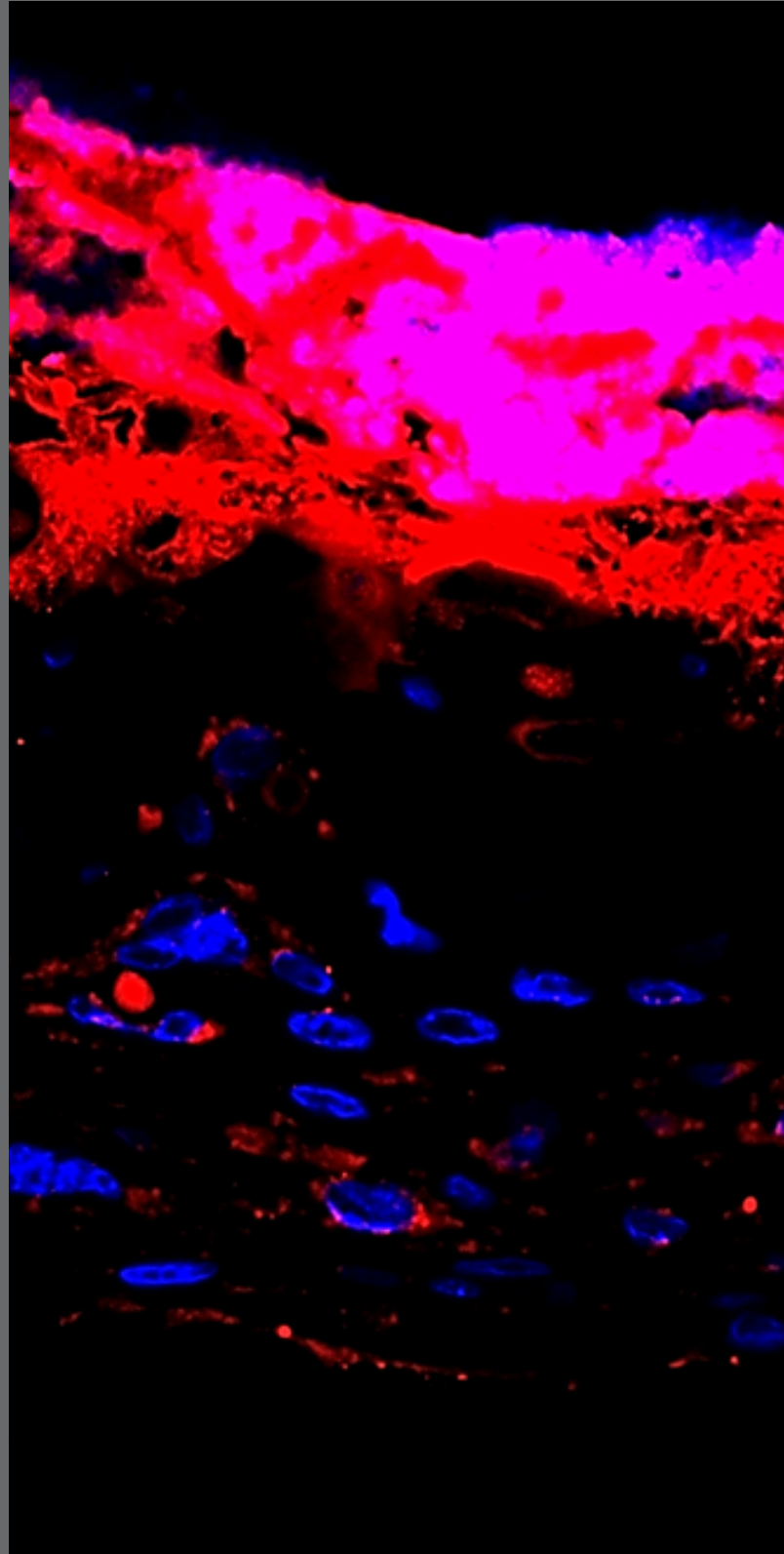


ABSCHLUSS- BERICHT DGUV FR 335

ANALYSE VON
BIOFILMIMPLANTATINFEKTIONEN
IN DER SEPTISCHEN CHIRURGIE:
ENTWICKLUNG EINES
NEUARTIGEN
HUMANEN 3D-HAUTMODELLS

Dr. rer. nat. Olga Kurow
Dr. med. Rima Nuwayhid
Prof. Dr. med. Stefan Langer

31.08.2024



Abschlussbericht zum Vorhaben
„ANALYSE VON BIOFILM-
IMPLANTATINFEKTIONEN IN DER
SEPTISCHEN CHIRURGIE:
ENTWICKLUNG EINES NEUARTIGEN
HUMANEN 3D-HAUTMODELLS“
(DGUV FR335)

Laufzeit

01.07.2022 – 30.06.2024

Bericht vom 31.08.2024

Dr. rer. nat. Olga Kurow
Dr. med. Rima Nuwayhid

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung Deutsch	4
Kurzfassung Englisch.....	5
1. Problemstellung	6
Bedeutung von Extremitätenverletzungen und Implantatinfektionen	6
Biofilmbildung und Staphylokokken	6
Vorteile und Bedeutung von 3D-Gewebemodellen	7
2. Forschungszweck/-ziel	8
3. Methodik	9
Arbeits- und Zeitplan.....	9
Modifikationen zum Antrag	11
3.I. Methodik 3D-Gewebe	12
3.I.1. Konstruktion des 3D-Gewebes	12
3.I.2. Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	13
3.II. Methodik 3D-Gewebe mit Biofilm	13
3.II.1. Konstruktion des 3D-Gewebes mit Biofilm	13
3.II.2. Histologie, Immunfluoreszenz und Zytotoxizität	14
3.II.3. Entwicklung und Berechnung Biofilmscore.....	14
3.III. Methodik 3D-Gewebe mit Implantat.....	15
3.III.1. Konstruktion 3D-Gewebe mit Implantat.....	15
3.III.2. Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	16
3.III.3. Analyse der Zytotoxizität und Immunantwort	16
3.IV. Methodik 3D-Gewebe mit Implantatinfektion	16
3.IV.1. Konstruktion 3D-Gewebe mit Implantatinfektion	16
3.IV.2. Histologie	17
3. IV.3. Analyse der Zytotoxizität und Immunantwort.....	17
3.IV.4. FISH-Analyse	17
4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens	18
4.I. Ergebnisse 3D-Gewebe	18
4.I.1. Stratifizierung des 3D-Gewebes	18
4.I.2. Zell-Zell-Kontakte des 3D-Gewebes	20
4.II. Ergebnisse 3D-Gewebe mit Biofilm	21
4.II.1. Biofilmbildung	21
4.II.2. Einfluss der Biofilmbildung auf Zell-Zell-Kontakte des 3D-Gewebes	22
4.II.3. Zytotoxizität des Biofilms	23
4.II.4. Immunantwort des 3D-Gewebes auf Biofilm.....	24

4.III. Ergebnisse 3D-Gewebe mit Implantat	25
4.III.1. Einfluss des Implantats auf Stratifizierung des 3D-Gewebes	25
4.III.2. Einfluss des Implantats auf Zell-Zell-Kontakte des 3D-Gewebes	25
4.III.3. Zytotoxizität der Implantate	25
4.III.4. Immunantwort des 3D-Gewebes auf Implantate	26
4.IV. Ergebnisse 3D-Gewebe mit Implantatinfektion	27
4.IV.1. Biofilmbildung und Implantatinfektion.....	27
4.IV.2. Zytotoxizität der Implantatinfektion	30
4.IV.3. Immunantwort des 3D-Gewebe auf Implantatinfektion.....	31
4.V. Publikationen und Kongressbeiträge.....	32
Veröffentlichung	32
Kongressbeiträge	32
5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen	33
6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen	34
7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan.....	36
Veröffentlichung in Einreichung	36
Geplante Publikationen.....	36
Mögliche weitere Anwendungen	36
8. Anhang/Anhänge	37
Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte Prof. Siemers	38
Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte Prof. em. Rodloff	39
Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte Prof. Moter	40
Literatur	41
Publikation	45

Kurzfassung Deutsch

Ziele: Ziel des Forschungsvorhabens war die Etablierung eines 3D-Gewebeäquivalents, welches sich für die Erforschung von Implantatinfektionen eignet. Hiermit sollte auch die Frage beantwortet werden, ob es Staphylokokken gelingen kann, durch geschlossene Haut zu einem Implantat vorzudringen. Dies sollte in vier Zielkomplexen erreicht werden:

- I. Etablierung eines 3D-Gewebes
- II. Etablierung eines infizierten 3D-Gewebes
- III. Etablierung eines 3D-Gewebes mit intradermalem Implantat
- IV. Etablierung eines 3D-Gewebes mit infiziertem Implantat

Methoden:

- I. Zum Aufbau des 3D-Gewebes wurden in einem Transwell-System humane Fibroblasten in einer Kollagenmatrix kokultiviert mit darauf ausgesäten Keratinozyten. Im Airlift-Verfahren erhielten die Keratinozyten apikal Luftkontakt, während die Ernährung der Zellen mit Kulturmedium basal über eine permeable Membran erfolgte.
- II. Dieses 3D-Gewebe wurde zur Simulation einer Hautinfektion mit isokonzentrierten Suspensionen von biofilmbildendem *Staphylococcus (S.) aureus*, *S. epidermidis* sowie einer Mischung beider Bakterienspezies inokuliert. Die Kontrollbehandlung erfolgte mit NaCl.
- III. Vor Ausreifung des 3D-Gewebes wurde eine Probe eines Silikonimplantats eingebracht.
- IV. Das 3D-Gewebe mit Implantat aus III. wurde mit Bakterien behandelt wie II.

Mittels Histologie und Immunhistochemie wurden der Aufbau des 3D-Gewebes einschließlich Zell-Zell-Kontakte und die Ausbildung des Biofilms untersucht. Laktatdehydrogenase (LDH) und AIF-Expression wurden als Maß für den Zelltod bestimmt. Das Zytokinprofil wurde mittels ELISA gemessen. Zusätzlich erfolgte Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Lokalisation der Erreger und Darstellung der Biofilme und Aktivität der Erreger.

Ergebnisse:

- I. Unter den Bedingungen des Airlift-Verfahrens entwickelte sich innerhalb von 30 Tagen eine reifes 3D-Gewebe mit hauttypischer Gewebearchitektur in differenzierten Schichten und regelhaften Zell-Zell-Kontakten.
- II. Es bildeten sich reife Biofilme aus. Die Zellen des 3D-Gewebes reagierten mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Unter Infektion kam es zur Auflösung von Zell-Zell-Kontakten. Dabei war trotz gleicher Bakterienkonzentration der polymikrobielle Biofilm aggressiver. In diesem beeinflussten sich beide Bakterienspezies in Biofilmbildung und provozierten unterschiedliche Zytokinreaktionen der Hautzellen.
- III. Auch unter Einbringen eines Implantats bildete sich reifes 3D-Gewebe aus. Silikon zeigte sich im Modell nicht zytotoxisch, rief jedoch eine proinflammatorische Antwort der Hautzellen hervor.
- IV. Im Implantatmodell bildete sich reifer Biofilm aus. Trotz gleicher Bakterienkonzentration war die Zytotoxizität bei gleichzeitigem Vorhandensein eines Implantats größer und die proinflammatorische Zytokinreaktion intensiver. Ein Implantat begünstigt das Infektionsgeschehen.

Zusammenfassend konnten wir ein 3D-Gewebeäquivalent etablieren, welches eine reproduzierbare Untersuchungsplattform für *in vitro* Forschung zu Biofilm, Biokompatibilität von Fremdmaterial sowie Implantatinfektionen bietet. Durch die gewebeäquivalente Architektur ist es den bislang dominierenden 2D-Kulturen deutlich überlegen und verzichtet dabei vollständig auf Tierversuche. Es erlaubt damit bspw. die Austestung antimikrobieller Substanzen und Oberflächenbehandlungen von Implantaten sowie die Biofilmanalyse.

Kurzfassung Englisch

Objectives: The objective of this research project was to establish a 3D tissue equivalent suitable for studying implant infections. The project also aimed to address whether staphylococci can penetrate intact skin to reach an implant. This was to be achieved through four specific goals:

- I. Establishment of a 3D tissue model.
- II. Establishment of an infected 3D tissue model.
- III. Establishment of a 3D tissue model with an intradermal implant.
- IV. Establishment of a 3D tissue model with an infected implant.

Methods:

- I. To develop the 3D skin model, human fibroblasts were co-cultured with keratinocytes seeded on top within a collagen matrix using a transwell system. The keratinocytes were exposed to air on their apical side using the airlift technique, while nutrients were supplied basally through a permeable membrane.
- II. This 3D tissue model was inoculated with iso-concentrated suspensions of biofilm-forming *Staphylococcus (S.) aureus*, *S. epidermidis*, as well as a mixture of both bacterial species, to simulate a skin infection. The control treatment was conducted with NaCl.
- III. Before the maturation of the 3D tissue, a sample of a silicone implant was inserted.
- IV. The 3D tissue model with the implant from III was treated with bacteria as in II.

Histology and immunohistochemistry were used to examine the structure of the 3D tissue, including cell-cell contacts and biofilm formation. Lactate dehydrogenase (LDH) and AIF expression were measured as indicators of cell death. The cytokine profile was assessed using ELISA, and Fluorescence in situ Hybridisation (FISH) were performed to localise the bacteria in the tissue and visualise biofilm formation and activity of the cells.

Results:

- I. Under airlift conditions, a mature 3D tissue model with skin-like architecture, differentiated layers, and regular cell-cell contacts developed within 30 days.
- II. Mature biofilms formed. The 3D tissue cells responded with the release of proinflammatory cytokines. Despite the same bacterial concentration, the polymicrobial biofilm was more aggressive. Both bacterial species influenced each other's biofilm formation, leading to different cytokine responses. Infection led to the dissolution of cell-cell contacts.
- III. A mature 3D tissue model also developed with the inclusion of an implant. Silicone was not cytotoxic in the model but induced a proinflammatory response.
- IV. In the implant model, a mature biofilm formed. Despite the same bacterial concentration, the cytotoxicity was higher, and the proinflammatory cytokine response was more intense in the presence of an implant. The implant promoted the infection process.

In summary, we successfully established a 3D tissue equivalent that provides a reproducible platform for *in vitro* research on biofilms, biocompatibility of foreign materials and implant infections. Due to its tissue-equivalent architecture, it is significantly superior to the previously dominant 2D cultures, enabling the testing of antimicrobial substances, implant surface treatments, and bacterial interactions within biofilms while eliminating the need for animal testing.

1. Problemstellung

Bedeutung von Extremitätenverletzungen und Implantatinfektionen

Meldepflichtige Arbeitsunfälle werden von Verletzungen der Extremitäten dominiert. Auf diese sind auch über 80% der Arbeitsunfallrenten zurückzuführen.¹ Bei 13% aller meldepflichtigen Verletzungen handelt es sich um offene oder geschlossene Frakturen oder Luxationen, hier besteht potentiell die Indikation zur Verwendung von Implantaten wie Osteosynthesematerialien. Den größten Anteil an meldepflichtigen Verletzungen (32%) haben Wunden, welche häufig einer Wundversorgung unter Einbringen von Hautnahtmaterial zugeführt werden müssen.

Das Einbringen von Fremdmaterial in den menschlichen Körper birgt jedoch stets das Risiko von Infektionen. Das Risiko einer Osteosynthese-assoziierten Infektion variiert zwischen 2% bei geschlossenen und 4 bis 52% bei offenen Frakturen.^{2,3} Periprothetische Infektionen treten bei bis zu 2% der primären Hüft- und Kniegelenkendoprothesen auf, im Falle notwendiger Revisionen steigt diese Zahl auf 5%.⁴ In Anbetracht der Häufigkeit dieser Eingriffe ergeben sich hieraus relevante absolute Zahlen, so werden in Deutschland jährlich über 400.000 künstliche Hüft- und Kniegelenke eingesetzt.⁵

Implantatinfektionen und Osteitis/Osteomyelitis als ihre möglichen Folgen sind notorisch schwer zu behandeln. Die Kosten für individuell Betroffene sowie die Allgemeinheit durch Arbeitsunfähigkeit sowie mögliche permanente Funktionseinschränkungen sind enorm. Im Falle einer Infektion erhöhen sich die Gesundheitskosten von Frakturbehandlungen um das 6,5-Fache.⁶ Im Nachbarland Frankreich werden die jährlichen Behandlungskosten für Knocheninfektionen auf 259 Millionen € geschätzt.⁷ Hierin sind weitere Kosten durch Arbeitsunfähigkeit, Pflegekosten, Hilfsmittel etc. noch nicht enthalten.

Biofilmbildung und Staphylokokken

Insbesondere erschwert wird die Behandlung von Implantatinfektionen durch Biofilmbildung. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Lebensform von Bakterien. Sie haften zunächst in Mikrokolonien auf Oberflächen von Implantaten an und umgeben sich durch Produktion einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen mit einer schützenden Schleimschicht. In dieser Matrix wird die Diffusion von Antibiotika erschwert, zudem kommunizieren die Bakterien miteinander und tauschen auch Informationen über Resistenzmechanismen aus. Hierdurch sowie eine Vielzahl weiterer Mechanismen entziehen sie sich letztlich der Wirkung von Medikamenten und der Immunabwehr des Körpers.⁸ Der Biofilm reißt immer wieder auf und ermöglicht so die Dispersion von Bakterien, was zu Infektionen in anderer Körperregionen bis hin zur Blutvergiftung führen kann. Diese Mechanismen erklären die Hartnäckigkeit und hohe Rezidivrate von Implantatinfektionen.

Der mit Abstand häufigste Erreger von Infektionen sowohl nativer Knochen und Gelenke als auch am Kochen verwendeter Implantate ist *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), ein Gram-positives, fakultativ humanpathogenes und insbesondere biofilmbildendes Bakterium.^{9,10} Im Biofilm ist die Toleranz von *S. aureus* gegenüber Antibiotika gar um das Hundertfache erhöht.¹¹ Auf Infektionen mit *S. aureus* wurden 2019 weltweit über eine Million Todesfälle zurückgeführt.¹² Ebenso große Bedeutung kommt der kommensalen Spezies *Staphylococcus epidermidis* zu. Da es ubiquitär auf der menschlichen Haut vorkommt, besteht bei jeder invasiven Maßnahme von der Blutentnahme über das Einbringen eines Herzschrittmachers bis hin zur Implantation orthopädischer Megaendoprothesen das Risiko einer Kontamination und Infektion mit *S. epidermidis*. Zudem ist *S. epidermidis* ebenfalls ein biofilmbildendes Bakterium. Diese beiden Vorteile für das Bakterium tragen dazu bei, dass es nicht nur einer der am häufigsten nachgewiesenen Erreger bei Bakteriämien, sondern auch bei Infektionen medizinischer Implantate ist.¹³ Die Behandlung der Staphylokokkeninfektionen stellt eine große Herausforderung im klinischen Alltag mit stetig zunehmender Bedeutung dar, in einer alternden Gesellschaft erscheint dieser Trend aktuell nicht umkehrbar.^{10,14-18} Vor dem Hintergrund einer drohenden postantibiotischen Ära ist die Erforschung von Pathomechanismen der Staphylokokkeninfektionen und Biofilmbildung von hoher Relevanz und Dringlichkeit.¹⁹

Vorteile und Bedeutung von 3D-Gewebemodellen

Das Hauptziel der Erforschung der Implantatinfektionen besteht darin, mögliche Ansätze für Prävention und Therapie zu entwickeln. Dies ist umso akuter, da die Resistenzbildung und die damit verbundene Pathogenität der Staphylokokken steigen.²⁰⁻²² Trotz bereits vieler an Tieren durchgeführten Studien besteht weiterhin ein enormer Forschungsbedarf.²³ Tiermodelle sind (1.) mit ethischen und moralischen Komplikationen, (2.) mit immer höheren Hürden bei der behördlichen Beantragung und (3.) anspruchsvollen Auflagen an die Durchführung und damit auch Kosten verbunden. Insbesondere muss jedoch die (4.) schwierige Standardisierung von Erregermenge und Ausdehnung der Infektion und (5.) hohe translationale Lücke vom Tierversuch zur klinischen Anwendbarkeit der im Tiermodell gewonnen Erkenntnisse beachtet werden.²⁴ Für *S. aureus* sind zudem mehrere Virulenzfaktoren bekannt, welche spezifisch humanpathogen sind, im Tiermodell also nicht repliziert werden können. So wurde bereits 1957 konstatiert, dass die Virulenz eines Erregers immer in Relation zur Wirtsspezies betrachtet werden muss.²⁵

3D-Modelle sind ein kosteneffizienter Ansatz zur Modellierung von Organen oder Geweben, welche Untersuchungen zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen ermöglichen, wobei vollständig auf Tierversuche verzichtet werden kann.²⁶⁻²⁹ Es wurden mehrere Protokolle für die Züchtung von 3D-Modellen aus menschlichen Geweben und Zelllinien beschrieben, z. B. aus dem Dickdarm, dem Dünndarm, der Haut, der Bauchspeicheldrüse, dem Magen, der Speiseröhre, der Prostata, der Lunge, den Eileitern und verschiedenen Krebsarten.²⁶⁻³⁵ Es konnte bereits gezeigt werden, dass Tumormodelle ihren Ursprungstumor nachahmen, so dass *in vitro* Arzneimittelreaktionen mit genetischen Veränderungen im Ursprungstumor in Verbindung gebracht werden konnten.³⁵ Unsere eigene Forschungsgruppe konnte die Entwicklung des weltweit ersten 3D-Modells humaner Pleura beitragen und hierin Biofilmbildung induzieren, wodurch ein 3D-Modell für die Erforschung des Pleuraempyems bereitgestellt wurde.^{36,37} Zwischenzeitlich existieren mehrere 3D-Hautmodelle mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen, welche einen Wendepunkt sowohl in der Erforschung von Hautkrankheiten als auch perspektivisch der regenerativen Medizin sein werden.³⁸

Aus Gründen der Lesbarkeit wird im Folgenden der Begriff *3D-Gewebe* verwendet, gemeint ist ein *3D-Gewebeäquivalent*. Synonym wird von *3D-Modell* gesprochen.

2. Forschungszweck/-ziel

Ziel der Studie war die Etablierung eines *in vitro* Hautinfektionsmodells, welches auch die Untersuchung von Implantatinfektionen ermöglicht. Dazu sollte ein 3D-Gewebeäquivalent hergestellt werden, welches aus differenzierten humanen Keratinozyten und Fibroblasten besteht. Dieses 3D-Gewebe sollte zu einem Infektionsmodell für Staphylokokkeninfektionen ausgebaut und zur Untersuchung der Implantatinfektionen durch biofilmbildende Bakterien genutzt werden. Als erwartete Ergebnisse wurden folgende konkrete Fragen formuliert (siehe Antrag vom 09.09.2020 Seite 15):

- *Gelangen biofilmbildende S. aureus und S. epidermidis durch unverletzte Haut zu einem Implantat?*
- *Kann ein in vitro-Test Modell etabliert werden, welches zur Biofilmforschung eingesetzt werden kann?*

Gemäß unserem ursprünglichen Forschungsantrag vom 09.09.2020 sowie nach Optimierung im Zwischenbericht vom 01.06.2023 Seite 29 formulierten wir drei experimentelle Zielkomplexe. Für eine übersichtliche Darstellung teilen wir Komplex III in zwei Komplexe auf und erhalten so insgesamt vier Zielkomplexe (siehe Abbildung 1):

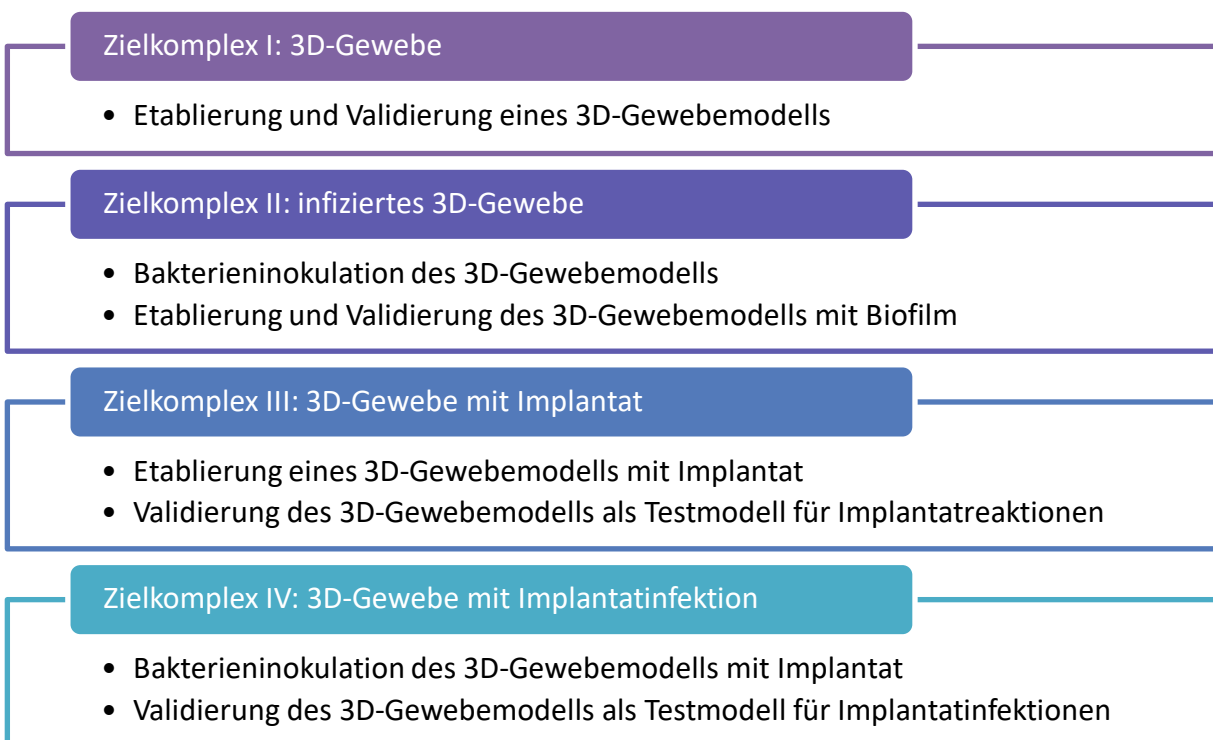


Abbildung 1: Darstellung der vier experimentellen Zielkomplexe, welche innerhalb des Forschungsvorhabens DGUV FR335 erreicht werden sollten.

3. Methodik

Arbeits- und Zeitplan

Es folgen zum Abgleich der ursprüngliche Arbeits- und Zeitplan aus dem Antrag (Abbildung 2), aus dem Zwischenbericht (Abbildung 3 Seite 10) sowie der aktuelle Stand zum Zeitpunkt des Abschlussberichts (Abbildung 4 Seite 10). Der im Antrag vorgeschlagene Arbeits- und Zeitplan konnten nach Projektbeginn eingehalten werden. Lediglich der Projektabschluss ist noch nicht als vollzogen markiert, da aus den erhobenen Daten noch mindestens zwei weitere Publikationen erstellt werden soll (siehe Seite 36).

	1. Jan.	1. Feb.	1. Mrz.	1. Apr.	1. Mai.	1. Jun.	1. Jul.	1. Aug.	1. Sep.	1. Okt.	1. Nov.	1. Dez.	1. Jan.	1. Feb.	1. Mrz.	1. Apr.	1. Mai.	1. Jun.	1. Jul.	1. Aug.	1. Sep.	1. Okt.	1. Nov.	31. Dez.	1. Jan.	
Ziel I																										
Einarbeitung, Materialbestellung	■	■	■																							
Kultur und Expandierung humaner Zelllinien		■	■	■	■																					
Etablierung des 2-D-Hautmodells			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Etablierung des Organoids					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Validierung des Modells																										
Ziel II																										
Infektion des 2D-Modells																										
Infektion des Organoids																										
Validierung des Modells mit Infektion																										
Ziel III																										
Etablierung des Organoids mit Implantat																										
Infektion des Organoids																										
Auswertung der Infektion																										
Ziel IV																										
Datenauswertung																										

Abbildung 2: Arbeits- und Zeitplan laut Antrag auf Forschungsförderung durch die DGUV vom 09.09.2020 Seite 14. MS Meilenstein, PA Projektabschluss.

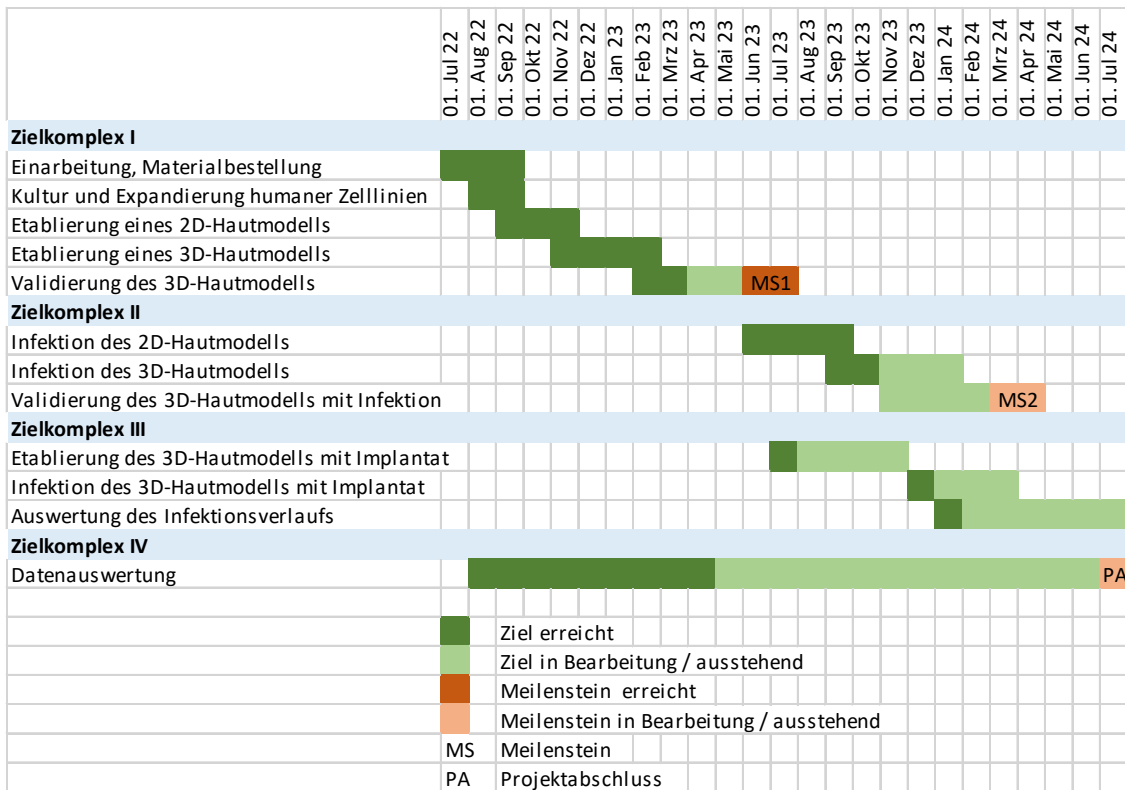


Abbildung 3: Arbeits- und Zeitplan laut Zwischenbericht vom 01.06.2023 Seite 29.

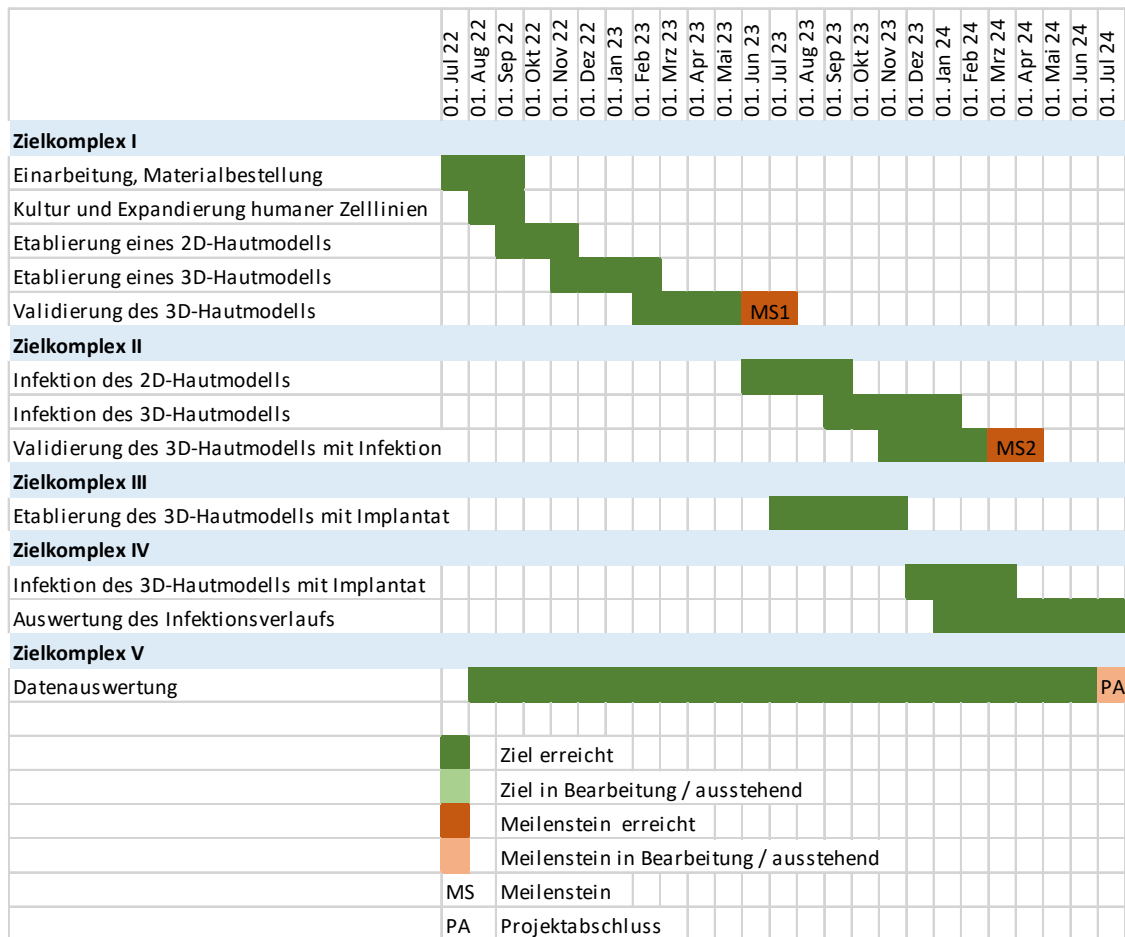


Abbildung 4: Arbeits- und Zeitplan aktueller Stand 31.08.2024. Alle Ziele wurden fristgerecht erfüllt.

Modifikationen zum Antrag

Zum Zeitpunkt der Beantragung (09/2020) planten wir Untersuchungsmodalitäten ein, welche letztlich nicht durchführbar waren oder durch andere Methoden ersetzt werden konnten. So sollte eine Genexpressionsanalyse die Ergebnisse der Zytokinmessungen unterstützen, hierzu war eine Kooperation mit der Core Unit DNA-Technologie an der Universität Leipzig geplant. Bis zur Freigabe der Mittel (07/2022) wurde das Speziallabor bedauerlicherweise geschlossen. Anstelle der zunächst geplanten Multiplex Bead-Analyse zur Messung der Zytokinantwort entschieden wir uns dazu, bei einer einheitlichen Analysemethode (ELISA) zu bleiben, welche wir unabhängig von Kooperationen selbstständig an eigenen Geräten durchführen und führten dafür mehr Zytokinmessungen durch als ursprünglich geplant.

Initial geplant war die Untersuchung von Implantaten aus Polyethylen (PE) als Werkstoff. Während die Konstruktion des 3D-Gewebes mit PE-Implantat problemlos gelang, war das Schneiden der Proben technisch nicht möglich ohne das 3D-Gewebe durch Ausreißen des Implantats zu beschädigen. Da ein Großteil der von uns angewendeten Untersuchungsmethodik jedoch intakte Schnitte für Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz voraussetzt, konnten die Versuche mit PE nicht fortgeführt werden.

Da wir jedoch eine ausgesprochen deutliche Biofilmbildung in unserem Modell erwirken konnten, entschieden wir uns über die im Antrag beschriebenen Versuche mit Monokulturen von *S. aureus* und *S. epidermidis* hinaus zusätzlich Versuchsreihen mit polymikrobiellen Biofilmen aus beiden Staphylokokkenspezies anzusetzen. Dies kommt der Situation *in vivo* noch näher, da die Haut immer von einer Mischflora besiedelt ist und *S. epidermidis* ein integraler Bestandteil dieser ist.

3.I. Methodik 3D-Gewebe

3.I.1. Konstruktion des 3D-Gewebes

Das von uns etablierte Modell ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Das Modell basiert auf Fibroblasten (HDFp primäre humane dermale Fibroblasten, CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland, Abbildung 5 A), denen eine humane Keratinozyten-Zelllinie zugeführt wird (HPEK, humane primäre epidermale Keratinozyten, CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Abbildung 5 B). Anschließend erfolgt die Differenzierung des 3D-Gewebes im sogenannten Airlift-Verfahren. Dabei wird das Medium (Abbildung 5 C) nur außerhalb des Zellkulturinserts hinzugefügt. Dadurch bleibt die Keratinozytenoberfläche des Hautäquivalentes der Luft ausgesetzt, wohingegen die Fibroblasten weiterhin über die Insert-Membran von unten Kontakt zum Medium haben. Unter Lufteinfluss und dem erhöhtem Ca^{2+} -Gehalt des Mediums bilden Keratinozyten eine der Epidermis entsprechende Schichtung aus *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* aus (Abbildung 5 D). Nach Zelldifferenzierung und -kultivierung ist das 3D-Gewebe nach insgesamt 30 Tagen fertiggestellt (Abbildung 5 E). Dieses Verfahren führt zu einer mehrschichtigen Epithelstruktur, die die morphologischen und funktionellen Eigenschaften der menschlichen Haut realistisch nachbildet.

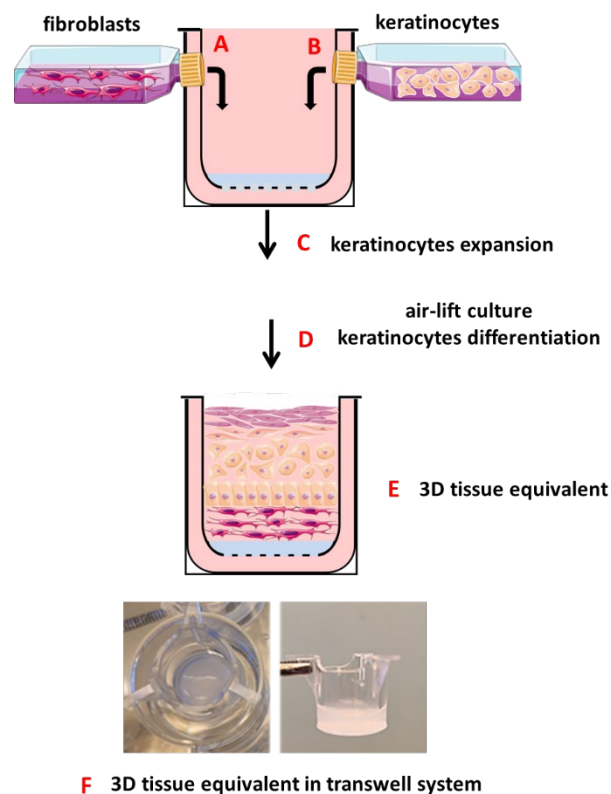


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Kultivierungsprotokolls für den Aufbau des 3D-Gewebemodells. Zunächst wird die dermale Komponente aus Fibroblasten aufgebaut (A) und anschließend mit Keratinozyten übersät (B), welche nach einer Differenzierungsphase eine hauttypische Schichtung aufweisen (D). Anschließend erfolgt die Kultivierung des Hautäquivalents an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche, bis sich eine hauttypische Morphologie und eine dreidimensionale Struktur ausgebildet haben (D-E). Foto des 3D-Gewebes im Transwell-System (F).

3.1.2. Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Es wurden Gewebeschnitte des 3D-Gewebes zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten mit Hämatoxylin-Eosin (Abcam, Cambridge, UK) gefärbt. Die Dicke und Struktur der einzelnen Epidermisschichten wurden mit Hilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Md) ausgemessen und mit Proben aus humanen Hautbiopsien verglichen.

Die Differenzierungsfähigkeit der Keratinozyten im Zellverband wurden durch Immunfärbungen mit den hautspezifischen Markern Keratin 1, Keratin 17, Filaggrin und Involucrin dargestellt. Weiterhin wurden E-Cadherin und ZO-1 als Marker der epithelialen Zell-Zell-Adhäsion nach 30 Tagen Differenzierung untersucht.

3.II. Methodik 3D-Gewebe mit Biofilm

3.II.1. Konstruktion des 3D-Gewebes mit Biofilm

Nach der Etablierung des 3D-Gewebes folgte die Inokulation von Staphylokokken mit bekannter Biofilmproduktion. In den Infektionsgruppen wurden hierzu jeweils 20 µl einer Staphylokokkenkultur mit der festen Konzentration von 10^6 Koloniebildenden Einheiten/ml (KBE/ml) auf die epidermale Oberfläche des 3D-Gewebes pipettiert (Abbildung 6). Diese Bakterienkonzentration beruht auf Erfahrungen aus unseren vorangegangenen Infektionsstudien im Tierversuchsmodell sowie Berichten anderer Forschungsgruppen.³⁹ Die 3D-Modelle wurden in vier Gruppen mit jeweils unterschiedlicher Behandlung aufgeteilt (Abbildung 7). Jeweils eine Gruppe erhielt monomikrobiell die Zugabe von *S. aureus* ATCC 49230 oder *S. epidermidis* Pia 8400. Die dritte Infektionsgruppe wurde mit einer polymikrobiellen Suspension aus beiden Bakterienspezies behandelt, wobei die Bakterienkonzentration insgesamt ebenfalls bei 10^6 KBE lag. Die Kontrollgruppe wurde mit demselben Volumen NaCl benetzt. Die weitere Kultivierung erfolgt im Airlift-Verfahren und Proben zur Analyse können aus dem umgebenden Medium abgenommen und bei -80 °C gelagert werden.

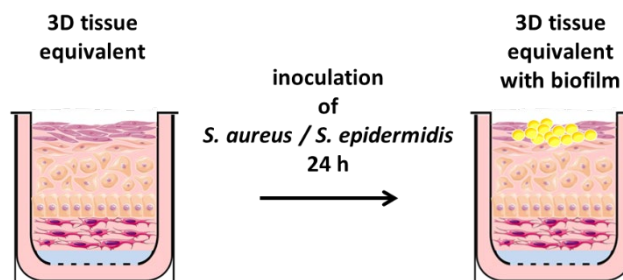


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Konstruktion des 3D-Gewebes mit Biofilm. Auf die in Abbildung 5 dargestellten Prozesse erfolgt die Inokulation von Bakterien. 24 h hiernach erfolgte die Entnahme aller Proben für die weiteren Analysen.

Monomikrobiell 1	Monomikrobiell 2	Polymikrobiell	Kontrolle
<ul style="list-style-type: none">• 20 µl mit 10^6 KBE <i>S. aureus</i> ATCC 49230	<ul style="list-style-type: none">• 20 µl mit 10^6 KBE <i>S. epidermidis</i> Pia 8400	<ul style="list-style-type: none">• 20 µl mit insgesamt 10^6 KBE <i>S. aureus</i> ATCC 49230 und <i>S. epidermidis</i> Pia 8400	<ul style="list-style-type: none">• 20 µl NaCl

Abbildung 7: Übersicht über die Einteilung der Proben in vier Gruppen.

3.II.2. Histologie, Immunfluoreszenz und Zytotoxizität

Zur Untersuchung von Morphologie des 3D-Gewebes und Darstellung des bakteriellen Biofilms wurden Gewebeproben 24 Stunden nach der Infektion mittels H&E untersucht.

In Folge einer Hautinfektion *in vivo* kommt es zu einem Verlust der intakten Hautbarriere, hierdurch wird wiederum die Besiedelung mit weiteren Erregern begünstigt. Daher untersuchten wir den Einfluss der Infektion auf die Zell-Zell-Kontakte des 3D-Gewebes, wie bereits auf Seite 13 beschrieben.

Die Zytotoxizität wurde mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Neben der weit verbreiteten Laktatdehydrogenase (LDH)-Messung wendeten wir auch eine moderne fluoreszenzmikroskopische Technik an, bei welcher der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) markiert und dargestellt wird. AIF löst im Zellzyklus die Einleitung der Apoptose und damit des Zelltods aus. Während die LDH-Messung nur eine Quantifizierung der geschädigten Zellen im gesamten Zellverband angibt, erfolgt bei der AIF-Messung neben der Quantifizierung auch eine räumliche Darstellung der Regionen mit besonders hoher AIF-Produktion. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignalintensität erfolgt im Programm ImageJ und wird in arbitrary units (AU) angegeben.⁴⁰

3.II.3. Entwicklung und Berechnung Biofilmscore

Zur Quantifizierung der Biofilmbildung wurde ein Score entwickelt, welcher anders als bspw. das Auszählen der koloniebildenden Einheiten auch die Gewebedestruktion und damit die Aggressivität der Bakterien gegenüber humanen Zellen als Faktor berücksichtigt. Hierzu wurde ein bereits von uns bei 3D-Pleura angewendetes Scoring-System modifiziert gemäß dem Aufbau des 3D-Gewebes um die Eindringtiefe der Erreger darzustellen. Je höher der Score, desto tiefer sind die apikal applizierten Bakterien eingedrungen und umso mehr Gewebedestruktion wurde beobachtet.³⁷ In Anlehnung an den Gleason-Score, der als prognostischer Parameter beim Prostatakarzinom angewendet wird, erfolgt zusätzlich ein Scoring der Ausprägung des Biofilms und beide Scores werden in Form einer Additionsformel angegeben.⁴¹ Hierzu wurde in digitalisierten histologischen Gewebeschnitten die zweidimensionale Fläche des Biofilms ausgemessen und ins Verhältnis zum 3D-Gewebe gesetzt. Zunächst wurde die Fläche der epidermalen Komponente in den histologischen Bildern ausgemessen und gemittelt, diese betrug 41.178 µm². In den untersuchten Bildausschnitten liegt das Verhältnis von Epidermis zu Dermis bei ca. 1:2. Die durchschnittlich dargestellte Hautfläche beträgt daher 3 x 41.178 µm² = 123.534 µm². Die mit dem Programm ImageJ ausgemessene Fläche des Biofilms setzen wir in Relation dazu.

Tabelle 1: Zuweisung von Merkmalen in Ausprägung des Biofilms und Gewebedestruktion zu einem Grad. Hieraus leitet sich der Biofilm Score ab.

Biofilm Score		
Ausprägung Biofilm	Grad	Ausmaß Gewebedestruktion
Keine Bakterien	0	Intaktes Gewebe
Planktonische Bakterien oder unreifer Biofilm	1	Leichte Destruktion mit Auflösung des Zellverbandes im <i>St. corneum</i>
Biofilm entspricht weniger als 20% der Hautfläche	2	Mäßige Destruktion mit Auflösung des Zellverbandes der zellulären Epidermis
Biofilm entspricht 20% bis 49% der Hautfläche	3	Ausgeprägte Destruktion mit Auflockerung des Zellverbandes der dermalen Komponente
Biofilm entspricht 50% oder mehr der Hautfläche	4	Massive Destruktion mit vollständiger Aufhebung der Gewebearchitektur

Formel zu Berechnung der Biofilm Grade 2 bis 4:

$$\text{Grad Ausprägung Biofilm} = \frac{\text{Fläche Biofilm} [\mu\text{m}^2]}{123.534 \mu\text{m}^2} \times 100 \%$$

Die Angabe des Scores in einer Additionsformel lässt eine Einschätzung der Aggressivität der Erreger zu. Ein Bakterium mit einem Score von $3+1=4$ ist zwar ein starker Biofilmbildner, greift die Zellen aber weniger an als ein Bakterium mit einem Biofilm Score von $2+2=4$.

3.III. Methodik 3D-Gewebe mit Implantat

Nach erfolgreicher Etablierung und genauer Charakterisierung der Infektion in den 3D-Gewebeäquivalenten folgte der Schritt der Integration des Implantates in das Modell.

3.III.1. Konstruktion 3D-Gewebe mit Implantat

Das 3D-Gewebemodell besteht wie auf Seite 12 unter beschrieben aus einer oberen Keratinozytenschicht und einer unteren Fibroblastenschicht. Das Implantat wird für dieses Modell in einem Zwischenstadium der Kollagenpolymerisierung in der Kollagen-Fibroblasten-Matrix platziert und anschließend mit Keratinozyten übersät (Abbildung 8 Seite 15). So wird gewährleistet, dass das Implantat einerseits vollumfänglich in Zellen eingebettet ist und andererseits die Ernährung der Fibroblasten über die Membran gesichert ist. Anschließend erfolgt im Rahmen weiterer Kultivierung die Differenzierung des Hautäquivalents an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche, bis sich die beschriebene hauttypische Morphologie und eine dreidimensionale Struktur ausgebildet hat. In dieser Form kann das 3D-Gewebe zur Erforschung der Reaktion menschlicher Hautzellen auf Implantate unterschiedlicher Werkstoffe verwendet werden (Abbildung 8 G).

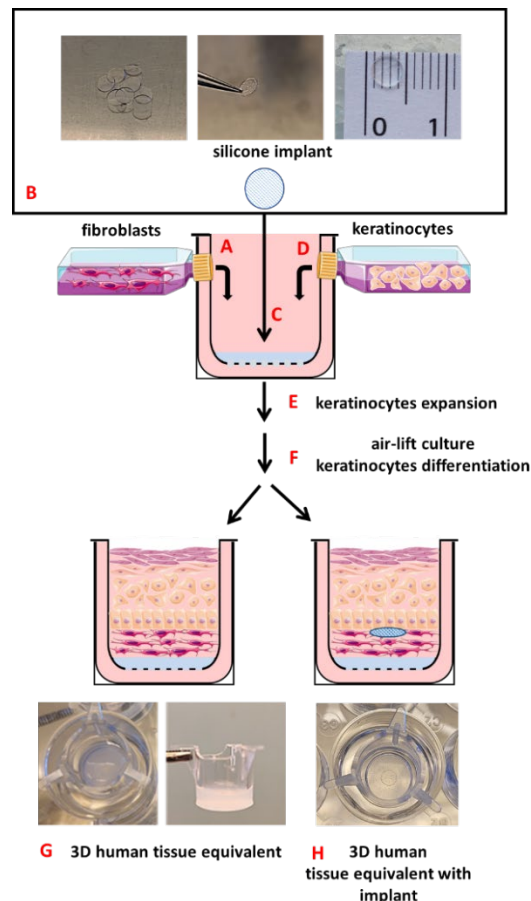


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Kultivierungsprotokolls für die Untersuchung von Implantatinfektionen im 3D-Gewebemodell. Zunächst wird die dermale Komponente aus Fibroblasten aufgebaut (A). Nach zehn Tagen Wachstumsphase werden Silikonproben in der Kollagen-Fibroblasten-Matrix platziert (B) und mit Keratinozyten übersät (C). Nach Konstruktion des 3D-Modells wird dieses drei Tage in Medium C kultiviert (D). Anschließend erfolgt die Differenzierung des Hautäquivalents an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche bis sich eine hauttypische Morphologie und eine dreidimensionale Struktur ausgebildet haben (E). Die ausdifferenzierten Hautäquivalente werden mit *S. aureus* infiziert (F) und die Biofilm-assoziierte Implantatinfektion im 3D-Gewebemodell untersucht (G).

3.III.2. Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Siehe entsprechender Abschnitt Seite 13.

3.III.3. Analyse der Zytotoxizität und Immunantwort

Keratinozyten treten aufgrund ihrer exponierten anatomischen Positionierung an der Außenschicht des Integuments besonders intensiv mit Fremdkörpern sowie Krankheitserregern und deren Virulenzfaktoren in Kontakt. Zu ihren Abwehrmechanismen gehört die Expression proinflammatorischer Zytokine, welche der Kommunikation dienen und bspw. den Zustrom von Immunzellen einleiten. Für unsere Studie bestimmten wir daher die Expression der entzündungsfördernden Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-33, TNF α und MCP-1 mittels ELISA aus den Kulturunterständen an den Tagen 5, 10, 15, 20, 25 und 30 der von mindestens neun Kokulturen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt und die statistische Signifikanz mittels t-Test überprüft.

Zusätzlich erfolgte zu den genannten Zeitpunkten die Bestimmung der LDH im Kulturunterstand als Maß für den Zelltod und damit die Zytotoxizität.

3.IV. Methodik 3D-Gewebe mit Implantatinfektion

Nach Etablierung und Validierung des Infektions- sowie des Implantatmodells sollten im letzten Schritt beide kombiniert werden als Modell für eine Implantatinfektion.

3.IV.1. Konstruktion 3D-Gewebe mit Implantatinfektion

Hierzu erfolgte zunächst die Kultivierung der Zellen mit einem innenliegenden Implantat wie auf Seite 15 beschrieben. Zusätzlich erfolgte die Bakterieninokulation wie auf Seite 13 beschrieben. Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

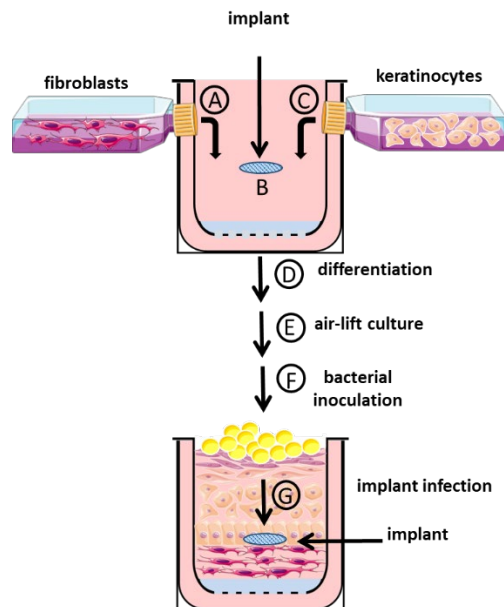


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Kultivierungsprotokolls für die Untersuchung von Implantatinfektionen im 3D-Gewebemodell. Zunächst wird die dermale Komponente aus Fibroblasten aufgebaut (A). Nach zehn Tagen Wachstumsphase werden Silikonproben in der Kollagen-Fibroblasten-Matrix platziert (B) und mit Keratinozyten übersät (C). Nach Konstruktion des 3D-Modells wird dieses drei Tage in Medium C kultiviert (D). Anschließend erfolgt die Differenzierung des Hautäquivalents an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche bis sich eine hauttypische Morphologie und eine dreidimensionale Struktur ausgebildet haben (E). Die ausdifferenzierten Hautäquivalente werden mit *S. aureus* infiziert (F) und die Biofilm-assoziierte Implantatinfektion im 3D-Gewebemodell untersucht (G).

3.IV.2. Histologie

In histologischen Schnitten nach H&E-Färbung beurteilten wir die Konfiguration des 3D-Gewebes um das Implantat herum sowie die Ausbreitung der Bakterien.

3. IV.3. Analyse der Zytotoxizität und Immunantwort

Um zu beurteilen, wie zellschädigend sich eine Implantatinfektion auswirkt, nahmen wir LDH-Messungen vor. Zudem führten wir Konzentrationsmessungen für die Zytokine IL-1 α , IL-6, TNF α und MCP-1 durch wie auf Seite 16 beschrieben.

3.IV.4. FISH-Analyse

FISH ist eine mikroskopische Methode, die die Vorteile von Molekularbiologie, Fluoreszenzmikroskopie und Histologie miteinander vereint. FISH basiert auf Fluoreszenz-markierten Sonden, die Sequenz-spezifisch an die ribosomale RNA (rRNA) der Mikroorganismen binden (Abbildung 10). So werden Bakterien und Pilze Genus- oder Spezies-spezifisch unter dem Mikroskop sichtbar und nachweisbar. Die FISH misst zudem die (Rest-) Aktivität der Mikroorganismen basierend auf dem Ribosomengehalt auf einem single-cell-level.

Fluorescence in situ hybridization = FISH

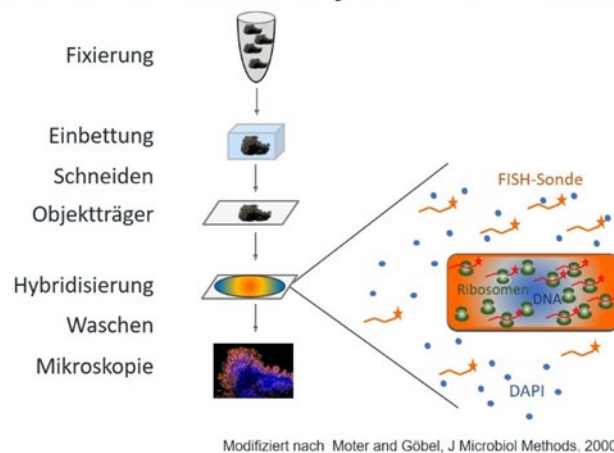


Abbildung 10: Schematische Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte der FISH-Methodik. Die Markierung der ribosomalen RNA macht in der Fluoreszenzmikroskopie Bakterien sichtbar und erlaubt eine Einschätzung ihrer Aktivität.

Im vorliegenden Projekt wurden die 3D Gewebeprobe in FISHopt (MoKi Analytics, Berlin, Germany) fixiert, in Methacrylat eingebettet und geschnitten wie beschrieben.⁴² Für die spezifische Visualisierung wurden die pan-bakterielle Sonde EUB338, die Staphylokokken Genus-spezifische Sonde STAPHY, die *S. aureus* spezifische Sonde SAU, und eine negative Kontrollsonde NonEUB338 benutzt sowie die Nukleinsäuren mit DAPI angefärbt.^{43,44} Nach einer zweistündigen Inkubation in einer dunklen, feuchten Kammer bei 50 °C wurden die Objektträger mit Wasser abgespült, an der Luft getrocknet und für die Mikroskopie mit einem Epifluoreszenzmikroskop (AxioImagerZ2; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit Schmalband Filtersätzen (AHF-Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) ausgestattet.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

4.I. Ergebnisse 3D-Gewebe

Zur Entwicklung eines *in vitro*-Zellkulturmodells, welches die Komplexität der 3D-Architektur und die phänotypischen Merkmale von *in-vivo*-Gewebe nachahmt, optimierten wir mehrere experimentelle Parameter, darunter das Verhältnis der beiden Zelltypen (HPEK und HDFp) zu einander. Wir überprüften H&E-Färbungen der humanen Hautbiopsien verschiedener Patienten und stellten fest, dass das Verhältnis von Keratinozyten zu Fibroblasten bei 8:1 liegt.

4.I.1. Stratifizierung des 3D-Gewebes

Zur Herstellung eines 3D-Gewebes wurden humane Keratinozyten und Fibroblasten, wie in Abbildung 5 Seite 12 grafisch dargestellt, ausgesät. Durch die Anordnung der Keratinozyten auf der Kollagen-Matrix mit eingebetteten Fibroblasten, entstand eine organotypische 3D-Co-Kultur. Unter Luftinfluss und einem erhöhtem Ca^{2+} -Gehalt im Medium differenzierte sich diese organotypische 3D-Co-Kultur, indem es zur Bildung der entsprechenden Schichtung aus Dermis und Epidermis mit *St. corneum* kommt. Mittels H&E-Färbung konnte im direkten Vergleich mit menschlicher Haut (Abbildung 10 a) gezeigt werden, dass die Keratinozyten eine kontinuierliche Monoschicht auf der 3D-Fibroblastenmatrix ausbildeten (Abbildung 10 b). Die Hautproben wurden von Patienten gewonnen, die sich einer Abdominoplastik am Universitätsklinikum Leipzig, Deutschland, Bereich Plastische Chirurgie unterzogen (genehmigt von der Ethikkommission der Universität Leipzig (434/20-ek)). Durch den direkten Kontakt beider Zelltypen im 3D-Gewebe wird die *in vivo* physiologische parakrine Signalübertragung besser modelliert, hierin besteht ein relevanter Vorteil gegenüber den bislang hauptsächlich verwendeten 2D-Kulturen.

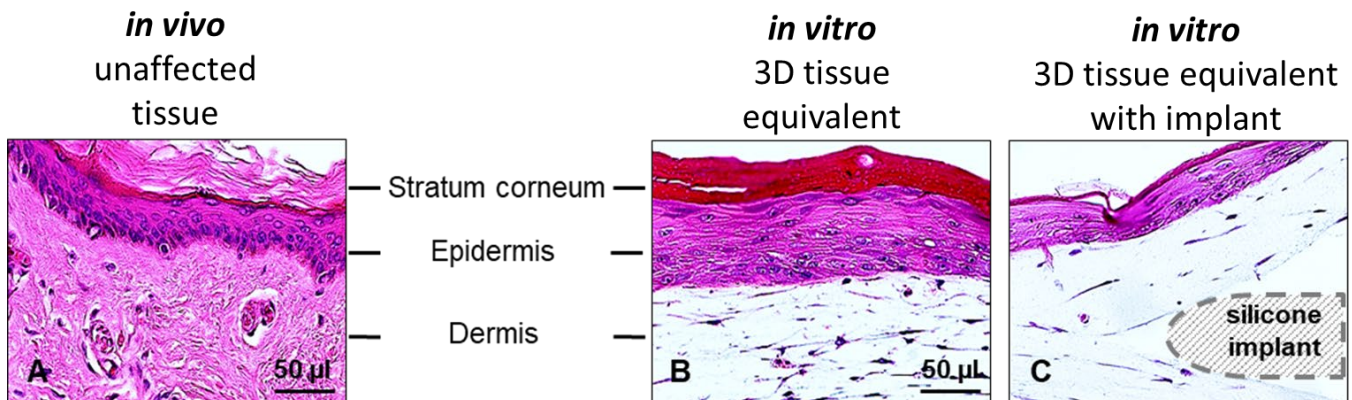


Abbildung 11: Vergleich der (a) humanen Haut mit (b) dem 3D-Gewebeäquivalent. Hämatoxylin- und Eosinfärbung (H&E) der menschlichen Haut (Biopsie) (a). H&E-Färbung eines 3D-Gewebe-modells mit humanen dermalen Fibroblasten in der Kollagen-I-Matrix und humanen primären dermalen Keratinozyten in der obersten Schicht (b). Position des Silikonimplantats (SI) intradermal im 3D-Gewebeäquivalent markiert durch schraffierte Fläche (c). Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 50 µm.

Um ihre biologischen Aufgaben zu erfüllen, gliedert sich die Haut in drei unterschiedliche Schichten mit unterschiedlichen Funktionalitäten: die Oberhaut (Epidermis) mit Hornschicht (*St. corneum*), *St. granulosum*, *St. spinosum* und *St. basale*, die Lederhaut (Dermis) und die Unterhaut (Subcutis). Ein 3D-Gewebeäquivalent zur Beurteilung von Infektionsverläufen und Beantwortung der Fragestellung, ob Bakterien durch intakte Haut eindringen können, muss diese Stratifizierung daher imitieren. In der Immunfluoreszenz zeigte sich im direkten Vergleich mit menschlicher Haut die gleiche stratifizierte Verteilung der wichtigen Markerproteine der verschiedenen epidermalen Schichten, wie sie physiologischerweise von der Haut exprimiert werden (Abbildung 11).

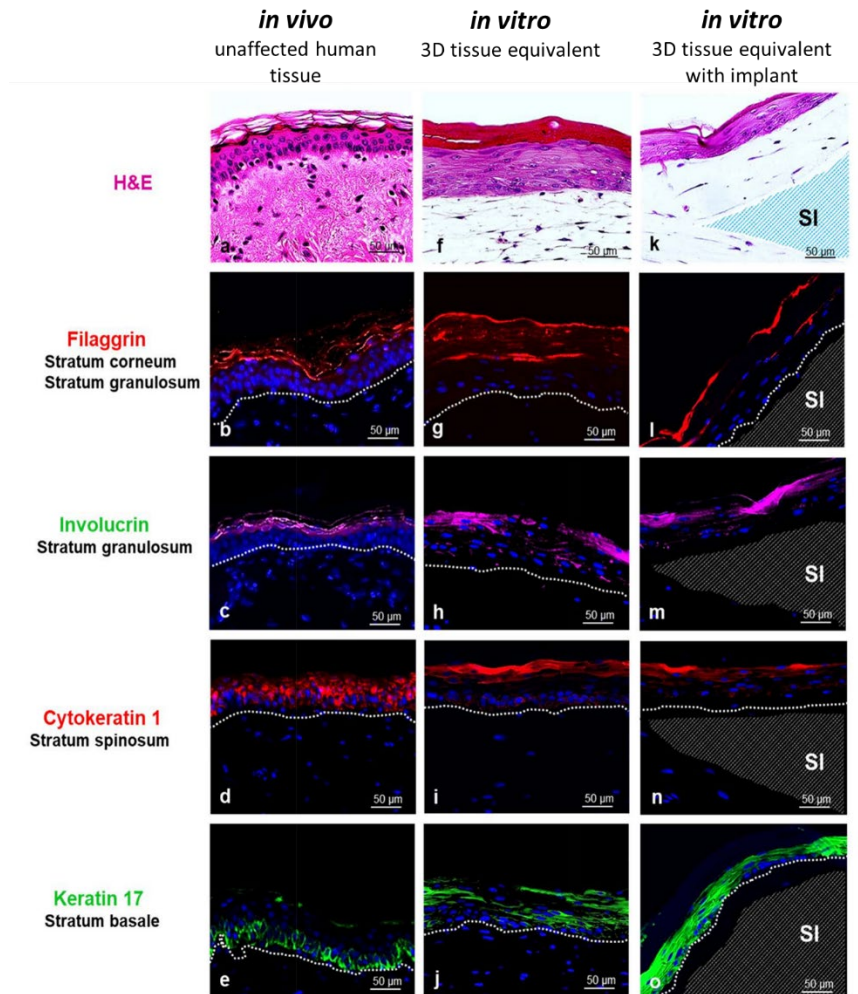


Abbildung 12: Charakterisierung des 3D-Gewebemodells und humaner Haut. Histologie unauffälliger humaner Hautproben (a-e), des 3D-Gewebemodells (f-j) sowie des 3D-Gewebes mit Silikonimplantat (k-o). H&E-Färbung der 3D-Gewebe mit der Abgrenzung zwischen Epidermis und Dermis (punktierte Linie), humanen dermalen Fibroblasten in der Kollagen-I-Matrix und humanen primären dermalen Keratinozyten in der obersten Schicht (a) und H&E der humanen Haut (f). Immunfluoreszenzfärbung humaner Haut (b-e), des 3D-Gewebes (g-j) sowie des 3D-Gewebes mit Implantat (l-o) (20x) für Filaggrin (rot) (b, g), Involucrin (grün) (c, h), Cytokeratin (rot) (d, i), Keratin 17 (grün) mit Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Die Kontrollen, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde, zeigen keine unspezifische Bindung. Maßstabsbalken = 50 µm.

4.1.2. Zell-Zell-Kontakte des 3D-Gewebes

Die Haut ist ein multifunktionelles Organ mit einer zentralen Rolle beim mechanischen und immunologischen Schutz des Körpers, der Reizaufnahme, des Stoffaustauschs, der Regulierung des Wärmehaushaltes, der Filtration und Absorption. Die Zell-Zell-Kontakte der Keratinozyten sind die Basis für diese Barrierefunktion und auch bei der Wundheilung und Immunantwort von zentraler Bedeutung. Ein valides Hautäquivalent benötigt daher ebenfalls ausreichende Zell-Zell-Kontakte (Tight junctions, TJ). Abbildung 12 zeigt das Expressionsmuster der beiden Proteine E-Cadherin und ZO-1, welche die Adhäsionsmoleküle der TJ aufbauen, in menschlicher Haut sowie unserem 3D-Gewebe. In unserem 3D-Gewebe sind die TJ-Proteine entlang der Zellmembran zwischen benachbarten HPEK ausgerichtet. Da die TJ sich zwischen vitalen Keratinozyten ausbilden, sollten sie im Bereich der avitalen, verhornten Zellen des *St. corneum* und an der Membran der Fibroblasten fehlen. Dieses erwartete Expressionsmuster konnte in unserem 3D-Gewebe dargestellt werden, äquivalent den menschlichen Hautproben. Die morphologische Analyse der TJ-Proteine zeigt damit, dass HPEK in unserem 3D-Gewebe polarisieren und gut entwickelte, interzelluläre Verbindungen ausbilden können, somit wiesen wir eine funktionelle Kopplung und Interaktion der HPEK-Zellen untereinander nach.

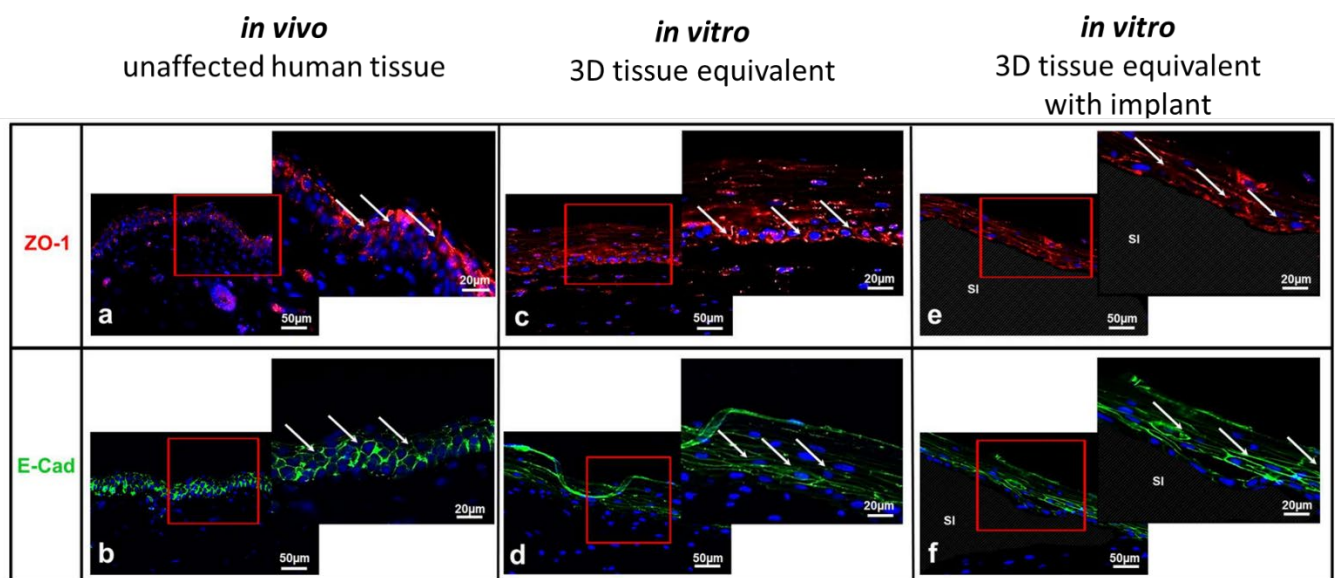


Abbildung 13: Expression der Tight Junctions (TJ) im 3D-Gewebe. Fluoreszenzfärbung menschlicher Haut (a, b), des 3D-Gewebes (c, d) sowie des 3D-Gewebes mit Silikonimplantat (SI) (e, g). Lokalisierung von E-Cadherin und ZO-1-Proteinen im 3D-Gewebe (c, d). Die Färbung von E-Cadherin (purpur) und ZO-1 (gelb) zeigt deutlich die Zellmembranen von HDEK in der Epidermis. Die Zellkerne wurden mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (blau) gegengefärbt. Die Pfeile markieren TJ. Der rote Kasten markiert den Bereich des rechts davon gezeigten vergrößerten Ausschnitts. Humane Fibroblasten zeigen keine Expression von E-Cadherin und ZO-1 an Zellmembranen. Die Kontrollen, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde, zeigen keine spezifische Färbung. Maßstabsbalken = 50µm.

4.II. Ergebnisse 3D-Gewebe mit Biofilm

4.II.1. Biofilmbildung

Wie in Abbildung 13 b dargestellt, weisen histologische Schnitte der Kontrollgruppe, die in einem bakterienfreien Medium kultiviert wurden, eine vollständig intakte Gewearchitektur mit *St. corneum*, *St. granulosum*, *St. spinosum* und *St. basale* auf einer dermalen Komponente mit Fibroblasten auf.

24 h nach der Applikation der Bakteriensuspensionen auf die apikale Seite des 3D-Gewebes zeigten sich unterschiedliche Muster der Bakterienausbreitung und Biofilmbildung in den Gruppen. In allen monomikrobiellen Proben konnte histologisch Biofilmbildung nachgewiesen werden. Bemerkenswert war hierbei, dass der *S. aureus* Biofilm häufig der Epidermis auflag und lediglich das *St. corneum* angriff. Der *S. epidermidis* Biofilm hingegen drang tiefer in das 3D-Gewebe ein und bildete sich häufig zwischen dermalen und epidermalen Komponente aus. Das histologische Bild in den polymikrobiellen Proben hingegen differierte hiervon deutlich. Die Ausprägung des Biofilms war geringer, dafür die Gewebedestruktion vorangeschritten, Bakterienkolonien waren hier im Großteil der Proben bis in die dermale Komponente vorgedrungen und die Epidermis war aufgelöst, ihre Stratifizierung nicht mehr erkennbar. Trotz des kompetitiven Verhältnisses beider Spezies scheinen synergistische Effekte zu bestehen, welche eine Infektion aggressiver verlaufen lassen.

Dies spiegelt sich auch im Biofilmscore wieder. Für die *S. aureus* Proben lässt sich eine weniger stark ausgeprägte Biofilmbildung und geringere Gewebedestruktion ablesen als für *S. epidermidis* und die Mischbiofilminfektion.

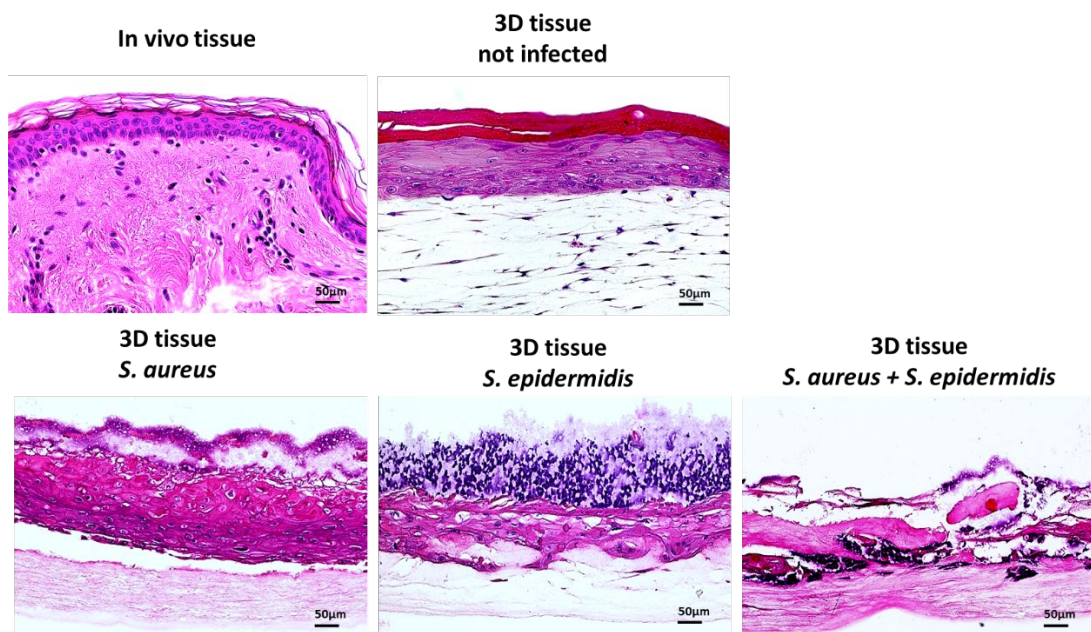


Abbildung 14: H&E-Färbung einer menschlichen *in vivo* Hautprobe (a), 3D-Gewebe (b) sowie 3D-Gewebe 24 h nach Inokulation mit *S. aureus* (c), *S. epidermidis* (d) und einem polymikrobiellen Biofilm aus *S. aureus* und *S. epidermidis* (e). Vergrößerung 20x. Maßstabsbalken 50 µm.

Tabelle 2: Median des ermittelten Biofilm Scores sowie seiner Komponenten Ausprägung des Biofilms und der Gewebedestruktion ermittelt für jeweils zehn repräsentative Proben der monomikrobiellen oder des polymikrobiellen Biofilms.

Gruppe	Grad Biofilm (Median)	Grad Gewebedestruktion (Median)	Summe Biofilm Score (Median)
<i>S. aureus</i>	2	2	4
<i>S. epidermidis</i>	3	3,5	7
<i>S. aureus + S. epidermidis</i>	2,5	3,5	6

4.II.2. Einfluss der Biofilmbildung auf Zell-Zell-Kontakte des 3D-Gewebes

Eine im Forschungsantrag formulierte Frage, welche durch unser Projekt beantwortet werden sollte, war ob die Bakterien transzellulär oder interzellulär in die Tiefe migrieren. Daher untersuchten wir erneut, wie stark Zell-Zell-Kontakte in der Epidermis ausgeprägt sind. Diese liegen wie Mörtel zwischen den Keratinozyten, welche wie Ziegelsteine die Epidermis aufbauen. In Übereinstimmung mit dem Eindruck aus den H&E-Schnittbildern wird diese Gewebearchitektur in allen drei Gruppen aufgelöst. Die vormalig bestehende Architektur der Keratinozyten und ihrer Zell-Zell-Kontakte ist bei *S. aureus* deutlich gestört. Die Reduktion der Tight Junctions durch *S. aureus* Infektion ist ein wohl bekannter Mechanismus.⁴⁵ Die Struktur der Epidermis wird auch durch *S. epidermidis* aufgelöst. Durch den polymikrobiellen Biofilm wird der Zellverband vollständig aufgelöst, entsprechend einer massiven Destruktion (Abbildung 14). Auffällig war zudem, dass der *S. epidermidis* Biofilm durch die Färbung für ZO-1 ebenfalls markiert wurde und pink fluoreszierte. Diese pinke Fluoreszenz fehlte bei den Proben mit *S. aureus*. Diese Differenzierung war in dieser speziellen Färbetechnik nicht beabsichtigt, deckt sich jedoch mit der Darstellung rein monomikrobieller Biofilme in der FISH-Diagnostik. Ein so ausgeprägte Biofilmrassen kam in den polymikrobiellen Proben nicht zu Darstellung. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die beiden kompetitiven Spezies sich gegenseitig in der Ausbildung ihres Biofilms hindern, jedoch gleichzeitig mehr Gewebedestruktion verursachen.

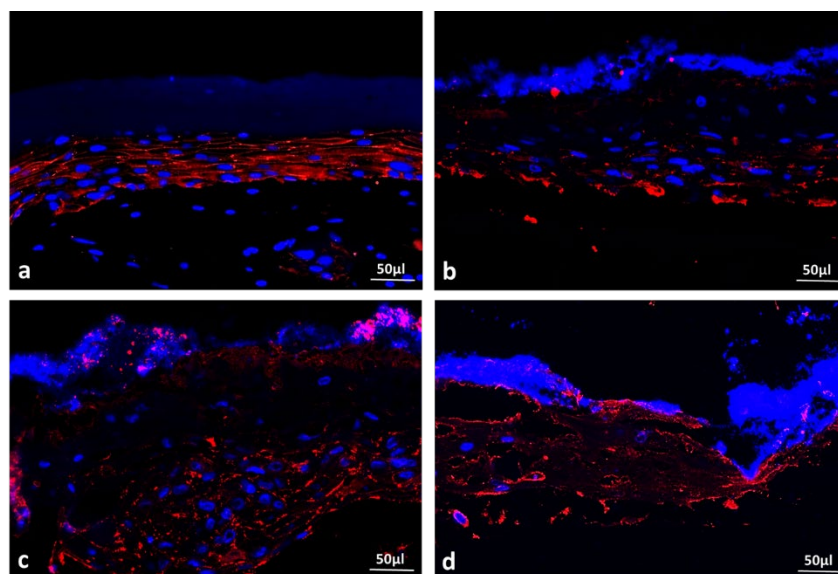


Abbildung 15: Repräsentative Ausschnitte aus der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Gewebeschnitten aus sterilem 3D-Gewebe (a) sowie 24 h nach Inokulation von *S. aureus* (b), *S. epidermidis* (c) sowie einer polymikrobiellen Suspension aus *S. aureus* und *S. epidermidis*. Darstellung der Tight junctions mit Antikörpern gegen ZO-1 (rot). Markierung der Zellkerne mit DAPI (blau). Vergrößerung 20-fach, Maßstabsbalken 50 µm.

4.II.3. Zytotoxizität des Biofilms

Histologisch ließ sich die Gewebedestruktion klar visualisieren, wobei das Ausmaß beim polymikrobiellen Biofilm deutlich höher war als im monomikrobiellen Biofilm. Dies bestätigte sich in den LDH-Messungen, hier lag der Wert signifikant über dem der monomikrobiellen Biofilme (Abbildung 15).

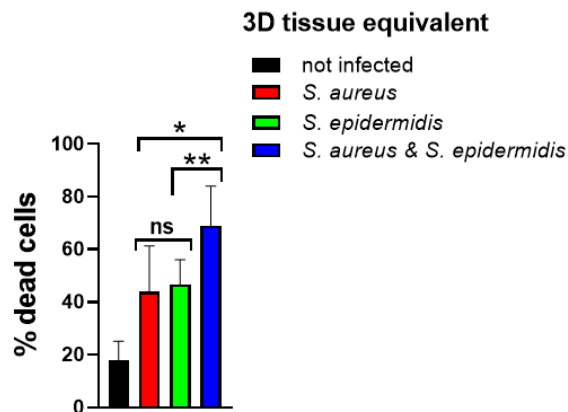


Abbildung 16: Grafische Darstellung der Durchschnittswerte toter Zellen (% dead cells) des 30 Tage gereiften 3D-Gewebes 24 h nach Inokulation von Monospeziesbiofilm *S. aureus* (rot) oder *S. epidermidis* (grün) sowie Biofilm aus *S. aureus* und *S. epidermidis* (blau). Kontrolle ohne Infektion (schwarz). Ergebnis aus drei unabhängigen LDH-Messungen von n=7 Proben. Statistische Untersuchung mittels ungepaartem t-Test, ns nicht signifikant $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Auch in der Analyse der AIF-Produktion zeigen sich statistisch signifikant höhere Konzentrationen und damit mehr tote Zellen bei der kombinierten Infektion mit *S. aureus* und *S. epidermidis*. Zwischen beiden Spezies in Monokultur zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 16 und Abbildung 17). In Zusammenschau von LDH- und AIF-Messungen kann konstatiert werden, dass polymikrobielle Infektionen von *S. aureus* und *S. epidermidis* *in vitro* zytotoxischer sind als monomikrobielle Infektionen.

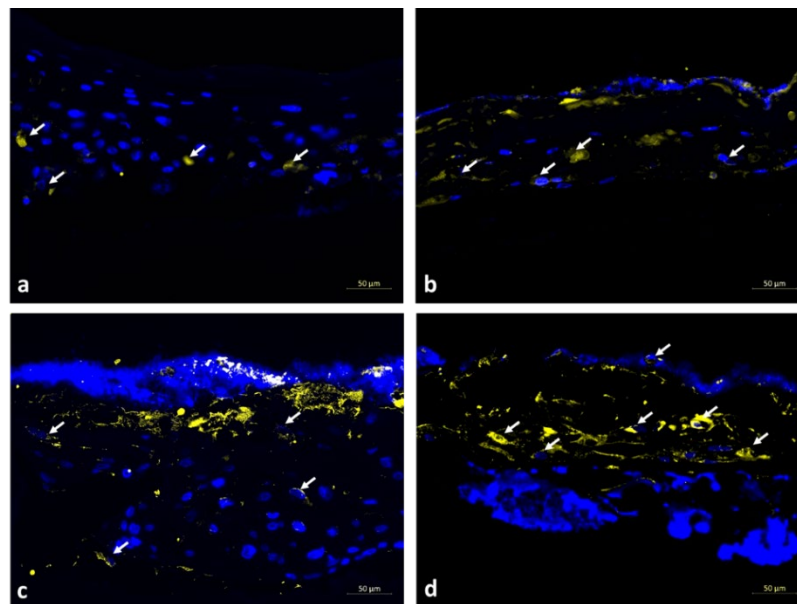


Abbildung 17: Repräsentative Ausschnitte aus der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Gewebeschnitten aus sterilem 3D-Gewebe (a) sowie 24 h nach Inokulation von *S. aureus* (b), *S. epidermidis* (c) sowie einer polymikrobiellen Suspension aus *S. aureus* und *S. epidermidis*. Darstellung und Quantifizierung der AIF-Expression als Marker für den Zelltod. AIF-exprimierende Zellen als Ausdruck des Zelltods mit weißen Pfeilen markiert. Markierung der Zellkerne mit DAPI (blau). Vergrößerung 20-fach, Maßstabsbalken 50 µm.

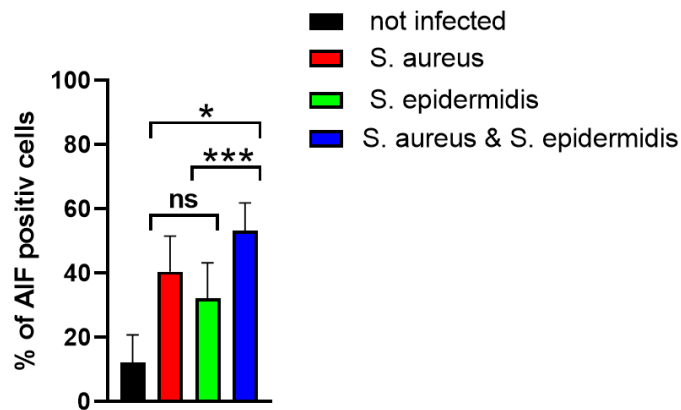


Abbildung 18: Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität AIF-positiver Zellen als Marker für tote Zellen. Darstellung der Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen von n=7 Proben. Statistische Auswertung mittels ungepaartem t-Test, ns nicht signifikant $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4.II.4. Immunantwort des 3D-Gewebes auf Biofilm

Alle untersuchten proinflammatorischen Zytokine (IL-6, IL-8, IL-33, MCP-1 und TNF- α) zeigten einen Anstieg unter Bakterieninokulation (Abbildung 18 Seite 25). Im Detail wurden IL-6, IL-8, IL-33, und TNF- α durch *S. aureus* signifikant mehr provoziert als durch *S. epidermidis*. Einzig MCP-1 wurde durch *S. epidermidis* dreimal so viel freigesetzt wie durch *S. aureus*. Im gemischten Biofilm fiel die MCP-1-Konzentration jedoch wieder auf Niveau der Monoinfektion mit *S. aureus* ab.

In vitro Versuche mit Monozyten zeigten ebenfalls einen Anstieg von IL-6, IL-8 sowie MCP-1 unter Stimulation mit von *S. aureus* und *S. epidermidis* freigesetzten Vesikeln.⁴⁶ Die Zytokinfreisetzung im Modell erfolgt vorwiegend durch die Keratinozyten. Von diesen ist bekannt, dass sie alle von uns untersuchten Zytokine freisetzen.^{47,48} Die *S. aureus* provozierte Freisetzung von MCP-1, TNF- α und IL-6 durch Keratinozyten ist bereits beschrieben und in unserem Modell nachvollziehbar.^{49,50} Auch Fibroblasten, welche die dermale Komponente ausmachen, setzen IL-8 frei als Abwehrmechanismus gegen Bakterien.⁵¹ Die Zytokinkonzentrationen unterschieden sich in unseren Versuchen in Abhängigkeit von untersuchtem Zytokin und Erreger. Die Level im Mischbiofilm entsprechen nicht einer simplen Addition der Konzentrationen im monomikrobiellen Biofilm, woraus sich eine Interaktion der Bakterien untereinander ableiten lässt. Tatsächlich ist bekannt, dass die kommensale Spezies *S. epidermidis* in Konkurrenz mit *S. aureus* lebt und multiple Faktoren produziert, welche sich gegen *S. aureus*, u.a. Lantibiotika und Serinproteasen welche, die Biofilmbildung von *S. aureus* hemmen.⁵²⁻⁵⁴ Somit lässt sich konstatieren, dass unser 3D-Gewebe erstens die Reaktion von humanen Keratinozyten und Fibroblasten im Gewebeverband auf bakterielle Infektionen widerspiegelt und zweitens eine Interaktion verschiedener Spezies in polymikrobiellen Biofilmen erlaubt. Sie stellt damit ein valides Modell für die Biofilmforschung dar.

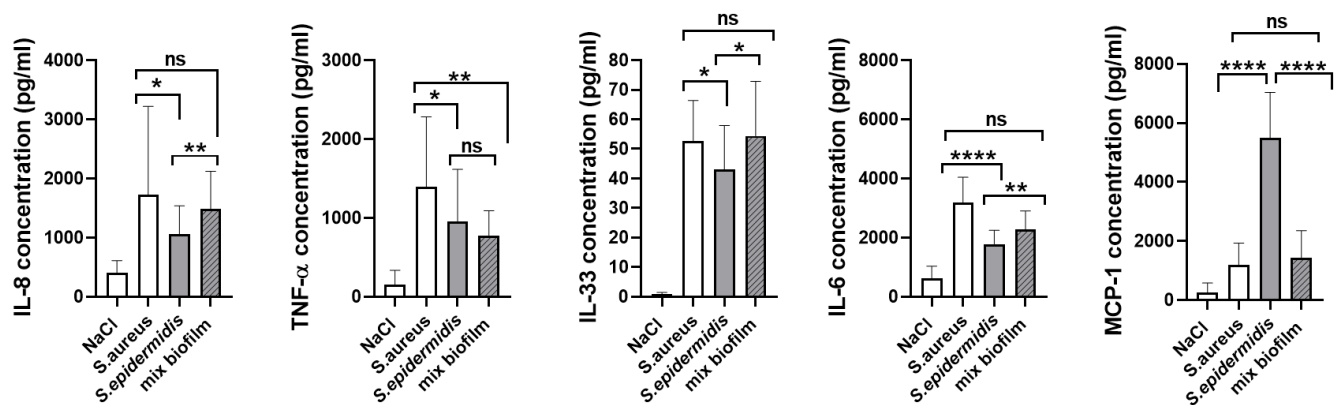


Abbildung 19: Grafische Darstellung der gemessenen Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-8, TNF- α , IL-33, IL-6 sowie MCP-1 im Unterstand des 3D-Gewebes 24 h nach Bakterieninokulation mit *S. aureus* (weiß), *S. epidermidis* (grau) und den Mischbiofilm aus *S. aureus* und *S. epidermidis* (grau schraffiert). Kontrolle mit NaCl. Dreifache Wiederholung der Messung von mindestens $n=7$ Proben mit Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung. Vergleich der Mittelwerte mittels ungepaartem t-Test, ns nicht signifikant $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

4.III. Ergebnisse 3D-Gewebe mit Implantat

Mit viel Aufwand werden Implantatoberflächen modifiziert und aseptische Oberflächenmaterialien entwickelt, um die Gewebekompatibilität zu verbessern und nachfolgende Infektionen zu reduzieren. Während neuartige Oberflächen in zahlreichen *in vivo* und *in vitro*-Modellen getestet wurden, wurde bisher kein *in vitro* 3D-Gewebemodell für die Untersuchung der Wirtsantwort auf die Biofilmbildung etabliert.

4.III.1. Einfluss des Implantats auf Stratifizierung des 3D-Gewebes

In der Histologie nach H&E-Färbung zeigt sich eine Gliederung der 3D in Dermis und Epidermis mit *St. corneum* wie auch in den Proben menschlicher Haut sowie des 3D-Gewebes ohne Implantat (Abbildung 10 Seite 18). Im Vergleich scheint die epidermale Komponente jedoch dünner in den Proben mit Implantat. Die Immunfluoreszenzfärbung der Marker für die Differenzierung und Stratifizierung der Keratinozyten (Erläuterungen siehe Seiten 13 und 18) weist ein Expressionsmuster äquivalent dem in menschlicher Haut und des 3D-Gewebes ohne Implantat nach (Abbildung 11 Seite 19). Auch hier ergibt sich der Eindruck einer Ausdünnung des *St. corneum*. Gleichzeitig zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von Keratin 17 als Marker für das *St. basale*. Das Filamentprotein Keratin 17 ist unter pathologischen Bedingungen wie Inflammationsprozessen der Haut erhöht.^{55,56} Unter Einfluss des Fremdkörpers findet also zwar eine Differenzierung und Polarisierung der Keratinozyten statt. Gemessen an der Schichtdicke der Epidermis scheint diese jedoch eingeschränkt zu sein, wahlweise auf Grund einer durch das Implantat hervorgerufenen Entzündungsreaktion.

4.III.2. Einfluss des Implantats auf Zell-Zell-Kontakte des 3D-Gewebes

Die mittels Fluoreszenzfärbung dargestellte Expression der Adhäsionsmoleküle für die TJ unterschied sich nicht vom Expressionsmuster in menschlichen Hautproben oder des 3D-Gewebes ohne Implantat (Abbildung 12 Seite 20). Das Silikonimplantat hat keinen in diesem Modell nachweisbaren negativen Einfluss auf die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte der Keratinozytenschicht und damit der TJ-vermittelten Barrierefunktion der Haut.

4.III.3. Zytotoxizität der Implantate

In der LDH-Messung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 3D-Gewebeäquivalenten ohne und mit Implantat (Abbildung 19 Seite 26). In Übereinstimmung mit bisherigen Berichten über die Zytokompatibilität von Silikon bestand damit in unserem Modell ebenfalls keine erhöhte Zelltodrate.^{57,58}

4.III.4. Immunantwort des 3D-Gewebes auf Implantate

Für alle sechs untersuchten proinflammatorischen Zytokine zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression in den 3D-Gewebeäquivalenten mit Implantat im Vergleich zu Kontrollen ohne Implantat (Abbildung 16). Dies stimmt überein mit vorhergehenden *in vitro* Studien mit Silikon.⁵⁸ Im 3D-Gewebeäquivalent zeigt sich eine klare proinflammatorische Reaktion der Keratinozyten auf das Silikonimplantat. Damit demonstrierten wir zum einen die Anwendbarkeit unseres 3D-Gewebeäquivalents für die Untersuchung der Biokompatibilität von implantierbaren Materialien, zum anderen das entzündungsfördernde Potential von Silikon. Insbesondere bemerkenswert ist die erhöhte IL-33-Freisetzung. Dieser Marker für akute Entzündungsreaktionen wird von humanen Keratinozyten freigesetzt, nicht jedoch von murinen und unterstreicht damit die Bedeutung und Vorteile von 3D-Gewebeäquivalenten gegenüber den etablierten Tiermodellen.⁵⁹

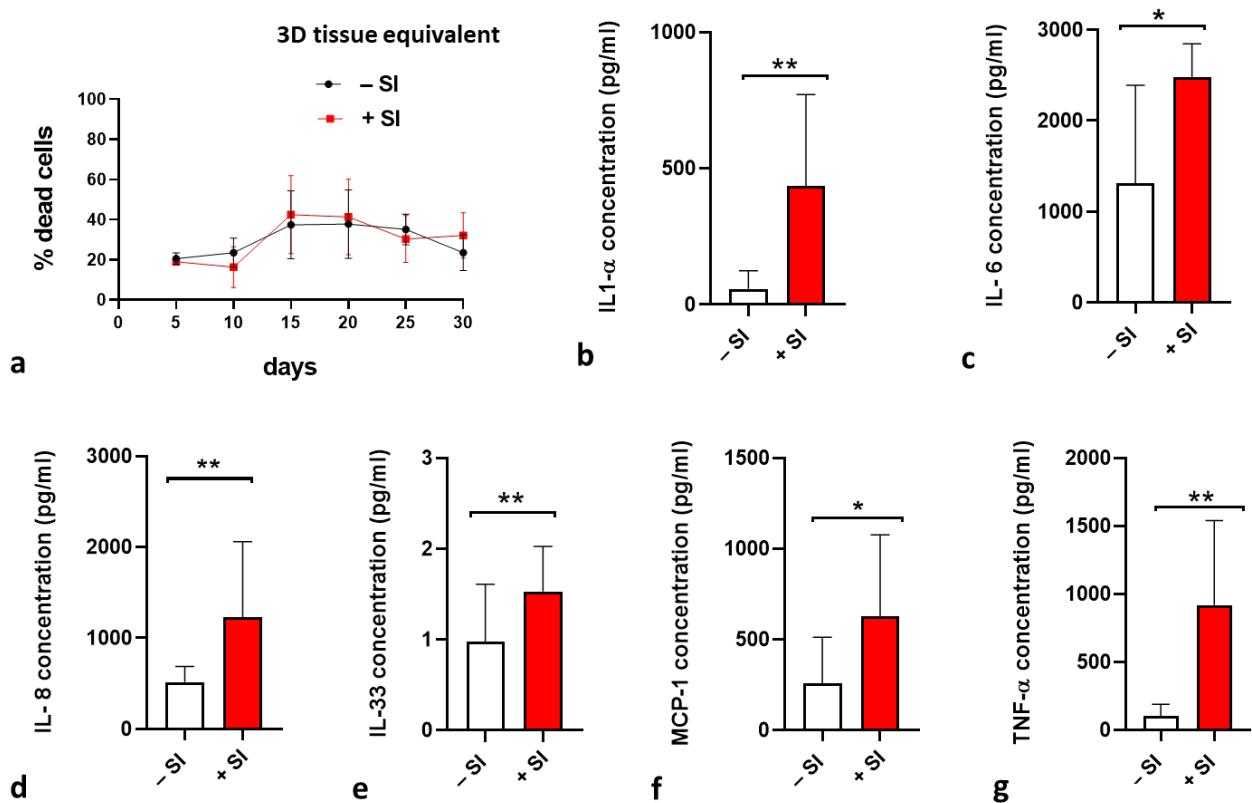


Abbildung 20: Vergleichende grafische Darstellung der durchschnittlichen LDH-Konzentration (a) sowie Expression proinflammatorischer Zytokine (b-g) im 3D-Gewebe ohne (- SI, schwarz in a, weiß in b-g) sowie mit Silikonimplantat (+ SI, rot). Die Grafen stellen den Mittelwert \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Messungen dar. Statistische Auswertung mittels ungepaartem t-Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.IV. Ergebnisse 3D-Gewebe mit Implantatinfektion

4.IV.1. Biofilmbildung und Implantatinfektion

Nach 24 h bakterieller Inokulation bildeten sowohl *S. aureus* als auch *S. epidermidis* reifen Biofilm aus und lösten zudem eine Destruktion des 3D-Gewebes aus. Die für die Mikroskopie notwendige Bearbeitung der Proben durch Fixierung, Schnitt, Färbung und Waschen führte jedoch in mehreren Proben zum Verlust des Implantatmaterials. Dieser Effekt trat insbesondere in den Proben mit Implantatinfektion auf, da das durch die Bakterienwirkung aufgelockerte Gewebe einen weniger festen Zellverband um das Implantat bildete. In den untersuchten Proben zeigte sich tendenziell eine höhere Affinität von *S. aureus* gegenüber der Implantatoberfläche, dies kann jedoch auf Grund der methodischen Einschränkung für *S. epidermidis* nicht ausgeschlossen werden.

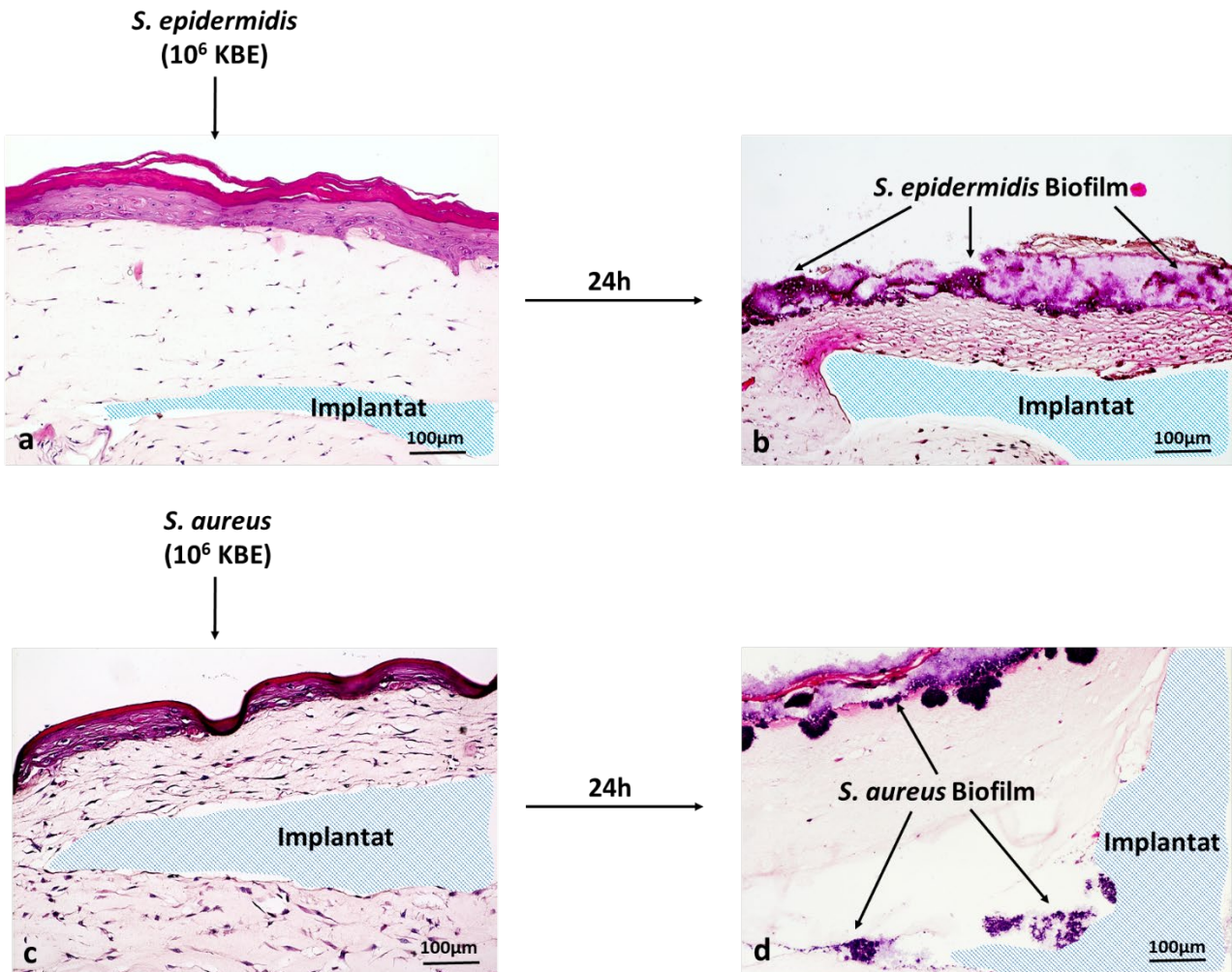


Abbildung 21: H&E-Färbung von Proben aus 3D-Gewebe mit Implantat Probe (a, c) sowie 3D-Gewebe 24 h nach Inokulation mit *S. aureus* (b) und *S. epidermidis* (d). Die schraffierten Flächen markieren die Lage des Implantats, dessen Material im Färbe- und Waschvorgang der Proben ausgeschwemmt wird. Vergrößerung 10x. Maßstabsbalken 100 µm.

Die Bildung reifen Biofilms konnte in den Proben des 3D-Gewebes mit infiziertem Implantat mittels FISH-Analyse nachgewiesen werden. Die 3D-Gewebeproben konnten erfolgreich fixiert und mit genauer Orientierung eingebettet und hybridisiert werden. In allen untersuchten Proben konnten Monospezies *S. aureus* oder *S. epidermidis* Biofilme visualisiert werden. Eine hohe FISH-Aktivität deutete auf sehr gute Kulturbedingungen hin. An Flächen, an denen das *Stratum corneum* gut ausgebildet und geschlossen war, wurde das 3D-Gewebe an der Oberfläche mit Biofilmen besiedelt (Abbildung 21 a und b). An Stellen, wo die Epidermis und tiefere Schichten der Dermis besiedelt wurden, war eine deutliche Degradation des 3D-Gewebes sichtbar (Abbildung 21 c und d).

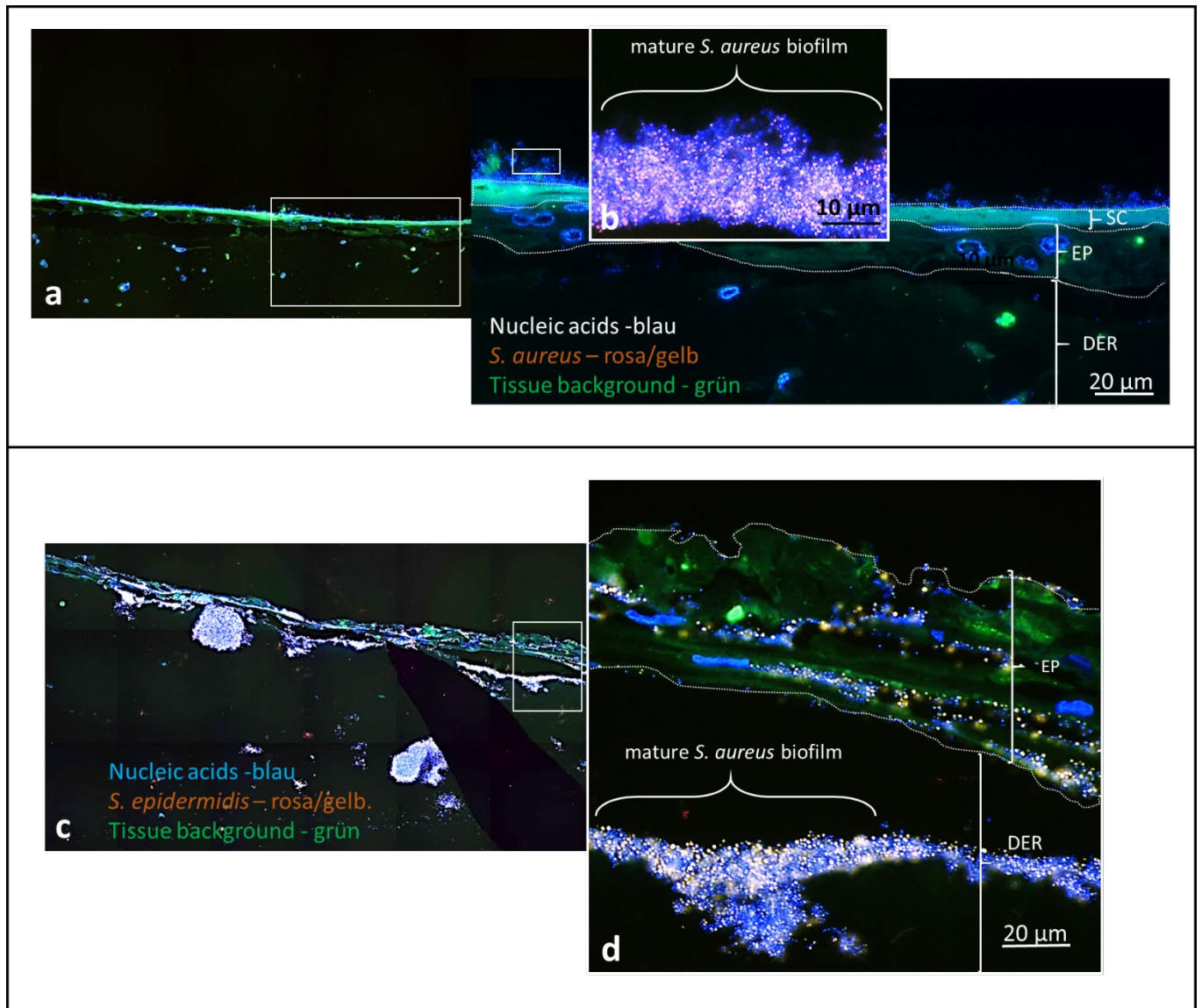


Abbildung 22: FISH-Analyse des 3D-Gewebes zur Visualisierung der räumlichen Verteilung von *S. aureus* (a, b) oder *S. epidermidis* (c, d) im infizierten 3D-Gewebe mit Implantat. Die Bilder a und c zeigen eine Übersicht über 3D-Gewebe mit reifem Biofilm auf der Oberfläche (Maßstabsbalken = 100 µm). In der Übersichtsaufnahme a ist der Biofilm auf dem St. corneum lokalisiert. In der Vergrößerung b sind einzelne FISH-positive Bakterien in gelb/rosa erkennbar, welche einen Biofilm bilden (Maßstabsbalken = 10 µm). In Abbildung c zeigt sich die bakterielle Kolonisation bis in die Dermis hineinreichend mit einem Verlust des St. corneum (Maßstabsbalken = 100 µm). Hoch aktive Kokken sind in d orange markiert und demonstrieren Biofilmbildung im dermalen Anteil des 3D-Gewebe (Maßstabsbalken = 20 µm). SC: Stratum corneum, EP: Epidermis, DER: Dermis.

Sowohl Verteilung als auch Organisation des Biofilms im 3D-Gewebe entsprach dabei *in vivo* gewachsenen Biofilmen, z. B. in chronischen Wunden oder auf dem Polyurethanschwamm bei der Vakuumversiegelung von Wunden (Abbildung 23).⁶⁰ Diese Ergebnisse stützen die Relevanz des entwickelten 3D-Gewebes für Folgestudien.

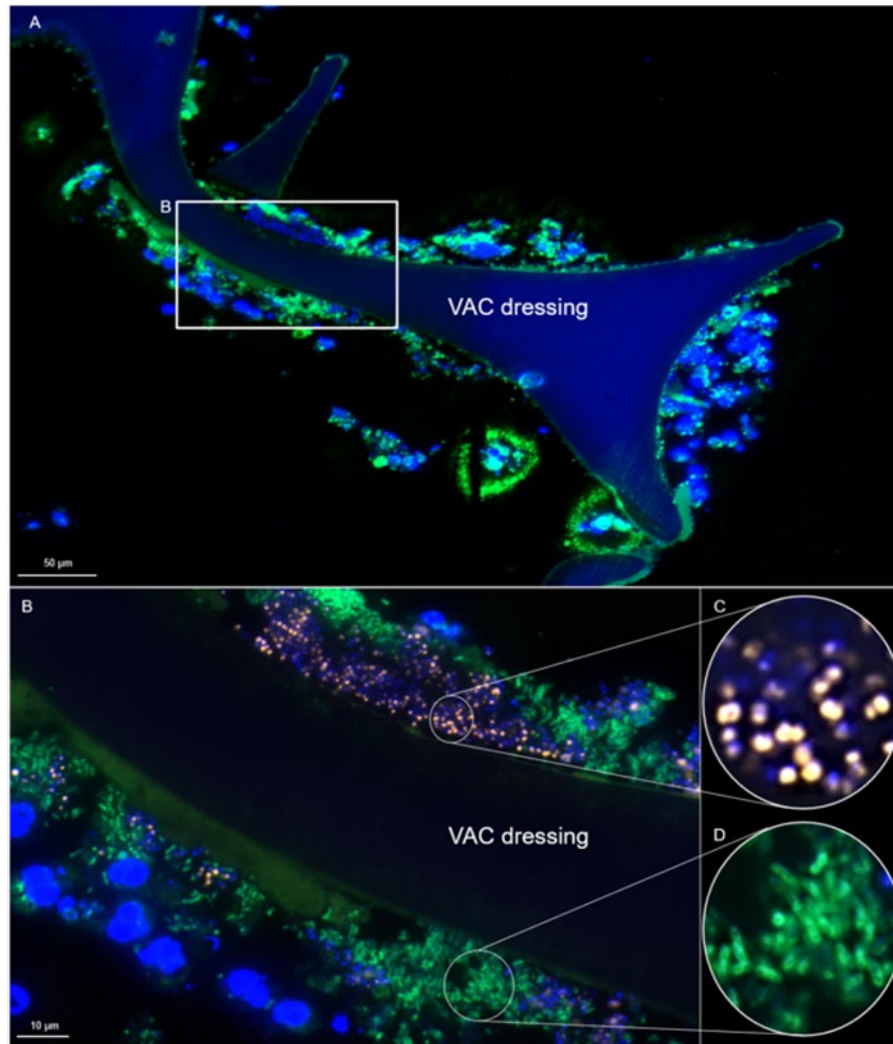


Abbildung 23: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eines Schaums einer Vakuum versiegelung, der kulturpositiv für *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* war. Der Schnitt wurde mit der *Staphylococcus*-genus-spezifischen Sonde STAPHYCY3 und der gattungsspezifischen *Pseudomonas*-Sonde PSMGFITC hybridisiert. DAPI wurde zur Visualisierung von Nukleinsäuren in Wirtszellkernen und Bakterien. (Oben) Die Übersicht zeigt einen mit Wirtszellkernen und bakteriellen Biofilmen kolonisierten Unterdruck-Wundtherapieschaum bakteriellen Biofilmen besiedelt ist. Der Einschub markiert einen Bereich, in dem FISH-positive Bakterien innerhalb der Biofilme sichtbar sind. Bei höherer Vergrößerung (unten) sind die gattungsspezifische *Staphylococcus*-FISH-Sonde (erster runder Einschub, orange) und die gattungsspezifische *Pseudomonas* FISH-Sonde (zweite Runde, grün) zeigen ein starkes Fluoreszenzsignal, das auf aktive Bakterien beider Spezies hinweist.⁶¹

4.IV.2. Zytotoxizität der Implantatinfektion

In Übereinstimmung mit unseren Versuchen zum Silikonimplantat zeigte sich durch bloßes Einbringen eines sterilen Silikonimplantats im 3D-Gewebe keine gesteigerte Zahl toter Zellen, passend zur niedrigen Zytotoxizität von Silikon (siehe Seite 25). Die bloße Inokulation von Bakterien führte zu mehr Zelltod, wie wir bereits in den Versuchen mit Biofilm zeigen konnten (siehe Seite 23). Obwohl die gleiche Anzahl an Bakterien unter gleichen Bedingungen hinzugeführt wurde, zeigt sich bei einem zusätzlich einliegenden Implantat eine deutliche Steigerung des Zelltods (Abbildung 21). Bereits 1957 wurde etabliert, dass das Vorhandensein eines Fremdkörpers die Virulenz von Staphylokokken um das 10.000-Fache erhöht.²⁵ Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist die erleichterte Anhaftung von Bakterien an Implantatoberflächen mit nachfolgender Biofilmbildung und somit letztlich die Vermehrung der Bakterien.

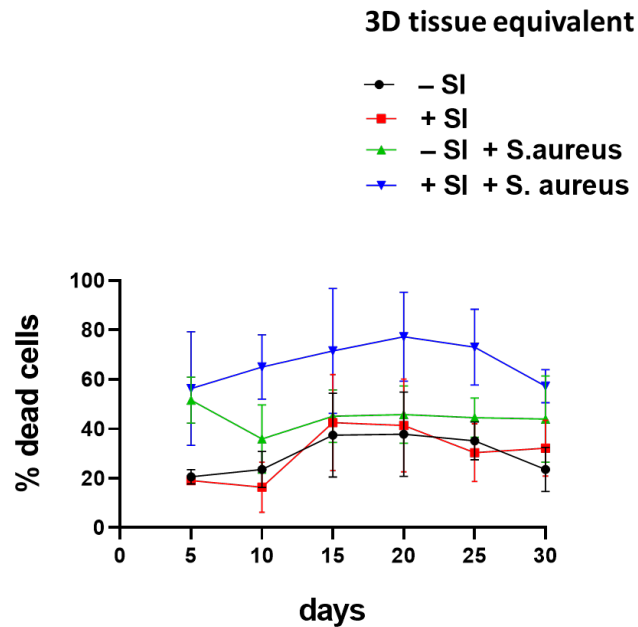


Abbildung 24: Grafische Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung der LDH-Konzentrationen im Kulturunterstand aus drei unabhängigen Messungen mit $n=7$ Proben mit Rückschluss auf den Anteil toter Zellen (x-Achse). Die Messungen wurden jeweils an unterschiedlich lang gereiften 3D-Gewebemodellen vorgenommen (y-Achse). Die volle Reife ist ca. an Tag 25 erreicht. Dargestellt für 3D-Gewebemodelle ohne Silikonimplantat (SI) (schwarz) oder mit sterilem Implantat (rot), sowie ohne Implantat inokuliert mit *S. aureus* (grün) oder Implantat inokuliert mit *S. aureus* (blau).

4.IV.3. Immunantwort des 3D-Gewebe auf Implantatinfektion

Aus unseren vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass das bloße Einbringen eines sterilen Fremdkörpers in unserem 3D-Gewebe eine proinflammatorische Zytokinantwort auslöst (siehe Seite 26), ebenso die Inokulation von Staphylokokken (siehe Seite 24). Im Vergleich werden die von Keratinozyten synthetisierten proinflammatorischen Zytokine nach der Initiierung der Entzündungsantwort durch das Implantat durch eine zusätzliche Infektion auf höchste Expressionsraten getrieben (Abbildung 22). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Implantierung eines Fremdkörpers in das 3D-Gewebemodell die Anfälligkeit und den Schweregrad der Biofilminfektion erhöhen kann.

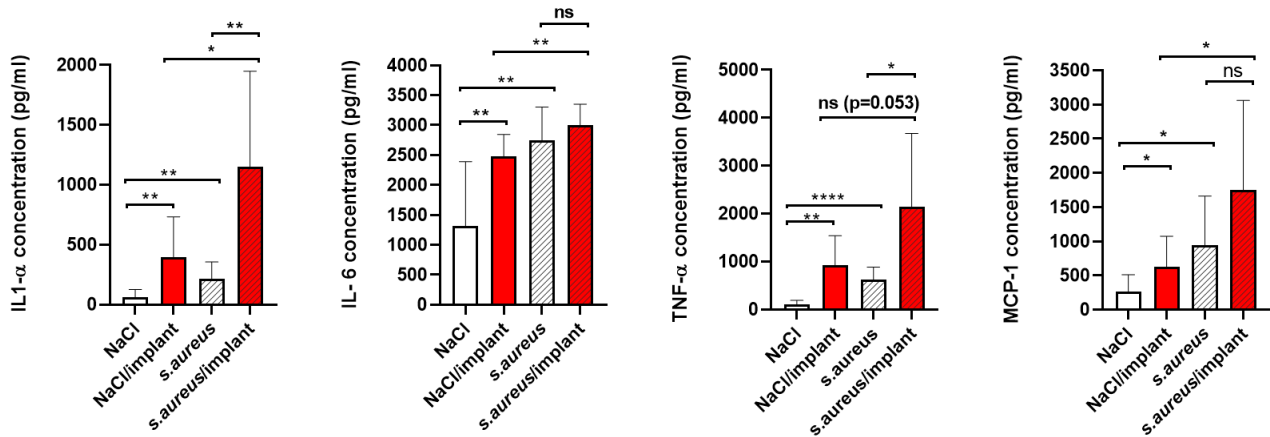


Abbildung 25: Grafische Darstellung der gemessenen Zytokinkonzentrationen aus dem Kulturunterstand von 3D-Gewebekulturen steril (weiß), mit sterilem Implantat (rot), mit *S. aureus* (weiß schraffiert) sowie mit einem mit *S. aureus* besiedelten Implantat (rot schraffiert). Messung von $n=7$ Proben in drei unabhängigen Untersuchungen, Darstellung des Mittelwertes. Statistische Auswertung mittels ungepaartem t-Test, ns nicht signifikant, $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

4.V. Publikationen und Kongressbeiträge

Veröffentlichung

Rima Nuwayhid, Torsten Schulz, Frank Siemers, Jeannine Schreiter, Philipp Kobbe, Gunther Hofmann, Stefan Langer, Olga Kurow.

A Platform for Testing the Biocompatibility of Implants: Silicone Induces a Proinflammatory Response in a 3D Skin Equivalent.

Biomedicines 2024; 12(1)

Druckversion der Publikation im Anhang. Weitere geplante Publikationen siehe Seite 366.

Kongressbeiträge

Kongress	Beitragstitel	Referentin
Gehaltene Präsentationen		
05. Nürnberger Wundkongress 2022	Establishment of a novel test method to analyze in vitro biofilm development with 3D organotypic co-culture	Olga Kurow
06. Nürnberger Wundkongress 2023	A novel in vitro 3D skin equivalent to analyze biofilm development in medical device associated infection	Olga Kurow
Deutscher Wundkongress Bremen 2023	A novel in vitro 3D skin equivalent to analyze biofilm development in medical device associated infection	Olga Kurow
16. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene Essen 2023	A novel in vitro 3D skin equivalent to analyze biofilm development in medical device associated infection	Olga Kurow
26. Chirurgische Forschungstage Mannheim 2023	A novel in vitro 3D skin equivalent to analyze biofilm development in medical device associated infection	Olga Kurow
Akzeptierte Präsentationen 2024		
27. Chirurgische Forschungstage (CFT) 2024	A Novel in vitro 3D Skin Equivalent as a Model for Skin Infections with Polymicrobial Biofilm	Olga Kurow
27. Chirurgische Forschungstage (CFT) 2024	A Platform for Testing the Biocompatibility of Implants: Silicone Induces a Proinflammatory Response in a 3D Skin Equivalent	Olga Kurow
54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische, Rekonstruktive und Ästhetische Chirurgie (DGPRÄC) 2024	Silicone induces Pro-Inflammatory Response in 3D Skin Equivalent	Rima Nuwayhid
07. Nürnberger Wundkongress 2024	3D Human Skin Equivalent as a Tool to Study Wounds with Polymicrobial Biofilms	Olga Kurow

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

Eine Forschungsgruppe aus Hong Kong publizierte 2021 eine 3D-Gewebekultur zur Untersuchung von Infektionen mit Methicillin-resistentem *S. aureus* (MRSA).⁶² Verwendet für die Konstruktion des 3D-Gewebes wurden jedoch HaCaT-Zellen, hierbei handelt es sich um eine unsterbliche Zelllinie von Keratinozyten, welche ursprünglich aus einem bösartigen Hauttumor stammt. Dies ist ein erheblicher Nachteil gegenüber unserem Modell, dass durch die Verwendung von Vorläuferzellen und deren Differenzierung die physiologischen Hautverhältnisse besser abbildet. Letztlich wäre eine Verifizierung der Ergebnisse zu MRSA in unserem Modell sinnvoll.

Dieses Jahr erschien eine Publikation einer Arbeitsgruppe aus Jena, welche ein 3D-Hautmodell nach ähnlichem Prinzip etablierten. Dieser wurden dann auf eine azelluläre Matrix transferiert und eine Wunde induziert und diese infiziert mit *S. aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa*.⁶³ Die Bakterien wurden jedoch nur in Monokultur eingebracht. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Publikation zu einem polymikrobiellen Biofilm in 3D-Gewebe, wie wir sie aktuell vorbereiten.

Die Integration von Fremdkörpern in ein 3D-Gewebe zur Untersuchung der Biokompatibilität erfolgte erstmals 2020, jedoch mit einem perkutan platzierten Material.^{64,65} Unsere Methode des Einbringens des Implantats während des Kultivierungsprozesses gewährleistet, dass das Implantat vollständig von 3D-Gewebe bedeckt ist und spiegelt so die *in vivo* Situation eines Großteils der medizinischen Implantate besser wieder.

Die Integration von Monozyten und Differenzierung zu Makrophagen in 3D-Gewebeäquivalente ist bereits gelungen und ist ein wichtiges nächstes Ziel für unsere Arbeitsgruppe zur noch realistischeren Simulation von Entzündungsprozessen.⁶⁶

Diese Publikationen anderer Forscher unterstreichen die große Relevanz und Aktualität von *in vitro* 3D-Gewebemodellen für die Erforschung von Infektionen und Materialverträglichkeit. Dennoch unterscheiden sich unsere Methoden und Ergebnisse hinreichend, um einen wertvollen eigenständigen Beitrag zu leisten. Wir sehen uns in unserem Vorhaben der Weiterentwicklung des 3D-Gewebes durch Integration weiterer Zelltypen und Gewebearten bestätigt.

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Wie auf Seite beschrieben, wurden im Forschungstrag an die DGUV zwei grundlegende Fragen formuliert. Beide können an Hand der hier vorgestellten Daten aus unseren von der DGUV-finanzierten Untersuchungen eingegrenzt und beantwortet werden.

- *Gelangen biofilmbildende S. aureus und S. epidermidis durch unverletzte Haut zu einem Implantat?*

Sowohl von *S. aureus* als auch *S. epidermidis* ist bekannt, dass einige Stämme Faktoren produzieren, welche die Hautbarriere penetrieren können.^{62,67,68} Von großer Relevanz für die Hautbarriere ist die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zwischen den Keratinozyten der zellulären Epidermis. In unseren Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass sowohl *S. aureus* als auch *S. epidermidis* die Zell-Zell-Kontakte und damit die Hautbarriere auflösen. Verstärkt wurde dieser Effekt durch Applikation beider Bakterienspezies gleichzeitig. Zudem war auch die Gewebeschädigung bei polymikrobiellen Biofilmen deutlich ausgeprägter als bei monomikrobiellen. *S. aureus* ist lediglich fakultativ humanpathogen, scheint jedoch in Kombination mit *S. epidermidis* an Virulenz zu gewinnen. Basierend auf diesen *in vitro* Befunden konnten wir also Hinweise darauf liefern, dass bestimmte Stämme beider Staphylokokkenspezies eine intakte Hautbarriere überwinden könnten und sich dabei gegenseitig in ihrem Effekt verstärken. Vor dem Hintergrund, dass *S. epidermidis* als ubiquitäres kommensales Bakterium des menschlichen Hautmikrobioms bei nahezu jedem Menschen die Haut besiedelt, erhalten diese Erkenntnisse besonderes Gewicht. Es muss also bei jedem Versicherten davon ausgegangen werden, dass einerseits die Gefahr einer Kontamination mit *S. epidermidis* im Rahmen invasiver Maßnahmen besteht. Andererseits sollte bei bereits bestehender Infektion und Nachweis von *S. aureus* in den mikrobiologischen Abstrichen bedacht werden, dass eine Mischinfektion möglich und diese scheinbar aggressiver ist. Während im klinischen Alltag bei Nachweis von *S. epidermidis* häufig von einer Verunreinigung ausgegangen wird, sollten diese synergistischen Effekte beider Erreger bedacht werden. Dies gilt insbesondere für die Therapieplanung bei einliegenden Implantaten, bspw. der Auswahl der eingesetzten Antibiotika. Die Erfolge der antibiotischen Therapie sind mit den aktuell verfügbaren Präparaten jedoch eingeschränkt, insbesondere bei Biofilmbildung auf dem Implantat. Daher sind präventive Strategien notwendig, z.B. die Beschichtung von Implantaten.⁶⁹ Mit unserem 3D-Gewebe steht nun obendrein eine effiziente Testplattform auf Basis menschlicher Zellen zur Verfügung, um die antimikrobiellen Eigenschaften von Materialien sowie deren Gewebeverträglichkeit zu untersuchen.

- *Kann ein in vitro-Test Modell etabliert werden, welches zur Biofilmforschung eingesetzt werden kann?*

Das 3D-Gewebeäquivalent erlaubt die Anwendung einer breiten Palette an optischen und molekularbiologischen Untersuchungsmethoden an menschlichen Zellen im hautähnlichen Gewebeverband. Vor dem Hintergrund der Wirtsspezifität als einem Grund für die große translationale Lücke aus Tierversuchen sowie den hohen regulatorischen Hürden werden Analysen in 3D-Gewebeäquivalenten künftig weiter an Bedeutung gewinnen und ein neuer Standard in der *in vitro* Forschung werden. Das von uns etablierte 3D-Gewebemodell diene zuverlässig zur Untersuchung der Biofilmbildung, Gewebedestruktion sowie der immunmodulatorische Effekt von *S. aureus* und *S. epidermidis*. Diese beiden Spezies leben kompetitiv und in regulärer Abundanz hat *S. epidermidis* als Bestandteil des Mikrobioms auch einen protektiven Effekt, da es über Faktoren wie Lantibiotika und Proteasen die Besiedelung mit *S. aureus* verhindern kann.⁵²⁻⁵⁴ Diesen Effekt konnten wir in unserem Modell nachvollziehen durch die deutlich verringerte Biofilmbildung bei Mischinfektion. Bei erhöhter Abundanz von *S. epidermidis*, wie in unseren Versuchen künstlich herbeigeführt, kann *S. epidermidis* der Haut gegenüber jedoch ausgesprochen schädlich sein, auch über nicht-inflammatorische Wege.⁶⁸ Die ausgeprägte Biofilmbildung sowie Gewebedestruktion von *S. epidermidis* ließ sich in unseren Versuchen gut nachvollziehen. Insbesondere die Erkenntnis, dass eine Interaktion zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* stattfindet, welche die Immunantwort der menschlichen Zellen und letztlich den Infektionsverlauf beeinflusst, bestätigt die Eignung unseres 3D-Gewebeäquivalents zur Biofilmforschung. Hieraus

ergeben sich zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten, von der Verwendung weiterer Bakterienspezies über die Kombination mit weiteren Erregern wie z.B. Pilzen bis hin zur Testung des antimikrobiellen Effekts von topischen Therapeutika.

Wir dürfen festhalten, dass die gegenüber dem initialen Antrag noch differenzierteren Forschungsziele sämtlich erreicht wurden (Abbildung 23).

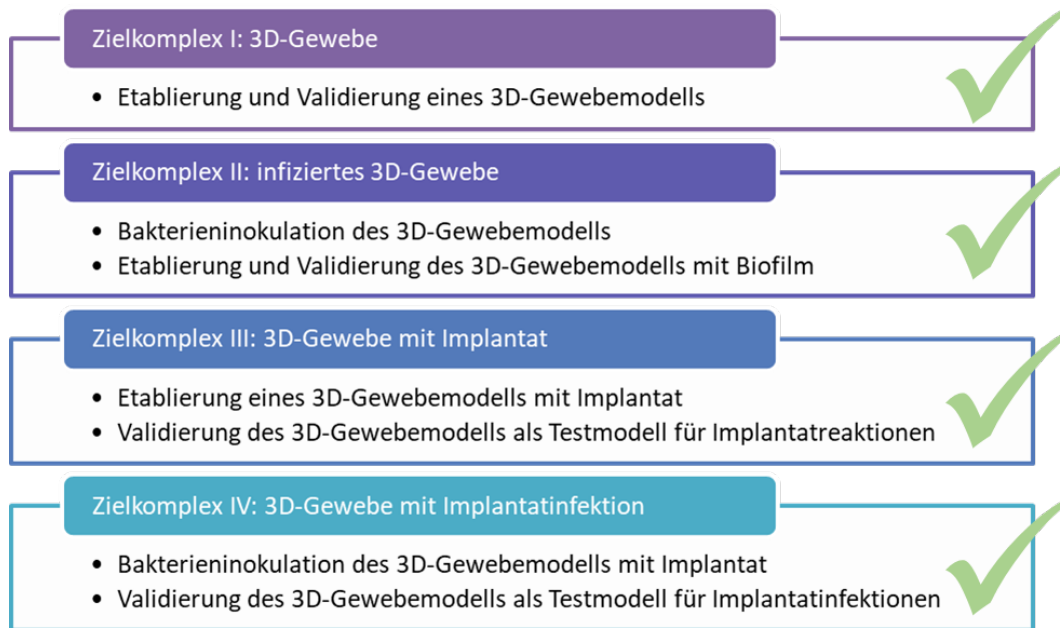


Abbildung 26: Darstellung der vier experimentellen Zielkomplexe, welche innerhalb des Forschungsvorhabens DGUV FR335 erreicht werden sollten. Erreichte Ziele sind mit einem grünen Haken markiert.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die Publikation unserer Erkenntnisse aus den Untersuchungen zum Effekt von Silikonimplantaten im 3D-Gewebe wurden vom Editor und den Reviewern der Fachzeitschrift mit einem Impact Factor von 3,9 sehr positiv aufgenommen und bereits von internationalen Forschungsgruppen zitiert. Aus den weiterhin erhobenen Daten werden sich noch mindestens zwei Publikationen ergeben:

Veröffentlichung in Einreichung

Rima Nuwayhid, Norman Lippmann, Nadine Dietze, Philipp Kobbe, Frank Siemers, Torsten Schulz, Andreas Roth, Stefan Langer, Christina Pempe, Olga Kurow

Interspecies Interaction in Polymicrobial Biofilm Investigated in a 3D Skin Equivalent as a Model for Skin Infections.

Intended for Submission in Elsevier Biofilms.

Geplante Publikationen

Biofilm Development is Increased on Textured Silicone Implants in an in vitro 3D Skin Equivalent

Intended for submission in Journal of Microbiology, Immunology and Infection.

Mögliche weitere Anwendungen

Um insbesondere die unfallchirurgisch und damit auch berufsgenossenschaftlich wichtigen Knochen- und Implantatinfektionen zu untersuchen, soll das bestehende 3D-Gewebe um weitere Zellen und Gewebe augmentiert werden. Für die Etablierung eines 3D-Knochenäquivalents bedeckt von unserem 3D-Gewebe entwerfen wir aktuell ein ambitioniertes Studienprotokoll, welches wir gern bei der DGUV zur Begutachtung der Förderungswürdigkeit vorstellen werden.

Aktuell wachsen die Bakterien ungehemmt unter idealen Bedingungen in unserem 3D-Gewebe. Das nächste Ziel wäre daher die Integration von Immunzellen, um deren Interaktion mit den Bakterien sowie den Hautzellen darzustellen. Die Biofilmbildung kann zudem mit beliebigen weiteren Bakterienspezies untersucht werden. Interessant erscheint hier die Kombination mit anaeroben Erregern oder auch Pilzen.

Zudem liegt aktuell in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut ein interdisziplinärer, multinationaler Antrag auf europäische Forschungsförderung über das Joint Programming on Antimicrobial Resistance Programm mit einer beantragten Fördersumme von über 800.000 € vor. Herzstück dieser geplanten Studie ist die Testung der antimikrobiellen Wirkung von Phagen auf Biofilme in unserem im Rahmen des DGUV-Projektes entwickelten 3D-Gewebe.

8. Anhang/Anhänge

- Literaturliste
- Publikation

Literatur

- 1 Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung e.V. *Arbeitsunfallgeschehen 2022: Statistik*. Berlin, September 2023.
- 2 Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury* 2006; **37 Suppl 2**: 66.
- 3 Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma* 1984; **24**(8): 742–6.
- 4 Otto-Lambertz C, Yagdiran A, Wallscheid F *et al.* Periprosthetic Infection in Joint Replacement. *Dtsch Arztebl Int* 2017; **114**(20): 347–53.
- 5 Alexander Grimberg, Jörg Lützner, Oliver Melsheimer. Jahresbericht 2022: Mit Sicherheit mehr Qualität. Berlin; 2022. URL https://www.eprd.de/fileadmin/user_upload/Dateien/Publikationen/Berichte/Jahresbericht2022-Status5_2022-10-25_F.pdf (last accessed 31 May 2023).
- 6 Walter N, Baertl S, Alt V, Rupp M. What is the burden of osteomyelitis in Germany? An analysis of inpatient data from 2008 through 2018. *BMC Infect Dis* 2021; **21**(1): 550.
- 7 Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S *et al.* Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J Hosp Infect* 2012; **82**(1): 40–8.
- 8 Masters EA, Trombetta RP, Mesy Bentley KL *de et al.* Evolving concepts in bone infection: redefining "biofilm", "acute vs. chronic osteomyelitis", "the immune proteome" and "local antibiotic therapy". *Bone Res* 2019; **7**: 20.
- 9 Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004; **364**(9431): 369–79.
- 10 Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. KISS Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System Modul OP-KISS Referenzdaten: Berechnungszeitraum: Januar 2018 bis Dezember 2022. Berlin; 2023 Feb 24. URL https://www.nrz-hygiene.de/files/Referenzdaten/OP/201801_202212_OPRef.pdf (last accessed 31 May 2023).
- 11 Anwar H, Strap JL, Costerton JW. Kinetic interaction of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with cephalixin and tobramycin in a chemostat system. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**(4): 890–3.
- 12 Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022; **399**(10325): 629–55.
- 13 Rupp ME. Clinical characteristics of infections in humans due to *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Mol Biol* 2014; **1106**: 1–16.
- 14 Eisner R, Lippmann N, Josten C *et al.* Development of the Bacterial Spectrum and Antimicrobial Resistance in Surgical Site Infections of Trauma Patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2020; **21**(8): 684–93.
- 15 McCaig LF, McDonald LC, Mandal S, Jernigan DB. *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**(11): 1715–23.
- 16 Joo H-S, Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol* 2012; **19**(12): 1503–13.
- 17 Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* 2012; **272**(6): 541–61.
- 18 Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**(3): 603–61.

- 19 Kwon JH, Powderly WG. The post-antibiotic era is here. *Science* 2021; **373**(6554): 471.
- 20 Haisma EM, Göblyös A, Ravensbergen B *et al.* Antimicrobial Peptide P60.4Ac-Containing Creams and Gel for Eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Cultured Skin and Airway Epithelial Surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**(7): 4063–72.
- 21 Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*--an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 2003; **16**(2): 103–24.
- 22 Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis* 2005; **40**(4): 562–73.
- 23 Moriarty TF, Harris LG, Mooney RA *et al.* Recommendations for design and conduct of preclinical in vivo studies of orthopedic device-related infection. *J Orthop Res* 2019; **37**(2): 271–87.
- 24 Pound P, Ebrahim S, Sandercock P *et al.* Where is the evidence that animal research benefits humans? *BMJ* 2004; **328**(7438): 514–7.
- 25 Elek SD, Conen PE. The Virulence of *Staphylococcus pyogenes* for Man. A Study of the Problems of Wound Infection. *Br J Exp Pathol* 1957; **38**(6): 573–86.
- 26 Camp JG, Badsha F, Florio M *et al.* Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**(51): 15672–7.
- 27 Lancaster MA, Huch M. Disease modelling in human organoids. *Dis Model Mech* 2019; **12**(7).
- 28 Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2014; **9**(10): 2329–40.
- 29 Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014; **345**(6194): 1247125.
- 30 Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 2018; **18**(7): 407–18.
- 31 Chang R, Emami K, Wu H, Sun W. Biofabrication of a three-dimensional liver micro-organ as an in vitro drug metabolism model. *Biofabrication* 2010; **2**(4): 45004.
- 32 Driehuis E, Kolders S, Spelier S *et al.* Oral Mucosal Organoids as a Potential Platform for Personalized Cancer Therapy. *Cancer Discov* 2019; **9**(7): 852–71.
- 33 Nichols JE, Niles JA, Vega SP *et al.* Modeling the lung: Design and development of tissue engineered macro- and micro-physiologic lung models for research use. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014; **239**(9): 1135–69.
- 34 Shea LD, Wang D, Franceschi RT, Mooney DJ. Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng* 2000; **6**(6): 605–17.
- 35 Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A *et al.* Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science* 2018; **359**(6378): 920–6.
- 36 Metelmann IB, Kraemer S, Steinert M *et al.* Novel 3D organotypic co-culture model of pleura. *PLoS One* 2022; **17**(12): e0276978.
- 37 Kurow O, Nuwayhid R, Stock P *et al.* Organotypic 3D Co-Culture of Human Pleura as a Novel In Vitro Model of *Staphylococcus aureus* Infection and Biofilm Development. *Bioengineering (Basel)* 2023; **10**(5).
- 38 Hong Z-X, Zhu S-T, Li H *et al.* Bioengineered skin organoids: from development to applications. *Mil Med Res* 2023; **10**(1): 40.

- 39 Charles CA, Ricotti CA, Davis SC *et al.* Use of tissue-engineered skin to study in vitro biofilm development. *Dermatol Surg* 2009; **35**(9): 1334–41.
- 40 Lu Z, Hasse S, Bodo E *et al.* Towards the development of a simplified long-term organ culture method for human scalp skin and its appendages under serum-free conditions. *Exp Dermatol* 2007; **16**(1): 37–44.
- 41 Epstein JI, Egevad L, Amin MB *et al.* The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol* 2016; **40**(2): 244–52.
- 42 Hajduczenia MM, Klefisch FR, Hopf AGM *et al.* New Perspectives for Prosthetic Valve Endocarditis: Impact of Molecular Imaging by FISHseq Diagnostics. *Clin Infect Dis* 2023; **76**(6): 1050–8.
- 43 Mallmann C, Siemoneit S, Schmiedel D *et al.* Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**(6): 767–73.
- 44 Kikhney J, Moter A. Quality Control in Diagnostic Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Microbiology. *Methods Mol Biol* 2021; **2246**: 301–16.
- 45 Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P *et al.* Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative Staphylococcus strains. *J Invest Dermatol* 2008; **128**(4): 906–16.
- 46 Zaborowska M, Vazirisani F, Shah FA *et al.* Immunomodulatory effects exerted by extracellular vesicles from Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus isolated from bone-anchored prostheses. *Biomaterials* 2021; **278**: 121158.
- 47 Nakamura K, Williams IR, Kupper TS. Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J Invest Dermatol* 1995; **105**(5): 635–43.
- 48 Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**(10): 679–91.
- 49 Kim J, Kim BE, Berdyshev E *et al.* Staphylococcus aureus causes aberrant epidermal lipid composition and skin barrier dysfunction. *Allergy* 2023; **78**(5): 1292–306.
- 50 Niebuhr M, Baumert K, Werfel T. TLR-2-mediated cytokine and chemokine secretion in human keratinocytes. *Exp Dermatol* 2010; **19**(10): 873–7.
- 51 Schramm F, Kern A, Barthel C *et al.* Microarray analyses of inflammation response of human dermal fibroblasts to different strains of Borrelia burgdorferi sensu stricto. *PLoS One* 2012; **7**(6): e40046.
- 52 Williams MR, Bagood MD, Enroth TJ *et al.* Staphylococcus epidermidis activates keratinocyte cytokine expression and promotes skin inflammation through the production of phenol-soluble modulins. *Cell Reports* 2023; **42**(9): 113024.
- 53 Iwase T, Uehara Y, Shinji H *et al.* Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 2010; **465**(7296): 346–9.
- 54 Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM *et al.* Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from Staphylococcus epidermidis, a normal resident of the skin. *J Invest Dermatol* 2010; **130**(1): 192–200.
- 55 Nair RR, Hsu J, Jacob JT *et al.* A role for keratin 17 during DNA damage response and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; **118**(13).

- 56 Zhang X, Yin M, Zhang L-J. Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells* 2019; **8**(8).
- 57 Ratner BD, Hoffman AS, Yaszemski M *et al.*, editors. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. Amsterdam: Elsevier, 2013.
- 58 Colaris MJL, Ruhl T, Beier JP. Effects of Silicone Breast Implants on Human Cell Types In Vitro: A Closer Look on Host and Implant. *Aesthetic Plast Surg* 2022; **46**(5): 2208–17.
- 59 Sundnes O, Pietka W, Loos T *et al.* Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *J Invest Dermatol* 2015; **135**(7): 1771–80.
- 60 Scheuermann-Poley C, Wiessner A, Kikhney J *et al.* Fluorescence In Situ Hybridization as Diagnostic Tool for Implant-associated Infections: A Pilot Study on Added Value. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2023; **11**(5): e4994.
- 61 Stichling M, Wiessner A, Kikhney J *et al.* Is There a Wound Recontamination by Eluates with High Bacterial Load in Negative-Pressure Wound Therapy with Instillation and Dwell Time? *Plast Reconstr Surg* 2023; **151**(1): 136e-147e.
- 62 Barua N, Huang L, Li C *et al.* Comparative Study of Two-Dimensional (2D) vs. Three-Dimensional (3D) Organotypic Keratinocyte-Fibroblast Skin Models for Staphylococcus aureus (MRSA) Infection. *Int J Mol Sci* 2021; **23**(1).
- 63 Wiegand C, Fink S, Mogrovejo DC *et al.* A standardized wound infection model for antimicrobial testing of wound dressings in vitro. *Int Wound J* 2024; **21**(3): e14811.
- 64 Bolle ECL, Verderosa AD, Dhouib R *et al.* An in vitro Reconstructed Human Skin Equivalent Model to Study the Role of Skin Integration Around Percutaneous Devices Against Bacterial Infection. *Front Microbiol* 2020; **11**: 670.
- 65 Bolle ECL, Bartnikowski N, Haridas P *et al.* Improving skin integration around long-term percutaneous devices using fibrous scaffolds in a reconstructed human skin equivalent model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2020; **108**(3): 738–49.
- 66 Smith A, Watkins T, Theocharidis G *et al.* A Novel Three-Dimensional Skin Disease Model to Assess Macrophage Function in Diabetes. *Tissue Eng Part C Methods* 2021; **27**(2): 49–58.
- 67 Williams MR, Nakatsuji T, Sanford JA *et al.* Staphylococcus aureus Induces Increased Serine Protease Activity in Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2017; **137**(2): 377–84.
- 68 Williams MR, Cau L, Wang Y *et al.* Interplay of Staphylococcal and Host Proteases Promotes Skin Barrier Disruption in Netherton Syndrome. *Cell Reports* 2020; **30**(9): 2923-2933.e7.
- 69 Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; **65**(2): 158–68.



biomedicines



Article

A Platform for Testing the Biocompatibility of Implants: Silicone Induces a Proinflammatory Response in a 3D Skin Equivalent

Rima Nuwayhid, Torsten Schulz, Frank Siemers, Jeannine Schreiter, Philipp Kobbe, Gunther Hofmann, Stefan Langer and Olga Kurow

Special Issue

Applications of 3D Cell Culture in Biomedicines

Edited by

Dr. Yoshitaka Miyamoto




<https://doi.org/10.3390/biomedicines12010224>



Article

A Platform for Testing the Biocompatibility of Implants: Silicone Induces a Proinflammatory Response in a 3D Skin Equivalent

Rima Nuwayhid ^{1,*} , Torsten Schulz ¹, Frank Siemers ², Jeannine Schreiter ³, Philipp Kobbe ^{4,5}, Gunther Hofmann ⁶, Stefan Langer ¹ and Olga Kurow ^{1,*}

¹ Department of Orthopaedic, Trauma and Plastic Surgery, University Hospital Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; torsten.schulz@medizin.uni-leipzig.de (T.S.); stefan.langer@medizin.uni-leipzig.de (S.L.)

² Department of Plastic, Hand Surgery and Burn Care, BG Klinikum Bergmannstrost, 06112 Halle, Germany; frank.siemers@bergmannstrost.de

³ Klinik am Rosental GmbH, 04105 Leipzig, Germany; jeannine.schreiter@klinik-am-rosental.de

⁴ Department of Trauma and Reconstructive Surgery, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Germany; philipp.kobbe@bergmannstrost.de

⁵ Department of Trauma and Reconstructive Surgery, BG Klinikum Bergmannstrost, 06112 Halle, Germany

⁶ Department of Trauma, Plastic and Reconstructive Surgery, University Hospital Jena, 07747 Jena, Germany; gunther.hofmann@med.uni-jena.de

* Correspondence: rima.nuwayhid@medizin.uni-leipzig.de (R.N.); olga.kurow@medizin.uni-leipzig.de (O.K.)

Abstract: Biocompatibility testing of materials is carried out in 2D cell cultures or animal models despite serious limitations. 3D skin equivalents are advanced in vitro models for human skin. Silicone has been shown to be noncytotoxic but capable of eliciting an immune response. Our aim was to (1) establish a 3D skin equivalent to (2) assess the proinflammatory properties of silicone. We developed a coculture of keratinocytes and fibroblasts resulting in a 3D skin equivalent with an implant using samples from a breast implant. Samples with and without the silicone implant were studied histologically and immunohistochemically in comparison to native human skin samples. Cytotoxicity was assessed via LDH-assay, and cytokine response was assessed via ELISA. Histologically, our 3D skin equivalents had a four-layered epidermal and a dermal component. The presence of tight junctions was demonstrated in immunofluorescence. The only difference in 3D skin equivalents with implants was an epidermal thinning. Implanting the silicone samples did not cause more cell death, however, an inflammatory cytokine response was triggered. We were able to establish an organotypical 3D skin equivalent with an implant, which can be utilised for studies on biocompatibility of materials. This first integration of silicone into a 3D skin equivalent confirmed previous findings on silicone being non-cell-toxic but capable of exerting a proinflammatory effect.

Keywords: tissue engineering; 3D skin equivalent; 3D skin model; silicone; breast implants; biocompatibility; cytotoxicity; cytokine response; Swanson prosthesis; silicone prosthesis



Citation: Nuwayhid, R.; Schulz, T.; Siemers, F.; Schreiter, J.; Kobbe, P.; Hofmann, G.; Langer, S.; Kurow, O. A Platform for Testing the Biocompatibility of Implants: Silicone Induces a Proinflammatory Response in a 3D Skin Equivalent. *Biomedicines* **2024**, *12*, 224. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010224>

Academic Editor: Yoshitaka Miyamoto

Received: 8 December 2023

Revised: 15 January 2024

Accepted: 17 January 2024

Published: 19 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In accordance with the precept *primum non nocere*, biocompatibility might be the most important quality of every implant inserted into the body. Thus, extensive research on interactions between implants and their surrounding tissues is required.

This is often performed in animal models despite their numerous disadvantages: they are expensive and highly regulated in many countries and thus laborious; have relevant moral implications associated with them; and most importantly, are an inadequate representation of human physiology, producing misleading results [1–3]. Therefore, in vitro cell culture models are required for adequate investigations on biocompatibility.

Three-dimensional (3D) tissue equivalents have proven to be superior to 2D cell cultures for in vitro studies, as they can be composed of multiple cell types with control

over cell type composition [4,5]. The cells in 3D tissue equivalents are able to differentiate and form an organotypical architecture [6]. They provide enhanced cell–cell contacts, and as an extracellular matrix is present, they also contain cell–matrix contacts [4,6–10]. This is especially relevant in modelling skin with its distinct layered build-up and multitudinous cell contacts to fulfil its barrier functions. Thus, 3D skin equivalents have been used in a variety of studies, e.g., to assess skin infections, the effect of cancer therapeutics, and the toxicity or antibiofilm properties of various agents [6,8,11–13].

Silicone was first implanted into the human body as a device for bile duct repair in 1946 by Lahey [14]. Since then, its stability, elasticity and reported cytocompatibility made it a regularly used component of implants for different indications. Silicone rods have been used in hand surgery for staged flexor tendon repair for decades [15]. Swanson prosthesis for proximal interphalangeal and metacarpophalangeal joint arthroplasty are made entirely out of silicone [16]. Apart from usage in degenerative diseases such as rheumatoid arthritis and post-traumatic arthrosis, they have also been described as replacements in acute hand injuries [17]. Perhaps the most widely known utilisation of silicone implants is breast reconstruction. One common denominator in these constellations is the direct contact of the silicone implant with skin: the digits physiologically contain very little subcutaneous tissue, which is further reduced during preparation or during debridement in case of infections. During nipple- or skin-sparing mastectomy, either for surgically treating breast cancer or risk-reducing procedures, the subcutaneous tissue is thinned out as much as possible in order to minimise recurrence rates before a silicone implant is placed for breast reconstruction [18]. Other applications of silicone include ophthalmology, maxillofacial and nasal reconstruction, and various devices, such as urinary catheters, venous port catheters, or drivelines of ventricular assist devices [19–24].

While at first silicone as an entirely synthetic material was reported to be immunologically inert, histological studies in animals in the 1980s demonstrated an immunologic effect [25]. The cytotoxicity and inflammatory activity of silicone have been studied in vitro and in vivo using murine models [26]. In vitro studies on different cell types (macrophages, monocytes, fibroblasts, umbilical vein endothelial cells) confronted with silicone have been performed [27]. Keratinocytes, which play an important role as an immunologic barrier, have not yet been tested in terms of their reaction to silicone [27,28].

Biocompatibility testing of medical devices is regulated by International Standard ISO 10993 [29]. For devices to be categorized as risk-adapted, in vitro studies in 2D cell cultures and in vivo studies in animal models may be required. Considering the aforementioned limitations of both test systems, a 3D in vitro test model using human cells would be highly useful, especially in light of variations of silicone and combinations with different coatings being introduced.

3D skin equivalents have previously been used to assess the skin integration of percutaneous devices [23,30]. Mock drivelines have been manufactured from poly- ϵ -caprolactone, seeded with fibroblasts, and inserted into the 3D skin equivalents through biopsy punch holes, thus mimicking transepidermal implants. However, data on intra- or subdermal implants with no direct contact to keratinocytes are still lacking as are data on the interactions of silicone implants with keratinocytes.

Our group previously established an organotypic 3D equivalent of human pleura and successfully mimicked pleural empyema [31,32]. The aim of the present study was to establish a 3D skin equivalent, which would allow for investigations of interactions between human skin cells (keratinocytes and fibroblasts) and implants of different materials, starting with silicone, to assess biocompatibility.

2. Materials and Methods

2.1. Composition of 3D Skin and Implanted 3D Skin Equivalents

Our 3D skin equivalent is shown schematically in Figure 1. It was based on fibroblasts (HDFp, primary human dermal fibroblasts, CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland), supplemented by human epidermal keratinocyte cells (HDEK, human

epidermal keratinocytes, CELLnTEC). Collagen gel was prepared using rat-tail type-I collagen (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) to a final concentration of 5 mg/mL in DMEM, neutralized with 5 M NaOH.

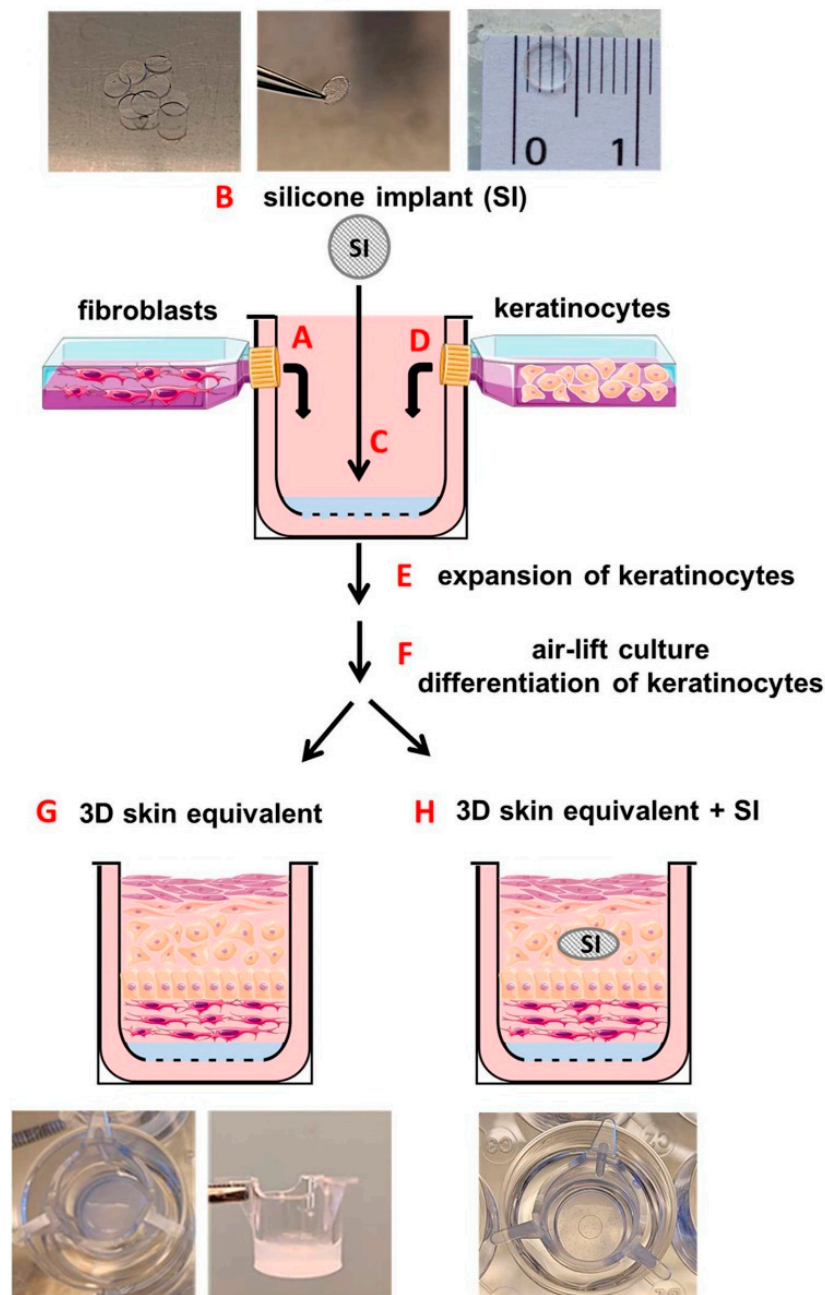


Figure 1. Schematic overview of experimental methods for construction of the 3D skin equivalent and 3D skin equivalent with an implant using a three-dimensional collagen gel culture. A single cell suspension of human fibroblasts (HDFp) obtained from confluent monolayers was passaged and cultivated in a type I collagen gel matrix (HDFp–collagen gel) (A). Silicone samples were cut out using a biopsy punch (B) and implanted in HDFp–collagen gel constructs (C). After solidification of HDFp–collagen gel constructs, keratinocytes were placed on the gel matrix to build up a three-dimensional skin-like structure (D). The skin constructs were cultured for another 3 days for keratinocytes to expand (E). The following air-lift culturing technique (F) allowed for cell differentiation. Eventually, the 3D equivalent had a skin-specific stratification and morphology (G,H).

Collagen gel (500 μL) with fibroblasts (HDFp-collagen gel) at a final cell density of 3.5×10^4 cells/mL was pipetted into 12-well inserts with a polymer mesh (ThinCert, 8 μm pore size, translucent, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). These inserts were then positioned into 12-well plates (Figure 1A).

In order to produce a 3D skin equivalent with an intradermal implant, we added silicone samples to half of our cell cultures. The implant samples were obtained from the envelope of a commercially available breast implant with a smooth surface. Using a biopsy punch, we cut out circular samples with a diameter of 5 mm and thickness of 0.4 mm and sterilised and bathed them in ethanol and sterile phosphate-buffered saline (Dulbecco's PBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Our target specifically was the intradermal positioning of the implants. In order to keep them from sinking to the bottom of the transwell, where they would have no tissue contact on their basal side, we first placed the HDFp-collagen gel in the transwell. We awaited spontaneous polymerisation for 10 min and then placed the silicone samples on top. With the collagen gel having partially polymerised, the implants only sank about half way into the desired position. (Figure 1B). These 3D constructs were then polymerized at 37 °C in 5% CO₂ for 5 h and then equilibrated in fibroblast growth medium CnT-PR-F (CELLnTEC) overnight.

After 24 h of polymerisation of the HDFp-collagen gel, the 3D constructs were coated with 100 μL of fibronectin (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in DMEM without FBS and incubated at 37 °C for 1 h. After that, organotypic 3D skin equivalents were generated by seeding 3.2×10^5 keratinocytes suspended in 250 μL of CnT-PR-medium (Cellntec, Bern, Switzerland) on top of the collagen gel in each transwell (Figure 1D). Keratinocyte's adhesion to the collagen was allowed for 5 h by incubating the transwells at 37 °C in 5% CO₂ without medium. Five hours after keratinocyte seeding, we applied 1 mL of CnT-PR-medium outside and 500 μL inside of the ThinCert. These inserts were then cultured in keratinocyte growth medium for 72 h until the keratinocytes expanded and covered the entire surface of the insert (Figure 1E). At this point, the inserts were lifted to an air-liquid interface (Figure 1F) with 1 mL of CnT-PR-FTAL-medium (Cellntec) outside of the ThinCert to ensure exposure of keratinocytes to air. 3D cocultures were cultured for an additional 26 days with the 3D medium being replaced every three days. All experiments were performed on 30-day cultures. Under the influence of air and an increased Ca²⁺ concentration in the medium, this 3D coculture differentiated into an organotypic 3D human skin equivalent (Figure 1G) or 3D human skin equivalent with the intradermal implant (Figure 1H).

2.2. Histochemistry and Immunofluorescence

We compared our 3D skin equivalent to human skin tissue using light microscopy and immunofluorescence. Human skin was obtained from patients undergoing abdominoplasty at the Department of Plastic Surgery, University Hospital Leipzig, Leipzig, Germany, (approved by the Ethics Committee of the University of Leipzig, Leipzig, Germany (434/20-ek)).

Samples were placed in zinc-formaldehyde (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) directly after being harvested in the operation theatre, fixed at 4 °C for 24 h, then paraffin-embedded and microtome-cut onto Superfrost Plus-charged slices (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), then deparaffinized in xylene, and hydrated with alcohol prior to standard hematoxylin and eosin staining. For immunohistochemical experiments, the peroxidase was inactivated with 1% H₂O₂ in methanol for 10 min. Slides were boiled in 0.01 M sodium citrate with pH 6.0 for 10 min to retrieve antigens. Unspecific binding site saturation was consistently carried out with 10% goat serum in 0.1 M PBS with pH 7.4 (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM NaH₂PO₄, 7.7 mM NaN₃, 0.1% BSA, 0.2% Triton X-100, 0.05% Tween 20 and 10% serum of host of secondary antibody; 1 h at RT). Samples were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against filaggrin, involucrin, cytokeratin 1, keratin 17, E-Cadherin, and ZO-1 diluted in blocking buffer. After three washes in TBS for 10 min, slides were incubated with goat anti-rabbit Alexa Fluor-labelled

secondary antibodies diluted in blocking buffer (Table 1). After another three washes in TBS for 10 min, cover slips were mounted with media containing DAPI (Vector Laboratories, Inc., Newark, CA, USA). Appropriate negative controls for the immunostaining were prepared by omitting the primary antibody. Localization of staining was analysed via fluorescent microscopy with a Leica Axiovert 100 microscope equipped with a Leica digital camera.

Table 1. Immunofluorescence reagents.

	Source	Dilution
Primary Antibody		
Filaggrin	Abcam plc, Cambridge, UK	1:400
Involucrin	Abcam, UK	1:200
Cytokeratin 1	Abcam, UK	1:200
Keratin 17	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:400
E-Cadherin	Proteintech Europe, Manchester UK	1:250
ZO-1	Proteintech, UK	1:1000
Secondary Antibodies		
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:1000
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 555	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 647	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	1:1000

2.3. 3D Skin Equivalent Response Quantification

In a first step, we assessed the cytotoxicity induced by the silicone implants. Culture supernatants below the inserts of 3D skin equivalents with implants were harvested at days 5, 10, 15, 20, 25, and 30 after 3D skin equivalent production, and the cytotoxicity of silicone was measured via lactate dehydrogenase assay with a Cytotoxicity Detection Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. Samples of 3D skin equivalent without implants or samples of 3D skin equivalent without implants treated with 5% Triton X-100 were used as the negative (0% toxicity) and positive (100% toxicity) control, respectively.

In a second step, we quantified the levels of inflammation mediators. Concentrations of IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-33, MCP-1, and TNF- α were measured in the culture supernatants of our 3D skin equivalent without the implant and in the 3D skin equivalent with the silicone implant using ELISA kits (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) on day 30 of cultures.

3. Results

3.1. Establishment of 3D Skin Equivalents with and without Silicone Implants

The 3D human skin equivalent was set up with human keratinocytes and fibroblasts (Figure 1). In order to generate an in vitro model for skin with a silicone implant, fibroblasts were mixed as described in the Materials and Methods section and graphically illustrated in Figure 1A and pipetted in 12-well inserts, which were placed into 12-well plates. The silicone implants were inserted into HDFp-collagen gel as previously described (Figure 1C). 3D HDFp-collagen gel constructs were cultured at 37 °C for 24 h for complete collagen solidification and supplemented with human epidermal keratinocyte cells (Figure 1D). Under the influence of air and an increased Ca²⁺ concentration in the medium (Figure 1E,F), this organotypic 3D coculture differentiated into a 3D skin equivalent (Figure 1G) and 3D skin equivalent with an intradermal implant (Figure 1H) by forming the corresponding stratification of dermis and epidermis with the stratum corneum (Figure 2).

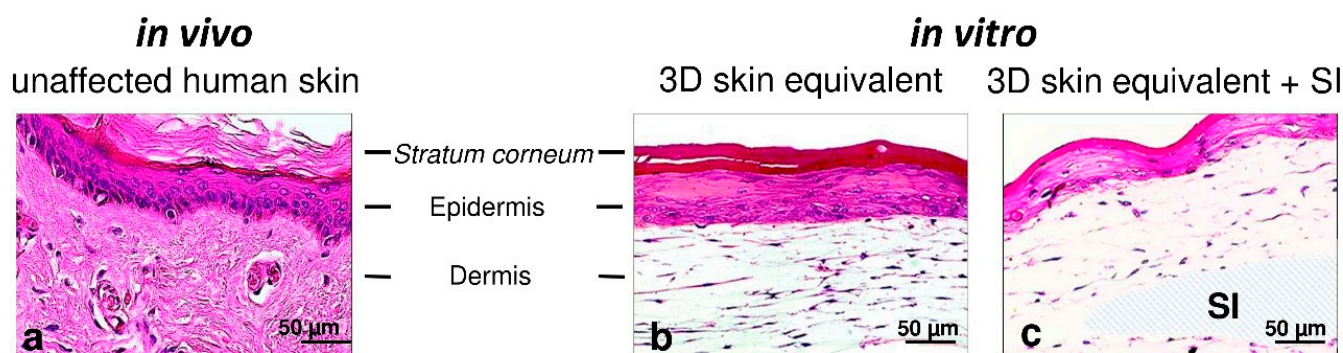


Figure 2. Representative photomicrographs of unaffected human skin and the 3D skin equivalent with and without the silicone implant. H&E staining showing unaffected human skin (a) and the 30-day 3D skin equivalent (b) and the 3D skin equivalent with the silicone implant (c) at 20× magnification. SI—silicone implant.

H&E staining confirmed that our 3D skin equivalents displayed tissue morphology close to native human skin. It was found that HPEK formed a continuous layer on the 3D fibroblast matrix (Figure 2b) as keratinocytes do in human skin *in vivo* (Figure 2a). While a continuous layer of keratinocytes also formed in the 3D skin equivalent with implant, the epidermal component was remarkably thinner than that in the 3D skin equivalent without implant (Figure 2c). The dermal growth patterns on the silicone implant suggests that the presence of silicone does not affect fibroblasts.

3.2. Validation of Layered Architecture in Newly Developed 3D Skin Equivalent

In order to conduct a direct comparison between our new organotypic 3D skin equivalent and the *in vivo* situation, we compared our 3D skin equivalent with and without implant to human skin tissue using light microscopy and immunofluorescence (Figure 3). The human skin is divided into two different layers: the epidermis with the corneal layer (St. corneum), St. granulosum, St. spinosum, and St. basale; the dermis; and the subcutis. Histological comparison of the 3D skin equivalents with and without implants to biopsies of human skin showed the presence of both cell types (HPEK and HDFp). The epidermal component in our 3D skin equivalents was visibly divided into four layers, demonstrating skin-like morphology. The distribution of the characteristic marker proteins for each of the four epidermal layers, which are physiologically expressed by human skin *in vivo*, was analysed with immunofluorescence staining. Filaggrin (St. corneum and St. granulosum markers), involucrin (St. granulosum marker), cytokeratin 1 (St. spinosum marker), and keratin 17 (St. basale marker) were expressed in the skin biopsies (Figure 3a–d) and presented an expression pattern similar to our 3D skin equivalent (Figure 3e–h) and our 3D equivalent with implant (Figure 3i–l). A comparison of the graphic abstract of our model (Figure 1) and immunostaining (Figure 3) to further demonstrate the stratification can be found in the Supplementary Materials.

While we observed a thinning of St. corneum in the 3D skin equivalents with implants, this did not lead to a change in the structure of the skin layers.

Keratin 17 expression was notably higher in the 3D skin equivalents with implants.

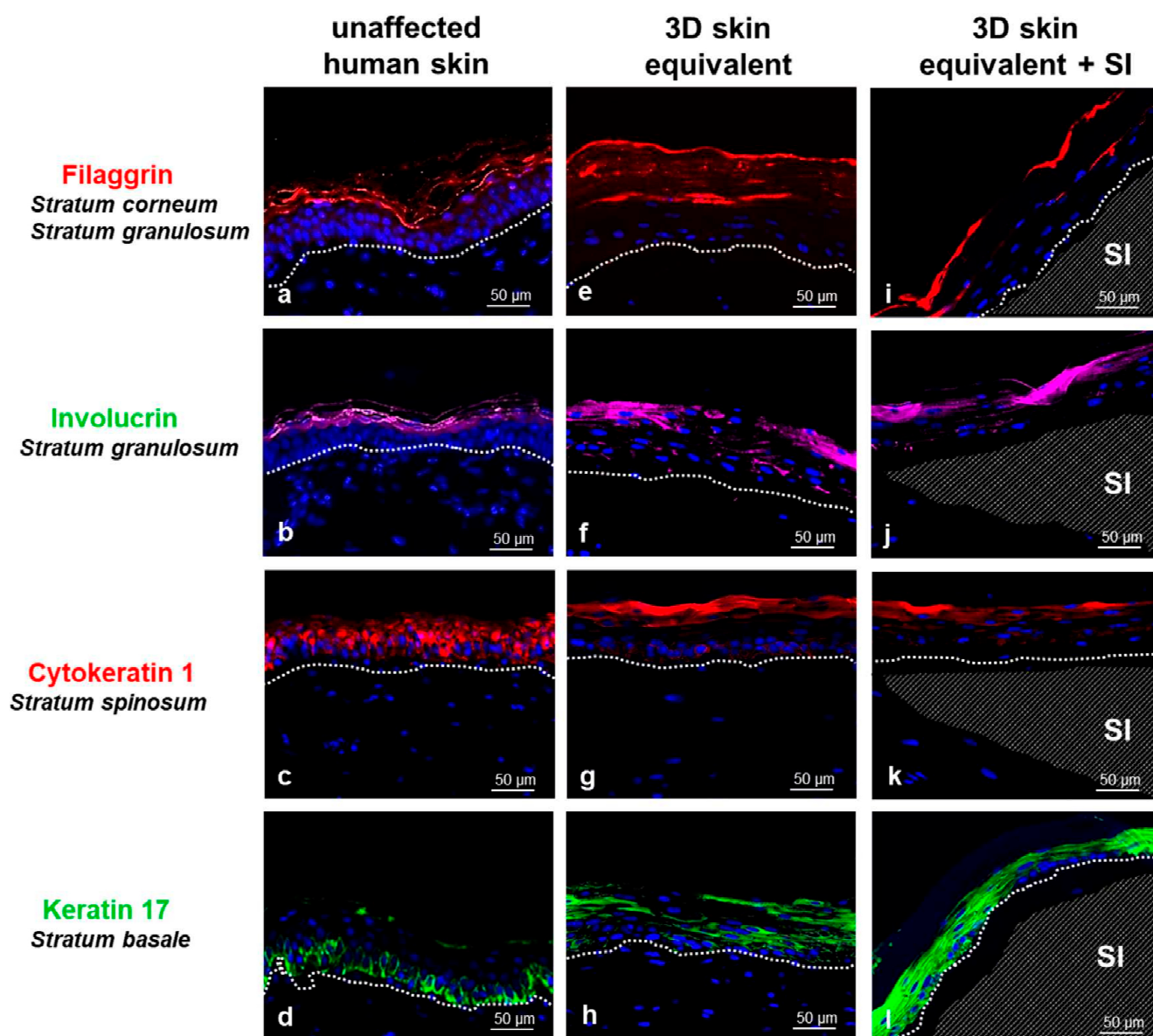


Figure 3. Comparison of unaffected human skin (a–d) with our 3D skin equivalent with (i–l) and without implant (e–h) by immunofluorescence staining (20×). The visible distinction between epidermis and dermis is marked with a dashed line (a–l), the position of the silicone implant (SI) with a shaded area (i–l). Immunostaining demonstrates the expression of filaggrin in red (a,e,i), involucrin in green (b,f,j), cytokeratin 1 in red (c,g,k) and keratin 17 in green (d,h,l) with counterstaining of cell nuclei with DAPI (blue). Controls in which the primary antibody was omitted showed no nonspecific binding. Scale bar = 50 μm.

3.3. Cell Contacts

The skin is a multifunctional organ with a central role in the mechanical and immunological protection of the body, the absorption of stimuli, the exchange of substances, and the regulation of body temperature, filtration, and absorption. Cell–cell contacts of keratinocytes are of great importance for these processes and also for wound healing and immune response. If these functions are disrupted or imbalanced by injury or genetic defects, the barrier function of the skin is impaired and skin diseases occur. Thus, without cell–cell contacts, our in vitro model would not represent human skin adequately.

Therefore, we investigated the localisation of epithelial cell–cell adhesion molecules (tight junction (TJ)) in the 3D skin equivalent. To determine the functional coupling and interaction of the HPEK cells with each other, we performed immunofluorescence staining of the TJ proteins E-cadherin and ZO-1 (Figure 4). The 3D skin equivalent featured intercellular tight junctions (TJ) resembling those found in human tissue (Figure 4b,c). Morphological analysis of TJ proteins showed that HPEK could polarise and form well-developed intercellular junctions with a similar expression pattern within our 3D skin equivalent (Figure 4c,d) and our 3D skin equivalent with implant (Figure 4e,f). TJ proteins were seen mainly on the surface of keratinocytes of the St. spinosum and granulosum. No difference was detected between the 3D skin equivalents with and without implant in expression and localization of epithelial cell–cell adhesion molecules.

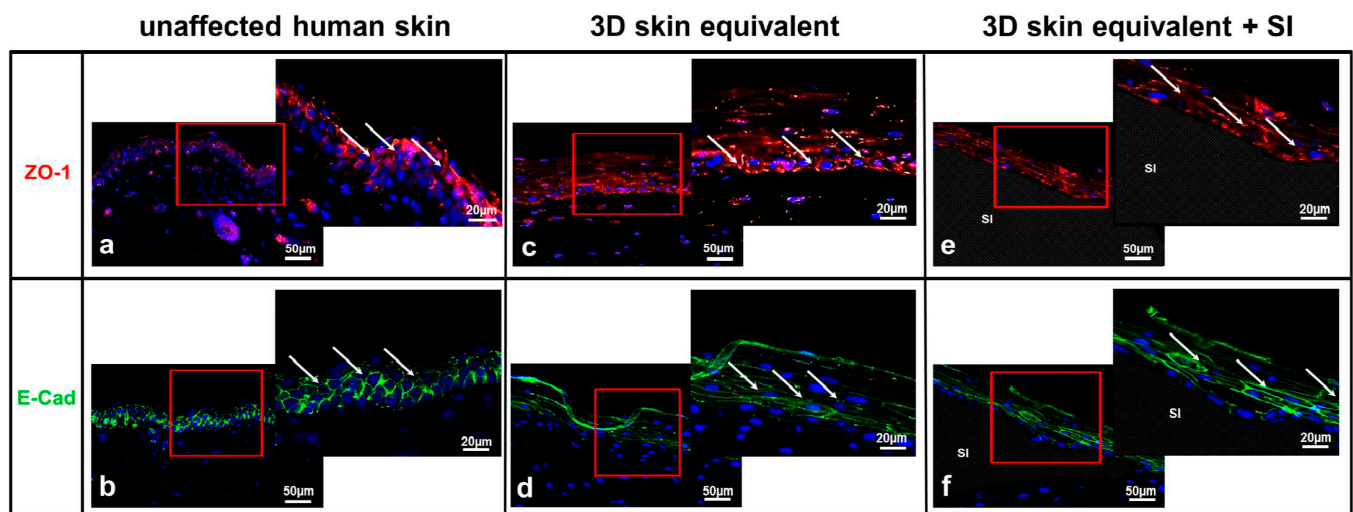


Figure 4. Expression of tight junctions in unaffected human skin (a,b) and the 3D skin equivalent with (e,f) and without implant (c,d). Immunofluorescence of ZO-1 (a,c,e) and E-Cadherin (b,d,f). The staining of ZO-1 (red) and E-cadherin (green) clearly showed the cell membranes of keratinocytes in the epidermis. The cell nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). Human fibroblasts showed no expression of ZO-1 or E-cadherin at cell membranes. The red box marks the area shown in detail to its right. Arrows signify TJ. Controls in which the primary antibody was omitted showed no specific staining. Scale bar = 50 μm.

Thus, our model allows the investigation of cell interactions by direct contact of both cell types in the 3D skin equivalent and models the physiological paracrine signal transmission better than do 2D cultures.

3.4. Cytotoxicity/Cytokine Response/Inflammatory Activity

In this part, we characterised the cellular responses of 3D skin equivalents to silicone by assaying the growth media underneath the cell culture inserts.

The cytotoxicity of silicone towards the cells in our 3D skin equivalent was assessed based on the activity of LDH released into the culture medium by damaged cells at days 5, 10, 15, 20, 25, and 30 after 3D skin equivalent production (Figure 5a). Implanting silicone into our 3D skin equivalents did not trigger LDH release (Figure 5a) but did induce a remarkable change in the overall immune response signified by statistically significant rises in concentrations of proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-33, and MCP-1, with the highest increases measured for IL-1 α and TNF- α (Figure 5b–g).

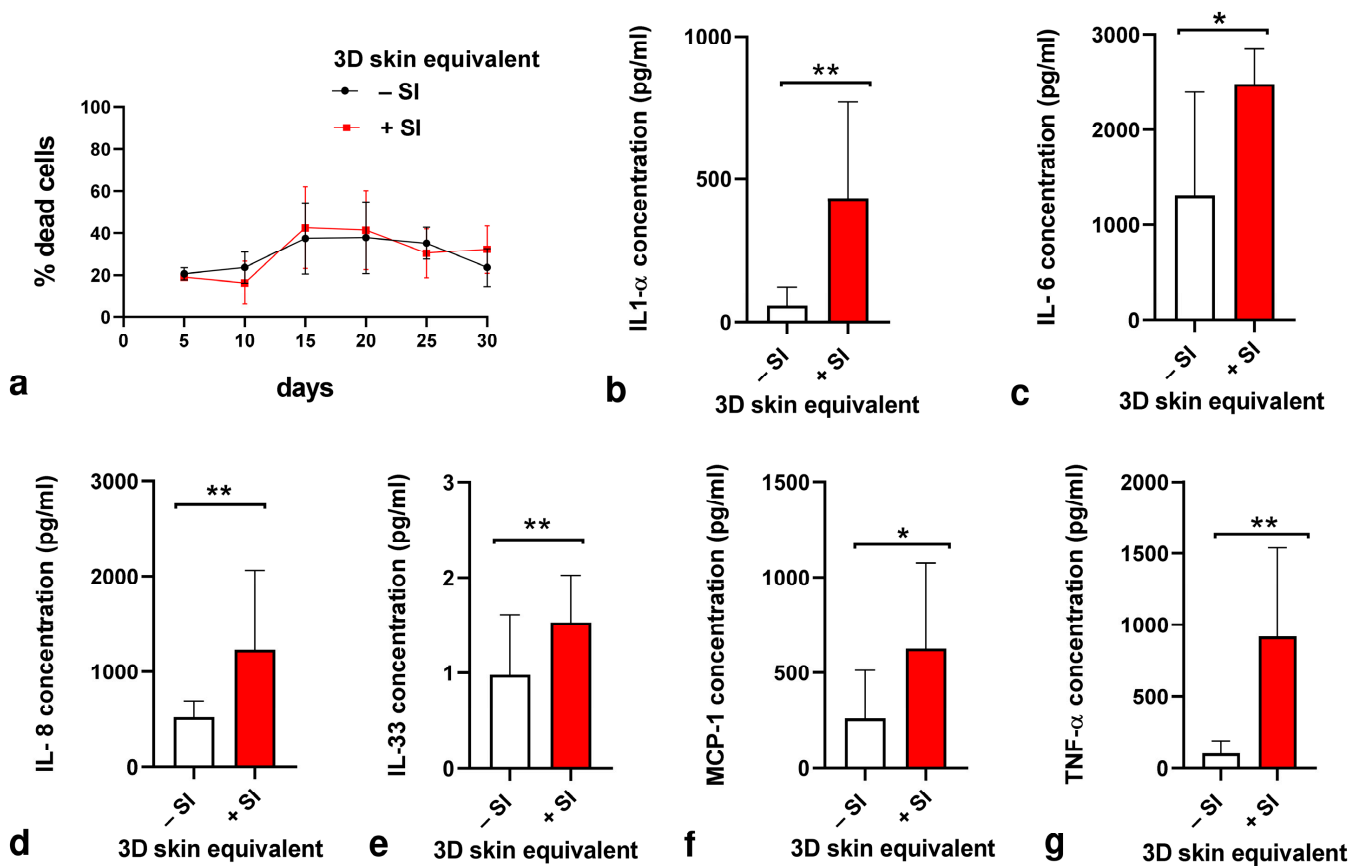


Figure 5. Cytotoxicity and proinflammatory cytokine production in response to silicone implantation in 3D skin equivalent. (a) Culture supernatants were used for measuring cytotoxicity via lactate dehydrogenase assay on days 5, 10, 15, 20, 25, and 30 after 3D skin equivalent production. (b–g) The concentrations of IL-1 α (b), IL-6 (c), IL-8 (d), IL-33 (e), MCP-1 (f), and TNF- α (g) in culture supernatant were quantified with ELISA on day 30 of cultures. The graphs represent the mean values \pm SD from at least three independent replicates. Statistical significance of the changes in cytokine concentration in comparison to control without implant was tested with the *t*-test: * $p \leq 0.005$, ** $p \leq 0.001$.

4. Discussion

In vitro testing platforms for analysis of biocompatibility of materials implanted into the human body should strive to represent physiological conditions as closely as possible. 3D tissue equivalents are an advancement in this field, as they resemble the native tissue architecture more accurately than do mere 2D cell cultures [10,33].

Based on our experience in establishing a 3D pleura equivalent, which proved to be applicable for investigating pleural infections, we aimed to engineer a 3D skin equivalent [31,32]. To verify the aforementioned goal of close resemblance to human skin, we compared our 3D skin equivalent histologically to specimens of human skin and were able to demonstrate a skin-typical layered structure (Figure 2). Proteins characteristic to each stratum were expressed, proving the similarity of the tissue architecture of our in vitro model in further detail (Figure 3). The immunofluorescence staining showed similar distribution patterns of epithelial markers in the correct order although they were not identical to actual human skin.

Cell–cell contacts, specifically tight junctions, are essential to the skin’s barrier function. We were able to prove the presence of tight junctions in our 3D skin equivalent (Figure 4) and thus the presence of an intact barrier. Combined, these findings demonstrate that our in vitro 3D skin equivalent effectively reproduces important characteristics of the in vivo morphology of human skin with similar biophysical and biomolecular mechanisms.

Establishing this skin equivalent posed various challenges. In attempts to have the collagen matrix for the dermal structure be produced entirely by the contained fibroblasts, as other groups have demonstrated, the resulting thickness of the dermal layer was not satisfactory [34]. In our preliminary trials, we were not successful at using commercially available human collagen. The coculture either did not adhere to the transwell walls and collapsed in the lower collagen concentrations or showed constant shrinkage in higher concentrations. This highlights the influence of collagen stiffness as well as alignment and the orientation of collagen fibres, which was not further examined in this study. In order to achieve a stable, full thickness skin equivalent, we resorted to adding rat collagen [35]. Thus, our 3D skin equivalent is not entirely human-derived. Another way to overcome this hurdle is using decellularised dermis as a foundation for keratinocytes [23]. In this case, the dermal component is completely human, but it is obtained from actual human skin specimens. This limits availability and perhaps, more importantly, reproducibility since the influence of donor-individual factors such as age, medication, or disease cannot be eliminated. Our approach using only commercially available cells and components ensures the consistency and comparability of results.

It has to be acknowledged that our 3D skin equivalent still lacks components of the complex *in vivo* situation.

One major drawback of this and other current skin equivalents surely is the lack of immune cells, namely Langerhans cells of the epidermis, and a variety of specialised immune cells contained in the dermis [28]. Particularly when assessing an implant's effect on tissues, the elicited immunologic response is of great interest. Nevertheless, our 3D skin equivalent is an appropriate platform to approach these questions since keratinocytes as our first barrier to the outside world play a major role in immune response [28]. We plan to advance our current 3D skin equivalent by coculturing immune cells as well, as has been done in models for inflammatory skin diseases [33].

As the models are kept static in an incubator under constant conditions, a further limitation of our 3D skin equivalent and basically all coculture models is the absence of physical influential factors such as movement, UV exposure, and pressure or temperature changes, which are present *in vivo*.

Recently, constructed 3D skin equivalents have been used to analyse the skin integration of percutaneous devices, demonstrating one of many potential applications for this type of tissue model [23,30]. While percutaneous devices are usually implanted only temporarily, a testing platform for materials intended to remain in the human body for prolonged periods of time, possibly a lifetime, seems highly interesting. Thus, we experimented with the integration of a foreign material into our 3D skin equivalent. To our knowledge, this is the first report of a 3D skin equivalent enhanced by an intradermal implant.

The crucial development of the characteristic skin strata (Figures 2 and 3) and tight junctions (Figure 4) was not inhibited by the implantation of a foreign body. We did notice a thinning of the epidermal layer, while dermal thickness was not influenced. A possible reason for this observation is discussed in the next section.

Silicone seemed particularly fitting for this study for several reasons: It is a widely used material for implants, which are mostly intended to be kept inside the body for as long as possible, and due to its elasticity, it seemed well manageable for the first trials with foreign materials in our 3D skin model. Furthermore, the immunologic response of *in vitro* keratinocytes and fibroblasts to silicone has not been reported yet despite silicone implants often being inserted into areas with little subcutaneous tissue coverage such as digits and mammae [27].

Our LDH assay aligns with the reported cytocompatibility of silicone, as there was no statistical significance between cell death in samples of skin equivalents with and without such implants [14,27].

Keratinocytes as immunologically active barrier cells secrete various proinflammatory cytokines, among them being the cytokines we tested for in this study (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-33, MCP-1, and TNF- α) and with all of them showing statistically significant higher

concentrations after addition of the silicone implant to our 3D skin equivalent [28,36,37]. Silicone has been shown to elevate the levels of monocyte secretion of IL-6 and TNF- α in vitro [27]. This intersects with our results of keratinocytes releasing statistically significantly more IL-6 and TNF- α , with TNF- α showing a particularly strong reaction in skin equivalents with implant.

MCP-1 mediates acute and chronic inflammation, is a strong attractant for macrophages, and plays an important role in contact dermatitis, where it is secreted by keratinocytes [38,39].

IL-8, as a chemoattractant for various immune cells, showed a doubling in concentration when keratinocytes were confronted with the silicone implant [40].

In acute inflammation, IL-33, as an alarmin, is expressed in human keratinocytes in contrast to murine cells [37,41]. The significant rise in IL-33 concentration in our 3D skin equivalents with implants is thus not only indicative of the proinflammatory potential of silicone but demonstrates once more the importance of research platforms based on human cells such as the one introduced here, as this species-specific reaction could not be replicated in a murine model.

Another interesting observation is the intensified keratin 17 expression in 3D skin equivalents with an implant compared to ones without an implant. Keratin 17, as a filament protein, is elevated in growth under pathological conditions and inflammation processes of skin, further matching the stress cytokine response [42,43].

An up to fourfold increase in the 3D skin equivalent's cytokine response to the implanting of a foreign matter demonstrates that our 3D skin equivalent can be used as a platform for testing different materials for their inflammatory effect on skin.

Since the silicone sample was implanted before polymerisation of collagen prior to cultivation of the 3D skin equivalent, we exclude this completely atraumatic process as a possible cause for the observed stress response.

These proinflammatory conditions provoked by the silicone implant might be one reason for the epidermal layer being noticeably thinner in the implant model compared to the model without implant mentioned above. By contrast, our histological examinations demonstrated that the dermal growth patterns were unaffected by the silicone implant. It is possible that the observed cytokine response representing inflammatory activity slows down the differentiation and cornification of keratinocytes. Insufficient nourishment of cells can be ruled out as a possible cause for the epidermal thinning, as all epidermal cells in the 3D skin equivalents with implants presented this specific characteristic even in border areas, which were not in contact with the implant. Nevertheless, it has to be noted that in vivo implants are placed in mature tissues, which is in contrast to our model, where the implant is already present during the maturation process, possibly negatively influencing cell activities. Although silicone has been shown to affect fibroblast viability in 2D cultures, we could not observe a difference in fibroblast maturation [44]. On the other hand, silicone dressings are explicitly used to treat keloids and hypertrophic scars by reducing keratinocyte stimulation [45]. Although this effect is mostly attributed to hydration, it does align with our evident epidermal thinning.

While to our knowledge, this is the first description of immunohistochemical trials on a 3D skin equivalent with an intradermal implant and the first in vitro analysis of the influence of silicone on keratinocytes and fibroblasts, several limitations have to be considered.

We observed our 3D skin equivalents with implant for 30 days. Silicone implants are left in the body for years and decades, but we currently cannot make assumptions on the long-term effects based on our trials.

Since our model consists of epidermal and dermal equivalent only, we also cannot draw conclusions for implants embedded in the deep subcutaneous or submuscular plane without direct skin contact. It has to be noted however that no direct contact between keratinocytes and the silicone sample was needed for the described immunologic response.

Despite our efforts, we were not able to preserve the implant in our histological samples after the procedure of deparaffinisation of paraffin-embedded sections before

staining. While this did not allow for optimal visual representation of our trials in the figures shown, it did not affect the results.

We see multiple future applications for this newly established 3D skin equivalent with an implant. A broad variety of other materials can be implanted and evaluated for their cytotoxic and proinflammatory properties. By inoculating bacteria, it could also be a useful tool for in vitro investigations on implant infections.

5. Conclusions

We presented a newly established, full-thickness, 3D skin equivalent with a dermal implant, which effectively reproduces the in vivo morphology of human skin and thus could be of value for future in vitro studies on the biocompatibility of various materials for implants.

Furthermore, this study is the first to demonstrate the noncytotoxic and proinflammatory effect of silicone on human keratinocytes and fibroblasts.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines12010224/s1>, Figure S1: Comparison of the graphic abstract of our 3D skin equivalent and immunostaining of skin layer markers to further demonstrate the successful stratification of our 3D skin equivalent.

Author Contributions: Conceptualization, F.S., J.S., G.H., S.L. and O.K.; Data curation, R.N. and O.K.; Formal analysis, O.K.; Funding acquisition, F.S., J.S., G.H., S.L. and O.K.; Investigation, O.K.; Methodology, S.L. and O.K.; Project administration, R.N. and O.K.; Resources, R.N.; Supervision, F.S., P.K., G.H., S.L. and O.K.; Validation, R.N., T.S. and O.K.; Visualization, R.N. and O.K.; Writing—original draft, R.N. and O.K.; Writing—review and editing, R.N., T.S., F.S., P.K., G.H., S.L. and O.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung under grant number FR 335.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University of Leipzig (protocol code 434/20-ek and date of approval 13 October 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are openly available in Zenodo at <https://doi.org/10.5281/zenodo.10309217> (accessed on 18 January 2024).

Acknowledgments: The authors appreciate support from Leipzig University for open access publishing. We acknowledge the support of Jenny Messall, Leipzig University Library, for the formatting of this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Pound, P.; Ebrahim, S.; Sandercock, P.; Bracken, M.B.; Roberts, I. Where is the evidence that animal research benefits humans? *BMJ* **2004**, *328*, 514–517. [[CrossRef](#)]
2. Meigs, L.; Smirnova, L.; Rovida, C.; Leist, M.; Hartung, T. Animal testing and its alternatives—The most important omics is economics. *ALTEX* **2018**, *35*, 275–305. [[CrossRef](#)]
3. Swaters, D.; van Veen, A.; van Meurs, W.; Turner, J.E.; Ritskes-Hoitinga, M. A History of Regulatory Animal Testing: What Can We Learn? *Altern. Lab. Anim.* **2022**, *50*, 322–329. [[CrossRef](#)]
4. Kapałczyńska, M.; Kolenda, T.; Przybyła, W.; Zajączkowska, M.; Teresiak, A.; Filas, V.; Ibbs, M.; Bliźniak, R.; Łuczewski, L.; Lamperska, K. 2D and 3D cell cultures—A comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch. Med. Sci.* **2018**, *14*, 910–919. [[CrossRef](#)]
5. Kohda, K.; Li, X.; Soga, N.; Nagura, R.; Duerna, T.; Nakajima, S.; Nakagawa, I.; Ito, M.; Ikeuchi, A. An In Vitro Mixed Infection Model with Commensal and Pathogenic Staphylococci for the Exploration of Interspecific Interactions and Their Impacts on Skin Physiology. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 712360. [[CrossRef](#)]

6. Chen, L.; Wu, M.; Jiang, S.; Zhang, Y.; Li, R.; Lu, Y.; Liu, L.; Wu, G.; Liu, Y.; Xie, L.; et al. Skin Toxicity Assessment of Silver Nanoparticles in a 3D Epidermal Model Compared to 2D Keratinocytes. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 9707–9719. [[CrossRef](#)]
7. Silva-Pedrosa, R.; Salgado, A.J.; Ferreira, P.E. Revolutionizing Disease Modeling: The Emergence of Organoids in Cellular Systems. *Cells* **2023**, *12*, 930. [[CrossRef](#)]
8. Law, A.M.K.; de la Fuente, L.R.; Grundy, T.J.; Fang, G.; Valdes-Mora, F.; Gallego-Ortega, D. Advancements in 3D Cell Culture Systems for Personalizing Anti-Cancer Therapies. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 782766. [[CrossRef](#)]
9. Fang, G.; Chen, Y.-C.; Lu, H.; Jin, D. Advances in Spheroids and Organoids on a Chip. *Adv. Funct. Mater.* **2023**, *33*, 2215043. [[CrossRef](#)]
10. Duval, K.; Grover, H.; Han, L.-H.; Mou, Y.; Pegoraro, A.F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* **2017**, *32*, 266–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lee, J.; Lilly, G.D.; Doty, R.C.; Podsiadlo, P.; Kotov, N.A. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small* **2009**, *5*, 1213–1221. [[CrossRef](#)]
12. Wu, B.C.; Haney, E.F.; Akhoundsadegh, N.; Pletzer, D.; Trimble, M.J.; Adriaans, A.E.; Nibbering, P.H.; Hancock, R.E.W. Human organoid biofilm model for assessing antibiofilm activity of novel agents. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2021**, *7*, 8. [[CrossRef](#)]
13. Popov, L.; Kovalski, J.; Grandi, G.; Bagnoli, F.; Amieva, M.R. Three-Dimensional Human Skin Models to Understand Staphylococcus aureus Skin Colonization and Infection. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 41. [[CrossRef](#)]
14. Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Yaszemski, M.; Lemons, J.E. (Eds.) *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013.
15. Helal, B. The use of silicone rubber spacers in flexor tendon surgery. *Hand* **1973**, *5*, 85–90. [[CrossRef](#)]
16. Rehart, S.; Kerschbaumer, F. Endoprothetik an der Hand. *Orthopade* **2003**, *32*, 779–783. [[CrossRef](#)]
17. Besmens, I.S.; Giesen, T.; Guidi, M.; Calcagni, M. Der Gelenkersatz mit einem Silikonimplantat bei der Primärversorgung offener Defektverletzungen eines Fingergelenkes. *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.* **2021**, *53*, 482–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Galimberti, V.; Vicini, E.; Corso, G.; Morigi, C.; Fontana, S.; Sacchini, V.; Veronesi, P. Nipple-sparing and skin-sparing mastectomy: Review of aims, oncological safety and contraindications. *Breast* **2017**, *34* (Suppl. S1), S82–S84. [[CrossRef](#)]
19. Yamamoto, S.; Takeuchi, S. Silicone oil and fluorosilicone. *Semin. Ophthalmol.* **2000**, *15*, 15–24. [[CrossRef](#)]
20. Sahan, B.; Ciftci, F. Trephination and silicone tube intubation in the treatment of canalicular obstruction. *Int. Ophthalmol.* **2023**, *43*, 541–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Craig, R.G.; Koran, A.; Yu, R. Elastomers for maxillofacial applications. *Biomaterials* **1980**, *1*, 112–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Walser, E.M. Venous access ports: Indications, implantation technique, follow-up, and complications. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* **2012**, *35*, 751–764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bolle, E.C.L.; Verderosa, A.D.; Dhoubib, R.; Parker, T.J.; Fraser, J.F.; Dargaville, T.R.; Totsika, M. An in vitro Reconstructed Human Skin Equivalent Model to Study the Role of Skin Integration Around Percutaneous Devices against Bacterial Infection. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 670. [[CrossRef](#)]
24. Kim, I.-S. Augmentation Rhinoplasty Using Silicone Implants. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* **2018**, *26*, 285–293. [[CrossRef](#)]
25. Heggers, J.P.P.; Kossovsky, N.M.; Parsons, R.W.M.; Robson, M.C.M.; Pelley, R.P.M.; Raine, T.J.M. Biocompatibility of silicone implants. *Ann. Plast. Surg.* **1983**, *11*, 38–45. [[CrossRef](#)]
26. Achilles, R.B.; DE Souza, D.V.; Quintana, H.T.; Malinverni, A.C.M.; DE Moura, C.F.G.; Branda, G.W.; Renno, A.C.M.; Ribeiro, D.A. Cytotoxicity, Inflammatory Activity, and Angiogenesis Are Induced by Different Silicone Implants. *In Vivo* **2022**, *36*, 1252–1258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Colaris, M.J.L.; Ruhl, T.; Beier, J.P. Effects of Silicone Breast Implants on Human Cell Types In Vitro: A Closer Look on Host and Implant. *Aesthetic Plast. Surg.* **2022**, *46*, 2208–2217. [[CrossRef](#)]
28. Nestle, F.O.; Di Meglio, P.; Qin, J.-Z.; Nickoloff, B.J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 679–691. [[CrossRef](#)]
29. U.S. Department of Health and Human Services. Use of International Standard ISO 10993-1, “Biological Evaluation of Medical Devices—Part 1: Evaluation and Testing within a Risk Management Process”: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. 2023. Available online: <https://www.fda.gov/media/142959/download> (accessed on 16 January 2024).
30. Bolle, E.C.L.; Bartnikowski, N.; Haridas, P.; Parker, T.J.; Fraser, J.F.; Gregory, S.D.; Dargaville, T.R. Improving skin integration around long-term percutaneous devices using fibrous scaffolds in a reconstructed human skin equivalent model. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2020**, *108*, 738–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Metelmann, I.B.; Kraemer, S.; Steinert, M.; Langer, S.; Stock, P.; Kurow, O. Novel 3D organotypic co-culture model of pleura. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0276978. [[CrossRef](#)]
32. Kurow, O.; Nuwayhid, R.; Stock, P.; Steinert, M.; Langer, S.; Krämer, S.; Metelmann, I.B. Organotypic 3D Co-Culture of Human Pleura as a Novel In Vitro Model of Staphylococcus aureus Infection and Biofilm Development. *Bioengineering* **2023**, *10*, 537. [[CrossRef](#)]
33. Moon, S.; Kim, D.H.; Shin, J.U. In Vitro Models Mimicking Immune Response in the Skin. *Yonsei Med. J.* **2021**, *62*, 969–980. [[CrossRef](#)]
34. Morgner, B.; Tittelbach, J.; Wiegand, C. Induction of psoriasis- and atopic dermatitis-like phenotypes in 3D skin equivalents with a fibroblast-derived matrix. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 1807. [[CrossRef](#)]

35. Barker, C.L.; McHale, M.T.; Gillies, A.K.; Waller, J.; Pearce, D.M.; Osborne, J.; Hutchinson, P.E.; Smith, G.M.; Pringle, J.H. The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. *J. Investig. Dermatol.* **2004**, *123*, 892–901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Nakamura, K.; Williams, I.R.; Kupper, T.S. Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): Analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J. Investig. Dermatol.* **1995**, *105*, 635–643. [[CrossRef](#)]
37. Morizane, S.; Mukai, T.; Sunagawa, K.; Tachibana, K.; Kawakami, Y.; Ouchida, M. “Input/output cytokines” in epidermal keratinocytes and the involvement in inflammatory skin diseases. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1239598. [[CrossRef](#)]
38. Conti, P.; DiGioacchino, M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* **2001**, *22*, 133–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Mai, W.; Lu, D.; Liu, X.; Chen, L. MCP-1 produced by keratinocytes is associated with leucocyte recruitment during elicitation of nickel-induced occupational allergic contact dermatitis. *Toxicol. Ind. Health* **2018**, *34*, 36–43. [[CrossRef](#)]
40. Jiang, W.G.; Sanders, A.J.; Ruge, F.; Harding, K.G. Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC- γ and potential clinical implications. *Exp. Ther. Med.* **2012**, *3*, 231–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sundnes, O.; Pietka, W.; Loos, T.; Sponheim, J.; Rankin, A.L.; Pflanz, S.; Bertelsen, V.; Sitek, J.C.; Hol, J.; Haraldsen, G.; et al. Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *J. Investig. Dermatol.* **2015**, *135*, 1771–1780. [[CrossRef](#)]
42. Nair, R.R.; Hsu, J.; Jacob, J.T.; Pineda, C.M.; Hobbs, R.P.; Coulombe, P.A. A role for keratin 17 during DNA damage response and tumor initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2020150118. [[CrossRef](#)]
43. Zhang, X.; Yin, M.; Zhang, L.-J. Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells* **2019**, *8*, 807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hauser, J.; Zietlow, J.; Köller, M.; Esenwein, S.A.; Halfmann, H.; Awakowicz, P.; Steinau, H.U. Enhanced cell adhesion to silicone implant material through plasma surface modification. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, *20*, 2541–2548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tandara, A.A.; Mustoe, T.A. The role of the epidermis in the control of scarring: Evidence for mechanism of action for silicone gel. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **2008**, *61*, 1219–1225. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.