

University of Groningen

Antimicrobial and nanoparticle penetration and killing in infectious biofilms

Rozenbaum, René Theodoor

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:

2019

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

Citation for published version (APA):

Rozenbaum, R. T. (2019). *Antimicrobial and nanoparticle penetration and killing in infectious biofilms*. [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

Bacteriële hechting aan oppervlakken in het menselijk lichaam kan resulteren in de vorming van biofilms. Biofilms spelen een belangrijke rol in infecties in het menselijk lichaam. Geschat wordt, dat ongeveer 60% van alle bacteriële infecties worden veroorzaakt door microbiële biofilms. In een biofilm, zitten bacteriën ingebed in een zelf-geproduceerde matrix van extracellulaire polymere substanties (EPS). Deze matrix fungeert als het 'huis van de cellen in een biofilm'. EPS bestaat uit water, polysachariden, eiwitten, extracellulair DNA (eDNA) en andere moleculen die een biofilm beschermen tegen het humane immuunsysteem, mechanische krachten, penetratie van antimicrobiële stoffen en uitdroging. Biofilms kunnen tot 1000 keer meer resistent zijn tegen antimicrobiële middelen dan bacteriën in een planktonische toestand. Antimicrobiële peptiden (AMPs) zijn veelbelovende antimicrobiële stoffen omdat ze geen resistentie vertonen, tenminste tot dusver. Om AMPs te laten penetreren in biofilms wordt het gebruik van nanocarriers gesuggereerd (**Hoofdstuk 1**). Daarom was de doelstelling van dit proefschrift gericht op het bestuderen van de penetratie van AMPs en nanocarriers in infectieuze biofilms *in vitro* en *in vivo*.

In **Hoofdstuk 2** wordt een protocol beschreven hoe biofilms gegroeid kunnen worden met een van tevoren gedefinieerde dikte, die overeenkomt met de dikte van klinische biofilms, in een 'constant depth film fermentor' (CDFF). In de CDFF groeien biofilms op oppervlakken die op een bepaalde diepte liggen, zogenaamde putjes die in een draaitafel gemaakt zijn, terwijl een schraper de biofilm verwijdert die boven de putten uitgroeit. Het fixeren van de put-diepte en het gebruik van een gladde schraper zijn kritische stappen voor het groeien van biofilms met gelijke dikte. De dikte van biofilms kan gemeten worden met 'confocale laser scanning microscopy' (CLSM), 'low load compression testing' (LLCT) en 'optical coherence tomography' (OCT). CLSM is de meest gebruikte techniek, maar is afhankelijk van de penetratie van fluorophoren en laser licht in de biofilm. Dit maakt CLSM ongeschikt om de dikte van relatief dikke biofilms te meten, waardoor LLCT en OCT de voorkeur hebben. Met de OCT kan met een lage resolutie de dikte van de biofilm over bijna het gehele oppervlak van een putje worden gemeten, wat een voordeel is in vergelijking met CLSM. Het groeien van biofilms met een reproduceerbare dikte maakt het mogelijk om studies te doen met veel biofilms tegelijk hetgeen belangrijk is voor het bestuderen van antimicrobiële penetratie in biofilms.

OCT is een manier om de dikte van een biofilm te meten zonder dat het de biofilm beschadigd wordt en waarbij het gebruik van kleuringen niet nodig is. De structuur van biofilms kan met behulp van witheidsintensiteit verdeling in OCT-afbeeldingen bepaald worden. Kwantitatieve vergelijking van biofilm witheid verdeling in OCT afbeeldingen is echter onmogelijk doordat het OCT-apparaat afbeeldingen automatisch herschaalt om een optimale kwaliteit van afbeeldingen te garanderen. In **Hoofdstuk 3** hebben we een methode ontwikkeld om de invloed van automatische schaal aanpassing te elimineren om kwantitatieve vergelijking van biofilms in verschillende afbeeldingen mogelijk te maken.

Automatisch geschaalde en herschaalde witheidsintensiteiten konden kwalitatief worden geïnterpreteerd in lijn met de verwachte biofilmeigenschappen uit de literatuur voor biofilms van verschillende bacterie stammen, hetgeen een validatie van auto- en herschalinganalyses is. Echter, specifieke kenmerken van *Pseudomonas* en orale dual-species biofilms werden prominenter uitgedrukt na onze herschaling. Kwantitatieve validatie werd verkregen door het relateren van gemiddelde auto- en herschaalde witheidsintensiteiten van de biofilms met bacteriële dichtheden in deze biofilms. De bacteriedichtheden per volume eenheid werden onafhankelijk verkregen door het tellen van het aantal bacteriën per biofilm volume eenheid. In tegenstelling tot auto-geschaalde gemiddelde witheidsintensiteiten, namen de herschaalde intensiteiten van verschillende biofilms lineair toe met bacteriële dichtheden per volume eenheid. Zo werd de ontwikkelde schaal verder kwantitatief gevalideerd. Hiermee wordt de voorgestelde witheidsverdelingen in OCT-afbeeldingen aanzienlijk verbeterd, wat de mogelijkheden van OCT biofilm-beeldvorming ten goede komt

EPS voorziet de biofilm van visco-elastische eigenschappen. Na een vervorming van de biofilm zorgen deze visco-elastische eigenschappen voor tijdsafhankelijke relaxatie met kenmerkende tijdsconstanten. Deze tijdsconstanten zijn kenmerkend voor de verschillende matrix componenten van de biofilm. De visco-elastische eigenschappen van biofilms zijn eerder gerelateerd aan de penetratie van antimicrobiële stoffen in biofilms, maar nog nooit aan het doden van bacteriën in de biofilm. In **Hoofdstuk 4** wordt de relatie tussen de visco-elasticiteit van biofilms met het doden van *P. aeruginosa* in biofilms na blootstelling aan drie antimicrobiële stoffen bestudeerd. *P. aeruginosa* biofilms werden gedurende 18 uur gegroeid in een CDFF met een mucine bevattend 'artificial sputum medium' (ASM), 'artificial sputum medium' zonder mucine (ASM⁻), of 'Luria Bertani medium' (LB). Dit resulteerde in biofilms van 100 µm dikte met verschillende concentraties eDNA en polysacchariden in hun matrices. LLCT gevolgd door drie-elementen Maxwell analyse toonde aan dat de snelste relaxatie componenten, geassocieerd met ongebonden water, het belangrijkste waren in de relaxatie van LB gegroeide biofilms. Langzamere relaxatie componenten, geassocieerd met opgeloste polysacchariden, onoplosbare polysacchariden en eDNA, waren het belangrijkste in de relaxatie van ASM gegroeide biofilms. Biofilms gegroeid met ASM⁻ toonden relaxatie componenten met waarden tussen die van ASM en LB gegroeide biofilms in. LB gegroeide biofilms waren het gevoeligste voor tobramycine, colistine en een antimicrobiële peptide. ASM gegroeide biofilms bevatte de meest beschermende biofilm matrix met het minste water en meeste opgeloste polysacchariden en eDNA. In deze studie concludeerden wij dat de stress relaxatie van biofilms die gegroeid werden met verschillende soorten media, correleert met de bescherming die de matrix geeft aan de bacteriën in de biofilm tegen antimicrobiële stoffen.

De ontwikkeling van antimicrobiële dendritische polymeren wordt gezien als een veelbelovend alternatief om infecties te bestrijden. In **Hoofdstuk 5** hebben we de invloed

van de perifere compositie van dendrons op de penetratie van de dendrons in *P. aeruginosa* biofilms bestudeerd. Rood fluorescerende dendrons met verschillende perifere composities werden hiervoor gebruikt. Om bacteriën in de biofilm effectief te doden is het belangrijk dat antimicrobiële dendritische polymeren diep penetreren en accumuleren in biofilms. Dendrons met NH_3^+ perifere groepen accumuleerden sneller in *P. aeruginosa* biofilms dan dendrons met OH en COO^- groepen. Dendrons met NH_3^+ perifere groepen accumuleerden in de bovenste laag van de biofilm, door interacties van de positieve lading van de NH_3^+ groepen met de negatief geladen componenten in de biofilm. De verdeling van dendrons met OH en COO^- groepen aan hun periferie was gelijkmatiger over de gehele diepte van de biofilms. In tegenstelling tot dendrons met NH_3^+ aan hun periferie, verdwenen dendrons met OH en COO^- aan hun periferie uit de biofilm na wassen met fosfaat gebufferde zoutoplossing (PBS) doordat er geen elektrostatistische interacties plaatsvonden tussen de dendrons en de biofilm. Penetratie en accumulatie van dendrons in biofilm wordt derhalve gecontroleerd door de perifere compositie van de dendrons. Deze informatie is belangrijk voor de ontwikkeling van nieuwe antimicrobiële stoffen of antimicrobiële dendritische polymeren.

In **Hoofdstuk 6** wordt de afgifte van AMPs, geadsorbeerd aan monolaurin lipid nanocapsules (ML-LNCs) bestudeerd. Er wordt onderzocht of de AMPs DPK-060 en LL-37 samen met ML-LNCs een synergetisch interactie hebben tegen *Staphylococcus aureus* biofilms *in vitro*, alsook in een *in vivo* therapeutisch wondgenezing model in muizen. Zeta potentialen van AMPs geladen ML-LNCs toonden aan dat de afgifte van geadsorbeerde AMPs van de ML-LNCs gecontroleerd werd door de AMP-concentratie in de omringende vloeistof. De AMPs DPK-060 en LL-37 hadden beide geen antimicrobieel effect tegen vier stafylokokken stammen in planktonische toestand. Met een checkerboard analyse werd synergie tussen ML-LNCs en DPK-060 aangetoond. Echter, er werd geen synergie gevonden tussen ML-LNCs en LL-37. Synergie werd alleen aangetoond tegen vier gegroeide stafylokokken biofilms wanneer ML-LNCs werden gecombineerd met de hoogste concentratie van DPK-060 en LL-37. Geïnficeerde wonden in muizen met bioluminescente *S. aureus* Xen36 genazen sneller door behandeling met ML-LNCs dan met PBS. De behandeling met AMPs had hetzelfde effect als de controle behandeling met PBS. De snellere wondgenezing met de combinatie van DPK-060 en ML-LNCs die werd verwacht op basis van de *in vitro* resultaten was afwezig *in vivo*. Waarschijnlijk werd er geen snellere wondgenezing *in vivo* gevonden doordat lichaamseigen AMPs van de muizen zelf het synergetische effect van de toegevoegde AMPs overnamen. Deze resultaten laten zien dat conclusies getrokken uit planktonische en biofilm data *in vitro* soms weinig relevantie bevatten voor de *in vivo* situatie.

In **hoofdstuk 7** worden de resultaten uit deze thesis besproken ten opzichte van penetratie van nanocarriers in biofilms en het gebruik van AMPs. Toekomstperspectieven voor antimicrobiële behandeling worden voorgesteld, zoals het onderzoeken van

synergetische interactie tussen antimicrobiële stoffen en antibiotica of andere antimicrobiële stoffen. Onderzoek naar nieuwe antimicrobiële behandelingen is nog steeds nodig om in de toekomst biofilm infecties te kunnen bestrijden.

