

De invloed van biofilms op wondgenezing

E. Lenselink*

Het normale wondgenezingsproces bestaat uit hemostase, inflammatie, proliferatie en remodelering (17,44). Tijdens de inflammatoiefase worden bacteriën gefagocyteerd door neutrofielen en macrofagen (17). Deze inflammatoire reactie is een essentieel onderdeel van het genezingsproces. Neutrofielen elimineren bacteriën door middel van fagocytose en de afgifte van zuurstofradicalen. Vervolgens worden neutrofielen afgebroken door de macrofaag (22). Het wordt verondersteld dat biofilms het wondgenezingsproces vertragen door het immuunsysteem van de gastheer te beïnvloeden en een hyper inflammatoire reactie uit te lokken (3,46).

Biofilms

Biofilms zijn alom vertegenwoordigd in de natuur (4) en worden gedefinieerd als door een matrix omgeven bacteriële populaties die aan elkaar en/of aan een oppervlak verbonden zijn (9). Deze zogenaemde exopolysaccharide (EPS) matrix wordt geproduceerd door bacteriën (21) en bestaat uit polysaccharides, nucleïnezuren, lipiden, proteïnen, DNA en cellulair debris (1,15,46). Biofilms kunnen bestaan uit een of meerdere soorten bacteriën. De meest voorkomende bacteriën in wonden zijn *Pseudomonas aeruginosa* en *Staphylococcus aureus* (14,21,23). 60% van de chronische wonden bevat een biofilm in tegenstelling tot slechts 6% van de acute wonden (23).

De vorming van een biofilm bestaat uit verschillende fasen

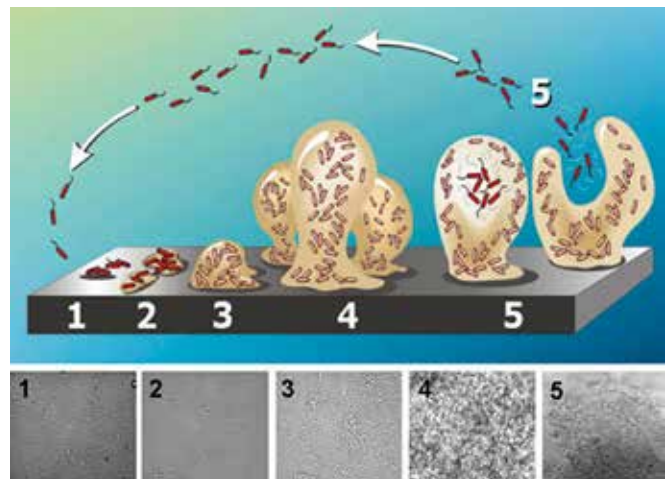
Een biofilm beschermt bacteriën tegen de afweer van de gastheer en tegen antibiotica (19,34). Biofilms spelen een belangrijke rol in het ziekteproces van cariës, urineweginfecties, chronische bronchitis bij cystic fibrosis (CF), kolonisatie van medische implantaten en endocarditis (15). Daarnaast wordt gedacht dat bacteriën in biofilms, in tegenstelling tot losse bacteriën (35), infecties veroorzaken en de wondgenezing vertragen (6,10,23,34,40). Een wondinfectie treedt op wanneer microflora zich vermeerderen zonder dat de gastheer dit kan controleren (4).

Het kenmerk van chronische wonden is de aanwezigheid van verhoogde cytokinen, matrix metalloproteases (MMP's) en cellulair activiteit (3). De wonden zijn 'vastgelopen' in de inflammatoire fase van de wondgenezing, welke wordt gekarakteriseerd door de continue input van neutrofielen in het wondbed. Neutrofielen geven op hun

beurt cytotoxische enzymen, vrije zuurstofradicalen en inflammatoire cellen af, die aanzienlijke schade veroorzaken aan het lichaamseigen weefsel (3,16,29). Wonden blijven in de chronische fase door de aanwezigheid van grote hoeveelheden bacteriën (3). Hoe bacteriën precies de vertraagde wondgenezing veroorzaken is een voortdurend debat (36). Dit artikel beschrijft het ontstaan en de opbouw van een biofilm en de invloed hiervan op wondgenezing.

Vorming van een biofilm

Biofilmformatie start in reactie op de omgeving van de bacteriën en is afhankelijk van voedsel, temperatuur, osmolariteit, pH, zuurstof en ijzer (31). Bacteriën hebben adhesinen die specifiek matrixcomponenten van de gastheer herkennen (11) en zich hiermee kunnen binden aan de extracellulaire matrixcomponenten, zoals collageen, fibronectine en vironectine (46). Tijdens het wondgenezingsproces zijn deze componenten blootgesteld aan de omgeving en daardoor een ideaal oppervlak voor bacteriën voor aanhechting.



Figuur 1. De vorming van biofilm

De vorming van een biofilm bestaat uit verschillende fasen: omkeerbare aanhechting, onomkeerbare aanhechting, eerste en tweede rijpingsfase en verspreiding (32,38). Een rijpe biofilm heeft een structuur die vergelijkbaar is met pilaren en paddenstoelen met waterkanalen tussen de bacteriegroepen (41) (figuur 1). Twee belangrijke stappen in de ontwikkeling van een biofilm zijn toegenomen synthese van de EPS en de ontwikkeling van resistentie tegen antibiotica. *P.aeruginosa* produceert een alginaat welke een belangrijk onderdeel van de EPS is, en waarschijnlijk is dit een belangrijke factor in de ontwikkeling vorming resistentie van *P. aeruginosa* (7).

Wonden met P.aeruginosa biofilms bevatten een aanzienlijk groter aantal neutrofielen vergeleken met wonden met S.aureus biofilms

Daarnaast hebben bacteriën verschillende genetische mogelijkheden om signalen af te geven om de vorming van een biofilm te starten. Gram-positieve bacteriën gebruiken bijvoorbeeld kleine peptiden als signaleringsmoleculen (3). Om te communiceren tussen verschillende cellen is een bepaalde concentratie van bacteriën vereist. Wanneer dit het geval is, kunnen bepaalde genen geactiveerd worden. Dit proces wordt quorum sensing (QS) genoemd (13). De belangrijkste rol van QS is directe genexpressie tussen de verschillende bacteriën in de biofilm (1,47).

Hoe biofilm de wondgenezing beïnvloedt

Men denkt dat de EPS matrix van biofilms de mogelijkheid heeft om de fagocyterende werking van antilichamen tegen te houden. Hierdoor is de afweer van de gastheer tegen bacteriën in de biofilm niet effectief (33). In vitro onderzoek laat zien dat alginaat in staat is om de vrije radicalen van fagocyterende cellen op te ruimen, waardoor bacteriën kunnen overleven (43). Daarnaast zorgt de QS van bacteriën ook voor de regulering van exotoxinen en extracellulaire enzymen. Wanneer bacteriën deze enzymen uitscheiden zijn ze in staat om vanuit de wond dieper in het weefsel door te dringen. Exotoxinen kunnen de functie van de immuuncellen van de gastheer beïnvloeden en dit resulteert in verdere afbraak van weefsel van de gastheer (8).

De functie van de neurofiel kan worden geblokkeerd door het QS systeem van de *P. aeruginosa* (2). Daarnaast is *P. aeruginosa* in staat om neutrofielen uit te schakelen door de productie van rhamnolipids (24). Dit is waarschijnlijk het geval in chronische wonden (4). De rhamnolipids houden de wond gevangen in een chronisch inflammatoire

staat. Wonden met *P.aeruginosa* biofilms bevatten een aanzienlijk groter aantal neutrofielen vergeleken met wonden met *S.aureus* biofilms (18), daarom kan worden aangenomen dat *P.aeruginosa* een grotere inflammatoire reactie uitlokt, wat weer schadelijk is voor de wondgenezing.

Wolcott et al. (46) veronderstellen dat bacteriën in een biofilmcommunie een parasitaire relatie met de gastheer onderhouden. Door meer gebruik te maken van hun virulente eigenschappen, veroorzaken bacteriën necrose aan het weefsel van de gastheer, wat weer voor voeding van de bacteriën dient. In het normale wondgenezingsproces, worden neutrofielen vervangen door macrofagen gedurende de inflammatiefase. Macrofagen geven diverse groeifactoren af die de proliferatiefase in gang zetten (5). Doordat biofilms continu planktonic 'zaadjes' van bacteriën afgeven veroorzaken ze een voortdurende inflammatoire reactie van de neutrofielen (38,46). Deze cyclus resulteert in een ongereguleerde afgifte van proteasen en pro-inflammatoire cytokinen, welke leidt tot schade aan de gastheer (37,46). Bacteriën in de biofilm geven lipopolysacchariden af aan het wondbed, met een destructief niveau van inflammatie als gevolg. Hierdoor zijn wonden niet in staat om over te gaan naar de proliferatiefase.

Wanneer een twee dagen oude biofilm wordt vergeleken met een zeven dagen oude biofilm, ziet men dat de inflammatoire reactie minder sterk is bij een oudere biofilm. Dit suggereert dat een biofilm in staat is om de normale immuunreactie tijdens de wondgenezing te onderdrukken (27,40).

Verschillende onderzoekers hebben de invloed van biofilm op de verschillende fasen van het wondgenezingsproces onderzocht (tabel 1). Tijdens het normale wondgenezingsproces start de re-epithelialisatie al een paar uur na de verwonding. Epidermale cellen migreren vanuit de wondranden in het wondbed en herstellen het defect zo snel mogelijk (17). De studie van Schiere et al. (39) laat zien dat dit proces verstoord wordt door de biofilm. Nog specifiek demonstreerde Secor et al. (40) dat een biofilm apoptose van de keratinocyten induceert. Apoptose is een vorm van gereguleerde celdood en is een belangrijk onderdeel in de ontwikkeling van nieuw weefsel (30). Apoptose komt tijdens het wondgenezingsproces voor bij fibroblasten en inflammatoire cellen (20). Normaal differentiëren keratinocyten en ondergaan ze geen celdood (45). Waarschijnlijk wordt apoptose bij keratinocyten veroorzaakt door een verhoogd TNF- α . Deze studie demonstreert dat een biofilm de re-epithelialisatie afremt en dat een gestoorde inflammatoire reactie kan leiden tot een infectie. In een vergelijkbare studie van Kirker et al. (25) kwamen onderzoekers tot vergelijkbare resultaten.

Tabel 1. Invloed van biofilm op wondgenezing

Auteur	Type onderzoek	Interventie	Uitkomst
Schierle et al. (39)	In vivo (muis)	Wonden geïnjecteerd met <i>S. aureus</i> en <i>S. epidermis</i>	Biofilm formatie waardoor verstoorde reepithelialisatie
Secor et al. (40)	In vitro	<i>S. aureus</i> biofilm en menselijke keratinocyten	Biofilm induceert apoptose keratinocyten en remt epithelialisatie
Kirker et al. (26)	In vitro	MRSA biofilm en menselijke fibroblasten	Beperkte migratie fibroblasten en verminderde productie van cytoliënen, groeifactoren en proteasen
Malic et al. (28)	In vitro	Invloed van vier soorten bacteriën op elkaar	<i>P. aeruginosa</i> en <i>S. aureus</i> zijn dominant over andere bacteriën
Dalton et al. (12)	In vivo (muis)	Wonden geïnjecteerd met <i>P. aeruginosa</i> of getransplanteerd met biofilm van vier verschillende bacteriën	Wonden met polymicrobiële infectie bleef achter t.o.v. één soort bacterie, maar alleen op dag acht was dit statistisch significant
Seth et al. (42)	In vivo (konijn)	Wonden geïnjecteerd met verschillende soorten bacteriën	IL-1 β en TNF α meer verhoogd en minder nieuw epitheel en granulatie weefsel bij poli- microbiële biofilm
Zhao et al. (48)	In vivo (diabetische muis)	<i>P. aeruginosa</i> biofilm infectie in wond	Vertraging in wondgenezing en geen angiogenese

De proliferatie fase wordt vooral gekenmerkt door de migratie van fibroblasten. Wanneer de fibroblasten in de wond migreren produceren ze matrixproteïnen om de nieuwe extracellulaire matrix (ECM) op te bouwen (17). Kirker et al (26) demonstreerde een beperkte migratie van fibroblasten en een verminderde productie van cytokinen, groeifactoren en proteasen na blootstelling aan biofilm. Naar aanleiding hiervan suggereren onderzoekers dat alle fasen van de wondgenezing worden verstoord door de aanwezigheid van bacteriën.

Percival et al. (35) beschrijven twee verschillende hypothesen over de invloed van biofilms op wonden. De 'specifieke bacteriële hypothese' suggereert dat ondanks de grote verscheidenheid aan bacteriën in wonden er slechts enkele soorten bacteriën betrokken zijn bij de vertraging van de wondgenezing. De 'niet specifieke bacteriële hypothese' suggereert dat een infectie in de wond wordt veroorzaakt doordat de biofilm een samengestelde overall functionerende eenheid is. De 'specifieke bacteriële hypothese' wordt ondersteund door Malic et al. (28). Seth et al (42) suggereren met hun onderzoek dat er een synergie is tussen verschillende soorten bacteriën, wat weer de 'niet-specifieke bacteriële hypothese' ondersteunt.

Dalton en collega's (12) concludeerden dat polymicrobiële infecties niet perse de wondgenezing vertragen. Dit is in tegenstelling tot de opinie van andere onderzoekers die wel een vertraging in wondgenezing zagen na een infectie (34, 40). Tot slot werd door Zhao et al. (48) een vertraging van twee weken in de wondgenezing gedemonstreerd bij

diabetische muizen met een *P.aeruginosa* biofilm infectie. Daarnaast rapporteerden onderzoekers dat er geen angiogenese werd gezien in de biofilmwonden, in tegenstelling tot de wonden uit de controle groep. Angiogenese is een belangrijk onderdeel van de wondgenezing (44) en de afwezigheid hiervan leidt tot een ernstige verstoring van de normale wondgenezing.

Conclusie

Om een biofilm te kunnen vormen hebben bacteriën een aantrekkelijke ondergrond, zoals een wond, nodig om zich aan te hechten. Tijdens de vorming van een biofilm gebruiken bacteriën QS om te communiceren. Het is niet precies duidelijk of verschillende soorten bacteriën samenwerken op een gelijkwaardige manier of dat bepaalde soorten bacteriën, bijvoorbeeld *P.aeruginosa*, dominant zijn (12,18).

Een biofilm beschermt bacteriën tegen de afweer van de gastheer door fagocytose door neutrofielen te voorkomen en weerstand te geven tegen de vrije zuurstofradicalen van de neutrofielen. Daarnaast geeft een biofilm weer nieuwe losse bacteriën af, die weer een continue inflammatoire reactie van de gastheer uitlokken. Deze voortdurende inflammatoire reactie leidt tot schade aan het weefsel van de gastheer en aangezien het beschadigde weefsel een voedingsbodem voor bacteriën is, leidt dit tot chroniciteit van de wond.

Literatuur

1. Alavi MR et al. **An overview of biofilm and its detection in clinical samples.** *Journal of Wound Care*, 2012;21:376-83.
2. Bjarnsholt T et al. **Pseudomonas aeruginosa tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent.** *Microbiology*, 2005;151:373-83.
3. Bjarnsholt T et al. **Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis.** *Wound Repair and Regeneration*, 2008;16:2-10.
4. Bowler PG. **Wound pathophysiology, infection and therapeutic options.** *Annals of Medicine*, 2002;419-27.
5. Broughton G et al. **Wound healing: An overview.** *Plast Reconstr Surg*, 2006;117:294S.
6. Burmølle M et al. **Biofilms in chronic infections-a matter of opportunity-monospecies biofilms in multispecies infections.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2010;59:324-36.
7. Byrne O, Kelly M. **Living with a chronic leg ulcer.** *Journal of Community Nursing*, 2010;24:46-54.
8. Cooper R. **The contribution of microbial virulence to wound infection.** *British Journal of Nursing, The Silver Supplement part three*, 2002;10-14.
9. Costerton JW et al. **Microbial Biofilms.** *Annual Review of Microbiology*, 1995;9:711-45.
10. Costerton JW et al. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** *Science*, 1999;284:1318-22.
11. Cucarella C et al. **Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of Staphylococcus aureus and alters the infective process.** *Infect Immun*, 2002;70:3180-86.
12. Dalton T et al. **An In Vivo Polymicrobial Biofilm Wound Infection Model to Study Interspecies Interactions.** *PLoS ONE*, 2011;6:e27317.
13. Davies DG et al. **The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm.** *Science*, 1998;280:295-8.
14. Davis SC et al. **The diabetic foot: the importance of biofilms and wound bed preparation.** *Current Diabetes Reports*, 2006;6:439-45.
15. Davis SC et al. **Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo.** *Wound Repair and Regeneration*, 2008;16:23-9.
16. Eming SA et al. **Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms.** *The Journal of investigative dermatology*, 2007;127:514-25.
17. Enoch S, Leaper DJ. **Basic science of wound healing.** *Surgery*, 2005;26:31-7.
18. Fazli M et al. **Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds.** *Wound Repair and Regeneration*, 2011;19:387-91.
19. Fux CA et al. **Survival strategies of infectious biofilms.** *Trends in microbiology*, 2004;13:34-40.
20. Greenhalgh DG. **The role of apoptosis in wound healing.** *Int J Biochem Cell Biol*, 1998;30:1019-30.
21. Harrison-Balestra C et al. **A wound-isolated Pseudomonas aeruginosa grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy.** *Dermatologic surgery*, 2003;29:631-5.
22. Hart J. **Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds.** *Wounds*, 2002;11:205-9.
23. James GA et al. **Biofilms in chronic wounds.** *Wound Repair and Regeneration*, 2007;16:37-44.
24. Jensen P O et al. **Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa.** *Microbiology*, 2007;153:1329-38.
25. Kirker K R et al. **Loss of viability and induction of apoptosis in human keratinocytes exposed to Staphylococcus aureus biofilms in vitro.** *Wound Repair and Regeneration*, 2009;17:690.
26. Kirker KR et al. **Differential effects of planktonic and biofilm MRSA on human fibroblasts.** *Wound Repair and Regeneration*, 2012;20:253-61.
27. Leid JG et al. **Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to Staphylococcus aureus Biofilms.** *Infection and Immunity*, 2002;70:6339-45.
28. Malic S et al. **In vitro interaction of chronic wound bacteria in biofilms.** *Journal of Wound Care*, 2011;20:569-77.
29. Martin JM et al. **Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing.** *The Journal of Investigative Dermatology*, 2010;130:38-48.
30. McConkey DJ et al. **Apoptosis-Molecular mechanisms and biomedical implications.** *Molecular Aspects of Medicine*, 1996;17:1-105.
31. O'Toole G et al. **Biofilm formation as microbial development.** *Annual review of Microbiology*, 2000;54:49-79.
32. Palmer RJ, White DC. **Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control.** *Trends in microbiology*, 1997;5:435-40.
33. Percival SL, Bowler PG. **Biofilms and their potential role in wound healing.** *Wounds*, 2004;16:234-40.
34. Percival SL, Cutting KF. **Biofilms: possible strategies for suppression in chronic wounds.** *Nursing standard*, 2009;23:64-72.
35. Percival SL et al. **Biofilms and bacterial imbalances in chronic wounds: anti-Koch.** *International Wound Journal*, 2010;7:169-75.
36. Percival SL et al. **Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection.** *International Wound Journal*, 2012;9:14-32.
37. Prince LR et al. **Subversion of a lysosomal pathway regulating neutrophil apoptosis by a major bacterial toxin, pyocyanin.** *Journal of Immunology*, 2008;180:3502-11.
38. Sauer K et al. **Pseudomonas aeruginosa Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm.** *The Journal of Bacteriology*, 2002;184:1140-54.
39. Schierle CF et al. **Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model.** *Wound Repair and Regeneration*, 2009;17:354-9.
40. Secor PR et al. **Staphylococcus aureus Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes.** *BMC Microbiology*, 2011;11:143-55.
41. Serralta VW et al. **Lifestyles of bacteria in wounds: presence of biofilms?** *Wounds*, 2001;13:29-34.
42. Seth AK et al. **Comparative Analysis of Single-Species and Polybacterial Wound Biofilms Using a Quantitative, In Vivo ,**

- Rabbit Ear Model (In Vivo Polybacterial Wound Biofilm).** Plos One, 2012;7:e42897.
43. Simpson JA et al. **Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages.** Free Radical Biology and Medicine, 1989;6:347-53.
 44. Singer AJ, Clark RA. **Cutaneous wound healing.** The New England Journal of Medicine, 1999;341:738-46.
 45. Terskikh V et al. **Apoptosis and differentiation of epidermal keratinocytes.** Russian Journal of Developmental Biology, 2004;36:61-4.
 46. Wolcott RD et al. **Biofilms and chronic wound inflammation.** Journal of Wound Care, 2008;17:333-41.
 47. Wolcott R, Dowd S. **The Role of Biofilms: Are We Hitting the Right Target?** Plastic and Reconstructive Surgery, 2011;127:28S-35S.
 48. Zhao G et al. **Time course study of delayed wound healing in a biofilm-challenged diabetic mouse model.** Wound Repair and Regeneration, 2012;20:342-52.

* *Ellie Lenselink, wondconsulent, Medisch Centrum Haaglanden, Den Haag*

Contact

e.lenselink@mchaaglanden.nl