

University of Groningen

Adaptive antimicrobial nanocarriers for the control of infectious biofilms

Liu, Yong

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):

Liu, Y. (2019). *Adaptive antimicrobial nanocarriers for the control of infectious biofilms*. University of 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

SAMENVATTING

Bacteriële infecties zijn meestal het gevolg van hechtende bacteriën, die gegroeid zijn tot een biofilm en niet vanwege planktonisch groeiende, gesuspenderde bacteriën. Biofilm-bacteriën zijn veel moeilijker te bestrijden met traditionele antimicrobiële stoffen dan planktonische bacteriën als gevolg van (1) ontstaan van nieuwe eigenschappen van bacteriën in een biofilm die niet kunnen worden voorspeld op basis van hun planktonische eigenschappen, (2) lage penetratie en accumulatie van antimicrobiële stoffen in een biofilm, (3) het inactiveren van antimicrobiële stoffen als gevolg van zure en anaerobe omstandigheden in een biofilm en (4) enzymatische modificatie of inactivatie van antimicrobiële stoffen door bacteriën in een biofilm. In de afgelopen jaren, zijn nieuwe op nanotechnologie gebaseerde antimicrobiële stoffen ontwikkeld om planktonische, antibiotica-resistente bacteriën te doden, maar meer eigenschappen zijn vereist dan louter het doden van planktonische bacteriën om biofilm-infecties te bestrijden. De vereisten en de verdiensten van op nanotechnologie gebaseerde antimicrobiële stoffen voor de bestrijding van biofilm-infecties vormen de focus van **Hoofdstuk 1**. Het doel van dit onderzoek is het ontwikkelen van nieuwe, zelf-adaptieve, antimicrobiële polymere nanocarriers met een verhoogde capaciteit om infectieuze biofilms binnen te dringen en multiresistente bacteriën te doden.

Het feit dat bacteriële biofilms volhardende infecties kunnen veroorzaken en moeilijk te bestrijden zijn met antimicrobiële stoffen, wordt mede veroorzaakt door slechte penetratie van antimicrobiële stoffen in biofilms. Bacteriën die diep in een biofilm zitten zijn daardoor onbereikbaar voor antimicrobiële stoffen en overleven de behandeling. In **Hoofdstuk 2**, wordt beschreven hoe we oppervlakte-adaptieve Triclosan geladen nanocarriers (micellen) maken die betere (1) biofilm penetratie en accumulatie laten zien, (2) elektrostatische interacties aangaan bij zure pH met het negatieve geladen bacterie oppervlak in een biofilm, en (3) het vrijkomen van antimicrobiële stoffen als gevolg van afbraak van de micellen door bacteriële lipasen. Eerst werd vastgesteld dat micellen gemaakt van gemengde polymeren (MSPM) bestaande uit een hydrofiel poly(ethyleenglycol) (PEG) en pH-responsief poly(β -amino ester) (PAE), positief geladen is bij pH 5.0, terwijl de micellen negatief geladen zijn bij fysiologische pH. Dit is tegengesteld aan enkelvoudige polymere micellen (SSPM) die bezitten alleen PEG en blijven negatief geladen bij pH 5.0. De biologische onzichtbare eigenschappen van de PEG-micellen gecombineerd met PAE met adaptieve lading mogelijkheden, maakten het voor MSPMs mogelijk stafylokokken biofilms binnen te dringen en zich op te hopen in de biofilm. Dit is aangetoond voor fluorescerend Nile rood geladen micellen met behulp van confocale laser scanning microscopie. Zodra de MSPMs binden aan een stafylokokken oppervlak, breken bacteriële enzymen de MSPM schil af en komen antimicrobiële stoffen vrij en worden bacteriën over de diepte van een biofilm gedood. Dit vormt een zeer effectieve manier om bloed toegankelijke stafylokokken biofilms met antimicrobiële stoffen te behandelen, waarmee het probleem van antimicrobiële penetratie in een biofilm wordt opgelost.

Behalve dat antimicrobiële stoffen moeilijk penetreren in biofilms, groeit het aantal bacteriën dat resistent is tegen beschikbare antibiotica alarmerend. In **Hoofdstuk 3** laten we zien dat micellen met een PEG-schil volledig kunnen binnendringen in stafylokokken biofilms, wat komt door de biologische onzichtbaarheid van de micellen. Maar als PEG wordt gecombineerd met PAE, dan worden deze MSPMs positief geladen in de lage pH omgeving van een biofilm, waarbij in eerste instantie niet alleen diepe penetratie maar ook hun latere accumulatie in biofilms plaatsvindt zonder dat ze worden uitgewassen. Multi-drug resistente (MDR) stafylokokken biofilms die blootgesteld werden aan protoporphyrin IX geladen MSPMs, dat na licht-activatie bacteriën doodt, was veel beter dan SSPMs geladen met protoporphyrin IX. Subcutane infecties bij muizen veroorzaakt door vancomycine-resistente bioluminescente stafylokokken werden opgelost door dagelijkse injectie van licht-actieveerbare protoporphyrin IX geladen MSPMs in de bloedbaan en licht-activatie op de

plek van de infectie. Micellen, die niet door bacteriële enzymen werden afgebroken in de biofilm, werden afgebroken in de lever en milt en uit het lichaam verwijderd via de nieren. Concluderend, micellen die hun lading kunnen aanpassen bij een zure pH geladen met licht-activeerbare antimicrobiële stoffen zijn een goed alternatief voor de huidige antibiotica therapieën.

Traditionele antimicrobiële stoffen worden steeds minder effectief voor de behandeling van bacteriële infecties veroorzaakt door de opkomst van MDR pathogene bacteriën. In **Hoofdstuk 4** doen we verslag van PEG-PAE micellen (MSPMs) met geconjugeerde antimicrobiële stoffen. Deze micellen kunnen doordringen in biofilms en richten zich op bacteriële cel oppervlakken als ze in de lage pH omgeving van een biofilm komen en laten de gekoppelde antimicrobiële stoffen vrij door afbraak van de ester-binding met PAE door bacteriële lipasen. *In vitro* geven de PEG-PAE micellen met geconjugeerd Triclosan (PEG-PAE-Triclosan) geen lekkage van hun antimicrobiële lading en doden MDR *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* en streptokokken in orale biofilms beter dan Triclosan in oplossing. In muizen, laten PEG-PAE-Triclosan micellen een betere afdoding zien van een MDR *S. aureus* infectie dan opgelost Triclosan., hebben we een orale biofilm bestaande uit verschillende bacteriën verzameld van orthodontische patiënten en behandelt met PEG-PAE-Triclosan micellen. De PEG-PAE-Triclosan micellen lieten een effectieve bacterie doding zien bij een 30-40 keer lagere concentratie Triclosan dan Triclosan in oplossing. Belangrijk is dat *Streptococcus mutans*, de belangrijkste verwekker van tandcariës, bij voorkeur werd gedood door PEG-PAE-Triclosan micellen. Concluderend, PEG-PAE-Triclosan micellen vormen een veelbelovende aanvulling op de afnemende hoeveelheid antimicrobiële stoffen die beschikbaar zijn om infecties te bestrijden in het lichaam.

In **Hoofdstuk 5** willen we strategieën onderzoeken om intracellulaire pathogene bacteriën te doden die moeilijk te behandelen zijn met traditionele antibiotica. We hebben met behulp van zelf-assemblage een hydrofiel en lipofiel antimicrobieel conjugaat gemaakt, wat resulteerde in een nanodeeltje. Het nanodeeltje werd vervolgens in een leukocyten membraan verpakt. De resulterende nanocarriers met leukocyten-kapsel bezitten Toll receptoren aan hun oppervlakken en worden specifiek geïnternaliseerd in leukocyten die geïnfecteerd zijn met bacteriën. Eenmaal binnen een geïnfecteerde leukocyt worden antimicrobiële geconjugeerde nanodeeltjes vrijgemaakt uit de nanocarriers met leukocyten-kapsel om intracellulaire stafylokokken te doden. De dodelijke werking van het antimicrobiële conjugaat in de nanocarrier met leukocyten-kapsel werd zowel *in vitro* als *in vivo* onderzocht. Het verpakte antimicrobiële conjugaat vertoonde een synergetisch effect op het afdoden van bacteriën, en was beter in het afdoden van bacteriën dan alleen de antimicrobiële stoffen of het antimicrobiële conjugaat zonder leukocyten-kapsel. Deze strategie kan in hoge mate bijdragen aan het beschikbare arsenaal van huidige antibioticatherapieën, die niet of nauwelijks intracellulaire pathogenen kunnen doden.

Bacteriële infecties door antimicrobieel-resistente pathogenen dreigen de nummer één doodsoorzaak te worden in 2050. Daarmee is het optimisme over infectiebeheersing dat ontstond na de ontdekking van antibiotica tot een einde gekomen en zijn nieuwe infectie controle strategieën hard nodig. De ontwikkeling van nieuwe antibiotica wordt over het algemeen als onwaarschijnlijk beschouwd. In **Hoofdstuk 6** wordt een waarschijnlijkheidsperspectief gegeven voor de mogelijkheden die geboden worden door combinatie en slimme inkapseling van bestaande antibiotica, gebruik van probiotica en faagtherapie, antimicrobiële peptiden en antimicrobiële stoffen op basis van nanotechnologie. Combinatie van bestaande antibiotica met probiotica, antimicrobiële peptiden of antimicrobiële stoffen op basis van nanotechnologie kan ook goede perspectieven bieden voor de klinische behandeling van infecties, ook wanneer veroorzaakt door antimicrobieel-resistente stammen. Daarmee kunnen bestaande antibiotica wellicht nog tientallen jaren langer bruikbaar zijn dan voorzien, ondanks het optreden van antibiotica-resistentie, maar wel op voorwaarde dat verder onderzoek en ontwikkeling van de bovengenoemde strategieën zijn gericht op klinische vertaling, gezamenlijk uitgevoerd in de academische wereld en de industrie. Maatschappelijk gezien, is dit belangrijker dan de ontwikkeling van en

het publiceren van nog een andere, nieuwe antimicrobiële verbinding.

