МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

BIOMEDICAL RESEARCH

СОЗДАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ АНАЛОГОВ КОЖИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ 3D-БИОПЕЧАТИ

С. А. Пелешок, О. А. Нагибович, М. В. Титова, О. В. Протасов

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург, Россия

CREATING OF ARTIFICIAL SKIN ANALOGUES BY 3D-BIOPRINTING

S. A. Peleshok, O. A. Nagibovich, M. V. Titova, O. V. Protasov

S. M. Kirov Military Medical Academy the Russian Defense Ministry, Saint Petersburg, Russia

Резюме. Актуальной проблемой здравоохранения продолжают оставаться глубокие раны и ожоги кожи, требующие лечения с помощью различных видов кожной пластики. На сегодняшний день технология трехмерной биопечати (3D-биопечати) позволяет получить экспериментальные аналоги кожи с формированием функционирующих межклеточных контактов, управляемой структурой внеклеточного матрикса, дифференцировкой кератиноцитов и возможностью неоваскуляризации при имплантации в экспериментальные раны лабораторным животным. Целью данной работы является анализ существующих источников получения клеток кожи и методических подходов к трехмерной биопечати для создания искусственных аналогов кожи (библ.: 24 ист.).

Ключевые слова: гидрогели, кератиноциты, мезенхимальные стволовые клетки, раны кожи, трехмерная биопечать, 3D-биопечать кожи, фибробласты.

Summary. The full-thickness wounds and burns of skin remain the current health care issue, which requires treatment by different methods of dermepentesis. Nowadays, 3D-bioprinting technology allows to obtain experimental skin substitutes with formation of functional intercellular contacts, controlled extracellular matrix structure, the keratinocytes differentiation and neovascularization potential while the implantation into experimental wounds of laboratory animals. The aim of this study is to learn and compare actual 3D-bioprinting technical approaches for creating artificial skin substitutes and laboratory methods to study the characteristics of the resulting tissue (bibliography: 24 refs).

Key words: fibroblasts, hydrogels, keratinocytes, mesenchymal stem cells, skin wounds, 3D-bioprinting, 3D-bioprinting of skin.

ВВЕДЕНИЕ

В РФ ежегодно регистрируется до 12,5 млн различных по характеру и локализации травм (8,4 тыс. случаев на 100 тыс. человек), среди которых поверхностные травмы и открытые раны суммарно составляют 50%. Ожоги остаются актуальной проблемой здравоохранения, составляя до 8% всех травм мирного времени. В год от ожогов в России страдает более 400 тыс. человек и около 20% пациентов с ожогами получают глубокие ожоги, и им требуется лечение с помощью различных видов кожной пластики [1]. Одной из важнейших задач медицины является решение проблемы лечения глубоких повреждений кожи (ран, ожогов) в результате воздействия различных внешних причин (механических, химических и др.). Коже как наиболее уязвимой к травмам необходимы быстрые и надежные методы регенерации. Обширные и глубокие раны кожи, глубокие ожоги 3-й и 4-й степени чаще всего требуют лечения с помощью различных видов кожной пластики [2]. Аутологичный кожный лоскут является наилучшим материалом для закрытия кожной раны, однако доступность донорской кожи может быть ограничена, а алло- или ксенографты, которые используются для временного закрытия ожоговой раны, как правило, отторгаются в течение 1 нед [2–6].

Кожные заменители помогают преодолеть ограничения традиционных методов обработки кожи с точки зрения технологических, временных ресурсов и затрат, но лечение ими глубоких ран, ожогов 3-й или 4-й степени до сих пор проблематично [7].

Одним из вариантов решения проблемы создания кожной ткани для имплантации пациентам с ранениями и ожогами, а также для изучения новых лекарственных средств может быть использование современной технологии трехмерной биопечати.

СОЗДАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ АНАЛОГОВ КОЖИ

Технология трехмерной биопечати позволяет создавать 3D-модели высокого разрешения, включающие различные типы клеток, без повреждения структуры клеток и изменения клеточного фенотипа [8–11].

Для получения функционирующей кожной ткани необходимо учесть все особенности технологии трехмерной биопечати [12].

На этапе подготовки к биопечати сначала создается цифровая трехмерная модель участка повреждения с использованием неинвазивных методов исследования (сканирование и др.) и происходит выбор способа и материалов для 3D-биопечати.

Управление процессом биопечати производится с помощью специальной компьютерной автоматизированной программы по созданию сложной архитектуры ткани [13, 14].

Генерация тканей с помощью 3D-биопечати требует выделения клеток (аутологичных и/или др.), которые в дальнейшем культивируют в лабораторных условиях с целью получения необходимого их количества для печати на биопринтере. Существуют различные технологии трехмерной печати, однако принцип работы биопринтера заключается в послойном нанесении на поверхность построения слоев живых клеток (биочернил) из печатной головки и использовании специального гидрогеля в качестве каркаса (биобумаги) для нанесения клеток [15, 16]. В трехмерной биопечати существенное влияние на выживаемость клеток в напечатанных конструкциях имеют диаметр сопла, дозирующего клетки, и возникающие при печати эффекты раздаточного давления. Также важен выбор оптимальной подложки (биополимера, гидрогеля) для использования в качестве жидкого компонента биочернил [8, 14].

Впоследствии, после биопечати, для созревания ткани может использоваться биореактор, где поддерживается высокая жизнеспособность клеток путем дозирования ростовых факторов, фазовых изменений гидрогеля [8].

Клетки кожи, используемые в качестве компонента биочернил для биопечати, предварительно выделяются и культивируются.

В литературе описана методика культивирования кератиноцитов кожи при 37 °C в среде Игла в модификации Дульбекко (Дульбекко–Игла), дополненной 15% фетальной бычьей сывороткой.

Дермальные фибробласты культивируются путем засева первичной культуры в среду Дульбекко–Игла с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина [9, 11].

Гингивальные фибробласты выдерживают в модифицированной среде, содержащей 5% лизата тромбоцитов человека, пенициллин (100 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и амфотерицин В (2 нг/мл), в течение 2-недельного периода. Полученные гингивальные фибробласты способны к мультилинейной дифференциации [11].

Иммortalизованные фибробласты крайней плоти человека перед использованием поддерживаются в ростовой среде, содержащей Иск-модифицированную среду Дульбекко, дополненную 10% эмбриональной бычьей сывороткой [17].

Костномозговые мезенхимальные клетки выделяют из надосадочной жидкости фрагментов губчатых костей после центрифугирования, высевают и культивируют при 37 °C в α -минимум эссенциальной среде (Masopharma) с 10 мкг/мл ципрофлоксацина и 8% лизата тромбоцитов человека в качестве источника факторов роста [10, 18].

Стволовые клетки из волосяных фолликулов, полученные при трепанобиопсии и последующей ферментативной обработке, культивируют в модифицированной среде Дульбекко–Игла с добавлением 150 ед/мл пенициллина и 150 мкг/мл стрептомицина и амфотерецина В и последующим переносом первичной культуры на модифицированную систему Rheinwald–Green [17, 19].

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) создаются путем введения зрелым фибробластам четырех факторов транскрипции, ответственных за пролиферативные характеристики эмбриональных стволовых клеток. Полученные человеческие иПСК были фенотипически, генотипически и эпигенетически плюрипотентными благодаря способности дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков [20].

Исследования [17] показали, что иПСК могут дифференцироваться в лабораторных условиях в мультидифференцированный эпидермис, включая невральные клетки, меланоциты, клетки волосяных фолликулов и сальных желез.

Существующие способы 3D-биопечати (лазер-опосредованная биопечать, биопечать каплями и экструзионная (дозированное вытеснение) биопечать) позволяют создавать многослойную матрицу и послойно печатать клетки, биоимитируя нативную ткань кожи, которая значительно-дифференцирована и многослойна [21].

В эксперименте [11] по печати каплями многослойного аналога кожи из фибробластов и кератиноцитов на матриксе из коллагена 1-го типа, полученного из хвостов крыс, были выбраны в качестве оптимальных следующие параметры 3D-биопечати: плотность фибробластов 2 млн/мл в дерме, 5 млн/мл кератиноцитов в эпидермисе и расстояние между каплями 500 мкм. Число коллагеновых слоев для дермы и эпидермиса определяли на основании толщины одного коллагенового слоя (~140 мкм). Многослойную структуру коллагена со встроенными клетками построили на поли-D-лизиновом покрытии стеклянного дна чашки Петри с добавлением бикарбоната натрия.

В другом исследовании была произведена биопечать фибрин/коллагенового геля, содержащего взвесь мультипотентных стволовых клеток амниотической жидкости человека и мезенхимальных стромальных клеток (16,6 млн клеток/мл) [11]. В результате продемонстрированы ускорение заживления экспериментальных эксцизионных кожных ран, нанесенных лабораторным мышам, и улучшенная реваскуляризация в месте повреждения.

В настоящее время эксперименты направлены на биопечать кожи многослойными конструктами из фибробластов и кератиноцитов. Результаты проводимых исследований свидетельствуют о том, что 3D-печатная кожа может сохранять свою первоначальную форму, архитектуру, физические размеры

и структуру в течение всего времени ее культивирования. Дальнейшее направление развития в этой области будет состоять в создании полноценных аналогов кожи, в структуре которых будет обеспечено присутствие всех типов клеток, составляющих нативную кожу, включая меланоциты и нервные клетки [9, 11, 12, 22, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день технология 3D-биопечати позволяет получить экспериментальные аналоги кожи с формированием функционирующих межклеточных контактов, управляемой структурой межклеточного матрикса, дифференцировкой кератиноцитов и потенциалом к неоваскуляризации

при имплантации в экспериментальные раны лабораторным животным. Дальнейшее развитие исследований в этой области должно быть направлено на получение многослойных аналогов кожной ткани, полученных из аутологических клеток пациента, включающих в состав все типы клеток, присутствующих в нативной коже. 3D-биопечать является перспективной технологией получения клеточных биоматериалов для лечения пациентов с ранами и ожогами [8, 12].

Технология трехмерной биопечати также имеет перспективы использования в таргетной и персонализированной медицине. 3D-модели опухолей кожи *in vitro* со сконструированной опухолевой микросредой необходимы для изучения пролиферации, миграции клеток и лечения рака кожи [23, 24].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Alekseev A. A., Tyurnikov Yu. I. Analysis of the main statistical indicators of Russian hospitals for patients with burns during the 2009–2012 period. In: IV s'ezd kombustsiologov Rossii. Moscow; 2013: 5–8. Russian (Алексеев А. А., Тюрников Ю. И. Анализ основных статистических показателей работы российских ожоговых стационаров за 2009–2012 годы. В сб.: IV съезд комбустиологов России. М.; 2013: 5–8).
2. Aleynik D. Ya., Zorin V. L., Eremin I. I., Korsakov I. N., Charykova I. N. Cell technologies using to restore skin damage in burn injury. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2015; 4: 18–30. Russian (Алейник Д. Я., Зорин В. Л., Еремин И. И., Корсаков И. Н., Чарыкова И. Н. Использование клеточных технологий для восстановления повреждений кожи при ожоговой травме. Современные проблемы науки и образования. 2015; 4: 18–30).
3. Zorin L. V., Kopnin P. B., Zorina A. I., Eremin I. I., Lazareva N. L., Chazova T. S., Samchuk D. P., Petrikina A. P., Eremin P. S., Korsakov I. N., Grinakovskaya O. S., Kotenko K. V., Pulin A. A. Optimization of the conditions for obtaining and maintaining of skin fibroblasts cultures and human gum cultures. Geny & Kletki. 2014; 9 (2): 53–60. Russian (Зорин В. Л., Копнин П. Б., Зорина А. И., Еремин И. И., Лазарева Н. Л., Чаузова Т. С., Самчук Д. П., Петрикина А. П., Еремин П. С., Корсаков И. Н., Гринаковская О. С., Котенко К. В., Пулин А. А. Оптимизация условий для получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека. Гены & Клетки. 2014; 9 (2): 53–60).
4. Kotenko K. V., Eremin I. I., Moroz B. B., Bushmanov A. Yu., Nadezhina N. M., Galstyan I. A., Grinakovskaya O. S., Ak-senenko V. A., Deshevoy Yu. B., Lebedev V. G., Slobodina T. S., Zhgutov Yu. A., Laik-Dubitskiy S. E., Eremin P. S. Cell technologies in the radiation burns treatment: experience of a Federal Medical Biological Center named after A. I. Burnazyan. Kle-tochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. 2012; 7 (2): 97–102. Russian (Котенко К. В., Еремин И. И., Мороз Б. Б., Бушманов А. Ю., Надежина Н. М., Галстян И. А., Гринаковская О. С., Аксененко А. В., Дешевой Ю. Б., Лебедев В. Г., Слободина Т. С., Жгуттов Ю. А., Лаук-Дубицкий С. Е., Еремин П. С. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов: опыт ФМБЦ имени А. И. Бурназяна. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012; 7 (2): 97–102).
5. Krylov K. M., Kozulin A. D., Panov A. V., Blinova M. I. An application experience of a dermal equivalent in the 3rd degree burns treatment. In: III s'ezd kombustsiologov Rossii. Moscow; 2010: 174. Russian (Крылов К. М., Козулин Д. А., Панов А. В., Блинова М. И. Опыт применения дермального эквивалента в лечении ожогов 3-й степени. В сб.: III съезд комбустиологов России. М.; 2010: 174).
6. Пат. 2499603 Российская Федерация, МПК А61К 35/36. Способ лечения глубоких ожогов на ранних этапах [Текст] / Карякин Н. Н., Докукина Л. Н., Алейник Д. Я., Аминев В. А., Квицинская Н. А., Соколов Р. А.; заявитель и патентообладатель «Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации. Заявл. 01.06.12. Опубл. 27.11.13. Бюл. № 33.
7. Rees A., Powell L. C., Chinga-Carrasco G., Gethin D. T., Syverud K., Hill K. E., Thomas D. W. 3D bioprinting of carboxymethylated-periodate oxidized nanocellulose constructs for wound dressing applications. Biomed. Res. Int. 2015; 925757. DOI: 10.1155/2015/925757
8. Mironov V. A. In the footsteps of Gutenberg: three dimensional bioprinting of organs. Priroda. 2013; 10: 3–12. Russian (Миронов В. А. По стопам Гутенберга: трехмерная био-печать органов. Природа. 2013; 10: 3–12).
9. Michael S., Sorg H., Peck C.-T., Koch L., Deiwick A., Chichkov B., Vogt P. M., Reimirs K. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. PLoS One. 2013; 8 (3): e57741. DOI: 10.1371/journal.pone.0057741
10. Schmelzer E., Over P., Gridelli B., Gerlach J. C. Response of primary human bone marrow mesenchymal stromal cells and dermal keratinocytes to thermal printer materials in vitro. J. Med. Biol. Eng. 2016; 36: 153–67. DOI: 10.1007/s40846-016-0118-z
11. Lee V., Sing G., Trasatti J. P., Bjornsson C., Xu X., Tran T. N., Yoo S. S., Dai G., Karande P. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. Tissue Eng. Part C: Methods. 2014; 20 (6): 473–84. DOI: 10.1089/ten
12. Vijayavenkataraman S., Lu W. F., Fuh J. Y. H. 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modeling, materials, and processes. Biofabrication. 2016; 8: 032001. DOI: 10.1088/1758-5090/8/3/032001
13. Nagibovich O. A., Peleshok S. A., Korovin A. E., Kopylenkova T. I., Shilin V. P., Ol'khovik A. Y., Shevchenko V. A. 3D-modeling and bioprinting in military medicine. Clin. Patofisiol. 2015; 3: 17–23. Russian (Нагибович О. А., Пелешок С. А., Коровин А. Е.,

- Копыленкова Т. И., Шилин В. П., Ольховик А. Ю., Шевченко В. А. 3D-моделирование и биопринтирование в военной медицине. *Клин. патофизиол.* 2015; 3: 17–23).
14. Peleshok S. A., Protasov O. V., Nagibovich O. A., Titova M. V., Astanina A. K., Eliseeva M. I. Fundamentals of three-dimensional bioprinting. In: *Innovatsii v meditsinskoy, farmatsevticheskoy, veterinarnoy i ekologicheskoy mikrobiologii: vsenos. nauch.-prakt. konf. Saint Petersburg; 2017: 209–11. Russian (Пелешок С. А., Протасов О. В., Нагибович О. А., Титова М. В., Астанина А. К., Елисеева М. И. Основы трехмерной биопечати. В сб.: Инновации в медицинской, фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии: всерос. науч.-практ. конф. СПб.; 2017: 209–11).*
 15. Peleshok S. A., Titova M. V., Sheveleva V. S., Eliseeva M. I., Astanina A. K. Using of three dimensional (3D) hydrogels in a cartilage tissue recovery, bone tissue recovery and skin recovery technologies. In: *Sovremennye problemy okhrany zdorov'ya voennosluzhashchikh: materialy konf. Saint Petersburg; 2016: 149–51. Russian (Пелешок С. А., Титова М. В., Шевелева В. С., Елисеева М. И., Астанина А. К. Использование трехмерных (3D) гидрогелей в технологиях восстановления кожных покровов, хрящевой и костной ткани. В кн.: Современные проблемы охраны здоровья военнослужащих: материалы конф. СПб.; 2016: 149–51).*
 16. Peleshok S. A., Titova M. V., Eliseeva M. I., Sheveleva V. S., Mullashev A. F., Astanina A. K. Using of hydrogels in 3D-bioprinting. *Proceeding of the 12th Russian-German Conference on Biomedical Engineering. Suzdal; 2016: 256–7.*
 17. Kumar A., Mohanty S., Nandy S., Gupta S., Khaitan B. K., Sharma S., Bhargava D., Airan D. Hair and skin derived progenitor cells: In search of a candidate cell for regenerative medicine. *Indian J. Med. Res.* 2016; 143 (2): 175–83. DOI: 10.4103/0971-5916.180205
 18. Schu S., Nosov M., O'Flynn L., Shaw G., Treacy O., Barry F., Murphy M., O'Brien T., Ritter T. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16 (9): 2094–103. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01509.x
 19. Chavez-Munoz C., Nguyen K. T., Xu W., Hong S.-J., Mustoe T. A., Galiano R. D. Transdifferentiation of adipose-derived stem cells into keratinocyte-like cells: engineering a stratified epidermis. *PLoS One.* 2013; 8 (12): e80587. DOI: 10.1371/journal.pone.0080587
 20. Torres-Espin A., Hernández J., Navarro X. Gene expression changes in the injured spinal cord following transplantation of mesenchymal stem cells or olfactory ensheathing cells. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e76141. DOI: 10.1371/journal.pone.0076141
 21. Peleshok S. A., Titova M. V., Eliseeva M. I., Sheveleva V. S., Mullashev A. F. Choosing of hydrogels for using in regenerative medicine. In: *Pervaya rossiiskaya konferenciya: fizika — naukam o zhizni: tez. dokl. Saint Petersburg; 2016: 107. Russian (Пелешок С. А., Титова М. В., Елисеева М. И., Шевелева В. С., Муллашев А. Ф. Выбор гидрогелей для использования в регенеративной медицине. В сб.: Первая российская конференция: физика — наукам о жизни: тез. докл. СПб.; 2016: 107).*
 22. Murphy S. V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32 (8): 773–85. DOI: 10.1038/nbt.2958
 23. Nagibovich O. A., Peleshok S. A., Titova M. V., Eliseeva M. I. 3D printing for medicine. In: *Pervaya rossiiskaya konferenciya: fizika — naukam o zhizni: tez. dokl. Saint Petersburg; 2016: 155. Russian (Нагибович О. А., Пелешок С. А., Титова М. В., Елисеева М. И. 3D-печать для медицины. В сб.: Первая российская конференция: физика — наукам о жизни: тез. докл. СПб.; 2016: 155).*
 24. Skardal A., Devarasetty M., Forsythe S., Atala A., Soker S. A reductionist metastasis-on-a-chip platform for in vitro tumor progression modeling and drug screening. *Biotechnol. Bioeng.* 2016; 113: 2020–32. DOI: 10.1002/bit.25950

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Пелешок Степан Андреевич — докт. мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(911)2118173, e-mail: peleshokvma@mail.ru

Нагибович Олег Александрович — докт. мед. наук, доцент, начальник научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(921)9327929, e-mail: olegnagibovich@mail.ru

Титова Мария Владимировна — канд. хим. наук, научный сотрудник НИО (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(921)8899314, e-mail: titovamaryv@mail.ru

Протасов Олег Вячеславович — канд. мед. наук, начальник НИО (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(904)3379912, e-mail: olegprotasov025@gmail.com

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Peleshok Stepan A. — M. D., D. Sc. (Medicine), Prof., Leading researcher, Science Research Center, S. M. Kirov Military Medical Academy the Russian Defense Ministry, 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(911)2118173, e-mail: peleshokvma@mail.ru

Nagibovich Oleg A. — M. D., D. Sc. (Medicine), Assoc. Prof., Head of the Science Research Center, S. M. Kirov Military Medical Academy the Russian Defense Ministry, 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(921)9327929, e-mail: olegnagibovich@mail.ru

Titova Maria V. — Ph. D. (Chemistry), Researcher, Biomedical department, Science Research Center, S. M. Kirov Military Medical Academy the Russian Defense Ministry, 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(921)8899314, e-mail: titovamaryv@mail.ru

Protasov Oleg V. — M. D., Ph. D. (Medicine), Head of biomedical department, Science Research Center, S. M. Kirov Military Medical Academy the Russian Defense Ministry, 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(904)3379912, e-mail: olegprotasov025@gmail.com