

RAZVOJ IN VITRO MODELA KOŽE

DOMINIK ŠKRINJAR^{1*}, MAJA SEVER^{2*}, TINA MAVER³, LIDIJA GRADIŠNIK⁴ IN TANJA ZIDARIČ⁵

Sprejeto

7. 3. 2024

Recenzirano

10. 4. 2024

Izdano

31. 5. 2024

¹ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinske vede, Maribor, Slovenija, dominik.skrinjar@student.um.si² Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinske vede, Maribor, Slovenija, maja.sever@student.um.si³ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinske vede, Maribor, Slovenija in Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Katedra za farmakologijo, Maribor, Slovenija, tina.maver@um.si⁴ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinske vede, Maribor, Slovenija, lidiya.gradisnik@um.si⁵ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinske vede, Maribor, Slovenija, tanja.zidarc@um.si

DOPISNI AVTOR

dominik.skrinjar@student.um.si

Znanstvena veda:

Medicina

Ključne besede:

in vitro model kože, reologija, 3D tiskanje, predklinična medicina, kožne bolezni

V raziskavi smo razvili biočrnilo za 3D tiskanje z vključitvijo človeških kožnih celic, sestavljeno iz alginata, metilceluloze in nanofibrilarne celuloze v celičnem mediju. 3D biotiskalnik omogoča ustvarjanje večslojnih ogrodij, ki simulirajo naravno celično mikrookolje kože. Zaradi potrebe po ponovljivosti smo biočrnilo hranili v zamrzovalniku in ga kasneje odtajali. Reološke lastnosti materiala po odtalitvi bistveno vplivajo na njegovo viskoznost, kar vpliva na možnost 3D tiskanja in stabilnost natisnjenih ogrodij. Ugotovili smo, da temperatura zamrzovanja pomembno vpliva na te lastnosti, kar je ključno za nadaljnji razvoj in vitro modela kože, ki je obetaven za predklinične in klinične raziskave.

* Avtorja sta enakovredno doprinesla k raziskavi in si pripadajoče prvo avtorstvo delita.



<https://doi.org/10.18690/analipazu.14.1.29-47.2024>
Besedilo © Škrinjar, Sever, Maver, Gradišnik in Zidarič
2024



DEVELOPMENT OF AN IN VITRO SKIN MODEL

DOMINIK ŠKRINJAR^{1*}, MAJA SEVER^{2*}, TINA MAVER³, LIDIJA GRADIŠNIK⁴ AND TANJA ZIDARIČ⁵

Accepted
7. 3. 2024

Revised
10. 4. 2024

Published
31. 5. 2024

¹ University of Maribor, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Maribor, Slovenia, dominik.skrinjar@student.um.si

² University of Maribor, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Maribor, Slovenia, maja.sever@student.um.si

³ University of Maribor, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Maribor, Slovenia and University of Maribor, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Maribor, Slovenia, tina.maver@um.si

⁴ University of Maribor, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Maribor, Slovenia, lidiya.gradisnik@um.si

⁵ University of Maribor, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Maribor, Slovenia, tanja.zidaric@um.si

CORRESPONDING AUTHOR
dominik.skrinjar@student.um.si

Science:
Medicine

In this study, we developed bioink for 3D printing incorporating human skin cells, composed of alginate, methylcellulose, and nanofibrillar cellulose in a cell medium. The 3D bioprinter allows the creation of multilayer scaffolds that simulate the natural cellular microenvironment of the skin. Due to the need for reproducibility, we stored the bioink in a freezer and thawed it later. The rheological properties of the material after thawing significantly affect its viscosity, impacting the feasibility of 3D printing and the stability of the printed scaffolds. We found that the freezing temperature notably influences these properties, which is crucial for the further development of an in vitro skin model, promising for preclinical and clinical research.

Keywords:
in
vitro
skin
model,
rheology,
3D
printing,
preclinical
medicine,
skin
diseases

* These authors equally contributed to this work.

1 Uvod

1.1 *In vitro* modeli kože

Koža je ključni organ, ki s svojo edinstveno morfologije zagotavlja barierno funkcijo kože, ki tako deluje kot funkcionalna pregrada pred različnimi okoljskimi vplivi, vključno s temperaturnimi spremembami, mehanskimi poškodbami in mikroorganizmi (Choudhury et al., 2020). Poleg tega, da opravlja številne vitalne funkcije, ima človeška koža visoko sposobnost samoobnavljanja, kar je povezano s konstantno proliferacijo bazalnih celic v povrhnjici kože (Suhail et al., 2019). Po poškodbi se koža naravno odzove in sproži štiri fazni proces spontanega popravila: hemostazo, vnetje, proliferacijo in preoblikovanje (Randall et al., 2018).

Izguba kožne bariere vodi v resne fiziološke posledice. Tako odprte rane predstavljajo visoko tveganje za izgubo tekočin, vnetje in bakterijsko kolonizacijo z okužbo, kar lahko privede do sepse. Po poškodbi zaraslo tkivo pogosto izgubi funkcionalnost in prvotne lastnosti nepoškodovane kože (Savoji et al., 2018). Kljub ogromnemu napredku v zadnjih desetletjih na področju celjenja ran, ostajajo avtologne presaditve kože s plastmi zmanjšane debeline zlato merilo v klinični praksi pri zdravljenju velikih ran. Vendar pa ta pristop prinaša omejitve, kot so pomanjkanje donorske kože in morebitna dodatna zdravstvena tveganja, povezana s postopkom presaditve, kot so brazgotinjenje, kirurške okužbe, hematomi in krvavitve (Sanabria-de la Torre et al., 2020).

V zadnjem času predstavljajo *in vitro* izdelani kožni nadomestki obetaven pristop za reševanje teh težav in spodbujanje prehoda od uporabe pasivnih oblog ran k uporabi bioaktivnih *in vitro* konstruktov kože z vgrajenimi celicami (Choudhury et al., 2020). Tridimenzionalni (3D) *in vitro* modeli kože postajajo vse pomembnejši v regenerativni medicini in tudi v farmacevtski ter kozmetični industriji. Poleg uporabe kožnih presadkov za celjenje ran so se *in vitro* modeli kože izkazali pomembni tudi v temeljnih in predkliničnih raziskavah; za testiranja neinvazivnih senzorjev, za *in vitro* preizkušanja potencialnih neželenih vnetnih odzivov pri razvoju in optimizaciji (trans)dermalnih zdravil ter za vrednotenje kozmetičnih izdelkov. Testiranja na *in vitro* modelih kože z vključenimi človeškimi celicami boljše posnemajo fiziologijo človeške kože, omogočajo zmanjšanje števila poskusnih živali v predkliničnih testiranjih skladno z naraščajočimi omejitvami v zvezi s preizkušanjem na živalih v

luči etičnih pomislekov. Zaradi medvrstnih razlik so *in vitro* modeli z vključenimi človeškimi celicami ustrezni za pridobivanje temeljnih vpogledov v etiologijo kožnih bolezni ter za proučevanje z boleznimi povezanih patofizioloških mehanizmov.

1.2 Uporaba *in vitro* modelov kože v predklinični in klinični medicini

1.2.1 Regeneracija in rekonstrukcija kožnega tkiva

V splošnem so vsi pristopi zdravljenja ran usmerjeni v ustvarjanje okolja, ki zmanjšuje pojavnost okužb, vzdržuje ustrezno vlažnost in pospešuje epitelizacijo ran. Eden od ključnih namenov *in vitro* modelov kože je dopolniti ali zamenjati presadke kože, ki se uporabljajo za zdravljenje hudih poškodb kože (Randall et al., 2018). Trenutno je v klinični praksi zlato pravilo pri zdravljenju ran polne debeline presaditev kože lastnega tkiva. Pri tem postopku se povrhnjica (oz. *epidermis*) kože skupaj z zgornjim delom spodaj ležeče usnjice (oz. *dermisa*) odstrani z nepoškodovane kože in nato prenese na rano polne debeline. Po prenosu na rano kapilare presadka kože tvorijo anastomoze, tj. povezave z obstoječo kapilarno mrežo in tako presadku zagotovijo hranila. To imenujemo prevzem presadka. Darovalno mesto se zaceli podobno kot rana površinske delne debeline z migracijo keratinocitov iz lasnih mešičkov, žlez znojnic in robov ran. Vendar, če je normalno celjenje tkiva moteno ali ni na voljo dovolj zdravega tkiva za presaditev, je lahko potreben konstruktivni tkivni inženiring (Choudhury et al., 2020). Zaradi velikega pomena in povpraševanja po nadomestkih kože, obstaja dolga zgodovina razvoja s poudarkom na ustvarjanju biomaterialov za nadomestitev kože. Glavna težava pri razvoju nadomestkov kože še zmerom ostaja oblikovanje ustrezne podlage, ki bi ustrezno posnemala povrhnjico in usnjico pri ljudeh ter tako izpolnjevala estetske in funkcionalne zahteve. Tkivno inženirstvo je doživelo eksponentno rast v zadnjih letih, s številnimi komercialnimi nadomestki za usnjico in povrhnjico. Čeprav so nekateri nadomestki pokazali izboljšanje kliničnih izidov po poškodbah, noben posamezen nadomestek za kožo, ki je trenutno na trgu, ni omogočil popolne obnove normalne strukture in fiziološke funkcije kože. Ko je koža obsežno poškodovana, izgubi sposobnost preprečevanja bakterijskih okužb in regulacije temperature ali zadrževanja vlage (Savoji et al., 2018). Naravni odziv na hude poškodbe kože pri odraslih, ki vključuje granulacijo in re-epitelizacijo tkiva, se odraža s hitrim razmnoževanjem fibroblastov, ki naključno odlagajo kolagenska vlakna, da zapolnijo strukturne pomanjkljivosti tkiva. Sledi migracija keratinocitov in kontrakcija

miofibroblastov, ki obnavljajo kožno pregrado. To kopičenje dezorganiziranega tkiva vodi v nastanek fibrotične brazgotine, pogosto povezane s pomanjkanjem ali izgubo senzibilitete in biomehanskih lastnosti kože (Zidarič, 2023). Celjenje obsežnejših ran torej ne obnovi v celoti funkcije, histološke strukture ali estetike kože. Tudi senzorični in avtonomni živci, prisotni v sosednjih predelih zdrave kože, lahko rastejo in se končno vračajo v območje rane, vendar je ta proces počasen in nikoli popoln (Radnall et al., 2018). Nazadnje, in tudi zelo pomembno iz perspektive bolnika, izguba melanocitov vodi v spremembe barvnega odtenka kože, kar je s trenutnimi kozmetičnimi pristopi težko oz. nemogoče izboljšati (Mohd et al., 2014).

1.2.2 Modeliranje fizioloških procesov v koži

V *in vitro* modelih kože uporabljajo v 3D strukture vključene človeške celice, s čimer je omogočena simulacija interakcij med celicami in zunajceličnim ogrodjem kože. Večina *in vitro* modelov posnema zdravo, nekateri pa simulirajo poškodovano ali obolelo kožo (Mohd et al., 2014).

1.2.2.1 Keratinizacija kože in njena zaščitna vloga

Povrhnjica je sestavljena iz (vsaj) štirih plasti, v katerih poteka proliferacija celic oz. keratinocitov. Metabolno neaktivne celice, napolnjene s keratinom in filagrinom imenujemo korneociti, in ta sloj 10-15 celic v lipidnem matriku tvorijo le najbolj zunanjo roženo plast (ali *stratum corneum*), ki je ključen za barierno funkcijo kože. V spodnjih plasteh so celice žive, proti površini pa vedno bolj diferencirane in metabolno manj aktivne (Zvonar, 2021). Simulacija kožne pregrade v *in vitro* modelih kože je zelo kompleksna kar se odraža v delno spremenjeni barierni funkciji pri *in vitro* modelih v primerjavi s človeško kožo (Franklin et al., 2017). Raziskave kažejo, da dodajanje prostih maščobnih kislin v kulturo izboljša morfogenezo povrhnjice, vendar količina lipidov v roženi plasti kljub temu ostane nižja kot pri naravni koži (Zidarič, 2023). Različne študije modelov kože so raziskale povezavo med tesnimi stiki celic v povrhnjici, tako med korneociti in keratinociti kot tudi bazalnimi celicami, ki so pritjene na spodaj ležeco bazalno membrano in permeabilnostjo kože, z uporabo citokinov, kot so interleukini IL-4, IL-17 in IL-22 (Nachman et al., 2016). Pokazali so, da so motnje v tvorbi tesnih stikov povezane z okrnjeno barierno funkcijo rožene plasti, na kar vpliva količina lipidov in profilagrina (Slivka et al., 1993).

1.2.2.2 Staranje kože

Različni dejavniki, kot so kopičenje mutacij, toksični presnovki, radikali in glikacija kolagenskih vlaken, so vpleteni v proces staranja. *In vitro* modeli kože, natančneje usnjice, kjer so procesi staranja najbolj izraženi, omogočajo hitrejši napredek v dognanjih glede vplivov različnih dejavnikov na staranje kože. Taki modeli omogočajo obsežne raziskave vpliva ultravijolične (UV) svetlobe na fotostarjanje, vpliv glikacije kolagena v usnjici na kronološko staranje ipd. Za staranje kože so pomembne tudi spremembe v lastnostih različnih fibroblastov, zato je potrebno pri razvoju *in vitro* modela usnjice vključiti različne populacije kožnih fibroblastov (Nachman et al., 2016).

1.2.3 Modeliranje kožnih bolezni

V preteklosti je razvoj novih zdravil za zdravljenje kožnih bolezni v velikem obsegu slonel na poskusih na živalih v okviru predkliničnih študij. Današnje raziskave del predkliničnega testiranja prenašajo na testiranja *in vitro* z ekvivalenti kože z vključenimi človeškimi celicami, pri čemer se živalskim poskusom, vsaj v bližnji prihodnosti, verjetno ne bomo mogli v celoti izogniti. V zadnjem času je v razvoju število *in vitro* modelov kože za različne kožne bolezni, kar zmanjšuje potrebo po eksperimentalnih poskusih na živalih. Širok spekter *in vitro* modelov kožnih bolezni zajema različna vnetna kožna obolenja, kožnega raka idr. (Choudhury et al., 2020). Za ustvarjanje bolezenskih modelov kože obstajata dva glavna pristopa: 1) priprava *in vitro* modela z vključenimi celicami bolnika ali 2) dodajanje genov in molekul, ki delujejo kot sprožilci bolezni prvotno zdravi *in vitro* koži (Zidarič, 2023).

1.2.3.1 Atopijski dermatitis

Atopijski dermatitis (AD) je najpogostejša kronična vnetna bolezen kože, za katero so značilne spremembe v strukturi kože. Kažejo se kot pordeli, suhi in luščeči se predeli, ki jih spremlja srbenje. Ker gre za izredno kompleksno bolezen, ki predstavlja velik terapevtski izziv, sodobne terapevtske smernice poudarjajo pomen celovitega zdravljenja (Vitek, 2023). Nastane kot posledica kombinacije genetskih, okoljskih in imunoloških dejavnikov, ki vodijo v oslABLJENO barierno funkcijo kože. AD spremlja kompleksna patologija, ki vključuje okvaro epidermalne pregrade in

sistemska vnetja, ki jih spremljajo kronično prekomerno nastajanje vnetnih citokinov in okvare kožne bariere. Raziskave so usmerjene v razvoj *in vitro* modelov kože, ki simulirajo patološke značilnosti AD, s poudarkom na možnosti spremljanja interakcij med različnimi tipi celic v koži, kar lahko pomaga pri razvoju učinkovitih terapevtskih pristopov (Choudhury et al., 2020).

1.2.3.2 Luskavica

Luskavica je kronična avtoimuna bolezen kože, ki se kaže z nastankom luskastih, eritematoznih lezij. Običajno jo spremljajo pridružene bolezni kot so bolezni srčno-žilnega sistema in artritis. Za razumevanje patofiziologije luskavice se uporabljajo *in vitro* modeli kože, bodisi v obliki 2D enoslojnih modelov ali 3D rekonstruiranih kožnih nadomestkov. Slednji omogočajo raziskovanje interakcij med različnimi celicami kože in imunskimi celicami ter preučevanje učinkov terapevtskih zdravil. Kljub temu se vsak model osredotoča zgolj na določene vidike patofiziologije luskavice, zaradi česar je ključno izbrati ustrezno modelno okolje glede na zastavljene cilje analize (Choudhury et al., 2020).

1.2.3.3 Kožna kandidoza

Kožna kandidoza je glivična okužba, ki jo povzroča kvasovka *Candida albicans*. *In vitro* modeli kože lahko služijo kot osnova za preučevanje patologije in interakcij med kožo ter povzročitelji bolezni. Ti modeli omogočajo raziskovanje učinkovitosti protiglivičnih zdravil in identifikacijo novih terapevtskih strategij. Poleg tega se modeli, ki vključujejo imunske celice, lahko uporabljajo za preučevanje kompleksnih imunsko-kožnih odzivov na okužbo (Savoji et al., 2018).

1.2.3.4 Bakterijske okužbe kože

Bakterijske okužbe kože so povezane z različnimi dejavniki, ki vplivajo na kožno pregrado in mikrobnobno kolonizacijo. 3D *in vitro* modeli človeške kože so uporabni tudi kot raziskovalno orodje za študije interakcij kože z bakterijami, kot je *Staphylococcus aureus*, predvsem v smislu razumevanja mehanizmov adhezije mikroorganizmov na kožo ter za oceno vpliva fizikalno-kemijskih interakcij in reliefa površine na biokontaminacijo. Razvoj modelov omogoča tudi testiranje novih

terapevtskih pristopov, vključno z obliži za zmanjšanje kolonizacije bakterij in preprečevanje širjenja bakterijskih okužb na koži, npr. pri kolonizaciji s *S. aureus* v primeru bolnikov z AD (Suhail et al., 2019).

1.2.3.5 Kožni rak

Kožni rak zajema različne klinične tipe, vključno z bazalnoceličnim karcinomom, ploščatoceličnim karcinomom in melanomom, ki predstavlja enega klinično najzahtevnejših oblik raka pri svetlopoltih po vsem svetu. Običajno je povezan s poškodovanim tkivom, raziskovalci pa so v različnih raziskavah uporabljali 3D *in vitro* modele kožnega raka, da bi razvozlali zapletene interakcije znotraj dermo-epidermalnega in tumor-stromalnega predela pri kožnem raku (Zidarič, 2023). Največ raziskav je narejenih na *in vitro* 3D modelih melanoma. Melanociti, ki so vključeni v *in vitro* 3D model kože kažejo melanocitno homeostazo in napredovanje melanoma, podobne tistim v človeški koži. Uspešno vključevanje živih melanocitov, celic melanoma, keratinocitov in fibroblastov je ključno za ustvarjanje funkcionalnega *in vitro* 3D modela melanoma kože. Različne metode, kot so uporaba poroznih opornic, vzgoja celic po metodi "viseče" kaplje (iz angl. hanging drop method) in večcelični tumorski sferoidi, so bile uporabljene v raziskavah za posnemanje rasti melanoma v 3D prostorskem okolju. Ti modeli prispevajo k bolj celovitemu razumevanju razvoja in napredovanja kožnega raka, saj omogočajo dragocen vpogled v celične in molekularne interakcije, ki vplivajo na patofiziologijo tumorja in odzive na terapevtska sredstva (Randall et. al, 2018).

1.3 Namen izvedbe preliminarne raziskave

3D biotiskanje predstavlja visoko napredno metodo za izdelavo 3D strukturiranih ogrodij za razvoj *in vitro* modelov kože. Z uporabo računalniško podprtega oblikovanja (ang. computer-aided design, CAD) ima biotiskanje potencial za ustvarjanje kompleksnih makroskopskih arhitektur, ki dobro posnemajo naravno zunajcelično ogrodje (ang. extracellular matrix, ECM) v usnjici, kar omogoča lažjo pritrditev in proliferacijo različnih vrst celic hkrati. Ključni korak pri 3D biotiskanju ogrodja z vključenimi celicami je izbira in oblikovanje idealnega biočrnila (tj. materiala z vključenimi celicami), ki mora imeti ustrezne lastnosti, kot so biokompatibilnost, visokoelastično obnašanje, mehansko integriteto in ustrezno razgradljivost. V večini primerov je biočrnilo za pripravo *in vitro* mehkih tkiv

sestavljen iz biokompatibilnih hidrogelov (iz naravnih in/ali sintetičnih polimerov) in suspenzije želenih celic, kar omogoča ustvarjanje kompleksnih biomimetičnih nadomestkov tkiv. V tej začetni raziskavi smo se osredotočili na možnost zagotovitve identičnega biočrnila za izvedbo vseh potrebnih metod s katerimi smo nato vrednotili lastnosti izhodnega materiala. Zaradi zagotovitve ustrezne količine materiala za pripravo ustreznega števila modelov in njegovih spremenljivih biomehaničnih lastnosti je namreč bilo težko vnaprej pripraviti povsem ponovljive izhodne materiale, kar lahko vpliva na ne-ponovljivost posameznih meritev tekom dolgoročnih raziskav. Želeli smo še preveriti, kako hranjenje izhodnega materiala pri različnih temperaturah in v različnem času vpliva na reološke lastnosti materiala, ki so ključne za printabilnost, kar bo služilo kot osnova za nadaljnji razvoj *in vitro* modela kože.

2 Materiali in metode

2.1 Materiali

Alginat (ALG, Mw: 80 kDa), metilceluloza in kalcijev klorid, ki smo ga uporabili za zamreževanje v material vključenega alginata, so iz podjetja Sigma-Aldrich iz Nemčije. Suspenzijo nanofibrilarnе celuloze (NFC, 3 % (m/m)) smo pridobili iz Centra za razvoj procesov na Univerzi v Mainu (Orono, ME, ZDA). Uporabljeni medij Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (ADMEM in fetalni goveji serum (FBS) sta iz podjetja Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Nemčija). Pred raziskovalnim delom nismo prilagajali ali spreminjali nobene od uporabljenih sestavin za pripravo biočrnila. Za pripravo raztopin kalcijevega klorida (in drugih vodnih raztopin) smo uporabili ultra čisto vodo (18,2 M Ω cm pri 25 °C), ki smo jo dobili z uporabo sistema za čiščenje vode ELGA PURELAB (ELGA LabWater, Veolia Water Technologies, High Wycombe, VB).

2.2 Metode

2.2.1 Priprava biočrnila

Mešanico materialov ALG, MC in NFC smo pripravili z mešanjem z mešalom, da smo zagotovili homogen material, ustrezen za 3D tisk in za pripravo nastanka stabilnih ogrodiv z ohranjeno geometrijo (Zidaric et al., 2020). Izbrana kombinacija materialov je bila že potrjena v več raziskavah kot odlična podlaga za kožne celice (Ćurić et. al, 2023). Nadaljni postopek priprave biočrnila zajema še vmešanje celične suspenzije z brizgami ali z ročnim vmešanjem. Ker gre za preliminarne raziskave, smo v drugem koraku ročno vmešali zgolj medij ADMEM, brez dodanih celic. Osnovna receptura za pripravo modelnega biočrnila je naslednja:

1. Za pripravo ALG-MC-NFC (AMN) hidrogela (10 g) smo najprej združili 0,375 g ALG, 0,75 g MC in 2,625 mL ADMEM + 5 % FBS ter 6,25 g NFC.
2. Od pripravljenega homogenega AMN hidrogela smo odvzeli 8 g (4 enote) in dodali 2 mL ADMEM suspenzije (1 enoto), da smo na koncu imeli 10 g biočrnila.

Pred vnosom ADMEM v osnovni AMN hidrogel, smo slednjega za 30 minut sterilizirali pod UV svetlobo, da smo v celoti posnemali postopek, ki je potreben, ko bodo dodane tudi celice.

Za potrebe te raziskave smo pripravili večjo količino osnovnega hidrogela, pri čemer smo del zamrzili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, kot kontrola (CTRL) pa nam je služil sveže pripravljen hidrogel AMN.

2.2.2 3D biotiskanje

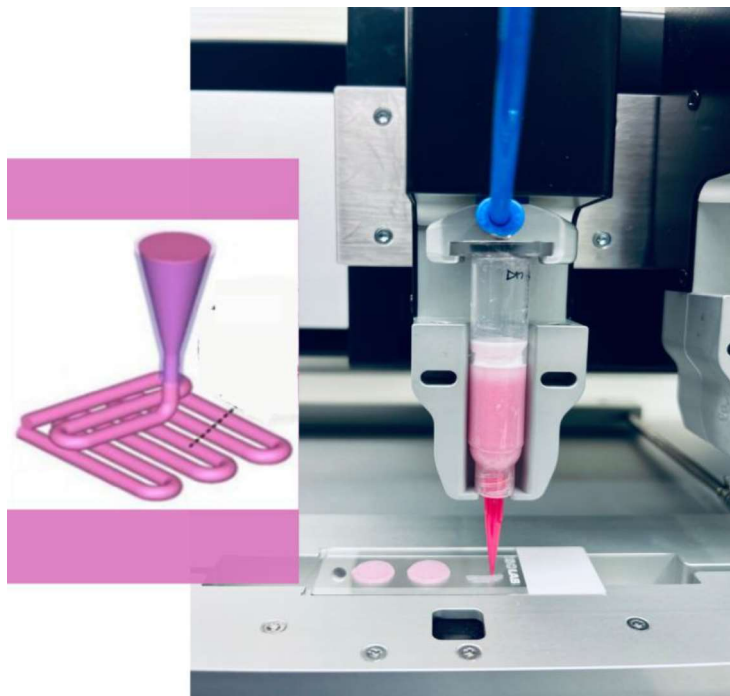
3D biotiskanje je inovativna tehnika, ki omogoča pripravo natančno določenih 3D ogrodiv z vključenimi živimi celicami in bioaktivnimi molekulami, kot so rastni dejavniki in citokini, v predhodno določenih prostorskih lokacijah s pomočjo računalniško podprtega načrtovanja (Milojevic et al., 2019).

Ekstruzijsko 3D biotiskanje omogoča izdelavo večplastnih tkivnih struktur, kjer se kontrolirano nalaga plast za plastjo, kar zagotavlja visoko stopnjo prilagodljivosti in ponovljivosti. Ključnega pomena pri 3D tiskanih biočrnilih in modelih kože je lastnost posnemanja ECM, ki zagotavlja simulacijo naravne strukture in biokemijskih signalov za lažjo pritrditev in proliferacijo v material vključenih celic. Hkrati omogoča ustrezno komunikacijo med celicami in diferenciacijo v strukturi prisotnih celic. Na ta način se lahko ustvari kakovostni model kože, ki

zagotovi estetske kot tudi funkcionalne lastnosti kože (Ishack & Lipner, 2020; Lee et al., 2014; Markstedt et al., 2015; Masri et al., 2022; Milojevic et al., 2019; Murphy et al., 2020; Ng et al., 2017).

3D biotiskalnik omogoča natančno nalaganje materialov v X, Y in Z smereh, kar omogoča ustvarjanje kompleksnih 3D struktur in s tem zagotovitev ustreznih pogojev za vključene celice ter posledično tvorbo *in vitro* modelov (Aljohani et al., 2018; Markstedt et al., 2015).

Na podlagi postopka 3D biotiskanja, ki je bil izveden na Inštitutu za biomedicinske vede (Milojevic et al., 2019), smo iz pripravljenega biočrnila izdelali 4-slojna ogrodja v obliki valja. Zasnova strukture (premer 10 mm in višina 0,8 mm) je bila izvedena s programsko opremo Scaffold Generator v5 (Inštitut IRNAS, Maribor, Slovenija). Uporabili smo pristop izdelave plast za plastjo in dobili 3D strukturo (**slika 1**).



Slika 1: Slikovni prikaz izdelave ogrodij iz biočrnila

Vir: lasten

Uporabili smo 3D biotiskalnik VitaPrint (Institut IRNAS, Maribor, Slovenija), ki omogoča oblikovanje 3D ogrodij izbrane velikosti, oblike in gostote por. Uporabili smo ekstruzijske šobe (Nordon EFD, East Providence, RI, ZDA) s premerom 0,25 mm. Zaporedne plasti smo nizali na stekleno površino z zasukom kota $0^\circ/90^\circ$.

2.2.3 Zamreženje z 1 % CaCl_2

Po končanem tiskanju so bila vsa natisnjena ogrodja ionsko zamrežena z 1 % raztopino CaCl_2 , kar je prav tako kot samo 3D tiskanje potekalo v aseptičnih pogojih v komori z laminarnim pretokom zraka. Ogrodja so bila v raztopini CaCl_2 namočena 5 minut, kar je bilo dovolj, da je prišlo med ALG in NFC komponentami do zamreženja. Prisotnost negativnih nabojev na površini ALG in NFC namreč omogoča tvorbo elektrostatskih in vodikovih vezi z bivaletnimi kalcijevimi ioni (Ca^{2+}), ki stabilizirajo polimerno mrežo hidrogela. S tem korakom smo zagotovili, da bodo 3D natisnjena ogrodja ohranila mehansko stabilnost. Zamrežena ogrodja so bila nato previdno odstranjena iz raztopine in premaknjena v ploščico z 12 vdolbinicami, ki smo jo ustrezno označili. Vsa ogrodja smo zalili z 1 mL ADMEM + 5 % FBS, da so bila v celoti prekrita. Celotno P12 ploščo smo takoj prenesli v inkubator, nastavljen na 37°C , v nadzorovanem okolju s 5 % CO_2 (za zagotovitev popolnoma enakih pogojev, ki jim bo tekom raziskav podvržen tudi 3D tiskano biočrnilo z vključenimi celicami kože).

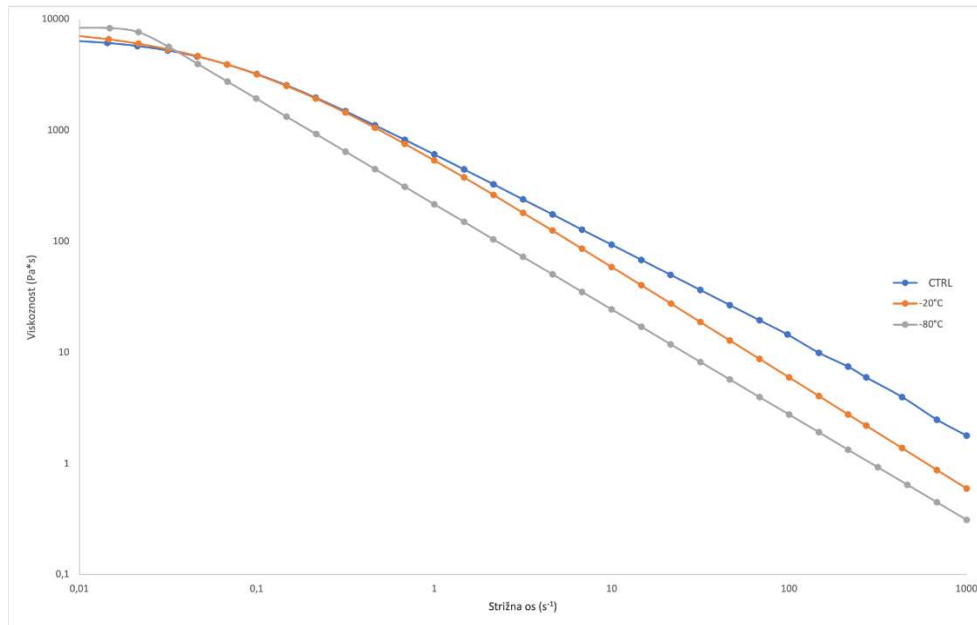
2.2.4 Reologija

Reološke lastnosti formulacije pripravljenega materiala smo izmerili z reometrom Rheolab QC (Anton Paar, Gradec, Avstrija) s sistemom valja CC27-SN25789 (Anton Paar, Avstrija) v skladu s standardom ISO 3219. Meritve smo izvedli pri 25°C . Profile viskoznosti smo določili pri strižni hitrosti ($\dot{\Gamma}$) od 0,01 do 1000 s^{-1} , kar obsega 31 merilnih točk na vsakih 10 s, skupaj za 310 s. Analiza in prilagajanje krivulj sta bila izvedena po modelu Carreau-Yasuda (Garcia et al., 2014).

3 Rezultati in diskusija

3D *in vitro* modeli kože se vedno bolj uveljavljajo tudi na področju predkliničnih in kliničnih preiskav kot alternativa testiranjem na živalih. Pri takšnih raziskavah je ključno, da so posamezne metode ponovljive in da so podatki pridobljeni na čim bolj primerljivih vzorcih. Najoptimalnejše bi bilo, če bi lahko pripravili ustrezno količino biočrnila za kasnejše tiskanje modelov in nadaljnje vrednotenje njegovih biomehaničnih in kemijskih lastnosti. V tem primeru bi se ognili nastanku variacij, do katerih pride že zaradi same priprave materialov. Tako smo v okviru te raziskave pripravili večjo količino izhodnega materiala, ki smo ga 7 dni hranili pri dveh temperaturah $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po tem času smo material odmrznili in preverili primerljivost reoloških lastnosti tako hranjenega materiala z meritvami, ki smo jih izvedli z istim materialom pred zamrzovanjem.

Ključna omejitev za uporabo posameznih materialov z metodo 3D tiska z ekstruzijo je printabilnost materiala, kar pomeni zmožnost ekstruzije zelenih 3D struktur in ohranjanje njihove geometrije. Printabilnost ne vpliva le na 3D strukturo natisnjene ogrodja, temveč tudi na njegove mehanske in biološke lastnosti. Sestava hidrogelov, ki služijo kot del končnega modela kože, je eden od dejavnikov, ki značilno vplivajo na pretočnost in površinsko napetost, kar med drugim vpliva na izdelavo 3D ogrodij. Ustrezna rigidnost ogrodja bistveno vpliva na možnost pritrditve in na proliferacijo vanj vključenih celic. Pri izdelavi 3D ogrodij mora osnovni hidrogel ohraniti površinsko napetost v navpični smeri ter imeti velik stični kot s podlago, na katero se tiska. Torej za visoko hidrofilni material ni primerna uporaba preveč hidrofobnega substrata, saj se s tem pojavi možnost, da bodo hidrogelni filamentni preveč plosko nanešeni na substrat (Markstedt et al., 2015). Prilagajanje mehanskih lastnosti biočrnila, kot je elastičnost, omogoča regulacijo več dejavnikov, ki vplivajo na printabilnost, predvsem ločljivosti. Neustrezne reološke lastnosti materiala (npr. viskoznost) lahko zaradi potencialnega širjenja 3D natisnjenih filamentov vplivajo na celotno ločljivost tiskanja, od česa je odvisna gradnja več plasti in s tem je lahko onemogočeno natančno oblikovanje različnih 3D struktur (Rutz et al., 2015). Tako je ustrezna viskoznost materiala ključna lastnost, ki opredeljuje možnost 3D tiskanja s posameznim materialom. Za doseg optimalnega ekstruzijskega 3D biotiskanja, ki poteka plast za plastjo, smo preučili pretočne lastnosti pripravljene materiala, ki v tej raziskavi simulira biočrnilo (slika 2).



Slika 2: Meritve viskoznosti biočrnila na osnovi ALG/MC/NFC. Na grafu so prikazane meritve za kontrole biočrnila, torej svežega biočrnila, ter biočrnil, ki so bili zamrznjeni 7 dni pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vir: lasten

Dobljena krivulja pretoka kaže lastnost strižnega redčenja biočrnila, pri kateri se viskoznost znižuje s povečevanjem strižne hitrosti. Pri 3D biotiskanju takšno obnašanje omogoča gladko prehajanje biočrnila skozi šobo z zmanjšanim tveganjem za zamašitev šobe. Kombinacija izbranih polimerov ALG, MC in NFC izkazuje psevdoplastično obnašanje, sicer značilno za polimerne raztopine. Pri tem je značilno zmanjšanje viskoznosti kot odziv na povečanje strižne hitrosti (Ning et al., 2018; Mota, Pereira, 2022). Negativni površinski naboj hidrogelnih materialov, na osnovi NFC in ALG, ki doprinese k visoki viskoznosti in strižnemu tanjšanju (ang. shear-thinning), zagotavlja dobro printabilnost teh materialov (Markstedt et al., 2015; Szychlinska et al., 2022). S **slike 2** je razvidno, da ima CTRL, pri katerem smo pomerili reološke lastnosti takoj po pripravi, pri nizki strižni hitrosti (10 s^{-1}) višjo viskoznost (vrednost viskoznosti okoli 100 Pa s), medtem ko pri povečanju strižne hitrosti na 100 s^{-1} njegova viskoznost pade na približno 14 Pa s . To pomeni, da se z večanjem strižne hitrosti, zaradi strižnih sil, makromolekule poravnajo bolj v smeri toka, zaradi česar je pretočni upor manjši.

Krivulji odtaljenih biočrnih v sliki 2, ki smo ju 7 dni hranili zamrznjena na -20 in -80 °C, se razlikujeta od CTRL. Čeprav se zamrznjena biočrnica obnašata podobno, njuna viskoznost pri višjih strižnih hitrostih pade bolj kot pri CTRL, pri čemer je ta padec za biočrnico, ki je bilo zamrznjeno na -80 °C, izrazitejši. Biočrnico, ki je bilo 7 dni zamrznjeno na -20 °C, ima pri 10 s^{-1} viskoznost približno 60 Pa s in pri 100 s^{-1} približno 6 Pa s . Medtem ko ima biočrnico, ki je bilo 7 dni zamrznjeno na -80 °C, pri strižni hitrosti 10 s^{-1} viskoznost $24,5\text{ Pa s}$, pri 100 s^{-1} pa pade na 3 Pa s .

Te razlike v krivuljah viskoznosti se kažejo v spremenjeni printabilnosti omenjenih biočrnih. Izrazitejši padec pri višjih strižnih napetosti biočrnica, ki je bil zamrznjen pri -80 °C, kot posledica povečanih mehanskih napetosti, kot so strižne sile, je najverjetneje razlog za težave, ki smo jih zaznali tudi pri poskusu 3D tiskanja tega materiala. Pri vzorcih, ki so bili 7 dni zamrznjeni, je biočrnico težje prehajalo skozi šobo, kar je vodilo do večkratnih zamašitev šobe. Posledično je prihajalo do strukturnih pomanjkljivosti pri natisnjenih 3D ogrodjih (npr., odsotnost določenih plasti), kar je vplivalo na končno mehansko integriteto ogrodja. Kljub omenjenim težavam, imata zamrznjeni biočrnici ohranjenih dovolj lastnosti strižnega tanjšanja, da se lahko uporabita za 3D tiskanje samostojecih 3D ogrodij z želeno obliko, pri čemer je sicer za pričakovati večjo porabo materiala zaradi možnih zapletov z zamašitvijo šob.

4 Zaključek

Nadaljnja optimizacija biočrnica lahko olajša izdelavo bolj kompleksnih *in vitro* modelov kože. Ti modeli lahko bistveno prispevajo k boljšemu razumevanju delovanja kože in kožnih bolezni, pripomorejo k izdelavi kakovostnih presadkov kože ter služijo kot orodje za testiranja in raziskovanja bolezni, vključno z vrnotenjem dermalnih in transdermalnih formulacij. S tem se odpirajo nove možnosti za razvoj učinkovitih in varnih zdravil ter medicinskih pripomočkov, hkrati pa se, skladno z načeli etičnosti, zmanjšuje potreba po testiranju na živalih. Pri teh raziskavah je ključno, da izvajamo preiskave pod enakimi pogoji in da imamo čim večjo ponovljivost, k čemu bi bistveno doprinesla možnost izdelave celotnega materiala za vse potrebne raziskave, pri čemer bi bilo nujno potrebno vmesno zamrzovanje. Zamrznitev izhodnega materiala (biočrnica) bi lahko olajšala delo in

zagotovila doslednost rezultatov. V opisani raziskavi smo ugotovili, da zaradi zamrzovanja sicer pride do delnega vpliva na lastnosti materiala, ki vpliva tudi na njegovo printabilnost. Potrebne bodo nadaljnje študije, ki bodo potrdile primerljivost stabilnosti, mehanskih in kemijskih lastnosti tako pripravljenega materiala.

Opombe – slovar okrajšav in uporabljenih pojmov

ALG = alginat

MC = metilceluloza

NFC = suspenzija nanofibrilizirane celuloze

ADMEM = Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS = fetalni goveji serum

3D = tri dimenzije

UV svetloba = ultravijolična svetloba

ECM = zunajcelično ogrodje

Zahvala

Avtorji se zahvaljujejo za finančno podporo, ki so jo za izvedbo študije prejeli od Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (številke dotacij: P3-0036 in L7-4494).

Literatura

Aljohani, W., Ullah, M. W., Zhang, X., & Yang, G. (2018). Bioprinting and its applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Int J Biol Macromol*, 107(Pt A), 261-275. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.171>

Bhushan B, Tang W (2011) Surface, tribological, and mechanical characterization of synthetic skins for tribological applications in cosmetic science. *J Appl Polym Sci* 120(5):2881–2890

Choudhury S, Das A (2020) Advances in generation of three-dimensional skin equivalents: preclinical studies to clinical therapies. *Cytotherapy*. 2020 Jan;23(1):1-9. doi: 10.1016/j.jcyt.2020.10.001. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33189572; PMCID: PMC8079860.

Čurić, L.Č., et al., Development of a novel NiCu nanoparticle-loaded polysaccharide-based hydrogel for 3D printing of customizable dressings with promising cytotoxicity against melanoma cells. *Materials Today Bio*, 2023. 22: p. 100770.

- Franklin S, Baranowska J, Hendriks C, Piwowarczyk J, Nachman M (2017) Comparison of the friction behavior of occluded human skin and synthetic skin in dry and moist conditions. *Tribol Trans* 60(5):861–872
- Garcia, M. C., Alfaro, M. C., Calero, N., & Munoz, J. (2014). Influence of polysaccharides on the rheology and stabilization of alpha-pinene emulsions. *Carbohydr Polym*, 105, 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.055>
- Ishack, S., & Lipner, S. R. (2020). A Review of 3-Dimensional Skin Bioprinting Techniques: Applications, Approaches, and Trends. *Dermatol Surg*, 46(12), 1500-1505. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000002378>
- Lee, V., Singh, G., Trasatti, J. P., Bjornsson, C., Xu, X., Tran, T. N., Yoo, S. S., Dai, G., & Karande, P. (2014). Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng Part C Methods*, 20(6), 473-484. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2013.0335>
- Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., Martinez Avila, H., Hagg, D., & Gatenholm, P. (2015). 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*, 16(5), 1489-1496. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00188>
- Masri, S., Zawani, M., Zulkiflee, I., Salleh, A., Fadilah, N. I. M., Maarof, M., Wen, A. P. Y., Duman, F., Tabata, Y., Aziz, I. A., Bt Hj Idrus, R., & Fauzi, M. B. (2022). Cellular Interaction of Human Skin Cells towards Natural Bioink via 3D-Bioprinting Technologies for Chronic Wound: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010476>
- Milojevic, M., Vihar, B., Banovic, L., Misko, M., Gradišnik, L., Zidaric, T., & Maver, U. (2019). Core/shell Printing Scaffolds For Tissue Engineering Of Tubular Structures. *J Vis Exp*(151). <https://doi.org/10.3791/59951>
- Mohd Noor SNA, Mahmud J (2014) A review on synthetic skin: materials investigation, experimentation and simulation. *Adv Mater Res, Trans Tech Publ*, pp 858–866
- Mota, G., Pereira R., *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences Engineering* 2022, 44. <https://doi.org/10.1007/s40430-022-03406-0>
- Murphy, S. V., De Coppi, P., & Atala, A. (2020). Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. *Nat Biomed Eng*, 4(4), 370-380. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0471-7>
- Nachman M, Franklin S (2016) Artificial skin model simulating dry and moist in vivo human skin friction and deformation behaviour. *Tribol Int* 97:431–439
- Ng, W. L., Wang, S., Yeong, W. Y., & Naing, M. W. (2017). Skin Bioprinting: Impending Reality or Fantasy? (*Trends in Biotechnology* 34, 689-699; September 2016). *Trends Biotechnol*, 35(3), 278. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.009>
- Ning, L., Sun, H., Lelong, T., Guilloteau, R., Zhu, N., Schreyer, D. J., & Chen, X. (2018). 3D bioprinting of scaffolds with living Schwann cells for potential nerve tissue

- engineering applications. *Biofabrication*, 10(3), 035014. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aacd30>
- Randall MJ, Jünger A, Rimann M, Wuertz-Kozak K (2018) Advances in the biofabrication of 3D Skin in vitro: healthy and pathological models. *Front Bioeng Biotechnol* 6:154
- Rutz, A. L., Hyland, K. E., Jakus, A. E., Burghardt, W. R., & Shah, R. N. (2015). A multimaterial bioink method for 3D printing tunable, cell-compatible hydrogels. *Adv Mater*, 27(9), 1607-1614. <https://doi.org/10.1002/adma.201405076>
- Sanabria-de la Torre R, Fernández-González AFV, Quiñones-Vico MI, Montero-Vilchez T, Arias-Santiago S (2020) Bioengineered skin intended as in vitro model for pharmacocosmetics, skin disease study and environmental skin impact analysis. *Biomedicine* 8(11):464
- Savoji H, Godau B, Hassani MS, Akbari M (2018) Skin tissue substitutes and biomaterial risk assessment and testing. *Front Bioeng Biotechnol* 6:86
- Slivka SR, Landeen LK, Zeigler F, Zimmer MP, Bartel RL (1993) Characterization, barrier function, and drug metabolism of an in vitro skin model. *J Invest Dermatol* 100(1):40–46
- Suhail S, Sardashti N, Jaiswal D, Rudraiah S, Misra M, Kumbar SG (2019) Engineered skin tissue equivalents for product evaluation and therapeutic applications. *Biotechnol J* 14(7):1900022
- Szychlińska, M. A., Bucchieri, F., Fucarino, A., Ronca, A., & D'Amora, U. (2022). Three-Dimensional Bioprinting for Cartilage Tissue Engineering: Insights into Naturally-Derived Bioinks from Land and Marine Sources. *J Funct Biomater*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/jfb13030118>
- Vitek, M., Zvonar Pobirk, A., Gašperlin, M., & Gosenca Matjaž, M. (2023). Izzivi in sodobni pristopi k zdravljenju atopijskega dermatitisa = Challenges and modern approaches to the treatment of atopic dermatitis. *Zdravniški vestnik*, 92(1–2), 79–92. <https://vestnik.sz.d.si/index.php/ZdravVest/article/view/3331>
- Zhang, Y., Ye, L., Cui, J., Yang, B., Sun, H., Li, J., & Yao, F. (2016). A Biomimetic Poly(vinyl alcohol)-Carrageenan Composite Scaffold with Oriented Microarchitecture. *ACS Biomater Sci Eng*, 2(4), 544-557. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00535>
- Zidaric, T., Milojevic, M., Gradisnik, L., Stana Kleinschek, K., Maver, U., & Maver, T. (2020). Polysaccharide-Based Bioink Formulation for 3D Bioprinting of an In Vitro Model of the Human Dermis. *Nanomaterials (Basel)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/nano10040733>
- Zidarič, T.; Kleinschek, K.S.; Maver, U.; Maver, T. (Eds.) *Commercial Skin Equivalents. In Function-Oriented Bioengineered Skin Equivalents: Continuous Development Towards Complete Skin Replication*; Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, 2023

Zvonar Pobirk, A. (2021). Pomen barierne funkcije za zdravje naše kože = The skin health and the role of epidermal barrier function. *Farmaceutski vestnik*, 72(4), 231–241. <http://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:doc-MLDGQF9V>