

**Academia
Oamenilor de Știință
din România**



**Academy
of Romanian
Scientists**

Add: Str. Ilfov nr. 3 sector 5, 050045, București, ROMANIA, Cod Fiscal: 5091859
Tel. 00-4021/314.74.91; Fax. 00-4021/314.75.39, Web-site: www.aosr.ro, E-mail: aosromania@yahoo.com

Domeniul: Științe ale informației

Platformă skin on chip pentru testarea *in vitro* a nanoparticulelor

Raport 2

Perioada: 01.08.2024 – 30.11.2024

Membri echipă proiect

Dr. Ing. Daniel Măriuța

Dr. Biochim. Mina Ghiță Răileanu

Dr. Biochim. Bianca-Maria Tihăuan

Avizat din parte eBio-hub, Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnica București

Dr. Ing. Ciprian Iliescu

Introducere

Caracteristicile unice ale pielii o fac permeabilă mediului înconjurător, permițând astfel difuzia aerului, căldurii, fluidelor și moleculelor cu greutate moleculară mică [1]. Difuzia cutanată poate avea loc prin trei căi principale: (a) intracelular, prin spațiile dintre corneocite; (b) transcelular, prin corneocite și matricea lipidică înconjurătoare; sau (c) prin anexe, cum ar fi glandele sudoripare și foliculii de păr [2]. Aceste proprietăți oferă o metodă alternativă de administrare a medicamentelor, în special prin aplicarea transdermică în fluxul sanguin, care este adesea mai convenabilă pentru confortul și accesibilitatea pacienților în comparație cu administrarea orală sau parenterală [3]. Administrarea transdermică vizează în primul rând efectele locale, reducând nevoia de terapii cu medicamente sistemice, scăzând doza totală necesară pentru tratarea unor situsuri specifice și minimizând efectele secundare [4].

Considerente biologice în dezvoltarea platformelor tip *Skin on chip*

a) *Sursa celulară*

Sursa celulară condiționează puternic platformele biomimetice SoC, deoarece obținerea arhitecturii și fiziologiei dorite este vitală. În ultimele trei decenii, o înțelegere mai profundă a citologiei pielii și a țesuturilor adiacente acestora a stimulat progresul domeniului SoC către echivalente cutanate realizate cu diverse modele dinamice și vascularizate [5]–[9]. Până în prezent, printre cele mai multe modele tip *in house* și disponibile comercial care replică structura pielii se numără epiderma umană reconstruită (RHE) [10], aceasta fiind o metodă de testare fiabilă pentru evaluarea iritației pielii *in vitro* (TG 439) implementată în 2010 de către organismul OCDE prin intermediul Centrului European pentru Validarea Metodelor Alternative (ECVAM) [11]. Cu toate acestea, proiectarea modelelor de piele 3D din celulele primare umane reprezintă o provocare, în principal datorită denaturării sau lipsei peisajului imunologic specific [12]–[17]. Limitările sunt predominante atât în rândul modelelor de piele de tipul epidermei reconstituite [12], [18] sau a modelelor care conțin celule endoteliale (EC) [19], [20] până la modele tip *full thickness* [14], [21] și replicanți cu trei straturi [16], [22].

Sursa celulară poate fi autogenă (ajută la minimizarea respingerii imune și la îmbunătățirea stării fiziologice relevanța modelului), alogenic (contribuie la o gamă mai largă de diversitate

genetică) sau xenogenă (luat în considerare atunci când se întâlnește deficitul într-o celulă umană sau pentru studii de interacțiuni între specii), fiecare prezentând avantaje și provocări specifice [23]–[25].

Cele mai raportate tipuri de celule utilizate în aplicațiile SoC sunt celulele primare, liniile celulare standardizate sau celulele stem pluripotente induse (iPSC). Utilizarea celulelor umane primare este considerată convențională pentru platformele SoC în acest moment [26], [27]. Celulele izolate de la donatorii sănătoși în timpul procedurilor chirurgicale standard pot captura fenotipul *ex-vivo*, în timp ce celulele primare de la donatorii cu boli aflate sub investigație pot fi eficient folosite pentru modelele patologice. De exemplu, unele dintre cele mai atractive protocoale de celule pentru modelele de piele tip *full thickness* includ o epidermă din keratinocite primare și un compartiment dermic care cuprinde fibroblaste primare, cu melanocite adăugate și celule Langerhans și limfocite [28]. Beneficiile esențiale ale utilizării liniilor celulare au rezultat din protocoalele recunoscute, reproductibile și fiabile legate de creșterea celulară. Modele de probă de concept raportate folosind celule umane primare, cum ar fi fibroblaste și keratinocite, în special fibroblaste dermice primare (NHDF), keratinocite epidermice (NHEK), celule endoteliale ale venei ombilicale (HUVEC), keratinocite epidermice normale neonatale (NHEK), HaCaT, fibroblaste (Hs27), celule endoteliale microvasculare dermale (HDMEC), celulele foliculelor dermice papilei (HFDPC) și melanocitele epidermice normale (NHEMs) [27], [28], [36], [37], [29], [30], [30]–[35].

Datele curente din literatura de specialitate arată că îmbunătățirea modelelor de piele *in vitro* existente implică integrarea adipocitelor, a celulelor papilelor dermice pentru a produce foliculi de păr, a celulelor endoteliale pentru a promova vascularizarea, a celulelor imune sau Langerhans pentru a reproduce răspunsul imun, a chemokinelor pentru a încuraja diferențierea celulară și a ganglionului rădăcinii dorsale și a neuronilor pentru a reconstrui sistemul nervos periferic. Aceste considerente ajută modelele să mimeze reprezentarea pielii mai precis în evaluarea răspunsurilor relevante la studiile de iritare sau toxicitate [38], [39]. În timp ce celulele primare sunt de neprețuit pentru modelele SoC relevante fiziologice și fiziopatologice, utilizarea lor este limitată de mai mulți factori. De exemplu, capacitatea de proliferare (senescență) și variabilitatea (diferențe de donatori și disponibilitate) limitează durata de viață și potențialul de expansiune și limitează utilizarea celulelor pentru studii pe termen lung sau aplicații la scară largă.

În plus, provocările tehnice (în special izolarea și purificarea) și posibilele răspunsuri imune generează provocări suplimentare în protocoalele de co-cultură. În special, constrângerile etice și de reglementare ce derivă din toate aceste provocări și care, prin urmare, impun un design experimental atent, standardizarea protocolului și dezvoltarea de surse celulare alternative, cum ar fi iPSC-uri sau linii celulare imortalizate, pentru a completa modelele primare bazate pe celule.

Evoluția platformelor tip SoC

Unul dintre cele mai vechi sisteme funcționale de tip SoC a fost conceput pentru a replica straturile pielii perfuzate, contribuind astfel la imitarea funcției de barieră. Acesta a avut la bază munca de pionierat a lui Eugene Bell în dezvoltarea pielii artificiale [2]. În prezent, modelele bazate pe cipuri permit cercetătorilor să analizeze permeabilitatea diferitelor substanțe prin piele, oferind o alternativă mai realistă la modelele tradiționale *in vitro*.

Metodele recunoscute ca standard pentru crearea barierelor biologice includ utilizarea suporturilor permeabile, cum ar fi canalele de transfer, pentru a forma două camere separate și pentru a delimita suprafețele apicale și bazale ale țesutului. O astfel de separare a țesuturilor este esențială în modelarea 3D a pielii ca barieră reprezentativă *in vivo*, din două motive principale. În primul rând, compartimentarea permite etanșarea suprafețelor apicale și bazale, delimitând astfel interfața aer-lichid. În al doilea rând, aceasta facilitează aplicarea biomaterialelor și a tehnologiilor de microfabricație pe platformele organ-on-a-chip (OoC), conducând la proiectarea unor modele noi de barieră. De exemplu, inserarea unei membrane semipermeabile pentru separarea canalelor elastomerice microfluidice și crearea de domenii într-un sistem tip *Organ on a Chip* (OoC) reprezintă o practică comună și eficientă în construcția modelelor de barieră biologică pulmonară, hemato-encefalică, intestinală și hepatică [40].

Cu toate acestea, metoda prezintă limitări semnificative în dezvoltarea țesuturilor 3D complexe, cum ar fi modelul de piele de grosime completă (*full-thickness-skin model*, FTSM). Pentru a realiza acest model, este necesară generarea unui compartiment dermic, care implică, de obicei, polimerizarea unui amestec de hidrogel și celule deasupra unei membrane [41].

Crearea epidermei deasupra (superficială) dermului necesită îndeplinirea a două condiții esențiale. În primul rând, camera apicală trebuie să sprijine construcția precisă a epiteliului stratificat, să permită circulația aerului și să faciliteze administrarea medicamentelor în cadrul fazelor experimentale ulterioare. În al doilea rând, camera inferioară trebuie să asigure perfuzia

adecvată cu mediul corespunzător. Abordările actuale pentru integrarea membranelor de cultură celulară se bazează în principal pe legătura ireversibilă dintre micromediile de cultură apicale și bazolaterale [42], influențând modul în care țesutul nou format este recuperat pentru analiza structurală și fiziologică. Generarea modelului de piele de grosime completă (FTSm) implică însă anumite limitări, precum însămânțarea dificilă a celulelor, introducerea matricei dermice pe membrană, continuarea culturii sau accesul la țesut pentru analiza finală.

Dacă nu sunt necesare comercializarea și producția la scară largă, pot fi explorate alte abordări alternative pentru dezvoltarea dispozitivelor SoC. Una dintre aceste alternative este utilizarea interfețelor gel-lichid, care oferă suport fizic pentru celule și permit o interacțiune directă de contact între acestea. Această interfață este, de obicei, microfabricată prin utilizarea ghidajelor de fază, care funcționează ca bariere capilare de presiune, sau prin structuri de consolidare dispuse la distanțe egale. Această tehnică a fost aplicată cu succes pentru construirea unei unități neurovasculare, incluzând celule endoteliale umane pentru simularea vaselor de sânge cerebrale, alături de neuroni primari de șobolan și astrocite.[43].

Proiectarea tuburilor integrate într-o matrice extracelulară (ECM) este, de asemenea, o opțiune pentru dezvoltarea dispozitivelor SoC. Homan și colaboratorii săi au utilizat bioimprimarea pentru a crea tubuli contorți, imprimând o cerneală sacrificială integrată în ECM [44]. Această structură a fost folosită pentru a modela tubuli renali 3D și pentru a recrea nefrotoxicitatea indusă de ciclosporină.

Deși aceste abordări prezintă unele limitări, cum ar fi costurile ridicate de producție, necesitatea unui personal înalt calificat și preocupările legate de reproductibilitate, ele rămân instrumente valoroase. Acestea permit studierea detaliată a unor aspecte specifice ale bolilor pielii și evaluarea profilului toxicologic al medicamentelor.

a) Avantaje și provocări asociate dezvoltării platformelor tip SoC

Utilizarea dispozitivelor SoC în testarea preclinică a medicamentelor și cosmeticelor reprezintă una dintre cele mai promițătoare aplicații [45]. Testarea bazată pe SoC ar trebui să includă evaluarea toxicocinetică (TK) și toxicodinamică (TD).

Studiile TK sunt esențiale pentru a analiza situațiile în care „ingredientele” pot pătrunde în circulația sistemică și depăși o concentrație critică în plasmă (nivelul minim toxic), afectând astfel siguranța utilizatorului. Aceste studii se concentrează atât pe mecanismele care determină efectele

toxice, cât și pe impactul substanțelor chimice asupra diferitelor tipuri de celule. Pe de altă parte, studiile TD contribuie la înțelegerea mecanismelor moleculare prin care ingredientele active își exercită acțiunea, precum și la determinarea eficacității acestora.

Deși nu există încă un consens clar cu privire la capacitatea modelelor de piele artificială de a simula complet condițiile reale [46], studiile au demonstrat că multe modele de piele reconstruită oferă rezultate reproductibile și consecvente în experimente. În mod special, aceste modele pot fi utilizate nu doar pentru evaluarea produselor farmaceutice și cosmetice, ci și în cercetarea stărilor patologice ale pielii. Ele permit analiza unor aspecte precum permeabilitatea, iritația, coroziunea, hidratarea, genotoxicitatea și absorbția [47].

Prin integrarea țesutului 3D, platformele SoC oferă micromedii ajustabile, capabile să reproducă condițiile *in vivo*, compensând astfel limitările modelelor 2D și 3D în ceea ce privește interfețele țesut-țesut sau organ-organ. Aceste platforme permit analizarea la diferite nivele ale indicatorilor biomecanici celulari fiziologici, precum stresul de întindere sau forfecare.

Un avantaj semnificativ al acestor sisteme îl reprezintă modelele de piele realizate la scară micro, care necesită un număr semnificativ redus de celule și medii de cultură, de până la 36 de ori mai puține, având totodată raporturi fluid-țesut personalizate fiziologic [48]. În plus, microsenzorii încorporați în aceste platforme permit înregistrarea parametrilor de diagnostic esențiali, în timp real, oferind posibilitatea de a reconfigura procedurile de testare ale medicamentelor [49]. Cu toate acestea, reproducerea fidelă a matricei extracelulare a pielii și integrarea acesteia cu celulele dintr-un cip rămâne o provocare. De exemplu, colagenul tinde să se contracte pe măsură ce fibroblastele proliferază și se desprind de membrana de suport a cipului [50], influențând în același timp permeabilitatea pielii [51]. Viabilitatea pielii depinde, de asemenea, de parametrii specifici ai modelării SoC [52].

Un model comercial dezvoltat de Biosolution Co., Ltd. din Seul, Coreea de Sud, a evaluat 20 de substanțe chimice utilizând un model de epidermă umană reconstruită, bazată pe țesut de piele asiatică. Totuși, este o provocare majoră pentru modelele comerciale de epidermă, piele pigmentată și piele de grosime completă să corespundă standardelor comune și să dezvolte modele de referință capabile să reflecte variabilitatea și intervariabilitatea genetică a pielii umane.

Rezultate parțiale

În cadrul acestei etape, **Activitatea 1.1. Design. Proiectarea protocolului și selectarea tipului de nanoparticulă necesară pentru eliberare controlată**, au fost selectate nanosistemele lipidice ca vehicule transportoare în cadrul sistemului tip SoC.

Lipozomii sunt vezicule amfifilice de natură fosfolipidică a căror proprietăți de auto-asamblare le conferă versatilitate atât în industria cosmetică cât și în cea farmaceutică. Odată cu dezvoltarea în anii '60 a domeniului lipozomologiei (de către Alec Bangham) [53] și publicarea structurii *liposomesin*-ului, aceste tipuri de molecule au cunoscut o continuă expansiune, fiind investigate pe scară largă ca vehicule de transport a medicamentelor, a unor fragmente moleculare mici, a proteinelor, acizilor nucleici sau a agenților utilizați în imagistică [53]–[56]. Datorită dimensiunii lor reduse (care poate varia de la câțiva nanometri la 2-3 μ m), biocompatibilității crescute, biodegradabilității scăzute, a capacității de a reduce toxicitatea anumitor substanțe pe care le înglobează, de a crește durata de viață a anumitor medicamente sau de a le controla eliberarea acestora, lipozomii sunt utilizați pe scară largă în diverse domenii (alimentare, farmaceutice, cosmetice, etc.), fiind vizate inclusiv aplicații de captare a unor compuși instabili sau nedoriti (de exemplu, agenți antimicrobieni, antioxidanți, arome și elemente bioactive) sau de protejare a funcționalității unor active ușor degradabile [57]–[60]. Datorită versatilității în obținere și numeroaselor aplicații pentru care sunt utilizate aceste sisteme, aceștia au fost selectați pentru testarea și utilizarea în cadrul acestei platforme.

Obținerea de nano – lipozomi încărcăți cu canabidiol. Pentru a obține lipozomi cu diametrul mediu preferabil cuprins între 150 nm și 250 nm, se vor folosi diverse tehnici precum metoda de epuizare (proteo-lipozomi), metoda injectării cu etanol și metoda evaporării în fază inversă (pentru o eficiență mai mare de încărcare a CBD). Încărcarea CBD-ului va fi efectuată fie prin tehnici de încărcare pasivă (dispersie mecanică, sonicare) fie prin încărcare activă (încărcare gradient prin liofilizare sau gradienti de pH). Purificarea lipozomilor (îndepărtarea moleculelor neîncapsulate) va fi abordată prin tehnici de microfluidică. Fig. 1 ilustrează reprezentarea schematică a procesului de obținere a nanosistemelor lipidice vizate.

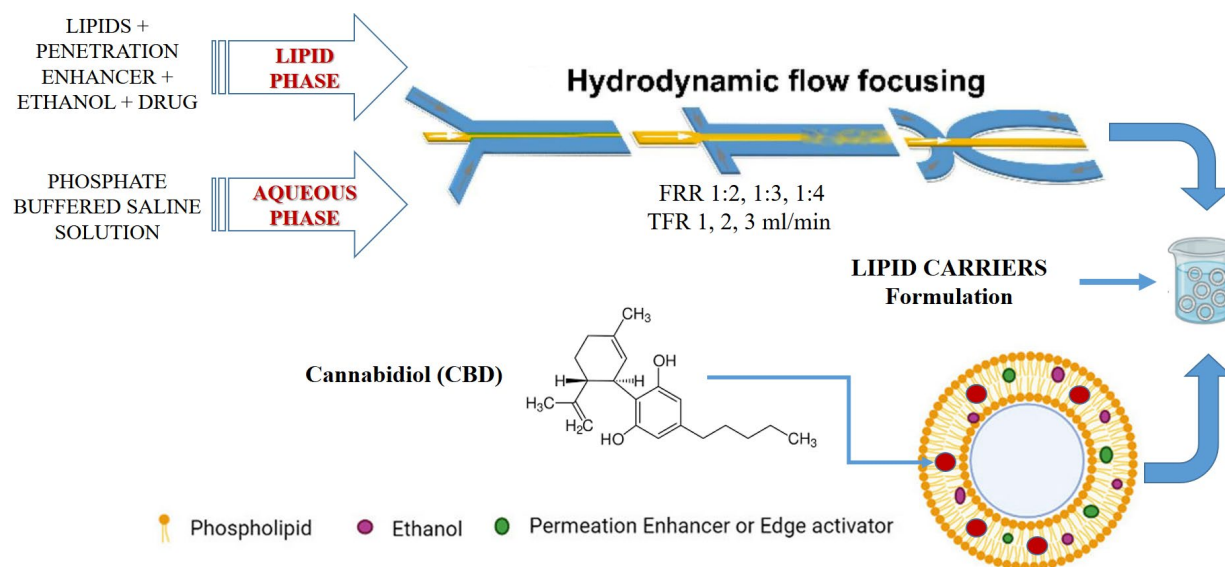


Fig. 1. Metodă de preparare a nanosistemelor lipidice utilizând tehnica *hydrodynamic flow focusing*

Pentru proiectarea protocolului de obținere a nanosistemelor lipidice, este esențial să se adopte o metodologie riguroasă, care să garanteze reproducibilitatea și eficiența sistemului final. Selecția lipidelor utilizate depinde de tipul de eliberare controlată dorit, fiind utilizate lipide solide, cum ar fi tripalmitina sau tristearina, precum și lipide lichide, cum sunt uleiurile vegetale sau trigliceridele. Surfactanții, precum Poloxamer, lecitină sau Tween 80, sunt esențiali pentru stabilizarea nanosistemelor.

În primul rând, lipidele solide și lichide sunt dizolvate și amestecate la o temperatură apropiată de punctul de topire al lipidelor solide (de obicei între 50 și 70°C). Surfactanții sunt adăugați treptat pentru a facilita formarea unei emulsii stabile. Dimensiunea particulelor este evaluată prin tehnici precum difracția laser și microscopie electronică, iar stabilitatea coloidală este determinată prin măsurarea potențialului Zeta. Eficiența încorporării substanțelor active este, de asemenea, evaluată, iar profilul de eliberare controlată al substanței active este testat în condiții simulate.

Pentru a preveni degradarea lipidelor și a substanțelor active, nanosistemele obținute sunt păstrate în condiții controlate (temperatură scăzută și protecție împotriva luminii). Acestea pot fi ulterior integrate în platformele SoC pentru a permite testări biologice și farmacologice detaliate.

În cadrul **Activității 1.2. Alegerea medicamentului ce va fi incorporat în nanoparticulă**, pornind de la nanosistemele lipidice mai sus menționate, a fost selectat canabidiolul drept moleculă cheie în testarea transferului transdermic prin modelul biomimetic de piele ce urmează a fi realizat. Selectarea acestei molecule are la bază o serie de considerente tehnice. În ultimii ani, s-au făcut numeroase descoperiri legate de modul în care canabinoizi precum canabidiolul (CBD) ar putea aduce beneficii pielii. Cercetările actuale sugerează că CBD ar putea juca un rol în îmbunătățirea procesului de vindecare a rănilor și reducerea formării cicatricilor, precum și în reducerea inflamației [61]–[63] putând fi o alternativă non-invazivă de îmbunătățire a calității vieții pacienților cu un fond inflamator.

Proprietățile fizico-chimice ale CBD, cum ar fi solubilitatea și stabilitatea, împreună cu bioactivitatea, permeabilitatea și metabolismul, sunt câteva dintre principalele elemente care afectează biodisponibilitatea și ratele de absorbție ale acestuia, precum și profilurile farmacocinetice variabile și posibilele polimorfisme. O serie de studii au arătat că polimorfismele influențează semnificativ comportamentul moleculei CBD și, implicit, activitatea sa terapeutică. CBD se prezintă în două sau mai multe forme cristaline inerente care îi pot afecta stabilitatea, ceea ce este o îngrijorare deoarece aceasta, la rândul său, influențează rata de absorbție a CBD și, prin urmare, biodisponibilitatea acestuia [64].

Prin urmare, necesitatea încorporării canabidiolului în lipozomi rezidă din natura acestuia. Canabidiolul se prezintă sub formă de cristale de culoare galben pal, având formula moleculară $C_{21}H_{30}O_2$ și o greutate moleculară de 314,46 g/mol. CBD este aproape insolubil în apă (0,0122 mg/L la 25 °C), dar are o bună solubilitate în solvenți organici, cum ar fi metanol, etanol, dietil eter, benzen și cloroform. Coeficientul de partiție octanol/apă K_{ow} este 8,01 log. Aceste particularități ale canabidiolului îi îngreunează transferul transdermal.

Utilizarea unor sisteme auto-emulsionante [65] (nano-micro emulsii) încărcate cu nanocapsule lipidice, lipozomi, sau vezicule permite o livrare mai precisă și controlată a CBD-ului și poate contribui la dezvoltarea de tratamente mai eficiente. Aceste sisteme pot îmbunătăți permeabilitatea, solubilitatea și biodisponibilitatea CBD-ului, ceea ce duce la o mai mare absorbție și eficacitate. Aceste aspecte tehnologice sunt susținute de o serie de studii care demonstrează importanța formulărilor pe bază de lipide în optimizarea terapeutică a CBD și deschid calea pentru noi opțiuni de tratament [64], [66], [67].

Utilizarea CBD în testarea platformelor SoC oferă oportunități valoroase pentru a studia atât mecanismele de acțiune, cât și siguranța și eficiența acestuia într-un cadru de cercetare avansat, cu aplicabilități în dezvoltarea de tratamente personalizate și în evaluarea riscurilor terapeutice.

În cadrul **Activității 1.3. Caracterizare nanoparticule: imagistică (microscopie, SEM), Zetasizer.**

Activitatea de caracterizare a nanosistemelor dezvoltate implică utilizarea unor tehnici avansate pentru a analiza proprietățile fizico-chimice ale acestora. Microscopia optică permite vizualizarea particulelor la scară mică, oferind informații despre morfologia generală, iar microscopie electronică (SEM) oferă imagini detaliate la rezoluții nanometrice, esențiale pentru studierea structurii și formei nanoparticulelor. În plus, Zetasizer măsoară dimensiunea particulelor și potențialul Zeta, un parametru important pentru stabilitatea coloidală a nanoparticulelor în dispersii, ajutând la evaluarea comportamentului acestora în diverse condiții. Aceste tehnici permit o caracterizare completă și precisă a nanoparticulelor, esențială pentru dezvoltarea și optimizarea aplicațiilor lor.

Concluzii

Proiectul vizează în această etapă dezvoltarea unui protocol pentru o "piele biomimetică" adecvată pentru testarea transdermică a administrării unor active (de tipul medicamentelor, cu ajutorul unor nanosisteme). În cadrul activităților 1.1 și 1.2 s-a selectat tipul de nanosistem utilizabil în transport, preum și molecula care va fi înglobată în acesta. În cadrul activității 1.3 sunt vizate metodele de caracterizare a sistemelor obținute. În urma unui studiu bibliometric extins s-au evaluat considerentele tehnice, provocările și oportunitățile asociate dezvoltării acestei platforme SoC. Recenziile literaturii studiate în cadrul acestei etape este în curs de publicare în două jurnale importante din domeniu, Q1, a căror factor de impact este semnificativ.

Diseminarea rezultatelor

1. Articol tip recenzie cu titlul *The good, the bad, and the ugly: skin-on-chip* de către autorii Mina Ghiță-Răileanu, Georgeta-Luminița Gheorghiu, Bianca Tihăuan, Grațiela Grădișteanu Pârcălăbioru, Gabriela Cioca, Florina S. Iliescu, Ciprian Iliescu – în curs de publicare în jurnalul *Lab on Chip*, **IF 6.2**;

2. Articol tip recenzie cu titlul *Cannabidiol – friend or foe?* de către autorii Bianca – Maria Tihăuan, Onisei Tatiana, Daniel Gună, Walter Sloothberg, Ciprian Iliescu, Mariana – Carmen Chifiriuc – în curs de publicare în jurnalul *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **IF 4.3**;

3. Abstract prezentare orală cu titlul *Beyond the Surface: How the Transdermal Delivery of Cannabidiol Can Unlock New Antimicrobial Sustained Effects* de către autorii Bianca – Maria Tihăuan, Ciprian Iliescu, Grațiela Grădișteanu Pârcălăbioru, Florina S. Iliescu – în evaluare la conferința internațională ESCMID;

4. Prezentare orală a lucrării “*Drug delivery systems for Skin-on-Chip applications*” în cadrul Secțiunii de Știința și Tehnologia Informației, la Conferința Științifică Națională de Toamnă a Academiei Oamenilor de Știință din România, cu tematica „Rolul inteligenței artificiale în dezvoltarea durabilă a României”, 22-24 septembrie 2024, Iași, Romania.

Surse bibliografice

- [1] M. A. Bolzinger, S. Briançon, J. Pelletier, and Y. Chevalier, “Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 17, no. 3, pp. 156–165, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.COCIS.2012.02.001.
- [2] K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y. N. Kalia, and R. H. Guy, “Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 52, no. 2, pp. 103–112, Sep. 2001, doi: 10.1016/S0939-6411(01)00166-7.
- [3] A. Z. Alkilani, M. T. C. McCrudden, and R. F. Donnelly, “Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum,” *Pharm. 2015, Vol. 7, Pages 438-470*, vol. 7, no. 4, pp. 438–470, Oct. 2015, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS7040438.
- [4] R. Goyal, L. K. Macri, H. M. Kaplan, and J. Kohn, “Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery,” *J. Control. Release*, vol. 240, pp. 77–92, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.JCONREL.2015.10.049.
- [5] H. M. Jeon, K. Kim, K. C. Choi, and G. Y. Sung, “Side-effect test of sorafenib using 3-D skin equivalent based on microfluidic skin-on-a-chip,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 82, pp. 71–80, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.JIEC.2019.09.044.
- [6] J. Kim, K. Kim, and G. Y. Sung, “Coenzyme Q10 Efficacy Test for Human Skin Equivalents Using a Pumpless Skin-On-A-Chip System,” *Int. J. Mol. Sci. 2020, Vol. 21, Page 8475*, vol. 21, no. 22, p. 8475, Nov. 2020, doi: 10.3390/IJMS21228475.
- [7] G. Sriram *et al.*, “Full-thickness human skin-on-chip with enhanced epidermal morphogenesis and barrier function,” *Mater. Today*, vol. 21, no. 4, pp. 326–340, May 2018, doi: 10.1016/J.MATTOD.2017.11.002.
- [8] N. Sasaki, K. Tsuchiya, and H. Kobayashi, “Photolithography-free skin-on-a-chip for parallel permeation assays,” *Sensors Mater.*, vol. 31, no. 1, pp. 107–115, 2019, doi: 10.18494/SAM.2019.2125.
- [9] I. Risueño, L. Valencia, M. Holgado, J. L. Jorcano, and D. Velasco, “Generation of a simplified three-dimensional skin-on-a-chip model in a micromachined microfluidic platform,” *J. Vis. Exp.*, vol. 2021, no. 171, 2021, doi: 10.3791/62353.
- [10] M. Rosdy and L. C. Clauss, “Terminal Epidermal Differentiation of Human Keratinocytes Grown in Chemically Defined Medium on Inert Filter Substrates at the Air-Liquid Interface,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 95, no. 4, pp. 409–414, Oct. 1990, doi: 10.1111/1523-1747.EP12555510.
- [11] N. Alépée *et al.*, “A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test,” *Toxicol. Vitro.*, vol. 24, no. 1, pp. 257–266, Feb. 2010, doi: 10.1016/J.TIV.2009.08.024.
- [12] B. Desprez, J. Barroso, C. Griesinger, H. Kandárová, N. Alépée, and H. W. Fuchs, “Two novel prediction models improve predictions of skin corrosive sub-categories by test methods of OECD Test Guideline No.

- 431,” *Toxicol. In Vitro*, vol. 29, no. 8, pp. 2055–2080, Dec. 2015, doi: 10.1016/J.TIV.2015.08.015.
- [13] S. Gibbs *et al.*, “An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 272, no. 2, pp. 529–541, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.TAAP.2013.07.003.
- [14] P. J. Hayden *et al.*, “Application of MatTek In Vitro Reconstructed Human Skin Models for Safety, Efficacy Screening, and Basic Preclinical Research,” <https://home.liebertpub.com/aivt>, vol. 1, no. 3, pp. 226–233, Sep. 2015, doi: 10.1089/AIVT.2015.0012.
- [15] I. J. Kosten, J. K. Buskermolen, S. W. Spiekstra, T. D. De Gruijl, and S. Gibbs, “Gingiva Equivalents Secrete Negligible Amounts of Key Chemokines Involved in Langerhans Cell Migration Compared to Skin Equivalents,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2015, no. 1, p. 627125, Jan. 2015, doi: 10.1155/2015/627125.
- [16] A. Monfort, M. Soriano-Navarro, J. M. García-Verdugo, and A. Izeta, “Production of human tissue-engineered skin trilayer on a plasma-based hypodermis,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 7, no. 6, pp. 479–490, 2013, doi: 10.1002/TERM.548.
- [17] W. Choi *et al.*, “The fibroblast-derived paracrine factor neuregulin-1 has a novel role in regulating the constitutive color and melanocyte function in human skin,” *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 18, pp. 3102–3111, Sep. 2010, doi: 10.1242/JCS.064774.
- [18] S. Gibbs *et al.*, “An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 272, no. 2, pp. 529–541, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.TAAP.2013.07.003.
- [19] B. R. Shepherd *et al.*, “Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells,” *FASEB J.*, vol. 20, no. 10, pp. 1739–1741, Aug. 2006, doi: 10.1096/FJ.05-5682FJE.
- [20] D. M. Supp, K. Wilson-Landy, and S. T. Boyce, “Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice,” *FASEB J.*, vol. 16, no. 8, pp. 797–804, Jun. 2002, doi: 10.1096/FJ.01-0868COM.
- [21] K. Ackermann, S. Lombardi Borgia, H. C. Korting, K. R. Mewes, and M. Schäfer-Korting, “The Phenion® Full-Thickness Skin Model for Percutaneous Absorption Testing,” *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 23, no. 2, pp. 105–112, Feb. 2010, doi: 10.1159/000265681.
- [22] E. Bellas, M. Seiberg, J. Garlick, and D. L. Kaplan, “In vitro 3D full-thickness skin-equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials,” *Macromol. Biosci.*, vol. 12, no. 12, pp. 1627–1636, Dec. 2012, doi: 10.1002/MABI.201200262.
- [23] J. Rogal *et al.*, “Autologous Human Immunocompetent White Adipose Tissue-on-Chip,” *Adv. Sci.*, vol. 9, no. 18, p. 2104451, Jun. 2022, doi: 10.1002/ADVS.202104451.
- [24] A. P. Ramme *et al.*, “Autologous induced pluripotent stem cell-derived four-organ-chip,” *Futur. Sci. OA*, vol. 5, no. 8, pp. 413–2056, 2019, doi: 10.2144/FSOA-2019-0065/SUPPL_FILE/SUPPL/FSOA-05-413-S2.PDF.
- [25] A. Bhatt, N. Dhiman, P. S. Giri, G. N. Kasinathan, F. Pati, and S. N. Rath, “Biocompatibility-on-a-chip: Characterization and evaluation of decellularized tendon extracellular matrix (tdECM) hydrogel for 3D stem cell culture in a microfluidic device,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 213, pp. 768–779, Jul. 2022, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.06.010.
- [26] J. T. Shoemaker, W. Zhang, S. I. Atlas, R. A. Bryan, S. W. Inman, and J. Vukasinovic, “A 3D Cell Culture Organ-on-a-Chip Platform With a Breathable Hemoglobin Analogue Augments and Extends Primary Human Hepatocyte Functions in vitro,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 7, p. 568777, Oct. 2020, doi: 10.3389/FMOLB.2020.568777/BIBTEX.
- [27] P. Zoio, S. Lopes-Ventura, and A. Oliva, “Biomimetic Full-Thickness Skin-on-a-Chip Based on a Fibroblast-Derived Matrix,” *Micro 2022, Vol. 2, Pages 191-211*, vol. 2, no. 1, pp. 191–211, Mar. 2022, doi: 10.3390/MICRO2010013.
- [28] P. Zoio, S. Ventura, M. Leite, and A. Oliva, “Pigmented Full-Thickness Human Skin Model Based on a Fibroblast-Derived Matrix for Long-Term Studies,” *Tissue Eng. Part C. Methods*, vol. 27, no. 7, pp. 433–443, Jul. 2021, doi: 10.1089/TEN.TEC.2021.0069.
- [29] L. Valencia *et al.*, “A new microfluidic method enabling the generation of multi-layered tissues-on-chips using skin cells as a proof of concept,” *Sci. Reports 2021 111*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-91875-z.
- [30] M. Wufuer *et al.*, “Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment,” *Sci. Reports 2016 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep37471.
- [31] C. Duval, C. Chagnoleau, F. Pouradier, P. Sextius, E. Condom, and F. Bernerd, “Human Skin Model Containing Melanocytes: Essential Role of Keratinocyte Growth Factor for Constitutive Pigmentation—Functional Response to α -Melanocyte Stimulating Hormone and Forskolin,” <https://home.liebertpub.com/tec>, vol. 18, no. 12, pp. 947–957, Jul. 2012, doi: 10.1089/TEN.TEC.2011.0676.

- [32] Q. Li *et al.*, “Epidermis-on-a-chip system to develop skin barrier and melanin mimicking model,” *J. Tissue Eng.*, vol. 14, Jan. 2023, doi: 10.1177/20417314231168529/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_20417314231168529-FIG7.JPEG.
- [33] A. T. O’Neill, N. A. Monteiro-Riviere, and G. M. Walker, “Characterization of microfluidic human epidermal keratinocyte culture,” *Cytotechnology*, vol. 56, no. 3, p. 197, Mar. 2008, doi: 10.1007/S10616-008-9149-9.
- [34] S. Lee, S. P. Jin, Y. K. Kim, G. Y. Sung, J. H. Chung, and J. H. Sung, “Construction of 3D multicellular microfluidic chip for an in vitro skin model,” *Biomed. Microdevices*, vol. 19, no. 2, Jun. 2017, doi: 10.1007/S10544-017-0156-5.
- [35] Q. Ramadan and F. C. W. Ting, “In vitro micro-physiological immune-competent model of the human skin,” *Lab Chip*, vol. 16, no. 10, pp. 1899–1908, May 2016, doi: 10.1039/C6LC00229C.
- [36] N. Mori, Y. Morimoto, and S. Takeuchi, “Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip,” *Biomaterials*, vol. 116, pp. 48–56, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.11.031.
- [37] H. E. Abaci, K. Gledhill, Z. Guo, A. M. Christiano, and M. L. Shuler, “Pumpless microfluidic platform for drug testing on human skin equivalents,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 3, p. 882, Feb. 2015, doi: 10.1039/C4LC00999A.
- [38] H. E. Abaci *et al.*, “Tissue engineering of human hair follicles using a biomimetic developmental approach,” *Nat. Commun.* 2018 91, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07579-y.
- [39] S. Suhail, N. Sardashti, D. Jaiswal, S. Rudraiah, M. Misra, and S. G. Kumbar, “Engineered Skin Tissue Equivalents for Product Evaluation and Therapeutic Applications,” *Biotechnol. J.*, vol. 14, no. 7, p. 1900022, Jul. 2019, doi: 10.1002/BIOT.201900022.
- [40] C. M. Sakolish, M. B. Esch, J. J. Hickman, M. L. Shuler, and G. J. Mahler, “Modeling Barrier Tissues In Vitro: Methods, Achievements, and Challenges,” *EBioMedicine*, vol. 5, p. 30, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.EBIOM.2016.02.023.
- [41] I. Risueño, L. Valencia, J. L. Jorcano, and D. Velasco, “Skin-on-a-chip models: General overview and future perspectives,” *APL Bioeng.*, vol. 5, no. 3, p. 030901, Sep. 2021, doi: 10.1063/5.0046376.
- [42] T. Pasman, D. Grijpma, D. Stamatialis, and A. Poot, “Flat and microstructured polymeric membranes in organs-on-chips,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 15, no. 144, Jul. 2018, doi: 10.1098/RSIF.2018.0351.
- [43] Q. Xue *et al.*, “A novel brain neurovascular unit model with neurons, astrocytes and microvascular endothelial cells of rat,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 9, no. 2, pp. 174–189, 2013, doi: 10.7150/IJBS.5115.
- [44] K. A. Homan *et al.*, “Bioprinting of 3D Convuluted Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips,” *Sci. Reports 2016 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, Oct. 2016, doi: 10.1038/srep34845.
- [45] K. Ronaldson-Bouchard and G. Vunjak-Novakovic, “Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development,” *Cell Stem Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 310–324, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.STEM.2018.02.011.
- [46] B. Bhushan and W. Tang, “Surface, tribological, and mechanical characterization of synthetic skins for tribological applications in cosmetic science,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 120, no. 5, pp. 2881–2890, Jun. 2011, doi: 10.1002/APP.33340.
- [47] M. H. Mohammadi *et al.*, “Skin Diseases Modeling using Combined Tissue Engineering and Microfluidic Technologies,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 5, no. 19, pp. 2459–2480, Oct. 2016, doi: 10.1002/ADHM.201600439.
- [48] H. E. Abaci, K. Gledhill, Z. Guo, A. M. Christiano, and M. L. Shuler, “Pumpless microfluidic platform for drug testing on human skin equivalents,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 3, p. 882, Feb. 2015, doi: 10.1039/C4LC00999A.
- [49] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, and J. J. Hickman, “TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems,” *J. Lab. Autom.*, vol. 20, no. 2, pp. 107–126, Apr. 2015, doi: 10.1177/2211068214561025.
- [50] M. Parmaksiz, A. Dogan, S. Odabas, A. E. Elçin, and Y. M. Elçin, “Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine,” *Biomed. Mater.*, vol. 11, no. 2, Mar. 2016, doi: 10.1088/1748-6041/11/2/022003.
- [51] B. M. Baker and C. S. Chen, “Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues,” *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 13, pp. 3015–3024, Jul. 2012, doi: 10.1242/JCS.079509.
- [52] E. Sutterby, P. Thurgood, S. Baratchi, K. Khoshmanesh, and E. Pirogova, “Microfluidic Skin-on-a-Chip Models: Toward Biomimetic Artificial Skin,” *Small*, vol. 16, no. 39, Oct. 2020, doi: 10.1002/SMLL.202002515.
- [53] F. Mirzavi, M. Barati, A. Soleimani, R. Vakili-Ghartavol, M. R. Jaafari, and M. Soukhtanloo, “A review on liposome-based therapeutic approaches against malignant melanoma,” *Int. J. Pharm.*, vol. 599, p. 120413,

- Apr. 2021, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2021.120413.
- [54] B. dos Santos Rodrigues, A. Banerjee, T. Kanekiyo, and J. Singh, "Functionalized liposomal nanoparticles for efficient gene delivery system to neuronal cell transfection," *Int. J. Pharm.*, vol. 566, pp. 717–730, Jul. 2019, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2019.06.026.
 - [55] F. Man, P. J. Gawne, and R. T.M. de Rosales, "Nuclear imaging of liposomal drug delivery systems: A critical review of radiolabelling methods and applications in nanomedicine," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 143, pp. 134–160, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.ADDR.2019.05.012.
 - [56] G. Wang, R. Li, B. Parseh, and G. Du, "Prospects and challenges of anticancer agents' delivery via chitosan-based drug carriers to combat breast cancer: a review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 268, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.CARBOL.2021.118192.
 - [57] R. O. Benech, E. E. Kheadr, R. Laridi, C. Lacroix, and I. Fliss, "Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 8, pp. 3683–3690, 2002, doi: 10.1128/AEM.68.8.3683-3690.2002.
 - [58] T. Shehata, K. ichi Ogawara, K. Higaki, and T. Kimura, "Prolongation of residence time of liposome by surface-modification with mixture of hydrophilic polymers," *Int. J. Pharm.*, vol. 359, no. 1–2, pp. 272–279, Jul. 2008, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2008.04.004.
 - [59] M. J. W. Johnston, S. C. Semple, S. K. Klimuk, S. Ansell, N. Maurer, and P. R. Cullis, "Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1768, no. 5, pp. 1121–1127, May 2007, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2007.01.019.
 - [60] A. Akbarzadeh *et al.*, "Liposome: Classification, preparation, and applications," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2013, doi: 10.1186/1556-276X-8-102/TABLES/2.
 - [61] B. Palmieri, C. Laurino, and M. Vadala, "A therapeutic effect of cbd-enriched ointment in inflammatory skin diseases and cutaneous scars," *Clin. Ter.*, vol. 170, no. 2, pp. E93–E99, 2019, doi: 10.7417/CT.2019.2116.
 - [62] K. Tóth, D. Ádám, T. Bíró, and A. Oláh, "Cannabinoid Signaling in the Skin: Therapeutic Potential of the 'C(ut)annabinoid' System," *Molecules*, vol. 24, no. 5, p. 918, Mar. 2019, doi: 10.3390/molecules24050918.
 - [63] R. B. Zurier and S. H. Burstein, "Cannabinoids, inflammation, and fibrosis," *FASEB J.*, vol. 30, no. 11, pp. 3682–3689, Nov. 2016, doi: 10.1096/fj.201600646R.
 - [64] K. R. Hossain, A. Alghalayini, and S. M. Valenzuela, "Current Challenges and Opportunities for Improved Cannabidiol Solubility," *Int. J. Mol. Sci.* 2023, Vol. 24, Page 14514, vol. 24, no. 19, p. 14514, Sep. 2023, doi: 10.3390/IJMS241914514.
 - [65] M. P. Di Bello, E. Bloise, S. E. Mazzetto, and G. Mele, "Formulation and Chemical Stability in Aqueous Media of Cannabidiol Embedded in Cardanol-Based Nanovesicles," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 10, pp. 8870–8875, Oct. 2017, doi: 10.1021/ACSSUSCHEMENG.7B01658/ASSET/IMAGES/LARGE/SC-2017-01658W_0004.JPEG.
 - [66] Í. M. de M. Ramalho *et al.*, "Current trends on cannabidiol delivery systems: where are we and where are we going?," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 18, no. 11, pp. 1577–1587, Nov. 2021, doi: 10.1080/17425247.2021.1952978.
 - [67] J. Aparicio-Blanco, I. A. Romero, D. K. Male, K. Slowing, L. García-García, and A. I. Torres-Suárez, "Cannabidiol Enhances the Passage of Lipid Nanocapsules across the Blood-Brain Barrier Both in Vitro and in Vivo," *Mol. Pharm.*, vol. 16, no. 5, pp. 1999–2010, May 2019, doi: 10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.8B01344/SUPPL_FILE/MP8B01344_SI_004.AVI.