antigene buitenkant die hetzelfde is als die van de macrofagen (4).

Binding van endotoxine aan MΦ-NPs vindt plaats aan de macrofaag receptoren CD14 en TLR4 via het LPS bindingsproteïne. De MΦ-NPs zijn vervolgens in staat om het LPS te neutraliseren, omdat zij de effecten van receptoractivatie van CD14 en TLR4 op echte macrofagen en het effect van vrij LPS inhiberen. De MΦ-NPs inhiberen bijvoorbeeld de expressie van selectine E, welke normaal meteen tot expressie wordt gebracht op endotheliale cellen door het LPS (4).

Verder zijn de MΦ-NPs in staat om de pro-inflammatoire cytokinen TNF, IL-6 en IFN-γ in vitro te neutraliseren. MΦ-NPs kunnen hiernaast de endotoxine gestimuleerde NO productie van macrofagen in vitro inhiberen (4).

De potente en specifieke neutralisatie van LPS door MΦ-NPs vindt ook in vivo plaats. Er werd gramnegatieve sepsis veroorzaakt in muizen door toediening van een letale dosis van *E. Coli*. 4 van de 10 muizen overleefden tot 60 uur na de letale dosis, het experimentele eindpunt, bij injectie van 300 mg/kg MΦ-NPs 30 minuten na injectie van *E.Coli* (zie figuur 10A). Dit demonstreert een significant overlevingsvoordeel bij injectie van MΦ-NPs, omdat alle dieren in de controlegroep stierven. Verder voorkwamen MΦ-NPs de bacteriële verspreiding in bloed en milt, maar niet in de lever en nier (zie figuur 10B). De cytokinen TNF-α, IL-6 en IFN-γ waren ook gereduceerd in het bloed en de milt (respectievelijk figuur 10C en 10D) (4).



Figuur 10: De in vivo therapeutische werkzaamheid van MΦ-NPs geëvalueerd in een muis bacteriëmie model. (A) Overlevingscurve van muizen (N=10 per groep) met bacteriëmie na behandeling met MΦ-NPs. (B) Aantal bacteriën in bloed, milt, nier en lever 4 uren nadat MΦ-NPs intraperitoneaal waren geïnjecteerd. (C en D) De hoeveelheid van de pro-inflammatoire cytokinen TNF-α, IL-6 en IFN-γ in bloed en milt na injectie van MΦ-NPs (4).

Voordelen en beperkingen van de studie en mogelijke therapie

Een nadeel van deze studie is dat de deeltjes gecoat zijn met het celmembran van muis macrofagen. Effectiviteit van de deeltjes gecoat met mens macrofagen moet dus nog bewezen worden. Hiernaast is het in vivo experiment uitgevoerd met 10 muizen per groep, dit is relatief weinig en maakt de resultaten minder betrouwbaar.

Een voordeel van mogelijke therapie met MΦ-NPs is dat zij gecoat zijn met macrofaag celmembranen, en de werking dus berust op de natuurlijke interactie van macrofaagreceptoren met endotoxine. Dit zorgt voor een universele neutralisatie van verschillende geslachten, soorten en stammen van gramnegatieve bacteriën (4). Verder zal het lichaam de MΦ-NPs niet als lichaamsvreemd herkennen, omdat celmembranen van macrofagen natuurlijk voorkomen in het lichaam. Dit zorgt ervoor dat geen ernstige bijwerkingen of reacties op zullen treden.

Deze methode zou verder getest kunnen worden op effectiviteit bij grampositieve sepsis, omdat MΦ-NPs lipoteichoïnezuur en peptidoglycanen zouden kunnen neutraliseren via de verwante receptoren TLR2-4. Verder zou de methode getest kunnen worden op effectiviteit bij fungale sepsis, omdat MΦ-NPs β-glucanen zouden kunnen neutraliseren via verwante receptoren als dectine-1 (4).

2.2 Enzymatische deactivatie van endotoxine

2.2.1 Alkalische fosfatase

Een studie uit 1997 demonstreert dat het enzym alkalische fosfatase (AP) het endotoxine in vivo kan detoxificeren door defosforylatie van de lipide A eenheid tot monofosforyl lipide A (1). De auteurs van dit artikel suggereren dat AP dan ook potentieel gebruikt zou kunnen worden bij de therapie van gramnegatieve sepsis, en dat verder onderzoek nodig is.

In 2004 is het protectieve effect van humaan placenta AP (pIAP) tegen LPS onderzocht in muizen. De muizen werden intraperitoneaal geïnjecteerd met *E. Coli* LPS en 20 minuten later werd pIAP intraveneus toegediend. Het pIAP zorgde voor een daling van de lichaamstemperatuur, normalisatie van serum NO levels na 24 uur en een significant hogere 24-uurs overleving vergeleken met de controlegroep (zie figuur 11) (23).

Een andere studie uit 2015 laat gunstige effecten van het 'recombinant human tissue non-specific alkaline phosphatase' (rhTNAP), verkregen van de melk van transgene konijnen, zien. Muizen werden intraperitoneaal geïnjecteerd met *E. Coli* LPS om sepsis te induceren en 3 uur later werd rhTNAP geïnjecteerd. De behandeling met rhTNAP zorgde voor normalisatie van de lichaamstemperatuur en toename van de overleving van 30% naar 80% (zie figuur 12). Intestinale rund AP (biAP) bleek ook effectief en verhoogde de overleving van muizen na injectie met LPS (zie figuur 12), maar verlaagde de lichaamstemperatuur niet (24).

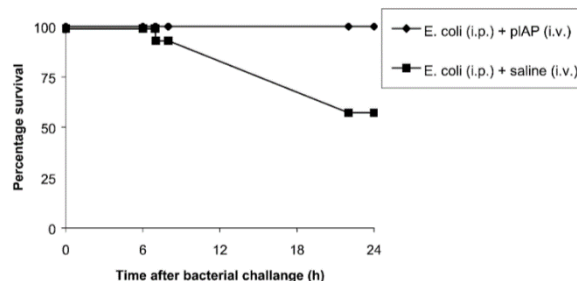
Twee review artikelen over sepsis-geassocieerde acute nierschade (AKI) behandelen de mogelijke rol van AP in therapie van AKI. AP zorgt voor een verbetering van de nierfunctie in twee fase IIa klinische trials in patiënten met sepsis-geassocieerde AKI. Dit is mogelijk te wijten aan LPS detoxificatie door defosforylatie en omzetting van ATP in adenosine, wat het lichaam beschermt tegen inflammatie geïnduceerde weefselschade (25,26).

Deze mogelijke mechanismen van de werking van AP bij sepsis-geïnduceerde AKI impliceren dat de onderliggende sepsis wordt aangepakt, in plaats van een direct effect te hebben op AKI. Ook uit deze studies kan dus opgemaakt worden dat AP een potentiële rol speelt in de bescherming tegen sepsis door middel van endotoxine detoxificatie, en in de toekomst mogelijk gebruikt kan worden als therapie.

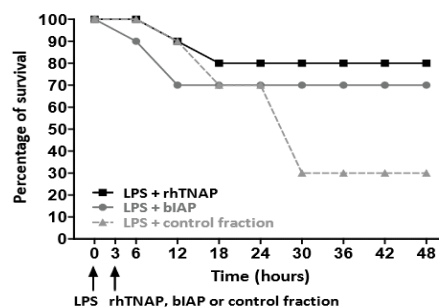
Voordelen en beperkingen van de studies en mogelijke therapie

Tijdens de studies met rhTNAP en pIAP worden deze specifieke AP vormen respectievelijk 3 uur en 20 minuten na LPS injectie toegediend. Er moet verder onderzocht worden wat de resultaten zijn bij latere toediening, omdat dit in de praktijk meestal het geval is bij sepsis.

Het enzym AP is een eiwit en is daarom waarschijnlijk onderhevig aan modificaties zoals acetylatie en degradaties zoals denaturatie. Dit is een nadeel wanneer AP in therapie bij sepsis wordt gebruikt. AP komt van nature voor in het menselijk lichaam (1). Toekomstige behandeling met AP zal dus minder snel bijwerkingen oproepen dan bij andere therapieën, wat voordelig is. Een ander voordeel is dat AP preventief gebruikt kan worden, bijvoorbeeld door toevoeging aan zuigelingenmelk.



Figuur 11: Overleving van muizen (N=14 per groep) na een intraperitoneale injectie van *E. Coli* en 20 minuten later een injectie met pIAP of fysiologische zoutoplossing (23).



Figuur 12: De overleving van muizen (N=10 per groep) in 48 uur na LPS injectie en na toediening van rhTNAP en biAP op t=3 uur (24).

2.3 Hemoperfusie methoden

2.3.1 Polymyxine B geïmmobiliseerde vezel kolom hemoperfusie (Toraymyxine)

Polymyxine B heeft een antibacteriële en anti endotoxine werking. Het verwoest bacteriële membranen en kan selectief de lipide A eenheid van het vrijgekomen endotoxine binden, waardoor de negatieve effecten van endotoxine op cellen wordt geneutraliseerd (27). Het polymyxine B kan worden toegepast in kolommen bij hemoperfusie om endotoxine uit het bloed te adsorberen, zoals gebruikt in de endotoxine verwijderingscassette Toraymyxine. Hieronder worden de huidige ontwikkelingen met betrekking tot polymyxine B geïmmobiliseerde vezel kolom (PMX) hemoperfusie besproken.

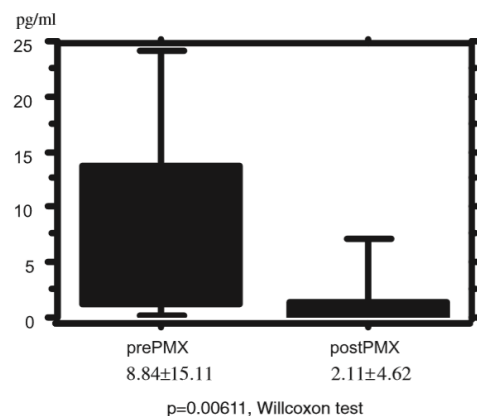
In 2014 is een studie gepubliceerd waarin werd geconcludeerd dat een 24-uurs PMX hemoperfusie behandeling effectief was in het continu verwijderen van endotoxine bij patiënten met septische shock. Na 24 uur behandeling met hemoperfusie was de mediane endotoxine verwijderingsgraad in 11 van de 19 patiënten 47.7%. De overige 8 patiënten hadden een normale plasma endotoxine level na 24 uur, wat totale verwijdering van endotoxine op dat tijdstip aantoont. De 28-daagse mortaliteit van de 19 patiënten was 47%. Gemiddeld werd over 24 uur 14,623 pg/ml endotoxine uit het bloed verwijderd (27).

In een tweede gepubliceerde studie uit 2006 is het effect onderzocht van polymyxine B geïmmobiliseerde vezel kolom directe hemoperfusie (PMX-DHP) op de bloed endotoxine levels in 24 peritonitis patiënten met postoperatieve septische shock. Er vond een significante reductie plaats in het bloed endotoxine level na PMX-DHP (zie figuur 13). De 28-daagse mortaliteit van de 24 patiënten was 12%. Gemiddeld werd over 120 minuten 4,22 pg/ml endotoxine verwijderd (28).

Toraymyxine is in kleine experimentele studies, zoals in de studies hierboven, bewezen effectief in het verwijderen van endotoxine uit het bloed en het reduceren van de gevolgen van LPS. Effectiviteit in reductie van de mortaliteit bij sepsis patiënten is echter niet bewezen in veel grootschalige klinische trials. Zo is in een tussenrapport van de nog niet afgeronde EUPHRATES trial geconcludeerd dat er een niet-significante 5% reductie in 28-daagse mortaliteit van septische shock patiënten was na twee sessies PMX hemoperfusie van 24 uur (29,30). Hiernaast is in een gerandomiseerde gecontroleerde trial uit 2015 ook geen effect op de mortaliteit van peritonitis geïnduceerde septische shock patiënten door PMX hemoperfusie waargenomen (31). Verder is de conclusie van een recent review artikel uit 2018 dat PMX hemoperfusie de 28-daagse mortaliteit bij volwassen sepsis patiënten ook niet reduceert. De auteurs baseren deze conclusie op resultaten uit de onderzochte studies die impliceren dat het endotoxine niet effectief uit de bloedbaan wordt verwijderd bij PMX hemoperfusie (32). Een review artikel met meta-analyse uit 2017 presenteert daarentegen gegevens dat PMX hemoperfusie wél een significante reductie geeft in mortaliteit bij patiënten met sepsis/septische shock (33). In al deze studies is de mortaliteit vergeleken met de mortaliteit bij de standaardbehandeling.

De literatuur is op dit punt dus erg tegenstrijdig, en onderzoek naar Toraymyxine is nog steeds gaande en nodig om de mechanismen en effectiviteit van deze methode op te helderen.

Toraymyxine heeft bewezen positieve hemodynamische- en respiratoire effecten (9). Verder zorgt het voor een verbetering van de hartfunctie en zuurstof toevoer vergeleken met standaardtherapie



Figuur 13: Veranderingen in de bloed endotoxine levels (y-as) van 24 patiënten met postoperatieve septische shock na PMX-DHP (28).

(10). Door het gebruik van dun vezelachtig dragermateriaal is er een groot oppervlak en vindt een geringe daling in de bloeddruk plaats tijdens hemoperfusie met Toraymyxine (9).

Voordelen en beperkingen van de studies en mogelijke therapie

In de studie uit 2014 is de endotoxine concentratie voor en na hemoperfusie gemeten. Er is dus niet bekend wanneer tijdens de behandeling de endotoxine concentratie in het bloed daalde (27).

Een andere limitatie van deze studie en die uit 2006 is dat er geen controlegroep was zonder PMX behandeling, en de resultaten ook niet werden vergeleken met de standaardtherapie (27).

Een voordeel van de studie uit 2006 is dat niet alleen patiënten met gramnegatieve sepsis zijn geïnccludeerd, maar ook patiënten met zowel gramnegatieve als -positieve sepsis. Deze personen zijn hersteld (28), wat impliceert dat binding van lipoteichoïnezuur aan polymyxine B waarschijnlijk plaatsvindt. Toepassing van PMX-DHP bij grampositieve sepsis is dus misschien mogelijk.

Een nadeel van hemoperfusie met polymyxine B is dat het ernstige systemische toxiciteit kan veroorzaken (5). Zo kan nefro- en neurotoxiciteit, monocyt stimulatie (IL-1) en eiwitverlies gedurende passage door de polymyxine kolommen plaatsvinden (3). Men moet dus oppassen met het gebruik van polymyxine B in Toraymyxine. Een voordeel is juist dat Toraymyxine zorgt voor een geringe daling in de bloeddruk. Dit is gunstig omdat sepsis patiënten last hebben van een algehele bloeddrukdaling.

2.3.II Sialzuur geïmmobiliseerde polysulfon dialysator

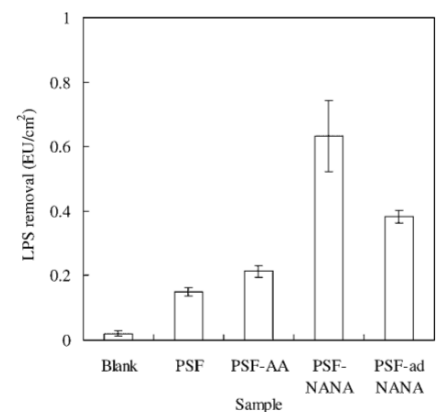
In een studie uit 1990 kwam naar voren dat polysulfon membranen het LPS sterk kunnen binden en adsorberen gedurende hemoperfusie (34). In 2009 is een artikel gepubliceerd waarin staat dat sialzuur het LPS ook kan binden met een hoge affiniteit, en daarom het plasma endotoxine level na LPS injectie kan verlagen (35).

Een in vitro studie uit 2009 heeft dan ook een hemoperfusie methode met zowel polysulfon als sialzuur onderzocht op de capaciteit om LPS van een oplossing te verwijderen. Hierbij is sialzuur (N acetylneuraminezuur, NANA) covalent geïmmobiliseerd op het oppervlak van een polysulfon (PSF) holle vezelmembraan (36).

De klaring van LPS door de NANA-PSF holle vezelmembraan is onderzocht. Het level van LPS in een oplossing werd 321% gereduceerd bij gebruik van een NANA-PSF holle vezelmembraan als dialysemembraan, vergeleken met het gebruik van een ongemodificeerd PSF holle vezelmembraan als dialysemembraan (zie figuur 14). De LPS verwijdering over 30 minuten was ongeveer 0,65 EU/ml (Endotoxine Units per ml), dit is 65 pg/ml (36).

Voordelen en beperkingen van de studie en mogelijke therapie

Een voordeel van hemoperfusie met het NANA geïmmobiliseerde PSF holle vezelmembranen is dat NANA geen toxische verbinding is (35). PSF membranen zijn waarschijnlijk ook niet toxisch, aangezien deze veel gebruikt worden als dialysemembranen. Een nadeel van de studie is dat de capaciteit van het NANA-PSF holle vezelmembraan om LPS te verwijderen alleen in vitro is onderzocht. Additioneel onderzoek is nodig om effectieve verwijdering van LPS in vivo te bewijzen.



Figuur 14: De verwijdering van LPS door polysulfon- en gemodificeerde polysulfon membranen, waaronder PSF-NANA, in vitro (35).

3. Vergelijkende discussie en conclusie

Het schadelijke agens dat een centrale rol speelt in sepsis is LPS. In dit review zijn 3 verschillende methoden en middelen van LPS detoxificatie uitgewerkt, die hieronder worden vergeleken. Dit zijn methoden gebaseerd op complexvorming, enzymatische deactivatie en hemoperfusie. Bij alle 3 de methoden en middelen is het van belang om de behandeling zo snel mogelijk te starten nadat het LPS de circulatie heeft betreden. De werking van de methoden en middelen is namelijk veelal minder effectief als de tijdsduur tussen het betreden van de bloedbaan door LPS en het inzetten van de behandeling langer wordt.

Er is bewezen dat de endotoxine complexerende middelen het endotoxine in vivo binden en vervolgens detoxificeren. Voor VHH 5G is dit tot nu toe echter alleen in vitro bewezen, dit middel moet dus in vivo verder worden onderzocht. Het ENP, DOSPER, BNEP, de triglyceride rijke lipoproteïnen en de MΦ-NPs detoxificeren het LPS niet alleen in vivo, maar reduceren ook significant de LPS geïnduceerde letaliteit in vivo. Deze bewezen effectiviteit maakt deze methoden geschikt als mogelijk therapeuticum voor het reduceren van de letaliteit bij gramnegatieve sepsis, mits het zo spoedig mogelijk aan de patiënt wordt toegediend. Er is niet bekend of de middelen reversibel of irreversibel aan het endotoxine binden, en wat er precies gebeurt met de complexen in het lichaam. Van de triglyceride rijke lipoproteïnen en MΦ-NPs is wel bekend dat de complexen opgenomen worden door de lever via hepatocyten.

Een opmerking over de actualiteit van de besproken studies in deze scriptie is op zijn plaats. De studies gebruikt voor VHH 5G, ENP, BNEP, DOSPER en triglyceride rijke lipoproteïnen zijn meer dan tien jaar oud omdat geen recentere studies gevonden konden worden. Een reden zou kunnen zijn dat de therapie met Toraymyxine veel verder in de ontwikkeling is, en dat daar nu dus vooral onderzoek naar wordt gedaan als mogelijke therapie bij sepsis. Verder is VHH 5G een heel specifiek antilichaam, en is er wel recent onderzoek gedaan naar een bredere toepassing van VHH's. Zo is er bijvoorbeeld onderzoek gedaan naar de toepassing van VHH's bij angiogenese en tegen cytokineproductie (37,38). Hetzelfde geldt voor ENP en BNEP, zeer specifieke delen van respectievelijk de anti-lipopolysaccharide factor en het BPI eiwit. Naar deze zeer specifieke verbindingen wordt minder onderzoek gedaan. DOSPER is hiernaast oorspronkelijk een transfectiemiddel, dus logischerwijs gaan hier de meeste studies over. Recenter onderzoek over triglyceriden is vooral gericht op de rol in het aangeboren immuunsysteem.

Een eis aan een therapeuticum is dat het niet toxisch mag zijn voor de patiënt. Wanneer de in vivo effectieve endotoxine complexerende methoden worden vergeleken op toxiciteit is het ENP een minder geschikte kandidaat voor therapie bij sepsis. ENP veroorzaakt namelijk multifocale hepatocellulaire necrose wanneer het wordt geïnjecteerd, en is dus mogelijk hepatotoxisch (12). DOSPER is daarentegen een niet-toxische verbinding. BNEP laat geen bijwerkingen zien wanneer een hogere dosis dan 10 mg/kg in muizen wordt gebruikt (18), en is dus waarschijnlijk ook niet toxisch. De triglyceride rijke lipoproteïnen behoren tot het natuurlijke verdedigingsmechanisme van de gastheer tegen een infectie (22) en worden net als de MΦ-NPs, die gecoat zijn met macrofaag celmembranen, niet als lichaamsvreemd herkend.

Een andere belangrijke eigenschap van een therapeuticum is dat deze stabiel is, vooral wanneer deze intraveneus wordt toegediend. Bij sepsis patiënten zal intraveneuze toediening de voorkeur hebben, omdat de infectie zich in de bloedbaan bevindt. Het stabiel houden van ENP en BNEP vóór toediening aan de patiënt is een uitdaging, omdat het respectievelijk een eiwit en een peptide betreft. Deze verbindingen zijn vaak onderhevig aan degradatie- en modificatieprocessen zoals denaturatie en acetylatie. Complexen van DOSPER en LPS zijn daarentegen in vitro en in vivo wel bewezen

voldoende stabiel in de aanwezigheid van serum (15). De triglyceride rijke lipoproteïnen en MΦ-NPs zullen ook geen last hebben van instabiliteit omdat de triglyceriden, lipoproteïnen en celmembranen van macrofagen natuurlijk voorkomen in het lichaam.

BNEP en ENP zijn dus minder goede kandidaten voor therapie bij sepsis om de letaliteit te reduceren. Er zitten echter ook nadelen aan de therapie met DOSPER en triglyceride rijke lipoproteïnen. DOSPER wordt bijvoorbeeld snel geëlimineerd uit het bloed (15). Om deze reden heeft het waarschijnlijk geen langdurig werking als therapeutikum bij sepsis. Triglyceride rijke lipoproteïnen hebben ook geen langdurige werking, omdat alleen effect van endotoxine neutralisatie is waargenomen in de circulatie tot 30 minuten na injectie van LPS (21). Modificaties aan deze verbindingen zijn dus nodig voor een langere werkingsduur bij sepsis.

Concluderend uit het bovenstaande zijn MΦ-NPs het recentst onderzocht en vormen zij de mogelijke therapie met de meeste potentie om het overlijden bij sepsis te reduceren. Een nog niet genoemd additioneel voordeel van therapie met MΦ-NPs is dat de werking berust op de natuurlijke interactie van macrofaagreceptoren met endotoxine. Deze interactie zorgt dat verschillende geslachten, soorten en stammen van gramnegatieve bacteriën universeel geneutraliseerd kunnen worden. Van VHH 5G is bewezen dat het ook een bredere specificiteit heeft, bij de rest van de middelen is dit nog niet expliciet onderzocht. MΦ-NPs zijn hiernaast ook mogelijk effectief bij grampositieve- en fungale sepsis door de neutralisatie van respectievelijk peptidoglycanen en lipoteichoïnezuur door de verwante receptor TLR2-4 en de neutralisatie van β -glucanen door de verwante receptor dectine-1 (4).

VHH 5G moet weliswaar verder onderzocht worden, maar de mogelijke toepassing van VHH 5G moet niet onderschat worden. Het antilichaam kan goedkoop geproduceerd worden, wat een betaalbare therapie mogelijk maakt. Verder is het antilichaam nog steeds bruikbaar na een denaturatie-renaturatie cyclus. Dit is praktisch omdat decontaminatie van een oplossing van VHH 5G eerst kan plaatsvinden, voordat deze intraveneus aan sepsis patiënten wordt toegediend (11). Hiernaast vertoont VHH 5G cross-reactiviteit met LPS van andere bacteriën dan *N. Meningitidis* waardoor het als therapie voor sepsis van verschillende gramnegatieve bacteriën zou kunnen worden toegepast.

De methode van enzymatische detoxificatie van endotoxine via alkalische fosfatase (AP) is bewezen effectief om de overleving van muizen te vergroten na een LPS injectie met *E. Coli*. De lagere sterfte vergeleken met de controlegroep werd zowel waargenomen bij muizen ingespoten met pIAP als bij muizen ingespoten met rhTNAP. bIAP verhoogde ook de overleving van muizen na injectie met LPS (23,24). Dit impliceert dat verschillende vormen van AP geschikt zijn als therapie bij sepsis voor het verminderen van sterfte.

Het rhTNAP is makkelijk te verkrijgen door de melk van transgene konijnen, terwijl het pIAP uit placenta's gehaald moet worden. Het laatstgenoemde is lastiger en maakt behandeling met rhTNAP een aantrekkelijker therapie bij sepsis dan met pIAP.

AP als therapie bij sepsis is net als de endotoxine complexerende middelen MΦ-NPs en triglyceride rijke lipoproteïnen een natuurlijke methode. AP komt namelijk natuurlijk voor in het menselijk lichaam (1). Een voordeel van toekomstige behandeling met AP bij sepsis is dan ook dat het minder snel ernstige bijwerkingen op zal roepen. Hiernaast kan AP preventief gegeven worden aan baby's via bijvoorbeeld zuigelingenmelk (Nutrilon). Een nadeel is echter dat het net als ENP een eiwit is en daarom onderhevig kan zijn aan modificaties zoals acetylatie en degradaties zoals denaturatie.

De methode van hemoperfusie met een polymyxine B geïmmobiliseerde vezelkolom (Toraymyxine) is bewezen effectief om endotoxine uit het bloed te verwijderen bij patiënten met septische shock (27,28). Er kan niet gezegd worden of de methode een reductie in letaliteit gaf, omdat in deze studies

geen controlegroep is gebruikt of een vergelijking is gemaakt met de standaardbehandeling. Wel is bekend dat in verschillende grootschalige trials een niet-significante reductie in de mortaliteit is waargenomen bij behandeling met Toraymyxine (29–32). Een andere trial uit 2017 liet wel een significante reductie zien (33). Toraymyxine lijkt dus effectief in kleine experimentele studies, maar het effect in grootschalige klinische trials moet nog bewezen worden. Onderzoek is dan ook nog steeds gaande.

Wanneer Toraymyxine vergeleken wordt met de endotoxine complexerende middelen, is een nadeel dat Toraymyxine een invasieve methode is. Hemoperfusie kan op zichzelf zorgen voor een nieuwe bacteriële infectie in het bloed. Een infectie kan natuurlijk ook bij intraveneuze toediening van de complexerende middelen plaatsvinden, maar het risico is hoger bij hemodialyse waarbij het bloed echt uit en in het lichaam wordt gepompt. Hiernaast bevat Toraymyxine de toxische verbinding polymyxine B, terwijl alle complexerende middelen behalve ENP niet toxisch zijn.

Toraymyxine heeft juist als voordeel dat het bewezen positieve effecten op het hart, de ademhaling en de zuurstof distributie heeft. Het is nog onduidelijk of de complexerende middelen additionele positieve effecten hebben bij behandeling van sepsis in mensen. Verder heeft Toraymyxine als voordeel dat polymyxine B een potente binder is van LPS en dus effectief endotoxine uit bloed kan adsorberen. DOSPER bindt LPS bijvoorbeeld maar met een affiniteit van 1/10 van dat van polymyxine B (15). Ten slotte heeft Toraymyxine als voordeel dat het voor een geringe daling van de bloeddruk zorgt. Dit is gunstig bij sepsis patiënten, die vaak te maken krijgen met een algehele bloeddrukdaling.

De methode van hemoperfusie met het NANA geïmmobiliseerde polysulfon holle vezelmembraan is bewezen effectief voor het verwijderen van LPS in vitro. De effectiviteit voor het verwijderen van LPS in vivo is nog niet bewezen, in tegenstelling tot de PMX methode. Verder onderzoek is dus nodig. Een voordeel van de mogelijke therapie van hemoperfusie met NANA-PSF is dat het NANA niet toxisch is, in tegenstelling tot het polymyxine B. De hemoperfusie met NANA-PSF kan de hemoperfusie met PMX op dit punt dus mogelijk vervangen.

Verder was na 30 minuten ongeveer 65 pg/ml endotoxine uit de oplossing verwijderd bij de NANA-PSF hemoperfusie methode. Vergeleken met de verwijderingsgraad van de PMX-methode van de studies uit 2006 en 2014, 4,22 pg/ml na 120 minuten en 14,623 pg/ml na 24 uur, is dit relatief hoog. De hemoperfusie methode met NANA-PSF is dus veelbelovend. Er moet wel rekening mee worden gehouden dat de verwijderingsgraad alleen de verwijdering van het LPS in vitro toont, en niet in vivo zoals bij de PMX-methoden. Er is hiernaast ook nog niet gekeken naar de invloed van de methode op de gevolgen van LPS in vivo. Een goede vergelijking van de resultaten kan dus niet worden gemaakt.

Concluderend zijn MΦ-NPs de meest veelbelovende experimentele methode van alle endotoxine complexerende middelen om de letaliteit bij sepsis te reduceren. Zij zijn het recentst onderzocht, hebben de minste nadelen en de meeste voordelen. Het enzym alkalische fosfatase is een natuurlijke methode en in vivo ook bewezen effectief, maar kan onderhevig zijn aan modificatie- en degradatie processen omdat het een eiwit is. Wel is dit enzym als enige in staat het LPS molecuul echt onschadelijk te maken door defosforylatie, in tegenstelling tot de andere methoden. De hemoperfusie methode NANA-PSF is veelbelovend, maar tot nog toe is alleen de hemoperfusie methode met PMX (Toraymyxine) in vivo onderzocht en in bepaalde studies bewezen effectief. Additioneel onderzoek is nodig om de mechanismen en effecten van al deze veelbelovende methoden verder op te helderen. Voorlopig zal de therapie van sepsis in Nederland dan ook ondersteunend blijven door toediening van breedspectrum antibiotica, vocht en vasopressors. De methoden in deze scriptie geven echter hoop op een effectievere therapie gericht op endotoxine detoxificatie in de toekomst.

4. Literatuurlijst

1. Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Hardonk MJ, Meijer DK. A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification. *Lab Investig* [Internet]. maart 1997 [geciteerd 5 september 2018];76(3):319–27. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9121115>
2. Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Kamps JA, Hardonk MJ, Meijer DK. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *Am J Pathol* [Internet]. oktober 1997 [geciteerd 5 september 2018];151(4):1163–9. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9327750>
3. Buttenschoen K, Radermacher P, Bracht H. Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application. *Langenbeck's Arch Surg* [Internet]. 27 augustus 2010 [geciteerd 4 september 2018];395(6):597–605. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20582603>
4. Thamphiwatana S, Angsantikul P, Escajadillo T, Zhang Q, Olson J, Luk BT, e.a. Macrophage-like nanoparticles concurrently absorbing endotoxins and proinflammatory cytokines for sepsis management. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 24 oktober 2017 [geciteerd 4 september 2018];114(43):11488–93. Beschikbaar op: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1714267114>
5. Shukla P, Rao GM, Pandey G, Sharma S, Mittapelly N, Shegokar R, e.a. Therapeutic interventions in sepsis: current and anticipated pharmacological agents. *Br J Pharmacol* [Internet]. november 2014 [geciteerd 4 september 2018];171(22):5011–31. Beschikbaar op: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.12829>
6. Hotchkiss RS, Sherwood ER. Getting sepsis therapy right. *Science* (80-) [Internet]. 2015 [geciteerd 4 september 2018];347(6227):1201–2. Beschikbaar op: <http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/9/439/ec176.abstract>
7. Baumgartner J-D, Calandra T. Treatment of Sepsis. *Drugs* [Internet]. 1999 [geciteerd 6 september 2018];57(2):127–32. Beschikbaar op: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-199957020-00001>
8. Gantner D, Nichol A. Treatment of severe sepsis. *Anaesth Intensive Care Med* [Internet]. 2012 [geciteerd 6 september 2018];13(5):199–203. Beschikbaar op: https://ac-els-cdn-com.proxy-ub.rug.nl/S1472029912000318/1-s2.0-S1472029912000318-main.pdf?_tid=1b9adbbf-a02c-4877-85bb-7b328b898248&acdnat=1536218825_ofd5e7778ecf3c227f44cb397e34e181
9. Shoji H. Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). *Ther Apher Dial* [Internet]. februari 2003 [geciteerd 4 september 2018];7(1):108–14. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12921125>
10. Vincent J-L, Laterre P-F, Cohen J, Burchardi H, Bruining H, Lerma FA, e.a. A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. *Shock Soc* [Internet]. 2005 [geciteerd 16 september 2018];23(5):400–5. Beschikbaar op: <https://ovidsp-tx-ovid-com.proxy-ub.rug.nl/sp-3.31.1b/ovidweb.cgi?QS2=434f4e1a73d37e8c69eec78d160eab4a44a1c9e09e0916e278378caae70e749bc74cb6fcabbb1400491c3242f65080119fcd40e11289330ae554ab0f0e6063e97b39016c187d1e1812c848886b863d9d6628dd97f0685e84d7daf7805>
11. El Khattabi M, Adams H, Heezius E, Hermans P, Detmers F, Maassen B, e.a. Llama single-chain antibody that blocks lipopolysaccharide binding and signaling: prospects for therapeutic

- applications. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 1 oktober 2006 [geciteerd 4 september 2018];13(10):1079–86. Beschikbaar op: <http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00107-06>
12. Fletcher MA, McKenna TM, Quance JL, Wainwright NR, Williams TJ. Lipopolysaccharide Detoxification by Endotoxin Neutralizing Protein. *J Surg Res* [Internet]. 1993 [geciteerd 4 september 2018];55(2):147–54. Beschikbaar op: https://ac-els-cdn-com.proxy-ub.rug.nl/S0022480483711224/1-s2.0-S0022480483711224-main.pdf?_tid=bc48244a-d3ca-455e-a527-c6c0ac1b8c85&acdnat=1536070936_e4828f77025db8cd655bd9756c82e351
 13. Garcia C, Saladino R, Thompson C, Hammer B, Parsonnet J, Wainwright N, e.a. Effect of a recombinant endotoxin-neutralizing protein on endotoxin shock in rabbits. *Crit Care Med* [Internet]. augustus 1994 [geciteerd 18 september 2018];22(8):1211–8. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8045139>
 14. Kurt-Jones EA, Thompson C, Novitsky T, Siber G, Fleisher G. Endotoxin neutralizing protein inhibits the response of human peripheral blood mononuclear cells to LPS and non-LPS stimuli. *Pediatr Res* [Internet]. 1 april 1996 [geciteerd 13 september 2018];39(4):177–177. Beschikbaar op: <http://www.nature.com/doi/10.1203/00006450-199604001-01067>
 15. David SA, Silverstein R, Amura CR, Kielian T, Morrison DC. Lipopolyamines: novel antiendotoxin compounds that reduce mortality in experimental sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. april 1999 [geciteerd 5 september 2018];43(4):912–9. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10103199>
 16. Opal SM, Palardy JE, Parejo N, Morrison DC. Lipopolyamines as a therapeutic strategy in experimental Gram-negative bacterial sepsis. *J Endotoxin Res* [Internet]. 3 februari 2001 [geciteerd 13 september 2018];7(1):35–8. Beschikbaar op: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/09680519010070010501>
 17. Ooi CE, Weiss J, Doerfler ME, Elsbach P. Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *J Exp Med* [Internet]. 1 september 1991 [geciteerd 14 september 2018];174(3):649–55. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1875165>
 18. Jiang Z, Hong Z, Guo W, Xiaoyun G, Gengfa L, Yongning L, e.a. A synthetic peptide derived from bactericidal/permeability-increasing protein neutralizes endotoxin in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol* [Internet]. april 2004 [geciteerd 5 september 2018];4(4):527–37. Beschikbaar op: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576904000542>
 19. Eichbaum EB, Harris HW, Kane JP, Rapp JH. Chylomicrons can inhibit endotoxin activity in vitro. *J Surg Res* [Internet]. november 1991 [geciteerd 11 september 2018];51(5):413–6. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1758174>
 20. Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. Human Very Low Density Lipoproteins and Chylomicrons Can Protect against Endotoxin-induced Death in Mice. *J Clin Invest* [Internet]. 1990 [geciteerd 10 september 2018];86(3):696–702. Beschikbaar op: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy-ub.rug.nl/pmc/articles/PMC296783/pdf/jcinvest00075-0022.pdf>
 21. Read TE, Grunfeld C, Kumwenda Z, Calhoun MC, Kane JP, Feingold KR, e.a. Triglyceride-rich lipoproteins improve survival when given after endotoxin in rats. *Surgery* [Internet]. januari 1995 [geciteerd 5 september 2018];117(1):62–7. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7809838>
 22. Read TE, Grunfeld C, Kumwenda ZL, Calhoun MC, Kane JP, Feingold KR, e.a. Triglyceride-rich lipoproteins prevent septic death in rats. *J Exp Med* [Internet]. 1 juli 1995 [geciteerd 5

- september 2018];182(1):267–72. Beschikbaar op:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790821>
23. Verweij WR, Bentala H, Van der Vlag AH, Miek van Loenen-Weemaes A, Kooi K, Meijer DKF, e.a. Protection against an escherichia coli-induced sepsis by alkaline phosphatase in mice. *Shock* [Internet]. 2004 [geciteerd 11 september 2018];22(2):174–9. Beschikbaar op:
<https://ovidsp-tx-ovid-com.proxy-ub.rug.nl/sp-3.31.1b/ovidweb.cgi?QS2=434f4e1a73d37e8cc1d367baa870b516c7cf87c2418d01929f3bae46e917ec9c958bb1561649b2cc78cd279734d8c89e53a2c6ce9b4f75b30d0fc1d92cf080203c71e2fc9a7b5cce4890fca168cab241a16771b211c5243efa4407>
 24. Bender B, Baranyi M, Kerekes A, Bodrogi L, Brands R, Uhrin P, e.a. Recombinant human tissue non-specific alkaline phosphatase successfully counteracts lipopolysaccharide induced sepsis in mice. *Physiol Res* [Internet]. 2015 [geciteerd 11 september 2018];64(5):731–8. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25804104>
 25. Peters E, Heemskerk S, Masereeuw R, Pickkers P. Alkaline Phosphatase: A Possible Treatment for Sepsis-Associated Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2014 [geciteerd 11 september 2018];63(6):1038–48. Beschikbaar op:
<http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.11.027>
 26. Peters E, Van Elsas A, Heemskerk S, Jonk L, Van Der Hoeven J, Arend J, e.a. Alkaline Phosphatase as a Treatment of Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2013 [geciteerd 11 september 2018];344(1):2–7. Beschikbaar op:
<http://dx.doi.org/10.1124/jpet.112.198226>
 27. Mitaka C, Fujiwara N, Yamamoto M, Toyofuku T, Haraguchi G, Tomita M. Polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion removes endotoxin throughout a 24-hour treatment period. *J Crit Care* [Internet]. oktober 2014 [geciteerd 4 september 2018];29(5):728–32. Beschikbaar op:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0883944114001312>
 28. Kojika M, Sato N, Yaegashi Y, Suzuki Y, Suzuki K, Nakae H, e.a. Endotoxin adsorption therapy for septic shock using polymyxin B-immobilized fibers (PMX): evaluation by high-sensitivity endotoxin assay and measurement of the cytokine production capacity. *Ther Apher Dial* [Internet]. februari 2006 [geciteerd 4 september 2018];10(1):12–8. Beschikbaar op:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-9987.2006.00340.x>
 29. Shimizu T, Miyake T, Tani M. History and current status of polymyxin B-immobilized fiber column for treatment of severe sepsis and septic shock. *Ann Gastroenterol Surg* [Internet]. 1 juni 2017 [geciteerd 17 september 2018];1(2):105–13. Beschikbaar op:
<http://doi.wiley.com/10.1002/ags3.12015>
 30. Pickkers P, Payen D. What's new in the extracorporeal treatment of sepsis? *Intensive Care Med* [Internet]. 2017 [geciteerd 16 september 2018];43(10):1498–500. Beschikbaar op:
<https://link-springer-com.proxy-ub.rug.nl/content/pdf/10.1007%2Fs00134-017-4738-8.pdf>
 31. Payen DM, Guilhot J, Launey Y, Lukaszewicz AC, Kaaki M, Veber B, e.a. Early use of polymyxin B hemoperfusion in patients with septic shock due to peritonitis: a multicenter randomized control trial. *Intensive Care Med* [Internet]. 11 juni 2015 [geciteerd 17 september 2018];41(6):975–84. Beschikbaar op: <http://link.springer.com/10.1007/s00134-015-3751-z>
 32. Fujii T, Ganeko R, Kataoka Y, Furukawa TA, Featherstone R, Doi K, e.a. Polymyxin B-immobilized hemoperfusion and mortality in critically ill adult patients with sepsis/septic shock: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Intensive Care Med* [Internet]. 4 februari 2018 [geciteerd 17 september 2018];44(2):167–78. Beschikbaar op:

<http://link.springer.com/10.1007/s00134-017-5004-9>

33. Terayama T, Yamakawa K, Umemura Y, Aihara M, Fujimi S. Polymyxin B Hemoperfusion for Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Surg Infect (Larchmt)* [Internet]. april 2017 [geciteerd 17 september 2018];18(3):225–33. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28092497>
34. Laude-Sharp M, Caroff M, Simard L, Pusineri C, Kazatchkine MD, Haeffner-Cavaillon N. Induction of IL-1 during hemodialysis: transmembrane passage of intact endotoxins (LPS). *Kidney Int* [Internet]. december 1990 [geciteerd 13 september 2018];38(6):1089–94. Beschikbaar op: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2127434>
35. Ho C-H, Hsu S-P, Yang C-C, Lee Y-H, Chien C-T. Sialic acid reduces acute endotoxemia-induced liver dysfunction in the rat. *Shock* [Internet]. augustus 2009 [geciteerd 13 september 2018];32(2):228–35. Beschikbaar op: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00024382-200908000-00015>
36. Chang J-J, Lin P-J, Yang M-C, Chien C-T. Removal of lipopolysaccharide and reactive oxygen species using sialic acid immobilized polysulfone dialyzer. *Polym Adv Technol* [Internet]. 1 december 2009 [geciteerd 4 september 2018];20(12):871–7. Beschikbaar op: <http://doi.wiley.com/10.1002/pat.1309>
37. Ebrahimzadeh W, Mousavi Gargari SLM, Javidan Z, Rajabibazl M. Production of Novel VHH Nanobody Inhibiting Angiogenesis by Targeting Binding Site of VEGF. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 9 augustus 2015 [geciteerd 26 september 2018];176(7):1985–95. Beschikbaar op: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-015-1695-y>
38. Nosenko MA, Atretkhany K-SN, Mokhonov V V., Efimov GA, Kruglov AA, Tillib S V., e.a. VHH-Based Bispecific Antibodies Targeting Cytokine Production. *Front Immunol* [Internet]. 1 september 2017 [geciteerd 26 september 2018];8:1073. Beschikbaar op: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01073/full>