

University of Groningen

Antibacterial measures for biofilm control

van de Lagemaat, Marieke

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):

van de Lagemaat, M. (2019). *Antibacterial measures for biofilm control*. [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

In dit proefschrift werden verschillende antibacteriële maatregelen tegen de orale biofilm onderzocht. **Hoofdstuk 1** beschrijft de problemen, met name in de orthodontie, die veroorzaakt worden door orale biofilm en beschrijft verschillende benaderingen voor antibacteriële maatregelen.

Bij het selecteren van onderzoeksthema's voor (biomedisch) onderzoek wordt de betrokkenheid van eindgebruikers steeds belangrijker, vooral in het vakgebied orthodontie, waar een groot deel van de bevolking mee in contact komt. Een voorbeeld van de participatie van eindgebruikers in de orthodontie wordt gepresenteerd in **Hoofdstuk 2**. Patiënten, ouders en zorgverleners zijn betrokken geweest bij de opzet en onderwerpselectie van een deel van dit proefschrift door middel van gestructureerde vragenlijsten. De vragenlijst behandelt verschillende aspecten van antibacteriële maatregelen bij patiënten met orthodontische apparatuur en vroeg welke aspecten en nieuwe ontwikkelingen door hen als eindgebruikers het meest zouden worden gewaardeerd. Alle respondenten, inclusief patiënten, ouders van patiënten, orthodontisten en paramedici scoorden het hoogst voor 'non-compliance' bacteriedodende composiet met een langdurig bacteriedodend effect. De resultaten tonen aan dat eindgebruikers een waardevolle bijdrage kunnen leveren aan wetenschappers bij de selectie van maatschappelijk relevante onderzoeksthema's, wanneer het hoofddoel van het onderzoek is om de potentiële eindgebruikers te bereiken en voordelen te bieden voor hun gezondheid en welzijn. Bovendien kan de publieke opinie wetenschappers helpen om de behoeften van eindgebruikers beter te begrijpen.

In het dagelijks leven zijn handmatig of elektrisch poetsen nog steeds verreweg de meest effectieve maatregel voor het onderhouden van de mondhygiëne bij patiënten met orthodontische apparatuur. In **Hoofdstuk 3** worden orthodontische, multi-streng retentiedraden gebruikt als een gegeneraliseerd model voor orale retentieplaatsen om te onderzoeken of biofilm die achter blijft na elektrisch tandenpoetsen *in-vivo* betere penetratie van antibacteriële middelen mogelijk maakt in vergelijking met handmatig poetsen. 2-cm meerstrengs roestvrijstalen retentiedraden werden bilateraal van de boventandbogen, tussen brackets geplaatst bij 10 vrijwilligers. Vrijwilligers gebruikten een NaF-natrium-lauryl-sulfaat-bevattende tandpasta en antibacteriële, triclosan-bevattende tandpasta aangevuld of niet met een mondspoeling die etherische oliën bevat. De beide zijden van het gebit met inbegrip van de retentiedraden werden handmatig of met een elektrische

tandenborstel gepoetst. De mondhygiëne regimes werden gedurende 1 week gehandhaafd, waarna draden werden verwijderd en orale biofilm werd verzameld en geëvalueerd. Wanneer elektrische tandenborstels werden toegepast, werden er iets minder bacteriën verzameld dan na handmatig poetsen, ongeacht of er een antibacterieel regime was toegepast of niet. Opvallend is dat elektrisch poetsen gecombineerd met een antibacterieel regime leidde tot lagere levensvatbaarheid van de biofilm dan na handmatig poetsen, wat aan geeft dat er een betere penetratie is van antibacteriële middelen in de biofilm die achterblijft na elektrisch poetsen. Ook werden na elektrisch poetsen met een antibacterieel regime grote verschuivingen in de samenstelling van biofilm geïnduceerd, met een daling van de prevalentie van zowel cariogene als paropathogene soorten. Hoofdstuk 3 laat hiermee voor het eerst zien dat er een synergie bestaat tussen de manier van poetsen en het gebruik van antibacteriële middelen met klinisch aantoonbare effecten.

Mondhygiëne producten met antibacteriële componenten kunnen effectief zijn tegen orale biofilm, maar dragen tegelijkertijd bij aan de dreiging van ontwikkeling van bacteriële resistentie. Klinische stammen zoals *Staphylococcus aureus* zijn resistent gebleken tegen chloorhexidine, terwijl orale bacteriële stammen, waaronder *Streptococcus mutans*, in de tandheelkundige praktijk grotendeels gevoelig blijven voor chloorhexidine. Het doel van **Hoofdstuk 4** is het speculeren over de mechanismen die een rol spelen bij het resistent worden tegen chloorhexidine van *S. aureus* versus *S. mutans*, die vatbaar blijft. Chloorhexidine blootstelling van aangehechte bacteriën aan (sub)-MIC concentraties van chloorhexidine leverde reversibele, nanoscopische celwandvervorming op in *S. mutans*, maar niet in *S. aureus*, een aanwijzing voor verlies van intracellulaire, cytoplasmatische druk in *S. aureus*. Hoewel de algehele celoppervlakte-eigenschappen van beide stammen niet significant veranderden, toonde propidium-jodiumkleuring aan dat de celmembranen van *S. aureus* inderdaad meer was beschadigd dan het celmembranen van *S. mutans*. De metabolische activiteit van *S. mutans* veranderde opvallend weinig bij blootstelling aan chloorhexidine, terwijl de metabolische activiteit van *S. aureus* veel hoger werd. Tegelijkertijd toonde herhaald kweken in aanwezigheid van chloorhexidine aan dat chloorhexidineresistentie gemakkelijk te induceren was in *S. aureus*, maar niet in *S. mutans*. Exacte interpretatie van deze gegevens is moeilijk. *S. aureus* kan met een hoge metabole activiteit zich aanpassen om de chloorhexidine-aanval te overleven, b.v. door efflux pompen of opening van membraankanalen te

activeren om de intracellulaire chloorhexidineconcentratie te verlagen. Dit kan verlies van intracellulaire druk veroorzaken waardoor celwandvervorming ontstaat, en tegelijkertijd de ontwikkeling van chloorhexidineresistentie stimuleren. In *S. mutans* was de vervorming van de celwand omkeerbaar binnen 15 minuten na blootstelling aan chloorhexidine, wat duidt op spontane, sterk zelf herstellend vermogen van de celwand. Als gevolg van celwandzelfreparatie, is *S. mutans* mogelijk niet in staat de chloorhexidine-concentratie in het inwendige effectief te verminderen, waardoor het overleven en de ontwikkeling van een resistent nageslacht wordt voorkomen.

Net zoals resistentie tegen antimicrobiële middelen zich in verschillende stammen verschillend kan ontwikkelen, kan anti-biofilm activiteit van een antimicrobieel middel worden bereikt door verschillende werkingsmechanismen: het voorkomen van bacteriële adhesie, het beperken van bacteriegroei, het verstoren van een reeds gevestigde biofilm of het veranderen van de samenstelling en / of pathogeniteit van de biofilm. Een belangrijke strategie in de tandheelkunde is het modifieren van materialen met antimicrobiële eigenschappen. Cationische oppervlakken met gealkyleerde quaternaire ammoniumgroepen doden gehechte bacteriën bij het contact maken op het oppervlak door het beschadigen van de celmembraan. Deze 'contact-dodende' oppervlakken zijn veelbelovend als een niet-antibioticum-gebaseerde manier om bacteriën te verwijderen die zich aan oppervlakken hechten. Er bestaan echter nog geen betrouwbare *in-vitro*-evaluatiemethoden voor oppervlakken die bacteriën doden door contact met het oppervlak. Opvallend is dat de resultaten van verschillende evaluatiemethoden vaak tegenstrijdig zijn. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 5** vijf methoden vergeleken om contact-dodende oppervlakken te evalueren. Hiertoe hebben we quaternaire ammoniumgroepen in diurethaandimethacrylaat / glyceroldimethacrylaat (UDMA / GDMA) gecopolymeriseerd en de contact-dodende werkzaamheid tegen vijf verschillende Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriestammen geëvalueerd. Spraken van bacteriën op contact-dodende oppervlakken gevolgd door luchtdroging en ASTM E2149-13a (American Society for Testing and Materials) bleken niet geschikt, terwijl het Petrifilm®-systeem en JIS Z 2801 (Japanese Industrial Standards) uitstekende methoden bleken te zijn voor het evalueren van oppervlakken die contact met bacteriën doden. Het wordt echter aanbevolen om deze methoden te gebruiken in combinatie met een inhibitiezone-test op een agarplaat om lekkage van antimicrobiële stoffen uit het materiaal uit te sluiten.

Voor klinische toepassingen zou het gunstig zijn om contact-dodende eigenschappen op te nemen in een materiaal met andere unieke kenmerken, b.v. 3D-printbaar en mechanisch veelzijdig. 3D-prints worden gezien als een veranderende technologie in productieprocessen in vele domeinen, waaronder algemene geneeskunde en tandheelkunde, maar de integratie van meer complexe functies in 3D-geprinte materialen ontbreekt nog steeds. In **Hoofdstuk 6-I** demonstreerden we de ontwikkeling van een antibacterieel materiaal dat 3D printbaar is. Monomeren die antimicrobiële, positief geladen quaternaire ammoniumgroepen met een aangehechte alkylketen bevatten, werden ofwel direct gecopolymeriseerd met conventionele diurethaandimethacrylaat / glyceroldimethacrylaat (UDMA / GDMA) composiet of voor-gepolymeriseerd als een lineaire keten voor integratie in een semi-interpenetrerend polymeernetwerk. Voor beide strategieën werden dentale 3D-geprinte objecten vervaardigd door een printer middels een stereolithografieproces, waarna de bacterie contact-dodende eigenschappen zijn aangetoond. Het lekken van quaternaire ammoniummonomeren gecopolymeriseerd met UDMA / GDMA-composiet is beperkt en zonder biologische consequenties binnen 4-6 d, terwijl biologische consequenties nog verder beperkt zouden kunnen zijn tot 1 d wanneer geprepolymeriseerde quaternaire ammoniumgroep bevattende ketens worden opgenomen in een semi-interpenetrerend polymeernetwerk. De klinische handteerbaarheid en mechanische eigenschappen van de polymeermatrix blijven gehandhaafd na opname van quaternaire ammoniumgroepen. Hierbij zijn de antimicrobieel 3D-printbare composieten gekwalificeerd voor klinisch gebruik.

Ons manuscript over de ontwikkeling van een 3D-printbaar antimicrobieel composiet, kreeg binnen de eerste weken na publicatie in *Advanced Functional Materials* onmiddellijk enorme aandacht van zowel nationale als internationale reguliere media. Hoewel ons onderzoeksproject op de platforms voor sociale media enorme aandacht en positieve erkenning kreeg, is de impact van deze rapportages een tweesnijdend zwaard, zoals besproken in **Hoofdstuk 6-II**. De publieke aandacht van dit onderzoeksproject kan grotendeels worden toegeschreven aan de erkenning door het grote publiek en de potentiële maatschappelijke impact die de onderzoeksresultaten zouden kunnen genereren. Het was echter niet gebaseerd op de ware wetenschappelijk bewezen inhoud. Daarom blijft het een uitdaging voor onderzoekers om het publiek op een goede manier te bereiken met hun

onderzoeksproject en dit proces te begeleiden, zodat de juiste informatie en interpretatie worden verspreid.

In de algemene discussie in **Hoofdstuk 7** worden de resultaten van de onderzoeken vanuit een klinisch perspectief besproken en worden suggesties voor toekomstige onderzoeksmogelijkheden gedaan.

