



Universiteit
Leiden

The Netherlands

**Nanomaterial safety for microbially-colonized hosts:
Microbiota-mediated physisorption interactions and
particle-specific toxicity**

Brinkmann, B.W.

Citation

Brinkmann, B. W. (2022, December 8). *Nanomaterial safety for microbially-colonized hosts: Microbiota-mediated physisorption interactions and particle-specific toxicity*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3494409>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3494409>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

De micro-organismen die de externe weefsels van planten en dieren koloniseren, vormen samen de gastheer-geassocieerde microbiota. Antimicrobiële stoffen die in aanraking komen met microbiëel-gekoloniseerde weefsels, kunnen bepaalde microben daarvan doden, waaronder de microben die bijdragen aan de gezondheid en ontwikkeling van hun gastheer. Dit vormt een zorg voor nanomaterialen die antimicrobiële nanodeeltjes bevatten. Voor veel van deze deeltjes is aangetoond dat deze de biofysiologische homeostase van gastheren, die afhankelijk is van microbiota, kunnen verstoren. Dit roept vragen op over de veiligheid van antimicrobiële nanomaterialen voor gastheren die door microben zijn gekoloniseerd.

Naast de effecten van nanodeeltjes op microbiota, zijn er effecten van microben op de fysisch-chemische eigenschappen van nanodeeltjes, en de fysiologische respons daarop van de gastheer. Dit proefschrift bundelt werk dat dit onderzoekt middels een combinatie van computermodellen en experimenten met zebrafislarven. Dit wordt geïntroduceerd in **hoofdstuk 1**. Dit hoofdstuk presenteert ten eerste een overzicht van het toenemende aantal studies dat effecten aantoont van nanodeeltjes op gastheer-geassocieerde microbiota. Verder beschrijft dit hoofdstuk welke chemische transformaties van nanomaterialen door microben mogelijk worden gemaakt. Daarna worden twee kennishiaten geïntroduceerd die in dit proefschrift worden onderzocht. Ten eerste worden fysisorptie interacties tussen koloniserende microben, hun metabolieten en nanomaterialen onderzocht in **hoofdstuk 2** en **hoofdstuk 3**. Ten tweede wordt de invloed van koloniserende microben op de deeltjes-specifieke toxiciteit van nanomaterialen gekwantificeerd, en worden de daaraan ten grondslag liggende mechanismen onderzocht in **hoofdstuk 4** en **hoofdstuk 5**. Samen behandelen deze hoofdstukken de onderzoeksvraag: *‘Welke mechanismen leiden tot de fysisorptie-gedreven en deeltjes-specifieke effecten van microbiota op de toxiciteit van nanomaterialen voor microbiëel-gekoloniseerde gastheren?’*

In **hoofdstuk 2** worden fysisorptie interacties onderzocht tussen ingenomen nanomaterialen en metabolieten van enterische microbiota in het maag-darmkanaal. Als startpunt voor dit onderzoek wordt aan de hand van literatuur een overzicht gegenereerd van 170 unieke microbiële metabolieten die door enterische microben worden geproduceerd, aangepast of gereguleerd. Met ‘quantitative structure-activity relationship’ (QSAR) modellen wordt vervolgens voor 13 metalen nanomaterialen, 5 koolstofnanobuizen en 1 fullereen de adsorptie affiniteit ($\log k$ waarde) van 60 van deze metabolieten voorspeld. Met moleculair dynamische (MD) simulaties wordt bovendien directe moleculaire informatie verkregen van nano-bio interacties voor een casus van

vier vitaminen, een siliciumdioxide nanomateriaal en een meerwandige koolstofnanobuis. De correlaties tussen de QSAR voorspellingen en de 'biological surface adsorption index' gaven aan dat door hydrofobiciteit gedreven interacties het meeste bijdragen aan de algehele affiniteit van metabolieten voor nanomaterialen, terwijl waterstofbrug interacties en polariteit/polariseerbaarheid gedreven interacties de affiniteit van metabolieten voor metaal en koolstof nanomaterialen onderscheiden. Vrije MD simulaties ondersteunden deze kern interactie types in grote mate. Daarbij lieten de simulaties zien hoe grote en flexibele metabolieten ander conformaties aan kunnen nemen om stabiliteit te winnen op het oppervlak van nanomaterialen. Samen geven deze resultaten zowel kwalitatief als kwantitatief inzicht in biologisch relevante interacties die in het maagdarmkanaal tussen microbiële metabolieten en ingenomen nanomaterialen kunnen optreden.

Hoofdstuk 3 richt zich op fysisorptie interacties die zich op de grotere schaal van microben voordoen. In dit hoofdstuk wordt veronderstelling getoetst dat de adsorptie van antimicrobiële titaniumdioxide nanodeeltjes ($n\text{TiO}_2$) op zebraviseieren het ontwikkelende embryo kan schaden, door vroeg-koloniserende microbiota te bestrijden. Eerst wordt onderzocht of de membranen die het ei omsluiten de opname van nanodeeltjes tegen kunnen gaan. Daartoe worden gouden nanostaafjes in en op blootgestelde zebraviseieren gelokaliseerd door middel van twee-foton microscopie. Hieruit bleek dat de deeltjes de beschermende membranen niet in detecteerbare hoeveelheden passeerden. Vervolgens worden de effecten van geadsorbeerd $n\text{TiO}_2$ op de koloniserende microben op zebraviseieren onderzocht. Dit geadsorbeerd TiO_2 bedekte, bij benadering door middel van 'particle-induced X-ray emission analysis', 25-45 % van het oppervlak van zebraviseieren. Zowel op beeld- als op kweek-gebaseerde identificatiemethoden lieten zien dat dit resulteerde in een algehele toename van de hoeveelheid microben, ondanks de antimicrobiële werking van de deeltjes. Ziekteverwekkende *Aeromonas* bacteriën tolereerden de antimicrobiële eigenschappen van de deeltjes. Dit vormde een risico voor de larven die uit de aan $n\text{TiO}_2$ blootgestelde eieren kwamen, aangezien deze ook een grotere hoeveelheid microben bevatten, zelfs zonder voortzetting van de blootstelling aan $n\text{TiO}_2$. Deze resultaten laten zien dat de adsorptie van gesuspendeerde antimicrobiële nanodeeltjes op aquatische eieren de ruimtelijk-temporale verspreiding van ziekteverwekkende bacteriën door aquatische ecosystemen mogelijk kan maken.

In de volgende twee hoofdstukken worden effecten van koloniserende microbiota op de deeltjes-specifieke toxiciteit van nanomaterialen bestudeerd. In **hoofdstuk 4** worden hiertoe protocollen geoptimaliseerd, waarmee de acute toxiciteit van nanomaterialen tussen kiemvrije en microbiel-gekoloniseerde zebravislarven vergeleken kan worden. Door deze methodiek met het respons additie model te

combineren, bleek dat koloniserende microben zebravislarven tegen de deeltjes-specifieke toxiciteit van zilver nanodeeltjes (nAg) beschermden, maar de toxiciteit van zinkoxide nanodeeltjes (nZnO) niet beïnvloedden. Door aan het eind van de tweedaagse blootstellingsperiode microben van zebravislarven te isoleren, bleek bovendien dat nAg de microbiota van zebravislarven grotendeels bestreed, terwijl nZnO geen significant effect had op de hoeveelheid microben van zebravislarven. Deze resultaten laten zien dat het in ieder geval voor bepaalde nanomaterialen belangrijk is om de interacties tussen een gastheer en haar microbiota mee te nemen in het beoordelen van de toxiciteit van nanodeeltjes voor microbiëel-gekoloniseerde gastheren.

In **hoofdstuk 5** wordt, aan de hand van de toxiciteit van nAg voor zebravislarven, verder ontrafeld hoe koloniserende microben de gastheer tegen de toxiciteit van nanomaterialen kunnen beschermen. Met behulp van een transgene *il1 β* -indicatielij, worden ten eerste de accumulatie en deeltjes-specifieke inflammatoire effecten van nAg gekarakteriseerd in het gehele lichaam en in het darmweefsel van de larven. Dit liet zien dat zilver gelijkmatig ophoopte in zowel het gehele lichaam als in het darmweefsel van larven, hoewel het met name in de huid van larven deeltjes-specifieke ontstekingen veroorzaakte. Vervolgens wordt met behulp van drie mutantlijnen beoordeeld of de herkenning van microbiota door toll-like receptoren (TLRs) bijdraagt aan de microbiota-afhankelijke bescherming tegen nAg. Zowel een zebravismutant voor TLR2, als een mutant voor de TLR2-adaptor TIRAP (Mal), waren gevoeliger voor nAg dan het wildtype in de aanwezigheid van microbiota. Daarentegen waren beide mutanten zonder microbiota even gevoelig voor nAg als het wildtype. Ongeacht de aan- of afwezigheid van microbiota was de gevoeligheid van een derde mutant, voor de TLR2-adaptor MyD88, gelijk aan die van het wildtype. Samen suggereren deze resultaten dat de herkenning van microbiota door TLR2, zebravislarven beschermt tegen de toxiciteit van nAg via TIRAP-afhankelijke signaaltransductie. In algemenere zin ondersteunen deze resultaten, die de effecten van gastheer-microbiota interacties onderscheiden van effecten van microbe-deeltjes interacties, de conclusie dat interacties tussen de gastheer en haar microbiota de toxiciteit van nanomaterialen in zebravislarven beïnvloeden.

In **hoofdstuk 6** bediscussiëren we hoe de resultaten van dit proefschrift bij kunnen dragen aan een microbiota-inclusieve beoordeling van de veiligheid van nanomaterialen. Met betrekking tot de effecten van microbiota op fysisorptie interacties, lichten we toe onder welke omstandigheden microbiële metabolieten met name verondersteld kunnen worden via biocorona vorming de blootstellingsscenario's voor nanomaterialen te beïnvloeden. We bediscussiëren bovendien hoe er in testsystemen rekening gehouden kan worden met de vorming van heteroaggregaten bestaande uit microben en deeltjes. Mogelijk verspreiden deze aggregaten ziekteverwekkende microben. Daarna gaan we in op de implicaties van het verkregen

inzicht in de toxiciteit van nAg, waarvan het mechanisme afhangt van microbiota en deeltjes-specifiek is, voor drie gangbare teststrategieën in de nanotoxicologie. Met betrekking tot het doel om chronische effecten te voorspellen, wijzen onze resultaten er ten eerste op dat antimicrobiële stoffen de gastheer gevoeliger kunnen maken voor nanomaterialen door de beschermende microbiota te bestrijden. Echter, andere veelvoorkomende vervuilende stoffen in het milieu kunnen dit maskeren door het immuunsysteem van de gastheer te onderdrukken. Met betrekking tot het groeperen van stoffen en 'read-across' aanpakken, suggereren de resultaten ten tweede dat een toename in *il1β* expressie mogelijk als marker kan dienen voor het detecteren van microbiota-afhankelijke toxiciteit. Als dat zo is, kan aan de hand daarvan microbiota-afhankelijke toxiciteit worden voorspeld voor nanomaterialen. Met betrekking tot de extrapolatie tussen soorten, geven onze resultaten ten derde aan dat met name het functioneren van microbiota, en niet de taxonomische samenstelling van microbiota, een veelbelovend uitgangspunt vormt voor de extrapolatie van testresultaten tussen verschillende gastheren. Dit volgt uit het behoud van het functioneren van microbiota, in tegenstelling tot de taxonomische samenstelling van microbiota, tussen verschillende gastheren. Al met al heb ik voor ogen dat de testmethoden, resultaten en inzichten die in dit proefschrift zijn verkregen, bij kunnen dragen aan een veilig en duurzaam ontwerp van nanomaterialen, door bij te dragen aan een transitie naar een microbiota-inclusieve beoordeling van de veiligheid van nanomaterialen voor mens en milieu.