

Оксана КРАЇЛО, студент,

Олена ГОЛЕМБІОВСЬКА, канд. фарм. наук, доц.

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», м. Київ, Україна,
e-mail: ksyuha120@gmail.com

ОПТИМАЛЬНІ СТРАТЕГІЇ СТВОРЕННЯ ТРИВИМІРНИХ МОДЕЛЕЙ ШКІРИ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ *IN VITRO* ДОСЛІДЖЕНЬ

Анотація. Дана робота присвячена дослідженню оптимальних стратегій створення тривимірних моделей шкіри для проведення *in vitro* досліджень. У роботі розглядаються два ключових підходи до моделювання шкіри: безкаркасна модель на основі гідрогелю з клітинами та каркасна модель, створена за допомогою 3D-біопринтингу на основі скафолдів. Досліджено переваги та обмеження кожного з цих методів, а також їхні можливі застосування в регенеративній медицині та наукових дослідженнях.

Ключові слова: Біопринтинг, 3D-модель шкіри, гідрогель, тканинна інженерія, *in vitro*.

Актуальність

Сучасна біомедична наука тяжіє до зменшення випробувань на тваринах з метою збереження останніх з етичних, фінансових та часових міркувань, що призводить до збільшення кількості та різноманітності випробувань *in vitro*. Особливо, це стосується матеріалів та сполук, що не класифікуються, як лікарські засоби або фармацевтичні інгредієнти, проте також можуть нести небезпеку для людини. До таких матеріалів відносяться, наприклад, косметичні продукти. Для них існує заборона на проведення досліджень *in vivo* згідно з Регламентом ЄС 1223/2009 (UNION, 2009). Тому необхідно розробити універсальну модель, яка буде максимально мімікувати шкіру людини та дозволить проводити випробування косметичних засобів *in vitro*. Окрім того, поява досконалої реконструйованої або штучної шкіри може підвищити рівень дослідження приживлюваності трансплантатів при лікуванні опіків і хронічних ран, а також призведе до появи в дослідницькій, дерматокосметологічній і фармацевтичній промисловості широкого спектру продуктів, таких як пігментована, ендотелізована, імунокомпетентна і жирова реконструйована шкіра.

Мета

Дана робота ставить за мету дослідити різні стратегії створення 3D моделі шкіри, їхні переваги та недоліки з метою подальшого вибору оптимізованих підходів до 3D друку шкіри.

Основні матеріали досліджень

Однією з перших 3D-моделей шкіри вважається модель Белла. Вона була запропонована Карасеком і Чарльтоном у 1971 році [1], а розвинута Беллом та співавт. у 1979 році [2]. Одним з основних складників цієї моделі шкіри є колагеновий гідрогель. Методика отримання гідрогелю навантаженого клітинами, складається з декількох етапів. Спершу, фібробласти культивуються в колагеновому гідрогелі, при цьому стійкість і нерозчинність колагену досягається шляхом «втягування» гелю фібробластами; це призводить до утворення живого дермального еквіваленту. У цій моделі проліферація фібробластів пригнічується, ймовірно, за допомогою ретро-контролю та біохімічного обмеження [3]. Другий етап – це висів кератиноцитів на поверхню дермального еквіваленту; кератиноцити розмножуються і диференціюються, що призводить до утворення епідермісу. Такий багатошаровий епідерміс містить необхідні для міцності конструкту елементи, тобто десмосоми та тонофіламенти. Шкірні моделі, отримані за допомогою цього підходу, постійно вдосконалюються. Фактично, модель Белла була доповнена додаванням меланоцитів [4] і гіподерми, що складається з преадипоцитів і зрілих адипоцитів, які культивуються в нижній частині гелю. У роботах часто можна зустріти скорочення RHE, тобто Reconstructed Human Epidermis. Це і є 3D-модель шкіри на основі колагенового гідрогелю. Саме з використанням цієї моделі проводять *in vitro* дослідження на подразнення шкіри за валідованою методикою OECD Test Guideline 439 «*In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method» [5].

Методи дослідження на основі RHE, за відсутності будь-якої васкуляризації в тест-системі *in vitro*, вимірюють ініціюючі події в каскаді, наприклад, пошкодження клітин, тканин, використовуючи життєздатність клітин як показник для обрахунку. Тобто, дана методика може бути використана для вивчення різних аспектів фізіології шкіри, таких як проникність речовин, різноманітні токсикологічні

дослідження та ефективність косметичних продуктів. Метод RHE може бути більш комерційно доступним та менш складним у використанні в порівнянні з іншими методами, що потребують дороговартісних матеріалів або спеціалізованого обладнання. Проте, дана методика не повністю відтворює природну архітектуру шкіри, тобто, дає не повністю реалістичну модель. У цьому відношенні біопринтинг пропонує можливість стандартизувати осадження мікротканин шляхом точного вказаного вище принципу RHE створено та продовжує з'являтися багато різних видів безкаркасних тканин. Наприклад, в дослідженнях можуть використовуватись сфероїди, які також називають мікротканинами[6]. Часто важливо оцінити алергенний, сенсibilізуючий потенціал нових молекул, що вводяться місцево та системно. Для цього можуть використовуватись імунокомпетентні моделі, еквівалентні шкірі. Їх отримують з використанням імунокомпетентних клітин, диференційованих з попередників CD34+, виділених, наприклад з пуповинної крові, які культивують у двовимірному середовищі протягом шести днів. Потім клітини висівають в ендотелізовані еквіваленти шкіри на різних фазах диференціювання епідермісу, щоб сприяти або дермальній, або епідермальній інтеграції [7].

Більш складними є 3D моделі шкіри на основі скафолдів. Ця модель передбачає використання клітин, вирощених в присутності опорних скафолдів, наприклад, гідрогелю або полімерних волокон. Ці каркаси можуть мати різний склад – бути природними, синтетичними або комбінованими полімерами і, на відміну від безкаркасних моделей, являють собою 3D-конструкцію, яка структурно, механічно і функціонально подібна до біологічної тканини [8].

3D-біодрук – це поширена адитивна технологія, яка генерує складні 3D біосумісні структури шляхом роботизованого нанесення біологічних речовин на підкладку з використанням технологій автоматизованого проектування та комп'ютерного виробництва (CAD/CAM). Відповідно до різних принципів формування і матеріалів для друку, технології 3D-біодруку можна умовно розділити на біодрук на основі крапель (droplet-based bioprinting, DBB), біодрук на основі екструзії (extrusion-based printing, EBB) і біодрук на основі фотополімеризації (photocuring-based bioprinting, PBB) [9]. Різні технології 3D біодруку мають різні механізми, в яких обладнання, в'язкість біочорнила, концентрація і життєздатність клітин, температура і час гелеутворення біоматеріалів є важливими факторами, що впливають на результати. Наприклад, біодрук на основі крапель, або термоструменевий біодрук є набагато швидшим і має більшу роздільну здатність за біодрук на основі екструзії. Проте має невеликий асортимент доступних матеріалів через нагрівання біочорнила. На ряду із різноманіттям технологій біодруку шкіри подібна ситуація існує з біоматеріалами. Найпоширенішим біоматеріалом є колаген – він має хорошу біосумісність, може сприяти адгезії, проліферації та міграції клітин, безпечний для організму і може піддаватися ферментативній деградації. Він може бути надрукований при низькій температурі і утворює затверділий гелю при температурі тіла. Однак низька механічна міцність і повільна швидкість гелеутворення обмежують застосування колагену. В даний час багато дослідників працюють над покращенням даного матеріалу. Наприклад, у роботі [10] вчені повідомили, що гідрогелі GelMA-колаген показали сприятливі біологічні та реологічні властивості, які підходять для виготовлення попередньо васкуляризованих замінників тканин за допомогою 3D-біодруку. Також відкрито нове біочорнило з GelMA і колагену, легованого тирозиназою, що використовується для створення живих тканин шкіри за допомогою екструзійного біодруку, та може формувати стабільні 3D-живі конструкції.

Тривимірний біодрук є гнучкою автоматизованою платформою. Гістологічні та імунофлуоресцентні дослідження показали, що 3D-друкована шкіра морфологічно та біологічно відповідає тканині шкіри людини *in vivo* [11]. У порівнянні з традиційними методами інженерії шкіри, 3D біопринтинг має ряд переваг з точки зору збереження форми, гнучкості, відтворюваності та високої продуктивності культури. Він має широкий спектр застосувань. Проте, все ще існує ряд ключових технічних проблем, які необхідно вирішити в біодруці. Це проблема відтворення унікальних фізико-механічних характеристик шкіри, що робить важливим підбір біологічних матеріалів, які відповідають характеристикам шкірної тканини в процесі 3D-біодруку. Вибрані матеріали для друку повинні бути сумісні з системою 3D-друку (біопринтером). Через усадку або зниження міцності цих матеріалів після друку вони можуть не відповідати вимогам для подальшого використання. Механічна міцність 3D-біодрукованих гідрогелів недостатня, а підтримка структурної стабільності після стиснення ускладнена. Тому важливо визначити кращий метод гелеутворення для досягнення швидкості і стабільності, не впливаючи на життєздатність клітин. Стан сучасних досліджень в галузі 3D біодруку шкіри вказує на те, що ідеальне біочорнило ще належить знайти.

Надруковані на 3D-біопрінтері конструкції шкірних тканин не можуть точно імітувати структуру шкіри, наприклад, кровоносні судини, нерви та шкірні придатки [12]. Але вчені зараз активно працюють над вирішенням цих проблем. Так, результати досліджень [13] показали, що спрямована диференціація мезенхімальних стовбурових клітин у потові залози в 3D-друкованій матриці можлива *in vitro*. У роботі [14] показано, що використання фібрину може сприяти ангиогенезу, так що 3D-друкована шкіра може спочатку забезпечити судинну мережу через надруковані канали і спонукати кровоносні судини формувати заміну оригінальної порожнистої мережі.

Висновки

Загалом є дві ключові 3D-моделі шкіри – безкаркасна та каркасна модель. Безкаркасна модель створена на основі гідрогелю культивованого з фібробластами та зверху заселеними кератиноцитами. Вона часто використовується для дослідження пошкодження тканин, використовуючи життєздатність клітин як показник. Також дану методику можна використовувати для дослідження проникнення речовин та токсикологічних досліджень. Цей метод є відносно простим та доступним, проте не дає повної імітації шкіри. Під каркасною моделлю в цій роботі розглядалися моделі створені на основі скафолдів, отриманих методом 3D-біопрінтингу. Існують різні підходи до 3D-біопрінтингу, які залежать від способу нанесення матеріалів та самих біочорнил. Вибір конкретної методики залежить від мети дослідження. Тривимірний біодрук більш детально відтворює модель шкіри і має широкий спектр застосувань у розробці трансдермальних і місцевих препаратів, дослідженні токсичності шкіри та створенні аутологічних трансплантатів для загоєння ран. Проте, не дивлячись на активний розвиток цієї галузі і нещодавно опубліковані перспективні дослідження, шкіра, надрукована на 3D-біопрінтері, поки ще не може абсолютно точно імітувати такі елементи як, наприклад, кровоносні судини, нерви чи шкірні придатки.

Література

1. Karasek M. A. In Vitro Growth and Maturation of Epithelial Cells from Postembryonic Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1975. Vol. 65, no. 1. P. 60–66. URL: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12598046>.
2. Bell E., Ivarsson B., Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979. Vol. 76, no. 3. P. 1274–1278. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.76.3.1274>.
3. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge / F. Berthod et al. *Biomaterials*. 1993. Vol. 14, no. 10. P. 749–754. URL: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(93\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90039-5).
4. Growth of melanocytes in a skin equivalent model in vitro / B. BERTAUX et al. *British Journal of Dermatology*. 1988. Vol. 119, no. 4. P. 503–512. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1988.tb03254.x>.
5. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Home Page. URL: <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en> (date of access: 24.03.2024).
6. Advances in the Biofabrication of 3D Skin in vitro: Healthy and Pathological Models / M. J. Randall et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2018. Vol. 6. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00154>.
7. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering / C. Auxenfans et al. *European Journal of Dermatology*. 2009. Vol. 19, no. 2. P. 107–113. URL: <https://doi.org/10.1684/ejd.2008.0573>.
8. Debels H, Hamdi M, Abberton K, Morrison W. Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2015 Feb 6;3(1):e284. doi: 10.1097/GOX.0000000000000219. PMID: 25674365; PMCID: PMC4323388.
9. Design of Hydrogel-Based Scaffolds for In Vitro Three-Dimensional Human Skin Model Reconstruction / S. H. Tan et al. *SSRN Electronic Journal*. 2022. URL: <https://doi.org/10.2139/ssrn.4153561>.
10. GelMA-collagen blends enable drop-on-demand 3D printability and promote angiogenesis / H. Stratesteffen et al. *Biofabrication*. 2017. Vol. 9, no. 4. P. 045002. URL: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa857c>.
11. 3D Bioprinting in Skin Related Research: Recent Achievements and Application Perspectives / A. Olejnik et al. *ACS Synthetic Biology*. 2021. Vol. 11, no. 1. P. 26–38. URL: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00547>.
12. 3D Bioprinting—A Model for Skin Aging / R. B. Ansaf et al. *Regenerative Biomaterials*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1093/rb/rbad060>.
13. Huang S, Yao B, Xie J, Fu X. 3D bioprinted extracellular matrix mimics facilitate directed differentiation of epithelial progenitors for sweat gland regeneration. *Acta Biomater*. 2016 Mar 1;32:170-177. doi: 10.1016/j.actbio.2015.12.039. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26747979.
14. In Vivo Assessment of Printed Microvasculature in a Bilayer Skin Graft to Treat Full-Thickness Wounds / M. Yanez et al. *Tissue Engineering Part A*. 2015. Vol. 21, no. 1-2. P. 224–233. URL: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0561>.