

Hadil Abdul

*Formulering og fremstilling av peptid-  
lignende antibiotika-holdige liposomer  
for levering mot bakterielle biofilmer*

Masteroppgave i Farmasi

Veileder: Sanko Nguyen & Colin Charnock

Juni 2020



## SAMMENDRAG

Når bakterier vokser i form av biofilm er de beskyttet mot antibiotika, og i større grad resistent. Ved bruk av liposomer som et leveringssystem rettet mot biofilmer kan de gi en forbedret antimikrobiell effekt. Ladning på liposomene kan resultere i en forbedret interaksjon mellom liposomene og bakteriecelleoverflaten. Dette kan forbedre penetrasjonen av biofilmen hvor bakterier sitter i og under en matrix av ekstracellulære materiale.

I denne masteroppgaven ble en nøytral hovedlipid, DPPC, kombinert med enten positiv ladet DPTAP eller negativ ladet DPPG i ulike molforhold. Totalt ble det prøvd å produsere fire ulike liposomformuleringer og en passende fremstillingsmetode ble etablert. Enkelte formuleringer som DPPC/ 10% DPTAP og DPPC/ 2.5% DPPG viste dårlig stabilitet fra første måling av deres egenskaper. Dermed ble disse to formuleringene utelukket som kandidater for innkapsling av ulike peptidbaserte antibiotika (polymyxin B, gentamicin og bacitracin). DPPC/ 10% DPPG viste seg å være en dårlig formulering for innkapsling av de ulike antibiotikaene. Alle formuleringene viste dårlig stabilitet ved karakterisering etter fremstilling med forhøyet zeta-average samt en størrelsesfordeling (ved intensitet) med flere toppe. DPPC/ 2.5% DPTAP var den eneste formulering som hadde ønskede egenskaper etter produksjonen.

De mikrobiologiske testene på planktoniske celler ble gjennomført ved bruk av to ulike bakterier; *P. aeruginosa* (DSM22644) og *S. aureus* (DIM2569). Testing på planktoniske tester ble gjennomført ved måling av absorbansen ved bruk av en plateleser. Volum til og med 1.25 µL ga ingen vekstrespons. Resultatene viser også at veksthemingen var stabil over testperioden på 12 timer. Dette indikerer at DPPC/ 2.5% DPTAP frigjører minst MIC under hele analyse tidsperioden.

De mikrobiologiske testene på biofilm ble gjort på to ulike metoder for *P. aeruginosa* og *S. aureus*. *P. aeruginosa* biofilm ble etablert i 96-brønnplater av plast og ble behandlet med mindre liposomvolum. Her var det dårlig hemming av allerede etablert biofilm. *S. aureus* biofilm ble etablert på kammerobjektglass og ble behandlet med større liposomvolum. Resultatene fra testen mot *S. aureus* biofilm antyder at allerede bruk av 100 µL av liposomformuleringen gir en svak hemming av biofilmer. CFU/mL for 100 µL ble beregnet til  $3.31818 \times 10^4$ , 1000 µL til  $8.7 \times 10^4$  og 2000 µL kontra CFU/mL på  $4.22523 \times 10^8$  for bakterier som ble ikke utsatt for DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin.

## **ABSTRACT**

When bacteria grow in biofilms, they are protected from antibiotics and are to a greater extent resistant. By using liposomes as a drug delivery system directly aimed at biofilms it can enhance the antimicrobial effect. Charged liposomes can increase the interaction between the liposomes and the bacterial cell surface. This can improve the penetration of the biofilm where bacteria are in and under a matrix of extracellular material

In this study a neutral lipid, DPPC, was combined with either a positively charged lipid, DPTAP, or negatively charged lipid, DPPG, in different molar ratios. In total, four different liposome formulations were made, and a suitable preparation method was established. Some formulations such as DPPC/ 10% DPTAP and DPPC/ 2.5% DPPG showed poor stability; thus, these two formulations were excluded as candidates for encapsulation of peptide-based antibiotics (polymyxin B, gentamicin and bacitracin). DPPC/ 10% DPPG was not suitable for encapsulation of the different antibiotics; the formulation showed poor stability with an elevated zeta-average and a size distribution with several peaks. Only gentamicin encapsulated in DPPC/ 2.5% DPTAP had the desired properties post-production. During storage there was a change in the zeta potential, but this formulation was nevertheless used for the microbiological tests.

*P. aeruginosa* (DSM22644) and *S. aureus* (DIM2569) was used for the microbiological tests. The first test was conducted on agar plates. Testing on planktonic cells was done by measuring the absorbance of the cells using a plate reader. A minimum volume of  $\mu\text{L}$  gave no bacterial growth response. The results from this test shows that growth inhibition was stable over the 12-hour test period. This indicated that DPPC/ 2.5% DPTAP release at least MIC during the entire analysis.

The tests on *P. aeruginosa* and *S. aureus* biofilms was conducted in two different manners. *P. aeruginosa* biofilm was grown in a 96-well plastic plate and was treated with lower liposomal gentamicin volume and there was poor inhibition of the already established biofilm. *S. aureus* biofilm was grown in 1-well chamber slides and treated with higher volume of the liposome gentamicin suspension. The results from the test against *S. aureus* biofilm suggested that a volume of as low as 100  $\mu\text{L}$  of liposomal gentamicin gives an inhibition. CFU /mL for 100 mL was calculated to  $3.31818 \times 10^4$  CFU/mL, 1000  $\mu\text{L}$  to  $8.7 \times 10^4$  CFU/mL and 2000  $\mu\text{L}$  versus CFU /mL of  $4.22523 \times 10^8$  for bacteria not exposed to DPPC / 2.5% DPTAP with encapsulated gentamicin.



## **FORORD**

*"Wherever you are, you will soon be breaking out of one world to soar into another"*  
- Kim Namjoon

Denne masteroppgaven ble gjennomført ved Norges tekniske naturvitenskapelige universitet (NTNU) i samarbeid med OsloMet, høst 2019 til våren 2020. En stor takk til Colin Charnock som har vært til stor støtte på lab. Veldig takknemlig for ditt nyttige innspill og at du tok deg tid til å svare på alle spørsmålene mine. Er utrolig takknemlig for Marius Landsverk og Bjørg Siw Møller Tannæs for å ha hjulpet meg med instrumenter og ulike praktiske utfordringer på lab. Tusen takk til Sanko Nguyen for en utrolig god gjennomgang av oppgaven min og for alle de gode anbefalingene hun kom med. Takk til FAI for at jeg kunne bruke utstyret deres.

Sist men ikke minst takk for familie og venner (særlig Niki og Ilaf) som taklet all sutringen min. Tusen takk til Lovisa og Heidi som tok seg tid for å lese over oppgaven for meg.



Oslo, juni 2020

Hadil Abdul



## ***Innholdsfortegnelse***

Liste over figurer .....	ix
Liste over tabeller.....	xi
Forkortelser .....	xii
<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>2</b>
1.1 Bakgrunn.....	2
1.2 Hensikt med oppgaven.....	3
<b>2. TEORI.....</b>	<b>4</b>
2.1 Biofilmer.....	4
2.2 Biofilmassosierte infeksjoner og legemiddelbehandling.....	6
2.3 Nanopartikler som legemiddelleveringssystem .....	8
2.3.1 Liposomer .....	9
2.4 Karakterisering av liposomer .....	11
2.4.1 Partikkelstørrelse og PDI.....	11
2.4.2 Zetapotensiale.....	13
2.5 Mikrobiologiske analysemetoder .....	14
<b>3. MATERIALER OG INSTRUMENTER.....</b>	<b>16</b>
3.1 Materialer .....	16
3.1.1 Lipider .....	16
3.1.2 Bakterier.....	17
3.1.3 Virkestoff.....	17
3.1.4 Andre kjemikalier .....	18
3.2 Instrumenter .....	19
3.2.1 Produksjon av liposomer.....	19
3.2.2 Karakterisering av liposomer .....	19
3.2.3 Mikrobiologiske tester .....	19
3.2.4 Diverse .....	20
<b>4. METODER.....</b>	<b>22</b>
4.1 Tillaging av løsninger .....	22



4.2 Fremstilling av liposomer .....	23
4.3 Karakterisering.....	24
4.3.1 Måling av partikkelstørrelse.....	25
4.3.2 Måling av zetapotensial .....	25
4.4 Fjerning av ikke-innkapslet virkestoff ved gelfiltrering .....	26
4.5 Mikrobiologisk uttesting av utvalgte liposomformuleringer på planktoniske celler.....	26
4.6 Mikrobiologisk uttesting av utvalgte liposomformuleringer på biofilm.....	28
4.6.1 Uttesting på <i>P. aeruginosa</i> biofilm.....	28
4.6.2 Uttesting på <i>S. aureus</i> biofilm .....	31
<b>5. FORSØKSOPPETT .....</b>	<b>34</b>
5.1 Etablering av fremstillingsmetode med Avanti® Mini-Ekstruder .....	34
5.2 Etablering av fremstillingsmetode med innkapslet virkestoff.....	34
5.2.1 Karakterisering etter produksjon .....	35
5.3 Uttesting av utvalgte liposomformuleringer på agarplater.....	35
<b>6. RESULTATER .....</b>	<b>38</b>
6.1 Etablering av fremstillingsmetode med Avanti Mini Ekstruder.....	38
6.1.1 Positiv ladete liposomer.....	38
6.1.2 Negativ ladete liposomer .....	43
6.2 Etablering av fremstillingsmetode med innkapslet virkestoff.....	46
6.2.1 Positiv ladete liposomer.....	46
6.2.2 Negativ ladete liposomer .....	49
6.3 Karakterisering.....	53
6.4 Uttesting av utvalgt liposomformuleringer på agarplater.....	55
6.5 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte liposomformuleringer på planktoniske celler .....	59
6.5.1 Uttesting på <i>P. aeruginosa</i> celler .....	59
6.5.2 Uttesting på <i>S. aureus</i> celler .....	60
6.6 Mikrobiologisk uttesting av utvalgt liposomformulering på biofilm.....	60
6.6.1 Uttesting på <i>P. aeruginosa</i> biofilm.....	60
6.6.2 Uttesting på <i>S. aureus</i> biofilm .....	62
<b>7. DISKUSJON .....</b>	<b>64</b>
7.1 Etablering av fremstillingsmetode med Avanti® Mini-Ekstruder .....	64
7.1.1 Positiv ladete liposomer.....	65

7.1.2 Negativ ladete liposomer .....	67
7.2 Etablering av fremstillingsmetode med innkapslet virkestoff.....	68
7.2.1 Positiv ladete liposomer .....	69
7.2.2 Negativ ladete liposomer .....	70
7.3 In vitro stabilitet .....	72
7.4 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte formuleringer på agarplater.....	73
7.5 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte liposomformuleirnger på planktoniske celler .....	74
7.5.1 Uttesting på <i>P. aeruginosa</i> celler .....	74
7.5.2 Uttesting på <i>S. aureus</i> celler .....	75
7.6 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte liposomformuleirnger på biofilm .....	76
7.6.1 Uttesting på <i>P. aeruginosa</i> biofilm.....	76
7.6.2 Uttesting på <i>S. aureus</i> biofilm .....	77
7.7 Videre arbeid.....	78
<b>8. KONKLUSJON .....</b>	<b>80</b>
<b>9. Referanser .....</b>	<b>82</b>

## Liste over figurer

Figur 2.1: Oversikt over biofilm dannelsen .....	5
Figur 2.2: Behandling av biofilmer med antibiotika .....	5
Figur 2.3: Oversikt over ulike type BAI .....	7
Figur 2.4: En skjematisk fremstilling av ulike liposomale leveringssystemer.....	10
Figur 2.5: Forholdet mellom størrelsesfordeling og PDI-verdi .....	12
Figur 3.1: Den kjemiske strukturen av DPPC. Hentet fra Avanti Polar Lipids, Inc. (59).....	16
Figur 3.2: Den kjemiske strukturen av det kationiske lipidet DPTAP. Hentet fra Avanti Polar Lipids, Inc (60).....	16
Figur 3.3: Den kjemiske strukturen av det anioniske lipidet DPPG. Hentet fra Avanti Polar Lipids, Inc (61).....	16
Figur 3.4: Den kjemiske strukturen til polymyxin B sulfat. Figur hentet fra DrugBank (65).....	17
Figur 3.5: Den kjemiske strukturen til gentamicin sulfat. Figur hentet fra Toronto Research Chemicals (66) .....	17
Figur 3.6: Den kjemiske strukturen til bacitracin. Figur hentet fra Althubiani et al (67).....	18
Figur 4.1: Oppsettet brukt i visiplate (4x6) for uttesting av liposomer på planktoniske celler .....	27
Figur 4.2: Fortynningsrekke av liposomformuleringen.....	28
Figur 4.3: Overikt over innholdet i 96-brønnplaten ved uttesting av P. aeruginosa biofilm .....	29
Figur 4.4: Skjematisk tegning av skrapeprosedyren. Figur hentet fra Kragh et al (70).....	30
Figur 4.5: Oversikt over fortynningsrekken .....	30
Figur 5.1: Figuren viser hvordan bakteriene ble sådd på agarskålene.....	36
Figur 5.2: Oversikt over diskenes plassering på Müeller-Hinton agarskåler ved første runde.....	36
Figur 5.3: Oversikt over diskenes plassering på Müeller-Hinton agarskåler ved andre runde.....	37
Figur 6.1: DPPC/ 2.5% DPTAP uten innkapslet virkestoff.....	39
Figur 6.2: DPPC/ 10% DPTAP uten innkapslet virkestoff.....	40
Figur 6.3: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPTAP..	40
Figur 6.4: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) g av DPPC/ 10% DPTAP to måneder etter ekstrudering .....	41
Figur 6.5: DPPC/ 10% DPTAP B-3 .....	42

Figur 6.6: Graf for størrelsesfordeling (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPTAP P-3 viser to ulike topper.....	42
Figur 6.7: DPPC/ 10% DPTAP B-3 i kyvette viste partikler .....	43
Figur 6.8: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 2.5% DPPG P-1 viste en hovedtopp og en bitteliten topp .....	44
Figur 6.9: Figuren viser utfelling i DPPC/ 2.5% DPPG P-2 dagen etter hydrering. Bildet tatt ovenfra og ned i begerglasset.....	44
Figur 6.10: Figuren viser utfelling i DPPC/ 10% DPPG P-2 dagen etter hydreringstrinnet. Bildet tatt ovenfra og ned i begerglasset.....	45
Figur 6.11: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 2.5% DPTAP P-1 og P-2 .....	47
Figur 6.12: DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet bacitracin.....	48
Figur 6.13: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet bacitracin .....	48
Figur 6.14: DPPC/ 10% DPPG med innkapslet gentamicin etter fem minutter på varmeblokken. Hvit utfelling ble observert i inni sprøyten.....	50
Figur 6.15: Før og etter ekstrudering av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet gentamicin .....	50
Figur 6.16: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet gentamicin .....	51
Figur 6.17: Første bildet viser graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet bacitracin P-1 viser tre topper. Andre bildet viser graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet bacitracin P-2.....	52
Figur 6.18: DPPC/ 10% DPPG med innkapslet bacitracin .....	53
Figur 6.19: Stabilitetsstudie av DPPC/ 2.5% TAP uten virkestoff.....	53
Figur 6.20: Den første figuren viser partikkelstørrelsesendring, og den andre figuren viser zetapotensialendringen. ....	54
Figur 6.21: Figuren viser hemmingssonene til.....	55
Figur 6.22: Hemmingssonene ved bruk av disk- og brønndiffusjon metodene .....	57
Figur 6.23: Oppsettet som ble brukt ved bruk av disk- og brønndiffusjon metodene .....	57
Figur 6.24 Vekstkurve av <i>P. aeruginosa</i> .....	59
Figur 6.25 Vekstkurve av <i>S. aureus</i> .....	60

## Liste over tabeller

Innholdsfortegnelse .....	vi
Tabell 3.1: Oversikt over brukte lipider.....	16
Tabell 3.2: Oversikt over brukte bakterier.....	17
Tabell 3.3: Oversikt over brukte modelsubstans.....	17
Tabell 3.4: Oversikt over kjemikalier som ble brukt i oppgaven.....	18
Tabell 3.5: Oversikt over instrumenter og utstyr brukt under liposomproduksjonen .....	19
Tabell 3.6: Oversikt over instrumenter og utstyr brukt ved måling av partikkelstørrelse og zetapotensiale .....	19
Tabell 3.7: Oversikt over instrumenter brukt under mikrobiologiske tester .....	19
Tabell 3.8: Oversikt over diverse utstyr som ble brukt i forsøkene.....	20
Tabell 4.1: Innstillinger brukt ved måling av partikkelstørrelse.....	25
Tabell 4.2: Innstillinger brukt ved måling av zetapotensiale.....	25
Tabell 4.3: Innstillinger brukt ved måling av absorpsjon for både <i>P. aeruginosa</i> og <i>S. aureus</i> . .....	27
Tabell 4.4: Konsentrasjonene (volum/volum) som ble benyttet i studien for DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin. Stammløsning (fortynning 1) ble laget til 50 µL/mL.....	29
Tabell 4.5: En oversikt over innholdet i kammerobjektglassene ved uttesting av <i>S. aureus</i> biofilm. ....	31
Tabell 5.1: Oversikt over liposomformuleringene som ble produsert under etablering av fremstillingsmetoden .....	34
Tabell 5.2: Oversikt over de ulike modelsubstansene som ble innkapslet og konsentrasjonene som ble brukt i hydreringsmediet (5 mM fosfatbuffer, pH = 7). .....	34
Tabell 6.1: Diameteren, PDI og zetapotensiale målt ved bruk av Zetasizer .....	38
Tabell 6.2: Diameteren, PDI og zetapotensiale målt ved bruk av Zetasizer .....	43
Tabell 6.3: Diameteren, PDI og zetapotensiale målt ved bruk av Zetasizer .....	46
Tabell 6.4: Diameteren, PDI og zetapotensiale målt ved bruk av Zetasizer .....	49
Tabell 6.5: Oversikt over hemmingssonene til tre ulike bakterier ved bruk av henholdsvis diskdiffusjon- og brønndiffusjonstest.....	56
Tabell 6.6: Oversikt over hemmingssonene til tre ulike bakterier ved bruk av henholdsvis diskdiffusjon- og brønndiffusjonstest.....	58
Tabell 6.7: CFU/mL i de originale <i>P. aeruginosa</i> bakteriekulturene som ble utsatt for DPPC/ 2.5% DPTAP med og uten innkapslet gentamicin.....	61
Tabell 6.8: CFU/mL i <i>S. aureus</i> bakteriekulturene som ble utsatt for DPPC/ 2.5% DPTAP med og uten innkapslet gentamicin.....	62

## Forkortelser

AMP = Antimicrobial peptides (antimikrobielle peptider)  
BAI = Biofilm assosierte infeksjoner  
CFU = Colony forming unit (kolonidannende enhet)  
CQAs = Critical quality attributes (Kritiske kvalitetsegenskaper)  
CR-BSI = Catheter-related bloodstream infection (kateter relatert blodstrøm infeksjon)  
DLS = dynamisk lysspredning  
DPPC = 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine  
DPPG = 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)  
DPTAP = 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt)  
*E. coli* = *Escherichia coli*  
EPS = ekstracellulære polymersubstanser  
ESCMID = European Society of Clinical Microbiology and infectious Diseases  
KCl = Kaliumklorid  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = Kaliumhydrogenfosfat  
LB = Luria-Bertani buljong  
MBIC = Minimum biofilm inhibitory concentration (minste biofilm hemmende konsentrasjon)  
MIC = Minimum inhibitory concentration (minste hemmende konsentrasjon)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = Dibasisk natriumfosfat  
NaCl = Natriumklorid  
NPDDS = Nanoparticulate drug delivery systems (nanopartikkel legemiddel leveringssytemer)  
*P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*  
PBS = Phosphate-buffered saline (fosfatbufret saltvann)  
PDI = Polydispersitetsindeks  
rpm = Rounds per minute (omdreiningshastighet)  
*S. aureus* = *Staphylococcus aureus*  
*S. mutans* = *Streptococcus mutans*  
Tc = Lipid transition temperature (lipid faseomvandlingstemperatur)  
TSB = Trypto-casein soy buljong  
Ø = diameter



## 1. INNLEDNING

### 1.1 Bakgrunn

Mikroorganismer kan feste seg til ulike overflater og utvikle mikrokolonier kjent som biofilmer (1). Biofilmbakterier kan differensieres fra frittflyttende bakterier fordi de er innkapslet i en matrix bestående av: ekstracellulære polymersubstanser (EPS), polysakkarider, nukleinsyre og proteiner (2, 3). Bakterier i biofilmer kan bli opptil 10 – 1000 ganger mer motstandsdyktig mot antibakterielle midler enn planktoniske bakterier (4) og de har høyere toleranse mot kroppens immunceller (5). Dette beskyttende miljøet i biofilmen har resultert i vanskeligheter for å kontrollere biofilmbakterier både innen medisinske og industrielle omgivelser.

Ifølge USAs National Institutes of Health (NIH) assosieres biofilmer med 80% av mikrobielle infeksjoner i kroppen, samt er det anslått at biofilmer er assosiert med 65% av nosokomiale infeksjoner (sykehusinfeksjoner) (6). Biofilmer kan også forårsake kroniske vevsinfeksjoner som cystisk fibrose (7), og i tillegg kan dannes på ulike medisinske implantater som katetre og hofteproteser (6, 8). På grunn av deres evne til å unnsnippe antibakterielle midler og immunforsvaret, kan disse infeksjonene behandles kun ved fjerning av implantatet, og dermed økes traumet for pasienten samt helsekostnadene for samfunnet (8). Det er nødvendig å forstå hvordan biofilmer oppfører seg for å sikre og optimalisere antibiotikabehandlingen av biofilminfeksjoner. Toleransen biofilm viser mot antibiotika er multifaktoriell; penetrering av antibiotika er begrenset, bakteriene proliferer saktere og det uttrykkes biofilmspesifikke gener. Etersom biofilmer har en økt toleranse for antimikrobielle midler kan det være nødvendig med en høyere konsentrasjon av antibiotika. Per i dag finnes det ikke noen fast bestemte retningslinjer for antibiotikabehandling av biofilmer (9). Konvensjonelle antibiotika brukes, men har ofte dårlig effekt i bekjempelsen av biofilminfeksjoner (9). Suboptimal antibiotikabehandling vil også føre til økt utvikling av antibiotikaresistens.

Antibiotikaresistens er et økende samfunnsproblem og det er derfor viktig å forebygge videre resistensutvikling (10). Multiresistens er et problem som kan resultere i at harmløse infeksjoner kan bli livstruende der ingen antibiotika har effekt lenger (10). Blant årsakene til antibiotikaresistens er overforbruk av konvensjonelle antibiotika (10), samt langvarig antibiotikakurer (11). Oppdagelse og utvikling av nye antimikrobielle midler de siste årene har vært nesten fraværende (12) og legemiddelformuleringer med nanopartikler kan være et alternativ for å endre farmakokinetikken og -dynamikken til tradisjonelle antibiotika. Nanopartikler har det potensialet til å kunne kapsle inn virkestoff og frakte det til et bestemt målsted, som for eksempel biofilmer, og oppkonsentrere antibiotikakonsentrasjonen ved målstedet (12), samtidig som konsentrasjonen i resten av kroppen reduseres. På denne måten kan bivirkningene reduseres og en eventuell økning av antibiotika dosen for økt antimikrobiell effekt muliggjøres (13). Ved å bruke nanopartikulære legemiddel leveringssystemer for å forbedre og/ eller endre egenskapene til antibiotika så kan det øke sjansen for et vellykket antibiotikaregime samt forsikre en høyere eradikasjonsrate.



På grunn av problematikken rundt antibiotikaresistens er det gjort mye forskning etter nye antimikrobielle stoffer. En gruppe stoffer som har vist å ha stort potensiale er antimikrobielle peptider (AMP, sett inn ref her). De fleste AMP er bredspektrede og kan overkomme antibiotikaresistens mekanismer som bakterier kan utvikler (10). Tross flere terapeutiske fordeler med AMP, har disse stoffene dårlig stabilitet og kort halveringstid (10). Utvikling av legemidler basert på proteiner og peptider er generelt svært utfordrende da disse stoffene er svært sensitive både *in vitro* og *in vivo* (10). I den forbindelse har det blitt foreslått bruk av nanopartikulære formuleringer for å løse disse utfordringene (14). Bakgrunn for denne oppgaven var derfor å undersøke muligheten for utvikling av nanopartikulære formuleringer for levering av AMP mot biofilmer.

## 1.2 Hensikt med oppgaven

Den overordnede hensikten med oppgaven var å utvikle liposomformuleringer som kunne kapsle inn antibakterielle peptider for levering mot bakterielle biofilmer og dermed gi antibakteriell effekt. I denne oppgaven ble det brukt velkjente, peptidbaserte antibiotika som modellsubstanser for innkapsling. Oppgaven ble delt i to deler, hver med følgende delmål:

Første delmål av oppgaven var å undersøke hvilke liposomformuleringer som kunne egne seg for innkapsling av valgte modellsubstanser. I dette formuleringsarbeidet ble det etablert en metode for liposomfremstilling med og uten innkapsling av virkestoff. De beste liposomformuleringene med hensyn til fysikalsk-kjemiske egenskaper og *in vitro* stabilitet ble valgt til videre arbeid (del to av oppgaven).

Andre delmål av oppgaven var å undersøke om virkestoff innkapslet i utvalgte liposomformuleringer hadde en antibakteriell effekt. Dette ble først undersøkt på planktoniske celler ved å måle absorbansen og undersøke om liposomformuleringene hadde en hemmende effekt på bakterieveksten. Deretter ble liposomformuleringen testet på allerede etablert biofilmer. I denne delen av oppgaven var det ønskelig å se om liposomale virkestoff kan resultere i eradikasjon av biofilmer.

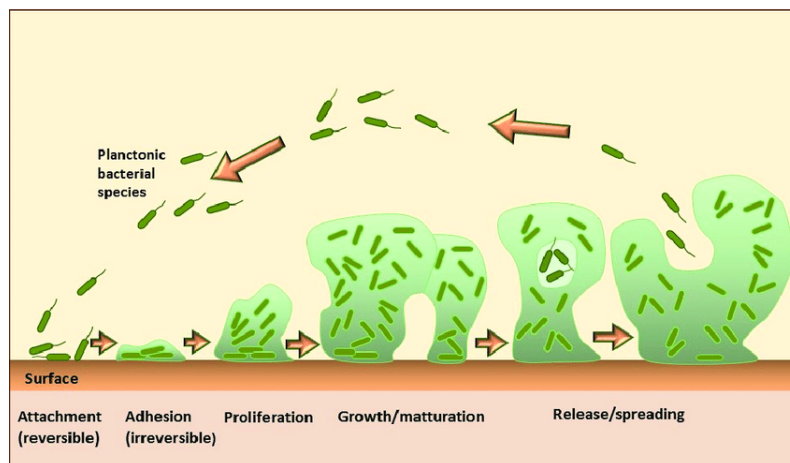
## 2. TEORI

### 2.1 Biofilmer

Tidligere har mikrobiologer studert bakterier som vokser på agar eller i flytende medier. Dermed ble bakteriene sett på som enkle, encellede organismer. Bakterier utenfor laboratoriet vil ofte finnes organisert i komplekse bakteriesamfunn på biologiske eller ikke-biologiske overflater (6, 15). Disse bakteriesamfunnene kalles for biofilmer (3, 6). Biofilmbakterier produserer og innkapsles i en matrix bestående av EPS (ekstracellulære polymersubstans), polysakkarider, nukleinsyre og proteiner (2, 3). Bakteriene i biofilm danner tredimensjonale strukturerte samfunn med vannkanaler som fungerer som et primitivt sirkulasjonssystem. Disse kanalene blir brukt til blant annet transport av ulike signalmolekyler, næringssubstrater og avfallsprodukter (2, 3).

Hver bakterie i biofilmen vil ha et spesifikt mikromiljø som bestemmes av ulike faktorer som tilgjengeligheten til vannkanaler, EPS-matrixen og ulike signalmolekyler. Bakterien resgjiter alt dette og den vil tilpasse seg til de varierende miljøforholdene ved å skru på eller av gener etter behov (2, 3). For eksempel når *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) vokser i biofilm, så vil ca. 20% av genene enten opp- eller nedreguleres i forhold til når den lever i flytende medium (3). Enzymene som produseres av *S. mutans* for å lage polysakkarider vil også variere i mengde avhengig av om biofilmen er moden eller umoden (3). Egenskapene biofilmbakterier har skiller dem fra planktoniske celler både strukturelt og funksjonelt (3). Strukturelt så vil bakterier i biofilmer ses på som flercellede organismer, i motsetning til hvordan det ses på bakterier som encellede når de er fritt flytende (2, 3). Når bakteriene er en del av en biofilm så vil det være mulighet for fenotypisk differensiering for at biofilmen skal takle forskjellige miljøforhold (2, 3). De ulike bakteriene kan ha ulike oppgaver som: ① feste seg til forskjellige overflater ved bruk av ulike reseptor-ligand interaksjoner. ② produsere EPS. ③ ha en rask eller en langsommere delingsprosess avhengig av miljøforholdene. ④ forbli festet til overflater eller «slippe» løs slikt at hele biofilmen eller noen av bakteriene forflytter på seg (7).

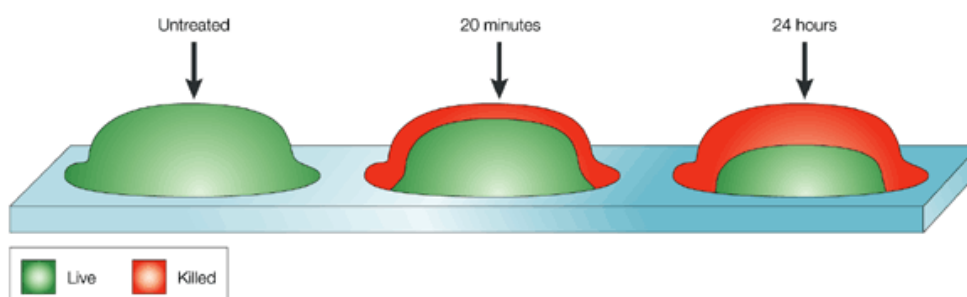
Dannelsen av biofilmer består generelt av fem trinn (figur 2.1). ① Planktoniske celler fester seg til en overflate ved bruk av fimbriae, flagella og pili, samt van der Waals-krefter mellom bakteriecellene og overflaten (16, 17). Dette steget kan deles inn i to kategorier; reversibel og irreversibel feste. ② Festet er irreversibel når bakteriecellene starter å dele seg og begynne å danne EPS-matrixen (16, 17). ③ Når EPS-matrixen produseres så vil etter hvert flere bakterier bli en del av biofilmen, enten fra det ytre miljøet eller ved at bakteriene i selve biofilmen begynne å proliferere seg (16). ④ Bakteriene i biofilmen kommuniserer med hverandre og cellene differensieres slikt at de ulike cellene har ulike funksjoner etter behov. ⑤ Etter at biofilmen har formert seg og modnet (16, 17) vil cellene i biofilmen begynne å spre seg til omgivelsene (16, 17). Dette kan skyldes ulike faktorer som mangel av næringsstoffer eller for stor populasjon (16, 17). Spredningen kan forekomme i hele biofilmen eller kun enkelte områder (16). Denne frigjøringen av planktoniske celler kan igjen resultere i formering av nye biofilmer andre steder.



**Figur 1.1: Oversikt over biofilm dannelsen**

Biofilmdannelse er en kompleks prosess som involverer ulike trinn. Hvert trinn har unike egenskaper som må tas i betraktning ved utvikling av biofilmbehandlinger. Figur hentet fra Rukavina et al. (18)

Når bakterier er i deres planktoniske form vil de ha forholdsvis høy celledelingshastighet (2, 6). Derimot når de er en del av en biofilm så vil veksten være langsommere på grunn av mindre adgang til næringsstoffer og konkurranse med andre bakterier (6). Det kan være flere ulike årsaker til hvorfor bakterier danner biofilmer. Biofilm dannelse kan forsterke toleransen bakterien har mot harde miljøforhold. Ved å feste seg til en overflate som en biofilm, istedenfor som en enkelt celle, er de beskyttet mot å bli vasket bort med vannstrømning. Celler i biofilmer kan være 10 000 ganger mer resistente mot antibiotika enn de samme bakteriene i planktonisk form (2, 6). Bakgrunnen for resistensen kan være mange og penetrasjon av antibiotika til alle delene av biofilmen, er en av disse faktorene. Tykkelsen på biofilmer kan variere, og i vev kan de være fra 4-200  $\mu\text{m}$ , og på fremmedlegemer kan de være mellom 5-1200  $\mu\text{m}$  (9). EPS-matrixen kan fungere som et beskyttende lag mot antibakterielle midler ved å redusere diffusjon av virkestoffene (2, 6). Utenom dette kan stor celletetthet resultere i redusert av absorpsjon av antibiotika til de innerste bakteriene i biofilmen (2). Dette kan føre til at kun de ytterste cellene blir drept, mens de resterende innerste bakteriene forblir levende (2). I en klinisk sammenheng kan dette resultere i tilbakefall av infeksjonen (figur 2.2).



**Figur 2.2: Behandling av biofilmer med antibiotika**

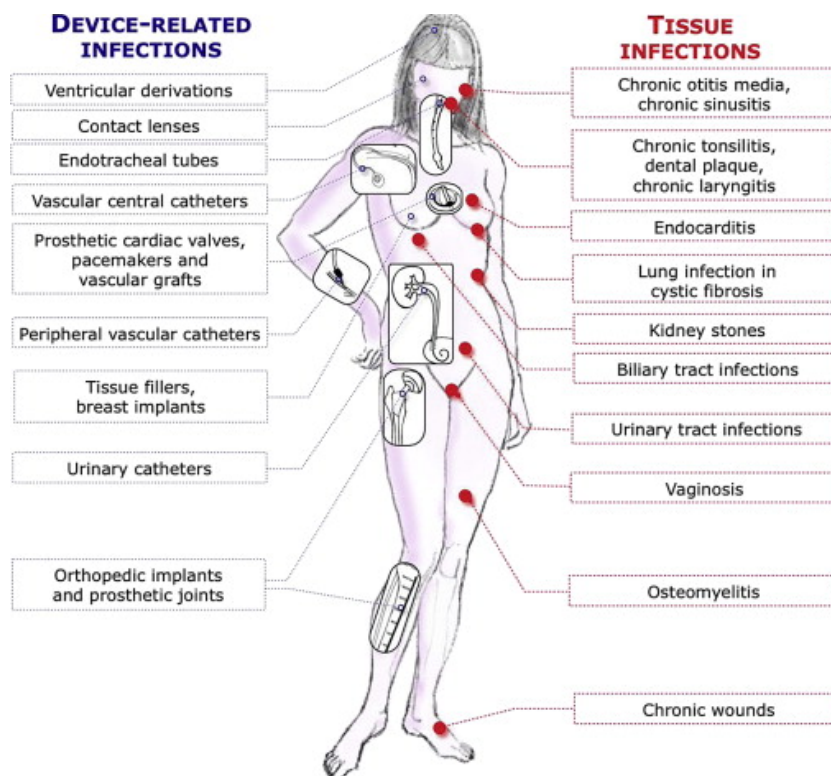
Bruk av konvensjonell antibiotika på biofilm infeksjoner kan ofte resultere i en ufullstendig behandling. Dette kan resultere i at bakterier som ikke blir drept kan fortsette infeksjonen etter behandlingsstopp av antibiotikumet. Den initiale behandlingen vil være effektiv mot det ytterste laget, men bakteriene som ligger innerst vil forbli aktive. Figur hentet fra Davies (2).

Når bakterier er i biofilm vil mobiliteten reduseres. Dette kan være en fordel for plasmid utveksling via konjugering noe som vil fremdrive antibiotikaresistens (16). Det er ulike gener som reguleres i de ulike trinnene i biofilmdannelsen og dette koordineres av ulike signalsystemer som tillater bakteriene å kommunisere med hverandre. Kommunikasjonen vil sette i gang kaskader av reaksjoner som resulterer i aktivering eller hemming av transkripsjonen av ulike gener (3). En av mekanismene som bakterier bruker for å kommunisere med hverandre er quorum-sensing, en mekanisme som «overvåker» celletettheten og regulerer den kollektive atferden til biofilmbakteriene (16).

Bakterier i biofilm er langt mindre sensitive for vertens immunforsvar; både det medfødte og det ervervede, samt antibakterielle midler, enn når de lever i flytende medium (6). Strukturen til biofilmen resulterer i at immunresponsen rettes kun mot antigener som uttrykkes på overflaten av biofilmen. Dette fører til en immunaktivitet kun på overflaten av biofilmen (6). Serumproteiner klarer heller ikke å penetrere biofilmen, så de innerste bakteriene er trygge mot immunangrepet (6). Fagocytene som er en del av immunresponsen vil heller ikke klare å fagocyttere biofilmer på grunn av deres komplekse struktur (6). Alt dette resulterer i en mislykket immunrespons samt aktivering og frigjøring av ulike pro-inflammatoriske enzymer og cytokiner som fører til inflammasjon og i verste fall ødeleggelse av nærliggende vev (6).

## **2.2 Biofilmassosierte infeksjoner og legemiddelbehandling**

Biofilmer er ofte forbundet med typiske kroniske infeksjoner. Det betyr at infeksjonen vedvarer tross antibiotikabehandling og ulike immunforsvar mekanismer (9). BAI (biofilmassosierte infeksjoner)(figur 2.3) kan være vevsinfeksjoner som tidligere nevnt cystisk fibrose med kronisk lungeinfeksjoner, kroniske sårinfeksjoner (7, 19-21) eller infeksjoner assosiert med medisinske implantater (for eksempel ortopediske proteser, katetre, ventilatorer) (1, 6, 8, 15, 22-27). BAI kjennetegnes ved vedvarende og progressiv patologi som skyldes hovedsakelig den langvarige inflammatoriske responsen (9). Det finnes foreløpig ingen retningslinjer for å hjelpe klinikere som står ovenfor BAI. Det nærmeste man kommer en retningslinje er ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and infectious Diseases) sin studie (9) som beskriver kunnskapene vi har samlet så langt om biofilmer. Tradisjonelt har mikrobiologer fokusert på å dyrke og undersøke planktoniske mikroorganismer (9). Dermed har all testing av antibiotika vært på planktoniske bakterier og ikke biofilmer. Dette har resultert i dårlig informasjon om den antibakterielle effekten til ulike antibiotika på biofilmer (9). Antibiotikabehandling av biofilmer basert på følsomhetstesting av planktoniske bakterier kan ha vært en medvirkende årsak til behandlingssvikt eller/ og tilbakefall av infeksjonen. Dette kan igjen ha resultert i videre utvikling av antibiotikaresistens.



**Figur 2.3: Oversikt over ulike type BAI**

Oversikten er delt inn mellom infeksjoner relatert til medisinske implantater (venstre panel) og vevsinfeksjoner (høyre panel). Figur hentet fra Høyby et al. (9).

Vedvarende lokal betennelse der infeksjonen ligger er det eneste fellestrekket for BAI. Andre symptomer kan variere avhengig av organet eller det fremmedlegemet som har blitt angrepet. Mangel på spesielle symptomer er en av grunnene som gjør at biofilmer er vanskelig å diagnostisere og behandle (9). Utenom det er det store vansker med å avgjøre om en infeksjon er biofilmrelatert eller om det er en akutt infeksjon som skyldes planktoniske mikroorganismer. Dermed er det BAI i klinisk praksis vanskelig å behandle. Ved å forbedre diagnostikken av BAI, vil det bidra til å lettere skille mellom BAI og akutt planktoniske infeksjoner. Dette kan forbedre behandlingsregimet som gir bedre eradikasjonsrate av bakteriene (7).

Antibiotika kan brukes på ulike måter; ① *profylaktisk*, som vil si å forhindre infeksjoner før pasienten er smittet. Profylaktisk behandling settes i gang om det er høy risiko for infeksjon etter, for eksempel kirurgiske inngrep med fare for sårinfeksjon. ② *Preemptiv behandling*, der det oppdages mikroorganismer, i for eksempel slimhinnene, men det har ennå ikke blitt utviklet en alvorlig infeksjon. I slik type behandling så vil antibiotikumet blir gitt etter mikroorganismene har trent seg inn, men før symptomene på infeksjon kommer. En slik type behandling brukes for eksempel for eradikasjon av *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) kolonisering i lungene hos cystisk fibrose pasienter for å forebygge BAI. ③ *Empirisk behandling* er basert på klinisk diagnose, men uten kjennskap til mikroorganismen som har forårsaket infeksjonen. Behandlingen som velges dekker som oftest de mest sannsynlige mikroorganismene i den spesifikke situasjonen (for eksempel Stafylokokker og *Escherichia coli* ved CR-BSI (kateter relatert blodstrøm infeksjon)). ④ *Definitiv behandling* er basert på kliniske diagnoser med kjennskap om mikroorganismen som har forårsaket infeksjonen, samt om det er blitt gjort mottakelighetstesting.

Hvilket behandlingsvalg og hva som anbefales er avhengig av type infeksjon og bakterier. ESCMID beskriver i deres retningslinjer at orale eller intravenøse antibiotika kan være effektive mot enkelte BAI men ikke alle (9). De står ikke beskrevet hvilken type BAI som kan behandles. Insidensen av kirurgi-relatert BAI kan forebygges ved profylaktisk perioperativ antibiotikabruk (9). For pasienter med urinkateter, kan kortvarig antibiotikabehandling utsette BAI (28, 29), men det er ikke anbefalt med en profylaktisk behandling når det er fare for infeksjon forårsaket av multiresistente bakterier (30, 31). Ulike studier (32-34) har konkludert med at det ikke er noen bevis som tilsier at systemisk behandling med antibiotika kan forebygge BAI i sår-relaterte infeksjoner. Kroniske urinveisinfeksjoner og kronisk *P. aeruginosa* lungeinfeksjoner i cystisk fibrose kan ikke forebygges ved bruk av profylaktisk behandling (9). For pasienter som bruker kateter i en kort periode, kan BAI forebygges ved å bruke/tilføre et antibakterielt belegg på kateteret (9). To ulike studier har vist gode resultater som sier at forebygginger tilstrekkelig for å forhindre BAI ved kortvarig kateter bruk, særlig om kateteret belegges med det antibakterielle stoffet nitrofurantoin (28, 35).

Nye metoder for å behandle BAI kan være å inducere cellene i biofilmen til å gi slipp. På denne måten vil de igjen gå tilbake til den planktoniske formen (2). For å muliggjøre dette må signalmolekyler som fremmer biofilmdannelse i første omgang identifiseres. Andre angrepspunkter kan være å forhindre kommunikasjonen mellom cellene i biofilmen (quorum-sensing) (2). Dette kan bidra til at biofilmen mister noe av dens stabilitet ved å hemme kommunikasjonen som bidrar til samarbeidet (16). Den største utfordringen i behandlingen av biofilmer er å overkomme resistens og toleranse mot antibakterielle virkestoffer. Det er et presserende behov for innovative strategier for å klare og overvinne disse problemene. En mulig løsning er bruken av nanopartikler som et leveringssystem av nye antimikrobielle legemidler.

### **2.3 Nanopartikler som legemiddelleveringssystem**

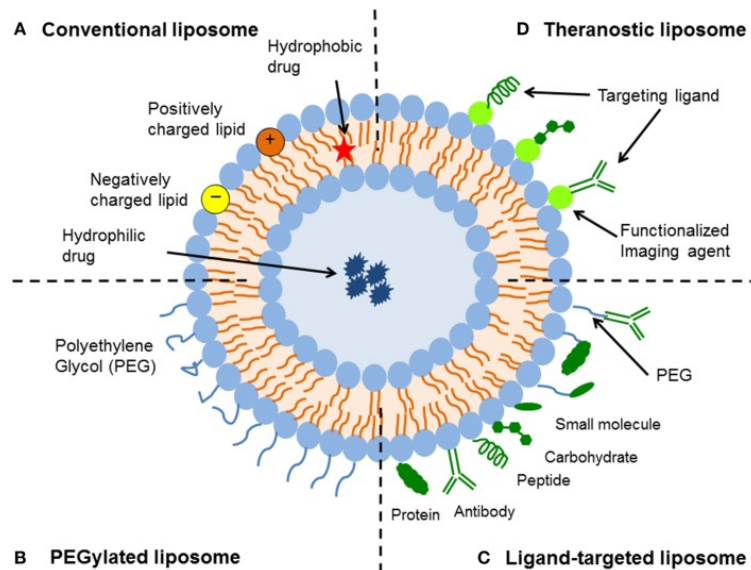
Nanopartikler er kolloidale partikler med størrelse mellom 10-1000nm (36). I nanoskala vil materialer få endrede egenskaper sammenlignet med det samme materialet i makroskala (36). Det er spesielt to ulike effekter som påvirker *in vivo* oppførsel: økt overflateareal og kvanteeffekten (13). Når partikkelstørrelsen reduseres vil en større andel av atomer befinne seg på overflaten av partikkelen sammenlignet med innsiden. Dette resulterer i at nanopartikler har en mye større overflate areal per masseenheter sammenlignet med partikler i større størrelse (13). Når materiale er i nanoskala vil egenskaper som smeltepunkt, fluorescens, elektrisk konduktivitet og kjemisk reaktivitet endres på som funksjon av partikkelstørrelsen (13).

I de siste tiårene har antall studier som omhandler forebygging av biofilm samt eradikasjon av biofilmer ved bruk av nanopartikler økt betraktelig. Særlig har fokuset på lipid- og polymer nanopartikler blitt ett attraktivt tema. Den generelle fordelene med nanopartikler er deres fleksible egenskaper; de kan bestå av biokompatible materialer, de kan overflatemodifiseres, de kan produseres med en bestemt frigjøringsprofil av virkestoffet, og de kan formuleres til å innkapsle både hydrofile og lipofile virkestoffer (37). I forbindelse med behandling av BAI kan bruk av nanopartikler ha flere ulike fordeler. Antibiotika kan binde seg til ulikt biofilm

matrix-materiale, samt kan ulike enzymer inaktivere antibiotikumet (37). Dannelsen av biofilm kan vanskeliggjøre behandlingen av infeksjoner med konvensjonell antibiotika. Antibiotika molekyler kan binde seg til ulikt biofilm matriks-materiale, samt kan ulike enzymer inaktivere antibiotikumet. Bakterier utvikler transmembran pumper, som p-glykoprotein og multi-virkestoff resistens assosierte proteiner som aktivt pumper ut fremmedstoffer fra cellen, inkludert antibiotika (13). Biofilm dannelsen vil redusere legemiddelopptaket i cellen som kan gi en ufullstendig behandling og eventuelt føre til resistensutvikling. Noen av disse problemene reduseres ved å innkapsle antibiotika i nanopartikler. I nanopartikler er virkestoffet beskyttet mot efflukspumper og absorpsjon av virkestoffet inn i biofilmen kan oppnås. Levering av antibiotika til biofilmen i nanopartikler kan tilpasses ved: ① bruk av eksterne triggere som pH, temperatur eller nanopartikler som frigjør virkestoffet når de utsettes for ultralyd (13). ② Modifisert overflateladning på nanopartiklene, for eksempel positiv ladde nanopartikler kan ha bedre affinitet til bakteriens negativt ladde cellemembran (13). ③ Reseptorer på overflaten av nanopartiklene vil gi en økt spesifisitet til en bestemt target (13). På grunn av nanopartiklenes fleksibilitet er de spesielt egnet som legemiddelleveringssystem til komplekse strukturer som bakterielle biofilmer.

### **2.3.1 Liposomer**

Det finnes mange ulike typer nanopartikler, med tanke på form, størrelse og sammensetning. Liposomer er en type nanopartikkel som er basert på lipider, som oftest fosfolipider (38). Liposomstørrelsen kan variere fra veldig små (25 nm) til store (2500 nm) vesikler (39). Dessuten kan liposomer inneholde en eller flere dobbeltlag som skaper adskilte vandige miljøer (39). Vesikkelstørrelsen er en viktig parameter påvirker sirkulasjonstiden og halveringstiden for liposomene (38-40). Både størrelse og antall dobbeltlag påvirker innkapslingseffektiviteten til liposomene (38-40). Den unike evnen liposomale systemer har til å bære både lipofile og hydrofile virkestoffer gjør det mulig å innkapsle et mangfoldig utvalg av virkestoff i liposomvesikler (38-40). Hydrofobe molekyler kan innkapsles i det lipofile dobbeltlaget, og hydrofile molekyler kan bli fanget i den vandige kjernen (38, 40). Liposomegenskapene er avhengig av lipidsammensetning, overflateladning, størrelse og fremstillingsmetode (39, 40). Figur 2.4 viser de ulike type liposomale leveringssystemer. Det er variant (A) konvensjonell liposom som er hovedfokuset i denne oppgaven.



**Figur 2.4: En skjematisk fremstilling av ulike liposomale leveringsystemer**

(A) viser den konvensjonelle liposomvarianten. Liposomer består av et lipid-dobbeltegg som kan være sammensatt av kationiske, anioniske eller nøytrale lipider og som omslutter en vandig kjerne. Både lipid-dobbeltegget og den vandige kjernen kan innkapsle henholdsvis hydrofobe eller hydrofile forbindelser. Figur hentet fra Sercombe et al. (38).

Det har blitt rapportert en forbedret effekt av antimikrobielle midler innkapslet i liposomer der innkapslede virkestoff har en lavere MIC (minste hemmende konsentrasjon) og/ eller MBIC (minste biofilm hemmende konsentrasjon) sammenlignet med ikke-innkapslet virkestoff (37, 41). En lenger kontakttid mellom virkestoff og biofilmbakteriene kan være en av årsakene til den forbedrede antibakterielle effekten. Dette kan oppnås ved å bruke liposomer med motsatt overflateladning enn overflateladningen på biofilmer (elektrostatisk interaksjoner) (37).

Liposomer interagerer med celler på ulike måter: ① liposomer kan interagere med ulike reseptorer på bakteriecellens overflate, ② absorpsjonen kan skje ved elektrostatisk interaksjoner, ③ liposomene kan smelte sammen med cellemembranen og frigjøre virkestoffet direkte i bakteriecellen eller ④ liposomene frigjør innkapslet virkestoff ved endocytose (42). Type interaksjon og omfang av interaksjonen er avhengig av ladningen på liposomoverflaten. Ved å endre på lipidsammensetningen kan omfanget av interaksjon endres. Liposomer kan produseres til å være nøytralt, positivt eller negativt ladd. Mangel på overflateladning kan resultere i større grad av aggregering og dermed dårligere fysisk stabilitet av liposomformuleringen (42). Liposomer uten overflateladning kan få mindre elektrostatisk interaksjoner med celler, som resulterer i dårligere målretting (42-44). Ved å tilføre overflateladning på liposomer vil det resultere i avstøtende krefter mellom individuelle liposomer på grunn av zetapotensialet. Dette vil føre til hindring av aggregering og flokkulering (42).

Det er to grunnleggende kilder til fosfolipid produksjonen: syntetisk eller vevsavledet fra dyr. Vevsavlede lipider er enten avledet av egg eller bovin, men for klinisk bruk er ingen av disse egnet på grunn av stabilitetsproblemer (45). Lipider derivert fra dyr har ikke noe særlige fordeler over syntetiske lipider. De er



mindre stabile på grunn av flere umettede fettsyrer, og ofte koster syntetiske lipider det samme eller mindre (45). Syntetiske lipider kan fremstilles fra glyserol eller glysero-3-fosfokolin (GPC) derivert fra planter eller animalske kilder (45). Sist nevnte blir ofte omtalt som halvsyntetisk, ettersom en del av molekylet har opphav fra en naturlig kilde (45). Syntetiske lipider vil oftest ha høyere renhet enn naturlige eller semisyntetiske lipider (45).

DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) er et nøytralt fosfolipid som består av to palmitinsyre-kjeder festet til et fosfatidylkolinhode (figur 3.1). DPPC har et lipid faseomvandlingstemperatur ( $T_c$ ) på 41.3 °C. Lipider kan eksistere i ulike tilstander avhengig av temperaturen (46). Når temperaturen stiger over  $T_c$  vil de skifte tilstand til en som er mer permeabel for vann. Når temperaturen stiger over 41.3 °C vil DPPC gå over til en mer flytende tilstand og vil ikke lenger være i sin solide gelform (46). Jo høyere temperaturen er over  $T_c$  jo større vil lastekapasiteten til DPPC være (47). Det er viktig å være oppmerksom på at ved en alt for høy økning av  $T_c$  kan det resultere i større lekkasje av innkapslet virkestoff (47). Ulike ladede lipider kan brukes for å oppnå ønsket ladning på liposomoverflaten. DPTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) er et godt brukt kationisk lipid som kan brukes for å produsere positivt ladde liposomer. For negativ ladde liposomer kan DPPG (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) ), et anionisk lipid, brukes.

## 2.4 Karakterisering av liposomer

Egenskapene til liposomer påvirker deres oppførsel både *in vitro* og *in vivo*. Ved å karakterisere de ulike egenskapene til nanopartiklene som for eksempel zetapotensiale, partikkelstørrelse, molekylvekt, polydispersitetsindeks (PDI), pH og konduktivitet så får vi informasjon om stabiliteten til formuleringen. Denne informasjonen kan gi en indikasjon om hvordan formuleringen vil oppføre seg *in vivo*. I denne oppgaven ble det bestemt å kun teste partikkelstørrelse, PDI og zetapotensiale for de produserte liposomformuleringene.

### 2.4.1 Partikkelstørrelse og PDI

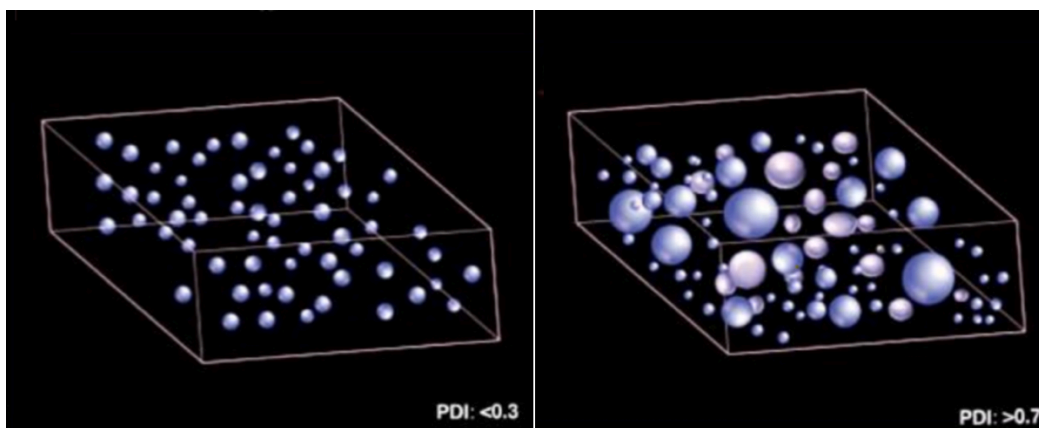
Partikkelstørrelse og størrelsesfordeling er kritiske faktorer som sier noe om hvordan nanopartikler vil oppføre seg. Kjennskap til partikkelstørrelsen vil være med på å avgjøre om liposomene vil ha evnen til å penetrere ulike fysiologiske barrierer i kroppen, og om de vil interagere med cellemembraner (48). Cellemembraner kan ha ulike type celleforbindelser; der noen er tette, og andre vil være løsere. Store partikler vil ha større vansker med å krysse okkluderende celleforbindelser enn celleforbindelser som er løsere (48, 49). Dermed er partikkelstørrelse en avgjørende faktor for type biologiske barrierer partiklene kan krysse. Biofilmer kan ha varierende tykkelse fra 4-200  $\mu\text{m}$  i vev, og 5-1200  $\mu\text{m}$  på fremmedlegeme (9). Ved å velge riktig partikkelstørrelse kan det resultere i akkumulering av nanopartikler i biofilm (50, 51). Legemiddelfrigjøringen vil være avhengig av både innkapslingseffektiviteten, men også størrelsen på liposomene (48, 49). Større liposomer vil gi muligheten til å innkapsle en større mengde virkestoff, enn mindre liposomer så lengde det er en høy innkapslingseffektivitet.

Partikkelstørrelsen kan bestemmes ved bruk av dynamisk lysspredning (DLS). Metoden går ut på å sende lys fra en laser gjennom en prøve. Dette vil resultere i at partiklene i prøven sprer lyset i alle retninger og denne spredningen detekteres (52). I en suspensjon vil alle partiklene være i konstant bevegelse som skyldes kollisjoner mellom de ulike molekylene (52). Disse bevegelsene kalles for brownske bevegelser (52). Hastighet på bevegelsene er avhengig av partikkelstørrelsene der store partikler beveger seg i lavere hastighet enn mindre partikler (52). DLS måler lysspredningen til partiklene kontinuerlig og dermed er det mulig å detektere intensitetsforandringer som oppstår på grunn av partiklenes bevegelser (52). Forholdet mellom størrelse og bevegelseshastigheten til partikkelen som skyldes brownske bevegelser er definert av Stokes-Einstein likningen (likning 2.1) (52).

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Likning 2.1})$$

$D_H$  er hydrodynamisk diameter til partikkel,  $k$  er Boltzmann konstant,  $T$  er temperatur i kelvin,  $\eta$  er løsningsmiddelets viskositet og  $D$  er diffusjonkoeffisient.

PDI brukes for å skaffe informasjon om størrelsesfordelingen av partikler i en suspensjon (52). PDI er en parameter som sier noe om bredden av partikkelstørrelsesfordelingen. Verdien kan variere mellom 0-1; der 0 vil være en perfekt uniform fordeling, og 1 vil være en prøve med høy polydispersitet (53). I liposomaleformuleringer er det ønskelig med en PDI-verdi på 0.3 eller mindre der det vil indikere en homogen prøve (53). FDA sitt siste utgave av «*Guidance for Industry*» understreker at partikkelstørrelse og størrelsesfordeling er en viktig del av CQAs (critical quality attributes), samt en viktig del i stabilitetsstudier innen liposom produksjonen (53). Det «*Guidance for Industry*» ikke nevner er verdier for akseptabel PDI innen produksjon av liposomer (53). Figur 2.8 viser forholdet mellom størrelsesfordelingen og PDI-verdiene.



**Figur 2.5: Forholdet mellom størrelsesfordeling og PDI-verdi**

Figuren til venstre viser en prøve med PDI under 0.3. Partiklene er av samme størrelse og er monodispers. Figuren til høyre viser en prøve med PDI over 0.7. Prøven inneholder partikler av ulike størrelser og vil være polydispers. Figur hentet fra Danaei et al. (53).

## 2.4.2 Zetapotensiale

De fleste løsninger inneholder ioner; disse kan være positivt eller negativt ladede. Når en ladet partikkel er suspendert i en løsning så vil ioner av motsatt ladning bli tiltrukket til overflaten av den suspenderte partikkelen (52). Det vil si at en ladet partikkel vil tiltrekke seg motioner fra mediet slik at det dannes et elektrisk dobbeltlag rundt partiklene (52). Zetapotensialet er potensialforskjellen mellom partikkelen sammen med motionlaget og den nøytrale delen av mediet (52). Ved å kjenne til zetapotensialet så vil det være mulig å forutsi hvilke interaksjoner partikkelen kan ha med ulike komponenter i kroppen, samt interaksjoner som kan oppstå *in vitro*.

Zetapotensialet til en nanopartikkel blir ofte brukt for å karakterisere overflateladnings-egenskapene til nanopartikkelen. Potensialet reflekterer det elektriske potensialet til partikler og blir påvirket av sammensetningen av partikkelen og mediet partiklene er suspendert i (36). Partikler i en kolloidal dispersjon kan feste seg til hverandre og danne aggregater av en økende størrelse. Dette kan resultere i bunnfall der tyngdekraften vil ha en stor påvirkning. Den kolloidale stabiliteten til en partikkelsuspensjon er dermed påvirket av dens evne til å motstå flokkulering eller aggregering av de andre partiklene i suspensjonen (54). Nanopartikkel dispersjonen kan forbli kolloidalt stabil hvis partiklene har sterke nok frastøtende krefter til å klare å motstå flokkulering eller aggregering (54). Hvis det er lite eller ingen frastøtende krefter mellom partiklene kan det resultere til flokkulering eller aggregering avhengig av størrelsen på kreftene (54). Nanopartikler med zetapotensiale som er mer enn 30 mV eller mindre enn -30 mV har vist seg å være stabile i suspensjoner der overflateladningen forhindrer aggregering av partiklene (36, 52). Ved å måle zetapotensialet over tid så vil det også være mulig å si noe om nanopartiklenes *in vitro* stabilitet. Ulike faktorer som pH-endringer, konsentrasjonsendringer av en komponent i formuleringen og konduktivitet kan endre zetapotensialet til en liposomsuspensjon (55).

Zetapotensialet kan måles ved hjelp av mikroelektroforese. Ved bruk av elektroder måles det hvor raskt partikler med positiv ladning beveger seg mot en negativ ladet elektrode, og hvor raskt en negativt ladet partikkel beveger seg mot en positiv ladet elektrode (52). Deretter brukes Henrys likning (likning 2.2) for å beregne zetapotensialet.

$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(Ka)}{3\eta} \quad \text{(Likning 2.2)}$$

I Henrys likning så er  $\eta$  og  $\varepsilon$  henholdsvis viskositeten og den dielektriske konstanten til løsningsmiddelet ved gitt temperatur,  $U_E$  er elektroforetisk mobilitet,  $z$  er zetapotensialet og  $f(ka)$  er Henrys konstant. Smoluchowski-tilnærming blir ofte brukt for Henrys konstant der  $f(Ka) = 1.5$  (52, 56). Smoluchowski-tilnærmingen brukes for partikler som er større enn 0.2  $\mu\text{m}$  dispergert i elektrolytter som inneholder mer enn  $10^{-3}$  molar salt (52).

## 2.5 Mikrobiologiske analysemetoder

Det finnes ulike type tester for å undersøke den antibakterielle aktiviteten av forskjellige substanser. Noen av de mest brukte er diskdiffusjon og brønndiffusjon tester (57). Begge analysemetodene er enkle å gjennomføre og gir resultater etter kort tid. I tillegg er de billige analysemetoder å gjennomføre, samt at resultatene fra analysene er lette å tolke (57). Dette gjør disse analysemetodene ofte brukt innen mikrobiologisk testing av antibakterielle midler. I denne studien ble begge metodene brukt for å teste de ulike antibiotika (polymyxin B, bacitracin og gentamicin) på planktoniske bakterier.

I diskdiffusjonstesten inokuleres ulike bakterier på agarskål med ønsket vekstmedium. Testsubstansene blir pipettert ut på filterpapirdisker og diskene plasseres på agaroverflaten. Alternativt kan det lages brønner i agarplaten som fylles med det ønsket testesubstans (57). Petriskålene blir inkubert under passende forhold. Den antimikrobielle testsubstansen på filterpapirdiskene eller i brønnen vil diffundere ut i agaren og forhindre bakterievekst. Det vil danne en klar hemmingsone rundt papirfilterdisken om det har skjedd en hemming og det vil være mulig å måle diameteren for hemmesonen (57). Ved overgangen mellom området med og uten vekst, er konsentrasjonen av det antibakterielle stoffet omtrent tilsvarende MIC (minste hemmende konsentrasjon) (57). Det vil være mulig å sammenligne eventuelle hemmingssoner med sonene for andre testsubstanser og testorganismer, forutsatt at testene er gjennomført på samme måte.

Ved gunstige forhold (temperatur, pH, tilgang til oksygen) kan mikrober dele seg raskt med en eksponentiell hastighet. Veksthastigheten til bakteriene kan fremstilles ved bruk av en vekstkurve. Bakterien vil inokuleres i et vekstmedium og testsubstans tilsettes. Måling av kolonidannende enheter per mL (CFU/mL) kan gjøres ved blant annet bruk av spektrofotometer der absorbansen måles over en tidsperiode. Om det ikke oppstår vekst vil det antyde bakteriellhemming, og at konsentrasjonen ligger på MIC-verdien eller over (58). Om det forekommer bakteriellvekst så kan det igjen gi viktig informasjon om vekstresponsen ved bruk av konsentrasjoner av testsubstanser under MIC-verdien (58).



### 3. MATERIALER OG INSTRUMENTER

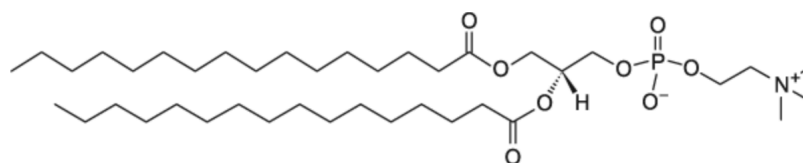
#### 3.1 Materialer

##### 3.1.1 Lipider

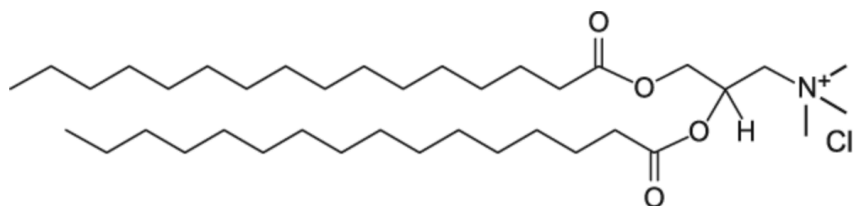
**Tabell 3.1: Oversikt over brukte lipider**

Lipider	T <sub>c</sub> (°C)	Molarmasse (g/mol) <sup>(59-61)</sup>	K-nummer/ batch nummer	Produsent
DPPC	41	734.039	850355P-1G-A-321 850355P-1G-A-323	Avanti. Polar lipids, Inc., USA
DPPG (natriumsalt)	41	744.952	840455P-200MG-B-102	Avanti. Polar lipids, Inc., USA
DPTAP (kloridsalt)	~ -0	646.467	890870P-200MG-A-037	Avanti. Polar lipids, Inc., USA

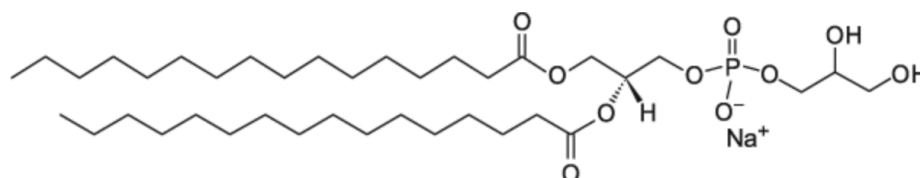
Figur 3.1-3.3 viser strukturene til de ulike lipidene brukt i studiet.



**Figur 3.1: Den kjemiske strukturen av DPPC. Hentet fra Avanti Polar Lipids, Inc. (59).**



**Figur 3.2: Den kjemiske strukturen av det kationiske lipidet DPTAP. Hentet fra Avanti Polar Lipids, Inc (60).**



**Figur 3.3: Den kjemiske strukturen av det anioniske lipidet DPPG. Hentet fra Avanti Polar Lipids, Inc (61).**

### 3.1.2 Bakterier

**Tabell 3.2: Oversikt over brukte bakterier**

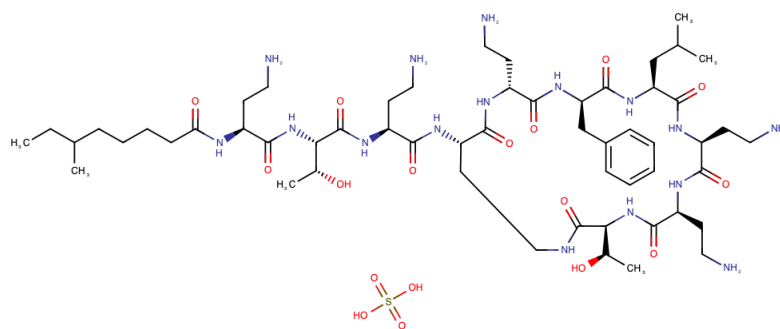
Bakterie	Bakteriestamme	Produsent
<i>E. coli</i>	ATCC259228	American Type Culture Collection, USA
<i>P. aeruginosa</i>	DSM22644	Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Tyskland
<i>S. aureus</i>	DIM2569	Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Tyskland

### 3.1.3 Virkestoff

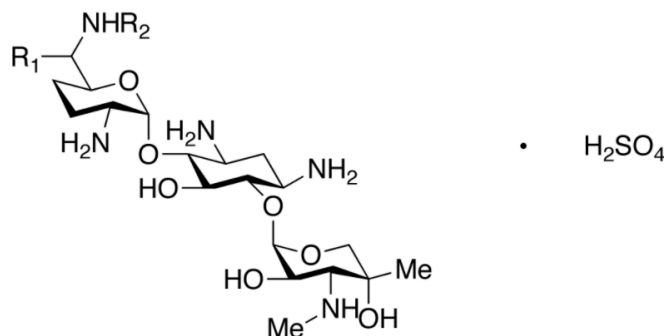
**Tabell 3.3: Oversikt over brukte modellsubstans**

Modellsubstans for innkapsling	Molarmasse (g/mol) (62-64)	K-nummer/ batch-nummer	Produsent
Bacitracin	1422.69	039M4010V	Sigma Aldrich, Israel
Gentamicin sulfat	1488.8	SLBG7734V	Sigma Aldrich, Kina
Polymyxin B sulfat	1385.61	BCBF832V	Sigma Aldrich, Kina

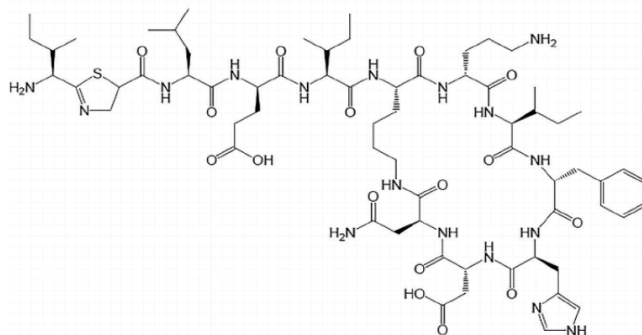
Figur 3.4-3.6 viser strukturene til de ulike modellsubstansene.



**Figur 3.4: Den kjemiske strukturen til polymyxin B sulfat. Figur hentet fra DrugBank (65)**



**Figur 3.5: Den kjemiske strukturen til gentamicin sulfat. Figur hentet fra Toronto Research Chemicals (66)**



**Figur 3.6: Den kjemiske strukturen til bacitracin. Figur hentet fra Althubiani et al (67)**

### 3.1.4 Andre kjemikalier

**Tabell 3.4: Oversikt over kjemikalier som ble brukt i oppgaven**

Andre kjemikalier	Molarmasse (g/mol)	K-nummer/ batch-nummer	Produsent
Benzalkonium chloride	372.028	29H2501	Sigma-Aldrich, Sveits
D-(+)+Glukose anhydrous	180.16	1145614	Fluka Biochemika, Oslo
Di-natriumhydrogenfosfat dihydrat	177.99	BCBZ3887	Sigma-Aldrich, Tyskland
Kloroform	119.38	K27290445	Merck, Tyskland
Maximum recovery diluent	-	1304891	Oxoid, England
Metanol	32.04	1.06035.2500	Merck, Tyskland
Müeller Hinton agar		2216452	Oxoid, England
Natriumdihydrogenfosfat monohydrat	137.99	STPJ0272	Sigma-Aldrich, Tyskland
Natriumklorid	58.44	STBH9672	Sigma-Aldrich, Danmark
Natriumtripolyfosfat	367.86	BCBR7262V	Sigma-Aldrich, Tyskland
Tryptic soy broth	-	1087209	BD, Frankrike
Tryptone Peptone	-	9313005	DIFCO, Frankrike
Yeast extract	-	Y1625	Stigma-Aldrich, Tyskland



## 3.2 Instrumenter

### 3.2.1 Produksjon av liposomer

**Tabell 3.5: Oversikt over instrumenter og utstyr brukt under liposomproduksjonen**

Instrument	Modell	Leverandør
Ekstruder	Mini-extruder	Avanti. Polar lipids, Inc., USA
Filter support for ekstruder	10mm Filter supports	Avanti. Polar lipids, Inc., USA
Membran for ekstruder	Polycarbonate membranes 0.2µm, 10mm	Avanti. Polar lipids, Inc., USA
Membranpumpe	VP 8	VWR international, USA
Rotavapor	Laborta 400-efficient	Heidolph, Tykland
Rotavapor	R-114	Büchi, Sveits
Sprøytefiltre brukt for fosfatbuffer og vann	Millex-GS syringe filter unit, 022µm	Merck Millipore Ltd., Irland
Sprøyter til mini-extruder	Gas-tight syringe, 1000 µl	Avanti. Polar lipids, Inc., USA
Vakuumpumpe	Rotary vane vacuum pump RZ6	Vacuubrand, Tyskland
Vakuumpumpe display	VAP 5	Vacuubrand, Tyskland
Varmeskap	Serie 4000/5000	Termaks, Norge

### 3.2.2 Karakterisering av liposomer

**Tabell 3.6: Oversikt over instrumenter og utstyr brukt ved måling av partikkelstørrelse og zetapotensiale**

Instrument	Modell	Leverandør
Engangskyvetter	Polysterene kyvetter 10 x 10 x 45mm	Sarstedt, Tyskland
Partikkelstørrelse- og zetapotensiale måler	Zetasizer Nano-ZS	Malvern Instruments, England
Standardløsning for zetapotensiale måling	Zeta Potential Transfer Standard -42mV +/- 4.2mV	Malvern Instruments, England

### 3.2.3 Mikrobiologiske tester

**Tabell 3.7: Oversikt over instrumenter brukt under mikrobiologiske tester**

Instrumenter	Modell	Leverandør
Mikroskop	Olympus CX31	Termaks, Norge
Plateleser	VICTOR <sup>3</sup> 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer, USA
Temperatur-shaker	Genie Temp-Shaker 100	Scientific Industries, Inc., USA
UV-VIS spektrofotometer	UV-1201	Shimadzu, Japan
Vortex shaker	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., USA

### 3.2.4 Diverse

**Tabell 3.8: Oversikt over diverse utstyr som ble brukt i forsøkene**

<b>Instrument</b>	<b>Modell</b>	<b>Leverandør</b>
96-brønnplate	Nunc® MicroWell™ 96 well polystyrene plates, clear, flat bottom, 400 µL/well, sterile, 50/cs	Stigma Aldrich, USA
Disk for diskdiskdiffusjonsmetoden	Sterile disks for microbiology	Stigma Aldrich, Tyskland
Finvekt	XT 220A	Precisa, Sveits
Gelfiltreringskolonner	PD-10 desalting columns	GE Healthcare, Tyskland
Kammerobjektglass	Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slide™ system, 1 well, glass slide, 8.6 cm <sup>2</sup> /well. Kode: C6307	Stigma Aldrich, Tyskland
pH meter	PHM210 Standard pH meter	Meterlab, England
Plate for VICTOR <sup>3</sup>	VisiPlate-24 TC, White 24-well Microplate with Clear Bottom	Nerliens Meszansky, Norge



## 4. METODER

### 4.1 Tillaging av løsninger

5mM fosfatbuffer (pH = 7): 345 mg av natriumdihydrogenfosfat monohydrat og 445mg av dinatriumhydrogenfosfat dihydrat ble veid på veiepapir og overført til en 1 L målekolbe. Saltene ble løst med litt destillert vann, deretter ble det tilsatt destillert vann omtrentlig 1 L-merket på målekolben. Litt av løsningen ble overført til et målebeger, pH ble målt og justert til 7 om nødvendig ved bruk av natriumhydroksid oppløsning (2 mol/L) eller saltsyre (2 mol/L). Målekolben ble fylt til 1 L merket med destillert vann. Fosfatbufferen ble overført til en ren og støvfri 1 L glassflaske med kork og oppbevart i kjøleskap (4 °C).

Benzalkoniumklorid 1%: 1 g benzalkoniumklorid ble veid i et reagensrør med skrukork og oppløst i 10 mL ionebytte vann. Røret ble ristet godt. Løsningen ble oppbevart i kjøleskap (4 °C).

Buljongkultur: både *Staphylococcus aureus* og *P. aeruginosa* buljongkultur ble tillaget og fremgangsmetoden var den samme for begge. Bakteriene ble sådd på en Müeller-Hinton agarplate og satt i varmeskap (37 °C) i 24 timer. Agarplaten ble tatt ut fra varmeskapet dagen etter og to ulike isolerte kolonier ble overført ved hjelp av en podeøse til en 100 mL flaske med skrukork som inneholdt 40 mL buljong. For *S. aureus* ble det brukt TSB + 1% glukose som buljong, og for *P. aeruginosa* ble det brukt LB som buljong. Flaskene ble inkubert med resting (rpm = 75, temperatur = 37 °C) i 24 timer ved bruk av Genie Temp-Shaker 100. Dagen etter ble en prøve undersøkt i mikroskop for kontaminering før prøven ble tatt i bruk.

DPPC 10mg/mL stamløsning: ønsket mengde romtemperert DPPC ble veid på finvekt i et glassveieskip og overført til et rent og støvfritt hetteglass. Veieskipet ble spylt med deler av det totale kloroform volumet. Deretter ble hetteglasset fylt med resterende volum av kloroform for å oppnå ønsket konsentrasjon. Stammløsningen ble oppbevart i fryser (-18 °C).

DPPG 5mg/mL stamløsning: ønsket mengde romtemperert DPPG ble veid på finvekt i et glassveieskip og overført til et rent og støvfritt hetteglass. Veieskipet ble spylt med deler av kloroform/metanol (2:1) blandingen. Deretter ble hetteglasset fylt med resterende volum av kloroform/metanol (2:1) blanding for å oppnå ønsket konsentrasjon. Stammløsningen ble oppbevart i fryser (-18 °C).

DPTAP 5mg/mL stamløsning: ønsket mengde romtemperert DPTAP ble veid på finvekt i et glassveieskip og overført til et rent og støvfritt hetteglass. Veieskipet ble spylt med deler av kloroform/metanol (2:1) blandingen. Deretter ble hetteglasset fylt med resterende volum av kloroform/ metanol (2:1) blanding for å oppnå ønsket konsentrasjon. Stammløsningen ble oppbevart i fryser (-18 °C).

Luria-Bertani (LB) buljong ble produsert ved å oppløse 10 g med tryptone peptone, 5 g yeast extract og 10 g med NaCl i 1 L destillert vann. Det ble forsikret at alt pulver var oppløst før det ble autoklavert på 121 °C i 20 minutter. Flasken ble oppbevart i LAF-benk til løsningen oppnådde romtemperatur. Deretter ble løsningen oppbevart i kjøleskap (4 °C).

Maximum recovery diluent: 4.75 g maximum recovery diluent ble veid i en ren og støvfri glassflaske med kork. Det ble tilsatt 500 mL ionebyttet vann og kork ble satt på. Flasken ble ristet godt til alt pulveret løste seg. Flasken ble autoklavert på 121 °C i 15 minutter. Flasken ble stående i LAF-benken til oppnådde romtemperatur, deretter oppbevart i kjøleskap (4 °C).

Müller-Hinton agar: 15.2 g Müller-Hinton agar ble veid i en ren og støvfri erlenmeyerkolbe. Det ble tilsatt 400 mL ionebyttet vann. Kolben ble ristet godt, og det ble forsikret at alt pulveret var oppløst. Løsningen ble autoklavert på 121 °C i 15 minutter. Løsningen ble satt i LAF-benk i 30 minutter før 50 mL av løsningen ble overført til 14 mL agarskåler. Agarskålene ble stående til agar-blandingen ble fast, og deretter ble de oppbevart i kjøleskap (4 °C).

PBS (fosfatbufret saltvann): I en ren og støvfri glassflaske med kork ble 1.2 g natriumklorid (NaCl), 0.3 g kaliumklorid (KCl), 2.16 dibasisk natriumfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) og 0.41 g kaliumhydrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) veid. Det ble tilsatt 1 L av ionebytte vann i flasken. Kork ble satt på flasken og flasken ble ristet godt. Det ble forsikret at alt pulver ble oppløst før flasken ble autoklavert på 121 °C i 15 minutter. Flasken ble stående i LAF-benken til den oppnådde romtemperatur.

Tryptic soy broth (TSB) + 1% glukose: 12 g TSB ble veid i en ren og støvfri glassflaske med kork. 400 mL ionebyttet vann ble tilsatt flasken. Kork ble satt på flasken og ristet godt. Det ble forsikret at alt pulveret var oppløst. Løsningen ble autoklavert på 121 °C i 20 minutter. TSB inneholder allerede 2.5% glukose i en 1 L løsning. Etter autoklaving ble det tilsatt 3 g glukose som steril-filtrert løsning for å oppnå en konsentrasjon på 1% glukose. Etter avkjøling ble løsningen oppbevart i kjøleskap (4 °C).

## 4.2 Fremstilling av liposomer

Tynnfilm-metoden ble brukt for å fremstille liposomer. Det endelige liposomkonsentrasjonen for alle formuleringene var på 10 mM.

Ønsket mengde av hovedlipid og ladet lipid ble avpipettert til en 250 mL rundkolbe for å oppnå ønsket molforhold. Organisk fase (kloroform eller kloroform/ metanol (2:1) ble tilsatt samme rundkolbe til totalvolum var 10 mL. Rundkolben ble satt på rotavapor og ned i vannbad ved 50 °C med rotasjonshastighet på ca. 90 rpm til løsningsmiddelet ble dampet av. Rundkolben var på rotavaporen i 20 minutter ytterligere etter inndampingen. Trykket ble redusert manuelt ved å åpne rotavapor-ventilen dersom løsningen begynte å koke, samt ble rundkolben tatt ut fra vannbadet om nødvendig i noen perioder for å unngå støtkoking.

Rundkolben med lipidfilmen ble satt på vakuumpumpe natten over for å fjerne løsningsmiddelrester. Dagen etter ble rundkolben med lipidfilmen satt i varmeskap til den oppnådde en temperatur på 50 °C. 10 mL hydreringsmedium (5 mM fosfatpuffer, pH = 7) ble satt i varmeskapet og varmet opp til 50 °C. Hydreringsmediet ble tilsatt rundkolben under manuell svingning. For liposomformuleringer med innkapslet gentamicin, ble 300 mg gentamicin sulfat (Sigma Aldrich, Kina) oppløst i hydreringsmediumet før det ble tilsatt rundkolben

med lipidfilmen. Deretter ble lipidfilmen med hydreringsmediet satt på vannbad (50 °C) med omdreiningshastighet på omtrent 90 rpm i ti minutter. Rundkolben ble satt i varmeskap (50 °C) i to timer med manuell svingning av kolben hvert 15. minutt. Formuleringene ble avkjølt til romtemperatur før de ble satt i kjøleskap for ekstrudering dagen etter.

For ekstrudering ble Avanti mini extruder (68) brukt. Varmeblokken ble satt på kokeplaten med et termometer for å oppnå en temperatur på 50 °C. Det ble brukt to støttemembraner og en polykarbonatmembranfilter med porestørrelse på 200 nm. Begge sprøytene ble skylt med hydreringsmediet før 1 mL av liposomsuspensjonen ble overført til den ene sprøyten. Sprøytene ble lagt inn i hver sin ende av ekstruderen og ble liggende på varmeblokken i ca. 5 minutter før ekstruderingen begynte. Dette var for å forsikre at selve liposomsuspensjonen hadde oppnådd den ønsket temperaturen på 50 °C. Liposomsuspensjonen ble ekstrudert 10 ganger. Det ble forsikret at liposomsuspensjonen var i den alternative sprøyten ved ekstruderingslutt. Dette var for å redusere sannsynlighet for forurensninger med større partikler eller fremmed materiale. Liposomsuspensjonen ble overført til et 10 mL rent og støvfritt hetteglass, lukket igjen med en propp og oppbevart i kjøleskap (4 °C).

### **4.3 Karakterisering**

Karakterisering av liposomformuleringene ble gjort på dag fire av fremstillingsprosessen, med andre ord dagen etter ekstrudering. Prøvene ble også karakterisert periodevis, etter: tre dager, fem dager, sju dager, samt to og fire uker etter ekstrudering. For liposomformuleringene med innkapslet gentamicin ble de kun karakterisert i tre omganger: dagen etter og tre dager etter ekstrudering samt etter en periode på ca. 60 dager etter produksjon.

Liposomformuleringene ble oppbevart i 4 °C etter fremstilling. Ved karakterisering ble det forsikret at prøvene og buffer (fosfatbuffer 5 mM, pH = 7) var romtemperert før testen ble tatt. Liposomformuleringene ble karakterisert med hensyn på partikkelstørrelse, PDI og zetapotensiale.

### 4.3.1 Måling av partikkelstørrelse

En engangskyvette ble holdt på skrå og tilsatt 25 µL liposomsuspensjon og 975 µL 5 mM fosfatbuffer (pH = 7). Det ble forsikret fravær av luftbobler i prøven samt ble linsepapir brukt for å tørke på utsiden av kyvetten før hver prøve ble satt inn i instrumentet og målt. Tabell 4.1 viser innstillingene brukt for måling av partikkelstørrelse.

**Tabell 4.1: Innstillinger brukt ved måling av partikkelstørrelse**

<b>Dispersjonsmedium</b>	Vann
<b>Viskositet for vann</b>	0.8872 (cP)
<b>Refraktiv indeks for vann</b>	1.330
<b>Innstillinger</b>	Mark-Houwink parameter
<b>Måletemperatur</b>	25 °C
<b>Ekvibreringstid</b>	300 sekunder
<b>Celletepe</b>	Disposable cuvettes
<b>Målevinkel</b>	173 °
<b>Målingsvarighet (hver måling)</b>	Automatisk
<b>Antall målinger</b>	3
<b>Attenuator</b>	Automatisk

### 4.3.2 Måling av zetapotensial

Før måling av zetapotensialet på egne prøver ble først en standardløsning benyttet for å kontrollere at instrumentet og dipcellen var i orden. Standardløsningen brukt var Zeta Potential Transer Standard (Malvern, England), standardløsningen inneholder latexkuler suspendert i en vandig buffer og skulle ha et zetapotensiale på  $-42 \text{ mV} \pm 4,2 \text{ mV}$  (69). Dipcellen ble skylt med MilliQ vann før liposomsuspensjonene ble målt. En engangskyvette ble holdt på skrå og tilsatt 25 µL liposomsuspensjon og 975 µL 5 mM fosfatbuffer (pH = 7). Dipcellen ble skylt med MilliQ vann før den ble satt inn i kyvetten med prøven. Kyvetten ble holdt på skrå og dipcellen ble ført inn sakte i prøven for å unngå luftbobler. Kyvettens utside ble tørket med linsepapir før den ble satt i målecellen. Tabell 4.2 viser innstillinger brukt ved måling av zetapotensiale.

**Tabell 4.2: Innstillinger brukt ved måling av zetapotensiale**

<b>Dispersjonsmedium</b>	Vann
<b>Viskositet for vann</b>	0.8872cP
<b>Refraktiv indeks for vann</b>	1.330
<b>Dielektrisk konstant</b>	78.5
<b>Innstillinger</b>	Smoluchowski
<b>Måletemperatur</b>	25°C
<b>Ekvibreringstid</b>	120 sekunder
<b>Celletepe</b>	Dip cell for zeta potential
<b>Målingsvarighet (hver måling)</b>	Automatisk, 10-100
<b>Antall målinger</b>	5
<b>Attenuator</b>	Automatisk
<b>Spennning</b>	Automatisk

#### 4.4 Fjerning av ikke-innkapslet virkestoff ved gelfiltrering

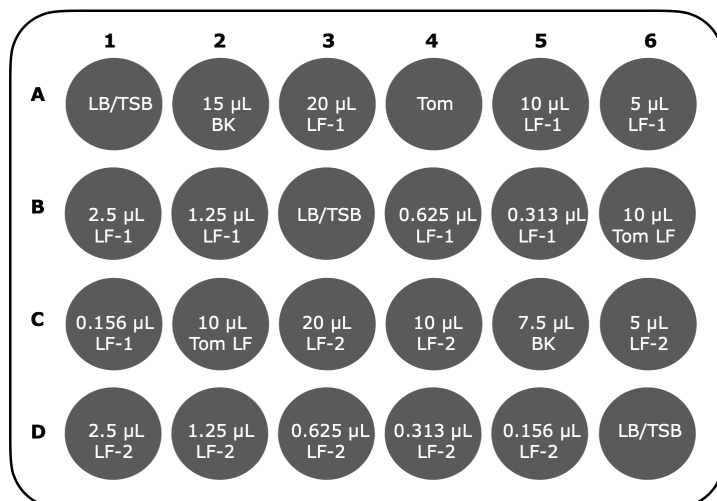
En gelfiltreringskolonne ble festet til et stativ. Fosfatbuffer (5 mM, pH = 7) ble brukt som ekvibreringsbuffer. 5 mL av fosfatbufferen ble tilsatt i kolonnen og det ble forsikret at ekvibreringsbufferen fylte hele kolonnen før det ble tilsatt nye 5 mL med fosfatbuffer i kolonnen. Dette ble gjort totalt fem ganger. Den totale volum fosfatbuffer brukt var på ca. 25 mL. Eluert ekvibreringsbuffer ble samlet i et målebeger og kastet. 2.5 mL liposomsuspensjon med innkapslet virkestoff ble utpipettert til kolonnen. Det ble sørget for at liposomsuspensjonen rant helt ned i den ferdigfylte kolonnen. Deretter ble prøven eluert med 3.5 mL fosfatbuffer (5 mM pH = 7), og ble samlet i et rent og støvfritt hetteglass.

#### 4.5 Mikrobiologisk uttesting av utvalgte liposomformuleringer på planktoniske celler

I dette forsøket ble det benyttet to ulike bakterier, *S. aureus* og *P. aeruginosa*. Dagen før forsøket ble det satt i gang en buljongkultur av begge bakteriene (se kapittel 4.1 tillaging av løsninger). Buljongkulturen ble fortynnet 1/1000 ved at 40 mL av LB ble overført til et 50 mL reagensrør og deretter ble det pipettert over 40 µL av *P. aeruginosa* buljongkultur til røret. Lokk ble satt på og røret ble ristet godt før bruk. For *S. aureus* ble det samme gjort bare at det ble brukt TSB + 1% glukose buljong istedenfor LB. For å forsikre at bakteriekulturene som ble tatt i bruk ikke var kontaminert, ble de sådd ut en prøveporsjon på hver sin agarplate. Agarplatene ble satt i varmeskap (37 °C) i ca. 24 timer og deretter undersøkt for kontaminasjon av andre mikrober.

I en visiplate (4x6) ble det pipettert 1.5 mL buljong som en steriltetstest. For den negative kontrollen ble det tilsatt 1.5 mL 1/1000 fortynnet bakteriekultur med ulike volum av 1% benzalkoniumklorid. I to av brønnene ble det kun tilsatt 1.5 mL 1/1000 fortynnet bakteriekultur med 10 µL tomme DPPC/ 2.5% TAP. I de resterende brønnene ble det tilsatt 1.5 mL med ulike konsentrasjoner av DPPC/ 2.5% TAP med innkapslet gentamicin. Figur 4.1 viser en nøyaktig oversikt over oppsettet som ble brukt.





**Figur 4.1: Oppsettet brukt i visiplate (4x6) for uttesting av liposomer på planktoniske celler**

LB ble brukt for *P. aeruginosa* og TSB + 1% glukose ble brukt for *S. aureus*, BK = benzalkoniumklorid 1%, LF-1 = liposomformulering parallell 1, LF-2 = liposomformulering parallell 2, tom LF = liposomformulering uten innkapslet virkestoff som negativ kontroll.

Platen ble satt inn i plateleseren og absorbansen målt over 12 timer med en måling hvert 15. minutt. Tabell 4.3 viser innstillingene som ble brukt under måling.

**Tabell 4.3: Innstillinger brukt ved måling av absorbans for både *P. aeruginosa* og *S. aureus*.**

<b>Name of the plate type</b>	Visiplate 4x6
<b>Number of wells in the plate</b>	4 x 6
<b>Height of the plate</b>	20.0 mm
<b>Offset of the wells</b>	16.585 mm, 18.804 mm
<b>Distance between wells</b>	18.057 mm, 18.060 mm
<b>Number of repeats</b>	50
<b>Delay between repeats</b>	900 s
<b>Measurement height</b>	8.00 mm
<b>Name of the label</b>	P590
<b>Label technology</b>	Photometry
<b>CW-lamp filter name</b>	P590
<b>CW-lamp filter slot</b>	A4
<b>Measurement time</b>	0.1 s
<b>Absorbance</b>	590 nm
<b>Absorbance Mode</b>	Visible
<b>Excitation Aperture</b>	N/A
<b>Shaking duration</b>	30.0 s
<b>Shaking speed</b>	Slow
<b>Shaking diameter</b>	0.10 mm
<b>Shaking type</b>	Double orbit
<b>Repeated operation</b>	Yes

Dagen etter ble all data (inkludert RAW-data) eksportert over til et Excel-dokument. Den samme fremgangsmåten og innstillinger ble brukt for å teste begge bakterietypene.

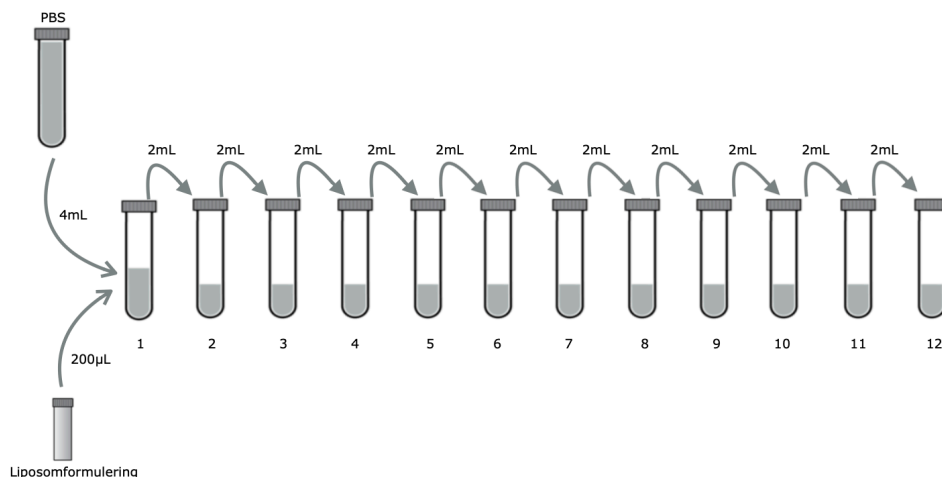
## 4.6 Mikrobiologisk uttesting av utvalgte liposomformuleringer på biofilm

### 4.6.1 Uttesting på *P. aeruginosa* biofilm

En buljongkultur av *P. aeruginosa* ble produsert dagen før forsøket startet. 40 mL av LB buljongen ble overført til et reagensrør med lokk og det ble pipettert 40 µL av buljongkulturen til røret for å oppnå en 1/1000 fortykning. Det ble sådd bakterier på to agarplater på samme fremgangsmåte som beskrevet i kapittel [4.5 mikrobiologisk uttesting av utvalgte liposomformuleringer på planktoniske celler](#).

Det ble pipettert 200 µL av 1/1000 fortynningskulturen til en 96-brønnplate. I en annen 96-brønnplate ble det pipettert kun buljong (LB). Det ble satt lokk på begge platene, og deretter ble de lagt i hver sin plastpose. Platene ble satt i Genie Temp-Shaker (rpm = 10, temperatur = 37 °C) i omtrent 24 timer. Dagen etter ble platene tatt ut fra instrumentet. Platene ble snudd opp ned og ristet forsiktig for å fjerne bort medium med cellene. Det ble pipettert 250 µL PBS forsiktig i hver brønn, løsningen ble helt ut og det samme ble gjort enda en gang. Platene ble lagt opp ned på filterpapir til de tørket.

Det ble brukt 12 eppendorfrør for å lage en fortynningsrekke av begge parallellene (1 og 2) til DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin. I det første røret ble 4 mL PBS og 200 µL liposomformulering tilsatt og røret ble ristet ved bruk av Vortex-Genie 2 (Shake vortex nivå 10). I de resterende rørene ble det pipettert 2 mL PBS. 2 mL av løsningen fra det første røret ble overført til neste rør og så videre. Figur 4.2 viser en oversikt over fortynningsrekken. Det var to ulike liposomformuleringer parallellt og dermed ble den samme prosessen gjort for hver formulering.



**Figur 4.2: Fortynningsrekke av liposomformuleringen**

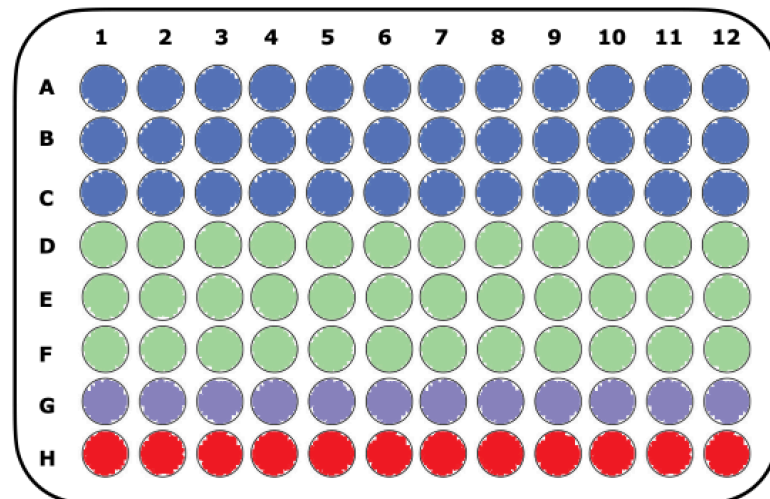
I hvert eppendorfrør ble det tilsatt 2 mL PBS utenom det første røret som hadde 4 mL. 200 µL liposomformulering ble tilsatt i første rør. Hvert rør ble ristet godt før hver overføring.

Konsentrasjonene av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin benyttet i denne delen av oppgaven kan ses i tabell 4.4.

**Tabell 4.4: Konsentrasjonene (volum/volum) som ble benyttet i studien for DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin. Stammløsning (fortynning 1) ble laget til 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .**

<b>Fortynning 1</b>	50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	<b>Fortynning 7</b>	0.781 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>Fortynning 2</b>	25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	<b>Fortynning 8</b>	0.391 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>Fortynning 3</b>	12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	<b>Fortynning 9</b>	0.195 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>Fortynning 4</b>	6.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	<b>Fortynning 10</b>	0.098 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>Fortynning 5</b>	3.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$	<b>Fortynning 11</b>	0.049 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<b>Fortynning 6</b>	1.563 $\mu\text{L}/\text{mL}$	<b>Fortynning 12</b>	0.024 $\mu\text{L}/\text{mL}$

Da 96-brønnplaten var tørket og fortynningsrekken var klargjort ble hver fortynning overført til hver sin brønn i 96-brønnplaten. Parallell 1 av liposomformuleringen ble overført til rad A-C. Parallell 2 av samme liposomformulering ble overført til rad D-F. Rad G forble ubrukt, og i rad H ble det kun tilsatt PBS. Figur 4.3 viser en oversikt over 96-brønnplate som ble brukt.

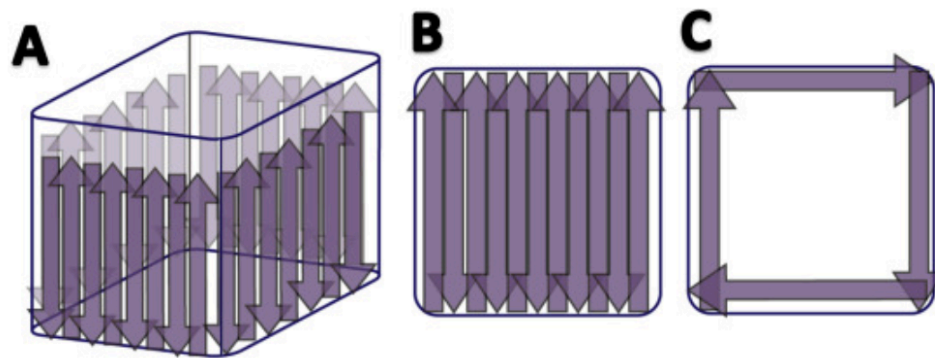


**Figur 4.3: Oversikt over innholdet i 96-brønnplaten ved uttesting av *P. aeruginosa* biofilm**

Rad A-C (blått): Parallell 1 av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamycin. Rad D-F (grønt): Parallell 2 av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamycin. Rad G (lille): Tom. Rad H (rød): PBS.

Det ble satt lokk på platene og platene ble lagt i en plastpose. Platene ble oppbevart under temperert cirka statiske forhold ( $\text{rpm} = 10$ , temperatur  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ) i omtrent 24 timer. Dagen etter ble platene snudd på hodet og ristet forsiktig for å fjerne bort medium og eventuelle planktoniske celler. Brønnene ble vasket med 250  $\mu\text{L}$  PBS to ganger. Platene ble lagt opp ned på filterpapir til de tørket.

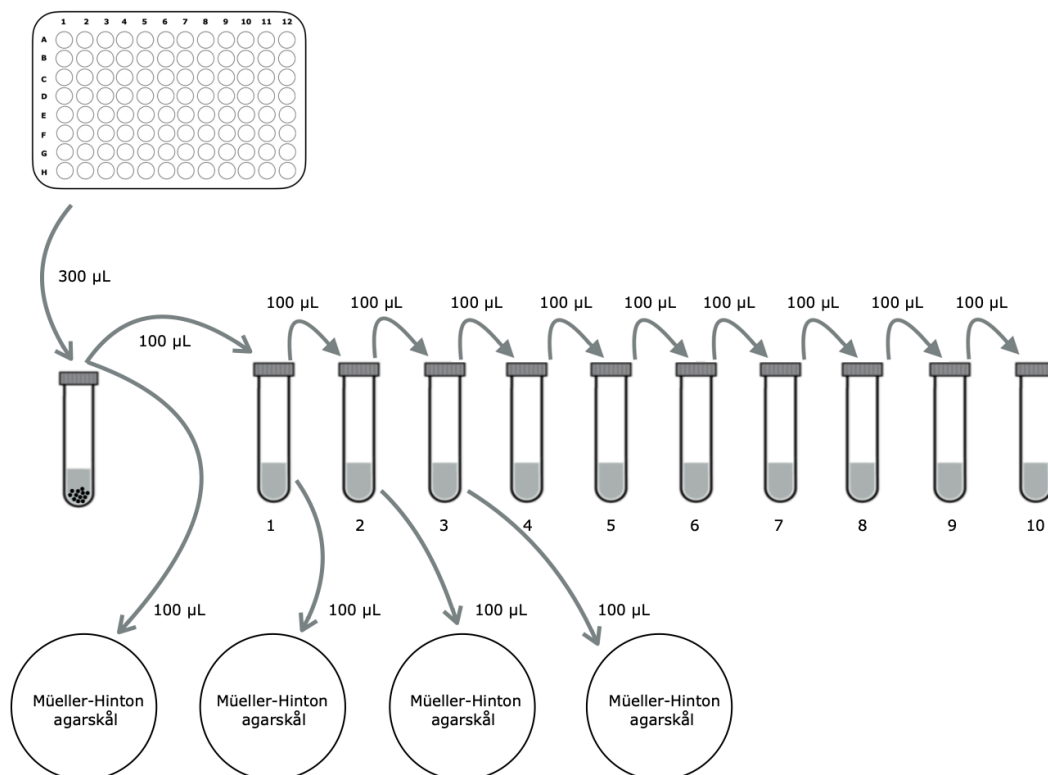
Etter at platene var tørre så ble det tilsatt 300  $\mu\text{L}$  av PBS i hver brønn. Pipettespissen ble brukt for å skrape biofilmen i brønnene. Dette ble gjort ved å bruke en mikropipette. Veggene til brønnene ble skrapet opp og ned i to runder rundt brønnen (figur 4.4 A). Deretter ble bunnen skrapet frem og tilbake i to runder (figur 4.4 B). Til slutt ble kanten skrapet i to runder (figur 4.4 C). Alt dette ble gjort samtidig som at det ble pipettert væske inn og ut av pipetten.



**Figur 4.4: Skjematisk tegning av skrapesyndyren. Figur hentet fra Kragh et al (70)**

Figuren viser trinnvis prosedyre for skraping av brønnene. (A) viser metoden veggene ble skrapet på, (B) er bunnen og (C) er kantene av brønnen.

I et eppendorfrør ble det tilsatt glasskuler, og all innholdet i den skrapte brønnen ble pipettert til røret. Løsningen ble homogenisert ved bruk av Vortex-Genie 2 (Shake vortex nivå 10) i 30 sekunder, og deretter ble røret lagt på is i 30 sekunder. Røret ble homogenisert i ytterligere 30 sekunder, og deretter lagt på is i 30 sekunder. 100  $\mu\text{L}$  av denne løsningen ble pipettert til et eppendorfrør som inneholdt 900  $\mu\text{L}$  maximum recovery diluent. Røret ble ristet ved bruk av Vortex-Genie 2. Det ble deretter laget en fortynningsrekke på 10 rør (Figur 4.5).



**Figur 4.5: Oversikt over fortynningsrekken**

Alt innholdsstoffet fra brønnen ble overført til eppendorfrør. 100  $\mu\text{L}$  fra stamløsningen ble pipettert til en eppendorfrør som inneholdte 900  $\mu\text{L}$  maximum recovery diluent. Det ble laget en fortynningsrekke med 10 fortynninger. Mellom hver utpipettering ble rørene ristet godt. 100  $\mu\text{L}$  av stamløsningen ble sådd på agarplaten.

Fra hvert rør ble 100 µL pipetert over til en agarplate og løsningen ble spredt jevnt over hele agarplaten ved bruk av en engangsspatel. Agarplatene ble inkubert i varmeskapet ved 37 °C i 24 timer før de ble tatt ut og antall kolonier ble telt. Plater som hadde kun plater som hadde kolonitall mellom 30-300 ble valgt ut for å regne ut CFU/mL i stamløsningen i henhold til Miles og Misra (75). For konsentrasjonene som hadde flere fortyngninger som ga kolonitall mellom 30-300 ble weighted mean beregnet først. Deretter ble likning 4.x brukt for å regne ut CFU/mL i den originale prøven.

$$CFU/mL = \frac{(antall\ kolonier) \times (fortynningsfaktor)}{volum\ sådd\ ut\ på\ agarplate} \quad (\text{Likning 6.1})$$

CFU/mL ble deretter brukt for å bestemme prosentreduksjon av behandlet bakterier med liposomal gentamicin kontra bakterier som ble kun utsatt for DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff.

#### 4.6.2 Uttesting på *S. aureus* biofilm

Fortynningskultur av *S. aureus* ble produsert på samme metode som nevnt under kapittel 4.6.1 uttesting på *P. aeruginosa* biofilm. Den eneste forskjellen var at det ble brukt TSB + 1% glukose som buljong istedenfor LB.

Det ble pipetert 2 mL av 1/1000 fortyngningskulturen til fire ulike kammerobjektglass. som deretter ble inkubert i varmeskap ved 37 °C i 24 timer. Dagen etter ble de vasket på samme måte som 96-brønnplaten med *P. aeruginosa* (kapittel 4.6.1 *Uttesting på P. aeruginosa biofilm*) bare med 2 mL PBS isteden. Det ble tilsatt ulikt forhold av liposomformulering i de ulike kammerobjektglassene (Tabell 4.5).

**Tabell 4.5: En oversikt over innholdet i kammerobjektglassene ved uttesting av *S. aureus* biofilm.**

	Volum liposomformulering (mL)	Volum PBS (mL)
<b>Kammerobjektglass 1</b> DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff	0.100	2
<b>Kammerobjektglass 2</b> DPPC/ 2.5% DPTAP med gentamicin	0.100	2
<b>Kammerobjektglass 3</b> DPPC/ 2.5% DPTAP med gentamicin	1	1
<b>Kammerobjektglass 4</b> DPPC/ 2.5% DPTAP med gentamicin	2	- *

\* Det ble ikke tilsatt PBS

Kammerobjektglassene ble satt under temperert cirka statiske forhold (rpm = 10, temperatur = 37 °C) i 24 timer. Dagen etter ble kamrene vasket med 500 µL PBS i to omganger. Platen ble lagt til tørk opp-ned på filterpapir. Etter at kamrene var tørre, ble det tilsatt 250 µL PBS og bunnen ble skrapet frem og tilbake fem ganger ved bruk av en celleskraper. Deretter ble løsningen pipetert ut til et eppendorfrør. Skrapeprosedyren ble repetert enda en gang etter ny tilsetning av 250 µL PBS.

Løsningen ble pipetterert til det samme eppendorfrøret. Det samme ble gjort med alle fire kamrene. Det ble tilsatt glasskuler i hver eppendorfrør og rørene ble homogenisert på samme måte som beskrevet under kapittel 4.6.1 Uttesting av *P. aeruginosa* biofilm. Metoden videre var den samme som ble gjort for uttesting av *P. aeruginosa*. Noen av fortynningene ble sådd ut dobbelt på agarplatene. Dette ble randomisert og ulike fortynninger ble brukt for hver konsentrasjon.



## 5. FORSØKSOPPSETT

### 5.1 Etablering av fremstillingsmetode med Avanti® Mini-Ekstruder

Det ble brukt tynnfilm-metode for å fremstille liposomformuleringene. Det er en veletablert metode som har blitt brukt i tidligere studier (71, 72). I denne oppgaven ble det brukt en nyinnkjøpt Avanti® Mini-ekstruder (Avanti. Polar Lipids, Inc., US) til ekstrudering av liposomformuleringene. Hydrerte lipider fra tynnfilm-metoden kan danne store, multilamellare vesikler. Etter tilstrekkelig ekstruderer gjennom en membran med en bestemt porestørrelse kan det oppnås en unimodal størrelsesfordeling noe som er ønskelig ved fremstilling av liposomer. Vi ønsket derfor å undersøke om Avanti® Mini-ekstruderen faktisk kunne utføre dette på en relativ rask og enkel måte.

Totalt ble fire ulike liposomformuleringer, to paralleller av hver, fremstilt i 5mM fosfatbuffer (pH = 7) (uten virkestoff) og karakterisert ved hjelp av partikkelstørrelse- og zetapotensiemålinger (Tabell 5.1). Formuleringer som var praktisk mulig å fremstille og som hadde egnet zetapotensiale og partikkelstørrelse ble valgt til videre arbeid for innkapsling av virkestoff.

**Tabell 5.1: Oversikt over liposomformuleringene som ble produsert under etablering av fremstillingsmetoden**

Hovedlipid	Ladet lipid	Ladning
DPPC	10% DPTAP	Positiv
DPPC	2.5% DPTAP	Positiv
DPPC	10% DPPG	Negativ
DPPC	2.5% DPPG	Negativ

Faktorer som ble modifisert underveis i metodeetableringen var temperatur under hydrerings- og ekstruderingsfasen.

### 5.2 Etablering av fremstillingsmetode med innkapslet virkestoff

To ulike, men velkjente, peptidbaserte antibiotika ble valgt som modellsubstanser for innkapsling av virkestoff: polymyxin B sulfat og bacitracin (73). Det tredje virkestoffet som ble brukt var gentamicin som er et aminosukker (74). Mengde virkestoff som ble brukt varierte mellom de ulike modellsubstansene (Tabell 5.2).

**Tabell 5.2: Oversikt over de ulike modellsubstansene som ble innkapslet og konsentrasjonene som ble brukt i hydreringsmediet (5 mM fosfatbuffer, pH = 7).**

<b>Modellsubstans</b>	Polymyxin B sulfat	Gentamicin sulfat	Bacitracin
<b>Konsentrasjon i hydreringsmediet</b>	10 mg/mL	30 mg/mL	30 mg/mL



### 5.2.1 Karakterisering etter produksjon

Alle prøvene ble undersøkt ved bruk av Zetasizer på dag fire av produksjonen, altså dagen etter ekstrudering tok sted. Både størrelse og zetapotensiale ble målt for å vurdere stabiliteten til liposomformuleringene. Ved å undersøke størrelsesfordeling, og størrelsen til hovedtoppen (Z-average, diameter i nm), samt zetapotensiale ble det vurdert om liposomformuleringene var en suksess eller ikke.

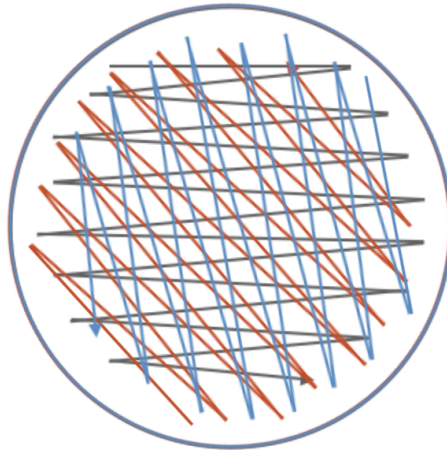
### 5.3 Uttesting av utvalgte liposomformuleringer på agarplater

For uttesting av den mikrobiologiske effekten ble DPPC/ 2.5% TAP med innkapslet gentamicin valgt. Gelfiltrering ble brukt til å fjerne ikke-innkapslet antibiotika i forkant av testene. Totalvolum av liposomformulering var 10 mL hvorav 5 mL ble gel-filtrert. Under gelfiltrering ble all gjennomstrømningsvæske (flow-through) tatt vare på, deretter ble formuleringen eluert med elueringsmiddelet (5 mM fosfatbuffer, pH = 7) og prøven ble samlet. Dette endte opp med å resultere i tre ulike prøver: gel-filtrert (eluert) prøve, prøve med gjennomstrømningsvæske og ikke-gelfiltrert prøve. To paralleller av liposomformuleringen ble gel-filtrert som resulterte i seks ulike prøver til sammen.

For undersøkelse av gentamicin potensen ble det brukt kommersielle *antimicrobial susceptibility discs (ASD)* som inneholdt 30 µg gentamicin (ThermoFisher Scientific). Samtidig ble det også produsert egne diskere på laboratoriet som følger: en 2 µg/µL gentamicin løsning fra pulveret som ble brukt under fremstillingen av liposomene ble tillaget. 15 µL av denne løsningen ble utpipettert til en tom disk. Dette ga en egenprodusert disk med tilsvarende 30 µg gentamicin. Det ble tatt hensyn til at gentamicin sulfat-saltet ble brukt.

I dette arbeidet ble det benyttet tre ulike bakterier; *Escherichia coli* (ATTC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM22644) og *Staphylococcus aureus* (DIM2569). Dagen før forsøket ble de ulike bakteriene sådd på Mueller-Hinton agarskåler. På forsøksdagen ble flere kolonier av hver bakterie overført ved hjelp av en podeøse til sitt eget plastikk prøverør som inneholdte 0.9% NaCl. En suspensjon som tilsvarer McFarlan 0.5 målt spektrofotometrisk ble laget. Dette tilsvares en konsentrasjon på  $1-2 \times 10^8$  CFU/ mL (75).

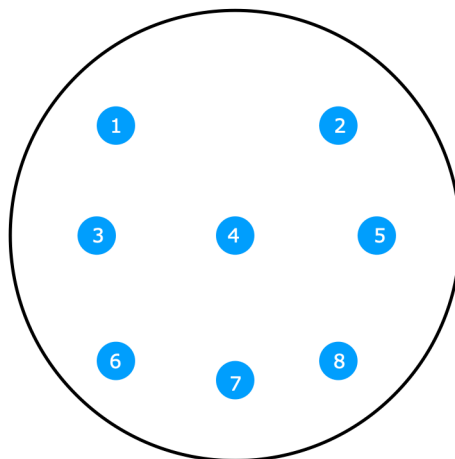
En steril vattpinne ble dyppet i 0.5 McFarland standardløsning og ble sådd på en 14 cm Mueller-Hinton agarskål i et bestemt oppsett (figur 5.1). Bakteriene ble sådd i en zig-zag struktur i tre runder. For hver runde ble agarskålen rotert forsiktig til venstre, en ny vattpinne ble dyppet igjen i bakterie standardløsningen for å så å plate ut.



**Figur 5.1: Figuren viser hvordan bakteriene ble sådd på agarskålene**

Bakteriene ble sådd i tre ulike runder, hver farge representerer en av rundene.

Agarplatene produsert ble brukt for diskdiffusjonsmetoden. 35  $\mu\text{L}$  av hver prøve ble utpipetert på et filterpapir disk. Diskene ble stående i en kort stund til de tørket og deretter ble sterile pinsetter brukt for å overføre diskene til Müller-Hinton agarskålene (Figur 5.2).

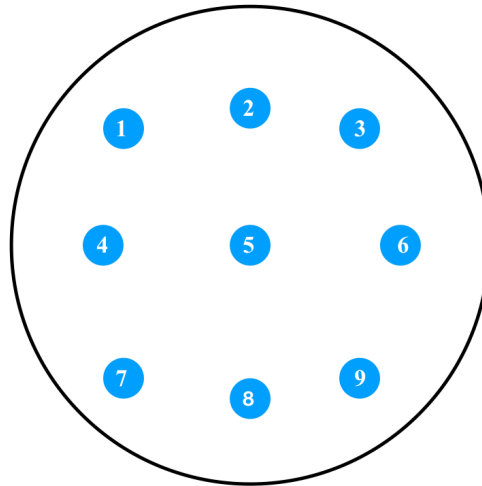


**Figur 5.2: Oversikt over diskenes plassering på Müller-Hinton agarskåler ved første runde.**

Det ble brukt til sammen 8 ulike diskene. Disk 1: Kommersiell 30  $\mu\text{g}$  gentamicin, disk 2: egenprodusert 30  $\mu\text{g}$  gentamicin, disk 3: gel-filtrert (eluert) liposomformulering (parallell-1), disk 4: prøve med gjennomstrømningsvæske ved gelfiltrering (parallell-1), Disk 5: ikke-gelfiltrert liposomformulering (parallell-1), disk 6: gel-filtrert (eluert) liposomformulering (parallell-2), disk 7: prøve med gjennomstrømningsvæske ved gelfiltrering (parallell-2), disk 8: ikke-gelfiltrert liposomformulering (parallell-2).

*S. aureus* ble også testet med brønndiffusjonmetoden. Ved bruk av brønndiffusjon testen ble en steril korkbor brukt for å produsere brønnene i agarskålen. Samme diskplassering på agarskålen ble brukt som i figur 5.2. 25  $\mu\text{L}$  av prøvene ble utpipetert i hver brønn. Agarskålene ble stående i romtemperatur i en kort periode før de ble lagt i en isoporkasse og deretter inkubert i varmeskap ved 37  $^{\circ}\text{C}$  i ca. 18 timer.

For å forsikre pålitelige resultater ble forsøket repetert. Denne gangen ble det produsert to agarskåler for hver bakterie; en med filterpapir-disker og den andre med brønner. Det ble valgt å inkludere en negativ kontroll i denne runden som var liposomformulering DPPC/ 2.5% TAP uten innkapslet virkestoff (figur 5.3). Samme fremgangsmåte ble brukt som i første runde.



**Figur 5.3: Oversikt over diskenes plassering på Müller-Hinton agarskåler ved andre runde.**

Det ble lagt til sammen 9 ulike diskere. Disk 1: Kommersiell 30  $\mu\text{g}$  gentamicin, disk 2: negativ kontroll, disk 3: selv-produsert 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  gentamicin, disk 4: Gel-filtrert (eluert) liposomformulering (batch-1), disk 5: gjennomstrømning etter gelfiltrering (batch-1), Disk 6: ikke-gelfiltrert liposomformulering (batch-1), disk 7: Gel-filtrert (eluert) liposomformulering (batch-2), disk 8: gjennomstrømning etter gelfiltrering (batch-2), disk 9: ikke-gelfiltrert liposomformulering (batch-2). For brønddiffusjon testen ble det samme oppsettet brukt.

## 6. RESULTATER

### 6.1 Etablering av fremstillingsmetode med Avanti Mini Ekstruder

#### 6.1.1 Positiv ladete liposomer

Tabell 6.1 viser resultatene av karakteriseringen av de ulike liposomene som ble fremstilt.

**Tabell 6.1: Diameteren, PDI og zetapotensiale målt ved bruk av Zetasizer**

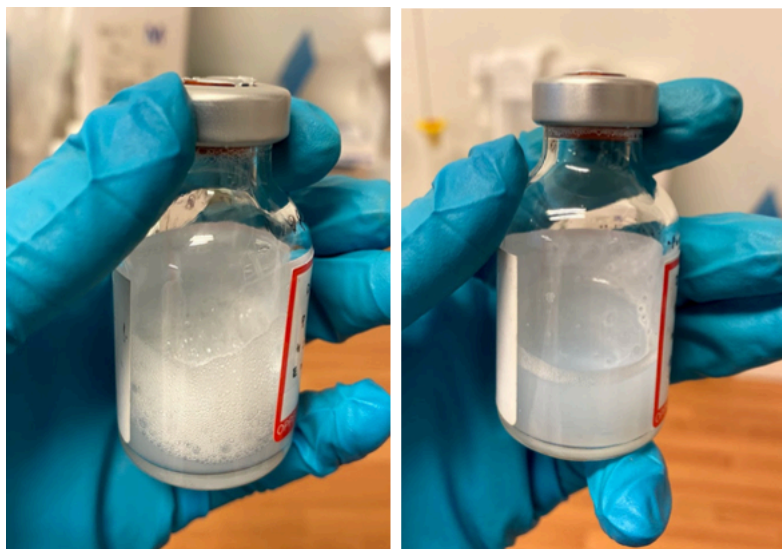
Liposomer	Z-average (Dm i nm) (standard deviation)*	PDI	Zetapotensiale (mV) (standard deviation)*
DPPC/ 2.5% DPTAP P-1	148.1 ( $\pm 0.5$ )	0.108	19.7 ( $\pm 0.7$ )
DPPC/ 2.5% DPTAP P-2	109 ( $\pm 0.67$ )	0.044	16.8 ( $\pm 0.6$ )
DPPC/ 2.5% DPTAP P-3	106 ( $\pm 0.76$ )	0.053	14 ( $\pm 0.5$ )
DPPC/ 2.5% DPTAP P-4	105 ( $\pm 0.6$ )	0.057	14 ( $\pm 0.9$ )
DPPC/ 10% DPTAP P-1	146.5 ( $\pm 2.4$ )	0.197	41.3 ( $\pm 0.8$ )
DPPC/ 10% DPTAP P-2	110.7 ( $\pm 0.8$ )	0.107	31.3 ( $\pm 1.9$ )
DPPC/ 10% DPTAP P-3	192 ( $\pm 80$ )	0.300	38.3 ( $\pm 2.4$ )
DPPC/ 10% DPTAP P-4	165.1 (22.8)	0.288	39.9 (2.5)

\*Standardavviket er oppgitt i parentes.

Resultatene på zetapotensialet var som forventet, der formulering med 2.5% DPTAP hadde en lavere zetapotensiale enn 10% DPTAP formuleringene. PDI-verdiene var høyere for 10% DPTAP formuleringene.

##### 6.1.1.1 DPPC/ 2.5% DPTAP

Det ble produsert to ulike paralleller av DPPC/ 2.5% TAP. Parallell 1 (P-1) ble oppbevart i kjøleskap i 47 dager, og parallell 2 (P-2) ble oppbevart i ni dager før formuleringene ble karakterisert. Størrelses-resultater for P-1 og P-2 var henholdsvis  $148.1 \pm 0.5$  nm og  $109 \pm 0.7$  nm. Begge suspensjonene ble karakterisert igjen etter to måneder og da hadde P-1 en partikkelstørrelse på  $150 \pm 1.0$  nm og P-2 en størrelse på  $109.9 \pm 0.8$  nm. Under oppbevaringen av parallellene ble det dannet skum (figur 6.1). Skumbelegget forble til og med etter at hetteglassene sto lenge i ro og det hadde ikke vært risting. Det ble produsert en ny batch med to paralleller for å undersøke skumdannelsen. Den nye batchen hadde en partikkelstørrelse på  $106 \pm 0.8$  nm for P-3 og  $105 \pm 0.6$  nm for P-4.



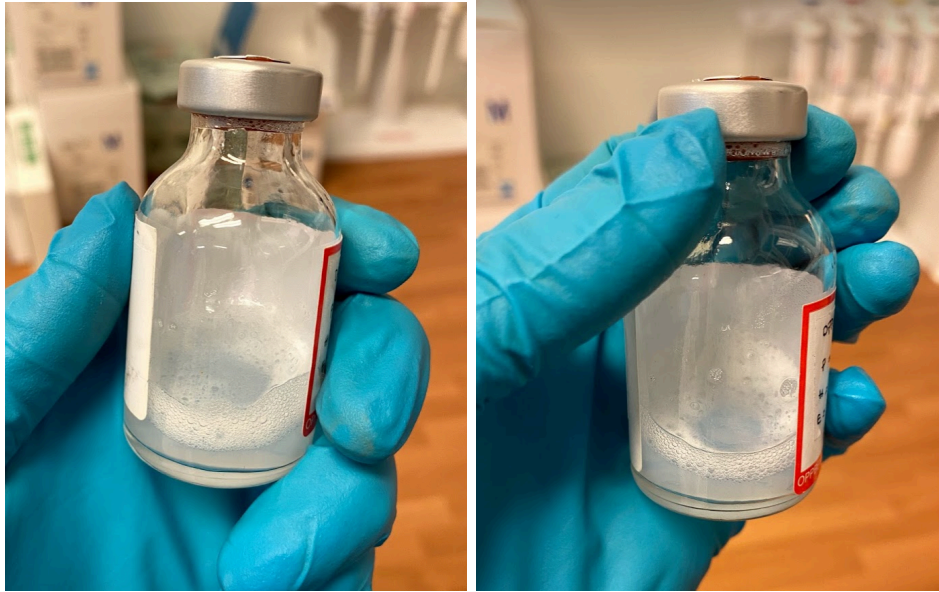
**Figur 6.1: DPPC/ 2.5% DPTAP uten innkapslet virkestoff**

*Figur til venstre viser DPPC/ 2.5% TAP P-1 av batch-1, og figur til høyre viser DPPC/ 2.5% TAP P-2 av batch-1. Bildene ble tatt etter 4 måneder etter produksjonen for P-1, og 3 måneder etter produksjonen av P-2. Begge formuleringene ble oppbevart i kjøleskap (4 °C).*

Det var ikke mulig å se noen aggregater i løsningene med det blotte øyet. PDI-verdien for P-1 var på 0.053 og 0.057 for P-2.

#### **6.1.1.2 DPPC/ 10% DPTAP**

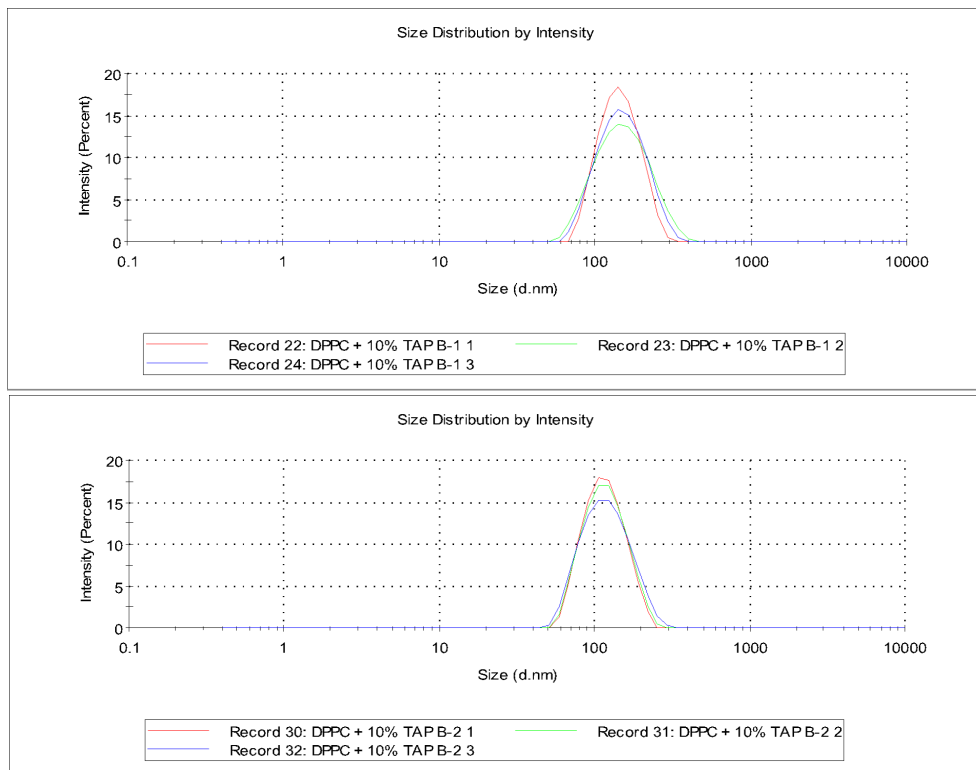
Fremstilling av DPPC/ 10% TAP virket som en suksess etter ekstruderingen. Etter at liposomsuspensjonen var oppbevart i kjøleskapet i noen dager ble det observert skum i suspensjonen (figur 6.2b). Suspensjonen begynte i tillegg å bli mer viskøs under oppbevaringen selv etter den ble romtemperert. Den første parallellen var stående i kjøleskapet i 47 dager før den ble karakterisert. Partikkelstørrelsen var på  $146.5 \pm 2.4$  nm for DPPC/ 10% TAP P-1. Det var mulig å se aggregater i suspensjonen med det blotte øyet. En ny batch av DPPC/ 10% TAP ble produsert og ble stående i kjøleskapet i ni dager før størrelse og zetapotensiale ble målt. Under oppbevaringen ble det dannet et skumlag på overflaten for P-2 (figur 6.2), samt virket det som at suspensjonen ble mer viskøs. Hetteglassene ble stående i ro i kjøleskapet (4 °C) i noen dager for å forsikre at det er ikke på grunn av risting eller andre mekaniske påkjenninger at det ble dannet skum. Størrelsen på DPPC/ 10% TAP P-2 var på  $110.7 \pm 0.8$  nm.



**Figur 6.2: DPPC/ 10% DPTAP uten innkapslet virkestoff**

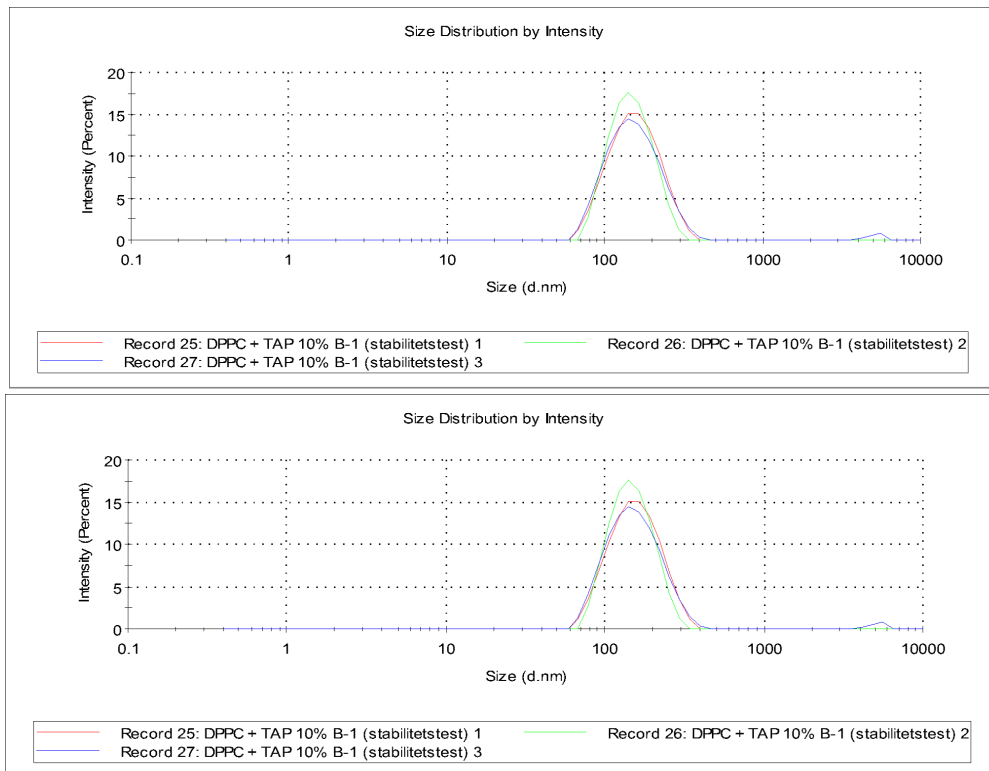
Figur til venstre viser DPPC/ 10% TAP P-1, og figur til høyre viser DPPC/ 10% TAP P-2. Begge hadde et skumbelegg på toppen av liposomsuspensjonen. Bildene ble tatt etter at suspensjonene hadde stått i ro i kjøleskapet (4 °C) i noen dager.

Første størrelsesmåling av DPPC/ 10% DPTAP P-1 og P-2 viste en topp (6.3). Etter to måneder ble det gjennomført en ny størrelsesmåling og da ble det registrert to ulike topper (figur 6.4).



**Figur 6.3: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPTAP**

Figuren viser den første størrelsesfordeling av DPPC/ 10% DPTAP P-1 (a), første størrelsesfordeling av DPPC/ 10% DPTAP P-2 (b). Begge målingene viser en topp.



**Figur 6.4: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) g av DPPC/ 10% DPTAP to måneder etter ekstrudering**

Figuren viser størrelsesfordeling av henholdsvis DPPC/ 10% TAP P-1 (a) og DPPC/ 10% TAP P-2 (b) to måneder etter ekstrudering. Begge målingene viser i tillegg til hovedtoppen en liten ekstra topp ved større partikkelstørrelsesområde.

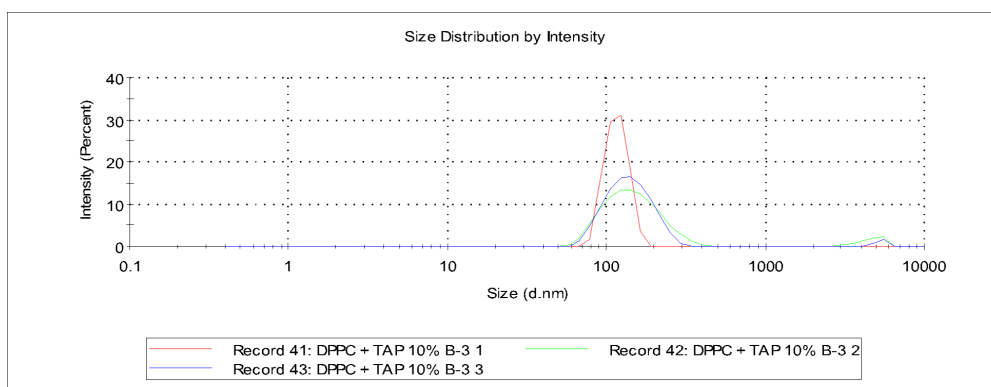
For å undersøke om skumforekomsten skyldts såperester fra vask eller andre forurensninger ble det fremstilt to nye paralleller med DPPC/ 10% TAP. Alt utstyr brukt under fremstillingen ble skylt ekstra godt med sterilt ionebyttet vann. Disse to nye parallellene var svært krevende å ekstrudere og det var nødvendig å øke temperaturen i ekstruderen fra 50 °C til 60-70 °C for å klare og få suspensjonen gjennom membranen. Etter ekstruderingen sår suspensjonene tilsynelatende fine ut og de ble oppbevart i kjøleskapet i ni dager før karakteriseringen ble utført. Det ble observert at suspensjonen endret seg under oppbevaring. Begge suspensjonene så mer viskøs ut og det var tegn til aggregatdannelse selv etter at de hadde blitt romtempererte (figur 6.5). Det ble derimot ikke observert skumdannelse i disse suspensjonene noe som ble observert i de to første parallellene.



**Figur 6.5: DPPC/ 10% DPTAP B-3**

Figur (a) viser DPPC/ 10% TAP P-3, og figur (b) viser DPPC/ 10% TAP P-4. Begge suspensjonene så mer viskøse ut enn tidligere og det var tegn til aggregatdannelse. Bildene ble tatt etter at formuleringene hadde stått i romtemperatur i to timer.

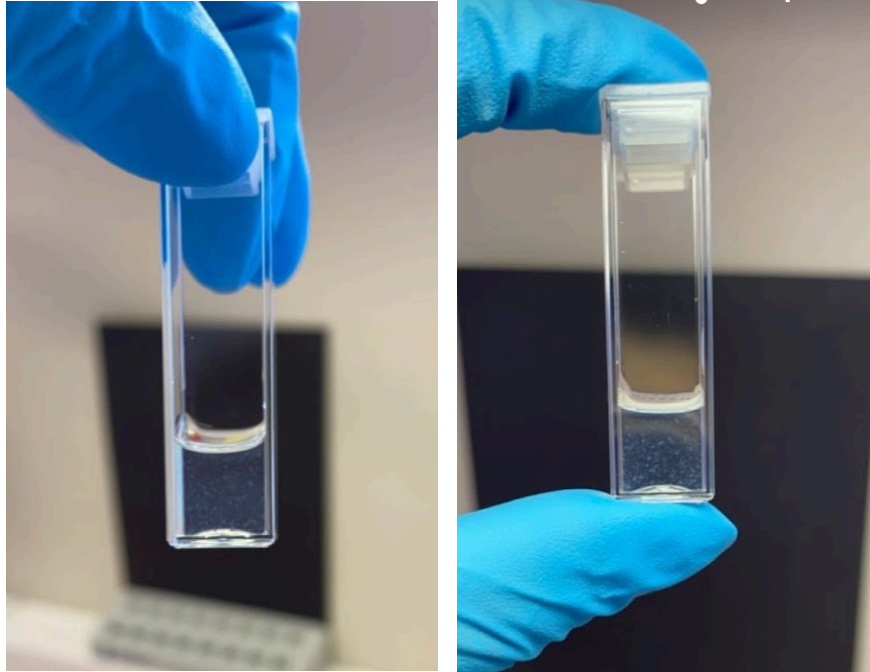
DPPC/ 10% DPTAP P-3 hadde en størrelse på  $192 \pm 80$  nm, og hadde to topper som vist i figur 6.6. DPPC/ 10% DPTAP P-4 hadde en størrelse på  $165.1 \pm 22.76$  nm, og hadde en topp.



**Figur 6.6: Graf for størrelsesfordeling (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPTAP P-3 viser to ulike topper**

Både DPPC/ 10% DPTAP P-3 og P-4 hadde partikler som var mulig å se med det blotte øyet. Resultatene fra Zetasizer for begge suspensjonene var under 200 nm.





**Figur 6.7: DPPC/ 10% DPTAP B-3 i kyvette viste partikler**

Figur (a) viser DPPC / 10% DPTAP P-3, og figur (b) viser P-4. Det var mulig å se partikler i prøvene.

Ingen av DPPC/ 10% TAP P-3 og P-4 møtte kvalitetskriteriene til partikkelstørrelsesmålinger det ble rapportert at prøvene var av dårlig kvalitet, samt hadde begge prøvene for høy polydispersitet for distribusjons- og kumulativanalyser. Det ble også rapportert at det er tegn på store, eller sedimenterende partikler.

### 6.1.2 Negativ ladete liposomer

Tabell 6.2 viser resultatene av karakteriseringen av de ulike negativ ladete liposomer som ble fremstilt.

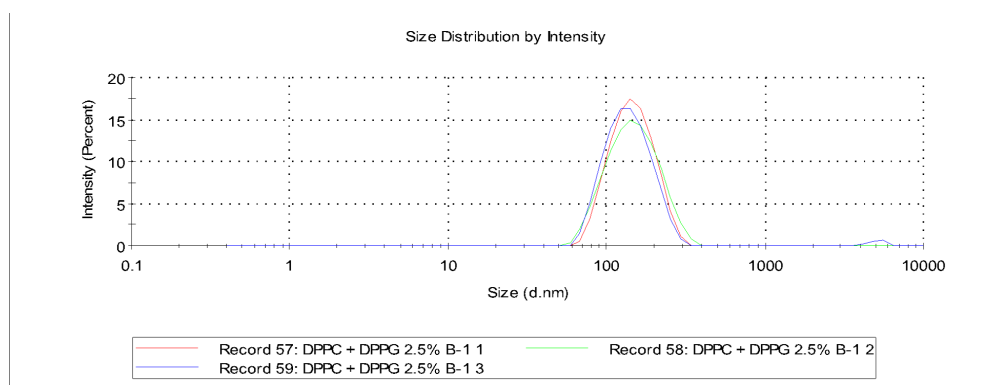
**Tabell 6.2: Diameteren, PDI og zetapotensiale målt ved bruk av Zetasizer**

Liposomer	Z-average (Dm i nm) (standard deviation)*	PDI	Zetapotensiale (mV) (standard deviation)*
DPPC/ 2.5% DPPG P-1	135.6 (± 2.1)	0.119	-16.7 (± 0.6)
DPPC/ 2.5% DPPG P-3	114.1 (± 0.5)	0.111	-20.1 (± 0.5)
DPPC/ 10% DPPG P-1	130.3 (± 2.2)	0.070	-42.1 (± 0.5)
DPPC/ 10% DPPG P-3	113.3 (± 2.2)	0.088	-42.0 (± 2.2)

Zetapotensialet var lavere for formuleringene med 2.5% DPPG, noe som var forventet. Zetapotensialet viste noe varierende resultater for P-1 og P-2 av DPPC/ 2.5% DPPG i forhold til 10% DPPG der begge parallellene hadde lik ladning på  $-42 \pm 2.15$  mV.

### 6.1.2.1 DPPC/ 2.5% DPPG

Faseomvandlingstemperaturen til både DPPC og DPPG er på 41 °C (76). Ekstruderingen av DPPC/ 2.5% DPPG P-1 ble først utført ved 40 °C noe som var for lavt og det var svært vanskelig å ekstrudere suspensjonen. Temperaturen ble dermed økt til 50 °C som gjorde ekstruderingen mye lettere. P-1 ble vellykket produsert og ekstrudert. Liposomsuspensjonen hadde en partikkelstørrelse på  $135.6 \pm 2.1$  nm, og størrelsesfordelingen viste to ulike topper (figur 6.8) Det var ikke mulig å se noen partikler med det blotte øyet.



**Figur 6.8: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 2.5% DPPG P-1 viste en hovedtopp og en liten topp**

P-2 virket normal etter hydreringen, men dagen etter så det ut som at det utfelling hadde forekommet (figur 6.9). P-2 ble ikke ekstrudert og det ble bestemt å produsere en ny batch for å undersøke om det kanskje hadde skjedd en feil under fremstillingsprosessen.

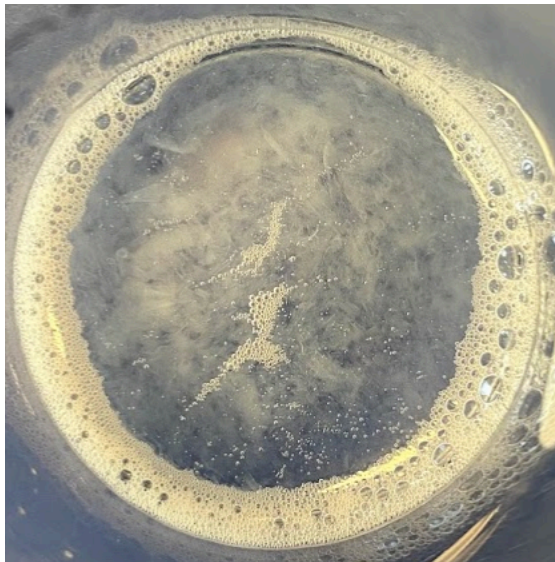


**Figur 6.9: Figuren viser utfelling i DPPC/ 2.5% DPPG P-2 dagen etter hydrering. Bildet tatt ovenfra og ned i begerglasset.**

DPPC/ 2.5% DPPG P-3 ble produsert, men denne gangen ble den hydrert og ekstrudert på 50°C. Liposomsuspensjonen ble vellykket produsert med en partikkelstørrelse på  $114.1 \pm 0.5$  nm, og størrelsesfordelingen avdekket kun en topp.

### 6.1.2.2 DPPC/ 10% DPPG

DPPC/ 10% DPPG P-1 var vellykket produsert med en partikkelstørrelse på  $130.3 \pm 0.5$  nm og zetapotensiale på  $-42.1 \pm 2.2$  mV. DPPC/ 10% DPPG P-2 hadde samme problem som DPPC/ 2.5% DPPG P-2 der etter hydreringen så liposomsuspensjonen fin ut, men dagen etter virket det som at det hadde skjedd en utfelling (figur 6.10).



**Figur 6.10: Figuren viser utfelling i DPPC/ 10% DPPG P-2 dagen etter hydreringstrinnet. Bildet tatt ovenfra og ned i begerglasset.**

Det ble produsert en ny batch med DPPC/ 10% PG, som ble vellykket hydrert og ekstrudert. DPPC/ 10% DPPG P-3 hadde en partikkelstørrelse på  $113.3 \pm 0.5$  nm. Kvalitetsrapporten fra partikkelstørrelsesmålingen tilsa at resultatene var av god kvalitet. Zetapotensialet ble rapportert til å være  $-42.0 \pm 3.1$  mV. Størrelsesfordelingen avdekket kun en topp.

## 6.2 Etablering av fremstillingsmetode med innkapslet virkestoff

### 6.2.1 Positiv ladete liposomer

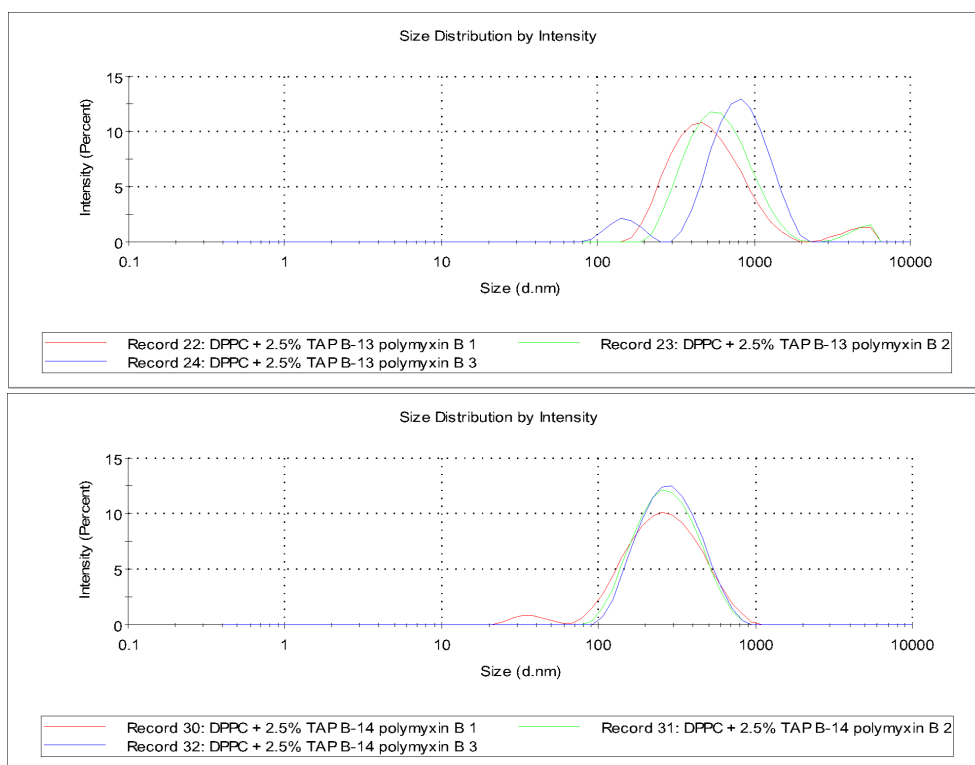
Tabell 6.3 viser resultatene av karakteriseringen av de ulike liposomene som ble fremstilt.

**Tabell 6.3: Diameteren, PDI og zetapotensiale målt ved bruk av Zetasizer**

Liposomer	Z-average (Dm i nm) (standard devation)*	PDI	Zetapotensiale (mV) (standard devation)*
DPPC/ 2.5% DPTAP med polymyxin B sulfat P-1	507.5 ( $\pm$ 63.6)	0.305	7.18 ( $\pm$ 0.2)
DPPC/ 2.5% DPTAP med polymyxin B sulfat P-2	217.8 ( $\pm$ 8.6)	0.261	8.75 ( $\pm$ 0.3)
DPPC/ 2.5% DPTAP med gentamicin sulfat P-1	107.5 ( $\pm$ 0.6)	0.061	13.9 ( $\pm$ 0.7)
DPPC/ 2.5% DPTAP med gentamicin sulfat P-2	129.2 ( $\pm$ 0.7)	0.083	15.1 ( $\pm$ 0.2)
DPPC/ 2.5% DPTAP med bacitracin P-1	186.1 ( $\pm$ 129.7)	0.480	7.94 ( $\pm$ 0.3)
DPPC/ 2.5% DPTAP med bacitracin P-2	122.2 ( $\pm$ 74.8)	0.694	6.99 ( $\pm$ 0.1)

### 6.2.1.1 DPPC/ 2.5% DPTAP med polymyxin B sulfat salt

Det ble produsert to paralleller av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet polymyxin B. Størrelse resultatene for P-1 og P-2 var henholdsvis  $507.5 \pm 63.6$  nm og  $217 \pm 8.66$  nm. Grafen for størrelsesfordelingen (ved intensitet) viser ulike topper for P-1 og to ulike topper for P-2 (figur 6.11)



**Figur 6.11: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 2.5% DPTAP P-1 og P-2**

Figur (a) viser størrelsesfordelingen for P-1, og figur (b) viser størrelsesfordelingen for P-2. Karakteriseringen ble foretatt to dager etter ekstruderingen. Suspensjonene var oppbevart i kjøleskap (4 °C) i mellomtiden.

### 6.2.1.2 DPPC/ 2.5% DPTAP med gentamicin sulfat salt

To paralleller av DPPC/ 2.5% TAP med innkapslet gentamicin ble produsert. Det ble brukt 50 °C i hydreringsfasen, men temperaturen ble økt til 60 °C under ekstruderingen. En lavere temperatur på ekstruderen førte til at det var umulig å ekstrudere suspensjonen.

Størrelsesresultater for P-1 og P-2 var henholdsvis  $107.5 \pm 0.6$  nm og  $129.2 \pm 0.7$  nm. Størrelsesmåling avdekket kun en topp.

### 6.2.1.3 DPPC/ 2.5% DPTAP med bacitracin

To paralleller av innkapslet bacitracin ble produsert. Bacitracin ble oppløst i hydreringsmediet før den ble overført til rundkolbe med lipidfilmen. Under hydreringstrinnet så blandingen ut som en klar, gul suspensjon (figur 6.12).



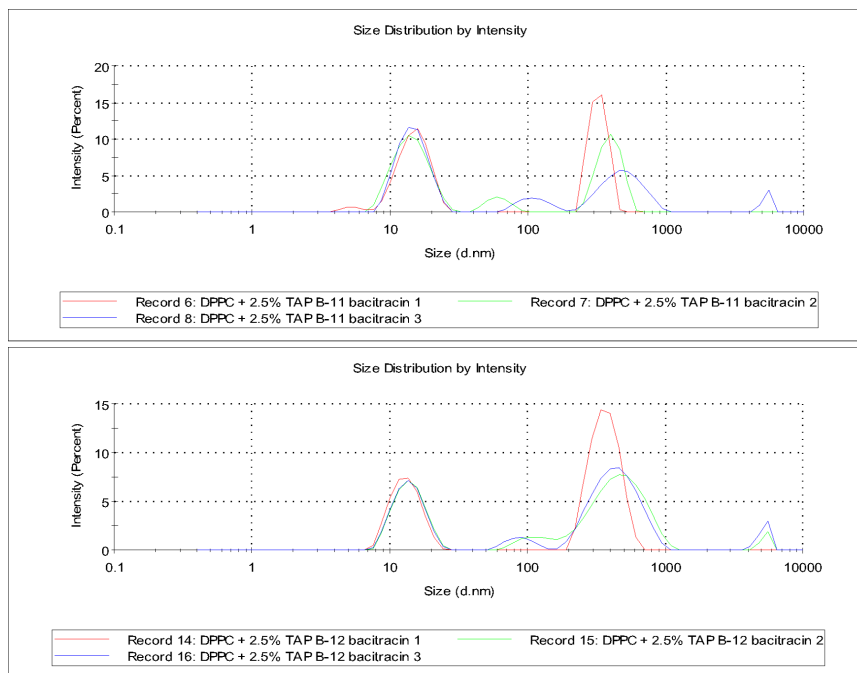
**Figur 6.12: DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet bacitracin**

Begge parallellene var like klare.

Størrelsesresultater for P-1 og P-2 var henholdsvis  $186.1 \pm 129.7$  nm og  $122.2 \pm 74.8$  nm. Ifølge kvalitetsrapporten til Zetasizer så oppnådde ingen av prøvene kvalitetskriteriene fordi datakvaliteten var for dårlig og størrelsesfordelingen for polydispers for distribusjonsanalyse og kumulantanalyse. Kvalitetsrapporten rapporterte også at det var tegn på store eller sedimenterende partikler, og at fargen på suspensjonen kunne ha påvirket målingene (figur 6.12). Det var ikke mulig å se noe sedimentering eller store partikler med det blotte øyet, men suspensjonen virket for klar for å være en liposomsuspensjon.

Ved måling av parallellene ble det vist at P-1 hadde en veldig lav derived count rate på gjennomsnittlig 616.133 kcps, og P-2 hadde en derived count rate på 778.8 kcps. Maskinen brukte en attenuator på 10 for å måle begge prøvene med bacitracin. Det indikerer veldig lav partikkel mengde i prøvene.

Størrelsesmåling avdekket også at disse to prøvene hadde tre ulike topper (figur 6.13).



**Figur 6.13: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet bacitracin**

Figur (a) viser størrelsesfordelingen for P-1, og figur (b) viser størrelsesfordelingen for P-2.

## 6.2.2 Negativ ladete liposomer

Tabell 6.4 viser resultatene av karakteriseringen av de ulike liposomene som ble fremstilt.

**Tabell 6.4: Diameteren, PDI og zetapotensiale målt ved bruk av Zetasizer**

Liposomer	Z-average (Dm i nm) (standard deviation)* $\pm$	PDI	Zetapotensiale (mV) (standard deviation)*
DPPC/ 10% DPPG med polymyxin B sulfat P-1	2010 ( $\pm$ 131.2)	0.487	-4.81 ( $\pm$ 0.3)
DPPC/ 10% DPPG med polymyxin B sulfat P-2	-*	-	-
DPPC/ 10% DPPG med gentamicin sulfat P-1	1130 ( $\pm$ 93.6)	0.418	-9.32 ( $\pm$ 0.3)
DPPC/ 10% DPPG med gentamicin sulfat P-2	1106 ( $\pm$ 92.7)	0.493	-10.4 ( $\pm$ 0.6)
DPPC/ 10% DPPG med bacitracin P-1	38.66 ( $\pm$ 1.2)	1.000	-28.9 ( $\pm$ 1.0)
DPPC/ 10% DPPG med bacitracin P-2	19.19 ( $\pm$ 0.6)	0.549	-21.3 ( $\pm$ 1.1)

\* P-2 av DPPC/ 10% DPPG med polymyxin B ble ikke ekstrudert og dermed ble den ikke karakterisert.

### 6.2.2.1 DPPC/ 10% DPPG med polymyxin B sulfat

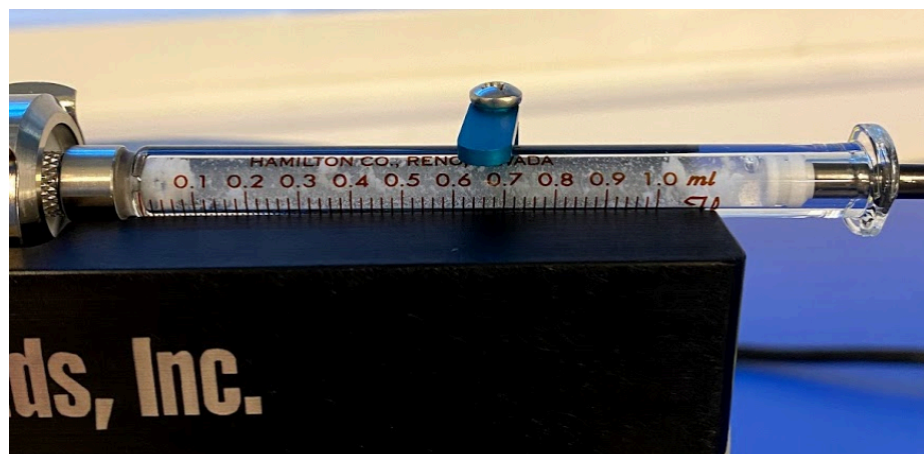
To paralleller av DPPC/ 10% DPPG med polymyxin B ble produsert. Under produksjonen ble sprøyten til ekstruderen ødelagt, og dermed var det ikke mulig å ekstrudere begge parallellene.

DPPC/ 10% DPPG uten virkestoff ble ekstrudert ved en temperatur på 50 °C. Ved ekstrudering av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet polymyxin B var det umulig å få suspensjonen gjennom membranen ved 50 °C. Ved å øke temperaturen til 60 – 70 °C ble det mulig å ekstrudere liposomsuspensjonen. Faseomvandlingstemperaturen til både DPPC og DPPG er på 41°C (76), så 50 °C skulle ha resultert i at suspensjonen hadde riktig temperatur ved ekstruderingen.

Måling av partikkelstørrelse ga en størrelse på 2010  $\pm$  131.2 nm, og en zetapotensiale på -4.81  $\pm$  0.3 nm. For partikkelstørrelsesmålingen så tilfredsstilte ikke prøven kvalitetskriteriene. Prøvekvaliteten var for dårlig, samt var prøven for polydispers for distribusjons- og kumulantanalyser.

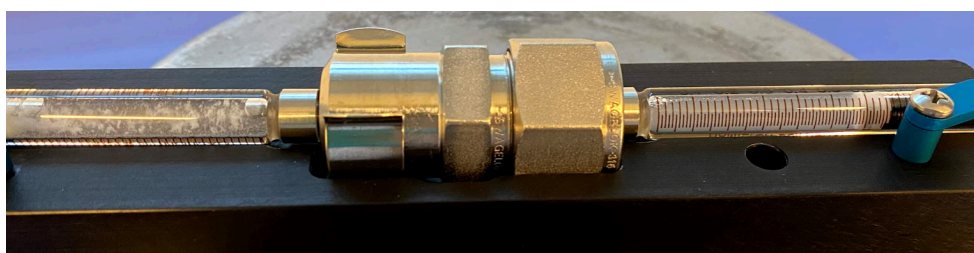
### 6.2.2.2 DPPC/ 10% DPPG med gentamicin sulfat

To paralleller av DPPC/ 10% DPPG med gentamicin ble produsert. Etter hydreringen så prøvene tilsynelatende fine ut og ble satt i kjøleskap til dagen etter. Den ikke ekstruderte DPPC/ 2.5% DPPG med gentamicin ble tatt opp i den ene sprøyten og lagt på varmeblokken i fem minutter før ekstrudering. Ettersom tiden gikk ble det observert utfelling i suspensjonen inni sprøyten (figur 6.14).



**Figur 6.14: DPPC/ 10% DPPG med innkapslet gentamicin etter fem minutter på varmeblokken. Hvit utfelling ble observert i inni sprøyten.**

Det ble allikevel forsøkt å ekstrudere suspensjonen. Suspensjonen gikk tilbake til sin «normale» tilstand etter kun en runde med ekstrudering (figur 6.15). Det var ikke mulig å se med det blotte øyet om suspensjonen hadde felt ut seg, og det var heller ikke mulig å se om det var store aggregater. Dette gjelder både for før og etter ekstruderingen. Denne tilstanden der suspensjonen har felt ut tok kun plass når liposomformuleringen var satt i varmeblokken. Det samme ble observert for begge parallellene av DPPC/ 10% DPPG med gentamicin. Etter ti runder med ekstrudering virket suspensjonen homogen, og suspensjonen oppførte seg normalt.

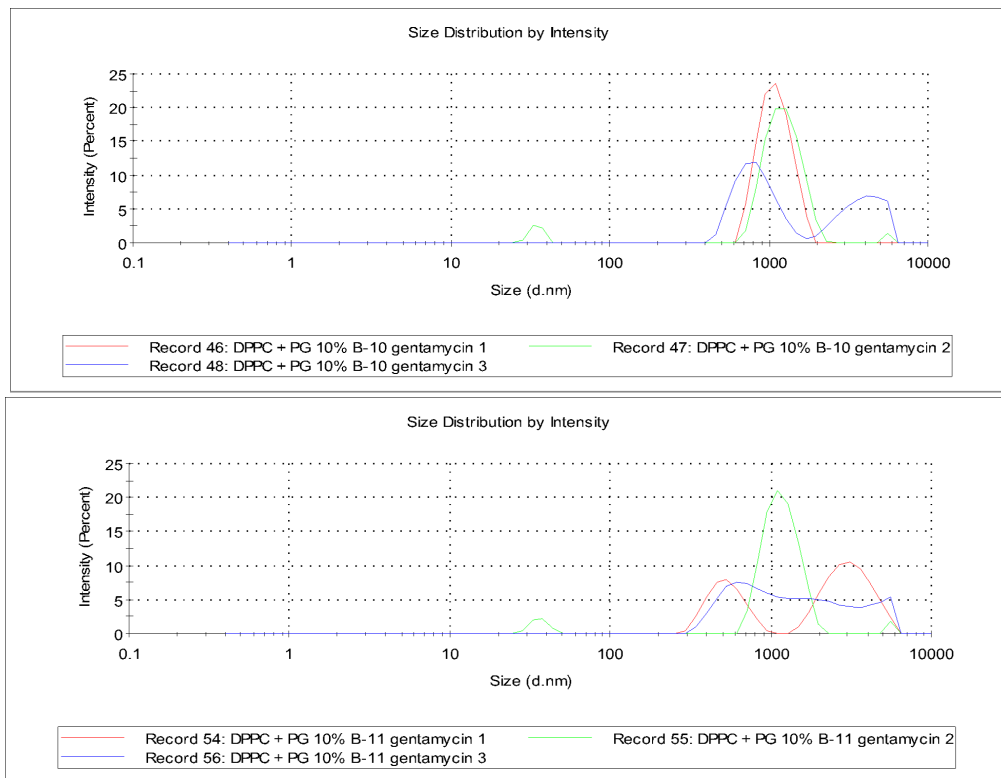


**Figur 6.15: Før og etter ekstrudering av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet gentamicin**

Sprøyten til venstre er «start-sprøyten» og inneholder liposomsuspensjonen før ekstrudering og sprøyten til høyre inneholder liposomsuspensjonen etter å ha blitt ekstrudert gjennom membranen en gang.



Størrelsesresultatene for DPPC/ 10% DPPG med gentamicin P-1 og P-2 var henholdsvis  $1130 \pm 93.6$  nm og  $1106 \pm 92.7$  nm. Størrelsesmålingen av DPPC/ 10% DPPG med gentamicin P-1 avdekket flere ulike topper (figur 6.16). Resultatene møtte ikke kvalitetskriteriene der det ble rapportert at prøven var for polydispers for kumulantanalyse. For DPPC/ 10% DPPG med gentamicin P-2 ble det også avdekket flere topper (figur 6.16). Igjen møtte ikke denne prøven kvalitetskriteriene til partikkelstørrelsesmåling, og det ble rapportert det samme som for P-1.



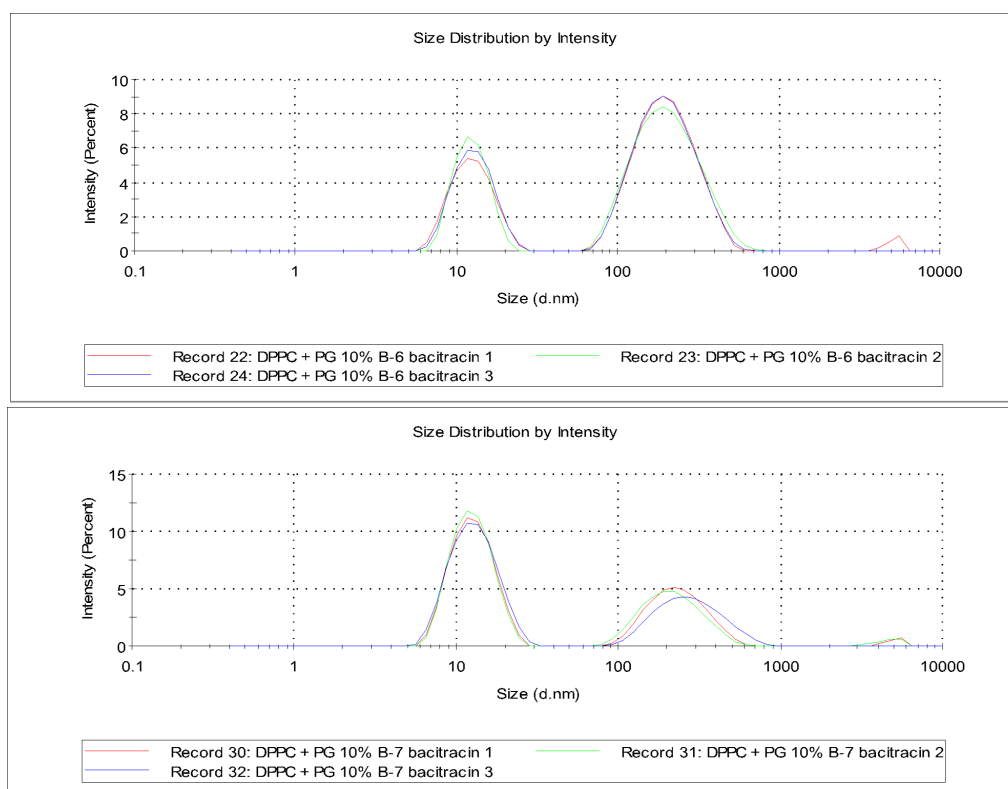
**Figur 6.16: Graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet gentamicin**

Figur (a) viser P-1, og figur (b) viser P-2.

Zetapotensialet for P-1 og P-2 var henholdsvis  $-9.32 \pm 0.3$  mV og  $-10.4 \pm 0.6$  mV.

### 6.2.2.3 DPPC/ 10% DPPG med bacitracin

To paralleller av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet bacitracin ble produsert. P-1 møtte ikke kvalitetskriteriene der det ble rapportert at prøven var for polydispers. Det ble også rapportert at det var mulig med tilstedeværelse av store partikler eller støv i prøven selv om dette ikke kunne observeres med det blotte øyet. Størrelse målt for P-1 var på  $39.89 \pm 1.1$  nm. Det ble avdekket tre topper for denne prøven (figur 6.17).



**Figur 6.17: Første bildet viser graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet bacitracin P-1 viser tre topper. Andre bildet viser graf for størrelsesfordelingen (ved intensitet) av DPPC/ 10% DPPG med innkapslet bacitracin P-2.**

Det ble avdekket tre ulike topper for parallell-2.

For P-2 ble det rapportert at prøven tilfredsstilte kvalitetskriteriene. Det ble målt en størrelse på 18.65 nm, men PDI var relativ høy (0.549) og grafen for størrelsesfordeling (ved intensitet) avdekket tre topper (figur 6.17).

Felles for begge prøvene var den uvanlig lave *derived count rate* hvor P-1 hadde en gjennomsnittlig *count rate* på 805 kcps, og P-2 hadde en gjennomsnittlig *count rate* på 341 kcps. Suspensjonen var veldig klar med en svak gul farge (figur 6.18). Zetasizer brukte en attenuator på 10 for å klare og analysere prøven.

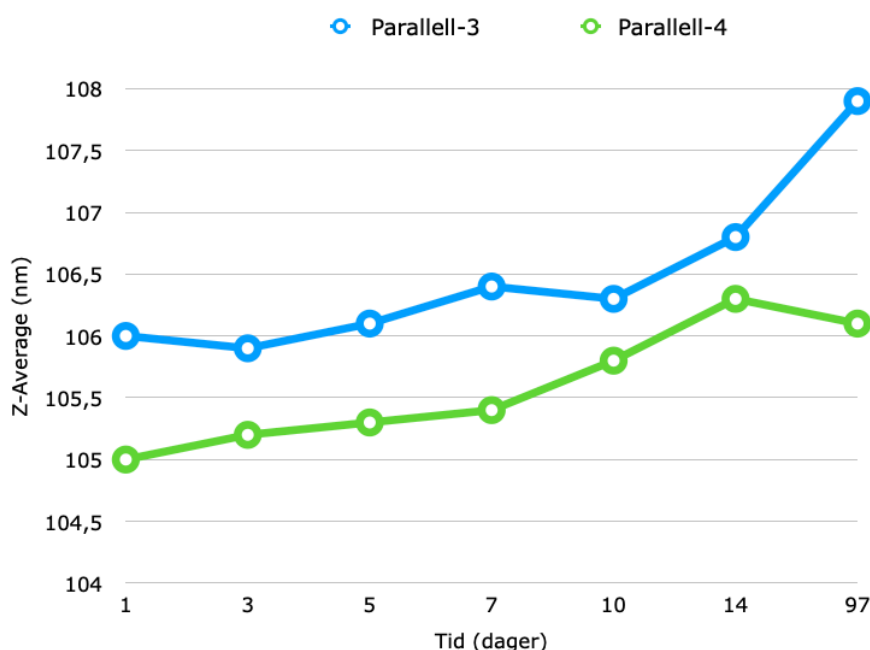


**Figur 6.18: DPPC/ 10% DPPG med innkapslet bacitracin**

Begge parallellene var like klare.

### 6.3 Karakterisering

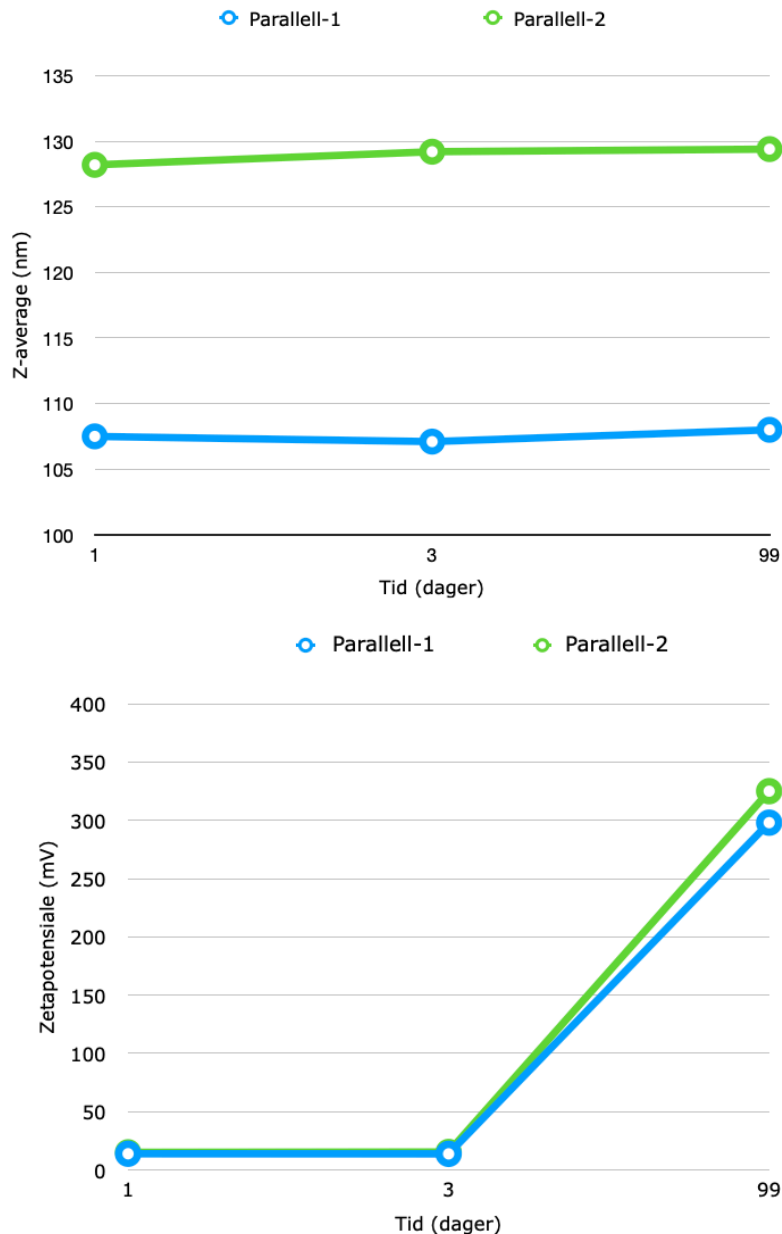
*In vitro* stabilitet av DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff og med innkapslet gentamicin ble undersøkt. Stabiliteten ble undersøkt for to ulike paralleller av hver formulering. For DPPC/ 2.5% TAP uten virkestoff var det mulig å se stabilitetsstudien i figur 6.19. Zetapotensialet for P-3 og P-4 endret seg henholdsvis  $14.0 \pm 0.5$  mV og  $14.0 \pm 0.9$  mV ved den første testen og 295 mV og 298 mV ved den siste karakteriseringen.



**Figur 6.19: Stabilitetsstudie av DPPC/ 2.5% TAP uten virkestoff**

Endring i størrelse av DPPC/ 2.5% DPTAP over tid. Y-aksen er størrelse på partiklene oppgitt i nm, og x-aksen er tid oppgitt i dager.

For formuleringen med innkapslet gentamicin var det kun mulig å karakterisere prøvene tre ganger etter produksjon; etter 1 dag, 3 dager og 99 dager. For den gel-filtrerte prøven av parallellene ble det kun karakterisert en gang som var 99 dager selve liposomproduksjonen. Figur 6.20 viser partikkelstørrelsesendring og zetapotensialendring av liposomformuleringen under oppbevaring.



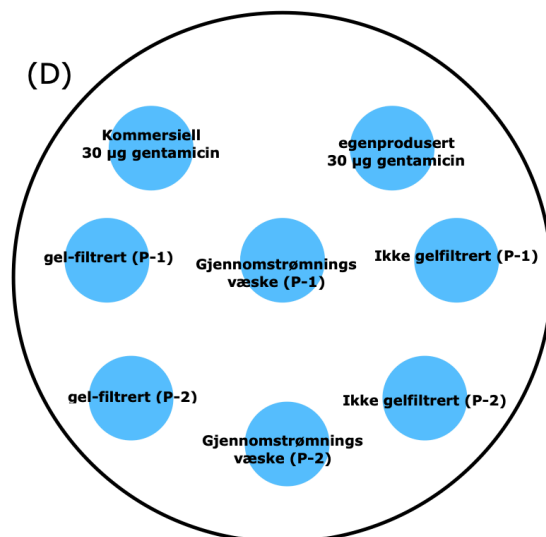
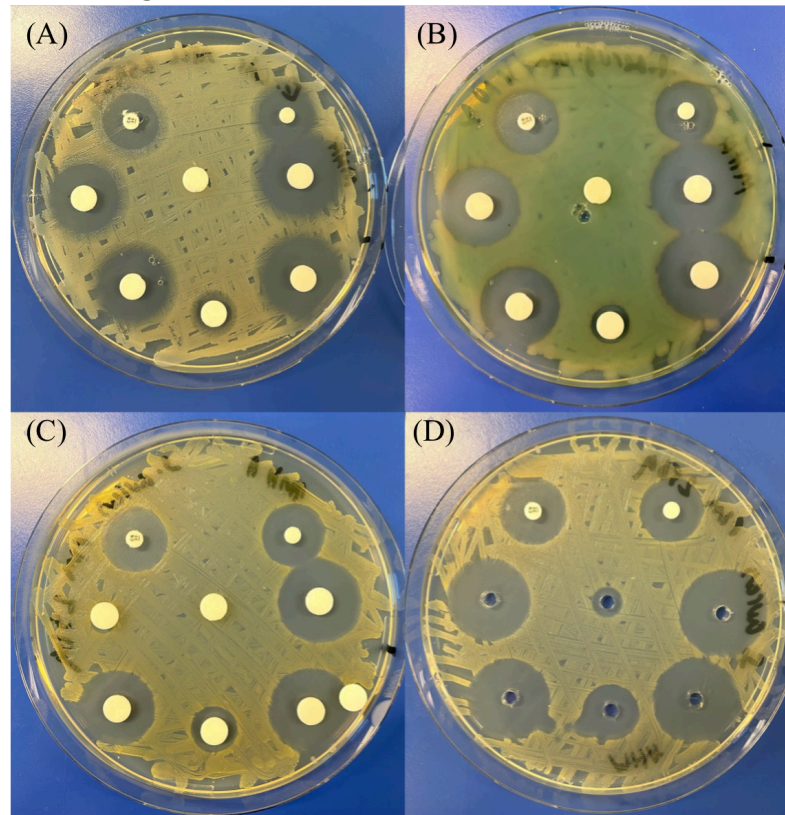
**Figur 6.20: Den første figuren viser partikkelstørrelsesendring, og den andre figuren viser zetapotensialendringen.**

Den blåe kurven representerer parallell-1 av DPPC/ 2.5% DPTAP med gentamicin, og den grønne kurven representerer parallell 2 av DPPC/ 2.5% DPTAP med gentamicin.

Endring av størrelsen var av ubetydelig grad. Zetapotensiale derimot har endret seg betydelig fra den andre karakterisering og den siste (figur 6.20) Det ble kun detektert en topp ved alle de ulike målingene for de fire liposomformuleringene. For den gel-filtrerte prøven for parallell-1 og parallell-2 ble partikkelstørrelsen henholdsvis  $107.5 \pm 0.5$  nm og  $129.1 \pm 0.9$  nm. Målingen av den gel-filtrerte prøven ble gjennomført 50 dager etter gelfiltreringen ble gjennomført. Zetapotensiale endringen for parallell-1 var på  $288 \pm 8$  mV og for parallell-2  $298 \pm 7.6$  mV.

## 6.4 Uttesting av utvalgt liposomformuleringer på agarplater

Hemmingssone av bakteriene ble målt ved bruk av linjal og verdiene ble oppgitt i mm. Figur 6.21 viser hemmingssonene på agarplatene og tabell 6.5 viser en oversikt over hemmingssoner for de ulike bakteriene.



**Figur 6.21: Figuren viser hemmingssonene til**

(a) *E. coli*, (b) *P. aeruginosa*, (c) *S. aureus* ved bruk av diskdiffusjonsmetoden, og (d) *S. aureus* ved bruk av brønn diffusjon metoden. På bilde (c) ser man en ekstra filterpapirdisk; denne disken er uten virkestoff, størst sannsynlig var det lagt to lapper på agarskålen og den ene datt av. Bilde (d) viser oppsettet brukt

Aktiviteten av gentamicin i form av kommersielt-tilgjengelige disk ble sammenlignet med gentamicin-disk produsert med pulveret som ble brukt under liposomproduksjonen i dette studiet. Begge diskene ga nesten lik hemmingssone for alle testbakteriene. *P. aeruginosa* hadde den største forskjellen, men den var på kun 2 mm forskjell. I tillegg ble gjennomstrømningsvæske og ikke-gelfiltrert prøve fra parallell-1 og parallell-2 testet.

**Tabell 6.5: Oversikt over hemmingssonene til tre ulike bakterier ved bruk av henholdsvis diskdiffusjon- og brønndiffusjonstest.**

Prøve	Diameter (Ø) av hemmingssonen til nærmeste mm			
	Papirdisker *			Brønner*
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
Kommersiell gentamicin (30 µg)**	23	23	23	23
Egenprodusert gentamicin disk***	21	22	22	22
Gel-filtrert prøve (P-1)	27	27	-	28
Gjennomstrømningsvæske ved gelfiltrering (P-1)	-	-	-	11
Ikke-gelfiltrert prøve (P-1)	32	30	29	30
Gel-filtrert (P-2)	29	27	27	29
Gjennomstrømningsvæske ved gelfiltrering (P-2)	-	12	16	19
Ikke-gel-filtrert prøve (P-2)	30	30	29	30

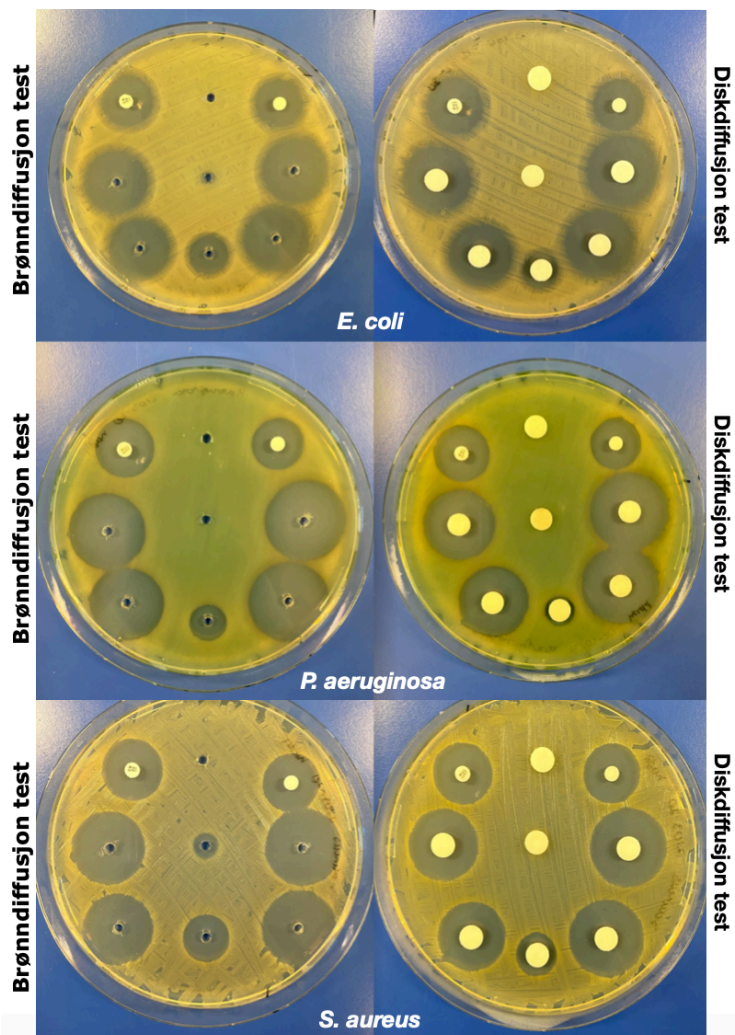
\* disk Ø = 10 mm; brønn Ø = 3.5 mm

\*\* Oxoid™ Antimicrobial susceptibility disc 30 µg gentamicin (ThermoFisher Scientific, US)

\*\*\* 30 µg gentamicin disk produsert av pulveret som ble brukt under innkapsling av virkestoff i liposomer

For *E. coli* var det en liten forskjell på hemmingssone som ble produsert ved bruk av gel-filtrert liposomformulering og ikke gel-filtrert gelfiltrering av parallell-1. Dette indikerer at det var lite gentamicin som gikk tapt under gelfiltrering. Det ble ikke produsert en hemmingssone for disken som inneholdte gjennomstrømningsvæsken. Aktiviteten av innkapslet gentamicin på *P. aeruginosa* viste samme tendens som for *E. coli*. For disker som inneholdte prøver fra parallell-1 var det ikke antibakteriell aktivitet for verken gel-filtrert prøve eller gjennomstrømningsvæsken. For disken som inneholdte ikke-gelfiltrert liposomformulering var det en hemmingssone på 29 mm. For diskene som inneholdte liposomformulering fra parallell-2 var det hemmingssone for alle tre disker. Resultatene fra brønndiffusjon metoden med *S. aureus* ble det en hemmende effekt i alle brønnene, til og med de som inneholdte gjennomstrømningsvæsken.

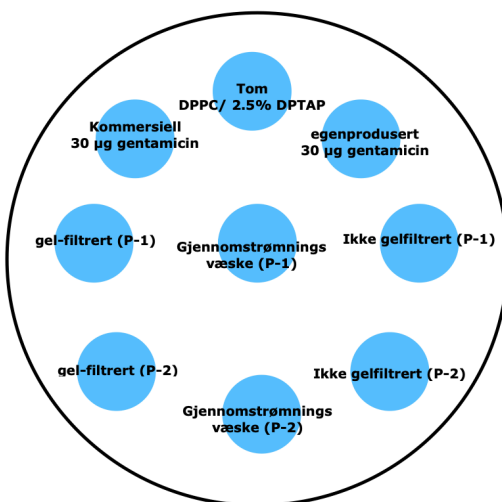
Forsøket ble repetert, men da ble det gjennomført både brønndiffusjon test og diskdiffusjon metoden på alle tre bakteriene. Figur 6.22 viser bilder av agarplatene.



**Figur 6.22: Hemmingsonene ved bruk av disk- og brønddiffusjon metodene**

Figuren viser brønddiffusjon og diskdiffusjon testene på *E. coli*, *P. aeruginosa* og *S. aureus*.

Figur 6.23 viser oppsettet om hva de ulike diskene og brønnene inneholdte i testene gjennomført.



**Figur 6.23: Oppsettet som ble brukt ved bruk av disk- og brønddiffusjon metodene**

Agarskålene ble inkubert i varmeskap 12. mars og skulle tas ut dagen etter for måling av hemmingssone. Regjeringen stengte alle landets universiteter og høgskoler 12. mars på grunn av koronavirus-pandemi. Dermed var det ikke mulig å måle hemmingssonene og kun bilder ble tatt av agarplatene den 13. mars. Hemmingssonene ble målt 06. april av veileder Colin Charnock som da fikk tilgang til laboratoriet.

Resultatene er oppgitt i tabell 6.6. I dette forsøket var det en hemming av den gel-filtrerte prøven fra parallell-1 ved bruk av diskdiffusjonsmetoden i motsetning til forsøk en.

**Tabell 6.6: Oversikt over hemmingssonene til tre ulike bakterier ved bruk av henholdsvis diskdiffusjon- og brønddiffusjonstest.**

Prøve	Diameter (Ø) av hemmingssonen til nærmeste mm					
	Papirdisker *			Brønner*		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Kommersiell gentamicin (30 µg)**	23	22	22	23	22	22
Negativ kontroll***	0	0	0	0	0	0
Gentamicin disk****	22	21	22	22	21	23
Gel-filtrert prøve (P-1)	30	29	28	32	28	29
Gjennomstrømning (P-1)	0	0	0	0	0*****	10
Ikke-gelfiltrert prøve (P-1)	33	30	29	34	30	30
Gel-filtrert prøve (P-2)	30	28	26	32	28	30
Gjennomstrømning (P-2)	13	16	15	16	18	19
Ikke-gelfiltrert prøve (P-2)	33	30	29	35	30	31

\* disk Ø = 10 mm; brønn Ø = 3.5 mm

\*\* Oxoid™ Antimicrobial susceptibility disc 30 µg gentamicin (ThermoFisher Scientific, US)

\*\*\* Negativ kontrollen var tom DPPC/ 2.5% DPTAP P-3

\*\*\*\* Gentamicin disk produsert av pulveret som ble brukt under innkapsling av virkestoff i liposomer

\*\*\*\*\* mulig det er hemmingssone på < 1 mm rundt brønnen

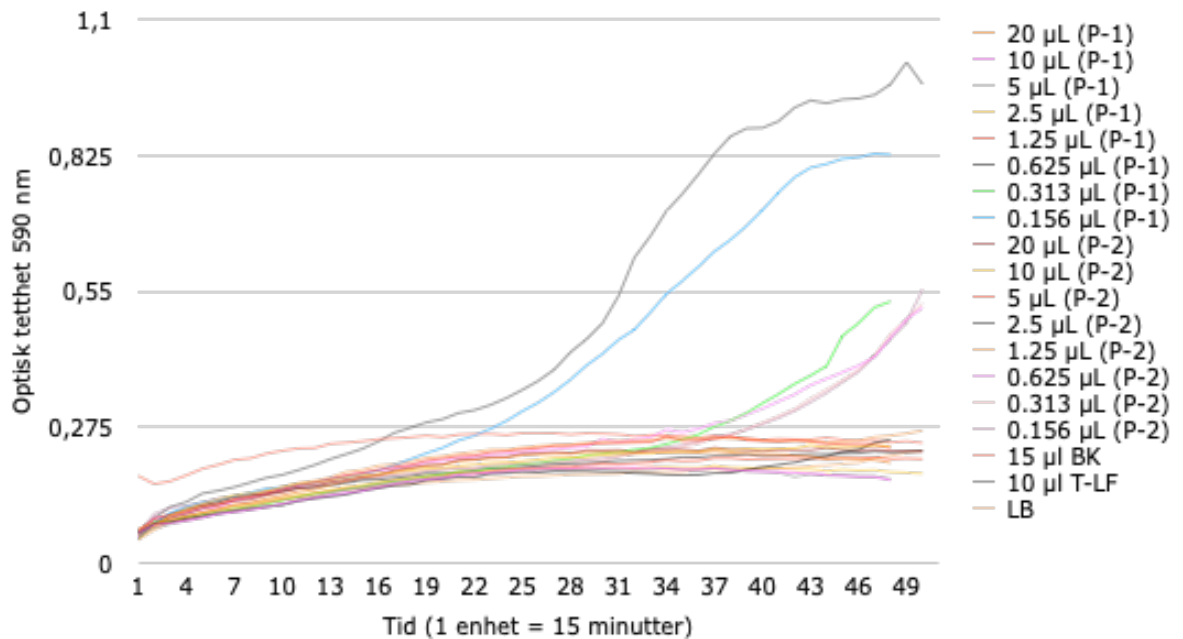
DPPC/ 2.5% DPTAP etter gel-filtrering og før gel-filtrering hadde omtrent lik aktivitet; med en liten reduksjon i den gelfiltrerte prøven. Dette kan indikere at kun en liten andel av liposomer blir borte under rensingen. Gjennomstrømningsvæske ga ikke noe antibakteriellhemming, som kan indikere at gentamicin har blitt effektivt pakket inn i liposomformuleringen. Resultatene på hemmingssonene var omtrent like for liposomal gentamicin sammenlignet med kommersiell gentamicin som viser at brukt pulver under innkapslingen av virkestoff hadde den samme antibakterielle aktiviteten.



## 6.5 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte liposomformuleringer på planktoniske celler

### 6.5.1 Uttesting på *P. aeruginosa* celler

Den optiske tettheten i de ulike brønnene ble målt over 12 timer. En lav optisk tetthet tilsier en hemming av bakterieveksten. Dermed vil en høyere optisk tetthet tilsi lite antibakteriell aktivitet av testsubstansen. Figur 6.24 viser en oversikt over tettheten for bakterier som ble utsatt for ulike volum av DPPC/ 2.5% TAP med innkapslet gentamicin P-1 og P-2.



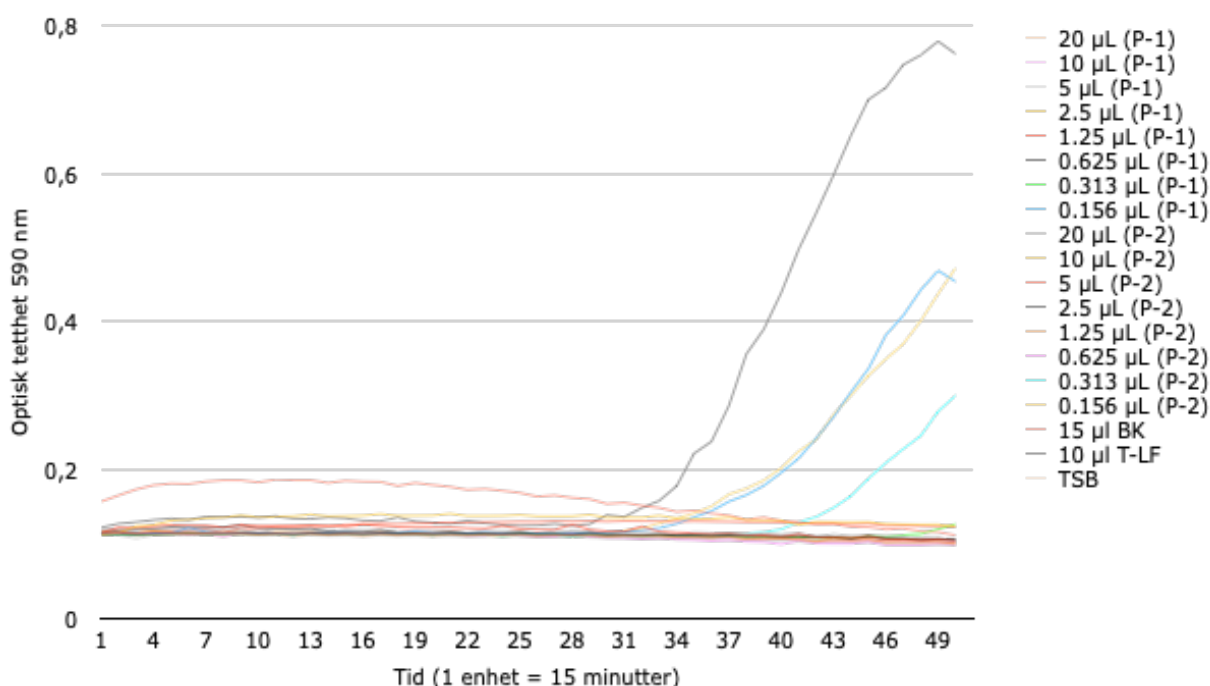
**Figur 6.24** Vekstkurve av *P. aeruginosa*

Vekstkurve i nærvær av ulike volum av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin (parallell 1 og parallell-2) på *P. aeruginosa*. I samme grafen kan man se positiv kontroll med T-LF (= DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff) samt blank (= LB uten bakterier eller nanopartikler)

Volum 0.625 µL parallell-1 og volum 1.25 µL for parallell-2 ga ingen vekstrespons. Dette tilsvarer en antibakteriell aktivitet som tilsvarer MIC av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin. Resultatene viser også at hemming av vekst har vært stabil under testperioden (12 timer). Dette indikerer at liposomformuleringen fortsatte å frigjøre minst MIC over hele testperioden. Ved lavere volum (0.156 µL og 0.313 µL for parallell-1 og 0.156 µL, 0.313 µL og 0.625 µL for parallell-2) var det en forlenget lagfase, men veksten ble registrert etterhvert. Dette kan indikere en midlertidig hemming av vekstresponsen ved lavere liposom volum. Det det laveste volum testet (0.156 µL av parallell-1) var vekstresponsen tilnærmet lik den positive kontrollen.

## 6.5.2 Uttesting på *S. aureus* celler

Figur 6.25 viser en oversikt over tettheten for bakterier som ble utsatt for DPPC/ 2.5% TAP med innkapslet gentamicin P-1 og P-2.



**Figur 6.25 Vekstkurve av *S. aureus***

Vekstkurve i nærvær av ulike volum av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin (parallell 1 og parallell-2) på *S. aureus*. I samme grafen kan man se positiv kontroll med T-LF (= DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff) samt blank (= TSB + 1% glukose uten bakterier eller nanopartikler)

Volum 0.313 µL av parallell-1 og volum 0.625 µL av parallell-2 ga ingen vekstrespons. Dette tilsvarer en aktivitet som tilsvarer MIC av liposomformuleringen brukt. Hemming av veksten har vært stabil under hele testperioden (12 timer). Dette betyr at liposomformuleringen frigjorde minst MIC over hele testperioden. Ved lavere volum (0.156 µL for parallell-1 og 0.156 µL og 0.313 µL for parallell-2) var det en forlenget lagfase. Veksten ble registrert etter hvert for alle tre volum. Dette kan tilsi at volum av liposomal gentamicin brukt var for lav, og at det resulterte i midlertidig hemming av *S. aureus*.

## 6.6 Mikrobiologisk uttesting av utvalgt liposomformulering på biofilm

### 6.6.1 Uttesting på *P. aeruginosa* biofilm

Tabell 6.7 viser en oversikt over CFU/mL i *P. aeruginosa* bakteriekulturen. Det var ikke mulig å se et mønster som viser redusert CFU/mL med høyere volum av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin. Bakterier som ble utsatt for DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff hadde et lavere CFU/mL enn for eksempel bakterier som ble utsatt med 50 µL liposomal gentamicin. Forskjellen var ikke av signifikant forskjell.

Ut fra resultatene ble det bestemt å ikke beregne prosentreduksjon av behandlet bakterier kontra ikke-behandlet.

**Tabell 6.7: CFU/mL i de originale *P. aeruginosa* bakteriekulturene som ble utsatt for DPPC/ 2.5% DPTAP med og uten innkapslet gentamicin**

	<b>Volum liposomformulering (µL)</b>	<b>CFU/mL</b>
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff</b>	50	$5.8 \times 10^3$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	0.024	$3.11 \times 10^4$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	0.049	$2.25 \times 10^4$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	0.098	ID
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	0.195	$1.88 \times 10^4$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	0.391	$1.56 \times 10^4$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	0.781	$1.21 \times 10^5$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	1.563	$3.6 \times 10^3$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	3.125	$9.4 \times 10^3$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	6.25	$7.5 \times 10^3$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	12.5	$1.76 \times 10^4$
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	25	$1.61 \times 10^4$

\* ID = Ingen data

### 6.6.2 Uttesting på *S. aureus* biofilm

Tabell 6.8 viser en oversikt over CFU/mL for den positive kontrollen og ulike volum av nanopartikler med gentamicin. Det var en stor forskjell mellom bakterier som ble utsatt for DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin kontra bakterier som ble utsatt for DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff. Det er et fast mønster som viser at med høyere volum av liposomal gentamicin reduserte også CFU/mL. Bakterier som ble utsatt for 1000 µL skiller seg ut, der originale løsningen hadde en høyere CFU/mL enn bakteriene som ble utsatt for 100 µL.

**Tabell 6.8: CFU/mL i *S. aureus* bakteriekulturene som ble utsatt for DPPC/ 2.5% DPTAP med og uten innkapslet gentamicin**

	Volum (µL)	LF*	CFU/mL	Prosentreduksjon i forhold til den positive kontrollen
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff</b>	100		$4.23 \times 10^8$	-
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	100		$3.32 \times 10^4$	99.99%**
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	1000		$8.7 \times 10^4$	99.98%**
<b>DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin</b>	2000		$1.17 \times 10^4$	99.998%**

\* LF = liposomformulering

\*\* Det ble beregnet prosentreduksjon ut fra originale *S. aureus* bakteriekulturen som ble utsatt med DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff.

Det ble beregnet prosentreduksjon av behandlet bakterier med DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin kontra bakterier som ble kun behandlet med DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff. Resultatene kan ses i tabell 6.8. Det er mulig å se at det har forekommet en betydelig reduksjon. Resultatene sier dermed at en volum på 100 µL av liposomale gentamicin reduserte bakteriene med over 4 log i forhold til bakteriene som ble utsatt for tomme liposomer. Dette indikerer baktericid aktivitet.



## 7. DISKUSJON

Den overordnede hensikten med oppgaven var å utvikle lipidbaserte nanoformuleringer som kunne kapsle inn AMP og dermed bedre leveringen mot bakterielle biofilmer. I denne oppgaven ble dette undersøkt ved å kapsle inn velkjente, peptidbaserte antibiotika som modellsubstanser for AMP i liposomer for levering først til planktoniske celler og deretter til biofilmer. Første del av oppgaven fokuserte på formuleringsarbeid og etablering av en fremstillingsmetode for liposomer (med og uten innkapsling av virkestoff) som kunne egne seg for det galenske laboratoriet ved OsloMet. Andre del av oppgaven fokuserte på mikrobiologiske uttestinger av utvalgt liposomformulering.

### 7.1 Etablering av fremstillingsmetode med Avanti® Mini-Ekstruder

Hensikten med denne delen av oppgaven var å etablere en fremstillingsmetode for liposomer ved bruk av tilgjengelig utstyr for liposomproduksjon ved galensk laboratorium på OsloMet. Ved å karakterisere og sammenligne de ulike formuleringene som ble produsert var det mulig å velge de mest egnede liposomsuspensjonene for videre arbeid med innkapsling av virkestoff. Tynnfilm-metoden er en velkjent metode (71, 72, 77) som brukes i liposom produksjon. I denne studien ble det brukt Mini-ekstruder fra Avanti® og ut ifra karakteriseringen og resultatene fra fra DPPC/ 2.5% DPTAP, ble det konstantert at instrumentet fungerte, og vellykkede liposomer ble produsert. Det ble brukt fosfatbuffer (5 mM) i pH = 7 som hydreringsmedium. Bruk av fosfatbuffer som hydreringsmedium innen liposomproduksjon er godt dokumentert (71), så dette redferdiggjør valget av hydreringsmedium?. Det ble bestemt å bruke 5 mM fosfatbuffer under de mikrobiologiske uttestingene i tillegg, der en så lav konsentrasjon av salter burde ikke klare å forstyrre testene.

Ulike naturlige og syntetiske fosfolipider har forskjellige  $T_c$  som er en viktig parameter fordi den påvirker innkapslingseffekten, lagringsstabiliteten og stabiliteten *in vivo*. Når omgivelsestemperaturen er høyere enn lipidenes  $T_c$  vil det resultere i at lipidene blir mer fleksible, noe som gjør dem også mer permeabel for vann (78). På grunn av dette var det viktig at ekstrudering av liposomene foregikk over  $T_c$ -temperaturen til lipidene. Ved å ha en høyere temperatur enn  $T_c$  vil også innkapslingseffektiviteten øke. . Ifølge bruksanvisningen fra Avanti® om bruk av Mini-ekstruderen skulle det holde å oppbevare sprøytene i varmeblokken i 5-10 minutter for at liposomsuspensjonen i sprøyten skulle tilsvare temperaturen på selve varmeblokken (79). Liposomene brukt i denne oppgaven var DPPC, DPTAP og DPPG. Disse liposomene ble spesielt valgt fordi deres  $T_c$ -verdier er henholdsvis : 41 °C, ~ 0 °C, 41 °C (76). Under hydrering- og ekstruderingfasen ble det brukt en temperatur på 50 °C for å forsikre seg om at temperaturen var over  $T_c$ -verdien til lipidene. Selv ved bruk av 50 °C var det noen liposomformuleringer som var vanskelig å ekstrudere. Dette kan skyldes eventuelle aggregater som ble dannet under liposomfremstillingen som vanskelig gjorde ekstruderingen. Disse aggregatene kan ha vært forårsaket av forurensninger som såperester fra glassutstyr og/ eller bruk av vann med utilstrekkelig kvalitet. I denne studien ble det brukt filtrert (0.22 µm) destillert vann. Resultatene kunne ha vært annerledes ved bruk av ultrarent vann som Milli-Q®. Det var tenkt å produsere liposomer med ultrarent vann men på grunn av koronakrisen ble det ikke tid til det.

Det var ikke mulig å justere trykket på rotavaporen som ble brukt, noe som resulterte i at det organiske løsningsmiddelet begynte å koke på grunn av høyt trykk. Støtkoking er ikke ønskelig innen produksjon av lipider, der det vil gi en ujevn lipidfilm som ville påvirke dannelsen av liposomer (80). Det eneste alternativet for å redusere trykket var ved å åpne rotavapor ventilen manuelt. Dette var ugunstig der det ga lite mulighet for å justere trykket underveis. Dette kan forklare hvorfor det var vanskelig å ekstrudere liposomsuspensjonen enkelte ganger.

### **7.1.1 Positiv ladete liposomer**

#### **7.1.1.1 DPPC/ 2.5% DPTAP**

Det var et problem med dannelse av skum i begge parallellene av suspensjonen ved første produksjon. Skumdannelse i liposomformuleringer ble observert etter at det hadde blitt oppbevart to måneder i kjøleskap. Det ble produsert en sny batch av disse formuleringene og skumdannelse ble ikke lenger observert. En tenkelig årsak for skummet, er såperester. Det var ulik mengde skumdannelse i parallellene som kan samsvare med såperestene som fant sted i hetteglassene, eventuelt gummitoppene som ble brukt. Ved produksjonen av den nye batchen ble hetteglassene og gummitoppene godt skylt med destillert vann før bruk. Produksjonen av DPPC/ 2.5% DPTAP P-3 og P-4 viste gode resultater med tanke på både størrelsen ( $106 \pm 0.7$  nm for P-3 og  $105 \pm 0.6$  nm for P-4), PDI (0.053 for P-3 og 0.057 for P-4) og zetapotensiale ( $14 \pm 0.5$  mV for P-3 og  $14 \pm 0.9$  mV P-4).

Stabiliteten til formuleringen ble undersøkt underveis og resultatene viste lite endring av størrelse og zetapotensiale. Denne stabilitetsundersøkelsen gjaldt da de to første ukene, og formuleringen ble vurdert til å ha iallfall god kortidsstabilitet. Denne formuleringen ble derfor valgt til videre arbeid med innkapsling av virkestoff da det var lett å håndtere formuleringene, i tillegg var resultatene fra karakteriseringen og stabilitetsundersøkelsene innenfor ønskede verdier.

#### **7.1.1.2 DPPC/ 10% DPTAP**

For P-1 og P-2 av DPPC/ 10% DPTAP ble det dannet skum etter at den sto i kjøleskapet i noen dager. Skum dannelsen var ikke stort, og det ble bestemt å karakterisere formuleringen. Ved karakteriseringen etter produksjonen ble det oppdaget en topp fra grafen for størrelsesfordeling (ved intensitet), noe som var ønskelig. Det var ikke mulig å gjennomføre en ny karakterisering før to måneder etter produksjonen. Grafen for størrelsesfordeling (ved intensitet) viste en hovedtopp og en bitteliten topp. Den nye toppen ligger på samme størrelse for begge parallellene som tyder på at det kan ha skjedd en reaksjon eller at det skyldes ustabilitet av formuleringen.

Det ble produsert en ny batch med to nye paralleller for å undersøke om resultatene ble de samme. Denne batchen var vanskelig å ekstrudere ved 50 °C, og derfor ble temperaturen økt ytterligere til 60-70 °C. Grafen for størrelsesfordeling for P-3 viste to ulike toppler, i motsetning til P-4 som kun hadde en. Ved karakteriseringen var det mulig å observere partikler i kyvetten med det blotte øyet (figur 6.7). Disse kan ha sedimentert til bunn under under DLS målingen, slik at de ikke ble detekterte og

dermed ga tilsynelatende fine resultater ( $Z$ -average =  $192 \pm 80$  nm for P-3, og  $Z$ -average =  $165,1 \pm 22,8$  nm for P-4). Standardavviket var veldig stor for begge parallellene. Standardavviket beskriver variasjonen i det tre målingene instrumentet utførte for hver prøve. Ettersom standardavviket er så stort er målingene ikke reproduserbare, noe som indikerer at størrelsestallet er ikke helt pålitelig. P-3 av denne formuleringen hadde en PDI på 0.3, og i liposomaleformuleringer er det ønskelig med en PDI-verdi på 0.3 eller mindre, fordi dette vil indikere en smal partikkelstørrelsesfordeling (53). De ulike toppene som ble detektert kan dermed understøttes av PDI-verdien i parallell-3. En studie gjennomført av Nguyen et al. (81) produserte DPPC/ 2.5% TPTAP ved bruk av tynnfilm-metoden. I studien hadde denne formuleringen en  $PDI = 0.06 \pm 0.01$ . Denne verdien er betraktelig lavere enn PDI-verdien for de karakteriserte liposomene i denne oppgaven. Under preparasjonen av liposomene i studiet av Nguyen et al. (81) ble det brukt samme hydreringsmedium (5 mM fosfatbuffer, pH = 7). Sammensetning av lipider brukt i formulering kan resultere i endringer av  $T_c$ -temperaturen. En studie av Cinelli et al. (82) konkluderte at  $T_c$ -temperaturen for DPPC/ 10% DPTAP vil være omtrent det samme som DPPC/ 2.5% DPTAP. Dermed betyr det at temperatur brukt under ekstrudering er mest sannsynlig ikke årsaken til formuleringens ustabilitet. Videre hadde studiet av Nguyen et al. (81) brukt 45 °C for å hydrere og ekstrudere lipidene, altså en lavere temperatur enn det som ble brukt for å fremstille liposomformuleringen i dette forsøket. Under hydreringsfasen begynte parallell-3 og parallell-4 å støtkoke. Trykket ble redusert ved å åpne rotavapor-ventilen, men støtkokingen resulterte likevel i en ujevn lipidfilm. Dette kunne ha påvirket dannelsen av uniforme liposomer (83).

Under oppbevaringen av suspensjonen så det ut som om den hadde aggregert betraktelig. Denne aggregeringen forble til og med etter to timers oppbevaring i romtemperatur og etter oppvarming i varmeskapet (50 °C). Tilstedeværelse av en større prosent ladete lipider i formuleringen skulle ha resultert i større elektrostatisk frastøtende effekt på grunn av zetapotensialdannelse (42). Ulike studier oppgir at et zetapotensiale på mer enn -30 mV eller mindre enn 30 mV gir mer stabile suspensjoner (36, 52). Dermed skulle denne formuleringen være mer stabil enn DPPC/ 2.5% DPTAP, teoretisk sett. Liposomformuleringene som ble produsert hadde et zetapotensiale på  $38.3 \pm 2.4$  mV for P-3 og  $39.9 \pm 2.5$  mV for P-4. Dette tilsier zetapotensiale som ligger innenfor ønsket verdier på over 30 mV. Igjen kan det hende at liposomene som ble produsert ikke ble satt sammen på den mest optimale måten, på grunn av den ujevne lipidfilmen. På grunn av aggregatdannelse og resultatene fra karakteriseringen ble det bestemt å utelukke denne formuleringen fra videre forsøk.



## 7.1.2 Negativ ladete liposomer

### 7.1.2.1 DPPC/ 2.5% DPPG

Det var ulike utfordringer under produksjonen av DPPC/ 2.5% DPPG. To ulike paralleller ble produsert, og etter at de ble oppbevart i kjøleskapet til dagen etter, hadde den ene parallellen felt ut. Det ble prøvd å varme opp suspensjonen på varmebad (50 °C) under rotasjon (90 rpm) i 10 minutter uten nytte. Formuleringen ble ikke ekstrudert fordi det var stor sannsynlighet for at den ville tette membranene.

Parallell-1 av formuleringen hadde et zetapotensiale på  $-16.7 \text{ mV} \pm 0.618$  og  $-20.1 \text{ mV} \pm 0.532$  for parallell-2. En studie av Nguyen et al. (84) ble det produsert DPPC/ 2.5% DPPG med et zetapotensiale på  $-28 \text{ mV}$ . Det er en betydelig forskjell mellom  $-28 \text{ mV}$  og zetapotensialet for parallell-1. I dette forsøket var det ønskelig med partikkelstørrelse under 200 nm, ettersom tykkelsen på biofilm kan være mellom 4-200  $\mu\text{m}$  (9). Disse liposomene oppfylte kravet ( $135.6 \pm 2.1 \text{ nm}$  for P-1 og  $114,1 \pm 0.5 \text{ nm}$  for P-2), men det ble allikevel bestemt å ikke fortsette med formuleringen. Det beste alternativet hadde vært å produsere flere batcher av denne formuleringen og karakterisere dem. Som beskrevet i resultatdelen så hadde parallell-1 en hovedtopp med en bitteliten topp i tillegg ved den første karakteriseringen. Ved produksjon av parallell-1 og parallell-2 ble det brukt en temperatur på 40 °C under hydreringsfasen og 50 °C under ekstruderingen av parallell-1. Dette skyldes at ekstruderingen hadde veldig stor motstand og var ikke mulig å gjennomføre på en temperatur på 40 °C. Den lave temperaturen som ble brukt under hydreringen kunne ført til at lipidene ikke ble satt riktig, fordi 40 °C er under  $T_c$ -verdien til DPPC og DPPG som er på 41°C (76). Dette kan også forklare hvorfor lipidene i parallell-2 gjennomgikk en utfelling. Ved produksjon av parallell-3 ble det brukt en hydrering- og ekstruderingsstemperatur på 50 °C. Dette kan være grunnen til at det kun ble oppdaget en topp under karakteriseringen. Det mest optimale hadde vært å produsere en ny batch av denne formuleringen og undersøke nærmere om temperaturen under hydreringen var årsaken til ustabiliteten av batch-1. Selv om parallell-3 viste en partikkelstørrelse på  $114.1 \text{ nm} \pm 0.5000$  ble det bestemt å utelukke denne formuleringen fra videre forsøk. Ut fra studier (42) og kjennskap om hvordan partikler oppfører seg ble det heller bestemt å fokusere på DPPC/ 10% DPPG. En høyere andel ladede lipider vil gi en høyere absolutt zetapotensialeverdi som vil resultere i bedre stabilitet på grunn av en større elektrostatiske frastøtning mellom partiklene (37, 42-44).

### 7.1.2.2 DPPC/ 10% DPPG

Under produksjonen av DPPC/ 10% DPPG, forekom det utfelling av lipidene i parallell-2. For denne formuleringen ble det også brukt en temperatur på 40 °C under hydreringsfasen. Dette kan ha vært årsaken til utfellingen som tok sted i formuleringen. Det ble igjen prøvd å varme opp suspensjonen på varmebad (50 °C) under rotasjon (90rpm) i 10 minutter uten at det hjalp. Parallell-2 ble ikke ekstrudert.

Parallell-1 hadde en partikkelstørrelse på  $130.3 \pm 2.146$  og parallell-3 hadde en  $113.3 \text{ nm} \pm 2.148$ . Tykkelsen på biofilm kan variere mellom 4-200  $\mu\text{m}$  (9). I en studie av Zora et al. (18) ble det konkludert at liposomer under 500 nm var mest effektive i leveringen av antibakterielle midler til biofilmer. Selv med en grense på 500 nm, ble det bestemt i denne studien å fokusere på liposomer som hadde en størrelse på 200 nm og mindre for å forsikre at liposomene klarer å penetrere biofilmen. En studie av Meers et al. (85) hadde gode resultater med å behandle *P. aeruginosa* ved bruk av liposomal amikacin under 300 nm i størrelse. Dermed ble også dette med på å understreke ønsket liposomstørrelsen i denne studien. Zetapotensialet for parallell-1 var på  $-42.1 \pm 0.532$  og  $-42.0 \pm 2.15$  for parallell-2. Disse verdiene stemmer overens med tidligere studier som har produsert denne formuleringen (84). Ut fra disse resultatene ble det bestemt å velge denne formuleringen for videre forsøk.

### 7.2 Etablering av fremstillingsmetode med innkapslet virkestoff

De mest stabile liposomformuleringer ble valgt til videre arbeid med innkapsling av virkestoff. For valg av egnede antibiotikakonsentrasjoner, ble MIC-verdien fra ulike studier brukt (72, 86, 87). I og med at den faktiske innkapslede mengden i liposomene var ukjent, ble det bestemt å øke konsentrasjonen over de nevnte MIC-verdiene i studiene for å forsikre en antibakteriell effekt. Dermed var det tryggere å velge en høyere konsentrasjon og det fritt flytende antibiotikumet kunne fjernes med gelfiltrering etter produksjon. En høyere konsentrasjon ble også valgt på grunn av fortyningen som vil ta sted ved gjennomført gelfiltreringsprosedyren. Mengde antibiotika tilgjengelig var en begrensende faktor, særlig for polymyxin B. Dermed ble det brukt ulike konsentrasjoner i hydreringsmediet for de ulike antibiotikaene. I oppgaven ble ikke polymyxin B sulfat mengden omregnet til polymyxin B ettersom denne formuleringen ble ikke tatt videre i videre forsøk.

Biofilmer kan ha en varierende tykkelse fra 4-200  $\mu\text{m}$  i vev og 5-1200  $\mu\text{m}$  på fremmedlegeme (9). En studie av Tian et al. (88) konkluderte med at pore-radius størrelsen i biofilmer reduserer fra 1.7-2.7  $\mu\text{m}$  til 0.3-0.4  $\mu\text{m}$  i de innerste biofilmlagene. I denne studien var det ønskelig med liposomer med en størrelse under 200 nm. Valget av dette størrelsesområde ble gjort i håp om å ha liposomer små nok i størrelse til å penetrere porene i biofilmen. Om liposomene klarer å penetrere det ytterste cellelaget vil det være mulig for dem å frigjøre virkestoffet lengere inn i eller i kjernen av biofilmen. Dette vil være med på å gi en bedre eradikasjonsrate der cellene i kjernen av biofilmen vil også bli utsatt for antibiotikumet.

## **7.2.1 Positiv ladete liposomer**

### **7.2.1.1 DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet polymyxin B sulfat**

Ved produksjonen av DPPC/ 2.5% DPTAP med polymyxin B ble det oppdaget flere topper i grafen for størrelsesfordeling (ved intensitet), samt veldig varierende partikkelstørrelse for de ulike parallellene. Karakteriseringen ble gjort dagen etter ekstruderingen og dermed kan ikke lagringsperiode være en årsak for dette. I studiet av Theretz et al. (89) det det konkludert at polymyxin B i DPPC-formuleringer kan resultere i ustabilitet og fase-separasjon av lipidene. Dette understøttes av studiet til Alipour et al. (72) som viste gode resultater av innkapslet polymyxin B i DPPC/ Chol. Dette kan forklare årsaken til partikkelstørrelsen som forekom som var på  $507.5 \pm 63.57$  nm for parallell-2 PDI-verdien for parallell-2 var på 0.261, som er under ønsket PDI-område. Størrelsen var på  $217.8 \text{ nm} \pm 8.571$ . Parallell-1 hadde et zetapotensiale på  $7.18 \pm 0.2$  mV og parallell-2  $8.75 \pm 0.3$  mV som er utenfor ønsket zetapotensialeområde (36, 52). Dette kan ha resultert i for svake frastøtende krefter mellom partiklene, som ga de tre ulike toppene som ble detektert for parallell-1, og de to ulike toppene som ble detektert for parallell-2. Det ble bestemt å utelukke DPPC/ 2.5% DPTAP med polymyxin B, på grunn av de varierende resultatene som gjorde det vanskelig å stole på formuleringen. Det mest optimale hadde vært å forsøke og produsere en ny batch av polymyxin B for å undersøke om de samme resultatene hadde forekommet igjen. Det hadde også vært mulig å innkapsle polymyxin B i en nøytral liposomformulering for å undersøke om det resulterer i bedre stabilitet.

### **7.2.1.2 DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin sulfat**

I denne studien var det ønskelig med liposomer under 200 nm, og en størrelsesfordeling (ved intensitet) som viste en topp. Videre var det også ønskelig med et zetapotensiale som ligger helst innenfor det anbefalte området (over 30 mV eller under -30 mV (36, 52)). En PDI-verdi under 0.3 var også ønskelig fordi dette vil indikere en liten partikkelstørrelsesfordeling (53). DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin tilfredstilte disse kravene. Det var ikke mulig å finne studier som innkapslet gentamicin i DPPC/ 2.5 DPTAP, dermed var det heller ikke mulig å sammenligne resultatene med tidligere studier. Det ble derimot funnet ulike studier som har innkapslet gentamicin i ulike kationiske liposomformuleringer (90, 91). Dette kan understøtte at gentamicin er stabil i positiv ladede liposomer.

Gentamicin er et aminosukker (74), kontra polymyxin B og bacitracin som er peptidbaserte antibiotika (73). Forskjellen mellom antibiotikumene kan være en mulig årsak til at innkapslingen av gentamicin var en suksess, men ikke for de peptidbaserte antibiotika. Gentamicin ble valgt for dette forsøket selv om den ikke er peptidbasert grunnet kjemisk struktur. Molarmassen til bacitracin ( $1422.69$  g/mol (63)) tilsvarer nesten molarmassen til gentamicin ( $1488.8$  g/mol (64)). Størrelsen er da mest sannsynlig ikke årsaken til hvorfor det ble mulig å innkapsle gentamicin.

Denne formuleringen ble valgt for videre undersøkning for de mikrobiologiske testene.

### **7.2.1.3 DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet bacitracin**

Innkapsling av bacitracin ga en meget lav derived count rate ved karakteriseringen. Instrumentet brukte en attenuator på 10 for å kunne måle formuleringen. Dette kan tyde på en meget lav mengde partikler i prøvene. Ved ekstrudering av prøven var det utrolig lett å få prøven mellom sprøytene og det var ikke noe motstand. Zetapotensiale for parallell-1 var  $7.94 \text{ mV} \pm 0.326$  og  $6.99 \text{ mV} \pm 0.114$  for parallell-2. Dette var lavere enn zetapotensialet for tomme DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff som hadde et zetapotensiale på 14 mV.

De to parallellene hadde tre ulike topper på nesten samme størrelsesområde og samme mønster. Dette tyder på at det ikke er tilfeldige forurensninger som hadde oppstått. I kvalitetsrapporten ble det oppgitt at det var tegn på store eller sedimenterende partikler. Det ble ikke sett noen partikler med det blotte øyet, og prøven virket mer som en oppløsning enn en suspensjon.

I en studie av Rodrigues og Caseli (92) ble interaksjonen av bacitracin og fosfolipider, inkludert DPPC og DPPG, som monolag undersøkt. Det som ble konkludert i studiet var enn interaksjon mellom bacitracin og fosfolipidene som monolag, noe som resulterte i morfologiske endringer av monolaget (92). Videre blir det beskrevet om denne interaksjonen er avhengig av den polare gruppen på lipidet (92). Liposomsuspensjonen besto hovedsakelig av DPPC og dermed kan det tenkes at den samme interaksjonen kan ha skjedd i denne formuleringen der 2.5% DPTAP utgjør kun en liten andel av lipidene. Det kan se ut til at bacitracin påvirker liposom-membranen slik at liposomstrukturen ble ødelagt og derav lite eller ingen partikler detektert.

## **7.2.2 Negativ ladete liposomer**

### **7.2.2.1 DPPC/ 10% DPPG med innkapslet polymyxin B sulfat**

Under ekstruderingen av denne formuleringen knakk sprøyten. Dette resulterte i at kun parallell-1 ble ekstrudert. Resultatene fra den ekstruderte delen ga veldig store liposomer på  $2010 \pm 131.2 \text{ nm}$  og zetapotensiale på  $-4.81 \pm 0.3 \text{ mV}$ . DPPC/ 10% DPPG uten innkapslet virkestoff hadde en zetapotensiale på rundt  $-42.0 \text{ mV}$ . Polymyxin B er en kationisk polypeptid (72). Det kan tyde på at virkestoffet ikke ble innkapslet som resulterte et høyere zetapotensiale. Karakteriseringen tok sted etter liposomproduksjonen, og dermed kan ikke lekkasje ha vært en årsak til det økte zetapotensialet. Partikkelstørrelsen til P-1 var på  $2010 \pm 131.2 \text{ nm}$ . Standardavviket er veldig stort for disse parallellene, som indikerer at målingene er ikke reproducerbare. Dermed er størrelsestallet ikke helt pålitelig. Det kan hende at det kationiske antibiotikumet aggregerte med de negative liposomene ved elektrostatisk interaksjoner.

Det ble bestilt nytt sett med sprøyter, men disse tok lang tid å få levert på grunn av koronavirus pandemien. Etersom det manglet kritisk utstyr for produksjonen, knapphet med tid, samt partikkelstørrelsesresultatene fra karakteriseringen ble det bestemt å utelukke denne formuleringen fra videre forsøk.

### **7.2.2.2 DPPC/ 10% DPPG med innkapslet gentamicin sulfat**

Formuleringen ble karakterisert dagen etter produksjonen. Det ble påvist partikkelstørrelse på  $1130 \pm 93.58$  nm for parallell-1 og  $1106 \pm 92.66$  nm for parallell-2. Denne størrelsen er betraktelig mye større enn tomme DPPC/ 10% DPPG som hadde en partikkelstørrelse i området 113 nm-130 nm. Det er en betydelig økning som kan forklares med at virkestoffet ikke ble innkapslet eller en interaksjon mellom virkestoffet (som er kationisk) har interagert med de negativ ladede liposomene. Under karakteriseringen ble det avdekket flere toppet i grafen for størrelsesfordeling (ved intensitet). De ulike toppene var på omtrent samme område, som kan antyde at det har forekommet en interaksjon som forårsaket ulik størrelsesfordeling. Det ble ikke funnet studier som beskriver innkapsling av gentamicin i DPPC/ 10% DPPG formulering, og dermed er det ikke mulig å sammenligne resultatene fra denne studien med tidligere litteratur.

Zetapotensialet for parallell-1 var  $-9.32 \pm 0.3$  mV og  $-10.4 \pm 0.6$  mV for parallell-2. Tomme liposomer av samme formulering hadde en zetaverdi på rundt -40 mV. Det er en betydelig stor forskjell. Gentamicin er et positiv ladet antibiotikum (93). De mindre negative zetapotensialeverdier målt med virkestoff kan derfor skyldes for dårlig innkapsling, som har resultert i flere kationer på utsiden av liposomene. Ettersom karakteriseringen ble gjort dagen etter produksjonen kan ikke lekkasje være en grunn for den økte zetapotensiale. Det er derimot lite sannsynlig at det har forekommet så stor lekkasje over 24 timer. Det ble bestemt å utelukke denne formuleringen, på grunn av stor sannsynlighet for at det ikke har skjedd en god nok innkapsling av virkestoff for denne formuleringen.

### **7.2.2.3 DPPC/ 10% DPPG med innkapslet bacitracin**

Parallellene produsert av disse formuleringene hadde tre ulike topper. Toppene ligger i samme størrelsesområde for begge parallellene som tyder på at det ikke skyldes tilfeldigheter. Som beskrevet i delkapittel DPPC/ 2.5% DPTAP med bacitracin konkluderte studien til Rodrigues og Caseli (92) at bacitracin utvider monolaget til DPPC og DPPG, og forstyrrer hvordan lipidene settes sammen. Dette resulterer i betydelig morfologiske endringer av monolaget noe som evt kunne ha påvirket dannelsen av liposomer (92). Derived count raten til formuleringene var veldig lav, samt hadde formuleringene en størrelse på 39.89 nm for parallell-1 og 18.65 nm for parallell-2. Parallellene for tom DPPC/ 10% DPPG hadde en partikkelstørrelse på 130.3 nm og 113.3 nm. Partikkelstørrelse forskjellen er veldig stor, og man kan anta at det har skjedd en interaksjon som har resultert i ødeleggelse av liposomene i prøvene. Parallell-1 av formuleringen møtte ikke kriteriene, mens parallell-2 møtte dem. Ved å se på derived count rate og tenke på observasjonene fra formuleringen kan det tyde sterkt på at det ikke er etablerte liposomer i formuleringen. Det kan dermed tenkes at det er kun ikke-innkapslet bacitracin i liposomformuleringen. Zetapotensialet for DPPC/ 10% DPPG med innkapslet gentamicin var på  $-28.9 \pm 0.1$  mV for parallell-1 og  $-21.3 \pm 1.1$  mV for parallell-2. Dette er mye lavere enn zetapotensialet for tomme DPPC/ 10% DPPG som hadde et zetapotensiale på -42 mV. Denne formuleringen ble ikke tatt med i videre forsøk fordi resultatene indikerte at liposomene ble ødelagt ved innkapsling med bacitracin.

### 7.3 *In vitro* stabilitet

Hensikten med denne delen av oppgaven var å teste om de produserte liposomformuleringene var stabile under lagring. Kun formuleringene som viste ønskelige egenskaper ble karakterisert over en lengre tidsperiode, dermed var det kun tom DPPC/ 2.5% DPTAP som ble undersøkt for *in vitro* stabilitet. De ulike ønskede egenskapene var partikkelstørrelse under 200 nm og en PDI-verdi under 0.3. Zetapotensialet ble vurdert ut fra de to andre faktorene samt ved å vurdere forekomsten av ulike topper ved størrelsesfordeling (ved intensitet). Det ble alltid foretatt visuelle observasjoner av formuleringene før karakteriseringen ved bruk av ZetaSizer. Dette var for å se at det ikke har blitt dannet synlige aggregater og/eller faseeparasjoner.

Det var kun DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff og DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin som ble undersøkt for *in vitro* stabilitet. På grunn av stengte universitet forårsaket av corona epidemien ble DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin ikke målt like mange ganger som ønskelig. DPPC/ 2.5% DPTAP brukt i de mikrobiologiske testene hadde en zetapotensiale mellom  $13.9 \pm 0.6$  mV og  $15.1 \pm 0.2$  mV. Dette er under anbefalt ladningsområde som er under -30 mV eller over 30 mV, som vil gi forbedret stabilitet til suspensjoner (36).

Størrelsen til hovedtoppen (graf for størrelsesfordeling ved intensitet) av DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff var stabil med sikkerhet i 14 dager etter produksjonen for tom DPPC/ 2.5% DPTAP samt for formuleringen som hadde innkapslet gentamicin. Dette kan indikere at liposomene har bra *in vitro* stabilitet. Det var en ubetydelig endring av partikkelstørrelsen i parallell-3 og parallell-4 av DPPC/ 2.5% DPTAP uten virkestoff. Alle prøvene ble undersøkt i kyvetten før de ble satt i zetasizeren, og det var ikke mulig å se noen synlige partikler. Størrelsesendring er også av ubetydelig grad for DPPC/ 2.5% med innkapslet gentamicin.

DPPC/ 2.5% DPTAP hadde god stabilitet i minst 14 dager med hensyn på partikkelstørrelse og PDI. Mellom den nest siste og siste karakterisering (97 dager etter produksjon) hadde det skjedd en stor endring på zetapotensialet. Zetapotensialet økte fra 14 mV til omtrent 300 mV for begge parallellene av DPPC/ 2.5% DPTAP. Etersom både de tomme liposomene, samt de med innkapslet gentamicin, fikk denne endringen på zetapotensialet, er det ikke mulig å konkludere med at det er på grunn av virkestoff lekkasje. Det kan være en mulighet at komponentene i liposomene ved lagring migrerer, og dermed arrangeres på nytt som gir et endret overflatepotensiale. Dette gjelder også for DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin, bare at det her er sikkert å si at formulering med innkapslet virkestoff er stabil i minst tre dager, mer enn det kan ikke spesifiseres

I vandige løsninger er pH en av de viktigste faktorene som kan påvirke zetapotensialet, og endringer i zetapotensialet påvirker suspensjonsstabiliteten (94). Det ble ikke gjort pH-måling av selve liposomformuleringen underveis av studiet, dermed er det vanskelig å si om pH endringer kan ha vært en faktor som har resultert i endringer av zetapotensialet. Dette bør undersøkes nærmere, men på grunn av tidsbegrensninger og mangel på kritisk utstyr ble det ikke mulig å gjennomføre. Dette resulterte også i at det ikke bles mulig å spesifisere når den signifikante økningen i zetapotensiale forekom. Det som sikkert kan sies er at DPPC/

2.5% DPTAP formulering med eller uten virkestoff vil få en stor endring av zetapotensialet ved langvarig oppbevaring. Nærmere undersøkelse bør gjennomføres for å se når ladningsforskjellen forekommer/eventuelt finner sted.

Om et zetapotensiale på rundt 300 mV kan ha vært årsaken til at partikkelstørrelsen til liposomene forble nesten lik under oppbevaringen er også viktig å undersøke. Et tilsvarende zetapotensiale vil gi sterke frastøtende effekter, som kan ha vært årsaken til den minimale partikkelstørrelsesendringen som fant sted i de tre månedene det ikke ble sforetatt karakterisering.

Det er viktig å merke seg at det er disse liposomene, med det forhøyet zetapotensiale, som ble brukt videre i de mikrobiologiske testene. Da OsloMet ble tilgjengelig igjen for en begrenset tidsperiode ble det bestemt å brukes tiden for de mikrobiologiske testene. Det optimale hadde vært å produsere en ny batch med liposomer og brukt disse for de mikrobiologiske analysene. Dermed er det vanskelig å være selvsikker på at resultatene fra de mikrobiologiske testene stemmer

#### **7.4 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte formuleringer på agarplater**

Brønndiffusjon og diskdiffusjonstestene ble gjennomført som en kvalitetskontroll av gentamicinpulveret som ble brukt under etableringsfasen med innkapslet virkestoff. Videre ble det benyttet for å undersøke på en rask og enkel måte om liposomal gentamicin hadde en antibakteriell effekt på et utvalg av godt karakteriserte bakterier (både gram-positive og gram-negative) som har en klinisk betydning og som er assosiert med biofilm produksjon og BAI.

Testen gjorde det mulig å gi et bilde av effektiviteten til liposomal gentamicin sammenlignet med ikke-innkapslet gentamicin. Hemmingszone som ble dannet for liposomal gentamicin hadde større radius enn ikke-innkapslet gentamicin for både parallell-1 og 2 av liposomal gentamicin. For den kommersielle gentamicin ble det brukt 30 µg disk og for den selv-produserte disken ble det brukt 30 µL av liposomformuleringen. Dette indikerer at gentamicin pulveret brukt i liposomproduksjonen hadde ennå samme effekt. Disken som inneholdte 30 µL av den gel-filtrerte DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin hadde en større hemmingszone enn den kommersielle disken. Ut fra denne observasjonen ble det bestemt å ta en tilnærming hvor 1 µL liposomal gentamicin tilsvarer 1 µg gentamicin. Med disse resultatene kan man konkludere med at det meste av antibiotikumet er innkapslet, og meget lite av konsentrasjonen var ikke-innkapslet.

Prøver med gjennomstrømningsvæske ved gelfiltrering ble også testet, og den ga veldig smal eller ingen hemmingszone. Dette var forventet i og med at disse prøvene skulle kun inneholde buffermediet og ikke liposomer eller fritt virkestoff. Samtidig betød dette at gelfiltreringen fungerte som den skulle.

Parallell-2 av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin hadde hemmingszone for gjennomstrømningen. Dette kan bety at liposomene ble eluert ut for tidlig, noe som resulterte i at den gel-filtrerte prøven ikke er helt riktig. Det resulterer i en gel-filtrert prøve som inneholder mindre liposomer.

I den første testen ble det ikke dannet hemmingszone for *S. aureus*. *S. aureus* er kjent for å være følsom for gentamicin samt at parallell-2 ga en hemmende effekt. Når forsøket ble gjennomført på nytt så hadde begge parallellene gitt en hemmingszone for *S. aureus*. Ved bruk av diskdiffusjon metoden oppstår det nærmere kontakt mellom bakteriene og selve liposomene. Bakteriene inkuberes på overflaten av agarplaten, og dermed vil disken ha en direkte kontakt, versus i brønn-diffusjon metoden der suspensjonen diffunderer i agaren. Man kan dermed si at dette var metodesvikt. Det kan hende at en tom disk ble lagt ved uhell, istedenfor en disk med gel-filtrert liposomformulering.

Det ble observert samme antibakterielleffekt for alle tre bakteriene; *S. aureus*, *P. aeruginosa* og *E. coli*. For videre testing på planktoniske tester og biofilm ble det valgt å gå videre med kun *S. aureus* og *P. aeruginosa*. Gentamicin brukes i behandlet av *P. aeruginosa* infeksjoner. *S. aureus* ble tatt med i videre testing fordi den er ett viktig patogen innen BAI. Det ble også vurdert at det vil gi best resultater med en gram-negativ og en gram-positiv bakterie. s

I denne fasen hadde det vært mulig å gjennomføre en MIC-analyse, for å se på den minste inhibitoriske konsentrasjonen. Denne analysen ble ikke gjennomført basert på resultatene fra brønn- og diskdiffusjon testene. Videre i forsøket ble det gått ut fra at 1 µl liposomal gentamicin tilsvarer 1 µg gentamicin pulver.

## **7.5 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte liposomformuleirnger på planktoniske celler**

### **7.5.1 Uttesting på *P. aeruginosa* celler**

Hensikten med denne delen av oppgaven var å se på effekten antibiotika-innkapslede liposomer har på frie bakterier under vekst. Den utvalgte liposomformuleringen til dette arbeidet var DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin. Vekstkurve var valgt fordi det gjør det mulig å synliggjøre og kvantifisere vekstresponsen over en lengre tidsperiode i nærvær av testsubstans (95, 96); i dette tilfellet med DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin. For parallell-1 var det laveste liposom volumet som hemmet veksten på 0.625 µL. For brønnen som ble utsatt for 0.313 µL og 0.156 µL var det en lang lagfase i vekstkurven, og for det laveste volumet (0.156 µL) var veksten nesten i samme grad som kontrollen (tom DPPC/ 2.5% DPTAP). For parallell-2 av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin var det laveste volum som ga en hemmende vekst 1.25 µL. De tre laveste volum brukt (0.156 µL, 0.313 µL og 0.625 µL) hadde en lang lagfase, men ingen av volumene ga en optisk tetthet som var i nærheten av kontrollen. Den forlengede lagfasen som ble sett for de laveste volumene brukt kan skyldes ① bakteriostatisk effekt hvor volumet brukt er under MIC-verdien eller ② liposomal gentamicin kan miste effekten over tid, og dermed gis behov for høyere konsentrasjon for å fortsatt kunne ha antibakteriell effekt.

Parallell-1 hadde en mindre partikkelstørrelse på 107.5 nm i forhold til partikkelstørrelsen til parallell-2 som var 129.1 nm. Dette antyder at mindre liposomer resulterer i bedre hemming av vekst enn større liposomer. Dette kan være på grunn av lettere penetrering av mindre liposomer. Zetapotensialet til disse to parallellene var omtrent like, der det var 288 mV for parallell-1 og 298 mV for



parallell-2. Det vil si at et høyere absolutt zetapotensiale gir ikke automatisk bedre interaksjon mellom liposomene og bakteriecellemembranen men at fortegnet til zetaverdien kan ha større betydning. Om den bestemmende faktoren er størrelse eller zetapotensiale er vanskelig å si uten at det gjennomføres flere tester gjennomføres for å ytterligere undersøke dette. Det som kan sies med sikkerhet er at liposomene med innkapslet gentamicin har en hemmende effekt på planktoniske *P. aeruginosa* celler.

Kontroll-brønnen med kun buljong hadde en lagfase under hele analysen, som antyder ingen bakteriellvekst. Brønnen med *P. aeruginosa* og tomme DPPC/ 2.5% DPTAP liposomer hadde en eksponentiell fase fra starten av forsøket. Disse resultatene var som forventet da disse formuleringene i seg ikke skal ha en antibakteriell effekt.

Samlet sett tyder resultatene på at DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin kan hemme vekst av *P. aeruginosa* ved allerede 1.25 µL av liposomal gentamicin. De høyeste konsentrasjonene (2.5 µL, 5 µL, 10 µL og 20 µL) ga en langvarig antibakteriell aktivitet som vedvarte under hele forsøksperioden på 12 timer. Om videre testing viser at disse liposomene har en så langvarig effekt, kan de eventuelt brukes for å øke halveringstiden til enkelte antibiotika.

### **7.5.2 Uttesting på *S. aureus* celler**

Ved uttesting på *S. aureus* ble det konkludert med at det laveste volum av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin (P-1) som ga hemmende effekt var 0.313 µL. Det laveste volumet (0.156 µL) brukt hadde en lang lagfase. Denne lagfasen kan, som beskrevet i kapittel 7.5.1 Uttesting på *P. aeruginosa* celler skyldes enten at volumet er lavere enn MIC-verdien eller at liposomene mistet effekten sin over tid. For parallell-2 av samme formulering var det laveste volum brukt som ga en antibakteriell effekt på 0.625 µL. De to laveste volumene på (0.156 µL og 0.313 µL) hadde en lagfase for en eksponentiell vekst begynte. Ingen av volumene i begge parallellene hadde like høy optisk tetthet som kontrollen (DPPC/ 2.5% DPTAP uten innkapslet gentamicin).

Kontroll-brønnen med TSB + 1% glukose hadde en lagfase under hele analysen, noe som antyder null bakterievekst. Dette forsirker at buljongen brukt i forsøket ikke? hadde noe mikrobiell kontaminering. Brønnen med *S. aureus* som ble utsatt for tomme DPPC/ 2.5% DPTAP liposomer hadde en lagfase i starten av anlysen, for en eksponentiell fase begynte.

MIC-verdien for sensitive *S. aureus* og *P. aeruginosa* ligger på  $\leq 4$  µg/mL (75). Resultatene fra dette forsøket indikerer at *S. aureus* er mer sensitiv for liposomal gentamicin enn *P. aeruginosa*. *S. aureus* er et gram-positiv bakterie (97) og *P. aeruginosa* er gram-negativ (98). Om DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin har bedre effekt mot gram-positive bakterier er ikke mulig å avgjøre basert kun på disse forsøkene. Det hadde vært optimalt å utføre de samme testene ved bruk av flere ulike gram-positive og gram-negative bakterier, da det hadde muliggjort bestemmelsen av sensitivtetsforskjeller.

Resultatene fra parallell-1 og 2 hadde like trekk med noe lik lagfase og eksponentiell fase av de ulike volumene som ble testet. Dette øker troverdigheten av resultatene samt at det forsikrer at det ble produsert ulike paralleller av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin av lik kvalitet. Begge parallellene resulterte i omtrent lik effekt hos både *S. aureus* og *P. aeruginosa*. Parallell-2 ga ikke en full hemming av frie bakterier før et volum på 0.625 µL, kan skyldes at liposomsuspensjonen ble for tidlig eluert under gelfiltreringen. Noe som resulterte i en prøve med mindre liposomer enn parallell-1 av samme formulering.

En studie gjennomført av Hess et al. (95) viste at  $\leq 4$  µg/mL gentamicin kunne drepe planktoniske *S. aureus* celler uten problem. Ut fra resultatene fra plateleseren kan liposomal gentamicin hemme veksten av planktoniske *S. aureus* i volum ned til 0.625 µL. Det er behov for å undersøke mengde gentamicin innkapslet i liposomene for å kunne sammenligne det med MIC-verdien til ikke-innkapslet gentamicin. Dette for å se om liposomal gentamicin gir en bedre hemmende effekt enn ikke-innkapslet gentamicin. For videre testing hadde det også vært ønskelig å undersøke om bakteriene i brønnen var hemmet eller drept. Dette kunne ha blitt gjort ved å velge noen av brønnene hvor det ikke hadde forekommet bakteriellvekst i løpet av analysen. Ved å spre cellene på en agarplate så hadde det vært mulig å undersøke om bakteriecellene er hemmet eller drept.

## **7.6 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte liposomformuleirnger på biofilm**

### **7.6.1 Uttesting på *P. aeruginosa* biofilm**

DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin ble testet på *P. aeruginosa* biofilmer ved bruk av 96-brønnplate. Volum av liposomer brukt i denne delen av oppgaven ble bestemt ut fra resultatene til testingen med plateleseren (kapittel 7.4 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte formuleringer på agarplater). Under denne testingen ble det brukt høyest volum på 20 µL og lavest volum på 0.156 µL av DPPC/ 2.5% DPTAP. Fortynningsrekkene ble laget for å kunne treffe en fortynning som ga et tellbart antall kolonier. Dette var for å regne tilbake til antall CFU/mL i den originale løsningen fra brønnen.

Ved å se på konsentrasjonene og deres fortynningsrekker var det ikke mulig å se et bestemt mønster. Mengde kolonier var uavhengig av konsentrasjon og fortynning. Etter inkubering av 96-brønnplatene, var det lett å se at det hadde blitt dannet biofilmer på bunnen av brønnene. Metoden som ble brukt for å skrape biofilmen er beskrevet i en studie av Kragh et al. (70). Studien konkluderte med at skraping av biofilmen ved bruk av pipettespiss gir bedre resultater enn sonikering. Utenom det viste resultatene fra studiet til Kragh et al. (70) at en fremgangsmetode med både skraping og sonikering ikke hadde bedre effekt enn kun skraping. Veksten av kolonier på agarplatene forsikrer at det har vært bakterievekst som betyr at metoden har fungert.

Det kan konkluderes med at volumet av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin ikke var høyt nok til å ha effekt på *P. aeruginosa* biofilmer, og at det er behov for et høyere volum. Dermed ble det bestemt å gjennomføre testen på nytt med høyere volum, samt å endre noe på metoden. På grunn av tidsbegrensninger ble dette kun utført med *S. aureus* biofilmer. Det hadde vært bedre om en ny test

med høyere volum på *P. aeruginosa* ble gjennomført men det var ikke mulighet til det på grunn av tidsbegrensninger.

Det er viktig å huske at for planktoniske celler trenger gentamicin kun å penetrere cellene, mens for biofilmer så må virkestoffet først penetrere biofilmen og deretter cellene. Ved bruk av ladede liposomale gentamicin var det håp om bedre interaksjoner mellom liposomene og biofilmen. Noe som kunne teoretisk øke penetrasjonen av liposomer inn i biofilmen. Selve EPS-matrixen kan også være et beskyttende lag (2, 6), slikt at liposomal gentamicin inaktiveres eller ikke klarte å penetrere biofilmen. Dette kan være en årsak til den lave antibakterielle aktiviteten.

### 7.6.2 Uttesting på *S. aureus* biofilm

Etter resultatene fra *P. aeruginosa* ble det bestemt å modifisere metoden for uttesting på *S. aureus*. Det ble brukt kammerobjektglass istedenfor 96-brønnplate. Dette var for å forsikre dannelsen av mest mulig biofilm samt å kunne bruke et større volum av liposomformulering. Denne gangen ble det brukt 2 mL liposomformulering som det høyeste volumet, og 100 µL som det laveste. Det var ønskelig å ha et høyere volum enn det høyeste som ble brukt i testen mot *P. aeruginosa* biofilm.

Den gjennomførte testen viste at det er en volum-avhengig effekt på biofilm. Uttestingen på *S. aureus* viste at det laveste volum på 100 µL liposomal gentamicin ga en 99.99% reduksjon i antall CFU i biofilmen i forhold til kontrollen. For 1000 µL ga en 99.98% reduksjon, og det høyeste volum på 2000 µL resulterte i 99.998% reduksjon i antall CFU i biofilmen i forhold til kontrollen. Dette bekrefter at liposomene produsert i denne studien har et potensiale til å bli brukt mot *S. aureus* biofilmer. Ut fra resultatene på frie bakterier (kapittel 6.5.1 Uttesting på *P. aeruginosa* celler) kan det konkluderes med at bakterier i biofilm er mer resistente enn planktoniske bakterier selv mot liposomal gentamicin. Metoden brukt for uttesting på *S. aureus* virket best, og det virker som om det kan være en metode som kan brukes i fremtidige forsøk for å undersøke den liposomale effekten mot biofilmer.

Studien av Hess et al. (95) observerte at det trengs en konsentrasjon på opptil 20 mg/mL ikke-innkapslet gentamicin for å klare og hemme intakte biofilmer. Dette støtter det som ble sett i denne studien. Der det ble behov å øke volumet av liposomal gentamicin fra 0.625 µL, som ga en hemmende effekt på planktoniske celler, til 100 µL for å oppnå en hemmende effekt på biofilm. I kapittel 7.4 Mikrobiologiske uttesting av utvalgte formuleringer på agarplater ble det beskrevet at det ble tatt en tilnærming om at 1 µL liposomal gentamicin tilsvarer omtrent 1 µg ikke-innkapslet gentamicin. Dette er en tilnærming som burde undersøkes videre. Om det vurderes at denne tilnærmingen er *korrekt* så betyr det at det trengs 100 µL liposomal gentamicin som tilsvarer 100 µg ikke-innkapslet gentamicin for å gi en hemmende effekt på *S. aureus* biofilmer. Dette er en stor forbedring fra resultatene som ble sett i studien til Hess et al. (95). Det optimale hadde vært å teste med lavere konsentrasjoner enn 100 µL av liposomformuleringen, men på grunn av tidsbegrensninger var ikke dette mulig. Ved å ha undersøkt med lavere konsentrasjoner, kunne det ha gitt mulighet for å vurdere ved hvilken konsentrasjon gentamicin sluttet å gi antibakterielleffekt (MBIC). Det kan også

være mulig at liposomene resulterer til bedre effekt av gentamicin. DPPC/ 2.5% DPTAP har en positiv overflate ladning. Meningen bak denne formuleringen var forbedret interaksjon mellom liposomene og den negative overflaten til bakteriecellene. En studie av Rukavina et al. (18) viser at positivt ladede liposomer klarer å eradikere biofilmer i en lavere konsentrasjon enn negativt ladede liposomer. Den samme studien av Rukavina et al. (18) konkluderte med at lavere og positivt ladede liposomer klarer å penetrere biofilmer i større grad enn anioniske liposomer i samme størrelse.

Liposomene brukt i dette forsøket hadde en partikkelstørrelse på høyst 130 nm, og et zetapotensiale på omtrent 300 mV da de mikrobiologiske testene ble gjennomført. Størrelsen er mindre enn porestørrelsen i biofilmer, som betyr at det skal være mulig for liposomene å penetrere biofilmen, teoretisk sett. Zetapotensialet er mye høyere enn det det var da liposomene var nyprodusert ( $13.9 \pm 0.6$  mV for P-1 og  $15.1 \pm 0.2$  mV for P-2). Det er dermed kritisk å undersøke om zetapotensialet har vært årsaken til en forbedret interaksjon mellom liposomene og biofilmen.

Retningslinjene som eksisterer per dagsdato (CLSI) er for effektiv bakteriedreping av planktoniske celler og er dermed ikke overførbart for biofilm bakterier. Som tidligere nevnt i innledningen så assosieres biofilmer med 80% av de mikrobielle infeksjoner i kroppen (6). Ulike studier (95, 99-103) har anslått for lave konsentrasjoner av antibiotika kan stimulere til økt biofilmdannelse. Den antibakterielle effekten som ble sett på biofilmen er veldig positive resultater som burde undersøkes videre. Om liposomal gentamicin kan gi en forbedret aktivitet mot biofilmer, kan det være en viktig ressurs mot å forebygge antibiotikaresistens og i behandlingen av BAI.

## **7.7 Videre arbeid**

I denne studien ble det produsert vellykket DPPC/ 2.5% DPTAP formulering med innkapslet gentamicin. De mikrobiologiske testene viste at det er behov for høyere volum av liposomer for å oppnå en hemmende effekt mot biofilmbakterier sammenlignet med planktoniske bakterier. Den brukte formuleringen av DPPC/ 2.5% DPTAP med og uten innkapslet gentamicin hadde en forhøyet zetapotensiale i forhold til ny produsert liposomformulering av samme type. På grunn av begrensninger med tid og tilfellet med coronavirusepidemien var det ikke mulig å produsere en ny batch og bruke det for testing.

Det er nødvendig med ytterligere studier for å undersøke og bestemme om innkapslet gentamicin i DPPC/ 2.5% DPTAP gir en forbedret hemming kontra ikke-innkapslet antibiotika på biofilm. Studien indikerer at den brukte liposomformuleringen klarer å penetrere biofilm og gi en antibakteriell effekt. Videre arbeid er nødvendig for å støtte funnene i denne studien. På grunn av en særskilt situasjon ble dessverre ikke karakterisering av liposomene gjort like ofte som ønskelig. De mikrobiologiske testene ble gjennomført ved bruk av liposomer som har fått endring av zetapotensialet. Dermed er det nødvendig å utføre de samme testene på nytt med nye liposomer. Dette for å undersøke om zetapotensialet er en av de viktigste faktorene for interaksjonen mellom liposomene og bakteriecellemembranen.

En drug loading studie hadde gjort det mulig å undersøke mengde gentamicin innkapslet i liposomer. Ut fra testen på agarplaten ble det bare antatt at 1 µL liposomalt gentamicin tilsvarer omtrent 1 µg ikke-innkapslet gentamicin for å hjelpe med valget av volum liposomformulering som skulle brukes i de resterende mikrobiologiske testene. Siden dette er et anslag, er det viktig å finne den reelle mengden gentamicin innkapslet i liposomene.

I de mikrobiologiske testene, både på de planktoniske cellene og på biofilm, ble det ikke testet med ikke-innkapslet gentamicin som kontroll. Det ble dermed ikke mulig å sammenligne resultatene av liposomal gentamicin med fritt gentamicin. Dette gjør det vanskelig å konkludere om liposomal gentamicin gir en bedre antibakteriell effekt. Det er uten tvil at liposomal gentamicin har en hemmende effekt på både planktoniske celler og biofilm. Om det viser seg at liposomal gentamicin ikke forbedrer den antibakterielleffekten mot biofilmer, kan det være et alternativt bruk som forebyggende behandling ved risiko for BAI. Basert på resultatene fra plateleseren var det behov for små volum for å hemme både *S. aureus* og *P. aeruginosa*.

## 8. KONKLUSJON

I denne oppgaven ble det produsert ulike liposomformuleringer ved bruk av tyntfilm metoden. De mest stabile formuleringene, DPPC/ 2.5% DPTAP (positive liposomer) og DPPC/ 10% DPPG (negative liposomer) ble brukt for å innkapsle tre ulike peptidbaserte antibiotika (polymyxin B, gentamicin og bacitracin). Kun DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin var stabil nok for videre bruk i de mikrobiologiske testene. Under oppbevaring av DPPC/ 2.5% DPTAP med og uten innkapslet gentamicin ble det ikke endring av partikkelstørrelsen, men det var en signifikant økning av zetapotensialet. Det var også kun denne formuleringen som hadde egnet partikkelstørrelse (under 200 nm) og en PDI-verdi under 0.3. De resterende formulering hadde mindre ønskelige egenskaper under karakteriseringen (partikkelstørrelse over 200 nm, PDI over 0.3, alt for store forandringer på zetapotensialet og/ eller flere topper under størrelsesfordeling (ved intensitet).

Det ble gjennomført disk- og brønn-diffusjon tester på *S. aureus* og *P. aeruginosa* planktoniske celler. Testene viste at 1 µL liposomal gentamicin ga omtrent samme hemmingszone som 1 µg ikke-innkapslet gentamicin ga. Nøyaktig mengde gentamicin i 1 µL i liposomer var ikke mulig å undersøke i dette studiet.

Videre testing på planktoniske celler av *S. aureus* og *P. aeruginosa* for å undersøke hemming av bakteriell vekst viste fordelaktige resultater på begge bakterier. Ved testing på biofilmer ble to ulike forsøk gjennomført. *P. aeruginosa* ble behandlet med lavere volum av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin (0.024 mL – 50 mL) og det ble ikke påvist en antibakteriell hemming. *S. aureus* biofilm derimot ble hemmet ved bruk av DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin i volum mellom 100 mL og 2000 mL.

Det er behov for videre studier for å fast bestemme om DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin resulterer i bedre hemmende effekt mot allerede etablert biofilm kontra ikke-innkapslet gentamicin. Det som med sikkerhet kan konkluderes fra resultatene til dette forsøket er at DPPC/ 2.5% DPTAP med innkapslet gentamicin har effekt på planktoniske celler. I tillegg hadde formuleringen en hemmende effekt på *S. aureus* biofilm.



## 9. Referanser

1. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881-90.
2. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):114-22.
3. Scheie A, Petersen F. Biofilm og bakteriekommunikasjon - mulige konsekvenser. *Den norske tannlegeforenings tidende.* 2006;116(2):84-9.
4. Mah T-F, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* 2003;426(6964):306-10.
5. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):34-40.
6. (NIH) NIOH. Research on microbial biofilms. In: Services USDoHH, editor. U.S: Nation Institutes of Health (NIH); 2002.
7. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Høiby N, Moser C, William Costerton J, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 2012;65(2):127-45.
8. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9(1):34-9.
9. Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21 Suppl 1:S1-25.
10. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 2019;11(7):3919-31.
11. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. *Annual Review of Medicine.* 2008;59(1):415-28.
12. Fulaz S, Vitale S, Quinn L, Casey E. Nanoparticle-Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends Microbiol.* 2019;27(11):915-26.
13. Thassu D, Pathak Y, Deleers M. *Nanoparticulate: Drug Delivery Systems.* 1st ed. Thassu D, Pathak Y, Deleers M, editors. New York: Informa Helathcare USA, INC; 2007. 1, 6, 56-7, 9, 78 p.
14. Rajchakit U, Sarojini V. Recent Developments in Antimicrobial-Peptide-Conjugated Gold Nanoparticles. *Bioconjug Chem.* 2017;28(11):2673-86.
15. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.
16. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem.* 2015;7(4):493-512.
17. Sun F, Qu F, Ling Y, Mao P, Xia P, Chen H, et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiol.* 2013;8(7):877-86.
18. Rukavina Z, Vanić Z. Current Trends in Development of Liposomes for Targeting Bacterial Biofilms. *Pharmaceutics.* 2016;8:18.
19. Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 2010;5(11):1663-74.
20. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatric pulmonology.* 2009;44(6):547-58.



21. Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun*. 1980;28(2):546-56.
22. Stoodley P, Nistico L, Johnson S, Lasko LA, Baratz M, Gahlot V, et al. Direct demonstration of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in an infected total joint arthroplasty. A case report. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(8):1751-8.
23. Stoodley P, Conti SF, DeMeo PJ, Nistico L, Melton-Kreft R, Johnson S, et al. Characterization of a mixed MRSA/MRSE biofilm in an explanted total ankle arthroplasty. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;62(1):66-74.
24. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*. 2009;11(7):1034-43.
25. Stoodley P, Braxton EE, Jr., Nistico L, Hall-Stoodley L, Johnson S, Quigley M, et al. Direct demonstration of *Staphylococcus* biofilm in an external ventricular drain in a patient with a history of recurrent ventriculoperitoneal shunt failure. *Pediatr Neurosurg*. 2010;46(2):127-32.
26. Wang X, Lunsdorf H, Ehren I, Brauner A, Romling U. Characteristics of biofilms from urinary tract catheters and presence of biofilm-related components in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*. 2010;60(6):446-53.
27. Hawe CS, Ellis KS, Cairns CJ, Longmate A. Reduction of ventilator-associated pneumonia: active versus passive guideline implementation. *Intensive Care Med*. 2009;35(7):1180-6.
28. Petronella P, Scorzelli M, Fiore A, Corbisiteo M, Aglfsfi E, Esposito S, et al. Antibiotic prophylaxis in catheter-associated urinary infections. *Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences*. 2012;35(2):191.
29. Kutlu SS, Aybek Z, Tekin K, Okke D, Akalin S, Altintas S, et al. Is short course of antimicrobial therapy for asymptomatic bacteriuria before urologic surgical procedures sufficient? *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2012;6(02):143-7.
30. Conway LJ, Larson EL. Guidelines to prevent catheter-associated urinary tract infection: 1980 to 2010. *Heart & lung*. 2012;41(3):271-83.
31. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. 2010;50(5):625-63.
32. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJ, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clinical infectious diseases*. 2012;54(12):e132-e73.
33. O'Meara S, Cullum N, Majid M, Sheldon T. Systematic reviews of wound care management:(3) antimicrobial agents for chronic wounds;(4) diabetic foot ulceration: National Co-ordinating Centre for HTA. Great Britain; 2000.
34. Howell-Jones R, Wilson M, Hill KE, Howard A, Price PE, Thomas DW. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;55(2):143-9.
35. Gaonkar TA, Sampath LA, Modak SM. Evaluation of the antimicrobial efficacy of urinary catheters impregnated with antiseptics in an in vitro urinary tract model. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2003;24(7):506-13.
36. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles - A Review. *Trop J Pharm Res*. 2006;5(1):561-73.

37. Forier K, Raemdonck K, De Smedt SC, Demeester J, Coenye T, Braeckmans K. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *J Control Release*. 2014;190:607-23.
38. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front Pharmacol*. 2015;6:286-.
39. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):102.
40. Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(11):592-9.
41. Mugabe C, Azghani AO, Omri A. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;55(2):269-71.
42. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975-99.
43. Senior JH, Trimble KR, Maskiewicz R. Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1070(1):173-9.
44. Zhao W, Zhuang S, Qi XR. Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:3087-98.
45. Lipids AP. What Are The Differences Between (Advantages Of) Synthetic And Natural Phospholipids? 2020 [15.04.20]. Available from: <https://avantilipids.com/tech-support/faqs/synthetic-vs-natural-phospholipids>.
46. Singh A, Iyer AK, Amiji M, Ganta S. 14 - Multifunctional nanosystems for cancer therapy. In: Park K, editor. *Biomaterials for Cancer Therapeutics*: Woodhead Publishing; 2013. p. 387-413.
47. Wang M, Zander T, Liu X, Liu C, Raj A, Florian Wieland DC, et al. The effect of temperature on supported dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers: Structure and lubrication performance. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015;445:84-92.
48. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;75(1):1-18.
49. Caldorera-Moore M, Guimard N, Shi L, Roy K. Designer nanoparticles: incorporating size, shape and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(4):479-95.
50. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):505-15.
51. Skotland T, Iversen TG, Sandvig K. New metal-based nanoparticles for intravenous use: requirements for clinical success with focus on medical imaging. *Nanomedicine*. 2010;6(6):730-7.
52. Instruments M. Zetasizer Nano Series User Manual United Kingdom: Malvern Instruments Ltd; 2004 [06.06.20]. Available from: [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf).
53. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2).
54. Park JJ, Luo X, Yi H, Valentine TM, Payne GF, Bentley WE, et al. Chitosan-mediated in situ biomolecule assembly in completely packaged microfluidic devices. *Lab Chip*. 2006;6(10):1315-21.

55. Barba AA, Bochicchio S, Dalmoro A, Caccavo D, Cascone S, Lamberti G. Chapter 10 - Polymeric and lipid-based systems for controlled drug release: an engineering point of view. In: Grumezescu AM, editor. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*: William Andrew Publishing; 2019. p. 267-304.
56. Jonassen H, Kjoniksen AL, Hiorth M. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*. 2012;13(11):3747-56.
57. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71-9.
58. Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van 't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(6):1875-81.
59. Lipids AP. 16:0 PC (DPPC): 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine 2020 [21.04.20]. Available from: <https://avantilipids.com/product/850355>.
60. Lipids AP. 16:0 TAP (TAP): 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt) 2020 [21.04.20]. Available from: <https://avantilipids.com/product/890870>.
61. Lipids AP. 16:0 PG: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) 2019 [21.04.20]. Available from: <https://avantilipids.com/product/840455>.
62. Aldrich S. Polymyxin B sulfate salt 2020 [06.03.20]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4932?lang=en&region=NO>.
63. Aldrich S. Bacitracin 2020 [06.03.20]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/11702?lang=en&region=NO>.
64. Aldrich S. Gentamicin sulfate salt 2020 [06.03.20]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=g3632&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en&region=NO&focus=product>.
65. DrugBank. Polymyxin B sulfate 2020 [15.04.20]. Available from: <https://www.drugbank.ca/salts/DBSALT002841>.
66. Chemicals TR. G360600 2020 [15.04.20]. Available from: <https://www.trc-canada.com/products-listing/?searchBox=gentamicin+Sulfate+Salt+%28C+Complex%29&type=searchResult>.
67. Althubiani A, Maher Y, Fathi A, Aborehab M, Alarjah M, Khan m, et al. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide compound produced by *Bacillus megaterium* strain isolated from oral microflora. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018;26.
68. Lipids AP. Mini-Extruder Assembly Instructions 2019 [12.12.19]. Available from: <https://avantilipids.com/divisions/equipment-products/mini-extruder-assembly-instructions>.
69. Panalytical M. ZTS1240 Zeta Transfer Standard 2020 [06.06.20]. Available from: [https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/CCM0031-ZTS1240IntroandFAQ\\_tcm50-63782.pdf](https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/CCM0031-ZTS1240IntroandFAQ_tcm50-63782.pdf).
70. Kragh KN, Alhede M, Kvich L, Bjarnsholt T. Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*. 2019;1:100006.
71. Zhang H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposomes Preparation. In: M. DSGG, editor. *Liposomes Methods in Molecular Biology*. 1522. 2nd ed. New York: Humana Press; 2017. p. 17-22.
72. Alipour M, Halwani M, Omri A, Suntres ZE. Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains. *Int J Pharm*. 2008;355(1-2):293-8.
73. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(6):1317-23.

74. Wu Z, Gao W, Zhou S, Wen Z, Ni X, Xia H. Improving gentamicin B and gentamicin C1a production by engineering the glycosyltransferases that transfer primary metabolites into secondary metabolites biosynthesis. *Microbiological Research*. 2017;203:40-6.
75. Patel JB, Cockerill FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler JA, Jenkins SG, et al. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard— Tenth Edition. Pennsylvania , USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. p. 110.
76. Lipids AP. Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids 2019 [12.12.20]. Available from: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps>.
77. Nguyen S, Alund SJ, Hiorth M, Kjøniksen A-L, Smistad G. Studies on pectin coating of liposomes for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;88(2):664-73.
78. Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface*. 2014;11(101):20140459-.
79. Lipids AP. Mini-Extruder Extrusion Technique 2019 [12.12.19]. Available from: <https://avantilipids.com/divisions/equipment-products/mini-extruder-extrusion-technique>.
80. Barenholz Y, Lasic DD. *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes, Vol. 3: From Design to Microreactors*. 1st ed. USA: CRC Press LLC; 1996. 95 p.
81. Nguyen S, Adamczak M, Hiorth M, Smistad G, Kopperud HM. Interactions of liposomes with dental restorative materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;136:744-51.
82. Cinelli S, Onori G, Zuzzi S, Bordi F, Cametti C, Sennato S, et al. Properties of Mixed DOTAP–DPPC Bilayer Membranes as Reported by Differential Scanning Calorimetry and Dynamic Light Scattering Measurements. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007;111(33):10032-9.
83. van den Brink-van der Laan E, Antoinette Killian J, de Kruijff B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2004;1666(1):275-88.
84. Nguyen S, Solheim L, Bye R, Rykke M, Hiorth M, Smistad G. The influence of liposomal formulation factors on the interactions between liposomes and hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;76(1):354-61.
85. Meers P, Neville M, Malinin V, Scotto AW, Sardaryan G, Kurumunda R, et al. Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;61(4):859-68.
86. Si W, Wang L, Usongo V, Zhao X. Colistin Induces *S. aureus* Susceptibility to Bacitracin. *Front Microbiol*. 2018;9:2805.
87. Yoshida Y, Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Kato F, Nakamura N, Sugai M, et al. Bacitracin sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*. 2011;320:33-9.
88. Zhang TC, Bishop PL. Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Water Research*. 1994;28(11):2267-77.
89. Theretz A, Ranck J-L, Tocanne J-F. Polymyxin B-induced phase separation and acyl chain interdigitation in phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1983;732(3):499-508.
90. Lutwyche P, Cordeiro C, Wiseman DJ, St-Louis M, Uh M, Hope MJ, et al. Intracellular Delivery and Antibacterial Activity of Gentamicin Encapsulated in pH-Sensitive Liposomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(10):2511.

91. Drulis-Kawa Z, Gubernator J, Dorotkiewicz-Jach A, Doroszkiewicz W, Kozubek A. A comparison of the in vitro antimicrobial activity of liposomes containing meropenem and gentamicin. *Cellular & molecular biology letters*. 2006;11:360-75.
92. Rodrigues JC, Caseli L. Incorporation of bacitracin in Langmuir films of phospholipids at the air-water interface. *Thin Solid Films*. 2017;622:95-103.
93. Khan KNM, Hard GC, Alden CL. Chapter 47 - Kidney. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2013. p. 1667-773.
94. Berg J, Romoser A, Banerjee N, Zebda R, Sayes C. The relationship between pH and zeta potential of 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. *Nanotoxicology*. 2009;3:276-83.
95. Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Wells CL. Gentamicin promotes *Staphylococcus aureus* biofilms on silk suture. *J Surg Res*. 2011;170(2):302-8.
96. Allen RJ, Waclaw B. Bacterial growth: a statistical physicist's guide. *Rep Prog Phys*. 2019;82(1):016601-.
97. Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus Aureus*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing  
Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.
98. Colmer-Hamood JA, Dzvova N, Kruczek C, Hamood AN. Chapter Six - In Vitro Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Using Conditions That Mimic the Environment at Specific Infection Sites. In: San Francisco M, San Francisco B, editors. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 142: Academic Press; 2016. p. 151-91.
99. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*. 2005;436(7054):1171-5.
100. Nucleo E, Steffanoni L, Fugazza G, Migliavacca R, Giacobone E, Navarra A, et al. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *BMC microbiology*. 2009;9(1):270.
101. Majtan J, Majtánová Ľ, Xu M, Majtan V. In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Slovakia. *Journal of applied microbiology*. 2008;104(5):1294-301.
102. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(12):3357-63.
103. Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg EP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and  $\beta$ -lactamase and alginate production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(4):1175-87.

