



Universiteit
Leiden

The Netherlands

How nutrients shape antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*: food for thought

Kok, M.

Citation

Kok, M. (2026, January 20). *How nutrients shape antibiotic sensitivity of Pseudomonas aeruginosa: food for thought*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4287725>

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/1887/4287725>

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

How nutrients shape antibiotic sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*

Food for thought

Chapter

8

Nederlandse samenvatting

8.1. Algemene introductie

Pseudomonas aeruginosa: een hardnekkige ziekteverwekker

Pseudomonas aeruginosa is een bacterie die goed gedijt op vochtige plekken, zoals stilstaand water, beekjes of vochtige aarde. Hoewel deze bacterie op veel plaatsen voorkomt, is deze bacteriesoort voor de meeste mensen geen ziekteverwekker. Voor mensen met een verzwakt afweersysteem kan *P. aeruginosa* echter wel gevaarlijk zijn: hun afweer is vaak niet sterk genoeg om de bacterie onder controle te houden. Omdat *P. aeruginosa* alleen onder bepaalde omstandigheden ziekte veroorzaakt, wordt de bacteriesoort beschouwd als een **opportunistisch pathogeen**. Maar omdat de bacterie niet alleen voorkomt in vochtige plekken in de natuur, maar ook in waterleidingen, kranen en airconditioningsystemen, kan ze zich gemakkelijk verspreiden in ziekenhuizen en verzorgingshuizen. Precies de plekken waar veel zieke en kwetsbare mensen verblijven. Hierdoor is *P. aeruginosa* verantwoordelijk voor een aanzienlijk deel van de infecties die patiënten tijdens hun ziekenhuisopname oplopen. Voorbeelden hiervan zijn urineweginfecties via katheters, bloedbaaninfecties bij infusen, of longontstekingen bij beademde patiënten. Wanneer iemand zo'n infectie oploopt, wordt vaak gestart met een **antibioticakuur**: een behandeling die gericht is op het doden van de bacterie. Hoewel deze behandeling in veel gevallen effectief is, komt het steeds vaker voor dat de infectie niet verdwijnt omdat het pathogeen niet meer gevoelig is voor de antibiotica (**Box 1**).

Box 1. De effectiviteit van antibiotica bij infecties

Het eerste **antibioticum** werd bij toeval ontdekt in 1928. Een schimmel scheidde een stofje uit dat de groei van omliggende bacteriën remde. Pas in 1940 slaagden wetenschappers erin om dit middel, penicilline, op grote schaal te produceren. Antibioticabehandelingen waren namelijk essentieel om infecties als gevolg van verwondingen of operaties te voorkomen, juist in een periode waarin de druk op het medisch personeel enorm was, tijdens de Tweede Wereldoorlog. Sindsdien is antibiotica niet meer weg te denken uit de gezondheidszorg. Dankzij deze middelen kunnen jonge kinderen die vroeger dagenlang ziek op de bank lagen, soms al na één dag behandeling weer vrolijk rondlopen. Ook ingrijpende operaties zijn een stuk veiliger geworden, omdat het risico op levensbedreigende infecties achteraf sterk is afgenomen.

Maar tegelijkertijd met de doorbraak van antibiotica werden ook de eerste bacteriën waargenomen die niet meer geremd werden bij blootstelling aan deze middelen. Deze

bacteriën ontwikkelden **antibioticaresistentie** door de doelwitten van antibiotica zodanig aan te passen dat de werking ervan verloren ging. Omdat bacteriën in grote populaties voorkomen en zich zeer snel delen, kan een verandering die een overlevingsvoordeel biedt snel dominant worden binnen een populatie. Deze snelle **evolutionaire aanpassing** leidde ertoe dat al kort na de introductie van antibiotica bacterielijnen ontstonden die volledig resistent waren, zoals de bekende ziekenhuisbacterie methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Om infecties met antibioticaresistente bacteriën toch te kunnen blijven behandelen, zijn er in de loop der tijd veel nieuwe antibiotica ontwikkeld. Dit heeft geleid tot een breed scala aan **antibioticaklassen** met verschillende werkingsmechanismen. Om de werking van antibioticaklassen te waarborgen gelden er strikte voorschriftregels. Toch overlijden jaarlijks nog altijd miljoenen mensen aan infecties waarbij antibioticaresistente bacteriën een rol spelen. Vaak omdat deze bacteriën ongevoelig zijn voor meerdere antibioticaklassen.

Hoewel onverantwoord gebruik van antibiotica vaak wordt genoemd als belangrijke aanjager van de ontwikkeling van **multiresistente bacteriën**, valt dit buiten de reikwijdte van dit proefschrift. Dit proefschrift richt zich op infecties die klinisch moeilijk te behandelen zijn doordat bacteriën zich tijdens de infectieperiode kunnen aanpassen door falende antibiotica therapieën. Als gevolg hiervan kunnen infecties langdurig blijven bestaan (soms maanden tot zelfs jaren), en dus overgaan in een **chronisch** ziektebeeld.

***P. aeruginosa* infecties in de longen van cystische fibrosepatiënten**

Cystische fibrose (CF), ook wel taaislijmziekte genoemd, is een genetische aandoening die leidt tot een abnormaal dikke slijmlaag in de luchtwegen. In gezonde longen helpt het slijm bij het afvoeren van pathogenen en afvalstoffen. Bij CF-patiënten is het slijm gedehydrateerd en stroperig, waardoor deze klaringsfunctie ernstig verstoord is. Dit creëert een gunstige omgeving voor micro-organismen om zich in de longen te vestigen. Het afweersysteem reageert op deze kolonisatie, wat leidt tot ontstekingsreacties en infecties. Al op jonge leeftijd worden bij CF-patiënten herhaaldelijk bacteriële kolonies aangetroffen in de luchtwegen. Om deze kolonies onder controle te houden en verdere longschade te beperken, zijn CF-patiënten vaak aangewezen op langdurige onderdrukkende antibioticatherapieën. Helaas zijn deze behandelingen bij een aanzienlijk deel van de patiënten niet effectief genoeg om chronische longinfecties volledig te voorkomen. In sommige gevallen zijn de infecties zo

hardnekkig en therapieresistent dat een risicovolle longtransplantatie de enige overgebleven optie is om de infectie te elimineren.

P. aeruginosa is één van de meerdere pathogenen die verantwoordelijk zijn voor chronische longinfecties bij CF-patiënten. Wat *P. aeruginosa* specifiek maakt, is dat de infectie vaak al op jonge leeftijd wordt opgelopen en vervolgens niet meer volledig geëlimineerd kan worden. Hierdoor is *P. aeruginosa* de meest dominante pathogeen in de luchtwegen van volwassen CF-patiënten. Meer inzicht in de manier waarop de chronische *P. aeruginosa* infectie ontstaat en de respons op antibiotica bij CF-patiënten biedt niet alleen kansen om de klinische uitkomst voor deze specifieke patiëntengroep te verbeteren, maar is ook van groot belang om het groeiende probleem van infecties met multiresistente *P. aeruginosa*-stammen het hoofd te bieden.

De stofwisseling van *P. aeruginosa* in de longen van CF-patiënten

Door de vorming van een dikke laag slijm en het gebrek aan effectieve klaring ontstaat een unieke leefomgeving in de **mucus** van de luchtwegen van CF-patiënten. In deze directe, lokale **micro-omgeving** waarin *P. aeruginosa* zich vestigt, hopen potentiële voedingsstoffen zich op, terwijl de hoeveelheid beschikbare zuurstof zeer beperkt is. Door de slechte zuurstofpenetratie in de mucus ontstaan zuurstofarme tot zelfs volledig zuurstofvrije omstandigheden. De stofwisseling van *P. aeruginosa* speelt een belangrijke factor waarom de bacterie zich gemakkelijk kan vestigen in deze unieke micro-omgevingen.

Het veelzijdige en flexibele metabolisme van *P. aeruginosa* sluit goed aan op het aanbod voedingsstoffen in de mucus van de longen van CF-patiënten (**Box 2**). In de mucus worden namelijk hoge concentraties gemeten van de **nutriënten** die *P. aeruginosa* efficiënt benut: aminozuren, korte-keten organische zuren, en nitraat. Daarnaast kan *P. aeruginosa* grotere moleculen actief afbreken om de gewenste nutriënten vrij te maken, en beschikt het over **virulentiefactoren** die het vrijkomen van nutriënten in humane cellen forceren. Dankzij deze overvloed aan beschikbare nutriënten kan de bacterie zich gemakkelijk vestigen in zowel zuurstofrijke (**aerobe**) als zuurstofarme (**anaerobe**) micro-omgevingen in de longen van CF-patiënten.

Box 2. Metabolisme van *P. aeruginosa*

Het **metabolisme** van *P. aeruginosa* wijkt af van veel andere pathogenen en humane cellen. In humane cellen start de energieproductie meestal met suikers zoals **glucose**, die worden afgebroken tot kleinere moleculen. Deze tussenproducten kunnen dienen als bouwstenen, of in combinatie met zuurstof worden gebruikt in **oxidatieve fosforylatie**. Tijdens oxidatieve fosforylatie wordt de energie uit de suikerafbraak opgeslagen in de vorm van **ATP**. Het ATP-molecuul is de universele energiedrager van cellen. In humane cellen vindt de oxidatieve fosforylatie plaats in de mitochondriën, die daardoor de bijnaam 'energicentrales van de cel' dragen. Hoewel oxidatieve fosforylatie een zeer efficiënte manier is van energieproductie, vereist het de aanwezigheid van zowel suikers en zuurstof. *P. aeruginosa* daarentegen maakt juist veelvuldig gebruik van alternatieve koolstofbronnen, zoals **aminozuren** en korte-keten **organische zuren**. Deze aminozuren en organische zuren zijn kleine moleculen die fungeren in humane cellen ook als belangrijke bouwstenen voor macromoleculen zoals eiwitten en lipiden. Maar *P. aeruginosa* beschikt over meerdere alternatieve metabole routes om deze kleine moleculen efficiënt te benutten voor energieproductie. Het gebruik van deze alternatieve nutriënten geven *P. aeruginosa* niet alleen een voordeel in de concurrentie om nutriënten, maar zorgt ook voor een hoge mate van flexibiliteit.

De metabole flexibiliteit van *P. aeruginosa* wordt verder vergroot doordat de bacterie, naast zuurstof, ook **nitraat** kan gebruiken als alternatief voor het proces om energie op te slaan in de vorm van ATP. Dit proces, **denitrificatie** genoemd, stelt *P. aeruginosa* in staat om ook in anaerobe omgevingen waar geen zuurstof aanwezig is efficiënt energie te blijven produceren. Wanneer zowel zuurstofrespiratie als denitrificatie niet mogelijk zijn, kan *P. aeruginosa* terugvallen op **fermentatie** en **deiminatie**. Fermentatie is een anaerobe metabole route voor energieproductie, vergelijkbaar met wat er in spieren gebeurt tijdens zware inspanning: glucose wordt dan deels afgebroken zonder dat zuurstof nodig is, met **lactaat** productie als gevolg. Bij deiminatie worden aminozuren afgebroken via specifieke enzymatische routes waarbij eveneens ATP wordt gegenereerd. Deze metabole veerkracht stelt *P. aeruginosa* in staat zich uitstekend aan te passen aan de vaak anaerobe mucus in de longen van CF-patiënten.

Het metabolisme van bacteriën beïnvloed de efficiëntie van antibiotica

Bacteriën beschikken over meerdere mechanismen om de werking van antibiotica te verminderen of zelfs volledig uit te schakelen. Antibiotica resistentie is verantwoordelijk voor het overgrote deel van de miljoenen sterfgevallen die jaarlijks wereldwijd worden toegeschreven aan het falen van

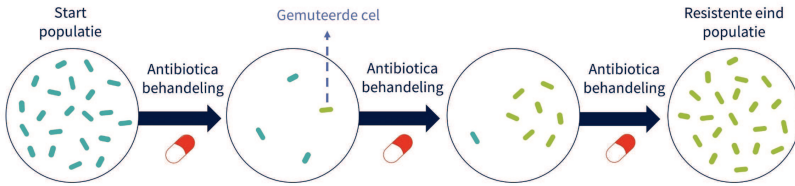
antibiotica behandelingen. Er is dan ook veel onderzoek gedaan naar de mechanismen die leiden tot antibioticaresistentie.

Door antibiotica **resistentiemechanismen** is een bacterie in staat zijn om te blijven delen bij antibiotica-concentraties die normaal gesproken de groei van de populatie remmen of dodelijk zijn (**Figuur 1A**). Veelvoorkomende resistentiemechanismen zijn: (1) enzymatische afbraak of modificatie van het antibioticum, (2) actieve efflux, waarbij antibiotica uit de cel worden gepompt, (3) veranderingen in het doelwit van het antibioticum, waardoor het niet meer effectief kan binden, en (4) verminderde opname of doorlaatbaarheid van het antibioticum.

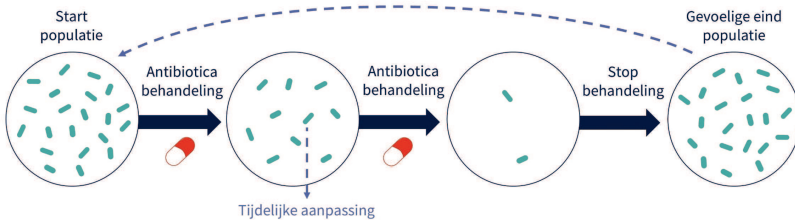
Deze resistentiemechanismen ontstaan door veranderingen in het bacteriële DNA. Een voorbeeld hiervan is een spontane mutatie in het stukje DNA dat de informatie bevat voor het maken van de eiwitten waaraan een antibioticum normaal bindt om celprocessen te verstoren. Als de aanpassing in het DNA ervoor zorgt dat het antibioticum niet meer goed kan binden, wordt deze specifieke bacteriecel ongevoelig voor het antibioticum. Omdat DNA wordt doorgegeven aan nakomelingen, zullen ook de nieuwgevormde cellen dezelfde aanpassing in het DNA hebben. De bacteriecellen die de mutatie niet hebben en dus nog wel gevoelig zijn voor het antibioticum, zullen tijdens de behandeling afsterven of stoppen met delen. Daardoor kunnen de resistente cellen met de mutatie snel de overhand nemen binnen de bacteriepopulatie. De kans op het ontstaan van zo'n mutatie die deze **evolutie** in gang zet is op zichzelf klein. Maar omdat een infectie vaak uit miljoenen bacteriën bestaat die zich bovendien zeer snel kunnen verdubbelen, is de kans dat er ergens in de populatie een resistente variant ontstaat reëel. Zeker bij de langdurige antibioticatherapieën die gebruikt worden om longschade bij CF-patiënten te beperken.

Naast deze stabiele, genetische resistentiemechanismen maken bacteriën ook gebruik van tijdelijke strategieën waarmee ze een antibiotica behandeling tijdelijk kunnen overleven. Een infectie met een pathogeen dat zulke **transiënte mechanisme** toepast lijkt tijdens de behandeling vaak succesvol bestreden, maar keert terug zodra de antibiotica wordt stopgezet (**Figuur 1B**). Bij hervatting van dezelfde behandeling is de bacterie meestal opnieuw gevoelig, omdat het gaat om

A. Antibiotica resistentie



B. Transiënte verlaging antibiotica gevoeligheid



Figuur 1. Visualisatie van hoe bacteriële populaties reageren op antibiotische behandeling. (A) antibiotica resistentie: een stabiele genetische verandering zoals een mutatie zorgt ervoor dat bacteriën kunnen blijven groeien tijdens blootstelling aan antibiotica. (B) Transiënte verlaging van antibiotica gevoeligheid: door een fenotypische verandering ontstaat een verlaagde gevoeligheid, waardoor bacteriën de antibiotische werking tijdelijk overleven.

een tijdelijke **fenotypische** aanpassing. Er vindt dus geen stabiele verandering plaats in het DNA. Toch vergroten deze tijdelijke aanpassingen de kans dat op termijn wel stabiele, genetische resistentie ontstaat en zich vastzet binnen de bacteriële populatie.

Het bacteriële metabolisme speelt een belangrijke rol in zulke tijdelijke veranderingen in antibioticagevoeligheid. Dit is duidelijk zichtbaar bij de werking van **aminoglycoside**-antibiotica. Aminoglycosiden, zoals **tobramycine**, verstoren de eiwitsynthese in bacteriën, wat uiteindelijk leidt tot celdood. De opname van deze antibiotica in de bacteriecel is echter afhankelijk van een elektrisch spanningsverschil over het celmembraan, dat wordt opgewekt tijdens de energieproductie via oxidatieve fosforylatie. Hierdoor hopen aminoglycosiden zich vooral op in metabool actieve cellen met een hoog energieniveau, en is de

aminoglycoside effectiever in celdoding. Dit staat in contrast met de werking van **polymyxines**, een andere klasse van bacteriedodende antibiotica. Polymyxines, zoals **colistine**, binden aan lipiden in de buitenste laag van de celwand. Om deze binding te verhinderen, kan de bacterie de samenstelling van de lipiden in de celwand actief aanpassen. Echter kost dit proces veel energie en dus niet mogelijk is in cellen met een laag energieniveau. Daardoor zijn polymyxines juist dodelijker voor cellen met een lage metabole activiteit.

Net als bij mensen verschillen bacteriecellen binnen een populatie van elkaar, zowel in genotypisch als fenotypisch opzicht. Deze **heterogeniteit** tussen cellen maakt dat een bacteriepopulatie zich goed kan aanpassen aan veranderende omstandigheden. Een goed voorbeeld van variatie tussen *P. aeruginosa* cellen in de luchtwegen van CF-patiënten zijn **biofilm-aggregaten**. Biofilms bestaan uit bacteriën die hun beweeglijkheid opgeven en samen een beschermende matrix uitscheiden. Deze extracellulaire matrix beschermt de bacteriën tegen schadelijke omgevingsfactoren, zoals antibiotica en het afweersysteem. Naast deze bescherming zorgt de matrix er ook voor dat voedingsstoffen beperkt tot de kern van de biofilm komen. Daardoor ontstaat in de kern een voedselarme en zuurstofarme micro-omgeving, waarin bacteriën inactief of **dormant** raken. Colistine werkt vooral goed op de inactieve cellen diep in de biofilm, terwijl tobramycine juist effectief is tegen de actieve bacteriën aan de buitenkant. Het toevoegen van voedingsstoffen tijdens de antibiotica behandeling zorgt dat bacteriën actiever worden, waardoor onder andere tobramycine beter gaat werken. Dit benadrukt hoe belangrijk het is om bij de keuze van een behandeling niet alleen naar het antibioticum te kijken, maar ook naar de metabole activiteit van de bacterie.

De micro-omgevingen beïnvloeden *P. aeruginosa* antibiotica gevoeligheid

De werking van antibiotica hangt nauw samen met de metabole activiteit van *P. aeruginosa*, die grotendeels wordt bepaald door de hoeveelheid beschikbare nutriënten en zuurstof in de omgeving. In de longen van CF-patiënten bestaan veel verschillende micro-omgevingen, die ontstaan door variatie in de ernst van de ziekte, de snelheid van longfunctieverlies, bijkomende infecties en de structuur van de luchtwegen. *P. aeruginosa* past zijn metabolisme aan deze omstandigheden aan, wat leidt tot een breed scala aan resistentiemechanismen.

Het is daarom belangrijk om te begrijpen welke specifieke veranderingen in de omgeving invloed hebben op de antibioticagevoeligheid van *P. aeruginosa*. Dit inzicht is essentieel om terugkerende behandelproblemen te voorkomen en chronische infecties beter onder controle te krijgen.

Analyse van bacteriële groei en antibioticawerking in het laboratorium

Om het effect van de groeicondities op antibioticagevoeligheid te bestuderen, zijn gecontroleerde omstandigheden nodig. In het menselijk lichaam wordt de omgeving beïnvloed door talloze factoren, waardoor het lastig is om het effect van één specifieke factor te isoleren. Daarom wordt vaak uitgeweken naar *in vitro* laboratoriumonderzoek.

In de kliniek wordt bijvoorbeeld het pathogeen uit een patiënt geïsoleerd om de gevoeligheid voor antibiotica te bepalen. In het laboratorium worden deze bacteriën vervolgens gekweekt onder gecontroleerde omstandigheden: bij lichaamstemperatuur (37 °C) en in een voedingsrijk **kweekmedium**. Vervolgens worden de bacteriën blootgesteld aan een verdunningsreeks van een antibioticum, waarbij elke volgende concentratie het dubbele is van de vorige. Na 20 tot 24 uur incubatie wordt het effect beoordeeld door te kijken naar de troebelheid van het medium: als het medium troebel is geworden, betekent dit dat de bacterie groeit ondanks de aanwezigheid van het antibioticum. De laagste concentratie waarbij geen zichtbare groei optreedt, wordt de **minimale inhibitieconcentratie (MIC)** genoemd.

Hoewel de MIC een belangrijke maat is voor de gevoeligheid van een bacterie voor een antibioticum, heeft deze methode ook een aantal beperkingen. Zo geeft de MIC slechts een momentopname weer, en wordt de groei of afname van de bacterie in de tijd niet in kaart gebracht. Daarnaast worden gestandaardiseerde kweekmedia gebruikt die de complexe omgeving van de longen in CF-patiënten niet goed nabootsen, waardoor de resultaten niet altijd representatief zijn voor de situatie in het lichaam.

Om de beperking van de meting op één enkel tijdstip bij MIC-bepalingen te omzeilen, kunnen **time-kill** experimenten worden gebruikt. In deze

Box 3. Bepalen van de bacteriedichtheid

De bacteriedichtheid kan op verschillende manieren worden bepaald. De snelste en goedkoopste methode is het meten van de optische dichtheid (OD). Dit is vergelijkbaar met de eindmeting van een MIC-test, maar kan bij time-kill experimenten dynamisch worden uitgevoerd met behulp van een fotospectrometer. De fotospectrometer schijnt licht met een golflengte van 600 nanometer door het kweekmedium. Dit licht wordt deels geabsorbeerd en verstrooid, waardoor er minder licht de detector bereikt. De gemeten waarde, **OD₆₀₀**, geeft een indicatie van de troebelheid van het medium. Omdat bacteriën de dichtheid van het medium verhogen, neemt de OD₆₀₀-waarde toe met de groei van de cultuur. De OD₆₀₀ zegt echter niets over het aantal levende bacteriën, omdat ook dode cellen het licht tegenhouden. Hierdoor is OD₆₀₀ niet geschikt om celdoding door antibiotica vast te stellen. Om zowel groei als afname van levende bacteriën te meten, wordt daarom vaak gebruikgemaakt van het tellen van **colony forming units (CFU)**. Eén CFU staat voor een levende bacterie die in staat is een kolonie te vormen op een voedingsbodem in een petrischaal. Aangezien bacterieculturen vaak uit tientallen miljoenen bacteriën bestaan, wordt de cultuur verdund om het aantal kolonies telbaar te maken. Het maken van verdunningen, incuberen van de platen en handmatig tellen van CFU's is echter tijdrovend. Daarom kan een indirecte bepaling van levende cellen veel tijd besparen. In dit proefschrift is hiervoor gebruikgemaakt van **bioluminescente** bacteriën. Deze bacteriën zijn genetisch aangepast om een eiwit te produceren dat voortdurend licht uitzendt. Dit eiwit functioneert alleen in levende cellen, omdat het ATP nodig heeft om luminescentie te genereren. Wanneer bacteriën afsterven, daalt het ATP-gehalte en neemt het uitgezonden licht af. Dankzij deze methode kan de bacteriële dichtheid gedurende het time-kill experiment volledig automatisch worden gevolgd met een fotospectrometer.

experimenten wordt de bacteriedichtheid gedurende de tijd gevolgd (**Box 3**), waardoor het mogelijk is om het groeiverloop en de mate van afname door antibiotica nauwkeurig te bepalen. In tegenstelling tot de statische MIC-meting kunnen time-kill experimenten subtiele veranderingen in groeidynamiek zichtbaar maken, zoals tijdelijke overlevingsstrategieën of het opnieuw opkomen van groei door het ontstaan van resistentie (**Hoofdstuk 1, Figuur 1**).

De bacteriedichtheid over tijd uit het time-kill experiment kan vervolgens worden gebruikt als input voor **farmacodynamische (PD) modellen**. Deze wiskundige modellen beschrijven de relatie tussen concentratie van het antibioticum en het effect op de bacteriedichtheid (**Box 4**). De parameters uit het model geven daarmee een kwantitatieve beschrijving van de **concentratie-effectrelatie** van

het antibioticum en de bacterie. Op deze manier kunnen ook subtiele veranderingen in groeidynamiek uit het time-kill experiment worden meegenomen bij het vergelijken van antibiotica of groeicondities.

Box 4. Farmacometrie

Farmacometrie is het vakgebied dat focust op het kwantitatief modelleren en analyseren van de werking van geneesmiddelen in het lichaam. Het combineert farmacokinetiek en farmacodynamiek met statistiek en wiskunde om te begrijpen, voorstellen en optimaliseren hoe medicijnen werken bij patiënten. In antibioticastudies wordt farmacometrie gebruikt om de juiste dosis en toedieningsfrequentie te bepalen die nodig zijn om een zo effectief mogelijk effect op de bacteriën te bereiken.

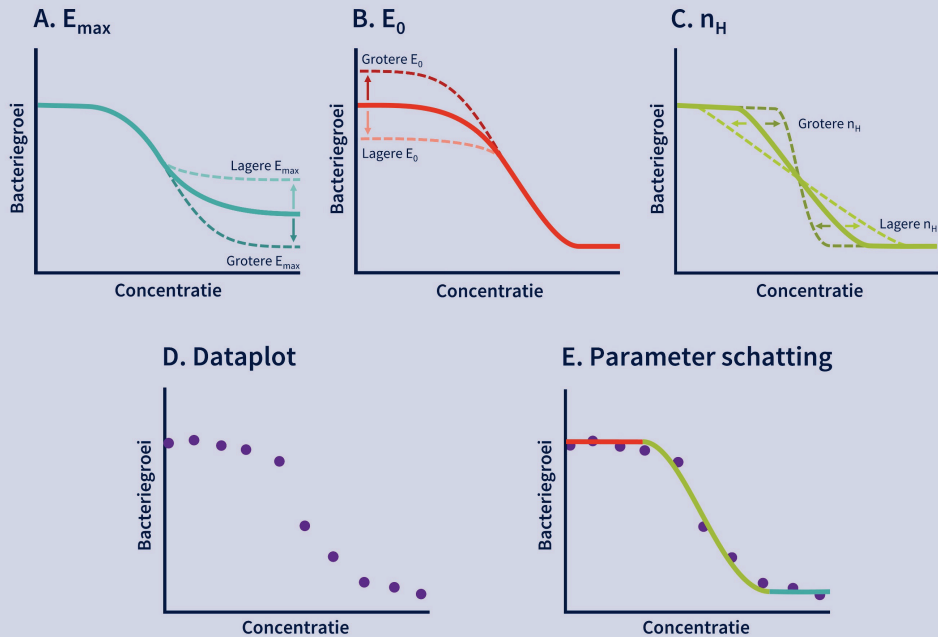
Farmacokinetiek (PK) beschrijft hoe het lichaam invloed uitoefent op de concentratie van een geneesmiddel. Denk hierbij aan processen zoals de opname in de darmen, de verdeling binnen het lichaam, de afbraak van het middel en de uitscheiding ervan. In een PK-model worden deze processen wiskundig weergegeven met parameters die de concentratie beïnvloeden. Op basis hiervan kan het verloop van de geneesmiddelconcentratie tijdens een behandeling worden gesimuleerd en weergegeven in een concentratie-tijd grafiek.

Farmacodynamiek (PD) beschrijft het effect van het geneesmiddel op het lichaam of micro-organismen. In dit proefschrift is het effect de afname van bacteriegroei. Door meerdere time-kill experimenten uit te voeren met verschillende concentraties kan een verschil in effect bepaald worden. De concentratie-effect relatie wordt vervolgens met een wiskundig model beschreven, zodat ook het effect bij concentraties die niet zijn getest gesimuleerd kunnen worden. In dit proefschrift wordt een $E_{\max}$ model gebruikt om de concentratie-effect relatie te beschrijven (**vergelijking 1**).

$$Bacteriegroei([AB]) = E_{\max} + \frac{E_0 - E_{\max}}{1 + e^{n_H(\log([AB]) - \log(EC_{50}))}} \quad (1)$$

Een $E_{\max}$ model beschrijft hoe sterk het effect is van een antibioticum door de relatie te bepalen tussen 2 asymptoten. Het maximale effect van het antibioticum wordt beschreven in de onderste asymptoot, de $E_{\max}$ (**Figuur 2A**). De concentraties waarbij nog geen effect waarneembaar is wordt beschreven door de bovenste asymptoot, de E_0 (**Figuur 2B**). En het

effect-concentratie tussen de asymptoten door de Hill coëfficiënt, de n_H (**Figuur 2C**). De computer berekent de modelparameters die het beste passen bij de metingen uit het time-kill experiment, door de fout tussen model en data zo klein mogelijk te maken (**Figuur 2D-E**).



Figuur 2. Het beschrijven van de concentratie-effect relatie met het E_{max} model. De figuren A-E zijn een concentratie-effect plot met op de Y-as het effect aangegeven met bacteriegroei en op de x-as de concentratie van het antibioticum. Bij een hogere concentratie van het antibioticum zal de bacteriegroei verminderen, waardoor het effect groter is.

Om tijdens deze laboratorium **in vitro** experimenten beter de omstandigheden in het lichaam na te bootsen, is in 2007 een **synthetisch CF-sputum medium (SCFM)** ontwikkeld. Dit kweekmedium lijkt qua nutriënten op het mucus van CF-patiënten. *P. aeruginosa* gedraagt zich in SCFM gelijkwaardiger aan hoe ze zich in het lichaam gedragen dan wanneer ze in standaard laboratorium media worden gekweekt. Omdat *P. aeruginosa* anders gedraagt in de verschillende media, reageren ze ook anders op antibiotica. Hoewel SCFM dus beter lijkt op de echte situatie in de longen, geeft een MIC-test met slechts één soort kweekmedium nog steeds geen volledig beeld. In de longen van CF-patiënten zijn namelijk veel verschillende soorten voedingsomgevingen aanwezig.

Daarnaast kan de invloed van voeding op het gedrag van de bacterie en de reactie op antibiotica beter worden onderzocht met behulp van PD modellen (**Hoofdstuk 1, Figuur 2**). De veranderingen in antibiotica gevoeligheid worden vaak grof geclassificeerd op basis van de PD veranderingen. Zo wordt bijvoorbeeld groei tijdens antibiotica behandeling geclassificeerd als resistentie, terwijl veranderingen in de dynamiek van bacteriedoding vaak worden toebedeeld aan transiënte mechanisme. Maar deze veranderingen in antibiotica PD zijn het gevolg van ingewikkelde veranderingen in onderliggende cel-processen die zich uiten in de fenotypische veranderingen. Omdat de voedingsomgeving ook effect heeft op dezelfde cel-processen, speelt dit ook een rol op het fenotype van de bacterie in het vormen de PD uitkomsten.

De veranderingen die optreden in bacteriën tijdens een antibioticabehandeling variëren van aanpassingen in het DNA tot veranderingen in de stofwisseling. Het bestuderen van deze processen is belangrijk om beter te begrijpen waarom antibiotica soms wel en soms niet goed werken. Uiteindelijk helpt dit om PD onderzoeksresultaten beter te vertalen naar effectieve behandelstrategieën in de kliniek. Dit onderzoek gaat enerzijds om het genetisch in kaart brengen van mutaties in bacteriën die de gevoeligheid voor antibiotica beïnvloeden. Maar ook om het toepassen van andere omics-technieken zoals transcriptomics, proteomics en **metabolomics** om fenotypische veranderingen in bacteriën te volgen (**Box 5**). Vooral bij transiënte veranderingen in antibioticagevoeligheid zijn deze technieken waardevol, bijvoorbeeld als reactie op verschillen in nutriënten. Door de resultaten van deze omics-methodes te combineren, ontstaat een beter beeld van hoe de omgeving en de bijbehorende bacteriële aanpassingen de werking van antibiotica beïnvloeden op moleculair niveau. Dit inzicht maakt het mogelijk om laboratoriummodellen op specifieke onderdelen realistischer te maken, zodat bacteriën onder testomstandigheden meer lijken op hoe ze zich gedragen in het lichaam van de patiënt. Daardoor kunnen behandelingen beter afgestemd worden op specifieke ziektebeelden. Daarnaast is het ontwikkelen van realistische modellen belangrijk voor het testen van nieuwe antibiotica. Of een nieuw middel kans maakt op verdere klinische ontwikkeling, hangt sterk af van hoe goed het werkt in laboratoriumtests. Een testomgeving die beter aansluit bij de situatie in het lichaam bij moeilijk te behandelen infecties verhoogt de voorspellende waarde van zulke experimenten.

Voor luchtweginfecties bij CF-patiënten is de kennis voor het verbeteren van laboratoriummodellen ook belangrijk. De longomgeving bij CF wordt gekenmerkt door een unieke samenstelling van nutriënten, terwijl *P. aeruginosa* het vermogen om zich flexibel fenotypisch aan te passen. Deze complexe wisselwerking vraagt om een gestructureerde en stapsgewijze benadering. Die begint bij het systematisch onderzoeken van afzonderlijke omgevingsfactoren. Daarmee wordt de basis gelegd voor beter inzicht in hoe de CF-longomgeving, het bacteriële metabolisme en antibiotica elkaar beïnvloeden.

Box 5. -Omics benadering

"Meten is weten" is het uitgangspunt van de -omics-technieken. Het woord -omics verwijst naar een groep onderzoeksvelden die zich richten op het in kaart brengen van verschillende lagen binnen een cel. Elk van deze velden bestudeert een ander aspect van hoe een cel werkt. De naam van deze onderzoeksgebieden eindigt op -omics, zoals genomics, transcriptomics, proteomics, en metabolomics (**Tabel 1**). Door deze lagen systematisch te meten, kunnen onderzoekers beter begrijpen hoe een cel zich aanpast aan zijn omgeving, bijvoorbeeld bij stress of blootstelling aan antibiotica.

Tabel 1. Voorbeelden van -omics velden.

Veld	Wat het meet	Toepassing
Genomics	Het volledige DNA	Identificeert genetische veranderingen, zoals mutaties of resistentiegenen
Transcriptomics	De RNA-moleculen die worden afgelezen van het DNA	Laat zien welke genen op een bepaald moment actief zijn
Proteomics	De eiwitten die in de cel worden geproduceerd	Toont welke celprocessen en functies actief zijn
Metabolomics	Kleine moleculen (metabolieten) die ontstaan uit de stofwisseling	Geeft inzicht in de metabole activiteit van de cel

8.2. Doel van dit proefschrift

De impact van de fenotypische flexibiliteit van *P. aeruginosa* en de uiteenlopende micro-omgevingen in de CF-longen op de werking van antibiotica en het ontstaan van resistentie is nog onvoldoende begrepen. Om de behandelstrategieën met antibiotica voor chronische luchtweginfecties door *P. aeruginosa* bij CF-patiënten te verbeteren, is het essentieel om beter te begrijpen hoe de infectieuze micro-omgeving de respons op antibiotica vormgeeft. In dit proefschrift stellen wij de hypothese dat nutriëntcondities een centrale rol spelen in veranderingen in antibiotica PD en de evolutie van antibioticaresistentie beïnvloeden. Hierdoor hebben de nutriëntcondities uiteindelijk invloed op het therapeutisch resultaat.

8.3. Aanpassingen aan de verschillende omgevingen in de CF-long

Om onze huidige kennis met betrekking tot de hypothese van dit proefschrift samen te vatten, biedt **Hoofdstuk 2** (Sectie I) een uitgebreid overzicht van de metabole aanpassingen van *P. aeruginosa* aan de uiteenlopende nutriënt-niches in de longen van CF-patiënten. Deze metabole aanpassingen van de bacterie bepaalt onder meer de groeisnelheid, energiehuishouding, en hoeveelheid stress in de cellen. Deze factoren hebben allemaal invloed op de gevoeligheid voor antibiotica. In dit kader spelen de diverse micro-omgevingen met verschillende nutriënten en verschillen in zuurstofconcentraties een centrale rol in de werking van antibiotica behandelingen. Deze verschillen in micro-omgevingen worden nog verder versterkt binnen de voedingsstofgradiënten binnen biofilm-aggregaten van *P. aeruginosa*. Door deze verschillen in micro-omgevingen ontstaat er een metabole heterogeniteit binnen de infectie.

Om te begrijpen wat het effect is van de metabole heterogeniteit tussen *P. aeruginosa* cellen op antibiotica gevoeligheid is het belangrijk om de metabole flexibiliteit te begrijpen. *P. aeruginosa* is in staat om uiteenlopende substraten te benutten, zoals aminozuren en vetzuren, en kan moeiteloos schakelen tussen aerobe respiratie, fermentatie en denitrificatie om de energieproductie op peil te houden onder wisselende omstandigheden. Deze metabole plasticiteit beïnvloedt de gevoeligheid voor verschillende klassen van

antibiotica, waaronder aminoglycosiden, fluoroquinolonen, β -lactams en polymyxines. Deze antibioticaklassen zijn elk op een manier afhankelijk van specifieke metabolische toestanden om effectief te zijn. Naast dat *P. aeruginosa* het flexibele metabolisme gebruikt voor het aanpassen verschillende omstandigheden, kan het metabolisme ook actief herstructureerd worden om de effectiviteit van antibiotica vermindert.

Het begrijpen van deze metabole responsen in fysiologisch relevante contexten is cruciaal voor het ontwikkelen van effectievere en meer gepersonaliseerde antibioticabehandelingen. Hiervoor moet wel benoemd worden dat er binnen een patiënt (intra-) als tussen patiënten (inter-) aanzienlijke variatie is in de micro-omgevingen. Factoren zoals constructie van de longen, ziektebeelden die samengaan met CF, en het CF-genotype zorgen voor substantiële verschillen in nutriëntbeschikbaarheid, en dus in antibioticagevoeligheid. Daarom vereist vooruitgang het integreren van klinische inzichten met geavanceerde *in vitro*-modellen en multi-omics benaderingen die de complexiteit van de CF-long realistisch benaderen.

Op basis van de huidige stand van kennis en het benoemen van de hiaten beschreven in dit hoofdstuk is het onderzoek in dit proefschrift opgebouwd. Het onderzoek is vervolgens verdeeld in het effect van nutriënten op antibioticagevoeligheid (Sectie II) en als sturende factor in antibiotica resistentie-evolutie (Sectie III).

8.4. Voedingsstoffen beïnvloeden het effect van antibiotica

Nutriënten en zuurstof behoren tot de meest voor de hand liggende aanjagers van metabole processen, en deze processen worden in toenemende mate in verband gebracht met de werking van verschillende klassen antibiotica. Toch is de regulerende rol van specifieke omstandigheden die kenmerkend zijn voor de CF-long nog onvoldoende begrepen.

In **Hoofdstuk 3** is onderzocht hoe specifieke nutriënten de antibioticagevoeligheid van *P. aeruginosa* beïnvloeden door in een basaal basis

medium telkens één nutriënt toe te voegen. Door time-kill experimenten met een bioluminescente stam van *P. aeruginosa* uit te voeren hebben we populatie dynamiek onder veel omstandigheden kunnen analyseren.

Met behulp van PD modellering werden nutriënt-afhankelijke, antibioticaklasse-specifieke verschuivingen aangetoond. Deze patronen wijzen op onderliggende biochemische mechanismen en gaan verder dan de klassieke verklaring dat een lagere metabolische activiteit resulteert in lagere gevoeligheid. Daarnaast suggereert de afwezigheid van duidelijke verschillen in groeisnelheid tussen de verschillende nutriëntcondities dat de gevoeligheidsverandering niet primair door groeisnelheid wordt bepaald. Ook hebben *in vitro* PK-PD-simulaties lieten zien dat nutriënten de verwachte behandeluitkomst veranderd.

Hoewel de gebruikte *in vitro*-modellen beperkt zijn vergeleken met de complexiteit van klinische infecties, vormen deze resultaten een waardevolle stap vooruit. Ze vergroten ons begrip van de gepersonaliseerde aard van de behandeling van *P. aeruginosa*-infecties, die sterk worden beïnvloed door interacties met de lokale micro-omgeving.

Hoofdstuk 4 beschrijft hoe zuurstofbeschikbaarheid de antibioticagevoeligheid van *P. aeruginosa* beïnvloedt. In plaats van uitsluitend te focussen op acute reacties op anoxie, beoordeelde de studie ook hoe langdurige anoxische blootstelling (<1% zuurstof gedurende 22 dagen) de antibioticagevoeligheid beïnvloedt. Met time-kill experimenten werd deze anoxische geconditioneerde stam met de moederstam vergeleken. De effecten bleken antibioticum specifiek en de gevoeligheidsprofielen veranderden sterk na langdurige anoxie. Daarnaast liet de anoxische geconditioneerde stam ook zien dat er blijvende fysiologische aanpassingen waren onder normale zuurstofcondities. Dit onthult beperkingen van standaard *in vitro* experimenten en benadrukt de noodzaak voor kweekcondities die anoxische infectiecondities beter nabootsen. Hoewel het proefschrift vooral gericht op is CF, zijn deze inzichten waarschijnlijk ook relevant voor andere infectielocaties zoals in de urineweg, COPD-slijmproppen.

Samenvattend laat Sectie II zien dat metabole regulatie bepalend is voor de antibioticagevoeligheid van *P. aeruginosa* onder uiteenlopende nutriënt- en zuurstofcondities. Zelfs een enkele nutriëntverandering kan de gevoeligheid

substantieel verschuiven, afhankelijk van de combinatie nutriëntconditie-antibioticaklasse. Meer nutriënten betekent niet automatisch betere werking omdat de metabole flexibiliteit beschermende routes kunnen activeren die antibiotica tegenwerken. Door deze metabole regulatiesystemen zal het mixen van nutriënten in de geteste media niet per se additieve effecten opleveren. Dergelijke inzichten benadrukken het belang van het ontrafelen van de biochemische basis van nutriënt-gestuurde antibioticagevoeligheid en benadrukken de noodzaak van integratieve, fenotype-gerichte -omics benaderingen. Metabolomics en proteomics zijn krachtige technieken die subtiele verschuivingen in intracellulaire metabolietconcentraties, enzymniveaus kunnen vastleggen om metabole herconfiguraties tijdens antibioticabehandeling in kaart te brengen.

Voor deze biochemische benadering in toekomstig onderzoek zijn klinisch representatieve omgevingen essentieel. Naast de incrementele aanpak van het onderscheiden van de effecten van individuele nutriënten, is gedetailleerd onderzoek naar de nutriëntsamenstelling van de infectieuze omgeving essentieel. Daarbij moeten ook de interacties met andere cellen die het bacteriële metabolisme moduleren meegenomen worden. Door voort te bouwen op deze experimentele data kan toekomstig onderzoek nauwkeuriger rekening houden met de complexe nutritionele en metabole landschappen die *P. aeruginosa* benut om de antibioticagevoeligheid te beïnvloeden.

8.5. Nutriënten sturen de evolutie van antibioticaresistentie

Fenotypische veranderingen spelen een centrale rol spelen in het aanpassingsvermogen van bacteriële populaties en daarom de natuurlijke selectie aansturen. In deze context gaan populaties die zich aan omgevingsverstoringen aanpassen met een voortplantingsvoordeel gaan domineren. Tijdens de druk van antibiotica kunnen erfelijke mutaties die de gevoeligheid sterk verminderen zich snel verspreiden. Echter gaat dit gepaard met ingrijpende veranderingen in essentiële cellulaire processen die de fitheid van de cellen verlagen. Daarom gaan de resistentie-mutaties vaak samen met ondersteunende aanpassingen om dit voortplantingsnadeel verminderen. Metabole aanpassingen zijn hier onderdeel van, als de voedingsstoffen in de

omgeving dit toelaten. Daarnaast wordt het steeds duidelijker dat metabolisme-gerichte mutaties ook een klasse van resistentiemechanismen vormen. Hierdoor kunnen de nutriënt- en stofwisselingscontext de evolutie van resistentie actief mede sturen.

Hoofdstuk 5 beschrijft de metabole aanpassingen tijdens resistentie-evolutie en hoe metabolomics kan helpen die te beter te begrijpen. Omdat één methode niet alle kleine moleculen kan meten, vraagt metabolomics om gerichte keuze van analysetechnieken en monstervoorbereiding passend bij de onderzoeksvraag. Omdat het metabolisme sterk kan verschillen tussen bacteriestammen en aanpassingen per antibioticaklasse anders zijn, maakt dit de keuze wel ingewikkeld. Daarnaast is de keuze nog beperkt, wat wordt weergegeven door de 23 geïncubeerde studies in de review uiteenlopende bacteriën en antibioticaklassen bestrijken. Dit benadrukt dat er systematischer metabolomics-onderzoek nodig is die vooral focussen op een juiste combinatie van biologisch vraagstuk en analytische methodologie. Uiteindelijk kan de rol van metabolisme in antimicrobiële resistentie beter te verklaard worden met deze analytische methodes.

In **Hoofdstuk 6** is getest hoe de resistentie-evolutie van *P. aeruginosa* tijdens adaptieve laboratoriumevolutie plaatsvindt in kweekmedium met een enkele nutriënt. Na deze evolutieperiode van 10 dagen zijn de fenotypische en genotypische veranderingen onderzocht. De geëvolueerde lijnen vertoonden significante verschillen in MIC tussen de verschillende enkelvoudige-nutriëntcondities. In het experiment werden ook mutaties gedetecteerd die uniek waren voor specifieke evolutiecondities, maar slechts zes mutaties in totaal over de 15 onderscheiden condities waarvan het DNA was gesequencet. Ook is er maar een kleine set van mutatiepatronen gevonden die de evolutiecondities betrouwbaar van elkaar onderscheidde. De smalle bandbreedte van deze mutatieverandering loopt parallel aan de vrijwel identieke groeisnelheidsverschuivingen na evolutie binnen elke antibioticaklasse. Deze beperkte variatie in fitness stuurt populaties richting een beperkte set genotypen.

De diversiteit manifesteerde zich dus vooral als MIC-verschuivingen, niet als uitgesproken mutatieprofielen. Omdat *P. aeruginosa* langdurig in CF-longen kan persisteren, kunnen zulke fenotypische verschuivingen die al na 10 dagen

optreden op termijn ook vestigen in stabiele genotypische verschillen. Maar met deze kennis dat enkele nutriënten de resistentieontwikkeling veranderen kan een volgende stap om te onderzoeken hoe verschillende infectierelevante nutriëntcondities de ontwikkeling van resistentie sturen genomen worden.

Samenvattend liet Sectie III zien dat metabole processen een cruciale rol spelen in de ontwikkeling van antibioticaresistentie en dat nutriënten een regulerende invloed uitoefenen ondanks de metabole veelzijdigheid van *P. aeruginosa*. Echter is de invloed van de samenstelling van het kweekmedium slechts een klein gedeelte van de complexe evolutionaire trajecten die in de CF-long worden waargenomen. Niettemin wijzen de resultaten erop dat de invloed van de nutriëntomgeving antibioticumafhankelijk is. Dit benadrukt diepgaander onderzoek naar de onderliggende aanpassingen die tijdens antibioticablootstelling optreden.

8.6. Vervolgstappen

Antibiotica zijn onmisbaar in de dagelijkse gezondheidszorg om infecties te bestrijden, toch zijn er groepen patiënten waarbij infectieziekten nog een groot probleem veroorzaken. Daarnaast is fungeert de lage kans van slagen van de antibioticabehandeling in de patiëntengroep als een reservoir voor antibioticaresistente stammen. Het bestuderen van de bacteriële aanpassingen in deze patiëntengroep geeft cruciale informatie over de uiteenlopende manieren waarop antibiotica therapieën kunnen falen. De luchtwegen van CF-patiënten vormen zo'n unieke omgeving. In deze omgeving groeit de doorgaans onschuldige bacterie *P. aeruginosa* uit tot een van de meest uitdagende infecties om te behandelen.

Een sleutel factor van *P. aeruginosa*-infecties in de CF-long is de specifieke nutriëntomgeving. Dit is een aspect dat vaak over het hoofd wordt gezien. De nutriëntomgeving kan het bacteriële gedrag diepgaand beïnvloeden en leiden tot misinterpretatie van gevoeligheidstesten wanneer deze met standaard kweekmedia worden uitgevoerd. Daarom is het essentieel om te focussen op: (I) het in kaart brengen van fysiologisch relevante infectielocaties, (II) het onderzoeken van de invloed van nutriënten op antibioticagevoeligheidstesten, (III) het vastleggen van door nutriënten geïnduceerde veranderingen in

antibioticagevoeligheid, en (IV) het ontrafelen van de onderliggende biologische mechanismen die verantwoordelijk zijn voor veranderingen in het antibiotisch effect.

Het beter in kaart brengen van welke voedingsstoffen in welke delen van de CF-long aanwezig zijn is belangrijk omdat dit proefschrift laat zien dat voedingsstoffen een grote rol spelen de PD van antibiotica. Het is daarbij goed om te beseffen dat niet alle monsters die uit de CF-long worden genomen dezelfde informatie geven. Sputum is het makkelijkst te verzamelen, maar bestaat uit materiaal uit verschillende delen van de long. Hierdoor geeft het alleen een gemiddeld beeld van de chemische samenstelling. Andere methoden die vocht verzamelen van het longoppervlak met speciale instrumenten zijn specifieker, maar ook lastiger uit te voeren met een minder nauwkeurige bepaling van de voedingsstoffen. Daarnaast zijn er ook biofilms, die binnen de biofilm-structuur verschillende micro-omgevingen hebben.

In de oncologie is veel vooruitgang geboekt in het begrijpen van zulke complexe structuren door het gebruik van ‘tumoratlassen’. In de tumoratlassen wordt informatie gecombineerd over celtypes, genetische veranderingen en de lokale omgeving. Deze kennis wordt inmiddels ook gebruikt om patiënten gericht te behandelen. Voor infecties in de CF-long zouden we op eenzelfde manier ook met geïntegreerde kaarten van de infectieomgeving gaan werken. Hierbij kunnen moleculaire, microbiële en klinische gegevens worden gecombineerd voor het onderscheiden van verschillende typen longomgevingen. Deze onderscheiding tussen patiënten is de basis om het effect van voedingsstoffen op de werking van antibiotica te begrijpen.

Om beter te voorspellen hoe antibiotica werken in de CF-long, moeten de in vitro testen aangepast worden om de infectieomstandigheden beter te imiteren. Dit proefschrift laat zien dat zelfs kleine veranderingen in de voedingsstoffen de effectiviteit van antibiotica beïnvloeden. Een volledige hervorming van klinische testmethodes is lastig, maar stappen vooruit zijn mogelijk. Hierbij is het in eerste instantie noodzakelijk om de bovengenoemde omgevingen goed in kaart te brengen. Maar er kunnen al veranderingen gemaakt worden zoals het testen van bacteriën uit verschillende delen van de long, of door ook anaerobe condities te gebruiken voor een van origine aerobe bacterie als *P. aeruginosa*.

Bacteriestammen passen zich door langdurige blootstelling aan condities aan, waardoor de stammen moeilijk te kweken zijn in het laboratorium. Toch kunnen deze gespecialiseerde stammen een factor spelen in therapiefalen wanneer ze in de niche omgeving van de patiënt zitten.

Om beter te begrijpen hoe voedingsstoffen de werking van antibiotica beïnvloeden, is in dit proefschrift gekozen voor time-kill experimenten en farmacodynamische modellen. De resultaten uit dit proefschrift laten zien dat een standaard MIC-test grote verschillen in groeisnelheid en afsterven van bacteriën kan verbergen. Daarom is het belangrijk om vervolgonderzoek naar de invloed van voedingsomstandigheden kritisch te kijken naar uiteindelijke read-out van de experimenten. Zo heeft ook de sigmoïde concentratie-effectcurve die in dit proefschrift gebruikt is om combinaties van antibiotica en voedingsstoffen in kaart te brengen ook beperkingen. De effectdata die zijn gebruikt voor het ontwerp van het farmacodynamisch model zijn verkregen uit een statische time-kill experimenten. Deze methodologische aanpak kan bacteriële aanpassingen tijdens de blootstelling aan antibiotica slecht nauwkeurig vastleggen. Deze beperkingen benadrukken de noodzaak van dynamische *in vitro* kweeksystemen, die beter inzicht kunnen geven in tijdsafhankelijke farmacodynamische kenmerken zoals veranderende groeisnelheden, dodingskinetiek en resistentieontwikkeling.

Een belangrijk inzicht uit dit proefschrift is dat het effect van antibiotica sterk afhangt van de combinatie met specifieke voedingsstoffen. Zulke voedingsstof-antibioticumcombinaties kunnen unieke aanpassingen in bacteriën veroorzaken, die niet altijd verklaard worden door bekende resistentie-mutaties in genetische databanken. Om deze mechanismen beter te begrijpen zijn technieken zoals transcriptomics, proteomics en metabolomics nodig. Deze brengen veranderingen in genexpressie, eiwitten en metabolieten in kaart en geven zo beter inzicht in hoe bacteriën reageren op antibiotica. In Hoofdstuk 5 is bijvoorbeeld beschreven hoe metabolomics kan worden ingezet om antibiotica-gevoeligheid te verbeteren door gerichte nutriënten toe te voegen tijdens de behandeling.

Een andere veelbelovende techniek is fluxomics, die laat zien hoe metabolieten en energie door cellen stromen. Hoewel dit waardevolle inzichten

oplevert tijdens stress of antibioticadruk, is de brede toepassing op klinische stammen beperkt omdat de modellen te complex en specifiek zijn. Om de extrapolatie tussen de verschillende stammen te verbeteren kunnen geavanceerde computermodellen gebruikt worden die meerdere -omics datasets combineren. Deze modellen geven een breder beeld van de veranderingen over tijd zoals nutriëntenschommelingen en resistentieontwikkeling. Ook zijn er single-cell technieken in opkomst om verschillen binnen bacteriepopulaties te begrijpen. Deze technieken zijn waardevol, maar moeten ingebed zijn in bredere analyses om goed te interpreteren hoe bacteriële heterogeniteit bijdraagt aan behandelresistentie.

7.3. Conclusies

Concluderend laat dit proefschrift zien dat de beschikbaarheid van voedingsstoffen en zuurstof een grote invloed heeft op hoe *P. aeruginosa* zich gedraagt en de antibiotica farmacodynamiek. Een antibioticabehandeling is dus niet alleen afhankelijk van het medicijn en de bacterie, maar ook van de omgeving waarin de bacterie zich bevindt. Dit geldt vooral voor complexe infecties zoals in de luchtwegen van CF-patiënten.

De bevindingen in dit onderzoek vormen een belangrijke stap naar het verbeteren van antibioticatesten in het laboratorium, door daarbij beter rekening te houden met realistische omstandigheden zoals zuurstofgebrek of specifieke nutriënten. De volgende uitdaging is om deze kennis te koppelen aan de situatie in het lichaam van de patiënt, zodat behandelingen beter afgestemd kunnen worden op de plek van de infectie. Zo komen we dichterbij antibiotica behandelingen op maat.