



An Active Attachment Biofilm Model to Develop Anti-Caries Strategies
R.A.M. Exterkate

Chapter 7

Nederlandse Samenvatting.

Voor het ontwikkelen van nieuwe preventieve middelen die gericht zijn op de orale microflora, zijn er ook geschikte modellen nodig voor het testen van deze middelen. Het huidige proefschrift beschrijft een aantal experimenten die zijn uitgevoerd om een dergelijk model te ontwikkelen, te testen en te gebruiken. Een goed biofilm model moet aan een aantal voorwaarden voldoen; 1) Biofilm vorming moet reproduceerbaar zijn en biofilms moeten ontstaan door actieve aanhechting aan een substraat. 2) Naast biofilms van slechts één bacteriesoort (single species) zouden er ook complexe polymicrobiële biofilms gevormd moeten kunnen worden. 3) Om biofilm vorming op verschillende materialen te kunnen testen zouden verschillende substraten gebruikt moeten kunnen worden. 4) omdat het een test model zou moeten zijn, zouden er meerdere testproducten, concentraties van producten en behandel tijden tegelijkertijd in één experiment met elkaar vergeleken moeten kunnen worden.

Op basis van de combinatie van al beschikbare modellen en bovengenoemde vereisten werd een nieuw actieve aanhechting biofilm model ontwikkeld. Het model bestond uit een op maat gemaakte roestvaststalen deksel met 24 klemmen die precies past op standaard 24-wells platen (Greiner, Nederland). Door gebruik te maken van klemmen kan het materiaal waar de biofilms op worden gevormd gevarieerd worden. Door standaard 24-wells platen te gebruiken is het mogelijk om de biofilms in individuele compartimenten te groeien en/of te behandelen. Aangezien de substraten met de aangehechte biofilms aan het deksel vast zitten, is er een grote mate van controle op de blootstelling aan voedingsstoffen en test-producten. Een enkelvoudig experiment bestaat op deze manier uit 24 biofilms en dat geeft de mogelijkheid om een range van concentraties van één product of meerdere test-producten tegelijkertijd te gebruiken. Als de behandel tijd gevarieerd moet worden kunnen er meerdere modellen parallel gebruikt worden.

In hoofdstuk 2 werd de bruikbaarheid van het model geëvalueerd met behulp van zowel single-species *Streptococcus mutans* (*S. mutans* C180-2) en van speeksel afgeleide polymicrobiële biofilms. De grootheden die werden gemeten waren het totaal aantal kolonievormende eenheden (KVE, CFU in het Engels) op basis van uitplaten en de hoeveelheid lactaat die geproduceerd werd door de biofilms. Als eerste werd de reproduceerbaarheid van het model gemeten door het aantal

KVE te bepalen van de gevormde biofilms. Daarvoor werden biofilms gegroeid vanuit overnacht culturen van *S. mutans* C180-2, vers verzameld speeksel en speeksel dat na verzameling was ingevroren. Uit de resultaten bleek dat de spreiding tussen verschillende experimenten klein was. Vervolgens werd in een reeks van experimenten het effect van de bron van de biofilm vorming (single-species en vanuit speeksel gegroeide biofilms) en de leeftijd van de biofilms op de behandel efficiëntie van een reeks van concentraties van aminefluoride (Olafur, GABA, Zwitserland) gemeten. De verzamelde data lieten zien dat het model gevoelig genoeg is om dosis-respons relaties te meten, zowel in termen van KVE-tellingen als ook in lactaat productie. Polymicrobiële biofilms waren minder gevoelig voor aminefluoride voor wat betreft het afdoden van cellen dan de single species biofilms. Maar behandeling met aminefluoride veroorzaakte een duidelijke en sterke afname van metabole activiteit van zowel de single species *S. mutans* biofilms als de polymicrobiële biofilms.

Dit onderzoek toonde aan dat single species biofilms de complexiteit ontberen die een juiste evaluatie van preventieve middelen mogelijk maakt. In een polymicrobiële biofilm zorgen de onderlinge interacties ervoor dat de respons op een behandeling anders is dan in een single-species biofilm.

Daarnaast zou de efficiëntie van een potentieel product niet alleen maar op basis van afdoding maar ook op basis van de metabole activiteit (vermindering van zuurproductie en daarmee vermindering van de cariogeniteit) moeten worden bepaald.

In hoofdstuk 3 werd het effect van het toevoegen van arginine aan het groei medium op het metabolisme van biofilms onderzocht. Arginine is een substraat voor de alkali productie van bacteriën. Alkali productie is een belangrijk pH verhogend effect in de mond. In het verleden is het effect van arginine vooral onderzocht in vloeibare culturen van enkelvoudige bacteriën. Daarnaast zijn er ook studies gedaan aan het sediment van speeksel of plak monsters. Met behulp van experimenten met polymicrobiële biofilms zou de kloof tussen single-species biofilms en *ex vivo* of *in vivo* experimenten kleiner gemaakt kunnen worden.

Uit de experimenten bleek dat de alkali productie door biofilms verminderde onder invloed van de aanwezigheid van sucrose, een lagere buffercapaciteit en een lage pH ($\text{pH} \leq 4.5$). De alkali productie steeg met toenemende ouderdom van de biofilm,

ongeacht de aan- of afwezigheid van sucrose. In feite nam het remmende effect van sucrose af met toenemende biofilm leeftijd. Het bestuderen van effecten van specifieke toevoegingen aan het model op het metabolisme van polymicrobiële biofilms kan leiden tot kennis, die verder gaat dan de kennis die op basis van goed-gecontroleerde single-species experimenten kan worden verkregen.

In de experimenten die werden beschreven in de hoofdstukken 2 en 3 werd gebruik gemaakt van polymicrobiële biofilms maar de samenstelling daarvan werd niet bepaald. Omdat nieuw te ontwikkelen producten niet noodzakelijkerwijs gericht zijn op het volledig verwijderen van orale bacteriën maar meer gericht zijn op het onderdrukken van plak groei of zelfs selectief bepaalde (groepen) bacteriën onderdrukken, leek het van belang om de samenstelling van de biofilms zowel voor als na een behandeling te bepalen. Het gebruik van technieken die gebaseerd zijn op het DNA van bacteriën is een meer voor de hand liggende benadering voor het meten van de samenstelling van polymicrobiële biofilms omdat het gebruik van kweektechnieken lastiger is. Maar tegelijkertijd is het feit dat DNA-technieken geen onderscheid maken tussen levende en dode cellen een belangrijk nadeel. Afdoding door antimicrobiële behandelingen zou onderschat kunnen worden doordat het DNA van niet-vitale cellen meegenomen wordt in de analyse. Een behandeling met propidium monoazide (PMA) wordt wel gebruikt om dit probleem te voorkomen. PMA is een stof die alleen de cel kan penetreren als het celmembraan beschadigd is. Een cel met een beschadigd membraan is meestal een niet-vitale cel. Als PMA in de cel doordringt kan het binden aan het DNA. Door fotolyse met behulp van intens zichtbaar licht vormt PMA een covalente link met het DNA van de cel. Door het intense licht wordt ook het niet gebonden PMA geïnactiveerd door een reactie met water. Het DNA dat is gekoppeld aan PMA kan niet worden vermenigvuldigd met een PCR reactie en zal daardoor niet meegenomen worden in de analyse.

In hoofdstuk 4 is deze benadering getest op van speeksel afgeleide polymicrobiële biofilms. Om te bepalen of PMA ook een effect heeft op vitale cellen, werd speeksel voorafgaand aan de biofilmvorming behandeld met PMA. Vervolgens werden biofilms gevormd met speeksel dat al of niet behandeld was met PMA. Na 48 uur biofilm vorming werden de biofilms eenmalig behandeld met 0.2% chloorhexidine (0.2% CHX, Meridol Perio, GABA, Zwitserland). Na de behandeling werden de biofilms blootgesteld aan 0.2% sucrose en werd de lactaat productie bepaald.

Vervolgens werden de biofilms geoogst en al of niet behandeld met PMA (post-spoeling PMA). De samenstelling van de biofilms werd bepaald met behulp van pyrosequencing.

De eenmalige behandeling met CHX verminderde de vitaliteit (KVE-waarden) en de metabole activiteit (lactaat productie) van de 48 uren biofilms. De verschuiving in de microbiële samenstelling na de eenmalige behandeling met CHX werd vergroot door de post-spoeling PMA behandeling. Het effect van de post-spoeling PMA behandeling op met water behandelde biofilms (controle) was klein. Het behandelen van speeksel met PMA voorafgaand aan de biofilm vorming, leidde tot een afname van de vitaliteit en een verschuiving in de gemeten samenstelling van zowel het speeksel als de van dat speeksel afgeleide biofilms. Op basis van dit experiment kon worden geconcludeerd dat het meten van verschuivingen in biofilms ten gevolge van een eenmalige behandeling met een antimicrobieel middel kon worden verbeterd door een PMA behandeling. Maar tegelijkertijd liet dit experiment zien dat een PMA behandeling de vitaliteit van levende cellen beïnvloed en dat is een indicatie dat een PMA behandeling voorzichtig moet worden ingezet.

De resultaten van hoofdstuk 4 leidde tot de vraag of verschuivingen in de bacteriële samenstelling *in vivo* na kort durend gebruik van een antimicrobieel middel ook gemaskeerd zouden kunnen worden door de aanwezigheid van niet-vitale cellen. Daarom werd er in hoofdstuk 5 een studie uitgevoerd om het gebruik van PMA in een klinische studie waarin een mondspoelmiddel werd getest te evalueren. In dit experiment werden bij 6 proefpersonen tandplak (van de buccale vlakken), tong schraapsel (met een microbrush) en speeksel afgenomen tweemaal voorafgaand aan en tweemaal na afloop van een periode van twee weken waarin een mondspoelmiddel werd gebruikt. De proefpersonen gebruikten gedurende die periode een standaard tandpasta (Prodent Coolmint, Unilever, Nederland) en tweemaal daags een mondspoelmiddel (Meridol, GABA, Zwitserland). In de 24 uur voorafgaand aan de monsternames poetsten de proefpersonen hun tanden niet, maar gebruikten ze wel het mondspoelmiddel. Op elk tijdstip werden 2 plakmonsters, 2 tongschraapsels en 1 speeksel monster (dat daarna in tweeën werd gesplitst) afgenomen. Een van de monsters van elk van de bronnen werd behandeld met PMA en de andere niet. De bacteriële samenstelling werd gemeten met behulp van pyrosequencing. De resultaten lieten een duidelijke verschuiving zien voor zowel

de tong als de speeksel monsters na het gebruik van het mondspoelmiddel. In de buccale plak monsters kon slechts bij 2 van de 6 personen een effect van het mondspoelmiddel worden aangetoond. Het gebruik van een PMA behandeling leidde alleen bij de speekselmonsters tot een additionele verschuiving, de gemeten samenstelling van de buccale plak en tongschraapsels werd niet beïnvloed door een PMA behandeling. Op basis van dit experiment werd geconcludeerd dat het gebruik van PMA om het DNA van niet-vitale cellen te blokkeren in klinische studies, gericht op het meten van verschuivingen in de bacteriële samenstelling na gebruik van mondspoelmiddelen, is beperkt tot speeksel monsters.

De totale dataset laat zien dat het nieuw ontwikkelde model gebruikt kan worden voor het testen van potentiële antimicrobiële producten. De gevoeligheid van het model was groot genoeg om dosis-respons relaties aan te tonen voor zowel de afdoding (KVE-getallen) alsook de metabole activiteit. Het model kan ook gebruikt worden om de effecten van toevoegingen aan het groei medium op cruciale metabole activiteiten te meten. Verschuivingen in de samenstelling van polymicrobiële biofilms t.g.v. een behandeling kunnen worden gemeten en een PMA behandelingsstap vergrootte de waargenomen effecten. Het idee dat een PMA behandeling noodzakelijk is om een accurate bepaling van de verschuiving van de bacteriële samenstelling te meten werd ook getest in een klinische studie. Blijkbaar wordt door de langdurige blootstelling aan het mondspoelmiddel de noodzaak van een PMA behandeling van buccale plak en tongschraapsels beperkt. Maar voor speeksel monsters blijkt dat een PMA behandeling nog steeds voordelen biedt.

Toekomstig onderzoek.

De experimenten die in dit proefschrift worden beschreven waren beperkt tot cariogene biofilms. De biofilms werden allemaal gegroeid in de aanwezigheid van sucrose hetgeen resulteerde in biofilms die rijk waren aan streptokokken en veillonella soorten.

Een doel voor toekomstige studies zou moeten zijn om biofilms te groeien die meer op het originele inoculum lijken. In de huidige studies is speeksel gebruikt als bron om biofilms mee te groeien, echter tandplak of zelfs paperpoint monsters als bron blijken ook al haalbaar. Maar het groeien van biofilms die meer op de originele bron lijken vergt ook groei condities die leiden tot andere typen gevormde biofilms.

Experimenten met verschillende groei-condities en verversingsschema's zijn noodzakelijk om de mogelijkheden van het model uit te breiden.

Idealiter zouden in het model biofilms gegroeid moeten kunnen worden die overeenkomen met biofilms die geassocieerd zijn met verschillende pathologieën. Als dat haalbaar blijkt te zijn, is het ook mogelijk om onderscheid te maken in de efficiëntie van potentiële middelen gebaseerd op de samenstelling van de biofilms. In de afgelopen paar jaar is het model in gebruik genomen in diverse projecten van collega onderzoekers binnen onze onderzoeksgroep en zelfs bij onderzoeksgroepen buiten ACTA waarmee samengewerkt wordt.

Als het model doorontwikkeld wordt, waardoor er verschillende type biofilms gegroeid kunnen worden, zal het haalbaar zijn om sommige van bovengenoemde doelen te bereiken.