

University of Groningen

Synthesis of quaternary ammonium coated surfaces

Roest, Steven

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Roest, S. (2016). *Synthesis of quaternary ammonium coated surfaces: Physico-chemistry, bacterial killing and phagocytosis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Onze levensverwachting neemt toe en met een vergrijzende bevolking neemt de vraag naar biomedische implantaten ook toe. De nummer één oorzaak van het falen van biomedische implantaten is het optreden van microbiële infecties. Een biomateriaal-geassocieerde infectie is vaak lastig te behandelen doordat de micro-organismen een biofilm vormen waardoor deze minder gevoelig zijn voor antibiotica. Daarnaast functioneert het immuunsysteem rond een implantaat niet optimaal, met als gevolg dat zowel het implantaat als het vaak geïnfecteerde, omringende weefsel moet worden verwijderd en een nieuw implantaat moet worden ingebracht. Met wederom risico op nieuwe infecties geassocieerd aan het biomateriaal en eventueel achtergebleven microbiële contaminatie. **Hoofdstuk 1** geeft een korte inleiding betreffende de impact en het ontstaan van een biomateriaal-geassocieerde infectie. Een universele methode om implantaten te ontwikkelen met intrinsieke antimicrobiële eigenschappen is lastig. Daarentegen is het coaten van bestaande biomaterialen met antimicrobiële materialen relatief eenvoudig. De doelstelling van dit proefschrift is dan ook het prepareren van een coating die bacteriën doodt zodra deze in contact komen met het oppervlak. Ook wordt de *in vitro* weerstand van dergelijke coatings tegen bacteriële adhesie en vorming van een biofilm onderzocht. Dit zal zich niet alleen richten op het reduceren van biofilm vorming, maar ook op fagocytose van, door de coating gedode, bacteriën. Dit is essentieel, aangezien een laag van gedode micro-organismen het afdodende effect van de coating kan beperken.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van verschillende methoden om biofilm vorming op biomaterialen te voorkomen, waaronder ook coatings die werken op basis van afgifte van antibacteriële verbindingen. Verschillende gecoatete antimicrobiële materialen worden besproken, waaronder lysozym, antimicrobiële peptiden en quaternaire ammoniumverbindingen (QUATs). Het onderzoek richt zich vooral op QUAT-coatings, omdat deze synthetisch goed toegankelijk zijn en al lange tijd als ontsmettingsmiddel worden gebruikt. Ook worden de verschillende werkingsmechanismen van QUATs besproken. Eén van de voorgestelde mechanismen is de penetratie van QUATs door de peptidoglycaanlaag in het cytoplasmatische membraan, waardoor dit membraan wordt verstoord. In een verwant mechanisme wordt gesteld dat QUATs een destabiliserende werking hebben op het celmembraan doordat ze uitwisselen met kationen die normaal het membraan stabiliseren. Tenslotte, met de nadruk op kationische polymeren, worden verscheidene polymeren besproken die vaak gebruikt worden in antimicrobiële coatings, zoals polyvinylpyridine, polyethyleenimine en poly(meth)acrylaten.

In **hoofdstuk 3** wordt, uitgaande van twee commercieel verkrijgbare verbindingen, een methode ontwikkeld om AB₂ monomeren te synthetiseren. Vanuit deze monomeren zijn de overeenkomstige hypervertakte en de bijbehorende amfifiele hyperbranched polymeren geproduceerd in een één-pot synthese. De A-groep (een secundaire aminogroep) reageert bij verhoogde temperatuur met de B-groepen (geblokte isocyanaten), waardoor de eindgroepen van het corresponderende hypervertakte polyurea ook geblokte isocyanates zijn. Door verschillende methoxypoly(ethyleen glycol)s te laten reageren met de geblokte isocyanaten werd een platform van amfifiele hypervertakte polymeren met regelbare hydrofobe kernen en hydrofiële schillen gecreëerd. Na drie opeenvolgende reactiestappen zonder tussentijdse opwerking werden de uiteindelijke polymeren verkregen door precipitatie, waarbij het polymeer geprecipiteerd en het

overtollige methoxypoly(ethyleen glycol) opgelost bleef. Pyreen absorptie experimenten toonden de vorming van micellen boven een kritische concentratie aan. Zowel cryo-transmissie-elektronenmicroscopie als dynamische lichtverstrooiing toonden de aanwezigheid van twee verschillende deeltjesgrootten aan, bestaande uit primaire micellen en aggregaten daarvan. Alle micellen vertoonden een thermoresponsief gedrag, met overgangen dicht bij de lichaamstemperatuur. De lage cytotoxiciteit van de micellen maken ze veelbelovend voor het transport van medicijnen of biociden.

Op basis van het in **hoofdstuk 3** ontwikkelde platform wordt in **hoofdstuk 4** de ontwikkeling beschreven van een naar het oppervlak vormende, contact-dodende coating. Dit werd bereikt door QUATs aan een hypervertakte polyurea coating te binden. De coating was in staat om hechtende bacteriën te doden door ze gedeeltelijk te omhullen. Zelfs na uitgebreide extracties, doodde de coating 99.99% van de *Staphylococcus epidermidis* bacteriën. Hieruit wordt geconcludeerd dat de afdoding uitsluitend wordt veroorzaakt door contact met het oppervlak. Het werkingsmechanisme van QUAT moleculen in oplossing is gebaseerd op het binnendringen in bacteriële membranen, maar het is lastig voor te stellen hoe geïmmobiliseerde QUATs een dergelijk werkingsmechanisme kunnen uitoefenen. De adhesiekrachten tussen de stafylokokken en de QUAT-coatings waren echter extreem hoog. Deze sterke adhesiekrachten leiden mogelijk tot verwijdering van membraanlipiden en uiteindelijk tot de dood van de bacteriën.

QUAT-coatings doden op unieke wijze hechtende bacteriën aan het oppervlak en vereisen een minimale dichtheid van kationen op het oppervlak om afdodend te zijn. In de literatuur wordt suggereert dat de minimum dichtheid in de orde van 10^{14} positieve ladingen per cm^2 is. De positieve ladingen op QUAT-coatings worden verkregen door quaternisering van de stikstof atomen van de geïntroduceerde amines door alkylering.

In **hoofdstuk 5** wordt de bijdrage onderzocht van additionele alkylering met methyl-jodide op de kationische-ladingsdichtheid van hexyl-bromide gealkyleerde QUAT-coatings. Deze werd gemeten met fluoresceïne kleuring. X-ray elektron spectroscopie (XPS) werd gebruikt om de fractie gealkyleerde stikstof te bepalen. Ook zeta-potentialen, water randhoeken en bacteriële contact-doding van de verschillende gealkyleerde oppervlakken werden gemeten. De kationische ladingsdichtheid nam toe met extra methyl-jodide alkylering (tot 18 uur), gepaard met een toename in de fractie gealkyleerde stikstof. Zeta-potentialen werden negatiever bij alkylering als gevolg van de afscherming van kationen door de hydrofobe alkylstaarten. Contact-doding van Gram-positieve stafylokokken trad alleen op bij een kationische ladingsdichtheid boven 10^{16} cm^{-2} en correleerde met de fractie gealkyleerde stikstof gemeten met XPS (elektron bindingsenergie 401.3 eV). Gram-negatieve *Escherichia coli* werden niet gedood bij contact met de coatings. Uit deze studie blijkt dat de kationische ladingsdichtheid, gemeten met fluoresceïne kleuring, ongeschikt is om het afdodende vermogen van QUAT-coatings te bepalen. Als alternatief wordt het atomaire gewichtsprocent van gealkyleerde stikstof bij 401.3 eV voorgesteld, aangezien deze zowel de kationische lading als zijn drager weerspiegelt. Het atomaire gewichtsprocent stikstof bij 401.3 eV moet hoger zijn dan 0.45% om Gram-positieve bacteriën te doden, zodra deze in contact komen met het oppervlak.

Betrouwbaarheid van de *in vitro* evaluatiemethoden voor contact-dodende oppervlakken zijn discutabel. De resultaten van de verschillende methoden zijn vaak tegenstrijdig. Daarom worden in **hoofdstuk 6** vijf methoden vergeleken om bacteriële contact-dodende oppervlakken te evalueren. De vergelijking is gebaseerd op de dodende werking van een contact-dodende gealkyleerde hypervertakte polyurea-polyethylenimine coating die in contact werd gebracht met een *S. epidermidis* stam. Afhankelijk van de gebruikte methode werden uiteenlopende resultaten verkregen. Geconcludeerd werd dat de Petrifilm® en Japanse Industriële Standaard (JIS) methoden de voorkeur genieten. Beide methoden moeten worden aangevuld met een test om afdoding ten gevolge van mogelijke afgifte van antimicrobiële verbindingen te kunnen uitsluiten. Een kleine afgifte van dergelijke antimicrobiële verbindingen heeft mogelijk een grote invloed op bacteriële afdoding in de kleine vloeistofvolumes van deze methoden. De aangepaste JIS methode is acceptabel, maar bevat geen gebalanceerde hoeveelheid voedingsstoffen in vergelijking met de Petrifilm® methode en mag daarom alleen worden gebruikt in combinatie met een niet-afdodende controle. De ASTM E2149 test en een bacteriële spray methode zijn niet betrouwbaar. De belangrijkste reden hiervoor is het gebrek aan controle over de hoeveelheid bacteriën die in contact komen met de coating.

Veel nieuwe biomaterialen worden beoordeeld op hun vermogen om bacteriële kolonisatie te remmen en het stimuleren van groei van weefselcellen, maar gaan voorbij aan de rol van immuuncellen. In **hoofdstuk 7** wordt dit onderzocht door de fagocytosesnelheid van een gehechte *Staphylococcus aureus* te meten. Dit werd gedaan op zowel poly(ethyleen)glycol-hydrogels, waar op verschillende afstanden, vlakken waren aangebracht waar bacteriën zich kunnen hechten, als op QUAT-coatings. De resultaten werden uitgezet tegen conventionele biomaterialen en roestvrij staal om te bepalen welke oppervlakeigenschappen invloed hebben op de fagocytosesnelheid. Stafylokokken werden in contact gebracht met de materialen, waarna murine macrofagen werden ingebracht. Uit de vermindering van het aantal gehechte stafylokokken werd de fagocytosesnelheid berekend en de totale macrofaagverplaatsing tijdens het experiment werd bepaald. Hydrofiele oppervlakken hadden de laagste fagocytosesnelheid, terwijl de conventionele biomaterialen gemiddelde fagocytosesnelheden lieten zien. Gevlakte poly(ethyleen)glycol-hydrogel coatings verhoogden de fagocytosesnelheid tot het niveau van gewone biomaterialen, terwijl op QUAT-coatings de fagocytosesnelheid relatief laag bleef, hetgeen waarschijnlijk veroorzaakt wordt door sterke elektrostatische binding van de negatief geladen macrofagen en stafylokokken. Op polymere biomaterialen en glas nam de fagocytosesnelheid toe met de totale macrofaagverplaatsing, terwijl beide parameters toenamen met toenemende hydrofobiciteit. Hydrofobiciteit is dus een vereiste voor een effectieve fagocytose. Hieruit werd geconcludeerd dat bij de ontwikkeling van een volgende generatie biomaterialen rekening moet worden gehouden met fagocytose, om zo het vermogen van deze materialen om een infectie te weerstaan te verbeteren.

In de algemene discussie, **hoofdstuk 8**, wordt de impact van dit werk op de ontwikkeling van toekomstige toepassingen benadrukt en worden de beperkingen van de gebruikte methoden bediscussieerd.