

Abstract

Project Code: MRG5980045

Project Title: The effects of modified-antimicrobial peptides and in combination with conventional antibiotic against *Burkholderia pseudomallei* biofilm

Investigator: Asst.Prof.Sakawrat Kanthawong

E-mail Address: Sakawrat@kku.ac.th

Project Period: 2 years (2 May 2016 – 1 May 2018)

Abstract:

Melioidosis is a severe disease caused by *Burkholderia pseudomallei*. The growing *B. pseudomallei* in biofilm has been reported to induce resistance to several conventional antibiotics, a phenomenon that may be related to relapse cases in melioidosis patients. The aim of this study was to compare the antibiofilm activity of human cathelicidin antimicrobial peptides (LL-37, LL-31) and their D-enantiomeric form (D-LL-37, D-LL-31) with ceftazidime (CAZ) against 3 isolates of *B. pseudomallei* 1026b, H777 and biofilm mutant M10. Antibiofilm assay revealed that, a truncated variant of LL-37 lacking the six C-terminus residues in D-enantiomeric form, D-LL-31, revealed a strongest killing activity against all isolates of *B. pseudomallei* in dose-dependent manner. Moreover, the IC_{50} values of D-LL-31 was further investigated compared with CAZ against biofilm form of those isolates. The results showed that IC_{50} values of D-LL-31 were ranging from 1.07-5.55 μ M, while, IC_{50} values of CAZ was higher than D-LL-31, about 45, 60, and 240 folds against biofilm form of *B. pseudomallei* M10, H777, and 1026b, respectively. In addition, D-LL-31/CAZ combination showed synergistic effects on biofilm of all isolates tested in static condition. Moreover, the D-LL-31/CAZ combination was applied to biofilm of *B. pseudomallei* under flow conditions and caused disruption of the biofilms. These results indicate that D-LL-31/CAZ combination not only disrupted preformed-biofilm but also exhibited potent killing activity against *B. pseudomallei* in biofilm form. Thus D-LL-31/CAZ combination

should be considered to enhance the efficacy of currently antibiotic against *B. pseudomallei* which is finally benefited to melioidosis patients.

Keywords: Anti-biofilm peptides, LL-37, LL-31, D-enantiomer peptide, *Burkholderia pseudomallei*

บทคัดย่อ

เมลิออยโดสิส เป็นโรคร้ายแรงที่เกิดจากการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* มีการรายงานว่า การสร้างฟิล์มชีวภาพของเชื้อ *B. pseudomallei* ส่งผลต่อการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและยังเกี่ยวข้องกับการกลับเป็นซ้ำในผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกลุ่ม Cathelicidin (LL-37, LL-31) และเปปไทด์ดัดแปลง (D-LL-37, D-LL-31) ในการทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* ในสภาวะที่สร้างฟิล์มชีวภาพ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. pseudomallei* 1026b, H777 และ biofilm mutant M10 โดยเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ ceftazidime ผลการทดลองพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพ LL-37 ชนิดที่ถูกดัดแปลงโดยใช้กรดอะมิโนในรูป D-enantiomer แทนและมีการตัดกรดอะมิโนที่ปลายด้าน C ออก 6 ตัว D-LL-31 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการทำลายเชื้อในสภาวะที่สร้างฟิล์มชีวภาพ แบบเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ยิ่งไปกว่านั้น การศึกษาหาค่าความเข้มข้นของเปปไทด์ต้านจุลชีพและยาปฏิชีวนะ ceftazidime ที่ทำลายเชื้อได้ 50% (Inhibition concentration 50) พบว่า ค่า IC_{50} ของ D-LL-31 ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 1.07-5.55 ไมโครโมลาร์ ขณะที่ IC_{50} ของยาปฏิชีวนะ ceftazidime สูงกว่า D-LL-31 อยู่ที่ 40, 60 และ 240 เท่า ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* 1026b, H777 และ biofilm mutant M10 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพ D-LL-31 เสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะ ceftazidime ในการลดปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ของฟิล์มชีวภาพ *B. pseudomallei* ภายใต้อิทธิพลของเครื่อง BioFlux ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพเพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า D-LL-31 เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* ในสภาวะที่สร้างฟิล์มชีวภาพ ทั้งแบบใช้อย่างเดียวและใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ceftazidime ดังนั้น D-LL-31 จึงควรนำไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อ *B. pseudomallei* ในสภาวะที่สร้างฟิล์มชีวภาพสำหรับผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส

คำสำคัญ: เปปไทด์ต้านฟิล์มชีวภาพ, LL-37, LL-31, D-enantiomer peptide, *Burkholderia pseudomallei*