



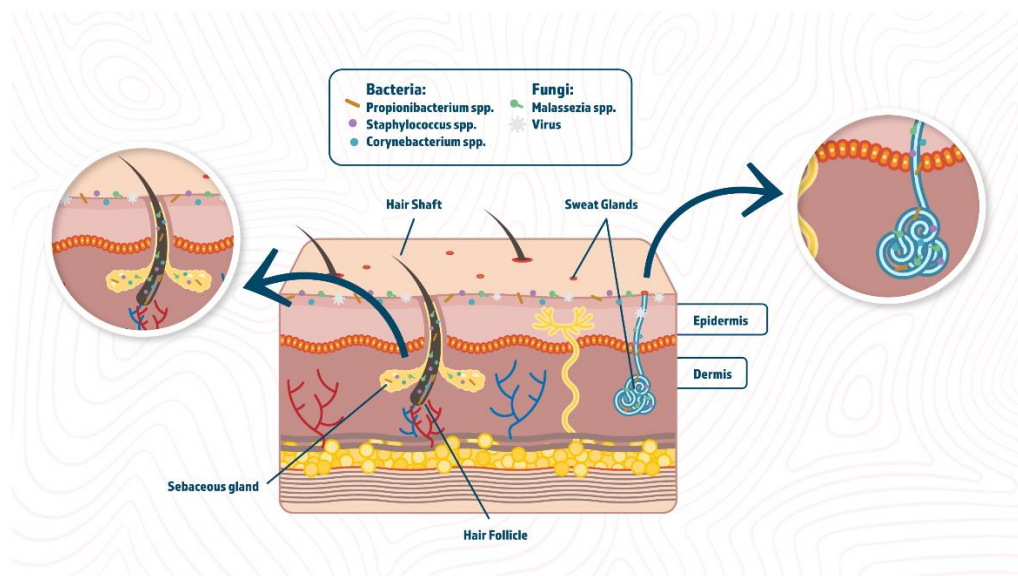
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

IN VITRO ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ



ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΤΣΙΡΩΝΗ
20678318

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:
ΣΟΦΙΑ ΛΕΤΣΙΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ, PhD
ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ

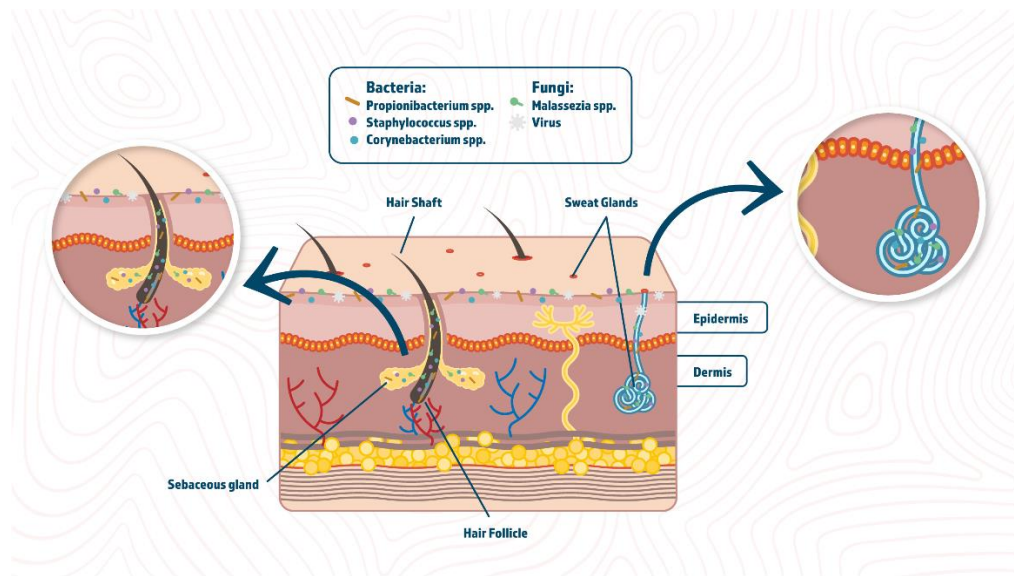
ΑΙΓΑΛΕΩ 2024



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Division Medical laboratories science

UNDERGRADUATE THESIS

IN VITRO MODELS FOR INVESTIGATING THE SKIN MICROBIOTA



STYLIANI TSIRONI
20678318

SUPERVISOR:
SOPHIA LETSIOU
CHEMIST, PhD
ADJUNCT ASSISTANT PROFESSOR

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 09/10/2024

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή:
1 ^{ος} εξεταστής	Σοφία Λέτσιου	
2 ^{ος} εξεταστής	Απόστολος Μπελούκας	
3 ^{ος} εξεταστής	Δημήτριος Χανιώτης	

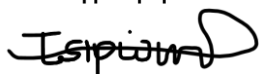
Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Στυλιανή Τσιρώνη του Δημητρίου, με αριθμό μητρώου 20678318 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα:

Στυλιανή Τσιρώνη

Υπογραφή:



Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας αισθάνομαι ότι πρέπει να ευχαριστήσω θερμά αυτούς που με βοήθησαν και με στήριξαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κυρία Σοφία Λέτσιου, Ακαδημαϊκή Υπότροφος του ΠΑΔΑ, για την καθοδήγηση και τον χρόνο της, δίνοντάς μου χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Τμήματος Βιοϊατρικών επιστημών για τη συμβολή τους στην επιστημονική συγκρότηση στα χρόνια της φοίτησής μου στο Τμήμα. Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους εκείνους που συνέβαλαν είτε πρακτικά είτε ψυχικά στην ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Συντομεύσεις

2D: Δισδιάστατα (2D) μοντέλα

3D: Τρισδιάστατα (3D) μοντέλα

AMP: Antimicrobial Peptides – Αντιμικροβιακά πεπτιδία

AMR: Antimicrobial Resistance – Αντιμικροβιακή αντοχή

CA: Cellulose Acetate – Οξεϊκή κυτταρίνη

ECM: Extracellular Matrix – Εξωκυτταρική μήτρα

FLG: Filaggrin - Φιλαγκρίνη

KLK5: Kallikrein-Related Peptidase 5 - Πεπτιδάση 5 που σχετίζεται με την καλλικρεΐνη

LL-37: Cathelicidin - Καθελιδίνη

MIC: Minimum Inhibitory Concentration – Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση

NGS: Next-Generation Sequencing – Αλληλούχηση επόμενης γενιάς

OoC: Organ-on-a-Chip – Όργανο σε τσιπ

PAMPAs: Parallel Artificial Membrane Permeability Assays - Παράλληλος προσδιορισμός διαπερατότητας τεχνητής μεμβράνης

PCR: Polymerase Chain Reaction – Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

RHE: Reconstructed Human Epidermis - Ανακατασκευασμένη Ανθρώπινη Επιδερμίδα

TLR2: Toll-Like Receptor 2 - Υποδοχέας

WGS: Whole Genome Sequencing - Αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος

WMS: Whole Metagenome Sequencing - Αλληλουχία ολόκληρου του μέταγονιδιώματος

hPSC: Human Pluripotent Stem Cells - Ανθρώπινα Πολυδύναμα Βλαστοκύτταρα

hESC : Human Embryonic Stem Cells - Ανθρώπινα Εμβρυϊκά Βλαστοκύτταρα

hiPSC: Human Induced Pluripotent Stem Cells - Ανθρώπινα Επαγόμενα Πολυδύναμα Βλαστοκύτταρα

ASC: Adult Stem Cells - Ενήλικα Βλαστοκύτταρα

MSC: Mesenchymal Stem Cells - Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα

CBMC: Cord Blood Mononuclear Cells - Μονοπύρηνια Κύτταρα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος

EB: Embryoid Bodies - Εμβρυοειδή Σώματα

ALI: Air-Liquid Interface - Επιφάνεια Αέρα-Υγρού

LAB: Laser-Assisted Bioprinting - Βιοεκτύπωση με Βοήθεια Λέιζερ

LIFT: Laser-Induced Forward Transfer - Μεταφορά Πρωθούμενη από Λέιζερ

ECM: Extracellular Matrix - Εξωκυτταρική Μήτρα

Περίληψη

Η προσομοίωση *in vitro* της μικροχλωρίδας του δέρματος αποσκοπεί στην αντικατάσταση της χρήσης ζώων στην έρευνα.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό, περιλαμβάνουν δισδιάστατα μοντέλα κυτταρικών καλλιιεργειών, τα οποία, παρά τη χρησιμότητά τους, περιορίζονται στην αναπαράσταση της αρχιτεκτονικής του δέρματος. Τα τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος παρέχουν μια πιο ολοκληρωμένη προσομοίωση της δομής και λειτουργίας του ανθρώπινου δέρματος, ενώ η χρήση οργανοειδών και συστημάτων "skin-on-a-chip" επιτρέπει την καλλιέργεια κυττάρων σε μικρορευστομηχανικές συσκευές, αναπαράγοντας το φυσικό περιβάλλον του δέρματος και τις αλληλεπιδράσεις με το μικροβίωμα. Επιπλέον, οι σύγχρονες τεχνικές "omics" προσφέρουν λεπτομερή ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας και των βιολογικών διεργασιών στις μικροβιακές κοινότητες του δέρματος. Η μεταγονιδιωματική αναλύει το DNA της μικροχλωρίδας, επιτρέποντας την κατανόηση της μικροβιακής ποικιλότητας και του λειτουργικού δυναμικού της. Η μεταγραφομική εξετάζει την έκφραση των γονιδίων σε πραγματικό χρόνο, δίνοντας πληροφορίες για τις μεταβολικές οδούς που είναι ενεργές στις μικροβιακές κοινότητες. Η μεταπρωτεομική αναλύει το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της μικροχλωρίδας, αποκαλύπτοντας τη λειτουργία και τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών, ενώ η μεταβολομική εξετάζει τους μεταβολίτες, προσφέροντας μια συνολική εικόνα των βιοχημικών διεργασιών. Επιπλέον, οι βιοεκτυπωτές (bioprinting) αποτελεί μια νέα τεχνολογία που επιτρέπει τη δημιουργία σύνθετων τρισδιάστατων δομών δέρματος με ακριβή τοποθέτηση κυττάρων και βιοϋλικών, επιτρέποντας την καλύτερη αναπαράσταση της μικροχλωρίδας του δέρματος και της αλληλεπίδρασής της με το περιβάλλον. Τα *ex vivo* μοντέλα, από την άλλη πλευρά, χρησιμοποιούν ανθρώπινους ιστούς που διατηρούνται ζωντανοί εκτός του οργανισμού, προσφέροντας μια πιο ρεαλιστική προσομοίωση της ανθρώπινης φυσιολογίας και παρέχοντας κρίσιμες πληροφορίες για τις δερματικές παθήσεις.

Έτσι, σε αυτήν την πτυχιακή εργασία αναλύονται όλες οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την προσομοίωση του ανθρώπινου δερματικού μικροβιώματος καθώς και οι περιορισμοί της κάθε μεθόδου ενώ υπογραμμίζεται η σημασία της συνεχιζόμενης έρευνας και βελτιστοποίησης αυτών των μοντέλων και τεχνικών για την καλύτερη κατανόηση και θεραπεία των δερματικών παθήσεων.

Λέξεις κλειδιά: δερματικό μικροβίωμα, τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος, *in vitro* μοντέλα, μικροχλωρίδα δέρματος, οργανοειδή, βιοεκτύπωση, δερματικές παθήσεις, όργανο-σε-τσιπ, μεταγονιδιωματική, αναλύσεις omics, κυτταροκαλλιέργειες, δερματικός Φραγμός, βιομεμβράνες, εξωσωματικά μοντέλα

Abstract

The simulation of skin microbiota *in vitro* aims to replace the use of animals in research.

Traditional methods include two-dimensional cell culture models, which, despite their usefulness, are limited in representing the architecture of the skin. Three-dimensional skin models provide a more comprehensive simulation of the structure and function of human skin, while the use of organoids and "skin-on-a-chip" systems allows for the cultivation of cells in microfluidic devices, replicating the natural skin environment and its interactions with the microbiome. Furthermore, modern "omics" techniques offer detailed analysis of microbial diversity and biological processes in the skin's microbial communities. Metagenomics analyzes the DNA of the microbiota, allowing for the understanding of microbial diversity and its functional potential. Metatranscriptomics examines gene expression in real-time, providing information on the metabolic pathways active in microbial communities. Metaproteomics analyzes the protein content of the microbiota, revealing the function and activity of microorganisms, while metabolomics studies metabolites, offering a comprehensive view of biochemical processes. Additionally, bioprinting is a new technology that enables the creation of complex three-dimensional skin structures with precise placement of cells and biomaterials, allowing for better representation of the skin microbiota and its interactions with the environment. On the other hand, *ex vivo* models use human tissues maintained alive outside the organism, offering a more realistic simulation of human physiology and providing critical insights into skin diseases.

Thus, this research assay analyzes all the methods that have been used to simulate the human skin microbiome and the limitations of each method, while emphasizing the importance of continuous research and optimization of these models and techniques for better understanding and treatment of skin diseases.

Key words: skin microbiome, 3D skin models, *in vitro* models, skin microbiota, organoids, bioprinting, skin diseases, organ-on-a-chip, metagenomics, omics analyses, cell cultures, skin barrier, biofilms, *ex vivo* models

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	vi
Συνοτομέυσεις.....	vii
Περίληψη	ix
Abstract.....	xi
1. Εισαγωγή	1
2. Τεχνητές Μεμβράνες (Artificial membranes)	8
3. 2D και 3D καλλιέργειες δέρματος.....	10
4. Οργανοειδή (Organoids).....	21
5. Μοντελοποίηση ενός ιστού ή οργάνου σε τσιπ (Organ on-a-chip (OoC))	26
Μεταφερόμενο δέρμα σε τσιπ	26
In situ συσκευή δέρματος σε τσιπ (in situ skin on a chip)	27
6. Βιοεκτύπωση (Bioprinting)	32
Βιοεκτύπωση με εξώθηση.....	33
Βιοεκτύπωση inkjet	34
Βιοεκτύπωση Φωτοπολυμερισμού	35
Βιοεκτύπωση με βοήθεια λέιζερ	35
7. Ex vivo μοντέλα δέρματος.....	41
8. Βιοφίλμ (Biofilms)	46
9. Τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next – Generation Sequencing)	48
9.1. Μεταγονιδιωματική Ανάλυση (Metagenomics)	48
9.2. Μεταγραφομική ανάλυση (Metatranscriptomics).....	50
9.3. Μεταπρωτεομική ανάλυση (Metaproteomics)	51
9.4. Μεταβολομική ανάλυση (Metabolomics).....	53
10. Περιορισμοί στην έρευνα του ανθρώπινου δερματικού μικροβιώματος	54
11. Μελλοντικές οδηγίες	60
12. Ιδανικό μοντέλο	62
13. Συμπεράσματα	65
Βιβλιογραφία	67
Παράρτημα:.....	103

1. Εισαγωγή

Η κατευθυντήρια αρχή των 3R (Replacement, Reduction, Refinement) που προστατεύει την ανεξέλεγκτη χρήση των ζώων στις έρευνες [1,2] έχει οδηγήσει τους ερευνητές σε όλους τους τομείς της ιατρικής, βιολογίας και βιοιατρικής να κατευθυνθούν και να αναζητήσουν άλλες λύσεις. Μία απ' αυτές αποτελούν τα *in vitro* μοντέλα με στόχο να ληφθούν προκαταρκτικά αποτελέσματα σχετικά με την καταλληλότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των νέων θεραπευτικών παραγόντων [2–4]. Στην πραγματικότητα, ένα *in vitro* μοντέλο αποτελεί μια δοκιμή που συμβαίνει σε «γυαλί», για παράδειγμα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα, γεγονός που σημαίνει ότι γίνεται εκτός ενός ζωντανού οργανισμού και συνήθως περιλαμβάνει απομονωμένους ιστούς, όργανα ή κύτταρα [5,6].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για *in vitro* αναπαράσταση, ανάμεσα σε διάφορους ιστούς και όργανα, έχει αποτελέσει το δέρμα καθώς είναι το φυσικό προστατευτικό στρώμα και μπορεί να αποτελεί οδό χορήγησης διαφόρων φαρμάκων, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται τόσο σε έρευνες στην βιοιατρική και στα καλλυντικά [2–4]. Το δέρμα αποτελείται από πολλούς τύπους κυττάρων και δομές που μαζί διατηρούν τον φραγμό του δέρματος και ανταποκρίνονται στις εξωτερικές προκλήσεις. Τα κύρια στρώματα είναι η επιδερμίδα και το χόριο, με υποκείμενο υποδόριο λιπώδη ιστό να παρέχει απορρόφηση κραδασμών και αποθέματα ενέργειας στο σώμα [7,8]. Το δέρμα περιέχει επίσης συστατικά όπως τριχοθυλάκια και αδένες, που συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες, όπως είναι για παράδειγμα η αποκατάσταση ενός τραύματος [8–11].

Το δέρμα αποτελεί έναν φυσικό φραγμό μεταξύ οργανισμών και περιβάλλοντος με σκοπό να προστατεύει από την εισβολή παθογόνων καθώς και την ανεξέλεγκτη απώλεια νερού και διαλυμένων ουσιών. Ο επιδερμικός φραγμός εντοπίζεται κυρίως στην κεράτινη στοιβάδα και αποτελείται από κύτταρα εμπλουτισμένα με πρωτεΐνες (κερατινοκύτταρα με κερατινοποιημένο περίβλημα και κυτταροσκελετικά στοιχεία, καθώς και δεσμοσώματα) και ενδοκυτταρικές περιοχές εμπλουτισμένες με λιπίδια. Μια σημαντική δομή αποτελεί ο κυτταρικός φάκελος που αποτελεί ένα πολυμερές πρωτεΐνης / λιπιδίου και βρίσκεται κάτω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα κεραμίδια (ceramides) A και B, που είναι λιπιδικά μόρια, βοηθούν στην προσθήκη ελεύθερων λιπαρών οξέων, άλλων ceramides και

χοληστερόλης στην κεράτινη στοιβάδα και συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με τις πρωτεΐνες του φακέλου. Επιπλέον η φιλαγκρίνη, μία πρωτεΐνη του δέρματος, συνδέεται με τον φάκελο και συσσωματώνει νημάτια κερατίνης σε μεγάλα ινίδια. Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζουν στην διατήρηση της λειτουργίας του φραγμού έχουν οι κυτοκίνες, η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη και το ασβέστιο [12].

Είναι, πλέον, γνωστό ότι τα μικρόβια υπάρχουν σε κάθε μέρος του σώματος δημιουργώντας μοναδικές μικροβιακές κοινότητες. Αλλαγές στην κοινότητα αυτή μπορεί να προκληθούν από διάφορους παράγοντες και συχνά συνδέονται με ασθένειες [13,14]. Όσον αφορά την βακτηριακή δερματική κοινότητα 19 φύλα είναι γνωστό ότι υπάρχουν με κυριότερα τα *Actinobacteria* (51.8%), *Firmicutes* (24.4%), *Proteobacteria* (16.5%), και *Bacteroidetes* (6.3%) [15,16]. Η πλειοψηφία των ταυτοποιημένων γενών είναι *Corynebacterium*, *Propionibacterium* και *Staphylococcus* [15–17]. Εκτός από τα βακτήρια στο δέρμα σημαντικό ρόλο παίζουν και οι μύκητες με τα πιο γνωστά είδη να είναι αυτά της *Malassezia* και πιο συγκεκριμένα *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta* και *Malassezia sympodialis* [16,18–20]. Άλλοι ευκαρυώτες που θα φιλοξενοούνται στο δέρμα είναι αυτά που ανήκουν στο φύλο *Arthropoda* με συνηθέστερα τα *Demodex folliculorum* και το *Demodex brevis*, γνωστά ως ακάρεα βλεφαρίδων [16,21,22]. Λιγότερα είναι αυτά που γνωρίζουμε για τους ανθρώπινους ιούς, ωστόσο είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι ακόμη και ένας παθογόνος ιός, όπως είναι αυτός των ανθρωπίνων θηλωμάτων μπορεί να αποτελεί μέρος του φυσιολογικού μικροβιώματος του δέρματος [16,23–27]. Οι βακτηριοφάγοι κυριαρχούν στο δέρμα όσον αφορά το ιικό κλάσμα [28,29], με γονιδιωματικές αναλύσεις να δείχνουν ότι οι φάγοι *Cutibacterium* και *Staphylococcus* είναι αυτοί που βρίσκονται σε αφθονία, ενώ άλλοι όπως οι φάγοι *Streptococcus* και *Corynebacterium* φαίνεται να υπάρχουν αλλά σε μικρότερο ποσοστό (Πίνακας 1) [29,30].

Πίνακας 1: Θέση των μικροοργανισμών στο ανθρώπινο δέρμα.

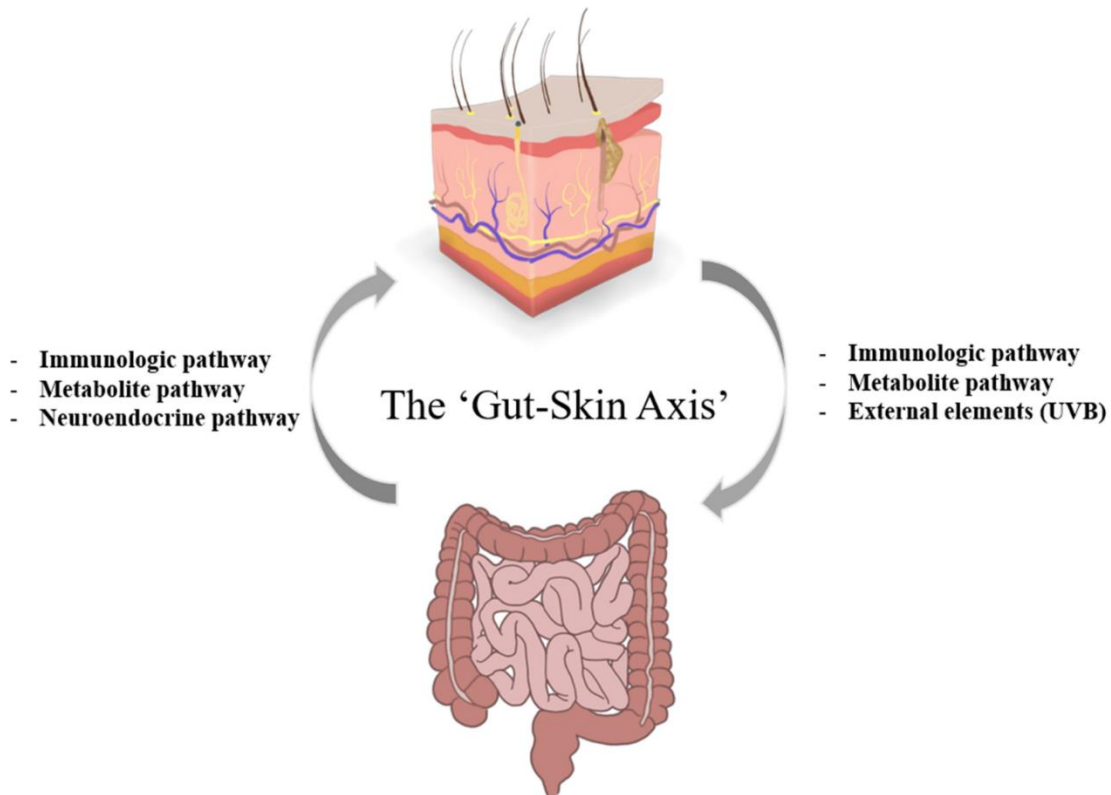
Θέση ανθρωπίνου σώματος:	Μικροοργανισμοί:	Βιβλιογραφία:
Σμηγματογόνες θέσεις στο πρόσωπο	Είδη <i>Propionibacterium</i> και <i>Staphylococcus</i>	[15,17]

Υγρές περιοχές (πχ μασχάλη)	Είδη <i>Corynebacterium</i> και <i>Staphylococcus</i>	[15,17]
Ξηρές περιοχές	Μικτοί πληθυσμοί βακτηριακών ειδών β-πρωτεοβακτηρίων και φλαβοβακτηρίων	[15,17]
Πλάτη , ινιακό ρύγχος, βουβωνική χώρα	<i>Malassezia globosa</i>	[31]
Τριχωτό της κεφαλής, έξω ακουστικός πόρος, μεσόφρυο	<i>Malassezia restricta</i>	[20,31]
Πόδια	Μεγάλη ποικιλομορφία (π.χ. <i>Aspergillus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Cryptococcus</i> και <i>Epicoccum</i>)	[20]
Θύλακες των τριχών	<i>Demodex folliculorum</i> με άλλα ακάρεα του ίδιου είδους	[32]
Σμηγματογόνους αδένες ή μείβομικούς αδένες στα βλέφαρα	<i>Demodex brevis</i>	[32]

Επίσης, στενή σχέση φαίνεται να υπάρχει μεταξύ του μικροβιώματος του δέρματος και του εντέρου με την υγεία του δεύτερου να επηρεάζει το την υγεία του πρώτου και αντίστροφα. Αν και είναι δύσκολο να αποδοθεί αυστηρά μια αιτιώδης σχέση μεταξύ του μικροβιώματος του εντέρου και των δερματικών παθήσεων, πολλές μελέτες υποστηρίζουν μια σύνδεση μεταξύ τους με αρκετές δερματικές ασθένειες να σχετίζονται με γαστρεντερικές διαταραχές. Για παράδειγμα, το 10% έως 25% των ασθενών με γαστρεντερικές παθήσεις, όπως η ελκώδης κολίτιδα, η

νόσος του Crohn και η κοιλιοκάκη, παρουσιάζουν επίσης σχετιζόμενα δερματικά ευρήματα, ιδιαίτερα ψωρίαση και δερματικά έλκη (*Εικόνα 1*) [33]. Ωστόσο, γενικά η περίπτωση διαταραχή της ομοιόστασης μεταξύ της φυσιολογικής μικροχλωρίδας και ξενιστή έχει συσχετιστεί με ασθένεια [34]. Συγκεκριμένα, από τις πιο συχνές ασθένειες του δέρματος είναι η ακμή, της οποίας ο μηχανισμός δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός ακόμη [35,36]. Ωστόσο, ένα αίτιο που φαίνεται να την προκαλεί είναι ο αλλαγμένος βακτηριακός αποικισμός [37] που έχει ως αποτέλεσμα υπερπαραγωγή σμήγματος, αλλοιωμένη κερατινοποίηση και φλεγμονή. Το βακτήριο που παρατηρείται συνήθως είναι το *Propionibacterium acnes* [35,36]. Ειδική περίπτωση αποτελεί η ροδόχρους ακμή, που ταλαιπωρεί περίπου 3% του πληθυσμού [38]. Εκδηλώνεται με ερύθημα, βλατίδες και φλύκταινες κυρίως στο πρόσωπο με το άκαρι *Demodex* να ευθύνεται για τις περισσότερες περιπτώσεις [39,40]. Όσον αφορά την παθογένεια της νόσου φαίνεται να είναι η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα αλλοιωμένη έκφραση TLR2, υπερέκφραση της σερινοπρωτεάσης καλλικρεΐνης 5 (KLK5) και ανώμαλη έκφραση του αντιμικροβιακού πεπτιδίου καθελιδίνης (AMP) LL-37 [41,42], με όλα αυτά να επηρεάζουν το δερματικό μικροβίωμα [41]. Η ατοπική δερματίτιδα αποτελεί μια χρόνια, φλεγμονώδη νόσο του δέρματος η οποία φαίνεται να οφείλεται σε διαταραχή του δερματικού φραγμού. Οι διαταραχές του φραγμού φαίνεται να περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της φιλαγκρίνης, μια πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στην κερατινοποίηση, καθώς και μειωμένη έκφραση των αντιμικροβιακών πρωτεϊνών (AMPs). Χαρακτηρίζεται από αυξημένο αποικισμό βακτηρίων και ευαισθησία σε λοιμώξεις από *Staphylococcus aureus* και άλλους ιούς [43,44]. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της θεραπείας παρατηρείται αύξηση διάφορων βακτηριακών γένων, όπως *Corynebacterium*, *Streptococcus* και *Propionibacterium* [45]. Η ψωρίαση φαίνεται να είναι πιο πολύπλοκη από την ατοπική δερματίτιδα, καθώς προκύπτει από έναν συνδυασμό περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων [46,47] με κύρια χαρακτηριστικά να είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων, η διήθηση του δέρματος από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και φυσικά η αγγειογένεση [48]. Όσον αφορά τον μικροβιακό πληθυσμό, κυριαρχούν τα *Firmicutes* και μειώνεται ο αποικισμός από *Actinobacteria*, χωρίς να γνωρίζουμε αν φτάνει οι αλλαγές αυτές στο μικροβίωμα για την ψωρίαση [46,47]. Τέλος, η σμηγματορροϊκή δερματίτιδα εμφανίζεται στην εφηβεία επειδή αυξάνονται τα δερματικά λιπίδια και μπορεί να παρατηρηθεί σε

περιοχές τα αυτιά, το στήθος και το τριχωτό της κεφαλής [49], γνωστή ως πιτυρίδα [31]. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν, κυρίως, ερυθρήματα με λιπαρή απολέπιση. Για αυτή την δερματική νόσο, υπεύθυνος είναι ο μύκητας *Malassezia* και γι' αυτό πρέπει να αντιμετωπίζεται με αντιμυκητιασικούς παράγοντες [49].



Εικόνα 1: Διάφορες εναλλακτικές του άξονα εντέρου – δέρματος στην ατοπική δερματίτιδα. Μελέτες δείχνουν ότι τοξίνες που υπάρχουν στο μικροβίωμα του εντέρου καθώς και τα εντερικά μικρόβια μπορεί να είναι πρόβλημα για ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα, μέσω ανοσολογικών, μεταβολικών και νευροενδοκρινικών οδών [34].

Πίνακας 2: Συσχέτιση ασθενειών του δέρματος με μικροοργανισμούς.

Ασθένεια:	Παρατηρείται:	Μικρόβιο:	Βιβλιογραφία:
Ακμή	Βακτηριακός αποικισμός που έχει αλλάξει	Οφείλεται συχνά σε <i>Propionibacnsiteri um acnes</i>	[35–37]

Ατοπική δερματίτιδα	Αυξημένος βακτηριακός αποικισμός - μεταλλάξεις στο γονίδιο φιλαγγρίνη	Ευαισθησία σε λοιμώξεις από <i>Staphylococcus aureus</i> και ιοί όπως ο έρπης	[43,44,50]
Ψωρίαση	Υπερκεράτωση, διήθηση του δέρματος από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και αγγειογένεση	Οι <i>Furmicutes</i> κυριαρχούν και τα <i>Actinobacteria</i> λιγοςτεύουν	[46–48]
Ροδόχρους ακμή	Δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της αλλοιωμένης έκφρασης TLR2, των υψηλών επιπέδων της πρωτεάσης σερίνης καλλικρεΐνης 5 (KLK5) και της μη φυσιολογικής έκφρασης του αντιμικροβιακού πεπτιδίου καθελικιδίνης LL-37	Τα ακάρεα <i>Demodex</i> αυξάνονται σημαντικά στο δέρμα των ασθενών με ροδόχρου ακμή	[38–42]
Σμηγματορροϊκή ή δερματίτιδα	Δυσλειτουργία του δερματικού φραγμού – υπερπολλαπλασιασμός και απολέπιση	Οφείλεται συχνά στον μύκητα <i>Malassezia</i>	[49]

Πριν ξεκινήσει μια προσπάθεια για την αναδημιουργία της δερματικής μικροχλωρίδας πρέπει να ληφθούν υπόψιν κάποια θέματα ώστε να είναι επιτυχημένη η έρευνα.

Το μικροβίωμα του δέρματος έχει πολλαπλούς ρόλους με τους σημαντικότερους να είναι ότι μπορεί να προστατεύσει από πιθανή εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών και περιβαλλοντικών θεμάτων [25,51]. Αυτό

επιτυγχάνεται με την έκκριση διαφόρων ενζύμων, αποικοδόμηση τοξικών για τον οργανισμό ουσιών καθώς και την παραγωγή , βιοφίλμ βακτηριοκινών [52,53] και αντιμικροβιακών πεπτιδίων [54]. Επιπλέον, κάποιοι από τους μικροοργανισμούς της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος έχουν από την αρχή της ζωής τους επικοινωνία με το ανοσοποιητικό σύστημα και με αυτό τον τρόπο συμμετέχουν στην επούλωση πληγών [55,56]. Ένας από τους παράγοντες που προκαλεί αλλοιώσεις στο μικροβίωμα του δέρματος είναι η γήρανση με αποτέλεσμα την εμφάνιση ρυτίδων, κηλίδων, δυσχρωμιών , που πολλές φορές μπορεί να συνδέονται με ασθένειες. Για όλους αυτούς τους λόγους που αναφέρθηκαν, φαίνεται να είναι απαραίτητο το μικροβίωμα του δέρματος να προσομοιωθεί σε ένα μοντέλο το οποίο θα μπορεί να παρέχει όλες τις πληροφορίες που απαιτούνται σε καταστάσεις όπως οι ασθένειες, οι φλεγμονές, η γήρανση ενώ το μικροβίωμα του δέρματος πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ακόμη και στην παραγωγή καλλυντικών και θεραπευτικών προϊόντων.

Έτσι, σε αυτή την πτυχιακή εργασία αναφέρονται όλα τα πειραματικά μοντέλα *in vitro* που έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για το μικροβίωμα του δέρματος, ορισμένες από τις εφαρμογές τους καθώς και τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν.

2. Τεχνητές Μεμβράνες (Artificial membranes)

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες μοντέλων για τη μελέτη της διαδερμικής διείσδυσης: τα μοντέλα που δεν βασίζονται σε λιπίδια και τα μοντέλα που βασίζονται σε λιπίδια [57]. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνεται η μικροπορώδης μεμβράνη οξικής κυτταρίνης (CA), η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη της τοπικής διάχυσης και απελευθέρωσης χημικών παραγόντων [58]. Παρόλο που είναι χρήσιμη, έχει αρκετά μειονεκτήματα, όπως το μεγαλύτερο μέγεθος των πόρων της σε σύγκριση με το ανθρώπινο δέρμα, γεγονός που οδηγεί σε υψηλότερο ποσοστό διείσδυσης. Αυτό επιβεβαιώθηκε από τον de Almedida Borges και την ομάδα του, οι οποίοι παρατήρησαν αυξημένη διείσδυση της δαψόνης μέσω των μεμβρανών CA σε σχέση με την επιδερμίδα του αυτιού χοίρου [59]. Επιπλέον, οι μεμβράνες CA στερούνται το υγρό λιπιδικό συστατικό που υπάρχει στην κεράτινη στιβάδα του δέρματος, ένα σημαντικό εμπόδιο για τη διείσδυση του φαρμάκου [58,59].

Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, έχουν αναπτυχθεί λιπιδικά μοντέλα όπως τα δερματικά PAMPAs (Parallel Artificial Membrane Permeability Assays), τα οποία περιέχουν ελεύθερα λιπαρά οξέα, χοληστερόλη και συνθετικά κεραμίδια που μιμούνται την κεράτινη στιβάδα [58,60]. Αυτά τα συστήματα, που βασίζονται σε πλάκες 96 φρεατίων με τεχνητή μεμβράνη, προσέλκυσαν το ενδιαφέρον των ερευνητών για τις δοκιμές υψηλής απόδοσης [60,61]. Για παράδειγμα, ο Rahma και οι συνεργάτες του [62] χρησιμοποίησαν αυτό το μοντέλο για την αξιολόγηση της διείσδυσης της φαινοξαιθανόλης, παρατηρώντας θετική συσχέτιση με τη διείσδυση στο δέρμα χοίρου και ανθρώπου [62–64]. Επιπλέον, με την προσθήκη φυσικού ελαίου jojoba, η διείσδυση της ρετινόλης αυξήθηκε σημαντικά, δείχνοντας την ικανότητα του ελαίου να ενισχύει τη ρευστότητα του λιπιδικού φραγμού [65].

Ωστόσο, τα δερματικά PAMPAs παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η έλλειψη στρωματοποιημένου επιδερμικού ιστού και πλήρους σετ λιπιδίων του ανθρώπινου δέρματος [66]. Ο Luo και η ομάδα του πραγματοποίησαν συγκριτική μελέτη της διείσδυσης της ιβουπροφαίνης, διαπιστώνοντας ότι το φάρμακο ήταν πιο διαπερατό μέσω του PAMPA και της μεμβράνης σιλικόνης παρά μέσω των ζωικών ιστών [67]. Επιπλέον, η μεμβράνη Strat-M από την EMD Millipore

είναι ένα άλλο παράδειγμα τεχνητής μεμβράνης με βάση τα λιπίδια που μιμείται το ανθρώπινο δέρμα, με πολλαπλά στρώματα πολυαιθεροσουλφόνης και πολυολεφίνης, δημιουργώντας μια διαβάθμιση διαπερατότητας [57,68–70]. Η Haq και η ομάδα της απέδειξαν την υπεροχή του Strat-M σε σχέση με τη μεμβράνη CA, καθώς η διαπερατότητα του Strat-M ήταν πιο κοντά σε αυτή του δέρματος, λόγω του μικρότερου μεγέθους πόρων και της χαμηλότερης μεταβλητότητας διείσδυσης [58]. Σε άλλη μελέτη, η ίδια ομάδα παρατήρησε καλή συσχέτιση διαπερατότητας μεταξύ του Strat-M και του ανθρώπινου δέρματος με χρήση διαφορετικών διαλυμάτων νικοτίνης [71]. Άλλες ερευνητικές ομάδες, όπως αυτή της Kittaneh και της Czajkowska-Kośnik, χρησιμοποίησαν το Strat-M για τη δοκιμή της διαδερμικής χορήγησης βιταμίνης D3 και για την πρόβλεψη της διεισδυτικότητας γέλης με νανοδομικούς φορείς λιπιδίων [69,70].

Παρόλο που αυτά οι τεχνητές μεμβράνες είναι κατάλληλες για τον αρχικό έλεγχο μορίων ή ενώσεων που χρειάζονται μελέτη των χαρακτηριστικών διάχυσης, δεν αποτελεί κατάλληλο μοντέλο για να φιλοξενήσει την πλήρη μικροχλωρίδα του ανθρώπινου δέρματος. Οι συνθετικές μεμβράνες έχουν έναν βασικό περιορισμό: δεν περιέχουν κύτταρα και έτσι δεν επιτρέπουν τη δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων με διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Για αυτόν τον λόγο, στη βιβλιογραφία βρίσκονται συχνά μελέτες όπου αυτές οι συνθετικές μεμβράνες χρησιμοποιούνται κυρίως ως υποστήριξη για την ανάπτυξη βακτηρίων και όχι ως ανακατασκευή ενός αποτελεσματικού δερματικού φραγμού [2]. Ένα παράδειγμα είναι το φίλτρο μεμβράνης οξικής κυτταρίνης που χρησιμοποιήθηκε από τους Janvier et al. για να μελετήσουν την επίδραση του διοξειδίου του αζώτου στη μικροχλωρίδα του ανθρώπινου δέρματος. Συγκεκριμένα, οι επιπτώσεις αυτού του ρύπου δοκιμάστηκαν όχι στην πλήρη μικροχλωρίδα, αλλά σε πέντε βακτηριακά στελέχη από το δέρμα υγιών εθελοντών [2,72].

3. 2D και 3D καλλιέργειες δέρματος

Οι πρώτες κυτταρικές καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν ήταν από ανθρώπινο δέρμα, επιτρέποντας την καλύτερη κατανόηση των φυσιολογικών λειτουργιών του δέρματος [73]. Σήμερα, οι κυτταρικές καλλιέργειες είναι διαθέσιμες σε δισδιάστατες (2D) και τρισδιάστατες (3D) μορφές. Οι 2D καλλιέργειες, οι οποίες καλλιεργούνται σε ελεγχόμενα επίπεδα περιβάλλοντα όπως τα τρυβλία Petri [74], απαιτούν τον κατάλληλο εξοπλισμό και προμήθειες για να διατηρήσουν τα κύτταρα εκτός του σώματος ενός οργανισμού [75,76]. Εκτός από τον κατάλληλο εξοπλισμό, το μέσο καλλιέργειας είναι εξίσου σημαντικό για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Αρχικά, το μέσο αυτό αποτελούνταν από πλάσμα αίματος, αλλά με την πάροδο του χρόνου, αναπτύχθηκαν συνθετικά μέσα με τις σωστές ποσότητες θρεπτικών ουσιών, αντιμυκητιστακά και αντιβιοτικά συστατικά [77]. Το μέσο κυτταροκαλλιέργειας περιέχει αμινοξέα, ρυθμιστικό σύστημα, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και άλλα συστατικά απαραίτητα για τη διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας [78]. Αναλόγως τον τύπο κυττάρου που επρόκειτο να καλλιεργηθεί, τα μέσα καλλιέργειας καθώς και οι απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά ποικίλουν [76].

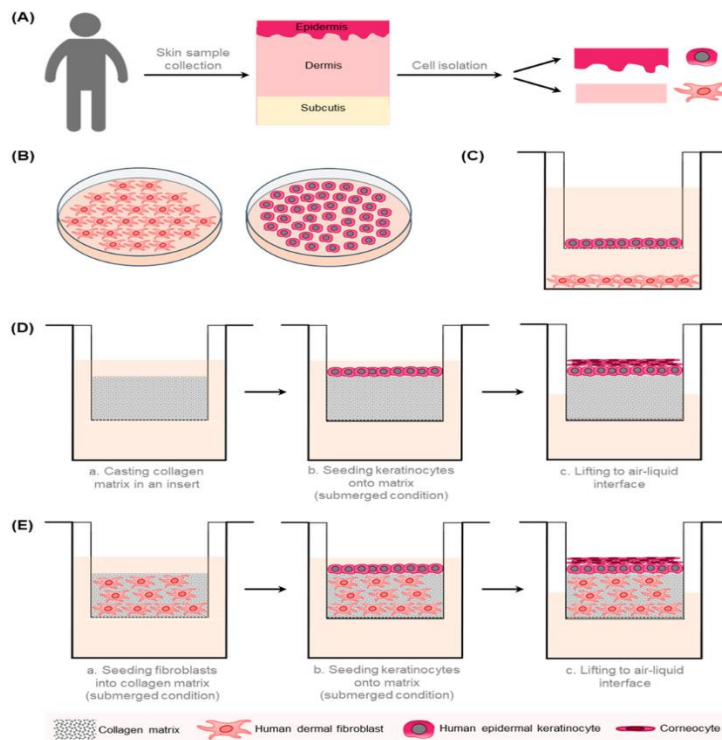
Από την αρχική τους έρευνα, οι Rheinwald και Green [79] παρατήρησαν ότι η ανάπτυξη μονοστιβάδων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων υποστηρίχθηκε από τη συγκαλλιέργεια με ινοβλάστες, καθώς αυτά τα κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν πρωτεΐνες εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) και αυξητικούς παράγοντες [4,59]. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα στη βιβλιογραφία που δείχνουν ότι οι 2D κυτταροκαλλιέργειες είναι κατάλληλες για την αξιολόγηση της απόκρισης των κυττάρων σε διάφορα ερεθίσματα. Για παράδειγμα, η Λέτσιοι και η ομάδα της δοκίμασαν τα αποτελέσματα ενός πιθανού συστατικού για νέες φόρμουλες προσωπικής φροντίδας, του εκχυλίσματος γλυκού κερασιού (*Prunus avium L.*), σε 2D καλλιέργειες πρωτογενών φυσιολογικών ανθρώπινων επιδερμικών κερατινοκυττάρων, αποδεικνύοντας ότι αυτή η ένωση δεν είναι κυτταροτοξική [80].

Εκτός από τα πρωτογενή κύτταρα που λαμβάνονται άμεσα από ζωντανούς ιστούς και έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής και σταθερότητα στην καλλιέργεια, οι αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές που μπορούν να επιβιώσουν με συνεχή κυτταρική διαίρεση είναι κατάλληλες για 2D μοντέλα [76,81,82]. Για παράδειγμα,

αυθόρμητα αθανатоποιημένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (κυτταρική σειρά HaCaT) χρησιμοποιήθηκαν από τους Smolińska και τους συνεργάτες του για να δοκιμάσουν τις επιδράσεις της γενιστεΐνης ισοφλαβόνης σε φυσιολογικά και επαγόμενα από ψωρίαση κερατινοκύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτή η φυσική ουσία μπορεί να βελτιώσει την ανώμαλη έκφραση γονιδίων που παρατηρείται στην ψωρίαση, ρυθμίζοντας προς τα κάτω τα υπερδραστήρια γονίδια και προς τα πάνω τα υπολειπόμενα γονίδια στα ψωριασικά κύτταρα [83].

Τα πλεονεκτήματα των 2D μοντέλων δέρματος συνοψίζονται στην απλότητα όσον αφορά την κατασκευή και την διατήρηση καθώς και στο γεγονός ότι είναι πιο οικονομικά από τις 3D καλλιέργειες [76,84].

Ωστόσο, διαπιστώνεται ότι τα 2D μοντέλα δεν είναι κατάλληλα για την αναπαράσταση του ανθρώπινου δερματικού μικροβιώματος, καθώς στερούνται της κεράτινης στοιβάδας, με αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί να έρχονται σε άμεση επαφή με τα πολλαπλασιαζόμενα κερατινοκύτταρα και τους ινοβλάστες, μια κατάσταση που δεν συμβαίνει στην πραγματικότητα *in vivo*. Επιπλέον, τα 2D συστήματα βρίσκονται σε μειονεκτική θέση λόγω του ταχύτερου ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων σε σύγκριση με τα ανθρώπινα κύτταρα, καθιστώντας δύσκολη τη διατήρησή τους για περισσότερες από 24 ώρες [29,81].



Εικόνα 2: Μια συνοπτική παρουσίαση των 2D και 3D *in vitro* μοντέλων του ανθρώπινου δέρματος. Περιλαμβάνει τα εξής: (Α) Διαφορετικοί τύποι κυτάρων απομονώνονται από δείγματα ανθρώπινου δέρματος, με τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα να εξάγονται από την επιδερμίδα και τους ινοβλάστες από το δερματικό στρώμα. (Β) Τα κερατινοκύτταρα και οι ινοβλάστες καλλιεργούνται ξεχωριστά ως 2D μονοστιβάδες. (Γ) Τα συστήματα συνκαλλιέργειας Transwell περιλαμβάνουν ινοβλάστες που αναπτύσσονται στον πυθμένα του φρεατίου και κερατινοκύτταρα που καλλιεργούνται σε πορώδες ένθετο, επιτρέποντας την ανταλλαγή διαλυτών παραγόντων χωρίς άμεση κυτταρική επαφή. (Δ) Στο μοντέλο ανακατασκευασμένης επιδερμίδας (RHE), τα στρωματοποιημένα κερατινοκύτταρα αναπτύσσονται πάνω σε πορώδη μεμβράνη στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού, πάνω από μια μήτρα κολλαγόνου. (Ε) Στο ισοδύναμο ανθρώπινου δέρματος (HSE), τα κερατινοκύτταρα καλλιεργούνται πάνω από ένα δερματικό ισοδύναμο που περιέχει ινοβλάστες ενσωματωμένους σε μήτρα που προσομοιάζει την εξωκυτταρική θεμέλια ουσία [85].

Στις τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες, τα κύτταρα συνενώνονται και σχηματίζουν μια τρισδιάστατη δομή, χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο περιβάλλον ή ειδικές συνθήκες που διατηρούν το σχήμα τους [86]. Ο εξοπλισμός στις 3D κυτταροκαλλιέργειες είναι ίδιος με αυτόν στις 2D ενώ οι προμήθειες που χρησιμοποιούνται διαφέρουν και περιλαμβάνουν τις μήτρες, τα ικριώματα και τα ιδιόκτητα πλαστικά για τον σχηματισμό συσσωματωμάτων [76].

Παρά την αυξανόμενη χρήση τρισδιάστατων μοντέλων στις δερματολογικές έρευνες, οι λειτουργικές μελέτες που εξετάζουν την επίδραση της μικροχλωρίδας στη βιολογία του δέρματος παραμένουν σχετικά σπάνιες. Με την ταχεία αύξηση της έρευνας για τη μικροχλωρίδα, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η χρήση τρισδιάστατων μοντέλων δέρματος σε αυτόν τον τομέα θα συνεχίσει να αυξάνεται [87].

Υπάρχουν διάφοροι τύποι τρισδιάστατων μοντέλων. Τα απλούστερα τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος περιλαμβάνουν μόνο μια διαφοροποιημένη επιδερμίδα. Σε αυτά τα μοντέλα, τα καλλιεργημένα κερατινοκύτταρα αναπτύσσονται σε μεμβράνες καλλιέργειας ιστών. Με την απομάκρυνση του υπερκείμενου, τα κερατινοκύτταρα εκτίθενται στον αέρα, προάγοντας τη δημιουργία και διαφοροποίηση πολλών επιδερμικών στιβάδων, μιμούμενοι τη φυσιολογική επιδερμίδα με κεράτινη στιβάδα [88–90].

Πιο εξελιγμένα μοντέλα δέρματος περιλαμβάνουν κερατινοκύτταρα που εμβολιάζονται σε μήτρα κολλαγόνου ή ινώδους με ινοβλάστες [89,91–95]. Αυτά τα μοντέλα πλήρους πάχους χρησιμοποιούν τη μήτρα ως ικρίωμα, μιμούμενη τη δερματική εξωκυτταρική μήτρα *in vivo*. Επιπλέον, μπορούν να δημιουργηθούν μοντέλα αποτελούμενα αποκλειστικά από ανθρώπινα κύτταρα, αντικαθιστώντας τη μήτρα με δερματικό υποκατάστατο από ινοβλάστες, οι οποίοι παράγουν τη δική τους εξωκυτταρική μήτρα *in vitro* [96]. Μια άλλη επιλογή είναι η χρήση αποεπιδερμικού χορίου από φυσιολογικό δέρμα ή κερατινοκύτταρα από το εξωτερικό περίβλημα των τριχοθυλακίων, προσφέροντας έναν μη επεμβατικό τρόπο δημιουργίας μοντέλων δέρματος με κύτταρα από ασθενείς [97–99].

Τα κερατινοκύτταρα και οι ινοβλάστες μπορούν επίσης να προέρχονται από βιοψίες. Για παράδειγμα, οι Berroth et al. χρησιμοποίησαν αυτήν την τεχνική για να δημιουργήσουν τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος με κύτταρα από υγιείς δότες ή από ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα [100]. Είναι επίσης δυνατό να δημιουργηθούν μοντέλα με κερατινοκύτταρα από την ακροποσθία ή με πρωτογενή κερατινοκύτταρα ενηλίκων, αν και τα μοντέλα από κερατινοκύτταρα της ακροποσθίας έχουν παρουσιάσει ανώμαλη μορφολογία και γονιδιακή έκφραση [99].

Για την αξιολόγηση του ρόλου συγκεκριμένων γονιδίων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κυτταρικές σειρές κερατινοκυττάρων που επιτρέπουν τη σταθερή υπερέκφραση ή την απενεργοποίηση γονιδίων. Τα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα N/TERT είναι ιδανικά για αυτόν τον σκοπό, καθώς παρουσιάζουν χαρακτηριστικά παρόμοια με τα πρωτογενή κερατινοκύτταρα και έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος [101,102].

Οι νέες τεχνολογίες, όπως τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) και η τεχνολογία μικρορευστοποίησης ("skin-on-chip") [103,104], καθώς και οι τεχνικές τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης [105] προσφέρουν προηγμένα εργαλεία για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μικροχλωρίδας-δέρματος.

Για να μελετηθεί και η αλληλεπίδραση μεταξύ επιδερμικών κερατινοκυττάρων και ανοσοκυττάρων, έχουν δημιουργηθεί εξειδικευμένα τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος με ενσωματωμένα λεμφοκύτταρα. Για παράδειγμα, ένα μοντέλο όπου τα κερατινοκύτταρα αναπτύσσονται σε αποεπιδερμидικό χόριο επωάστηκε με ενεργοποιημένα CD4+ T κύτταρα, τα οποία τοποθετήθηκαν κάτω από το ισοδύναμο του δέρματος. Τα T κύτταρα μετάνάστευσαν στο χόριο και προκάλεσαν φλεγμονώδη απόκριση, επάγοντας την έκφραση φλεγμονωδών δεικτών στην επιδερμίδα και διαταράσσοντας τη διαδικασία διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων [106]. Παρόμοια, τα ενεργοποιημένα T κύτταρα προκάλεσαν την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών σε ένα μοντέλο δέρματος με κερατινοκύτταρα HaCaT. Αυτή η φλεγμονώδης απόκριση μειώθηκε με την εφαρμογή αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως η δεξαμεθαζόνη [107].

Τα αποτελέσματα από μελέτες σε ποντίκια δείχνουν ότι κοινά βακτήρια όπως το *S. epidermidis* ενισχύουν την άμυνα του δέρματος ενεργοποιώντας τα ανοσοκύτταρα [108,109]. Επομένως, τα τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος με ενσωματωμένα ανοσοκύτταρα είναι χρήσιμα για την κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους οι μικροοργανισμοί επιδρούν στα δερματικά ανοσοκύτταρα. Για παράδειγμα, ένα μοντέλο δέρματος με CD4+ T κύτταρα χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της αντίδρασης των κυττάρων μετά από μόλυνση με τη ζύμη *Candida albicans*, αποκαλύπτοντας τη σημαντική επικοινωνία μεταξύ T κυττάρων και ινοβλαστών για την άμυνα κατά της ζύμης [110]. Αυτές οι μελέτες καταδεικνύουν τη λειτουργικότητα των τρισδιάστατων μοντέλων δέρματος με ενσωματωμένα

ανοσοκύτταρα για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δερματικών κυττάρων και μικροοργανισμών [87].

Πολλές μελέτες που χρησιμοποιούν τρισδιάστατα μοντέλα ανθρώπινου δέρματος για να εξετάσουν τις αλληλεπιδράσεις μικροβίου-δέρματος εστιάζουν στους σταφυλόκοκκους, ειδικά τον άφθονο *S. epidermidis* του δέρματος, καθώς και τον παθογόνο *S. aureus*. Η αλληλεπίδραση του δέρματος με τον *S. aureus* αποτελεί μακροχρόνιο επίκεντρο της δερματολογικής έρευνας λόγω του υψηλού παθογόνου δυναμικού του. Τα τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος έχουν αποδειχθεί χρήσιμα εργαλεία για τη μελέτη του ρόλου αυτού του σημαντικού παθογόνου, καθώς η προσκόλληση, η ανάπτυξη και ο εντοπισμός του *S. aureus* μπορούν εύκολα να παρακολουθηθούν σε τέτοια μοντέλα [111–113].

Για παράδειγμα, οι van Dronghelen et al. κατασκεύασαν ένα μοντέλο επιδερμικού δέρματος με πειραματικά εισαγόμενο knockdown φιλαγκρίνης και έδειξαν ότι η μειωμένη έκφραση φιλαγκρίνης οδηγεί σε σημαντικά αυξημένο επιδερμικό αποικισμό από τον *S. aureus*. Αυτή η εργασία καταδεικνύει ότι τα γενετικά τροποποιημένα αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα είναι πολύτιμα για τη μελέτη της επίδρασης συγκεκριμένων παραγόντων ξενιστή στον μικροβιακό επιδερμικό αποικισμό [114].

Όσον αφορά τα μολυσμένα τραύματα του δέρματος, τα τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος μπορούν να προσφέρουν μια εναλλακτική οδό για τη μελέτη της επίδρασης του *S. aureus* σε τραυματισμένο δέρμα. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει επιτυχή ανάπτυξη μοντέλων μόλυνσης ανθρώπινου τραύματος χρησιμοποιώντας τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος. Οι Shepherd et al. χρησιμοποίησαν μοντέλα δέρματος για την παρακολούθηση της προσκόλλησης και της εισβολής του *S. aureus* σε πειραματικά δημιουργημένα τραύματα [115]. Επιπλέον, ερευνητές από το Ιατρικό Κέντρο του Πανεπιστημίου του Λέιντεν ανέπτυξαν τρισδιάστατα ισοδύναμα δέρματος με θερμικά επαγόμενα τραύματα για να εξετάσουν την αποτελεσματικότητα αντιμικροβιακών παραγόντων στην εξάλειψη του πολυανθεκτικού *S. aureus* [116,117].

Σε αντίθεση με τον *S. aureus*, άλλοι σταφυλόκοκκοι του δέρματος είναι λιγότερο μελετημένοι. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες έχουν αυξήσει τις γνώσεις μας

για τους αρνητικούς στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκους που κατοικούν στο δέρμα μας. Ο *Staphylococcus epidermidis* είναι ο πιο άφθονος από αυτούς και παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του δέρματος, περιορίζοντας την ανάπτυξη παθογόνων όπως ο *S. aureus* και ενεργοποιώντας τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [118,119]. Παρά τα ευεργετικά χαρακτηριστικά του, ο *S. epidermidis* είναι επίσης μια κοινή αιτία ευκαιριακών λοιμώξεων, ιδίως σε βιοφίλμ σε ιατρικές συσκευές [120].

Οι Holland et al. δημιούργησαν ένα μοντέλο για την παρακολούθηση της ανάπτυξης κοινών δερματικών μικροβίων όπως το *S. epidermidis*, το *P. acnes* και ο μύκητας *Malassezia furfur*. Αυτό το μοντέλο υποστήριξε την ανάπτυξη και παρακολούθηση αυτών των μικροβίων για έως και 120 ώρες [93]. Αργότερα, χρησιμοποίησαν αυτό το μοντέλο για να αναλύσουν την επίδραση του *S. epidermidis* και του *S. aureus* στην έκφραση των γονιδίων του δέρματος, βρίσκοντας ότι ο *S. epidermidis* επηρέασε την έκφραση μόνο λίγων γονιδίων, ενώ ο *S. aureus* προκάλεσε την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων [121]. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το ανθρώπινο δέρμα είναι ιδιαίτερα ανεκτικό στην έκθεση στο βακτήριο *S. epidermidis*, γεγονός που μπορεί να διευκολύνει τον αποικισμό του δέρματος από αυτό το μικρόβιο, το οποίο αποτελεί μόνιμο στοιχείο της μικροχλωρίδας του δέρματος. Αντίθετα, ο *S. aureus* προκάλεσε έντονη αμυντική αντίδραση στο τρισδιάστατο μοντέλο δέρματος, υποδεικνύοντας ότι αυτό το βακτήριο δρα περισσότερο ως παθογόνος οργανισμός παρά ως συμβιωτικός παράγοντας [121]. Παρόμοια ευρήματα προέκυψαν και από άλλη μελέτη, όπου διαπιστώθηκε ότι το *S. epidermidis* και το *P. acnes* δεν προκάλεσαν σημαντική φλεγμονώδη αντίδραση όταν εφαρμόστηκαν στην επιφάνεια ενός τρισδιάστατου μοντέλου δέρματος. Ωστόσο, όταν τα βακτήρια εισήχθησαν στο μέσο καλλιέργειας του μοντέλου για να προσομοιωθεί η διείσδυση τους στον επιδερμικό φραγμό, παρατηρήθηκε έντονη φλεγμονώδης αντίδραση [122]. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα κοινά βακτήρια δεν επηρεάζουν την ισορροπία του δέρματος εφόσον παραμένουν στην επιφάνειά του. Παρ' όλα αυτά, η διείσδυσή τους στον επιδερμικό φραγμό μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη αντίδραση, η οποία ενδέχεται να αποτελεί μέρος της διαδικασίας αποκατάστασης του φραγμού μετά από τραυματισμό [123,124].

Επιπλέον, τα Gram-αρνητικά βακτήρια του γένους *Acinetobacter* έχουν επίσης διερευνηθεί σε τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος. Για να αποκτήσουν

καλύτερη κατανόηση της αντίδρασης του δέρματος στο *Acinetobacter*, ο de Breij και η ομάδα του χρησιμοποίησαν ένα τρισδιάστατο μοντέλο δέρματος που αποίκισαν με *Acinetobacter baumannii* και *Acinetobacter junii*. Παρατήρησαν ότι και τα δύο βακτήρια παρέμειναν στην κεράτινη στιβάδα χωρίς να διεισδύσουν στην επιδερμίδα, ενώ ο *A. baumannii* άρχισε να σχηματίζει βιοφίλμ. Επίσης, δεν σημειώθηκε έντονη φλεγμονώδης αντίδραση, γεγονός που δείχνει ότι τα βακτήρια δεν ενεργοποίησαν τα κερατινοκύτταρα στο συγκεκριμένο σύστημα καλλιέργειας [90]. Παρομοίως, τα *Corynebacteria*, όπως το *Corynebacterium amycolatum*, προκάλεσαν την έκφραση της αντιμικροβιακής πρωτεΐνης RNase 7 στα κερατινοκύτταρα [125].

Συγκεκριμένα, τα τρισδιάστατα μοντέλα έχουν καταστεί ουσιώδη εργαλεία για την ανάλυση των επιπτώσεων της διαταραχής του δερματικού φραγμού στη μικροβιακή κοινότητα, προσφέροντας πολύτιμες γνώσεις για τις δυσλειτουργίες του δερματικού φραγμού, ιδιαίτερα στην ατοπική δερματίτιδα (AD) [126–128]. Χάρη στα ανθρώπινα τρισδιάστατα μοντέλα, έχει προσεγγιστεί περισσότερο η κατανόηση των αιτιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν τον φραγμό του δέρματος και τον μικροβιακό αποικισμό. Ο Mildner και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η μείωση του siRNA του FLG οδήγησε σε μειωμένη λειτουργία φραγμού σε ανθρώπινα δερματικά μοντέλα [129]. Επίσης, οι van Drongelen et al, χρησιμοποιώντας επιδερμικά μοντέλα, έδειξαν ότι η μείωση του FLG αύξησε τον αποικισμό του *S. aureus*, υποστηρίζοντας τη θεωρία ότι η AD συνδέεται με αυξημένο αποικισμό από τον *S. aureus* [130]. Μια αναλυτική ανασκόπηση των μελετών knockdown του FLG σε τρισδιάστατα δερματικά μοντέλα παρέχεται από τους Niehues et al [131]. Οι Myles et al [132] διαπίστωσαν ότι η μεταφορά βακτηρίων από υγιείς εθελοντές και όχι από ασθενείς με AD βελτίωσε τις παραμέτρους διαταραχής του δερματικού φραγμού σε ένα μοντέλο AD ποντικίου, κάτι που αναμένει επαλήθευση σε ανθρώπινα τρισδιάστατα μοντέλα ή ασθενείς.

Τα τρισδιάστατα δερματικά μοντέλα που εκτίθενται σε μικροχλωρίδα από τον ασθενή ενδέχεται να είναι το ιδανικό εργαλείο για την αναγνώριση των παραγόντων που συμβάλλουν στις αλλαγές της μικροχλωρίδας του δέρματος στην AD. Στο μέλλον, θα ήταν ενδιαφέρον να αναπτυχθούν πειραματικές μέθοδοι που θα επιτρέπουν την ειδική επισήμανση μικροχλωρίδας από υγιείς και άρρωστο δέρμα για την παρακολούθηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μικροχλωρίδας και δέρματος

σε τρισδιάστατα μοντέλα. Επιπλέον, η διερεύνηση των επιβλαβών παθογόνων και των αλληλεπιδράσεών τους με το δέρμα ή/και τη μικροχλωρίδα θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε αυτό το πλαίσιο χωρίς ηθικούς περιορισμούς [128].

Επίσης, φαίνεται τα τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος να χρησιμοποιούνται για την μελέτη και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Μια υποσχόμενη πειραματική προσέγγιση για την κατανόηση του ρόλου της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και της επίδρασής της στη σύνθεση του μικροβιώματος του δέρματος περιλαμβάνει τη χρήση επισημασμένων μεταβολιτών σε ένα τρισδιάστατο μοντέλο μικροχλωρίδας του δέρματος. Σε αυτό το μοντέλο, επισημασμένες ενώσεις μπορούν να προστεθούν στα μέσα καλλιέργειας, και η μεταβολική τους μετατροπή σε ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα και μικροχλωρίδα μπορεί να παρακολουθηθεί μέσω φασματομετρίας μάζας. Λαμβάνοντας υπόψη το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη ρύθμιση του μικροβιώματος του δέρματος μέσω συστημικών ή διατροφικών προσεγγίσεων, η χρήση επισημασμένων ενώσεων και η ανάλυση του μεταβολισμού στο τρισδιάστατο μοντέλο μικροβιώματος του δέρματος επιτρέπει στους ερευνητές να διερευνήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των διατροφικών συμπληρωμάτων στο δέρμα [128].

Παράλληλα, υπάρχει αυξανόμενη εμπιστοσύνη στο δέρμα ως στόχο για μικροβιακά προϊόντα με σκοπό τον έλεγχο της φλεγμονής, ιδιαίτερα στο πλαίσιο της θεραπείας φλεγμονωδών δερματικών παθήσεων. Οι Baurecht et al έδειξαν ότι το μικροβίωμα του δέρματος σε περιπτώσεις ατοπικής δερματίτιδας παρουσιάζει μια αλλαγή από τα *Bacteroidetes* στα *Staphylococcus*, που συνδέεται με μεταβολές στα λιπίδια της κεράτινης στιβάδας, τονίζοντας τη σημασία της μεταβολικής ρύθμισης του μικροβιώματος για την υγεία του δέρματος [133]. Οι πρώτες κλινικές πιλοτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η τοπική εφαρμογή φυσικών βακτηρίων ή προβιοτικών διαλυμάτων μπορεί να βελτιώσει τη λειτουργία του δερματικού φραγμού και να μειώσει τη σοβαρότητα της ατοπικής δερματίτιδας [134–136], ενώ πολλές εταιρείες αναπτύσσουν τοπικές θεραπείες βασισμένες στο μικροβίωμα του δέρματος [137].

Τα τρισδιάστατα μοντέλα δέρματος προσφέρουν μια εξαιρετική προσέγγιση για την αναπαράσταση των δομικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών του ανθρώπινου δέρματος, συμπεριλαμβανομένης της πλήρως διαφοροποιημένης και πολυεπίπεδης επιδερμίδας που μιμείται τον φυσικό δερματικό φραγμό. Αυτά τα

μοντέλα εξαλείφουν ηθικές ανησυχίες, καθώς δεν απαιτούν τη χρήση ζώων και είναι εύκολα προσβάσιμα. Το περιβάλλον τους μπορεί να τροποποιηθεί με την προσθήκη κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων για την προσομοίωση φλεγμονωδών και νοσηρών καταστάσεων. Είναι από τη φύση τους αποστειρωμένα και μπορούν να αποικιστούν επιλεκτικά με συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, επιτρέποντας την εφαρμογή μικροβίων στην επιφάνεια για μελέτη της αλληλεπίδρασης με τον άθικτο φραγμό ή στο μέσο καλλιέργειας για τη διείσδυση του φραγμού. Είναι δυνατή η χρήση κυττάρων από ασθενείς, όπως κερατινοκύτταρα από άτομα με ατοπική δερματίτιδα ή ψωρίαση, για την εστίαση σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων και την ενσωμάτωση ανοσοκυττάρων. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κύτταρα με συγκεκριμένες γονιδιακές μεταλλάξεις ή γονιδιακό knockdown, καθώς και κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο ενδιαφέροντος. Τυποποιημένα μοντέλα ανθρώπινου δέρματος είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, διευκολύνοντας την έρευνα και την εφαρμογή αυτών των μεθόδων [87].

Παρόλο που ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών που χρησιμοποιούν τρισδιάστατα μοντέλα ανθρώπινου δέρματος για να εξερευνήσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ δέρματος και μικροχλωρίδας είναι ακόμα περιορισμένος, οι υπάρχουσες έρευνες καταδεικνύουν την τεράστια δυναμική αυτών των μοντέλων στη μελέτη λειτουργικών μικροβίων. Η δυνατότητα δημιουργίας τρισδιάστατων μοντέλων δέρματος με κύτταρα προερχόμενα από ασθενείς και η χρήση κυττάρων με σίγαση ή ενισχυμένη έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων μπορεί να προσφέρει πολύτιμες μεθόδους για την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης της μικροχλωρίδας στη βιολογία του δέρματος. Επιπλέον, η χρήση τρισδιάστατων μοντέλων δέρματος για την αξιολόγηση της επίδρασης των τοπικών θεραπειών που βασίζονται στο RNAi έχει ήδη αποδειχθεί επιτυχής [87,138].

Είναι εμφανές ότι οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες έρευνες που χρησιμοποίησαν τρισδιάστατα μοντέλα για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-μικροχλωρίδας έχουν επικεντρωθεί στην επίδραση μεμονωμένων ειδών μικροχλωρίδας. Συνεπώς, υπάρχει μια σαφής ανάγκη για την ανάπτυξη και τη βελτίωση πειραματικών στρατηγικών για τον αποικισμό τρισδιάστατων μοντέλων δέρματος με πλήρεις κοινότητες μικροβίων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που απομονώνονται απευθείας από μεμονωμένους ανθρώπους, για να μιμούνται

καλύτερα την *in vivo* αλληλεπίδραση δέρματος και μικροχλωρίδας. Αυτό μπορεί να συμβάλει στην καθιέρωση τρισδιάστατων μοντέλων δέρματος ως εναλλακτική λύση στα ζωικά μοντέλα σε μελλοντικές έρευνες για τα δερματικά μικρόβια [87,128].

4. Οργανοειδή (Organoids)

Η συνεχής και γρήγορη πρόοδος στη βιολογία των βλαστοκυττάρων μπορεί να προσφέρει νέες γνώσεις για τη βασική βιολογία των ανθρώπινων ασθενειών, οδηγώντας σε καινοτομίες στη διάγνωση και τη θεραπεία μιας ευρείας ποικιλίας καταστάσεων. Τα ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hPSCs), όπως τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (hESCs) και τα ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hiPSCs), έχουν γίνει πολύτιμα εργαλεία για τη μοντελοποίηση ανθρώπινων ασθενειών, συμπληρώνοντας τα παραδοσιακά ζωικά μοντέλα έρευνας [139–142]. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, τα hPSC μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιονδήποτε τύπο κυττάρου ή ιστού του ανθρώπινου σώματος. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία τρισδιάστατων (3D) μοντέλων *in vitro*, όπως οργανοειδή, τα οποία περιέχουν διάφορους τύπους κυττάρων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μοντελοποίηση της οργανογένεσης και των αναπτυξιακών διαταραχών [139,143,144]. Τα δερματικά οργανοειδή προέρχονται από hPSC και μπορούν να αυτοσυναρμολογηθούν για να σχηματίσουν μια οργανωμένη δομή που μοιάζει με δέρμα, αποτελούμενη από προγονικά κύτταρα δέρματος και τριχοθυλάκια που θυμίζουν το εμβρυϊκό δέρμα [139,145–147].

Τα βλαστοκύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή κυττάρων για την κατασκευή των οργανοειδών [139,148]. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι βλαστοκυττάρων. Ο ένας είναι τα ενήλικα βλαστοκύτταρα (ASCs), τα οποία βρίσκονται σε κάθε όργανο και είναι εξειδικευμένα για αυτό. Συνήθως εντοπίζονται σε «κόγχες» που παρέχουν ειδικά μικροπεριβάλλοντα για τη συντήρηση και τη λειτουργία τους [139,149]. Το δέρμα περιέχει διάφορα ASCs, όπως επιδερμικά, τριχοθυλακίων, δερματικά μεσεγχυματικά (MSCs), μελανοκυττάρων, ενδοθηλιακά και αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, μεταξύ άλλων [139,150]. Αυτά τα ASCs μπορούν να αντικαταστήσουν ιστό που χάνεται λόγω καθημερινής φθοράς, τραύματος ή ασθένειας. Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί σε οργανοειδή του δέρματος που προέρχονται από ASCs, όπως αυτά που σχετίζονται με την επιδερμίδα, τους ιδρωτοποιούς αδένες και τους θύλακες των τριχών [151–153]. Ο άλλος τύπος είναι τα PSC, που περιλαμβάνουν τα ESC και τα iPSC [141,154]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα iPSC μπορούν να ελεγχθούν και να βελτιστοποιηθούν για να δημιουργούν εμβρυοειδή σώματα και στη συνέχεια να διαφοροποιούνται σε

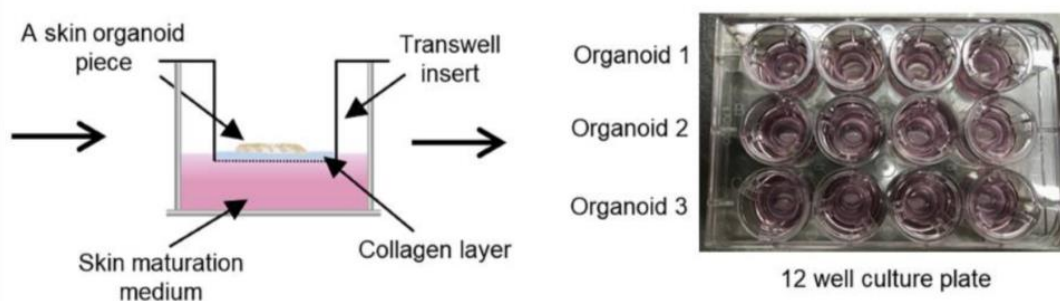
ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα υπό συγκεκριμένες συνθήκες στο αρχικό στάδιο [155]. Ωστόσο, η προέλευση των iPSC από την έκτοπη έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας του πυρήνα εγείρει ανησυχίες για την ογκογένεση [156]. Τα μονοπύρηνα κύτταρα αίματος ομφάλιου λώρου (CBMCs) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως πηγή κυττάρων αντικατάστασης και τα iPSC που προέρχονται από CBMC έχουν διαφοροποιηθεί σε κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες, καθώς και σε τρισδιάστατα οργανοειδή δέρματος. Τα κερατινοκύτταρα και οι ινοβλάστες που προέρχονται από αυτά παρουσιάζουν χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των αρχικών κυτταρικών σειρών [145].

Τα περισσότερα οργανοειδή που έχουν αναπτυχθεί για το δέρμα προς το παρόν παράγουν διάφορα εξαρτήματα του δέρματος, ειδικότερα τριχοθυλάκια. Ωστόσο, έχουν γίνει και προσπάθειες προσομοίωσης της ανθρώπινης μικροχλωρίδας χρησιμοποιώντας οργανοτυπικά μοντέλα δέρματος. Η δημιουργία ενός μοντέλου οργανοειδών για την προσομοίωση του δέρματος περιλαμβάνει αρκετά βήματα. Αρχικά, συλλέγονται και απομονώνονται δερματικά κύτταρα από βιοψίες ή προμηθευτές βιολογικών υλικών [155]. Στη συνέχεια, τα κερατινοκύτταρα καλλιεργούνται σε ένα στρώμα από ινοβλάστες τοποθετημένους σε υποστηρικτικό υλικό, όπως κολλαγόνο, για τη δημιουργία της δομής της επιδερμίδας [157]. Για την ενσωμάτωση της μικροχλωρίδας, επιλέγονται και καλλιεργούνται αντιπροσωπευτικοί μικροοργανισμοί που βρίσκονται φυσιολογικά στο ανθρώπινο δέρμα, όπως το *Staphylococcus epidermidis* και το *Cutibacterium acnes* [158]. Οι μικροοργανισμοί αυτοί τοποθετούνται στην επιφάνεια του τρισδιάστατου μοντέλου δέρματος και καλλιεργούνται σε ελεγχόμενες συνθήκες που προσομοιώνουν το φυσικό περιβάλλον του δέρματος [159]. Τέλος, το μοντέλο δέρματος χαρακτηρίζεται μέσω μικροσκοπίας και γενετικής ανάλυσης για την επιβεβαίωση της μορφολογίας και της βιολογικής δραστηριότητας, επιτρέποντας τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μικροχλωρίδας και ξενιστή, καθώς και τη δοκιμή νέων θεραπευτικών και καλλυντικών προϊόντων [160].

Μια γνωστή μελέτη αποτελεί αυτή των Song-yi et al. που παρουσίασαν ένα οργανοειδές μοντέλο ανθρώπινου δέρματος το οποίο μελετούσε το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt υπο συνθήκες ατοπικής δερματίτιδας. Συγκεκριμένα για τη δημιουργία οργανοειδών ανθρώπινου δέρματος από iPSC, χρησιμοποιήθηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο. Τα iPSC αποσπάστηκαν και διαχωρίστηκαν σε μεμονωμένα κύτταρα, ενώ τα βιώσιμα κύτταρα μετρήθηκαν με αιμοκυτταρόμετρο

και χρώση μπλε τρυπανίου. Για τον σχηματισμό εμβρυϊκών σωμάτων (EB), περίπου 1×10^3 hiPSC τοποθετήθηκαν σε φρεατία 96 φρεατίων U-bottom και καλλιεργήθηκαν με συγκεκριμένα μέσα και πρόσθετα καλλιέργειας, όπως Y-27632, Matrigel, SB431542, FGF, BMP4, LDN 193189 και CHIR99021. Στη συνέχεια, 11-12 ημέρες μετά τα οργανοειδή δέρματος ωρίμασαν σε πλάκες χαμηλής προσκόλλησης 6 φρεατίων και αναδευτήρα (Εικόνα 3). Τα οργανοειδή εκτέθηκαν σε διεπαφή αέρα-υγρού (ALI) για 3-4 εβδομάδες και επιδερμική ωρίμανση προκλήθηκε σε ξηρές συνθήκες. Για τη συν-καλλιέργεια με βακτήρια, τα οργανοειδή δέρματος ALI εμβολιάστηκαν με *S. aureus* και *C. acnes* σε διάφορες συγκεντρώσεις και καλλιεργήθηκαν σε ξηρές συνθήκες για έως 48 ώρες.

Συμπερασματικά, αυτό το μοντέλο είναι ένα παθολογικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για να προσομοιώσει την ασθένεια της ατοπικής δερματίτιδας και τον ρόλο των βακτηρίων που χρησιμοποιούνται, καθώς πιθανόν θα αποτελέσει οδός για την ανάπτυξη θεραπευτικών παραγόντων της ασθένειας στο μέλλον [161].



Εικόνα 3: Δημιουργία οργανοειδών. Σχηματική επισκόπηση καλλιέργειας. Παρατηρούνται τα στρώματα που υπάρχουν στο πηγαδάκι μετά την μεταφορά σε 6 πηγαδάκια με κάτω κάτω να υπάρχει το μέσο ωρίμανσης για το δέρμα το οποίο αλλάζει περίπου κάθε 2-3 μέρες, πάνω από αυτό να έχουμε την στοιβάδα του κολλαγόνου και τέλος το κομμάτι οργανοειδούς που χρησιμοποιείται στην μελέτη μας [161].

Μια δεύτερη μελέτη, επίσης, με παθολογικό χαρακτήρα είναι αυτή των Martina et al. στην οποία γίνεται λειτουργική και πρωτεομική ανάλυση ενός οργανοειδούς μοντέλου δέρματος πλήρους πάχους με έλλειψη φιλαγκρίνης που συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με το έκζεμα. Για τη δημιουργία οργανοειδών δέρματος χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες, απομονωμένα από πλεονάζοντα χειρουργικά δείγματα δέρματος τεσσάρων ενήλικων γυναικών (29-65 ετών). Τα κερατινοκύτταρα συν-καλλιεργήθηκαν με αδρανοποιημένα κύτταρα 3T3

σε ειδικό μέσο (RM), ενώ οι ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε DMEM με 10% FCS. Παρασκευάστηκαν δερματικά ισοδύναμα γέλης ινώδους με ινωδογόνο και θρομβίνη, τα οποία περιείχαν 200.000 ινοβλάστες. Τα ισοδύναμα καλύφθηκαν με RM και καλλιεργήθηκαν. Στη συνέχεια, προστέθηκαν αιωρούμενα κερατινοκύτταρα και το μέσο ανανεωνόταν καθημερινά. Την 5η ημέρα, τα ισοδύναμα ανυψώθηκαν στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού και καλλιεργήθηκαν για μέχρι 12 ημέρες, με ανάλυση να πραγματοποιείται τις ημέρες 3, 5 και 7 μετά την ανύψωση [162].

Τα οργανοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μικροβιώματος και του ξενιστή, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες [163]. Είναι επίσης κρίσιμα εργαλεία για την ανάπτυξη νέων θεραπειών, καθώς επιτρέπουν τη δοκιμή φαρμάκων και θεραπειών με μεγαλύτερη ακρίβεια και αξιοπιστία σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους [160]. Επιπλέον, τα οργανοειδή χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων, μειώνοντας την ανάγκη για δοκιμές σε ζώα. Στη μελέτη παθογόνων λοιμώξεων, τα οργανοειδή επιτρέπουν την προσομοίωση και την κατανόηση των μηχανισμών της λοίμωξης [164]. Στην εξατομικευμένη ιατρική, τα οργανοειδή μπορούν να δημιουργηθούν από κύτταρα ενός συγκεκριμένου ασθενούς, επιτρέποντας την ανάπτυξη προσαρμοσμένων θεραπειών [165]. Η ανάλυση της ανάπτυξης αντοχής στα αντιβιοτικά είναι μια άλλη σημαντική εφαρμογή, καθώς τα οργανοειδή βοηθούν στην κατανόηση των μηχανισμών αντοχής [166]. Στην έρευνα για τη μικροβιακή οικολογία, τα οργανοειδή επιτρέπουν τη μελέτη της σύνθεσης και της δυναμικής της μικροχλωρίδας σε διάφορες συνθήκες. Τέλος, τα οργανοειδή είναι χρήσιμα για τη μελέτη φλεγμονωδών παθήσεων, όπως η ατοπική δερματίτιδα και οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, βοηθώντας στην κατανόηση των μηχανισμών αυτών των παθήσεων και στην ανάπτυξη νέων θεραπειών [167].

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα των οργανοειδών στη μελέτη του μικροβιώματος, υπάρχουν και αρκετά μειονεκτήματα που περιορίζουν τη χρήση τους. Ένα από τα κύρια προβλήματα είναι η αδυναμία αναπαράστασης της πλήρους πολυπλοκότητας του ανθρώπινου μικροβιώματος, καθώς τα οργανοειδή συχνά φιλοξενούν μόνο περιορισμένο αριθμό μικροοργανισμών [168]. Επιπλέον, η καλλιέργεια οργανοειδών μπορεί να είναι τεχνικά απαιτητική και χρονοβόρα, απαιτώντας εξειδικευμένο εξοπλισμό και πρωτόκολλα [169]. Επίσης, τα οργανοειδή μπορεί να μην καταφέρνουν να προσομοιώσουν πλήρως το μικροπεριβάλλον των

ιστών, όπως η αλληλεπίδραση με το ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο παίζει κρίσιμο ρόλο στην υγεία και τις ασθένειες που συσχετίζονται με το μικροβίωμα. Τέλος, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων οργανοειδών, η οποία μπορεί να επηρεάσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων [170]. Παρά τα μειονεκτήματα αυτά, τα οργανοειδή παραμένουν ένα ισχυρό εργαλείο στη μελέτη του μικροβιώματος, αλλά απαιτείται συνεχής βελτίωση και προσαρμογή των μεθόδων για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα.

5. Μοντελοποίηση ενός ιστού ή οργάνου σε τσιπ (Organ on-a-chip (OoC))

Οι περιορισμοί των παραδοσιακών δισδιάστατων καλλιεργειών και των τρισδιάστατων μοντέλων οργάνων έχουν οδηγήσει στη χρήση τεχνολογιών όπως η μικροκατασκευή για βιολογικούς σκοπούς. Αυτή η προσέγγιση έχει οδηγήσει την τελευταία δεκαετία στην ανάπτυξη των λεγόμενων organs-on-chips. Αυτές οι μικρορευστικές συσκευές διαθέτουν θαλάμους μικροσκοπικών διαστάσεων που επιτρέπουν τη δυναμική καλλιέργεια κυττάρων, με σκοπό τη μοντελοποίηση ή την προσομοίωση της φυσιολογίας ενός ιστού ή οργάνου [171,172].

Ένα από τα σημαντικά παραδείγματα αυτής της της τεχνολογίας είναι το «Skin-on-a-chip» (SOC) το οποίο αφορά την καλλιέργεια ιστών δέρματος μέσα σε ένα μικρορευστοσύστημα, το οποίο μπορεί να ελέγχει πολλές φυσικές και βιοχημικές παραμέτρους, όπως τη μέση ροή, τη μηχανική δύναμη και τις διαβαθμίσεις των βιοχημικών, προσομοιώνοντας τα τρισδιάστατα μικροπεριβάλλοντα του φυσικού ανθρώπινου δέρματος. Αυτά τα μοντέλα έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν λειτουργικούς ιστούς δέρματος με ελεγχόμενη τρισδιάστατη οργάνωση των στρωμάτων και των στοιχείων του δέρματος [173]. Υπάρχουν δύο κατηγορίες για τις συσκευές ανάλογα με τον τρόπο δημιουργίας του δέρματος στο τσιπ. Οι προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί για το σχεδιασμό μικρορευστοποιημένων τσιπ για μοντελοποίηση δέρματος: η πρώτη είναι η άμεση εισαγωγή ενός δερματικού θραύσματος από βιοψία ή HSE στο τσιπ (μεταφερόμενο δέρμα σε τσιπ), και η δεύτερη επικεντρώνεται στη δημιουργία του ιστού απευθείας στο τσιπ (in situ skin-on-a-chip).

Μεταφερόμενο δέρμα σε τσιπ

Οι πιο συνηθισμένες προσεγγίσεις για την ανάπτυξη μοντέλων skin-on-a-chip περιλαμβάνουν την άμεση εισαγωγή του ιστού στη συσκευή. Αυτά τα τμήματα ιστού προέρχονται είτε από βιοψίες δέρματος από δότη είτε από *in vitro* καλλιεργημένα ισοδύναμα ανθρώπινου δέρματος (HSE). Και τα εργαστηριακά και τα εμπορικά διαθέσιμα HSE έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία μικρορευστοποιησίων τσιπ δέρματος. Παρόλο που υπάρχουν επιδερμικά και δερμο-επιδερμικά μοντέλα, τα μοντέλα με δερματικό διαμέρισμα χρησιμοποιούνται

πιο συχνά, επειδή προσφέρουν μια πιο ρεαλιστική αναπαράσταση της δομής του δέρματος. Αυτά τα καλά διαμορφωμένα τμήματα ιστού επιτρέπουν τη μελέτη διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν τη διατήρηση των ισοδύναμων δέρματος και τη χρήση τους για κλινικές και δοκιμαστικές εφαρμογές, όπως η διάχυση μορίων, η διασύνδεση πολλαπλών οργάνων, η ευαισθησία στα φάρμακα και η τοξικότητα [172].

Παράδειγμα τέτοιων δοκιμασιών αποτελεί η μελέτη των Kim et al. όπου για την παρατήρηση των αντιδράσεων των ουδετερόφιλων στην παρουσία βακτηρίων στο δέρμα, σχεδίασαν μια συσκευή μεταφοράς δέρματος σε τσιπ με ιστό και δύο κανάλια χωρισμένα από φίλτρο ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ένα ανθρώπινο δείγμα δέρματος από βιοψία, το οποίο είχε προηγουμένως εκτεθεί σε βακτήρια, τοποθετήθηκε σε ένα κανάλι και εκτέθηκε σε δείγματα αίματος που φορτώθηκαν στο άλλο [174]. Κάποιες ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιούν HSE αντί για ανθρώπινες βιοψίες για την κατασκευή αυτών των τσιπ. Για παράδειγμα, το 2016, οι Abaci et al. δημιούργησαν ένα τσιπ με φρεάτιο όπου τοποθετήθηκε το HSE για δοκιμές βιωσιμότητας και συντήρησης, και ένα κανάλι στο κάτω μέρος για τη ροή του μέσου καλλιέργειας. Το HSE καλλιεργήθηκε πάνω από πορώδη μεμβράνη για να επιτραπεί η διάχυση θρεπτικών συστατικών από το κανάλι. Αυτή η ομάδα μελέτησε τη διαδερμική μεταφορά ουσιών και τη δυνατότητα χρήσης της συσκευής για δοκιμές φαρμάκων [175]. Σε άλλες περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα ισοδύναμα δέρματος, όπως το EpiDerm™, για τη δημιουργία τέτοιων τσιπ [176].

In situ συσκευή δέρματος σε τσιπ (in situ skin on a chip)

Η δεύτερη προσέγγιση για τη δημιουργία μοντέλων skin-on-a-chip εστιάζει στην κατασκευή του δέρματος απευθείας πάνω στο τσιπ. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες in situ συσκευών δέρματος. Η πρώτη είναι παρόμοια με τα προηγούμενα συστήματα, βασισμένα σε τεχνητά αγγειωμένο χόριο, όπου το δέρμα κατασκευάζεται χειροκίνητα μέσα σε μια ανοιχτή δομή στη συσκευή. Η βασική διαφορά είναι στον τρόπο παροχής του μέσου καλλιέργειας, όπου στην πρώτη περίπτωση γίνεται μέσω κοίλων καναλιών που διέρχονται από το δερματικό διαμέρισμα, ενώ στις in situ συσκευές η κυκλοφορία των υγρών πραγματοποιείται μέσω μικρορευστικού καναλιού κάτω από το ιστό [172].

Οι Lee et al. ανέπτυξαν ένα skin-on-a-chip σύστημα βασισμένο σε πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS), όπου το δέρμα κατασκευάστηκε απευθείας σε μια τρύπα μέσα στη συσκευή. Το δερματικό διαμέρισμα σχηματίστηκε με ένα πήκτωμα κολλαγόνου που περιείχε ινοβλάστες και τοποθετήθηκε πάνω από μια πορώδη μεμβράνη. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν κερατινοκύτταρα πάνω από το τζελ και διαφοροποιήθηκαν για να δημιουργηθεί ώριμο δέρμα [177]. Οι Song et al. χρησιμοποίησαν το τσιπ για να μελετήσουν την επίδραση διαφορετικών πηγών κολλαγόνου στη διαφοροποίηση των κυττάρων και την ωρίμανση του δέρματος, διαπιστώνοντας ότι το κολλαγόνο από ουρά αρουραίου είχε καλύτερα αποτελέσματα από το κολλαγόνο χοίρου ή πάπιας [178].

Η συσκευή skin-on-a-chip χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για διάφορες δοκιμές φαρμάκων. Οι Jeon et al. μελέτησαν τις δερματολογικές παρενέργειες του sorafenib, ενός φαρμάκου για την αντιμετώπιση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο μοντέλο [179]. Επίσης, οι Kim et al. μελέτησαν την επίδραση ενός εκχυλίσματος από φύλλα *Curcuma longa* στον σχηματισμό και τη διαφοροποίηση του δέρματος, διαπιστώνοντας αντιγηραντικά αποτελέσματα [180].

Με παρόμοιο τρόπο, οι Lim et al. σχεδίασαν μια συσκευή για να συγκρατεί το ισοδύναμο δέρματος και να εφαρμόζει μηχανικά ερεθίσματα στον ιστό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτό το μηχανικό ερέθισμα δημιούργησε ρυτίδες στην επιφάνεια του ισοδύναμου, υποδεικνύοντας τη γήρανση του δέρματος [181].

Η δεύτερη προσέγγιση *in situ* και ο ιδανικός στόχος για skin-on-chips είναι η μοντελοποίηση του οργάνου απευθείας μέσα στη συσκευή, χρησιμοποιώντας τα κανάλια όχι μόνο ως μέσα παροχής θρεπτικών ουσιών αλλά και ως διαμερίσματα για τη συγκράτηση του ιστού. Μια πρώτη προσέγγιση περιλάμβανε την καλλιέργεια κερατινοκυττάρων σε μικρορευστομηχανικές συσκευές με σπορά αυτών των κυττάρων σε γυάλινες πλάκες καλυμμένες με κολλαγόνο. Η εφαρμογή μικροροής επέτρεψε μεγαλύτερες καλλιέργειες και διατήρησε τη βιωσιμότητα των κερατινοκυττάρων σε σύγκριση με μια παραδοσιακή στατική καλλιέργεια, αν και ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν μειωμένος. Αυτή η συσκευή δεν μπορεί να θεωρηθεί ως skin-on-a-chip, αλλά θέτει τη βάση για μελλοντικές μικρορευστομηχανικές συσκευές δέρματος [172].

Η χρήση των καναλιών ως διαμερίσματα για την καλλιέργεια του ιστού παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, κυρίως λόγω της πολυπλοκότητας της αναδημιουργίας της τρισδιάστατης δομής του δέρματος. Κάποιοι ερευνητές έλυσαν το πρόβλημα όπως οι Sriram et al. σχεδιάζοντας μια συσκευή που αποτελείται από δύο κανάλια χωρισμένα από μια πορώδη μεμβράνη και μια δομή που μοιάζει με πηγάδι [182]. Επίσης, οι Sasaki et al. ανέπτυξαν ένα μικρορρευστικό τσιπ χωρίς φωτολιθογραφία βασισμένο σε PDMS που επιτρέπει παράλληλα πειράματα. Χρησιμοποίησαν αυτή τη συσκευή για δοκιμές βιωσιμότητας και διαπερατότητας κυττάρων χρησιμοποιώντας μονοστοιβάδες κερατινοκυττάρων, ερευνώντας την επίδραση ενός αλλεργιογόνου στη διαπερατότητα της μονοστοιβάδας [183].

Προκειμένου να μετρηθεί η λειτουργία φραγμού μιας μονοστοιβάδας κερατινοκυττάρων, ο Ramadan και ο Ting σχεδίασαν μια μικρορρευστομηχανική συσκευή με δύο κανάλια χωρισμένα από μια πορώδη μεμβράνη. Τοποθετήθηκαν κερατινοκύτταρα στο ανώτερο κανάλι για να σχηματίσουν μια μονοστοιβάδα στην πορώδη μεμβράνη, ενώ στο κάτω κανάλι εισήχθη μια κυτταρική γραμμή λευχαιμικού λεμφώματος. Μόλις τα κερατινοκύτταρα έφτασαν στη συρροή, εφάρμοσαν λιποπολυσακχαρίτες και θειικό νικέλιο για τη διέγερση των κυττάρων και τη μέτρηση της παραγωγής κυτοκινών, δείχνοντας ισχυρή λειτουργία φραγμού [184].

Η πρώτη συσκευή που προσομοίασε την πραγματική αρχιτεκτονική του δέρματος χρησιμοποιώντας τα κανάλια για τον περιορισμό του ιστού αναπτύχθηκε από τους Wufuer et al. Η συσκευή αυτή περιλάμβανε τρία κανάλια που προσομοιώνουν το χόριο, την επιδερμίδα και ένα αιμοφόρο αγγείο. Χρησιμοποιώντας πορώδεις μεμβράνες, σπάρθηκαν κερατινοκύτταρα και HUVECs, προσομοιώνοντας την επιδερμίδα και το ενδοθήλιο. Η συσκευή χρησιμοποιήθηκε για τη μοντελοποίηση φλεγμονής και τη μελέτη της προστατευτικής δράσης της δεξαμεθαζόνης [185].

Τέλος, ένα πρόσφατο έργο των Risueño et al. παρουσίασε μια συσκευή skin-on-a-chip βασισμένη σε αυτοκόλλητο βινύλιο αντί για PDMS. Η συσκευή αναπαράγει ένα απλοποιημένο δερμο-επιδερμικό κατασκεύασμα μέσα στα μικρορρευστικά κανάλια, χρησιμοποιώντας τζελ ινώδους ως δερματικό διαμέρισμα 3D και ένα αδιαφοροποίητο στρώμα κερατινοκυττάρων. Αν και το έργο είναι

προκαταρκτικό, αποτελεί το πρώτο skin-on-a-chip που δημιουργεί μια τρισδιάστατη δομή απευθείας μέσα στα κανάλια της συσκευής [186].

Οι μελέτες που αναφέραμε και εστιάζουν στην προσομοίωση του δερματικού μικροβιώματος χρησιμοποιώντας τεχνολογία organ-on-a-chip είναι ακόμη σχετικά νέες, αλλά ιδιαίτερα πρωτοποριακές. Αυτές οι μελέτες επιχειρούν να αναπαραστήσουν το μικροπεριβάλλον του δέρματος, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και των μικροβιακών κοινοτήτων, για να κατανοήσουν καλύτερα τη δυναμική μεταξύ του δέρματος και των μικροοργανισμών. Συνοπτικά τα βήματα για την προσομοίωση της χλωρίδας του δέρματος σε μια συσκευή organ-on-chip είναι μια περίπλοκη διαδικασία ξεκινάει από τον σχεδιασμό της συσκευής μέχρι τη δοκιμή φαρμάκων και τη συνεχή βελτιστοποίηση. Αρχικά, η επιλογή των υλικών για την κατασκευή της συσκευής είναι κρίσιμη, με υλικά όπως η πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (PDMS) και το πολυμεθακρυλικό μεθυλεστέρα (PMMA) να είναι βιοσυμβατά και να επιτρέπουν τη διατήρηση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών [171]. Στη συνέχεια, η μοντελοποίηση του δέρματος απαιτεί την καλλιέργεια ανθρώπινων κερατινοκυττάρων και ινοβλαστών για την αναδημιουργία της επιδερμίδας και του χορίου αντίστοιχα. Αυτές οι κυτταρικές καλλιέργειες επιτρέπουν τη δημιουργία στρωμάτων και την ωρίμανση των κυττάρων [185]. Για την εισαγωγή των μικροοργανισμών, επιλέγονται συνήθως βακτήρια που αποτελούν την κανονική χλωρίδα του δέρματος, όπως τα *Staphylococcus epidermidis* και *Propionibacterium acnes* [56]. Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών στη συσκευή απαιτεί την ανάπτυξη συνθηκών που επιτρέπουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους όπως είναι η θερμοκρασία, η υγρασία και τα θρεπτικά συστατικά [187]. Μετά από αυτό, η παρακολούθηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δερματικών κυττάρων και των μικροοργανισμών είναι απαραίτητη για την κατανόηση της έκφρασης γονιδίων, της παραγωγής πρωτεϊνών και της ανοσολογικής απόκρισης [188]. Η εφαρμογή της συσκευής για τη δοκιμή φαρμάκων και θεραπειών είναι ένα επόμενο σημαντικό βήμα, καθώς επιτρέπει την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους [189].

Τα συστήματα organ-on-a-chip, παρά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματά τους, παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα όσον αφορά την προσομοίωση του δερματικού μικροβιώματος. Ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι η πολυπλοκότητα της

αναπαραγωγής της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής του δέρματος και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δερματικών κυττάρων και των μικροοργανισμών. Πολλές από τις συσκευές βασίζονται σε κυτταρικές μονοστοιβάδες, οι οποίες δεν αντικατοπτρίζουν πλήρως την πολυεπίπεδη δομή του φυσικού δέρματος και τη σύνθετη μικροβιακή κοινότητα που φιλοξενεί [183]. Επιπλέον, η μικρορευστοποιημένη τεχνολογία απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και τεχνογνωσία, κάτι που μπορεί να περιορίσει την ευρεία εφαρμογή της σε τυπικά εργαστήρια [172]. Τέλος, η τρέχουσα τεχνολογία δεν επιτρέπει την προσομοίωση όλων των περιβαλλοντικών συνθηκών και παραγόντων που επηρεάζουν το δερματικό μικροβίωμα, όπως η υγρασία, η θερμοκρασία και η έκθεση σε διάφορους χημικούς παράγοντες.

Οι μελλοντικές κατευθύνσεις για τα συστήματα organ-on-a-chip στο πεδίο του δερματικού μικροβιώματος περιλαμβάνουν την ανάπτυξη πιο σύνθετων και αντιπροσωπευτικών μοντέλων που μπορούν να προσομοιώσουν καλύτερα τη φυσιολογία του ανθρώπινου δέρματος και τη δυναμική του μικροβιώματος. Ένα σημαντικό βήμα είναι η ενσωμάτωση πολυκυτταρικών στρωμάτων και αγγείων για την αναπαραγωγή της πλήρους τρισδιάστατης δομής του δέρματος και των αλληλεπιδράσεων του με μικροοργανισμούς [172]. Τέλος, η χρήση αυτών των μοντέλων για την ανάπτυξη και δοκιμή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων και καλλυντικών προϊόντων που στοχεύουν στο μικροβίωμα του δέρματος, ανοίγει νέες προοπτικές στην ιατρική και τη βιομηχανία καλλυντικών [183].

6. Βιοεκτύπωση (Bioprinting)

Την τελευταία δεκαετία, η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση έχει κερδίσει σημαντική παγκόσμια προσοχή από επιστήμονες που ασχολούνται με βιολογικές, ιατρικές και φαρμακευτικές μελέτες. Είναι σημαντικό να διακρίνουμε την τρισδιάστατη εκτύπωση από την τρισδιάστατη βιοεκτύπωση.

Στην τρισδιάστατη εκτύπωση, δημιουργούνται στρώματα υλικών (πλαστικά, μέταλλα, πολυμερικές ρητίνες, καουτσούκ) για να σχηματίσουν μια τρισδιάστατη δομή. Αυτή η τεχνολογία χρησιμοποιείται για την κατασκευή αντικειμένων σε σχήμα 3D και έχει εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως η ιατρική, η οδοντιατρική, η μηχανική, η αρχιτεκτονική, η γεωργία, η αεροδιαστημική και ο σχεδιασμός προϊόντων [190,191]. Στον ιατρικό τομέα, χρησιμοποιείται για την παραγωγή ανατομικών μοντέλων, εμφυτευμάτων, προσθετικών, θεραπευτικών συσκευών, χειρουργικών εργαλείων και τρισδιάστατων πλαστικών μοντέλων που βοηθούν τους χειρουργούς στις επεμβάσεις [192,193]. Στην ακτινολογία, μπορούν να σχεδιαστούν τρισδιάστατα φυσικά μοντέλα για τον ασθενή από ιατρικές εικόνες, βοηθώντας στην επίλυση και ανάλυση χειρουργικών προβλημάτων [194].

Η βιοεκτύπωση, από την άλλη πλευρά, είναι μια καινοτόμος τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία τρισδιάστατων πολύπλοκων δομών χρησιμοποιώντας κύτταρα, βιοϋλικά και βιολογικά μόρια [195,196]. Με απλά λόγια, η βιοεκτύπωση λειτουργεί παρόμοια με την τυπική τρισδιάστατη εκτύπωση, αλλά το συμβατικό μελάνι αντικαθίσταται από βιομελάνι που περιλαμβάνει κύτταρα και βιοϋλικά απαραίτητα για το σχηματισμό κατασκευών ιστού με υψηλό βαθμό επαναληψιμότητας, ευελιξίας και ακρίβειας [197,198]. Λόγω των βιοεκτυπωτών που λειτουργούν με υπολογιστή, τα κύτταρα και τα βιοϋλικά μπορούν να εναποτεθούν με ακρίβεια για να επιτευχθούν οι προκαθορισμένες δομές.

Η βιοεκτύπωση περιλαμβάνει σύντομα τρία στάδια. Αρχικά, συλλέγονται ακριβείς πληροφορίες σχετικά με ιστούς ή όργανα για την επιλογή των κατάλληλων υλικών και τον καθορισμό μοντέλων. Στην συνέχεια οι πληροφορίες μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα που ελέγχουν τον εκτυπωτή για την κατασκευή των ιστών και στο τελευταίο στάδιο αναπτύσσεται μια σταθερή δομή [199–201]. Η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση ανήκει στην τεχνολογία της προσθετικής κατασκευής και έχει ευρύ

φάσμα εφαρμογών, όπως η μηχανική ιστών, οι μεταμοσχεύσεις, ο έλεγχος φαρμάκων, η έρευνα για τον καρκίνο, η καρδιαγγειακή και αναγεννητική ιατρική και η οδοντιατρική [202].

Η τεχνολογία αυτή προσφέρει επίσης τη δυνατότητα κατασκευής δέρματος χρησιμοποιώντας επιλεγμένους τύπους κυττάρων. Μέχρι τώρα, δεν έχει τυπωθεί ισοδύναμο δέρματος που περιέχει όλα τα στοιχεία του δέρματος, αλλά η τεχνολογία βρίσκεται ακόμη σε στάδιο ανάπτυξης. Τα πρώτα βιοτυπωμένα κατασκευάσματα δέρματος δημιουργήθηκαν από τον Lee και τους συνεργάτες του το 2009, οι οποίοι πρόσθεσαν ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες σε μια υδρογέλη κολλαγόνου [203]. Την ίδια εποχή, οι Koch και συνεργάτες [204] εστίασαν στη βιοεκτύπωση ισοδύναμου δέρματος προσθέτοντας στο κολλαγόνο κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες. Το 2010, οι Binder και συνεργάτες χρησιμοποίησαν τρισδιάστατο εκτυπωτή inkjet για την παραγωγή υποκατάστατων δέρματος με ανθρώπινους ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα για την αποκατάσταση πληγών [205]. Οι τεχνολογίες εκτύπωσης που χρησιμοποιούνται στην τρισδιάστατη βιοεκτύπωση κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις κύριες ομάδες: εξώθηση υλικού (πνευματική, με έμβολο και βιδωτή), βιοεκτύπωση inkjet, βιοεκτύπωση με λέιζερ και στερεολιθογραφική βιοεκτύπωση.

Βιοεκτύπωση με εξώθηση

Η μικροεξώθηση, συνήθως χρησιμοποιούμενη στη μη βιολογική τρισδιάστατη εκτύπωση, αποτελεί τη βάση για τη βιοεκτύπωση με εξώθηση. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την ελεγχόμενη εναπόθεση και κατασκευή στρώμα προς στρώμα για την ακριβή τοποθέτηση του βιομελανιού. Η εξώθηση επιτυγχάνεται μέσω μηχανικής [206] ή πνευματικής [207] πίεσης που ωθεί το βιομελάνι μέσω ενός ακροφυσίου σε μια πλατφόρμα, η οποία μπορεί να μετακινηθεί κατά μήκος των αξόνων x, y και z.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της βιοεκτύπωσης με εξώθηση είναι η δυνατότητα χρήσης βιομελανιών υψηλής πυκνότητας και ιξώδους κυττάρων [208]. Αυτή η τεχνολογία είναι προσιτή και ευέλικτη, καθώς οι εμπορικοί τρισδιάστατοι εκτυπωτές μοντελοποίησης συντηγμένης εναπόθεσης μπορούν να τροποποιηθούν για βιοεκτύπωση [209].

Ωστόσο, υπάρχουν και μειονεκτήματα. Ένας βασικός περιορισμός είναι η χαμηλή ανάλυση κλώνου, μεγαλύτερη από 100 μm [210]. Αυτό μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για εφαρμογές που απαιτούν μεγαλύτερη ακρίβεια, όπου προτιμώνται τεχνικές με υψηλότερη ανάλυση [190].

Επιπλέον, η εξώθηση εκθέτει τα κύτταρα σε υψηλές δυνάμεις διάτμησης, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν μηχανική βλάβη. Για να αντιμετωπιστεί αυτό, έχουν σχεδιαστεί βιομελάνια με συμπεριφορά αραίωσης διάτμησης [211,212], όπου το ιξώδες της βιομελάνης μειώνεται όταν υποβάλλεται σε εφαρμοζόμενο ρυθμό διάτμησης. Αυτό μειώνει την απαιτούμενη πίεση για την εξώθηση της βιομελάνης και τις διατμητικές τάσεις που ασκούνται σε αυτήν [213]. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μπορεί να επηρεαστεί, καθώς η υψηλότερη διατμητική τάση μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ η ευελιξία της βιοεκτύπωσης με εξώθηση οδηγεί σε ευρύ φάσμα βιωσιμότητας κυττάρων (40-80%), που συνολικά είναι χαμηλότερη από άλλες τεχνικές εκτύπωσης [214].

Βιοεκτύπωση inkjet

Οι πρώτοι εκτυπωτές που χρησιμοποιήθηκαν για βιοεκτύπωση ήταν τροποποιημένες εκδόσεις εμπορικών εκτυπωτών 2D με βάση το inkjet [195], όπου το μελάνι αντικαταστάθηκε με βιολογικό υλικό και το χαρτί με υποστρώματα ή ικρίωματα [214]. Σήμερα, υπάρχουν ειδικοί βιοεκτυπωτές inkjet που είναι βελτιστοποιημένοι για υψηλότερη ανάλυση, ακρίβεια και ταχύτητα [215].

Οι βιοεκτυπωτές inkjet, γνωστοί και ως εκτυπωτές drop-on-demand, χρησιμοποιούν θερμικές ή ακουστικές δυνάμεις για την εκτόξευση σταγονιδίων βιομελανιού σε ένα υπόστρωμα [195]. Οι θερμικοί εκτυπωτές inkjet χρησιμοποιούν θερμαντήρες για τη δημιουργία φυσαλίδων που αυξάνουν την πίεση στην κεφαλή εκτύπωσης, εκτοξεύοντας τελικά τα σταγονίδια [216,217]. Παρά τις ανησυχίες για πιθανή καταστροφή των κυττάρων λόγω των υψηλών θερμοκρασιών, μελέτες έδειξαν ότι η θερμοκρασία στην κεφαλή εκτύπωσης αυξάνεται μόνο κατά 4-10°C για πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου 2 μικροδευτερόλεπτα), χωρίς να επηρεάζονται τα βιολογικά μόρια όπως το DNA [218,219]. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την εκτύπωση παραμένει περίπου στο 90% [220].

Ένα βασικό μειονέκτημα των θερμικών και πιεζοηλεκτρικών τεχνολογιών είναι η ευαισθησία τους σε απόφραξη των ακροφυσίων όταν χρησιμοποιούνται βιομελάνια υψηλού ιξώδους, καθώς η διάμετρος των ακροφυσίων μπορεί να είναι τόσο μικρή όσο 18 μm. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανομοιόμορφη κατανομή και εναπόθεση των σταγονιδίων [190]

Η βιοεκτύπωση inkjet παράγει σταγονίδια με διάμετρο μικρότερη από 50 μm και η ανάλυση της κατατάσσεται μεταξύ της λιγότερο ακριβούς βιοεκτύπωσης με εξώθηση και της πιο ακριβούς βιοεκτύπωσης με υποβοήθηση λέιζερ [220].

Βιοεκτύπωση Φωτοπολυμερισμού

Η στερεολιθογραφία (SLA), μια τεχνική κατασκευής πρόσθετων με φωτοπολυμερισμό, χρησιμοποιεί υπεριώδες ή ορατό φως για να στερεοποιήσει φωτοευαίσθητα πολυμερή. Στη βιοεκτύπωση, αυτή η μέθοδος προσαρμόζεται με τη χρήση φωτοευαίσθητων βιομελανιών. Ένα λέιζερ σκληραίνει επιλεκτικά μικρές ποσότητες βιομελανιού, σχηματίζοντας το ικρίωμα σε μια πλατφόρμα που απομακρύνεται σταδιακά από το λέιζερ, επιτρέποντας στη φρέσκια βιομελάνη να ρέει και να καλύπτει τη δομή. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να σχηματιστεί μια στερεά τρισδιάστατη δομή και η υπόλοιπη υγρή βιομελάνη ξεπλένεται [221,222].

Η τεχνική αυτή εξαλείφει τα προβλήματα διατμητικής τάσης που προκύπτουν από τις υψηλές πιέσεις σε τεχνικές με ακροφύσια όπως η εξώθηση και η βιοεκτύπωση inkjet [223]. Επιτρέπει τη γρήγορη και ακριβή κατασκευή, με αναλύσεις που κυμαίνονται από 5 μm [224] έως 300 μm [225]. Όσον αφορά την βιωσιμότητα των κυττάρων, η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει κατά μέσο όρο 85% βιωσιμότητα [223].

Βιοεκτύπωση με βοήθεια λέιζερ

Η βιοεκτύπωση με βοήθεια λέιζερ (LAB) ή εμπρόσθια μεταφορά που προκαλείται από λέιζερ (LIFT) [226,227] προοδεύει γρήγορα στη μικροβιολογία και βιοτεχνολογία [228]. Στην τεχνική αυτή, μια γυάλινη πλάκα επικαλύπτεται με ένα στρώμα μετάλλου ή οξειδίου που απορροφά την ακτινοβολία λέιζερ. Ένα στρώμα

κυττάρων αιωρούμενων σε βιομελάνι εφαρμόζεται από πάνω. Το λέιζερ θερμαίνει το στρώμα μετάλλου ή οξειδίου, δημιουργώντας μια φυσαλίδα ατμού που ωθεί ένα σταγονίδιο βιομελανιού στην επιφάνεια δέκτη [226].

Η μέθοδος LIFT επιτρέπει την ακριβή τοποθέτηση κυττάρων με υψηλή βιωσιμότητα [229,230], καθιστώντας δυνατή την κατασκευή σύνθετων ιστών και τεχνητών οργάνων [231]. Εφαρμόζεται επίσης στη μικροβιολογία για την απομόνωση νέων μικροοργανισμών και τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους [229]. Η LAB προσφέρει υψηλή ανάλυση σε μικρομέτρους [231] και δυνατότητα εκτύπωσης σε ευρύ φάσμα ιξώδους χωρίς κίνδυνο απόφραξης ακροφυσίων, καθώς είναι τεχνική χωρίς ακροφύσια [232]. Μπορεί να εκτυπώσει με υψηλή πυκνότητα βιομελανιών και ταχύτητες έως 1600 mm/s, καθιστώντας την την πιο ακριβή τεχνική βιοεκτύπωσης.

Ένας κίνδυνος της LIFT είναι η πιθανή μεταφορά επιβλαβών ουσιών από το απορροφητικό στρώμα [233–235], που μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση μη τοξικών υλικών [228]. Ωστόσο, η χρήση της LAB είναι πιο ακριβή σε σύγκριση με άλλες τεχνολογίες βιοεκτύπωσης [231].

Το σκεύασμα της βιομελάνης αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο, καθώς η σύνθεση και η δομή του επηρεάζουν τον φαινότυπο του αναπτυσσόμενου ιστού [195,236]. Οι μηχανικές και φυσικές ιδιότητες του βιομελανιού πρέπει να εξασφαλίζουν την εκτυπωσιμότητά του και να ταιριάζουν με τον μηχανικό ιστό. Ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης της βιομελάνης πρέπει να είναι συμβατός με την ικανότητα των κυττάρων να αναδιαμορφώνουν την εξωκυτταρική μήτρα (ECM), ενώ τα προϊόντα αποικοδόμησης δεν πρέπει να είναι τοξικά ή να προκαλούν ανοσολογική αντίδραση. Παρόλο που υπάρχει αυξανόμενος αριθμός βιοϋλικών που χρησιμοποιούνται στη βιοεκτύπωση, μόνο ένα μικρό υποσύνολο αυτών είναι κατάλληλο για τη βιοεκτύπωση δέρματος [202].

Τα τελευταία χρόνια, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα της βιοεκτύπωσης δέρματος [237,238]. Οι αρχικές μελέτες εστιάστηκαν στην εκτύπωση μόνο του χόριου [239,240], και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν και τα επόμενα δύο στρώματα (επιδερμίδα και χόριο) [241–243]. Τελικά, προχώρησαν σε τρεις

στρώσεις που περιλαμβάνουν την επιδερμίδα, το χόριο και την υποδερμίδα [244,245].

Για παράδειγμα, οι Pouchet et al. κατασκεύασαν έναν υποκαταστάτη δέρματος δύο στρωμάτων χρησιμοποιώντας ένα μείγμα βιομελάνης ζελατίνης και ινωδογόνου, με πάχος 5 χιλιοστών. Μετά από 26 ημέρες καλλιέργειας, το εκτυπωμένο δέρμα παρουσίασε ιστολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του φυσικού δέρματος [246].

Οι Cubo et al. ανέπτυξαν ένα ανθρώπινο δέρμα πλήρους πάχους χρησιμοποιώντας ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα ενσωματωμένα σε ανθρώπινο πλάσμα με ινωδογόνο. Τα αποτελέσματα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* έδειξαν ότι το βιοεκτυπωμένο ισοδύναμο δέρματος μοιάζει πολύ με το φυσικό ανθρώπινο δέρμα [247].

Οι Lee et al. κατασκεύασαν ένα δέρμα δύο στρωμάτων χρησιμοποιώντας κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες για την επιδερμίδα και το χόριο αντίστοιχα. Το κολλαγόνο χρησιμοποιήθηκε για να σχηματιστεί η δερματική μήτρα του δέρματος. Οι μελέτες έδειξαν ότι τα τρισδιάστατα εκτυπωμένα κατασκευάσματα δέρματος ήταν μορφολογικά και βιολογικά παρόμοια με το ανθρώπινο δέρμα [248].

Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι τα βιοϋλικά με βάση το κολλαγόνο έχουν κακή δυνατότητα εκτύπωσης και μεγάλο χρόνο διασταύρωσης. Για να αντιμετωπιστεί αυτό, οι Ng et al. χρησιμοποίησαν υδρογέλες πολυηλεκτρολύτη-ζελατίνης-χιτοζάνης, οι οποίες είχαν καλή βιοσυμβατότητα και κατάλληλη δυνατότητα εκτύπωσης [249].

Οι Rimann et al. παρουσίασαν μια λύση όλα σε ένα για την κατασκευή μοντέλων δέρματος χρησιμοποιώντας ανθρώπινους πρωτογενείς ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα. Οι Yanez et al. χρησιμοποίησαν τρισδιάστατη βιοεκτύπωση για να ενσωματώσουν ενδοθηλιακά δίκτυα που μοιάζουν με τριχοειδή σε δερμοεπιδερμικό μόσχευμα δέρματος [250].

Οι Min et al. εργάστηκαν στην ανάπτυξη παχύρρευστου δέρματος με χρωστικές που περιέχουν μελανοκύτταρα [251]. Οι Kim et al. πρότειναν μια νέα τρισδιάστατη κυτταρική εκτύπωση χρησιμοποιώντας ένα λειτουργικό σύστημα

transwell, επιτυγχάνοντας πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα με χαμηλότερο κόστος και κατανάλωση χρόνου [252].

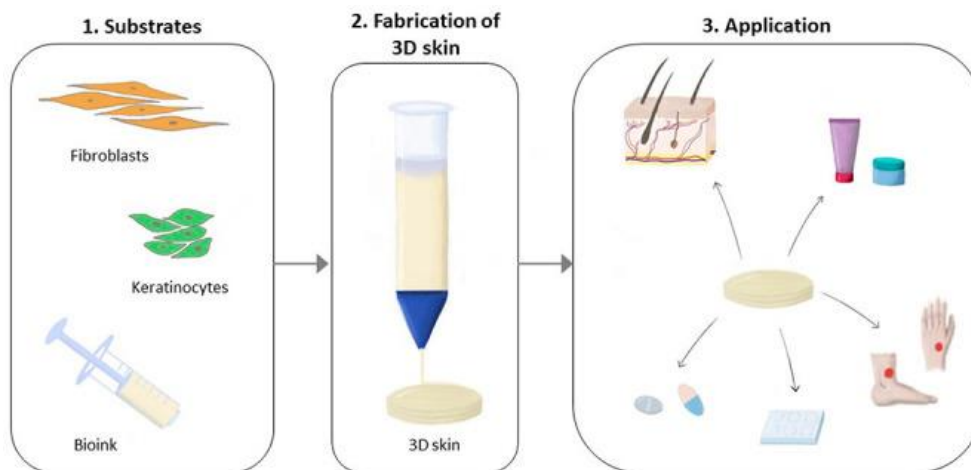
Οι Hakimi et al. ανέπτυξαν έναν φορητό εκτυπωτή δέρματος για τον επί τόπου σχηματισμό φύλλων ιστού δέρματος με διαφορετικές ομοιογενείς και αρχιτεκτονικές συνθέσεις [253]. Οι Admane et al. κατασκεύασαν ένα ισοδύναμο δέρματος πλήρους πάχους με δομικές, μηχανικές και εμβιομηχανικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του ανθρώπινου δέρματος [241].

Αυτές οι προσεγγίσεις και τεχνολογίες δείχνουν τη συνεχή πρόοδο στον τομέα της βιοεκτύπωσης δέρματος, με σκοπό την αναπαραγωγή των φυσικών ιδιοτήτων του ανθρώπινου δέρματος και τη βελτίωση των μεθόδων θεραπείας και αναπλαστικών εφαρμογών.

Η διαδικασία της βιοεκτύπωσης για την προσομοίωση του μικροβιώματος του δέρματος περιλαμβάνει διάφορα κρίσιμα βήματα, που ενσωματώνουν τις τεχνολογικές και βιολογικές πτυχές της βιοεκτύπωσης. Αρχικά, η επιλογή και η προετοιμασία της κατάλληλης βιομελάνης είναι ζωτικής σημασίας, καθώς πρέπει να υποστηρίζει την ανάπτυξη των κυττάρων και να προσομοιώνει το μικροπεριβάλλον του δέρματος [254,255]. Στη συνέχεια, η διαδικασία της εκτύπωσης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η εκτύπωση με λέιζερ, η εκτόξευση μελάνης και η εξώθηση, για να δημιουργηθούν τρισδιάστατες δομές που μιμούνται τα διάφορα στρώματα του δέρματος και τις μικροβιακές κοινότητες [190].

Μετά την εκτύπωση, τα μοντέλα δέρματος υποβάλλονται σε καλλιέργεια για να επιτευχθεί η ωρίμανση των ιστών και η ανάπτυξη των μικροβίων στο δέρμα. Οι ιστολογικές αναλύσεις και οι δοκιμές ανοσοφθορισμού επιβεβαιώνουν την ομοιότητα των εκτυπωμένων μοντέλων με το φυσικό ανθρώπινο δέρμα, τόσο σε μορφολογικό όσο και σε βιολογικό επίπεδο [254,255]. Τα πρόσφατα επιτεύγματα στον τομέα περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση ενδοθηλιακών δικτύων που μιμούνται τα τριχοειδή αγγεία και τη χρήση καινοτόμων βιομελανών που βελτιώνουν τη βιοσυμβατότητα και τη δυνατότητα εκτύπωσης [190].

Η βιοεκτύπωση προσφέρει σημαντικές κλινικές εφαρμογές και χρησιμοποιείται σε διάφορους τομείς της ιατρικής, της φαρμακευτικής και της καλλυντικής βιομηχανίας (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Επισκόπηση της διαδικασίας κατασκευής τρισδιάστατου δέρματος και των κύριων εφαρμογών [202]

Στην αναγεννητική ιατρική, η βιοεκτύπωση δέρματος μπορεί να επιταχύνει την επούλωση χρόνιων πληγών, εγκαυμάτων και ελκών, προσφέροντας μοσχεύματα που μιμούνται τα φυσικά χαρακτηριστικά του δέρματος και βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στην επανορθωτική χειρουργική μετά από μεγάλες ογκολογικές εκτομές, παρέχοντας εξατομικευμένα μοσχεύματα που ενισχύουν την ανάρρωση των ασθενών.

Η βιοεκτύπωση είναι επίσης πολύτιμη για τη μοντελοποίηση φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων, όπως η επούλωση πληγών, η ανταπόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία, η γήρανση, η διαπερατότητα του φραγμού του δέρματος και η φαρμακευτική αντίδραση. Αυτά τα μοντέλα επιτρέπουν την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αυτών των καταστάσεων και τη δοκιμή νέων θεραπειών με μεγαλύτερη ακρίβεια. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη του καρκίνου του δέρματος και των φλεγμονωδών καταστάσεων.

Στην καλλυντική και φαρμακευτική βιομηχανία, η βιοεκτύπωση συμβάλλει στην αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των δραστικών παραγόντων, στην απορρόφηση και το μεταβολισμό των φαρμάκων και στην ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών. Μέσω της βιοεκτύπωσης, οι εταιρείες

μπορούν να δημιουργούν μοντέλα δέρματος που προσομοιώνουν τις ανθρώπινες συνθήκες, επιτρέποντας πιο αξιόπιστες δοκιμές και μειώνοντας την ανάγκη για δοκιμές σε ζώα. Αυτές οι εφαρμογές αποδεικνύουν τη δυναμική της βιοεκτύπωσης ως εργαλείου για την προώθηση της έρευνας και της ανάπτυξης νέων θεραπειών και προϊόντων [202].

Η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση δέρματος προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η ικανότητα παραγωγής βιομιμητικών ισοδύναμων δέρματος [256] με ακριβή τοποθέτηση πολλαπλών τύπων κυττάρων και βιοϋλικών, υψηλή αναπαραγωγιμότητα και ευελιξία [257]. Αυτή η τεχνική επιτρέπει την αυτοματοποιημένη κατασκευή τρισδιάστατων μοντέλων δέρματος που μπορούν να περιλαμβάνουν μόρια και κύτταρα για μελάγχρωση, αγγείωση και νεύρωση, προωθώντας έτσι την ανάπτυξη κλινικά σχετικών δομών δέρματος που μιμούνται στενά την αρχιτεκτονική και την ετερογένεια του φυσικού δέρματος. Επιπλέον, η βιοεκτύπωση επιτρέπει την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών, χρησιμοποιώντας αυτόλογα κύτταρα για τη δημιουργία ειδικών ισοδύναμων δέρματος για επιλεγμένους ασθενείς, γεγονός που συμβάλλει στην προώθηση της ιατρικής ακριβείας [258].

Ωστόσο, η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση δέρματος αντιμετωπίζει και σημαντικές προκλήσεις. Η πολυπλοκότητα του συστήματος απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και ο εξοπλισμός είναι υψηλού κόστους, γεγονός που περιορίζει την ταχεία προώθηση της τεχνολογίας στην κλινική πράξη. Ένα από τα κύρια προβλήματα είναι η επιλογή κατάλληλων βιομελανών που υποστηρίζουν τη λειτουργία των κυττάρων και την ανάπτυξη νέας εξωκυτταρικής μήτρας. Επίσης, η δημιουργία ισοδύναμων δερματικών δομών με ανεπτυγμένο αγγειακό σύστημα και τη συμπερίληψη τριχοθυλακίων, ιδρωτοποιών και σμηγματογόνων αδένων παραμένει δύσκολη [202]. Επιπλέον, η διαδικασία βιοεκτύπωσης μπορεί να επηρεάσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων [250,259], ενώ υπάρχουν ανησυχίες για την ασφάλεια των ασθενών και νομικές προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν πριν την κλινική εφαρμογή [260,261].

7. Ex vivo μοντέλα δέρματος

Στη δεκαετία του 1990, προτάθηκε η χρήση δέρματος φιδιού ως εναλλακτικό μοντέλο που μιμείται την ανθρώπινη κεράτινη στιβάδα για *in vitro* μελέτες. Παρόλο που υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές στη βιβλιογραφία, με μερικούς συγγραφείς να υποστηρίζουν ότι το δέρμα φιδιού μπορεί να αποτελέσει ένα αποτελεσματικό μοντέλο λόγω των ομοιοτήτων του με το ανθρώπινο δέρμα και της εύκολης διαχείρισης και χαμηλού κόστους του [262], άλλοι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι η χρήση του μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών διείδυσης που παρουσιάζει κάθε είδος [263]. Επιπλέον, προτάθηκε πρόσφατα ότι το δέρμα της βασιλικής κόμπρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φραγμός για *in vitro* μελέτες διείδυσης νικοτίνης.

Για να βελτιωθεί το πειραματικό μοντέλο δέρματος και να προσεγγίσει καλύτερα τη φυσιολογία των ανθρώπινων οργάνων, οι ερευνητές έχουν στραφεί στη διατήρηση *ex vivo* μοσχευμάτων δέρματος σε συνθήκες καλλιέργειας. Αυτά τα μοντέλα λειτουργούν ως ενδιάμεσος σταθμός μεταξύ των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων και έχουν υψηλή ικανότητα πρόβλεψης, μειώνοντας την ανάγκη για πειράματα σε ζώα όταν χρησιμοποιείται ανθρώπινο δέρμα. Παρά τις εγγενείς διαφορές μεταξύ των ειδών [264–266], τα ζωικά μοντέλα έχουν προσφέρει ενδιαφέροντα αποτελέσματα σε μελέτες διείδυσης, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται μοσχεύματα δέρματος χοίρου [267–269].

Παρόλο που διατηρούν την αρχική τρισδιάστατη δομή και περιέχουν όλα τα συστατικά του ανθρώπινου δέρματος όπως είναι *in vivo*, αυτά τα συστήματα έχουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι απαιτείται ηθική έγκριση για τη λήψη και επεξεργασία των δειγμάτων, οι βιοψίες μπορεί να παρουσιάζουν διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και εντός του ίδιου δείγματος, ενώ η δομική και λειτουργική τους ακεραιότητα περιορίζεται χρονικά [270].

Τα μοντέλα *ex vivo* χρησιμοποιούνται ευρέως στη φαρμακευτική έρευνα για την αξιολόγηση των θεραπευτικών ουσιών στο ανθρώπινο δέρμα, στην καλλυντική βιομηχανία για τη μελέτη των επιδράσεων καλλυντικών προϊόντων και τη δοκιμή νέων συστατικών, στις τοξικολογικές μελέτες για την αξιολόγηση της ασφάλειας χημικών ουσιών, καθώς και στη δερματολογία και πλαστική χειρουργική για τη

μελέτη της μορφολογίας και φυσιολογίας του δέρματος και την ανάπτυξη νέων θεραπειών [271,272].

Επίσης, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τον προσυμπτωματικό έλεγχο τοπικών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Οι Neil et al. [273] ανέφεραν την ανάπτυξη ενός δομικά ακέραιου και μεταβολικά ενεργού μοντέλου ανθρώπινου δέρματος για 9 ημέρες, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προκλινικές δοκιμές όσον αφορά την αποδοτικότητα και την εφαρμογή θεραπειών για το δέρμα. Σε άλλη μελέτη, οι ίδιοι ερευνητές [274] δημιούργησαν ένα *ex vivo* μοντέλο καλλιέργειας δέρματος που διατήρησε την ακεραιότητα του δερματικού φραγμού και τη μεταβολική δραστηριότητα για 5 ημέρες, και χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης μέσω κυτοκινών Th1. Αξιολόγησαν τις επιδράσεις της πιμεκρόλιμους και της προπιονικής κλοβεταζόλης σε φλεγμονώδη δερματικά μοντέλα και βρήκαν ότι οι μειώσεις στην έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων ήταν συγκρίσιμες με αυτές μιας κλινικής μελέτης *in vivo*. Οι Anitua et al. [275] διερεύνησαν τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του πλάσματος πλούσιου σε αυξητικό παράγοντα (PRGF) και του αυτόλογου τοπικού ορού (ATS) σε ένα *ex vivo* μοντέλο ανθρώπινου δέρματος που είχε υποβληθεί σε διέγερση με IL-4 και IL-13. Οι θεραπείες αυτές βελτίωσαν τη βιωσιμότητα των ιστών και μείωσαν τη συσσώρευση ελεύθερων ριζών και την παραγωγή κυτοκινών όπως ο TNF-α και η IL-1β. Επιπλέον, άλλη μελέτη έδειξε ότι ένα σύμπλεγμα βακουχιόλης, εκχυλίσματος *Ginkgo biloba* και μαννιτόλης είχε αντιφλεγμονώδη δράση σε ανθρώπινα δερματικά μοσχεύματα, μείωσε την IL-8 και τον TNF-α κατά 45% και 46%, αντίστοιχα, όταν το σύμπλεγμα εφαρμόστηκε δύο φορές την ημέρα για 3 ημέρες [276].

Όσον αφορά το δέρμα του χοίρου, το οποίο μοιάζει πολύ με το ανθρώπινο δέρμα, είναι ένα αποδεκτό μοντέλο για ερευνητικές μελέτες λόγω της αρχιτεκτονικής, της ανοσολογίας και της διαπερατότητας του σε ξένες ουσίες [277,278]. Ερευνητές όπως οι Heard [279] και Hwang et al. [280] πιστεύουν ότι η χρήση του δέρματος χοίρου για *ex vivo* δοκιμές ευθυγραμμίζεται με τη φιλοσοφία των 3Rs (Μείωση, βελτίωση και αντικατάσταση), καθώς μπορεί να αποκτηθεί φθηνά από ζώα που έχουν ήδη θυσιαστεί για διατροφικούς σκοπούς. Το φρεσκοκομμένο δέρμα χοίρου περιέχει υψηλά επίπεδα επαγωγίσιμης COX-2, η οποία παράγεται συνεχώς υπό βιώσιμες συνθήκες έως ότου συμβεί νέκρωση ιστού, επιτρέποντας την αξιολόγηση

της αντιφλεγμονώδους ή προφλεγμονώδους δράσης διάφορων ενώσεων. Σημειώνεται ότι η φλεγμονώδης κατάσταση είναι ήδη παρούσα πριν από το πείραμα λόγω της διαδικασίας σφαγής, έτσι δεν απαιτείται πρόσθετη επαγωγή [279].

Διάφοροι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει *ex vivo* μοντέλα δέρματος χοίρου για τις μελέτες τους. Οι Ouitas και Heard [281] εξέτασαν την αντιφλεγμονώδη (COX-2) δράση έξι εμπορικών σκευασμάτων νυχιού του διαβόλου, ενώ οι Houston et al. [282] χρησιμοποίησαν το μοντέλο για να μελετήσουν την αντιφλεγμονώδη δράση (COX-2) εκχυλισμάτων φλούδας ροδιού. Οι Hwang et al. [280] διερεύνησαν τη βιωσιμότητα του δέρματος χοίρου σε ένα *ex vivo* μοντέλο για να αξιολογήσουν την ασφάλεια και τις επιδράσεις βελτίωσης του φραγμού του δέρματος από υδροξυοξέα που χρησιμοποιούνται συχνά σε καλλυντικά απολέπισης.

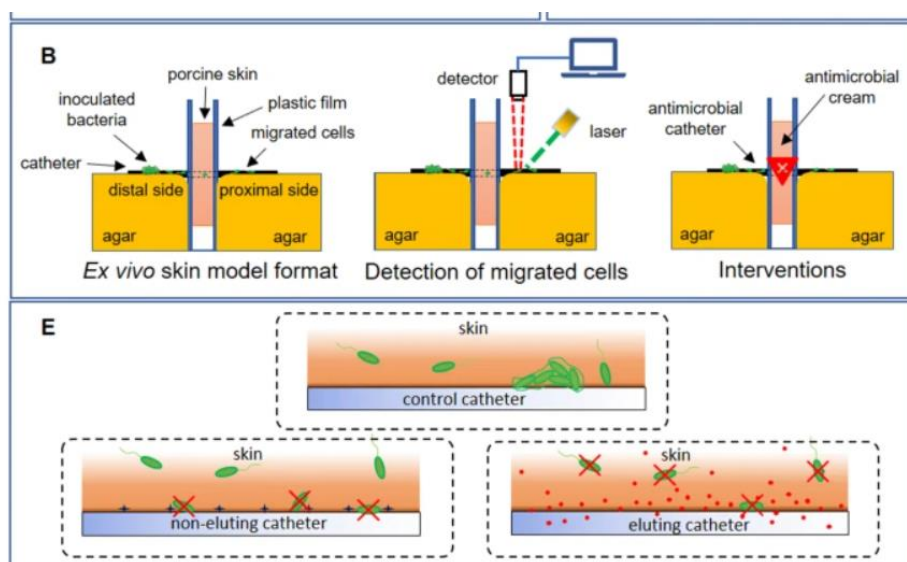
Σε μια άλλη μελέτη, οι ερευνητές ανέπτυξαν και χαρακτήρισαν ένα *ex vivo* μοντέλο ιστού χοίρου για τη μελέτη της βακτηριακής μετατόπισης που προκαλείται από ιατρικές συσκευές. Αρχικά, βελτιστοποίησαν την προετοιμασία του δέρματος χρησιμοποιώντας ένα πολύπλοκο δίκτυο μικροϊνδοποιημένης κυτταρίνης (πάστα NP) που αναπτύχθηκε από τη NovaFlux, για να απομακρύνουν μηχανικά την υπάρχουσα χλωρίδα και τις μολύνσεις, μειώνοντας παράλληλα τη βλάβη των ιστών. Η ιστολογία και το τεστ MTT χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των επιπτώσεων στον ιστό. Στη συνέχεια, σχεδίασαν μια πλακέτα έξι φρεατίων για να αυξήσουν την απόδοση των δοκιμών. Τα τρισδιάστατα εκτυπωμένα ένθετα δημιουργήθηκαν για να διαχωρίζουν τον ιστό που τοποθετείται ανάμεσα σε δύο πλάκες άγαρ. Ο ιστός τρυπήθηκε με βιοψία, και εισήχθη σωλήνας ενδοαγγειακού καθετήρα σε ένα σφραγισμένο άνοιγμα. Η μετανάστευση των βακτηρίων παρακολούθηθηκε μέσω πολλαπλών μεθόδων. Τα αποτελέσματα από την οπτική επιθεώρηση συγκρίθηκαν με εκείνα της μικροσκοπίας φθορισμού, της ομοεστιακής απεικόνισης και της παρακολούθησης φωταύγειας σε πραγματικό χρόνο με το σύστημα απεικόνισης *in vitro* (IVIS). Για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα αντιμικροβιακών ιατρικών συσκευών, δοκιμάστηκαν δύο τύποι καθετήρων πολυουρεθάνης με τον ίδιο αντιμικροβιακό παράγοντα — ένας χωρίς έκλουση και ένας με έκλουση. Στον καθετήρα χωρίς έκλουση, το αντιμικροβιακό παραμένει στον καθετήρα, ενώ στον καθετήρα με έκλουση απελευθερώνεται αργά στη διεπαφή συσκευής-ιστού μέσω διάχυσης. Πραγματοποιήθηκαν επίσης αναλύσεις ιστολογίας

και βιωσιμότητας σε ιστούς που εκτέθηκαν στους αντιμικροβιακούς καθητήρες, για να αποδειχθεί ότι το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια ολοκληρωμένη ανάλυση οφέλους-κινδύνου στην ανάπτυξη τεχνολογίας σε πρώιμο στάδιο (*Εικόνα 5*). Το μοντέλο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη όχι μόνο της αποτελεσματικότητας των αντιμικροβιακών σε μια συσκευή στην πρόληψη της βακτηριακής μετατόπισης, αλλά και για να προσφέρει καλύτερη κατανόηση πιθανών θεραπειών για το δέρμα γύρω από το σημείο στήριξης, όπως ο καθημερινός καθαρισμός, τα προβιοτικά, τα υπερηχητικά κύματα, το ηλεκτροχημικό πεδίο κ.λπ. Αυτό είναι ιδιαίτερα πολύτιμο για την προώθηση της οστεοενσωμάτωσης εμφυτευμάτων, συμπεριλαμβανομένων ορθοπεδικών εμφυτευμάτων που χρησιμοποιούνται για τραυματίες πολέμου, προϊόντων που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές, και ενδεχομένως για προσαρμογές σε οδοντικά εμφυτεύματα [283].

Ωστόσο τα μοντέλα που προσπαθούν να περιλαμβάνουν όλο το ανθρωπινό δερματικό μικροβίωμα συνοψίζονται σε τρία μοντέλα: HygroSkin της GenoSkin, NativeSkin της Genoskin και το μοντέλο που αναπτύχθηκε από την Vaiomer. Η Genoskin ανέπτυξε το HygroSkin, ένα πλήρως λειτουργικό μοντέλο ανθρώπινου δέρματος *ex vivo* με τα τρία στρώματα του δέρματος [284], χρησιμοποιώντας την τεχνολογία εμφύτευσης NativeSkin. Συγκεκριμένα, τα μοντέλα ανθρώπινου δέρματος NativeSkin αποτελούν την πλησιέστερη εναλλακτική επιλογή σε σύγκριση με τις δοκιμές που γίνονται απευθείας σε ανθρώπινο δέρμα. Αυτά τα μοντέλα περιλαμβάνουν στρογγυλές βιοψίες ανθρώπινου δέρματος που διατηρούνται ζωντανές και λειτουργικές μέσα σε μια πατενταρισμένη μήτρα. Το συγκεκριμένο μοντέλο παρέχει μια καινοτόμο πλατφόρμα για έρευνα και ανάλυση, επιτρέποντας τη μελέτη της απόκρισης του ζωντανού ανθρώπινου δέρματος σε διάφορες ουσίες, φάρμακα, καλλυντικά και ιατρικές συσκευές, είτε μετά από τοπική είτε συστηματική χορήγηση [285]. Στόχος αυτής της μελέτης ήταν να χαρακτηριστεί η μικροχλωρίδα του δέρματος στα διάφορα στρώματα του μοντέλου HygroSkin καθώς και την αξιολόγηση των αλλαγών στη μικροχλωρίδα του δέρματος μετά από θεραπεία με δερμοκαλλυντικά προϊόντα για μια περίοδο 7 ημερών. Με τη χρήση της προηγμένης τεχνολογίας της Vaiomer, βασισμένης στην ανάλυση του ριβοσωμικού RNA 16S, μελετήθηκε η εξέλιξη της μικροχλωρίδας κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Βρέθηκε ότι η ακεραιότητα των δερματικών στρωμάτων διατηρήθηκε, και η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε σημαντική αλλαγή στο μέγεθος των λιποκυττάρων μετά από 7

ημέρες. Η μικροχλωρίδα του δέρματος παρουσίασε διαφοροποίηση μεταξύ των στρωμάτων, με τέσσερις κύριες φυλές να κυριαρχούν, σύμφωνες με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Παρατηρήθηκε ότι οι βασικοί μικροβιακοί πληθυσμοί του δέρματος, όπως τα βακτήρια *Propionibacterium*, *Corynebacterium* και *Staphylococcus*, παρέμειναν μετά από 7 ημέρες καλλιέργειας, αν και σημειώθηκαν αλλαγές στη σχετική αφθονία τους. Διατηρήθηκε η ποικιλομορφία της μικροχλωρίδας στα τρία στρώματα του δέρματος σε όλους τους δότες, παρά τις παρατηρούμενες μεταβλητότητες μεταξύ των ατόμων και μεταξύ της πρώτης ημέρας και της έβδομης ημέρας της καλλιέργειας [284].

Αυτά τα *ex vivo* μοντέλα επιτρέπουν στους ερευνητές να μελετήσουν το μικροβίωμα του ανθρώπινου δέρματος σε συνθήκες που προσομοιώνουν το φυσικό περιβάλλον, ενώ παράλληλα προσφέρουν δυνατότητες για τη δοκιμή θεραπειών και συσκευών με υψηλή ακρίβεια και σχετικότητα.



Εικόνα 5: *Ex vivo* μοντέλο που προσομοιώνει την ανάπτυξη μιας διαρκούς λοίμωξης συνδεδεμένης με ιατρική συσκευή. Β) Ένα σχηματικό μοντέλο *ex vivo* παρουσιάζει την πορεία των βακτηριακών κυττάρων που εισάγονται στην εξωτερική πλευρά της διεπαφής μεταξύ δέρματος και συσκευής και μεταναστεύουν προς την εσωτερική πλευρά. Η μετανάστευση αυτή παρακολουθήθηκε με τη χρήση φθορίζουσας μικροσκοπίας, ομοεστιακής μικροσκοπίας και βιοφωταύγειας IVIS. Διάφορες παρεμβάσεις εξετάστηκαν για να προσδιοριστεί ο σχετικός χρόνος που χρειάζεται για τη μετακίνηση των μικροβίων. Ε) Το σχηματικό απεικονίζει τρία διαφορετικά σενάρια που αναλύθηκαν σε αυτή τη μελέτη: την αλληλεπίδραση των βακτηρίων με τη διεπαφή καθετήρα ελέγχου ιστού, τη διεπαφή καθετήρα χωρίς έκλυση και τη διεπαφή καθετήρα έκλυσης ιστού [283].

8. Βιοφίλμ (Biofilms)

Τα βιοφίλμ αποτελούν μια ποικιλόμορφη και πολύπλοκη συλλογή μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, πρωτεΐνες και DNA, που είτε ενσωματώνονται είτε προσκολλώνται σε ζωντανές ή μη ζωντανές επιφάνειες, σχηματίζοντας μια εξωκυτταρική μήτρα πολυσακχαρίτη [286–290]. Παρά το γεγονός ότι η σύνθεση κάθε βιοφίλμ μπορεί να διαφέρει σημαντικά, ο γενικός μηχανισμός σχηματισμού τους μοιάζει [289]. Τα βακτήρια συνήθως προσκολλώνται μεταξύ τους και συσσωρεύονται, σχηματίζοντας πολλαπλά στρώματα, τα οποία καθιστούν δύσκολη την πρόσβαση των λευκών αιμοσφαιρίων για την εξάλειψή τους [286,290].

Τα βιοφίλμ αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1990 σε ζώα. Ενώ αρχικά δεν είχαν λάβει τη δέουσα προσοχή ως πιθανή απειλή, αργότερα άρχισαν να μελετώνται πιο εντατικά [290,291]. Τα αντιβιοτικά δυσκολεύονται να εξουδετερώσουν τα βακτήρια στα βιοφίλμ λόγω της βραδείας ανάπτυξής τους και της αναερόβιας φύσης τους [286]. Λόγω της έλλειψης θρεπτικών ουσιών, όπως η γλυκόζη και το οξυγόνο, τα βιοφίλμ συχνά αναπτύσσονται αργά, και πολλά από τα βακτήρια αυτά μπαίνουν σε μεταβολική αδράνεια, επιβιώνοντας από τα αντιβιοτικά και αποικίζοντας ξανά το βιοφίλμ αργότερα [292]. Επιπλέον, οι βιομεμβράνες αυτές καθίστανται ανθεκτικές στην τοπική αντιβιοτική θεραπεία, καθώς τα επιζώντα βακτήρια επαναποικίζουν την περιοχή [293].

Αν και ο σχηματισμός βιοφίλμ επηρεάζει αρνητικά την κυτταρική ανάπτυξη και επιβραδύνει την επούλωση, τα μικροβιώματα φαίνεται να ωφελούν το δέρμα. Η υγιής, φυσιολογική χλωρίδα βακτηρίων και άλλων μικροβίων έχει διερευνηθεί για τον ρόλο της στη φυσική διαδικασία ανάκτησης του δέρματος. Ωστόσο, η τεράστια ποικιλία και η πολυπλοκότητα αυτού του μικροβιώματος δυσκολεύουν την πλήρη κατανόησή του. Επομένως, απαιτείται περισσότερη έρευνα για να εξεταστεί η ακριβής αλληλεπίδραση μεταξύ των βιοφίλμ του δέρματος και του μικροβιώματος [290,293].

Παρόλο που έχουν γίνει προσπάθειες, τα βιοφίλμ από μόνα τους δεν αποτελούν πλήρη *in vitro* μοντέλα. Αντίθετα, χρησιμοποιούνται ως μέρος των *in vitro*

μοντέλων για να προσομοιώσουν τις αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμών στο δερματικό περιβάλλον.

Συγκεκριμένα, τα βιοφίλμ χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες που περιλαμβάνουν ανθρώπινα κερατινοκύτταρα ή άλλα κύτταρα του δέρματος για να μελετηθεί η επίδραση των μικροοργανισμών στο δέρμα. Αυτά τα συστήματα καλλιέργειας μπορούν να περιλαμβάνουν διάφορους οργανισμούς που είναι γνωστοί για την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοφίλμ, όπως τα *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* [29,294].

Σε τρισδιάστατα μοντέλα ανθρωπίνου δέρματος, τα βιοφίλμ συνδυάζονται με ανθρώπινα κύτταρα για να δημιουργηθεί ένα πιο ρεαλιστικό περιβάλλον. Τα τρισδιάστατα μοντέλα επιτρέπουν τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των μικροοργανισμών και των κυττάρων του δέρματος σε ένα πολυδιάστατο περιβάλλον [29].

Συμπερασματικά, τα βιοφίλμ χρησιμοποιούνται για να προσομοιώσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών και των ανθρώπινων κυττάρων του δέρματος, βοηθώντας στην κατανόηση της δομής και της λειτουργίας των μικροβιακών κοινοτήτων. Μέσω αυτών των μοντέλων, οι ερευνητές μπορούν να μελετήσουν τη συμβιωτική και παθογενετική συμπεριφορά των μικροβίων, τις επιπτώσεις των αντιμικροβιακών θεραπειών, καθώς και τον ρόλο των βιοφίλμ σε χρόνιες δερματικές παθήσεις όπως οι λοιμώξεις και η ακμή [29,294]. Αυτές οι εφαρμογές αναδεικνύουν τη σημασία των βιοφίλμ ως ουσιαστικό εργαλείο στην έρευνα του δερματικού μικροβιώματος και στην ανάπτυξη νέων ιατρικών παρεμβάσεων.

9. Τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next – Generation Sequencing)

Η κατανόηση του περιορισμού των *in vitro* μοντέλων για την πλήρη εικόνα του δερματικού μικροβιώματος σε συνδυασμό με τις τεχνολογικές εξελίξεις έχει ωθήσει τους ερευνητές να ασχοληθούν με τις τεχνικές αλληλούχισης για τις μελέτες του ανθρώπινου μικροβιώματος. Αυτές οι τεχνικές περιλαμβάνουν μεταγονιδιωματικές, μεταγραφομική, μεταπρωτεομικές και μεταβολομικές αναλύσεις (metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics, metabolomics) [295,296] και αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την διερεύνηση της ποικιλομορφίας, τη λειτουργίας και τη δραστηριότητας των μικροβιακών κοινοτήτων στο δέρμα υπό διάφορες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των φυσιολογικών και των ασθενειών.

9.1. Μεταγονιδιωματική Ανάλυση (Metagenomics)

Αυτή τη στιγμή οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς είναι η αλληλούχιση αμπλικονίου του 16S rRNA (16S) και η αλληλούχιση ολόκληρου του μεταγονιδιώματος (WMS). Η μεταγονιδιωματική ανάλυση αφορά τη γονιδιωματική ανάλυση μιας κοινότητας μικροοργανισμών μέσω τεχνικών εξαγωγής και αντιγραφής DNA [296,297].

Η αλληλούχιση του 16S rRNA, γνωστή και ως μεταταξινομική, χρησιμοποιεί εκκινητές που συνδέονται με ένα συγκεκριμένο τμήμα της εξαιρετικά διατηρημένης υπερμεταβλητής περιοχής βρόχου των βακτηρίων, και ακολουθείται από ενίσχυση αυτής της περιοχής με PCR [296,298]. Αν και αυτή η μέθοδος αφορά την αλληλούχιση βακτηριακών γονιδιωμάτων, η αλληλούχιση αμπλικονίου μπορεί επίσης να εφαρμοστεί σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς [296,299]. Με τη στόχευση διατηρημένων ριβοσωμικών γονιδίων RNA ειδικών για μύκητες, είναι δυνατή η ενίσχυση και αλληλούχιση των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων, με τις τρεις πιο διατηρημένες περιοχές να είναι το εσωτερικό μεταγραμμένο διαχωριστικό (ITS1-ITS2), το ριβοσωμικό γονίδιο RNA ριβοσωμικής μικρής υπομονάδας 18S ή ο τομέας D1 / D2 του γονιδίου RNA ριβοσωμικής μεγάλης υπομονάδας 26S [296,300].

Η χρησιμότητα της αλληλούχισης αμπλικονίου σχετίζεται με τις πολλές ολοκληρωμένες βάσεις δεδομένων γονιδιωματικής αναφοράς που υπάρχουν

[296,301]. Αν και αυτή η μορφή μεταγονιδιωματικής ανάλυσης έχει αποδειχθεί ισχυρό εργαλείο παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Τα κύρια προβλήματα της αλληλούχισης αμπλικονίου σχετίζονται με την υπερβολική εξάρτηση από τις διατηρημένες αλληλουχίες ενός γονιδιώματος, καθώς και με το γεγονός πως η ενίσχυση με PCR συχνά παράγει χιμαιρικές αλληλουχίες στα συλλεγόμενα δείγματα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε στρέβλωση ή μείωση της ποιότητας των αναγνώσεων και σε πιθανή παραποίηση της ταξινομικής ποικιλομορφίας [296,297,301,302].

Η αλληλούχιση ολόκληρου του μεταγονιδιώματος (Whole Metagenome Sequencing - WMS) είναι μια σύγχρονη τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next-Generation Sequencing - NGS), η οποία μπορεί να αναγνωρίσει περίπου διπλάσιο αριθμό ειδών σε σύγκριση με την αλληλούχιση αμπλικονίων σε συγκεκριμένα βάθη ανάγνωσης [296,303]. Όπως και η μεθοδολογία της αλληλούχισης αμπλικονίων, η WMS απαιτεί τη συλλογή δερματικών δειγμάτων. Ωστόσο, αντί να χρησιμοποιεί εκκινητές για την απομόνωση και ενίσχυση του γονιδίου ενδιαφέροντος, όλα τα δείγματα DNA που συλλέγονται κόβονται σε μικρά θραύσματα και αλληλουχούνται ανεξάρτητα [296,298].

Τα κύρια μειονεκτήματα του WMS συνοψίζονται κυρίως σε δύο παράγοντες: το κόστος και την πολυπλοκότητα της εκτέλεσης. Η ενίσχυση των μικρών θραυσμάτων DNA και η ανάλυση των παραγόμενων δεδομένων είναι σημαντικά πιο δαπανηρή και απαιτητική σε σύγκριση με την αλληλούχιση αμπλικονίων. Οι ερευνητές αντιμετωπίζουν προκλήσεις στην ανάλυση μεταγονιδιωματικών δεδομένων λόγω του εκτεταμένου φιλτραρίσματος που απαιτείται από την αλληλούχιση ολόκληρου του DNA του δείγματος (ξενιστής και μικροβιακός), με αποτέλεσμα να δημιουργούνται πολύ μεγαλύτερα σύνολα δεδομένων. Έτσι, οι αναλύσεις των δεδομένων WMS απαιτούν περισσότερο χρόνο για να εκτελεστούν και χρειάζονται πολύ μεγαλύτερη υπολογιστική ισχύ. Επιπλέον, η WMS απαιτεί επαρκή βάθη ανάγνωσης για την επίτευξη ακριβών αποτελεσμάτων, κάτι που μπορεί να είναι δύσκολο να επιτευχθεί στην έρευνα για το μικροβίωμα του δέρματος, αν και έχουν γίνει σημαντικές πρόοδοι για τη βελτίωση αυτής της πρόκλησης [296,304].

Από τις δύο τεχνολογίες, το WMS χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο στην έρευνα του δερματικού μικροβιώματος. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην αύξηση

του μεγέθους των βάσεων δεδομένων αναφοράς WMS και στην πιο πλήρη και ακριβή φύση της τεχνικής [296,302].

Οι πληροφορίες που παίρνουμε και από τις δύο τεχνολογίες αλληλούχησης είναι σημαντικές. Αρχικά, η μεταγονιδιωματική ανάλυση παρέχει αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με την μικροβιακή ποικιλότητα, καθώς προσδιορίζουν τα είδη που υπάρχουν και την σχετική αφθονία τους. Παρέχουν πληροφορίες για το λειτουργικό δυναμικό του μικροβιώματος αφού μπορούν να ταξινομήσουν πολλές αλληλουχίες σε επίπεδο είδους και, σε ορισμένες περιπτώσεις, σε επίπεδο στελεχούς. Παράλληλα, επιτρέπεται η μελέτη των προκαρυωτικών, αρχαίων, ιών, ιοφάγων και ευκαρυωτικών, μαζί με τη λειτουργική ταξινόμηση των σχετικών γονιδιακών αλληλουχιών. Αυτό τελικά οδηγεί στην ανακάλυψη νέων μικροβιακών γονιδίων και γονιδιωμάτων [296,303].

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι οι εφαρμογές της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης στο ανθρώπινο, δερματικό μικροβίωμα εστιάζουν στην κατανόηση των βακτηριακών μελών του μικροβιώματος του δέρματος και των διαφορών τους μεταξύ διαφορετικών ατόμων και τοποθεσιών στο ανθρώπινο σώμα [305], καθώς επίσης και στις δερματικές παθήσεις με κύριο στόχο αν η παρουσία κάποιων βακτηρίων ή μικροβιακών κοινοτήτων μπορεί να είναι αιτία η συνέπεια της διαταραχής, με σημαντικά παραδείγματα το έκζεμα και την ατοπική δερματίτιδα [47,305].

9.2. Μεταγραφομική ανάλυση (Metatranscriptomics)

Η μεταγραφομική ανάλυση περιλαμβάνει τον χαρακτηρισμό της περιεκτικότητας σε RNA των δειγμάτων [306] Η δύναμη της μεταγραφομικής ανάλυσης είναι η ικανότητά της να αποσαφηνίζει τη λειτουργική έκφραση μικροβιακών γονιδίων, ακόμα και όταν οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται *in vitro* [296,304]. Η τυπική διαδικασία για τη μεταγραφομική ανάλυση ξεκινά με τη συλλογή δειγμάτων και τον καθαρισμό του mRNA. Μόλις απομονωθεί, το mRNA μετατρέπεται σε cDNA και αλληλουχείται ταυτόχρονα με μεταγονιδιωματικά δείγματα [296,307]. Οι παραγόμενες αλληλουχίες αναφέρονται ως RNA-Seq και συγκρίνονται με ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων για αναλύσεις.

Η μεταγραφομική ανάλυση σπάνια χρησιμοποιούνται στην έρευνα για το ανθρώπινο δερματικό μικροβίωμα. Τα μειονεκτήματα βασίζονται στο υψηλό κόστος της τεχνικής καθώς επίσης και στην δυσκολία απομόνωσης του mRNA. Τέλος, οι ερευνητές αντιμετωπίζουν προκλήσεις στην πιθανότητα μόλυνσης από το RNA ξενιστή ανάλογα με τον τρόπο που συλλέγουν τα δείγματα.

Η συμπλήρωση με WMS επιτρέπει την απόκτηση ακριβών πληροφοριών σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των αλληλουχιών που αναλύονται από τη μεταγονιδιωματική προσέγγιση. Με αυτά τα λειτουργικά δεδομένα, οι ερευνητές μπορούν να αναγνωρίσουν τις μεταβολικές οδούς που είναι ενεργές σε μικροβιακές κοινότητες σε διαφορετικά περιβάλλοντα και να αξιοποιούν πληροφορίες που σχετίζονται με βιοϊατρικές εξελίξεις [296,304].

Οι εφαρμογές της μεταγραφομικής ανάλυσης συμπληρώνουν τα δεδομένα μεταγονιδιωματικής, διευκρινίζοντας με ακρίβεια ποια από τα γονίδια που αναφέρθηκαν στη μεταγονιδιωματική ανάλυση μεταγράφονται και σε ποιο βαθμό [304,307]. Από τέτοια λειτουργικά δεδομένα, μπορούν να αναγνωριστούν ενεργές μεταβολικές οδοί στις βακτηριακές κοινότητες και να συσχετιστούν με συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και με πιθανούς θεραπευτικούς στόχους [304,308]. Επομένως, η μεταγραφομική ανάλυση προσφέρει μια πιο εμπειριστατωμένη προοπτική καθώς μπορεί να αποκαλύψει λεπτομέρειες σχετικά με πληθυσμούς που είναι μεταγραφικά ενεργοί, και όχι απλώς να προσδιορίσει το γενετικό περιεχόμενο των βακτηριακών κοινοτήτων [304,307,309].

9.3. Μεταπρωτεομική ανάλυση (Metaproteomics)

Η μεταπρωτεομική ανάλυση ορίζεται ως η ανάλυση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου της περιβαλλοντικής μικροχλωρίδας σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή [296,310]. Γνωρίζοντας ποιες πρωτεΐνες υπάρχουν και σε ποια συγκέντρωση, διευκολύνεται η ανάλυση των συστατικών ενός μικροβιακού οικοσυστήματος που υποστηρίζουν την επιβίωσή του. Συνήθως, η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών επιτυγχάνονται μέσω μιας μεθόδου τύπου "shotgun", και στην συνέχεια τα πεπτίδια διασπώνται και αναλύονται με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας [296,310,311]. Τα δεδομένα που προκύπτουν αποκαλύπτουν την αλληλουχία των αμινοξέων, την αφθονία τους και

την παρουσία τυχόν μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως η φωσφορυλίωση. Τέλος, οι αλληλουχίες συγκρίνονται με διαδικτυακές βάσεις δεδομένων αναφοράς για τον προσδιορισμό των ακριβών πρωτεϊνών που υπάρχουν [296,312].

Το σημαντικότερο αποτέλεσμα της μεταπρωτεομικής ανάλυσης είναι η παροχή πληροφοριών για τους μικροοργανισμούς που δραστηριοποιούνται και τον τρόπο λειτουργίας τους, μέσα από τις πρωτεΐνες που ανιχνεύονται [313,314]. Αυτή η λειτουργία περιγράφεται από δύο βασικές μεταβλητές: τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με λειτουργικές μονάδες και την αφθονία τους, η οποία αποτελεί δείκτη της δραστηριότητάς τους. Η ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται ή απελευθερώνονται από τα κύτταρα μπορεί να αποκαλύψει τον τρόπο με τον οποίο οι κυτταρικές μονάδες της μικροχλωρίδας αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το περιβάλλον τους [314–316]. Συνήθως, τα πεπτίδια που ταυτοποιούνται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων οργανισμών που παρήγαγαν τις πρωτεΐνες, επιτρέποντας μια ακριβή μοριακή περιγραφή του φαινοτύπου τους [314,317].

Μέχρι σήμερα, πολύ λίγοι ερευνητές που ασχολούνται με το μικροβίωμα του δέρματος έχουν ενσωματώσει τη μεταπρωτεομική ανάλυση στις έρευνές τους. Αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με την έρευνα για το μικροβίωμα του εντέρου, όπου πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν τη μεταπρωτεομική ανάλυση σε συνδυασμό με τη μεταγονιδιωματική αλληλούχηση [312,318,319]. Αυτή η διαφορά μεταξύ της έρευνας για το μικροβίωμα του εντέρου και του δέρματος μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως τα περιορισμένα βάθη ανάγνωσης και το υψηλό κόστος.

Ωστόσο, με την εξέλιξη της βιοτεχνολογίας, η εφαρμογή της μεταπρωτεομικής στη δερματική έρευνα γίνεται όλο και πιο εφικτή. Οι μεταπρωτεομικές τεχνικές επιτρέπουν στους ερευνητές να παρακολουθούν λειτουργικά γονίδια και μεταβολικές οδούς, να εντοπίζουν την έκφραση πρωτεϊνών σε διάφορες καταστάσεις (όπως μικρόβια υπό συνθήκες στρες) και να συμβάλλουν στην ανακάλυψη νέων πιθανών λειτουργικών γονιδίων. Όλες αυτές οι δυνατότητες είναι κρίσιμες για την κατανόηση του ρόλου των μικροβίων στην ανάπτυξη δερματικών παθήσεων [296].

9.4. Μεταβολομική ανάλυση (Metabolomics)

Η τελευταία κατηγορία των τεσσάρων "omics" που εξετάζονται εδώ είναι η μεταβολομική ανάλυση, η οποία αφορά την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση όλων των μεταβολιτών που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Παρόμοια με τη μεταπρωτεομική, οι μεταβολίτες εντοπίζονται και ποσοτικοποιούνται μέσω υγρής ή αέριας χρωματογραφίας, φασματομετρίας μάζας και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Τα ακριβή αποτελέσματα που προκύπτουν εξαρτώνται από την καθαρότητα των συλλεγόμενων δειγμάτων. Όπως συμβαίνει με τη σύγκριση αλληλουχιών γονιδιωματικών δειγμάτων με γνωστές ταξινομικές βάσεις δεδομένων, τα μεταβολομικά δεδομένα που προκύπτουν συγκρίνονται με γνωστές φασματικές βάσεις δεδομένων [296,320].

Όπως και στη μεταπρωτεομική, η πλειονότητα της μεταβολομικής έρευνας επικεντρώνεται στο μικροβίωμα του εντέρου και όχι στο μικροβίωμα του δέρματος. Υπάρχουν ωστόσο κάποιες σημαντικές μελέτες μεταβολομικής του δέρματος που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, όπως η έρευνα των Kuehne et al., η οποία έδειξε ότι μόνο μικρές μεταβολομικές και μεταγραφικές αλλαγές συμβαίνουν καθώς το δέρμα γερνάει [296,320,321]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα του ρόλου της μεταβολομικής στη δερματική έρευνα είναι ο τομέας της λιπιδιωματικής ανάλυσης (lipidomics), ειδικά όσον αφορά την ψωρίαση [296,322].

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει στους ερευνητές να αποκαλύψουν την ταυτότητα και την αφθονία των μεταβολιτών στο δείγμα. Παρά τα οικονομικά εμπόδια, η χρήση της μεταβολομικής ανάλυσης δίνει τη δυνατότητα στους ερευνητές να εξετάσουν περίπλοκες πορείες των μικροβιακών κοινοτήτων, όπως τις διαδικασίες σηματοδότησης που χρησιμοποιούν τα βακτήρια για επικοινωνία [296,320]. Σε συνδυασμό με την μεταγονιδιωματική αλληλούχηση (WMS), η μεταβολομική ανάλυση επιτρέπει την ανακατασκευή των πολύπλοκων δικτύων των μικροβιακών κοινοτήτων [296].

10. Περιορισμοί στην έρευνα του ανθρώπινου δερματικού μικροβιώματος

Τα δύο κύρια προβλήματα στην έρευνα του δερματικού μικροβιώματος συνοψίζονται στην (1) μικροβιακή ταυτοποίηση και (2) στην μοντελοποίηση του μικροβιώματος του δέρματος τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω [8].

Η παραδοσιακή μικροβιολογική έρευνα εστιάζει κυρίως στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστών και μεμονωμένων παθογόνων. Ωστόσο, τα νέα δεδομένα σχετικά με τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει το μικροβίωμα στην υγεία και στις ασθένειες έχουν δημιουργήσει την ανάγκη για ακριβή ταυτοποίηση των μικροβίων που βρίσκονται σε διάφορες βιολογικές θέσεις και για τη δυνατότητα διαμόρφωσης των φυσικών μικροβιακών κοινοτήτων [323]. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη τεχνικών που να καλύπτουν το εύρος των μικροβιακών οικοσυστημάτων παραμένει μια σημαντική πρόκληση στην έρευνα του μικροβιώματος. Παραδοσιακά, η μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων γινόταν κυρίως μέσω καλλιέργειών, μεθόδων που ευνοούν είδη ικανά να αναπτυχθούν σε εργαστηριακές συνθήκες και συνεπώς, υποεκπροσωπούν την πραγματική ποικιλομορφία του φυσικού μικροβιακού περιβάλλοντος [324,325]. Συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες μπορεί να υποτιμήσουν την παρουσία έως και 26 βακτηριακών ειδών σε έλκη διαβητικού ποδιού και να μην ανιχνεύσουν το *S. aureus* σε πάνω από το 50% των περιπτώσεων. Από την άλλη, οι τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση του 16S rRNA έχουν αποδειχθεί ανώτερες από τις μεθόδους καλλιέργειας για την ανάλυση δειγμάτων από πληγές, εντοπίζοντας περίπου 50% περισσότερα βακτηριακά είδη, συμπεριλαμβανομένων αναερόβιων οργανισμών [326]. Παρά τους περιορισμούς των μεθόδων καλλιέργειας, παραμένουν απαραίτητες για τη βαθύτερη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ξενιστών και βακτηρίων, ενώ ο συνδυασμός τους με συστημικές προσεγγίσεις όπως οι τεχνολογίες omics [327] και η μοντελοποίηση με υπολογιστή [328,329] μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τη μικροβιακή ποικιλότητα και λειτουργία.

Όπως προαναφέρθηκε, η αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA παραμένει η πιο διαδεδομένη μέθοδος στη μελέτη του μικροβιώματος, ωστόσο δεν είναι χωρίς τα μειονεκτήματά της. Οι μεροληψίες που προκύπτουν από τις διαδικασίες

ενίσχυσης PCR και τις πλατφόρμες αλληλούχισης που χρησιμοποιούνται μπορεί να οδηγήσουν σε ανακριβείς εκτιμήσεις της μικροβιακής ποικιλομορφίας [330–332]. Επιπλέον, η τεχνική αυτή παρέχει περιορισμένη ανάλυση, καθώς συνήθως δεν μπορεί να διακρίνει βακτήρια πέρα από το επίπεδο του γένους, κάτι που είναι κρίσιμο για την έρευνα του δέρματος. Βακτήρια του ίδιου γένους μπορούν να έχουν διαφορετικές επιδράσεις στον ξενιστή. Για παράδειγμα, άτομα με ατοπική δερματίτιδα και αυξημένη παρουσία *S. aureus* εμφανίζουν σοβαρότερη μορφή της νόσου σε σχέση με εκείνα με αυξημένη παρουσία *S. epidermidis*, ενώ η επιδείνωση της νόσου μπορεί να σχετίζεται μόνο με ένα κυρίαρχο στέλεχος του *S. aureus* [333].

Οι πρώιμες τεχνολογίες αλληλούχισης έχουν βελτιώσει σημαντικά την κατανόησή μας για τη μικροβιακή ποικιλομορφία, αλλά δεν μπορούσαν να παρέχουν πλήρη ανάλυση του μικροβιακού πληθυσμού ή να συνδέσουν αυτά τα δεδομένα με φαινοτυπικές πληροφορίες. Η ανάπτυξη της αλληλούχισης επόμενης γενιάς έχει επιτρέψει τον λεπτομερέστερο χαρακτηρισμό του μικροβιακού περιβάλλοντος, φέρνοντας επανάσταση στην έρευνα του μικροβιώματος του δέρματος [334]. Παρόλο που η αλληλούχιση επόμενης γενιάς χρησιμοποιεί ακόμα στοχευμένες μεθόδους ενίσχυσης [300], επιτρέπει και τη μεταγονιδιωματική αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων με υψηλή απόδοση και οικονομική αποδοτικότητα [335]. Αν και η αλληλούχιση μακράς ανάγνωσης, η οποία διαβάζει τμήματα DNA μήκους έως 10 kilobase, έχει υψηλότερα ποσοστά σφάλματος από τις μεθόδους σύντομης ανάγνωσης, βελτιώνει σημαντικά την ακρίβεια της ταξινόμησης των οργανισμών [336]. Ωστόσο, κάθε πλατφόρμα αλληλούχισης έχει τους δικούς της περιορισμούς δυσκολεύοντας την ακριβή ανάλυση της δομής των μικροβιακών κοινοτήτων και την αξιόπιστη σύγκριση των αποτελεσμάτων διαφορετικών μελετών [337]. Έχει επίσης προταθεί ότι οι ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές αλληλούχισης μπορεί να υπερεκτιμούν την ποικιλία και τον πλούτο των ειδών, καθώς δεν διαχωρίζουν το εξωκυτταρικό DNA από το DNA των ζωντανών βακτηρίων [338]. Για να αντιμετωπιστούν ορισμένα από αυτά τα ζητήματα, ορισμένες μελέτες υιοθετούν πλέον μια ολοκληρωμένη προσέγγιση μεταγονιδιωματικής που συνδυάζει την υψηλή ακρίβεια της αλληλούχισης σύντομης ανάγνωσης της Illumina με την πιο λεπτομερή ανάλυση της μακράς ανάγνωσης της Nanopore [339]. Παρόλα αυτά, η ενσωμάτωση ροών εργασίας από εντελώς διαφορετικές πλατφόρμες παραμένει πρόκληση [340], γεγονός που καθιστά αυτή

την προσέγγιση λιγότερο διαδεδομένη. Προκαταλήψεις μπορεί επίσης να επιλυθούν με μαθηματική μοντελοποίηση, για την εντοπισμό και διόρθωση των σφαλμάτων στις ροές εργασίας [337], ενώ νέες μέθοδοι υιοθετούνται για τη δημιουργία προφίλ του DNA ζωντανών βακτηρίων [338].

Επίσης, είναι γνωστό ότι η μεταγονιδιωματική, σε σύγκριση με τη στοχευμένη ενίσχυση επιτρέπει τη συναρμολόγηση πλήρων γονιδιωμάτων, προσφέροντας ταυτόχρονα λειτουργικό χαρακτηρισμό και υψηλότερη ταξινομική ανάλυση [8]. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς διαφορετικά βακτηριακά στελέχη συνδέονται με δερματικές παθήσεις, όπως το *Cutibacterium acnes* [341,342]. Οι μεταγονιδιωματικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη συναρμολόγηση βακτηριακών γονιδιωμάτων, επιτρέποντας μια πλήρη ανάλυση του μικροβιώματος του δέρματος [343], καθώς και για την αναγνώριση ταξινομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των εντερικών μικροοργανισμών στην παχυσαρκία [344]. Η μεταγονιδιωματική αλληλούχηση επιτρέπει επίσης τον χαρακτηρισμό των γονιδίων αντοχής στα αντιμικροβιακά (AMR) στο μικροβίωμα του δέρματος, όπως στο *Staphylococcus epidermidis* [345]. Οι νέες προσεγγίσεις που βασίζονται σε ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων υπόσχονται να εξελίξουν περαιτέρω αυτή την τεχνολογία, διευκολύνοντας την ανάλυση σε επίπεδο στελέχους και επιτρέποντας τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεμονωμένων βακτηρίων και των αντίστοιχων βακτηριοφάγων τους [346]. Αυτές οι τεχνολογίες αναμένεται να είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών κατά της AMR σε δερματικές και τραυματικές λοιμώξεις στο μέλλον.

Παρότι η μεταγονιδιωματική προσφέρει σημαντικά οφέλη στη μελέτη του μικροβιώματος, η ολοκληρωμένη λειτουργική ανάλυση και η συναρμολόγηση *de novo* συχνά περιορίζονται σε εξαιρετικά άφθονα στελέχη, λόγω της ανάγκης για υψηλή κάλυψη βάθους ανάγνωσης. Αυτό είναι ιδιαίτερα προκλητικό για το δέρμα, όπου τα δείγματα, όπως τα επιχρίσματα, περιέχουν συχνά πολύ μικρές ποσότητες βακτηρίων, με μεγάλη ποικιλία μικροβιακής μάζας και υψηλά επίπεδα μόλυνσης από το DNA του ξενιστή [347]. Επιπλέον, η διαδικασία απαιτεί σημαντικούς υπολογιστικούς πόρους για τη συγκέντρωση, τη χαρτογράφηση και την ανάλυση των δεδομένων. Για την αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων, έχουν αναπτυχθεί στατιστικά εργαλεία που χρησιμοποιούν ταξινομικά και φυλογενετικά δεδομένα για

να προβλέπουν λειτουργικά προφίλ και πλεονάσματα γονιδίων, καθώς και για να εντοπίζουν βιολογικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μικροβιακών προφίλ [348–350]. Επίσης, προηγμένες τεχνικές βελτιώνουν την κάλυψη βάθους ανάγνωσης, όπως η προσαρμοστική αλληλούχηση [351], και ενισχύουν την αναπαραγωγιμότητα και την αξιοπιστία της έρευνας του μικροβιώματος με την τυποποίηση των μεθόδων [352,353]. Η συνδυαστική χρήση αυτών των προόδων στη μεταγονιδιωματική ανάλυση των μικροβίων με άλλες τεχνολογίες, όπως η RNA-Sequencing [354], θα επιτρέψει μια ολοκληρωμένη κατανόηση του ρόλου του μικροβιώματος στην υγεία και τις δερματικές παθήσεις σε επίπεδο συστήματος.

Η δημιουργία κατάλληλων μοντέλων μικροβιώματος του δέρματος είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση προκλινικών δοκιμών σε νέες θεραπείες και καλλυντικά, καθώς και για την καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ξενιστή και μικροβίων. Ωστόσο, η ανάπτυξη τέτοιων μοντέλων παραμένει μια δύσκολη πρόκληση, λόγω της πολυπλοκότητας και της ποικιλομορφίας της μικροχλωρίδας του δέρματος και των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν ανάμεσα στον ξενιστή και την μικροβιακή κοινότητα [355,356]. Επίσης, υπάρχει έλλειψη ερευνών που να χρησιμοποιούν μοντέλα δέρματος για τη μελέτη του μικροβιώματος, καθώς οι περισσότερες έρευνες επικεντρώνονται κυρίως στον παθογόνο αποικισμό [111,357,358]. Για την ανάπτυξη ρεαλιστικών μοντέλων μικροβιώματος, είναι απαραίτητο να διασφαλιστεί η παρουσία μιας σταθερής μικροβιακής κοινότητας που να αντικατοπτρίζει τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του δέρματος και να χρησιμοποιηθούν μοντέλα που αναπαριστούν με ακρίβεια τη δομή και τη φυσιολογία του δέρματος.

Τα πιο απλά μοντέλα μικροβιώματος προσφέρουν μια πλατφόρμα για τη διερεύνηση των βασικών σχέσεων μεταξύ μεμονωμένων βακτηρίων και κυτταρικών μονοστοιβάδων του ξενιστή *in vitro* [359]. Παρόλο που αυτά τα μοντέλα μας επιτρέπουν να αναλύσουμε συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις ξενιστή-βακτηρίου [360,361], παραμένουν αναγωγικά και δεν μπορούν να αποτυπώσουν πλήρως την πολυπλοκότητα ενός ολοκληρωμένου μικροβιακού οικοσυστήματος σε ζωντανό δέρμα. Επιπλέον, τα κύτταρα που καλλιεργούνται σε τεχνητά περιβάλλοντα *in vitro* μεταβάλλουν τη φυσιολογική τους απόκριση, καθώς τα μέσα κυτταροκαλλιέργειας παρέχουν μια διατροφική πηγή πολύ διαφορετική από το φυσικό περιβάλλον του

δέρματος [362] και οι θερμοκρασίες καλλιέργειας είναι συνήθως υψηλότερες από τη φυσιολογική θερμοκρασία του δέρματος [363]. Για να ξεπεραστούν κάποιες από τις προκλήσεις των συστημάτων καλλιέργειας *in vitro*, ο Van Der Krieken και οι συνεργάτες ανέπτυξαν ένα μοντέλο κεράτινης στιβάδας που επιτρέπει την αξιολόγηση βακτηριακών κοινοτήτων σε πιο φυσικό υπόστρωμα [364]. Είναι αξιοσημείωτο ότι κατάφεραν να διατηρήσουν τη βακτηριακή ποικιλομορφία για έως και επτά ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή εξακολουθεί να έχει περιορισμούς, καθώς το μοντέλο δεν περιλαμβάνει βιώσιμους υποδοχείς.

Τα τρισδιάστατα μοντέλα ανθρώπινου δέρματος παρέχουν έναν πιο δυναμικό τρόπο μελέτης της φυσιολογίας του δέρματος, ενσωματώνοντας τόσο επιδερμικές όσο και δερματικές δομές. Τα μοντέλα αυτά προσομοιώνουν καλύτερα τις φυσικές κυτταρικές συμπεριφορές, προσφέροντας μια πιο φυσική εξωκυτταρική μήτρα (ECM) [365]. Επειδή η στρωματοποίηση είναι ένα κρίσιμο στοιχείο για τη φυσιολογία του δέρματος και την απόκριση του ξενιστή, ένας βασικός στόχος της ανάπτυξης τρισδιάστατων κατασκευών είναι η δημιουργία ενός επιδερμικού φραγμού που να προσομοιάζει το φυσικό δέρμα, με διαφοροποιημένα στρώματα και παρόμοια σύνθεση επιδερμικών λιπιδίων [366]. Αυτά τα μοντέλα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη μελέτη παθολογικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ξενιστή και μικροβίου. Εμπορικά διαθέσιμα ισοδύναμα ανθρώπινου δέρματος προσφέρουν στους ερευνητές μοντέλα υψηλής αναπαραγωγιμότητας που απαιτούν ελάχιστους πρόσθετους πόρους [367]. Αυτά τα μοντέλα έχουν επίσης συμβάλει στην κατανόηση του ρόλου που παίζουν οι μεμονωμένες και μικτές βακτηριακές κοινότητες στη ρύθμιση του επιδερμικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και του μεταβολισμού [356,368]. Παρόλο που έχουν πολλά πλεονεκτήματα, τα κατασκευασμένα δερματικά μοντέλα συχνά υστερούν σε πιο σύνθετες πτυχές της δομής και της φυσιολογίας του δέρματος, όπως οι αδένες, τα εξαρτήματα, τα αιμοφόρα αγγεία και τα ανοσοποιητικά κύτταρα [369]. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, έχουν δημιουργηθεί τρισδιάστατα δερματικά μοντέλα που ενσωματώνουν βασικά στοιχεία της φυσιολογίας του δέρματος, όπως η αγγείωση [370,371], τα εξαρτήματα [372] και η ενισχυμένη ανοσολογική ικανότητα [373,374]. Αυτές οι εξελίξεις θα προσφέρουν ένα πιο ρεαλιστικό περιβάλλον για τη μελέτη του μικροβιώματος του δέρματος.

Χωρίς αμφιβολία, η πιο κατάλληλη προσέγγιση *in vitro* είναι η εφαρμογή ζωντανού ανθρώπινου δέρματος, καθώς προσφέρει το πλεονέκτημα της διατήρησης της φυσικής δομής και της κυτταρικής ετερογένειας του δέρματος. Το φυσικό δέρμα διατηρεί ορισμένες ανοσολογικές δυνατότητες λόγω της παρουσίας μόνιμων ανοσοκυττάρων που παραμένουν ενεργά για τις πρώτες μέρες της καλλιέργειας [375,376]. Τα δερματικά μοσχεύματα μπορούν να ληφθούν από διάφορα σημεία του σώματος και από δότες διαφορετικών ηλικιών, φύλων, εθνικοτήτων και παθολογικών καταστάσεων, προσφέροντας έτσι μια πλήρη αντιπροσώπευση του ανθρώπινου πληθυσμού [377]. Το φρέσκο ανθρώπινο δέρμα αποτελεί μια εξαιρετικά πολύτιμη πηγή για τη μελέτη του δέρματος, ωστόσο, η πρόσβασή του είναι συχνά δύσκολη και πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε ένα συγκεκριμένο χρονικό πλαίσιο βιωσιμότητας. Επιπλέον, η καλλιέργεια δέρματος *ex vivo* δεν περιλαμβάνει συστηματική απόκριση, κάτι που είναι ιδιαίτερα κρίσιμο όταν εξετάζονται οι σχέσεις μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος του δέρματος και της μικροχλωρίδας. Η συστηματική προσέλευση ανοσοκυττάρων είναι επίσης απαραίτητη για την επούλωση των τραυμάτων [378] και την αντιμετώπιση των παθογόνων λοιμώξεων [379]. Στην πραγματικότητα, νέες μέθοδοι καλλιέργειας, όπως οι μικρορευστές τεχνολογίες, μπορεί να αντιμετωπίσουν ορισμένους από αυτούς τους περιορισμούς, επεκτείνοντας τη βιωσιμότητα των ιστών *ex vivo* [380] και ενισχύοντας την ανοσολογική ικανότητα των ανθρώπινων δερματικών μοντέλων [381].

11. Μελλοντικές οδηγίες

Η ταχεία ανάπτυξη της έρευνας για το εντερικό μικροβίωμα έχει ανοίξει νέους δρόμους για την κατανόηση του ρόλου της μικροχλωρίδας σε άλλα συστήματα του σώματος, όπως το δέρμα. Η τρέχουσα έρευνα συχνά περιορίζεται από συσχετιστικές αναλύσεις και χαμηλή ταξινομική ανάλυση, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη για τη χρήση προηγμένων τεχνικών αλληλούχησης και μοντέλων που μπορούν να μεταφραστούν σε κλινικές εφαρμογές, προκειμένου να κατανοηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και μικροβιώματος στο δέρμα.

Αν και η γνώση μας για τον ρόλο της μικροχλωρίδας του δέρματος στη δερματική βιολογία είναι ακόμη περιορισμένη, έχουν ήδη αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές για τη ρύθμιση του μικροβιώματος με στόχο τη βελτίωση της υγείας του δέρματος. Αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών που παράγονται από βακτήρια για τη θεραπεία δερματικών λοιμώξεων [382–384] και την εφαρμογή μεταμοσχεύσεων κοινών Gram-αρνητικών βακτηρίων για την αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων [132,136]. Επιπλέον, τα προβιοτικά και μεταβιοτικά φαίνεται να έχουν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στη μείωση των συμπτωμάτων της γήρανσης [385–387] και στην επιτάχυνση της επούλωσης τραυμάτων σε πειραματικά μοντέλα [388,389]. Παράλληλα, το μικροβίωμα του δέρματος μπορεί να χρησιμεύσει ως διαγνωστικό και εγκληματολογικό εργαλείο [390], βοηθώντας στην εκτίμηση της παρουσίας και της κατάστασης δερματικών παθήσεων [391,392], στη σύνδεση ατόμων με συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές [393], στην ταυτοποίηση ατόμων [394], καθώς και στην ανίχνευση επαφής μεταξύ ατόμων μέσω της μεταφοράς μικροχλωρίδας [395]. Η ευρεία χρήση εξελιγμένων μεταγονιδιωματικών τεχνολογιών μπορεί να διευκολύνει τον λειτουργικό χαρακτηρισμό του μικροβιώματος και να οδηγήσει σε εξατομικευμένες προσεγγίσεις για τη διάγνωση και τη θεραπεία καταστάσεων που σχετίζονται με μικροβιακές ανισορροπίες, προσφέροντας νέες προοπτικές τόσο στην ιατρική όσο και στην εγκληματολογία.

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αποτελεί μια επείγουσα παγκόσμια πρόκληση για την υγειονομική περίθαλψη [396], καθιστώντας απαραίτητη την ανάπτυξη θεραπειών που δεν βασίζονται σε αντιβιοτικά για την καταπολέμηση των

λοιμώξεων. Είναι πλέον κατανοητό ότι τα αντιβιοτικά ευρέος φάσματος μπορούν να εξαντλήσουν τη φυσική μικροχλωρίδα του σώματος, προάγοντας έτσι την εμφάνιση ανθεκτικών μικροοργανισμών [397,398]. Επομένως, οι νέες θεραπείες πρέπει να στοχεύουν ειδικά τα παθογόνα, μειώνοντας τις επιπτώσεις στους ξενιστές. Ένας πολλά υποσχόμενος τομέας είναι η χρήση εξωγενώς παραγόμενων προϊόντων από βακτηριοφάγους που μπορούν να εξουδετερώνουν επιλεκτικά συγκεκριμένα παθογόνα του δέρματος, όπως το *Staphylococcus aureus* [399]. Ωστόσο, απαιτείται μεγαλύτερη κατανόηση των παθογόνων του δέρματος και των μηχανισμών που οδηγούν στην παθογένεια, ώστε τα αντιμικροβιακά να γίνουν πιο αποτελεσματικά. Οι ολοκληρωμένες προσεγγίσεις που λαμβάνουν υπόψη ολόκληρα συστήματα μπορούν να ενισχύσουν την κατανόησή μας για τη δυναμική των μικροβιακών κοινοτήτων και να καθορίσουν τις λειτουργικές σχέσεις μεταξύ του δέρματος και της μικροχλωρίδας του. Οι σύγχρονες υπολογιστικές μέθοδοι έχουν τη δυνατότητα να ενοποιούν δεδομένα από διάφορες μελέτες [337], προσφέροντας έτσι μια βαθύτερη κατανόηση του μικροβιακού τοπίου του δέρματος, τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς συνθήκες. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν επίσης να προβλέψουν την εξέλιξη παθήσεων που σχετίζονται με μικροβιακή δυσβίωση [329], μειώνοντας την ανάγκη για μακροχρόνιες μελέτες. Τελικά, η αναγνώριση των βακτηριακών μοριακών υπογραφών που συνδέονται με συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων, αποτελεσματικών θεραπειών για δερματικές παθήσεις και άλλες ασθένειες.

12. Ιδανικό μοντέλο

Η πλειονότητα της σημερινής έρευνας για το μικροβίωμα του δέρματος εξακολουθεί να βασίζεται κυρίως στην αλληλούχιση αμπλικονίων, καθώς είναι λιγότερο επίπονη και οικονομικότερη. Ωστόσο, με την πρόοδο της βιοτεχνολογίας, οι μέθοδοι αλληλούχισης επόμενης γενιάς, όπως το WMS, αποδεικνύονται πιο χρήσιμες από την αλληλούχιση αμπλικονίων. Το WMS, με την ικανότητά του να διακρίνει παραλλαγές σε επίπεδο στελέχους και να προβλέπει τη λειτουργική ικανότητα των γονιδίων, αρχίζει να κερδίζει έδαφος στην έρευνα του μικροβιώματος του δέρματος. Παρόλα αυτά, οι περισσότεροι ερευνητές του μικροβιώματος του δέρματος δεν έχουν ακόμα ενσωματώσει άλλες "ωμικές" μεθόδους στην έρευνά τους. Η συνδυασμένη χρήση μεταγονιδιωμιατικής με μεταγραφομική, μεταπρωτεομική ή/και μεταβολομική προσφέρει μια πιο ολοκληρωμένη και λεπτομερή εικόνα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ξενιστή και των μικροβίων του δέρματος, τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς καταστάσεις. Καθώς η έρευνα για το μικροβίωμα του δέρματος προχωρά, γίνεται όλο και πιο αναγκαίο να επικεντρώνεται όχι μόνο στο "ποια μικρόβια είναι παρόντα;" αλλά στο "τι κάνουν τα μικρόβια που είναι παρόντα;". Το επόμενο λογικό βήμα για την προώθηση της κατανόησης των παθολογικών καταστάσεων του δέρματος περιλαμβάνει τη μελέτη των προϊόντων των μικροβίων, του τρόπου παραγωγής τους και των επακόλουθων επιδράσεων αυτών των προϊόντων. Καθώς οι απαιτήσεις για το βάθος ανάγνωσης και την ένταση εργασίας μειώνονται, είναι αναπόφευκτο ότι οι άλλες "ωμικές" μέθοδοι θα ενσωματωθούν στην έρευνα του μικροβιώματος του δέρματος [320].

Είναι σημαντικό να αναπαραχθούν 2 μοντέλα δέρματος, ένα που να προσομοιάζει ένα υγιή ανθρώπινο δερματικό μικροβίωμα και ένα μοντέλο που να προσομοιάζει μικροβίωμα ασθενούς. Τα κανονικά μοντέλα δέρματος χρησιμοποιούνται για να αναπαράγουν τη μικροβιακή σύνθεση και δραστηριότητα του υγιούς δέρματος. Αυτά τα μοντέλα διασφαλίζουν την παρουσία ευεργετικών μικροοργανισμών που συμβάλλουν στη διατήρηση του δερματικού φραγμού και στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Από την άλλη πλευρά, τα μοντέλα ασθενειών δημιουργούνται με την εισαγωγή παθογόνων ή την τροποποίηση της

μικροβιακής ισορροπίας για να προσομοιωθούν καταστάσεις όπως η ακμή, το έκζεμα και η ψωρίαση.

Για να προσομοιώσουμε τη μικροχλωρίδα του δέρματος με ένα ιδανικό μοντέλο, πρέπει να δημιουργήσουμε ένα σύστημα που να αναπαριστά όσο το δυνατόν πιο πιστά τις συνθήκες του ανθρώπινου δέρματος, περιλαμβάνοντας τις φυσικές, χημικές και βιολογικές παραμέτρους. Το μοντέλο αυτό θα πρέπει να περιλαμβάνει μια πολυστρωματική δομή, αναπαριστώντας τουλάχιστον την επιδερμίδα και το χόριο. Αυτά τα στρώματα θα πρέπει να έχουν παρόμοιες φυσικές και χημικές ιδιότητες με αυτές του ανθρώπινου δέρματος, ενώ παράλληλα πρέπει να περιέχουν κύτταρα όπως κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες, που να μιμούνται τα κύτταρα του δέρματος. Για την κατασκευή της δομής αυτής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα μοντέλα όπως τρισδιάστατα βιοεκτυπωμένα δερματικά μοντέλα, τα οποία επιτρέπουν την ακριβή αναπαράσταση των κυτταρικών στρωμάτων και της εξωκυτταρικής μήτρας.

Η μικροβιακή κοινότητα που αναπτύσσεται στο μοντέλο πρέπει να περιλαμβάνει μια ποικιλία μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες και ιούς, που απαντώνται φυσιολογικά στο δέρμα, όπως τα *Staphylococcus*, *Cutibacterium* και *Malassezia*. Σε ένα ιδανικό μοντέλο πρέπει να υπάρχουν όλη η μικροχλωρίδα του ανθρώπινου δέρματος. Αυτοί οι μικροοργανισμοί πρέπει να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τα κύτταρα του δέρματος, δημιουργώντας ένα δυναμικό σύστημα που να προσομοιώνει τις φυσικές αλληλεπιδράσεις. Για την καλλιέργεια και συντήρηση αυτών των μικροοργανισμών σε ένα πολυεπίπεδο μοντέλο δέρματος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικά θρεπτικά υλικά, τα οποία προσαρμόζονται ώστε να μιμούνται τα θρεπτικά συστατικά του δέρματος.

Το μικροπεριβάλλον του δέρματος στο μοντέλο θα πρέπει να αναπαριστά τα ακριβή επίπεδα pH του δέρματος. Επίσης, η προσθήκη λιπιδίων και σμήγματος που εκκρίνονται φυσιολογικά στο δέρμα είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ομοιότητας με το ανθρώπινο δέρμα. Παράλληλα, το μοντέλο πρέπει να περιλαμβάνει κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως μακροφάγα και κύτταρα του Langerhans, τα οποία θα επιτρέψουν τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων της μικροχλωρίδας με το ανοσοποιητικό σύστημα.

Ένα τέτοιο σύστημα πρέπει να έχει δυνατότητα δυναμικής ροής υγρών για να προσομοιώνει τον ιδρώτα και την έκκριση σμήγματος, ενώ οι αλλαγές στη θερμοκρασία και την υγρασία πρέπει να προσαρμόζονται ώστε να αντικατοπτρίζουν τις συνθήκες του πραγματικού δέρματος. Είναι απαραίτητο να υπάρχουν υλικά που μιμούνται την ελαστικότητα, διαπερατότητα και τη δομή του ανθρώπινου δέρματος είναι απαραίτητη για την καλλιέργεια μικροοργανισμών.

Το μοντέλο πρέπει επίσης να επιτρέπει την παρακολούθηση και ανάλυση της δραστηριότητας των μικροοργανισμών μέσω οπτικού μικροσκοπίου και μοριακών τεχνικών, όπως η PCR και η αλληλούχηση γονιδιωμάτων. Η χρήση τεχνικών όπως metagenomic sequencing μπορεί να προσφέρει λεπτομερείς πληροφορίες για την σύνθεση και τις δυναμικές της μικροχλωρίδας του δέρματος. Τέλος, πρέπει να είναι ευέλικτο και προσαρμόσιμο, ώστε να επιτρέπει την προσομοίωση διαφόρων πειραματικών συνθηκών, όπως φλεγμονές ή αλλαγές στην ισορροπία της μικροχλωρίδας. Η χρήση organoids ή organ-on-a-chip συστημάτων μπορεί να παρέχει την αναγκαία ευελιξία για την προσαρμογή του μοντέλου σε διαφορετικές καταστάσεις.

Αν και η πλήρης υλοποίηση ενός τέτοιου μοντέλου είναι δύσκολη με τις τρέχουσες τεχνολογίες, θα αποτελούσε ένα εξαιρετικό εργαλείο για την κατανόηση της λειτουργίας της μικροχλωρίδας του δέρματος, των αλληλεπιδράσεών της με το ανοσοποιητικό σύστημα και την ανάπτυξη νέων θεραπειών για δερματικές παθήσεις.

13. Συμπεράσματα

Παρά το γεγονός ότι το ανθρώπινο μικροβίωμα είναι γνωστό και μελετάται εδώ και δεκαετίες, συνεχίζει να απασχολεί την επιστημονική κοινότητα λόγω της πολυπλοκότητας και της κρίσιμης του σημασίας για την ανθρώπινη υγεία. Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα επικεντρώνεται όλο και περισσότερο στην ανάλυση των δυναμικών αλληλεπιδράσεων μικροοργανισμών – ξενιστή, με στόχο να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους σε διάφορες παθήσεις αλλά και στην προαγωγή της συνολικής υγείας του ανθρώπου. Μέσα από την ανάλυση των διαφόρων μεθόδων και τεχνικών που έχουν χρησιμοποιηθεί, αναδεικνύεται η πρόοδος που έχει γίνει στην κατανόηση της μικροχλωρίδας του δέρματος και των αλληλεπιδράσεών της με τον ξενιστή.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι, όπως τα δισδιάστατα μοντέλα κυτταρικών καλλιεργειών, παρότι αποτελούν θεμέλιο για την αρχική μελέτη του δέρματος, παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς, καθώς δεν αναπαριστούν πλήρως την τρισδιάστατη δομή και τη λειτουργία του δέρματος. Η ανάπτυξη τρισδιάστατων μοντέλων δέρματος, οργανοειδών και συστημάτων "skin-on-a-chip" έχει βελτιώσει την προσομοίωση του ανθρώπινου δέρματος, προσφέροντας μια πιο ολοκληρωμένη αναπαράσταση του φυσικού περιβάλλοντος του δέρματος και των μικροβιακών του κοινοτήτων. Οι τεχνικές "omics", όπως η μεταγονιδιωματική, η μεταγραφομική, η μεταπρωτεομική και η μεταβολομική, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη μικροβιακή ποικιλότητα, τη γονιδιακή έκφραση, την πρωτεϊνική δραστηριότητα και τις μεταβολικές διεργασίες στις μικροβιακές κοινότητες του δέρματος. Αυτές οι τεχνικές έχουν συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των μικροβιακών κοινοτήτων και του ρόλου τους στη δερματική υγεία και τις παθήσεις. Επιπλέον, η εισαγωγή τεχνολογιών όπως η βιοεκτύπωση (bioprinting) και τα *ex vivo* μοντέλα ανοίγει νέους δρόμους για τη μελέτη της μικροχλωρίδας του δέρματος και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ωστόσο, κάθε μέθοδος έχει τους δικούς της περιορισμούς και προκλήσεις. Η βιοεκτύπωση, αν και επιτρέπει τη δημιουργία σύνθετων δομών, εξακολουθεί να αντιμετωπίζει δυσκολίες στη δημιουργία πλήρως λειτουργικών δερματικών μοντέλων. Τα *ex vivo* μοντέλα, από την άλλη πλευρά, προσφέρουν μια πιο ρεαλιστική προσομοίωση, αλλά είναι

περιορισμένα όσον αφορά τη διάρκεια ζωής των ιστών και την αντιπροσώπευση του συνολικού ανθρώπινου περιβάλλοντος.

Συμπερασματικά, ενώ έχουν γίνει σημαντικά βήματα προς την κατεύθυνση της κατανόησης και της προσομοίωσης του ανθρώπινου δερματικού μικροβιώματος, δεν υπάρχει ακόμα ένα ιδανικό μοντέλο που να αναπαριστά πλήρως την πολυπλοκότητα του ανθρώπινου δέρματος και της μικροχλωρίδας του. Κάθε προσέγγιση έχει πλεονεκτήματα και αδυναμίες, και είναι απαραίτητη η συνεχιζόμενη έρευνα και βελτιστοποίηση αυτών των μοντέλων. Το ιδανικό μοντέλο θα πρέπει να συνδυάζει την ακριβή αναπαράσταση της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής του δέρματος, τη διατήρηση της μικροχλωρίδας σε συνθήκες παρόμοιες με το *in vivo* περιβάλλον και την ικανότητα να ανταποκρίνεται σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως η φλεγμονή και οι δερματικές παθήσεις. Μέχρι να επιτευχθεί αυτό, η έρευνα θα συνεχίσει να προσαρμόζεται και να εξελίσσεται, με στόχο τη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου μοντέλου που θα επιτρέπει την καλύτερη κατανόηση και θεραπεία των δερματικών ασθενειών.

Βιβλιογραφία

1. Dellambra, E. Non-Animal Models in Dermatological Research. *ALTEX* 2018, doi:10.14573/altex.1808022.
2. Galvan, A.; Pellicciari, C.; Calderan, L. Recreating Human Skin *In Vitro*: Should the Microbiota Be Taken into Account? *Int J Mol Sci* 2024, 25, 1165, doi:10.3390/ijms25021165.
3. Filaire, E.; Nachat-Kappes, R.; Laporte, C.; Harmand, M.; Simon, M.; Poinso, C. Alternative *in Vitro* Models Used in the Main Safety Tests of Cosmetic Products and New Challenges. *Int J Cosmet Sci* 2022, 44, 604–613, doi:10.1111/ics.12803.
4. Planz, V.; Lehr, C.-M.; Windbergs, M. *In Vitro* Models for Evaluating Safety and Efficacy of Novel Technologies for Skin Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* 2016, 242, 89–104, doi:10.1016/j.jconrel.2016.09.002.
5. Cho, H.; Won, C.H.; Chang, S.E.; Lee, M.W.; Park, G. Usefulness and Limitations of Skin Explants to Assess Laser Treatment. *Medical Lasers* 2013, 2, 58–63, doi:10.25289/ML.2013.2.2.58.
6. Zhou, L.; Zhang, X.; Paus, R.; Lu, Z. The Renaissance of Human Skin Organ Culture: A Critical Reappraisal. *Differentiation* 2018, 104, 22–35, doi:10.1016/j.diff.2018.10.002.
7. Zwick, R.K.; Guerrero-Juarez, C.F.; Horsley, V.; Plikus, M. V. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab* 2018, 27, 68–83, doi:10.1016/j.cmet.2017.12.002.
8. Smythe, P.; Wilkinson, H.N. The Skin Microbiome: Current Landscape and Future Opportunities. *Int J Mol Sci* 2023, 24, 3950, doi:10.3390/ijms24043950.
9. Ito, M.; Liu, Y.; Yang, Z.; Nguyen, J.; Liang, F.; Morris, R.J.; Cotsarelis, G. Stem Cells in the Hair Follicle Bulge Contribute to Wound Repair but Not to Homeostasis of the Epidermis. *Nat Med* 2005, 11, 1351–1354, doi:10.1038/nm1328.
10. Lu, C.P.; Polak, L.; Rocha, A.S.; Pasolli, H.A.; Chen, S.-C.; Sharma, N.; Blanpain, C.; Fuchs, E. Identification of Stem Cell Populations in Sweat Glands and Ducts Reveals Roles in Homeostasis and Wound Repair. *Cell* 2012, 150, 136–150, doi:10.1016/j.cell.2012.04.045.
11. Rittié, L.; Sachs, D.L.; Orringer, J.S.; Voorhees, J.J.; Fisher, G.J. Eccrine Sweat Glands Are Major Contributors to Reepithelialization of Human Wounds. *Am J Pathol* 2013, 182, 163–171, doi:10.1016/j.ajpath.2012.09.019.
12. Jensen, J.M.; Proksch, E. The Skin's Barrier. *G Ital Dermatol Venereol* 2009, 144, 689–700.

13. Costello, E.K.; Lauber, C.L.; Hamady, M.; Fierer, N.; Gordon, J.I.; Knight, R. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science (1979)* 2009, 326, 1694–1697, doi:10.1126/science.1177486.
14. Findley, K.; Grice, E.A. The Skin Microbiome: A Focus on Pathogens and Their Association with Skin Disease. *PLoS Pathog* 2014, 10, e1004436, doi:10.1371/journal.ppat.1004436.
15. Grice, E.A.; Kong, H.H.; Conlan, S.; Deming, C.B.; Davis, J.; Young, A.C.; Bouffard, G.G.; Blakesley, R.W.; Murray, P.R.; Green, E.D.; et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science (1979)* 2009, 324, 1190–1192, doi:10.1126/science.1171700.
16. Schommer, N.N.; Gallo, R.L. Structure and Function of the Human Skin Microbiome. *Trends Microbiol* 2013, 21, 660–668, doi:10.1016/j.tim.2013.10.001.
17. Fitz-Gibbon, S.; Tomida, S.; Chiu, B.-H.; Nguyen, L.; Du, C.; Liu, M.; Elashoff, D.; Erfe, M.C.; Loncaric, A.; Kim, J.; et al. Propionibacterium Acnes Strain Populations in the Human Skin Microbiome Associated with Acne. *Journal of Investigative Dermatology* 2013, 133, 2152–2160, doi:10.1038/jid.2013.21.
18. Paulino, L.C.; Tseng, C.-H.; Blaser, M.J. Analysis of Malassezia Microbiota in Healthy Superficial Human Skin and in Psoriatic Lesions by Multiplex Real-Time PCR. *FEMS Yeast Res* 2008, 8, 460–471, doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00359.x.
19. Gioti, A.; Nystedt, B.; Li, W.; Xu, J.; Andersson, A.; Averette, A.F.; Münch, K.; Wang, X.; Kappauf, C.; Kingsbury, J.M.; et al. Genomic Insights into the Atopic Eczema-Associated Skin Commensal Yeast *Malassezia Sympodialis*. *mBio* 2013, 4, doi:10.1128/mBio.00572-12.
20. Findley, K.; Oh, J.; Yang, J.; Conlan, S.; Deming, C.; Meyer, J.A.; Schoenfeld, D.; Nomicos, E.; Park, M.; Kong, H.H.; et al. Topographic Diversity of Fungal and Bacterial Communities in Human Skin. *Nature* 2013, 498, 367–370, doi:10.1038/nature12171.
21. Lacey, N.; Ní Raghallaigh, S.; Powell, F.C. & Demodex & Mites – Commensals, Parasites or Mutualistic Organisms? *Dermatology* 2011, 222, 128–130, doi:10.1159/000323009.
22. Lacey, N.; Kavanagh, K.; Tseng, S.C.G. Under the Lash: Demodex Mites in Human Diseases. *Biochem (Lond)* 2009, 31, 2–6.
23. Foulongne, V.; Sauvage, V.; Hebert, C.; Dereure, O.; Cheval, J.; Gouilh, M.A.; Pariente, K.; Segondy, M.; Burguière, A.; Manuguerra, J.-C.; et al. Human Skin Microbiota: High Diversity of DNA Viruses Identified on the Human Skin by High Throughput Sequencing. *PLoS One* 2012, 7, e38499, doi:10.1371/journal.pone.0038499.

24. Singh, S.; Kaye, S.; Gore, M.E.; McClure, M.O.; Bunker, C.B. The Role of Human Endogenous Retroviruses in Melanoma. *British Journal of Dermatology* 2009, *161*, 1225–1231, doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09415.x.
25. Rosenthal, M.; Goldberg, D.; Aiello, A.; Larson, E.; Foxman, B. Skin Microbiota: Microbial Community Structure and Its Potential Association with Health and Disease. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, *11*, 839–848, doi:10.1016/j.meegid.2011.03.022.
26. Antonsson, A.; Erfurt, C.; Hazard, K.; Holmgren, V.; Simon, M.; Kataoka, A.; Hossain, S.; Håkangård, C.; Hansson, B.G. Prevalence and Type Spectrum of Human Papillomaviruses in Healthy Skin Samples Collected in Three Continents. *Journal of General Virology* 2003, *84*, 1881–1886, doi:10.1099/vir.0.18836-0.
27. Delwart, E.L. Viral Metagenomics. *Rev Med Virol* 2007, *17*, 115–131, doi:10.1002/rmv.532.
28. Liu, J.; Yan, R.; Zhong, Q.; Ngo, S.; Bangayan, N.J.; Nguyen, L.; Lui, T.; Liu, M.; Erfe, M.C.; Craft, N.; et al. The Diversity and Host Interactions of *Propionibacterium Acnes* Bacteriophages on Human Skin. *ISME J* 2015, *9*, 2078–2093, doi:10.1038/ismej.2015.47.
29. Boxberger, M.; Cenizo, V.; Cassir, N.; La Scola, B. Challenges in Exploring and Manipulating the Human Skin Microbiome. *Microbiome* 2021, *9*, 125, doi:10.1186/s40168-021-01062-5.
30. Oh, J.; Byrd, A.L.; Park, M.; Kong, H.H.; Segre, J.A. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell* 2016, *165*, 854–866, doi:10.1016/j.cell.2016.04.008.
31. Clavaud, C.; Jourdain, R.; Bar-Hen, A.; Tichit, M.; Bouchier, C.; Pouradier, F.; El Rawadi, C.; Guillot, J.; Ménard-Szczebara, F.; Breton, L.; et al. Dandruff Is Associated with Disequilibrium in the Proportion of the Major Bacterial and Fungal Populations Colonizing the Scalp. *PLoS One* 2013, *8*, e58203, doi:10.1371/journal.pone.0058203.
32. Lacey, N.; Kavanagh, K.; Tseng, S.C.G. Under the Lash: Demodex Mites in Human Diseases. *Biochem (Lond)* 2009, *31*, 2–6.
33. Sinha, S.; Lin, G.; Ferenczi, K. The Skin Microbiome and the Gut-Skin Axis. *Clin Dermatol* 2021, *39*, 829–839, doi:10.1016/j.clindermatol.2021.08.021.
34. Park, D.H.; Kim, J.W.; Park, H.-J.; Hahm, D.-H. Comparative Analysis of the Microbiome across the Gut–Skin Axis in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 2021, *22*, 4228, doi:10.3390/ijms22084228.
35. Williams, H.C.; Dellavalle, R.P.; Garner, S. Acne Vulgaris. *The Lancet* 2012, *379*, 361–372, doi:10.1016/S0140-6736(11)60321-8.
36. Inuma, K.; Sato, T.; Akimoto, N.; Noguchi, N.; Sasatsu, M.; Nishijima, S.; Kurokawa, I.; Ito, A. Involvement of *Propionibacterium Acnes* in the

- Augmentation of Lipogenesis in Hamster Sebaceous Glands *In Vivo* and *In Vitro*. *Journal of Investigative Dermatology* 2009, 129, 2113–2119, doi:10.1038/jid.2009.46.
37. Bojar, R.A.; Holland, K.T. Acne and Propionibacterium Acnes. *Clin Dermatol* 2004, 22, 375–379, doi:10.1016/j.clindermatol.2004.03.005.
 38. Jarmuda, S.; O'Reilly, N.; Żaba, R.; Jakubowicz, O.; Szkaradkiewicz, A.; Kavanagh, K. Potential Role of Demodex Mites and Bacteria in the Induction of Rosacea. *J Med Microbiol* 2012, 61, 1504–1510, doi:10.1099/jmm.0.048090-0.
 39. FORTON, F.; SEYS, B. Density of Demodex Folliculorum in Rosacea: A Case-Control Study Using Standardized Skin-Surface Biopsy. *British Journal of Dermatology* 1993, 128, 650–659, doi:10.1111/j.1365-2133.1993.tb00261.x.
 40. Casas, C.; Paul, C.; Lahfa, M.; Livideanu, B.; Lejeune, O.; Alvarez-Georges, S.; Saint-Martory, C.; Degouy, A.; Mengeaud, V.; Ginisty, H.; et al. Quantification of *Demodex Folliculorum* by PCR in Rosacea and Its Relationship to Skin Innate Immune Activation. *Exp Dermatol* 2012, 21, 906–910, doi:10.1111/exd.12030.
 41. Yamasaki, K.; Kanada, K.; Macleod, D.T.; Borkowski, A.W.; Morizane, S.; Nakatsuji, T.; Cogen, A.L.; Gallo, R.L. TLR2 Expression Is Increased in Rosacea and Stimulates Enhanced Serine Protease Production by Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2011, 131, 688–697, doi:10.1038/jid.2010.351.
 42. Yamasaki, K.; Di Nardo, A.; Bardan, A.; Murakami, M.; Ohtake, T.; Coda, A.; Dorschner, R.A.; Bonnart, C.; Descargues, P.; Hovnanian, A.; et al. Increased Serine Protease Activity and Cathelicidin Promotes Skin Inflammation in Rosacea. *Nat Med* 2007, 13, 975–980, doi:10.1038/nm1616.
 43. Leung, D.Y.M. New Insights into Atopic Dermatitis: Role of Skin Barrier and Immune Dysregulation. *Allergology International* 2013, 62, 151–161, doi:10.2332/allergolint.13-RAI-0564.
 44. Kim, B.E.; Bin, L.; Ye, Y.-M.; Ramamoorthy, P.; Leung, D.Y.M. IL-25 Enhances HSV-1 Replication by Inhibiting Filaggrin Expression, and Acts Synergistically with Th2 Cytokines to Enhance HSV-1 Replication. *Journal of Investigative Dermatology* 2013, 133, 2678–2685, doi:10.1038/jid.2013.223.
 45. Kong, H.H.; Oh, J.; Deming, C.; Conlan, S.; Grice, E.A.; Beatson, M.A.; Nomicos, E.; Polley, E.C.; Komarow, H.D.; Murray, P.R.; et al. Temporal Shifts in the Skin Microbiome Associated with Disease Flares and Treatment in Children with Atopic Dermatitis. *Genome Res* 2012, 22, 850–859, doi:10.1101/gr.131029.111.
 46. Cho, I.; Blaser, M.J. The Human Microbiome: At the Interface of Health and Disease. *Nat Rev Genet* 2012, 13, 260–270, doi:10.1038/nrg3182.

47. Gao, Z.; Tseng, C.; Strober, B.E.; Pei, Z.; Blaser, M.J. Substantial Alterations of the Cutaneous Bacterial Biota in Psoriatic Lesions. *PLoS One* 2008, *3*, e2719, doi:10.1371/journal.pone.0002719.
48. Schön, M.P.; Boehncke, W.-H. Psoriasis. *New England Journal of Medicine* 2005, *352*, 1899–1912, doi:10.1056/NEJMra041320.
49. Gaitanis, G.; Magiatis, P.; Hantschke, M.; Bassukas, I.D.; Velegraki, A. The *Malassezia* Genus in Skin and Systemic Diseases. *Clin Microbiol Rev* 2012, *25*, 106–141, doi:10.1128/CMR.00021-11.
50. O'Regan, G.M.; Sandilands, A.; McLean, W.H.I.; Irvine, A.D. Filaggrin in Atopic Dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008, *122*, 689–693, doi:10.1016/j.jaci.2008.08.002.
51. Meisel, J.S.; Sfyroera, G.; Bartow-McKenney, C.; Gimblet, C.; Bugayev, J.; Horwinski, J.; Kim, B.; Brestoff, J.R.; Tyldsley, A.S.; Zheng, Q.; et al. Commensal Microbiota Modulate Gene Expression in the Skin. *Microbiome* 2018, *6*, 20, doi:10.1186/s40168-018-0404-9.
52. Williams, M.R.; Costa, S.K.; Zaramela, L.S.; Khalil, S.; Todd, D.A.; Winter, H.L.; Sanford, J.A.; O'Neill, A.M.; Liggins, M.C.; Nakatsuji, T.; et al. Quorum Sensing between Bacterial Species on the Skin Protects against Epidermal Injury in Atopic Dermatitis. *Sci Transl Med* 2019, *11*, doi:10.1126/scitranslmed.aat8329.
53. Baldwin, H.E.; Bhatia, N.D.; Friedman, A.; Eng, R.M.; Seite, S. The Role of Cutaneous Microbiota Harmony in Maintaining a Functional Skin Barrier. *J Drugs Dermatol* 2017, *16*, 12–18.
54. Nakatsuji, T.; Chen, T.H.; Narala, S.; Chun, K.A.; Two, A.M.; Yun, T.; Shafiq, F.; Kotol, P.F.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; et al. Antimicrobials from Human Skin Commensal Bacteria Protect against *Staphylococcus Aureus* and Are Deficient in Atopic Dermatitis. *Sci Transl Med* 2017, *9*, doi:10.1126/scitranslmed.aah4680.
55. Coates, M.; Lee, M.J.; Norton, D.; MacLeod, A.S. The Skin and Intestinal Microbiota and Their Specific Innate Immune Systems. *Front Immunol* 2019, *10*, 2950, doi:10.3389/fimmu.2019.02950.
56. Grice, E.A.; Segre, J.A. The Skin Microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011, *9*, 244–253, doi:10.1038/nrmicro2537.
57. Moniz, T.; Costa Lima, S.A.; Reis, S. Human Skin Models: From Healthy to Disease-mimetic Systems; Characteristics and Applications. *Br J Pharmacol* 2020, *177*, 4314–4329, doi:10.1111/bph.15184.
58. Haq, A.; Dorrani, M.; Goodyear, B.; Joshi, V.; Michniak-Kohn, B. Membrane Properties for Permeability Testing: Skin versus Synthetic Membranes. *Int J Pharm* 2018, *539*, 58–64, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.01.029.

59. de Sousa, V.; Borges; Simon; Senna; Cabral Nanoemulsion Containing Dapsone for Topical Administration: A Study of *in Vitro* Release and Epidermal Permeation. *Int J Nanomedicine* 2013, 535, doi:10.2147/IJN.S39383.
60. Köllmer, M.; Mossahebi, P.; Sacharow, E.; Gorissen, S.; Gräfe, N.; Evers, D.-H.; Herbig, M.E. Investigation of the Compatibility of the Skin PAMPA Model with Topical Formulation and Acceptor Media Additives Using Different Assay Setups. *AAPS PharmSciTech* 2019, 20, 89, doi:10.1208/s12249-019-1305-3.
61. Neupane, R.; Boddu, S.H.S.; Renukuntla, J.; Babu, R.J.; Tiwari, A.K. Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics* 2020, 12, 152, doi:10.3390/pharmaceutics12020152.
62. Rahma, A.; Lane, M.E.; Sinkó, B. A Comparative Study of the *in Vitro* Permeation of 2-Phenoxyethanol in the Skin PAMPA Model and Mammalian Skin. *Int J Pharm* 2023, 635, 122692, doi:10.1016/j.ijpharm.2023.122692.
63. Kumar, M.; Sharma, A.; Mahmood, S.; Thakur, A.; Mirza, M.A.; Bhatia, A. Franz Diffusion Cell and Its Implication in Skin Permeation Studies. *J Dispers Sci Technol* 2024, 45, 943–956, doi:10.1080/01932691.2023.2188923.
64. Salamanca, C.H.; Barrera-Ocampo, A.; Lasso, J.C.; Camacho, N.; Yarce, C.J. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics* 2018, 10, 148, doi:10.3390/pharmaceutics10030148.
65. Gruber, J. V; Terpak, N.; Massard, S.; Schwartz, A.; Bojanowski, K. Passive Enhancement of Retinol Skin Penetration by Jojoba Oil Measured Using the Skin Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (Skin-PAMPA): A Pilot Study. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2023, Volume 16, 317–324, doi:10.2147/CCID.S391667.
66. Hu, X.; Tang, M.; Dong, K.; Zhou, J.; Wang, D.; Song, L. Changes in the Skin Microbiome during Male Maturation from 0 to 25 Years of Age. *Skin Research and Technology* 2023, 29, doi:10.1111/srt.13432.
67. Luo, L.; Patel, A.; Sinko, B.; Bell, M.; Wibawa, J.; Hadgraft, J.; Lane, M.E. A Comparative Study of the *in Vitro* Permeation of Ibuprofen in Mammalian Skin, the PAMPA Model and Silicone Membrane. *Int J Pharm* 2016, 505, 14–19, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.03.043.
68. Bolla, P.K.; Clark, B.A.; Juluri, A.; Cheruvu, H.S.; Renukuntla, J. Evaluation of Formulation Parameters on Permeation of Ibuprofen from Topical Formulations Using Strat-M® Membrane. *Pharmaceutics* 2020, 12, 151, doi:10.3390/pharmaceutics12020151.
69. Czajkowska-Kośnik, A.; Szymańska, E.; Winnicka, K. Nanostructured Lipid Carriers (NLC)-Based Gel Formulations as Etodolac Delivery: From Gel Preparation to Permeation Study. *Molecules* 2022, 28, 235, doi:10.3390/molecules28010235.

70. Kittaneh, M.; Qurt, M.; Malkieh, N.; Naseef, H.; Mugeedi, R. Preparation and Evaluation of Vitamin D3 Supplementation as Transdermal Film-Forming Solution. *Pharmaceutics* 2022, *15*, 39, doi:10.3390/pharmaceutics15010039.
71. Haq, A.; Goodyear, B.; Ameen, D.; Joshi, V.; Michniak-Kohn, B. Strat-M® Synthetic Membrane: Permeability Comparison to Human Cadaver Skin. *Int J Pharm* 2018, *547*, 432–437, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.012.
72. Janvier, X.; Alexandre, S.; Boukerb, A.M.; Souak, D.; Maillot, O.; Barreau, M.; Gouriou, F.; Grillon, C.; Feuilloley, M.G.J.; Groboillot, A. Deleterious Effects of an Air Pollutant (NO₂) on a Selection of Commensal Skin Bacterial Strains, Potential Contributor to Dysbiosis? *Front Microbiol* 2020, *11*, doi:10.3389/fmicb.2020.591839.
73. COULOMB, B.; DUBERTRET, L. Skin Cell Culture and Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration* 2002, *10*, 109–112, doi:10.1046/j.1524-475X.2002.02104.x.
74. Duval, K.; Grover, H.; Han, L.-H.; Mou, Y.; Pegoraro, A.F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 2017, *32*, 266–277, doi:10.1152/physiol.00036.2016.
75. Philippeos, C.; Hughes, R.D.; Dhawan, A.; Mitry, R.R. Introduction to Cell Culture. In; 2012; pp. 1–13.
76. Teimouri, A.; Yeung, P.; Agu, R. 2D vs. 3D Cell Culture Models for *In Vitro* Topical (Dermatological) Medication Testing. In *Cell Culture*; IntechOpen, 2019.
77. Breslin, S.; O'Driscoll, L. Three-Dimensional Cell Culture: The Missing Link in Drug Discovery. *Drug Discov Today* 2013, *18*, 240–249, doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003.
78. *Animal Cell Culture*; Davis, J.M., Ed.; Wiley, 2011; ISBN 9780470666586.
79. Rheinwald, J.G.; Green, H. Epidermal Growth Factor and the Multiplication of Cultured Human Epidermal Keratinocytes. *Nature* 1977, *265*, 421–424, doi:10.1038/265421a0.
80. Letsiou, S.; Ganopoulos, I.; Kapazoglou, A.; Xanthopoulou, A.; Sarrou, E.; Tanou, G.; Molassiotis, A. Probing the Effects of Sweet Cherry (*Prunus Avium* L.) Extract on 2D and 3D Human Skin Models. *Mol Biol Rep* 2022, *49*, 2687–2693, doi:10.1007/s11033-021-07076-4.
81. Pérez-Salas, J.L.; Moreno-Jiménez, M.R.; Rocha-Guzmán, N.E.; González-Laredo, R.F.; Medina-Torres, L.; Gallegos-Infante, J.A. *In Vitro* and *Ex Vivo* Models for Screening Topical Anti-Inflammatory Drugs. *Sci Pharm* 2023, *91*, 20, doi:10.3390/scipharm91020020.
82. Jiang, M. Spontaneous Immortalization of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. *World J Stem Cells* 2010, *2*, 114, doi:10.4252/wjsc.v2.i5.114.

83. Smolińska, E.; Moskot, M.; Jakóbkiewicz-Banecka, J.; Węgrzyn, G.; Banecki, B.; Szczerkowska-Dobosz, A.; Purzycka-Bohdan, D.; Gabig-Cimińska, M. Molecular Action of Isoflavone Genistein in the Human Epithelial Cell Line HaCaT. *PLoS One* 2018, *13*, e0192297, doi:10.1371/journal.pone.0192297.
84. Gargotti, M.; Lopez-Gonzalez, U.; Byrne, H.J.; Casey, A. Comparative Studies of Cellular Viability Levels on 2D and 3D *in Vitro* Culture Matrices. *Cytotechnology* 2018, *70*, 261–273, doi:10.1007/s10616-017-0139-7.
85. Hofmann, E.; Fink, J.; Pignet, A.-L.; Schwarz, A.; Schellnegger, M.; Nischwitz, S.P.; Holzer-Geissler, J.C.J.; Kamolz, L.-P.; Kotzbeck, P. Human *In Vitro* Skin Models for Wound Healing and Wound Healing Disorders. *Biomedicines* 2023, *11*, 1056, doi:10.3390/biomedicines11041056.
86. Edmondson, R.; Broglie, J.J.; Adcock, A.F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 2014, *12*, 207–218, doi:10.1089/adt.2014.573.
87. Rademacher, F.; Simanski, M.; Gläser, R.; Harder, J. Skin Microbiota and Human 3D Skin Models. *Exp Dermatol* 2018, *27*, 489–494, doi:10.1111/exd.13517.
88. Poumay, Y.; Dupont, F.; Marcoux, S.; Leclercq-Smekens, M.; Hérin, M.; Coquette, A. A Simple Reconstructed Human Epidermis: Preparation of the Culture Model and Utilization in *in Vitro* Studies. *Arch Dermatol Res* 2004, *296*, 203–211, doi:10.1007/s00403-004-0507-y.
89. De Vuyst, E.; Salmon, M.; Evrard, C.; Lambert de Rouvroit, C.; Poumay, Y. Atopic Dermatitis Studies through *In Vitro* Models. *Front Med (Lausanne)* 2017, *4*, doi:10.3389/fmed.2017.00119.
90. de Breij, A.; Haisma, E.M.; Rietveld, M.; El Ghalbzouri, A.; van den Broek, P.J.; Dijkshoorn, L.; Nibbering, P.H. Three-Dimensional Human Skin Equivalent as a Tool To Study *Acinetobacter Baumannii* Colonization. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, *56*, 2459–2464, doi:10.1128/AAC.05975-11.
91. Salerno, M. Quantum Deformations of the Discrete Nonlinear Schrödinger Equation. *Phys Rev A (Coll Park)* 1992, *46*, 6856–6859, doi:10.1103/PhysRevA.46.6856.
92. Reuter, C.; Walles, H.; Groeber, F. Preparation of a Three-Dimensional Full Thickness Skin Equivalent. In; 2017; pp. 191–198.
93. Holland, D.B.; Bojar, R.A.; Jeremy, A.H.T.; Ingham, E.; Holland, K.T. Microbial Colonization of an *in Vitro* Model of a Tissue Engineered Human Skin Equivalent – a Novel Approach. *FEMS Microbiol Lett* 2008, *279*, 110–115, doi:10.1111/j.1574-6968.2007.01021.x.
94. Carlson, M.W.; Alt-Holland, A.; Egles, C.; Garlick, J.A. Three-Dimensional Tissue Models of Normal and Diseased Skin. *Curr Protoc Cell Biol* 2008, *41*, doi:10.1002/0471143030.cb1909s41.

95. Ali, N.; Hosseini, M.; Vainio, S.; Taïeb, A.; Cario-André, M.; Rezvani, H.R. Skin Equivalents: Skin from Reconstructions as Models to Study Skin Development and Diseases. *British Journal of Dermatology* 2015, *173*, 391–403, doi:10.1111/bjd.13886.
96. El Ghalbzouri, A.; Commandeur, S.; Rietveld, M.H.; Mulder, A.A.; Willemze, R. Replacement of Animal-Derived Collagen Matrix by Human Fibroblast-Derived Dermal Matrix for Human Skin Equivalent Products. *Biomaterials* 2009, *30*, 71–78, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.09.002.
97. Nakano, M.; Kamada, N.; Suehiro, K.; Oikawa, A.; Shibata, C.; Nakamura, Y.; Matsue, H.; Sasahara, Y.; Hosokawa, H.; Nakayama, T.; et al. Establishment of a New Three-dimensional Human Epidermal Model Reconstructed from Plucked Hair Follicle-derived Keratinocytes. *Exp Dermatol* 2016, *25*, 903–906, doi:10.1111/exd.13066.
98. Guiraud, B.; Hernandez-Pigeon, H.; Ceruti, I.; Mas, S.; Palvadeau, Y.; Saint-Martory, C.; Castex-Rizzi, N.; Duplan, H.; Bessou-Touya, S. Characterization of a Human Epidermis Model Reconstructed from Hair Follicle Keratinocytes and Comparison with Two Commercially Models and Native Skin. *Int J Cosmet Sci* 2014, *36*, 485–493, doi:10.1111/ics.12150.
99. Tjabringa, G.; Bergers, M.; van Rens, D.; de Boer, R.; Lamme, E.; Schalkwijk, J. Development and Validation of Human Psoriatic Skin Equivalents. *Am J Pathol* 2008, *173*, 815–823, doi:10.2353/ajpath.2008.080173.
100. Berroth, A.; Kühnl, J.; Kurschat, N.; Schwarz, A.; Stäb, F.; Schwarz, T.; Wenck, H.; Fölster-Holst, R.; Neufang, G. Role of Fibroblasts in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013, *131*, 1547-1554.e6, doi:10.1016/j.jaci.2013.02.029.
101. van Drongelen, V.; Danso, M.O.; Mulder, A.; Mieremet, A.; van Smeden, J.; Bouwstra, J.A.; El Ghalbzouri, A. Barrier Properties of an N/TERT-Based Human Skin Equivalent. *Tissue Eng Part A* 2014, *20*, 3041–3049, doi:10.1089/ten.tea.2014.0011.
102. Smits, J.P.H.; Niehues, H.; Rikken, G.; van Vlijmen-Willems, I.M.J.J.; van de Zande, G.W.H.J.F.; Zeeuwen, P.L.J.M.; Schalkwijk, J.; van den Bogaard, E.H. Immortalized N/TERT Keratinocytes as an Alternative Cell Source in 3D Human Epidermal Models. *Sci Rep* 2017, *7*, 11838, doi:10.1038/s41598-017-12041-y.
103. Abaci, H.; Guo, Z.; Doucet, Y.; Jacków, J.; Christiano, A. Next Generation Human Skin Constructs as Advanced Tools for Drug Development. *Exp Biol Med* 2017, *242*, 1657–1668, doi:10.1177/1535370217712690.
104. van den Broek, L.J.; Bergers, L.I.J.C.; Reijnders, C.M.A.; Gibbs, S. Progress and Future Prospectives in Skin-on-Chip Development with Emphasis on the Use of Different Cell Types and Technical Challenges. *Stem Cell Rev Rep* 2017, *13*, 418–429, doi:10.1007/s12015-017-9737-1.

105. Min, D.; Lee, W.; Bae, I.; Lee, T.R.; Croce, P.; Yoo, S. Bioprinting of Biomimetic Skin Containing Melanocytes. *Exp Dermatol* 2018, 27, 453–459, doi:10.1111/exd.13376.
106. van den Bogaard, E.H.; Tjabringa, G.S.; Joosten, I.; Vonk-Bergers, M.; van Rijssen, E.; Tijssen, H.J.; Erkens, M.; Schalkwijk, J.; Koenen, H.J.P.M. Crosstalk between Keratinocytes and T Cells in a 3D Microenvironment: A Model to Study Inflammatory Skin Diseases. *Journal of Investigative Dermatology* 2014, 134, 719–727, doi:10.1038/jid.2013.417.
107. Engelhart, K.; El Hindi, T.; Biesalski, H.-K.; Pfitzner, I. *In Vitro* Reproduction of Clinical Hallmarks of Eczematous Dermatitis in Organotypic Skin Models. *Arch Dermatol Res* 2005, 297, 1–9, doi:10.1007/s00403-005-0575-7.
108. Naik, S.; Bouladoux, N.; Linehan, J.L.; Han, S.-J.; Harrison, O.J.; Wilhelm, C.; Conlan, S.; Himmelfarb, S.; Byrd, A.L.; Deming, C.; et al. Commensal–Dendritic-Cell Interaction Specifies a Unique Protective Skin Immune Signature. *Nature* 2015, 520, 104–108, doi:10.1038/nature14052.
109. Naik, S.; Bouladoux, N.; Wilhelm, C.; Molloy, M.J.; Salcedo, R.; Kastenmuller, W.; Deming, C.; Quinones, M.; Koo, L.; Conlan, S.; et al. Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. *Science (1979)* 2012, 337, 1115–1119, doi:10.1126/science.1225152.
110. Kühbacher, A.; Henkel, H.; Stevens, P.; Grumaz, C.; Finkelmeier, D.; Burger-Kentischer, A.; Sohn, K.; Rupp, S. Central Role for Dermal Fibroblasts in Skin Model Protection against *Candida Albicans*. *J Infect Dis* 2017, 215, 1742–1752, doi:10.1093/infdis/jix153.
111. Popov, L.; Kovalski, J.; Grandi, G.; Bagnoli, F.; Amieva, M.R. Three-Dimensional Human Skin Models to Understand *Staphylococcus Aureus* Skin Colonization and Infection. *Front Immunol* 2014, 5, doi:10.3389/fimmu.2014.00041.
112. Kirker, K.R.; James, G.A. *In Vitro* Studies Evaluating the Effects of Biofilms on Wound-healing Cells: A Review. *APMIS* 2017, 125, 344–352, doi:10.1111/apm.12678.
113. Bäsler, K.; Galliano, M.; Bergmann, S.; Rohde, H.; Wladykowski, E.; Vidal-y-Sy, S.; Guiraud, B.; Houdek, P.; Schüring, G.; Volksdorf, T.; et al. Biphasic Influence of *Staphylococcus Aureus* on Human Epidermal Tight Junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2017, 1405, 53–70, doi:10.1111/nyas.13418.
114. van Drongelen, V.; Haisma, E.M.; Out-Luiting, J.J.; Nibbering, P.H.; El Ghalbzouri, A. Reduced Filaggrin Expression Is Accompanied by Increased *Staphylococcus Aureus* Colonization of Epidermal Skin Models. *Clinical & Experimental Allergy* 2014, 44, 1515–1524, doi:10.1111/cea.12443.
115. Shepherd, J.; Douglas, I.; Rimmer, S.; Swanson, L.; MacNeil, S. Development of Three-Dimensional Tissue-Engineered Models of Bacterial Infected Human

- Skin Wounds. *Tissue Eng Part C Methods* 2009, 15, 475–484, doi:10.1089/ten.tec.2008.0614.
116. Haisma, E.M.; Rietveld, M.H.; de Breij, A.; van Dissel, J.T.; El Ghalbzouri, A.; Nibbering, P.H. Inflammatory and Antimicrobial Responses to Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in an *In Vitro* Wound Infection Model. *PLoS One* 2013, 8, e82800, doi:10.1371/journal.pone.0082800.
 117. Haisma, E.M.; de Breij, A.; Chan, H.; van Dissel, J.T.; Drijfhout, J.W.; Hiemstra, P.S.; El Ghalbzouri, A.; Nibbering, P.H. LL-37-Derived Peptides Eradicate Multidrug-Resistant *Staphylococcus Aureus* from Thermally Wounded Human Skin Equivalents. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58, 4411–4419, doi:10.1128/AAC.02554-14.
 118. Nakatsuji, T.; Chen, T.H.; Narala, S.; Chun, K.A.; Two, A.M.; Yun, T.; Shafiq, F.; Kotol, P.F.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; et al. Antimicrobials from Human Skin Commensal Bacteria Protect against *Staphylococcus Aureus* and Are Deficient in Atopic Dermatitis. *Sci Transl Med* 2017, 9, doi:10.1126/scitranslmed.aah4680.
 119. Otto, M. *Staphylococcus Epidermidis* Pathogenesis. In; 2014; pp. 17–31.
 120. Nguyen, T.H.; Park, M.D.; Otto, M. Host Response to *Staphylococcus Epidermidis* Colonization and Infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2017, 7, doi:10.3389/fcimb.2017.00090.
 121. Holland, D.B.; Bojar, R.A.; Farrar, M.D.; Holland, K.T. Differential Innate Immune Responses of a Living Skin Equivalent Model Colonized by *Staphylococcus Epidermidis* or *Staphylococcus Aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2008, 290, 149–155, doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01402.x.
 122. Duckney, P.; Wong, H.K.; Serrano, J.; Yaradou, D.; Oddos, T.; Stamatias, G.N. The Role of the Skin Barrier in Modulating the Effects of Common Skin Microbial Species on the Inflammation, Differentiation and Proliferation Status of Epidermal Keratinocytes. *BMC Res Notes* 2013, 6, 474, doi:10.1186/1756-0500-6-474.
 123. Percoco, G.; Merle, C.; Jaouen, T.; Ramdani, Y.; Bénard, M.; Hillion, M.; Mijouin, L.; Lati, E.; Feuilloley, M.; Lefeuvre, L.; et al. Antimicrobial Peptides and Pro-inflammatory Cytokines Are Differentially Regulated across Epidermal Layers Following Bacterial Stimuli. *Exp Dermatol* 2013, 22, 800–806, doi:10.1111/exd.12259.
 124. Simanski, M.; Gläser, R.; Harder, J. Human Skin Engages Different Epidermal Layers to Provide Distinct Innate Defense Mechanisms. *Exp Dermatol* 2014, 23, 230–231, doi:10.1111/exd.12365.
 125. Walter, S.; Rademacher, F.; Kobinger, N.; Simanski, M.; Gläser, R.; Harder, J. RNase 7 Participates in Cutaneous Innate Control of *Corynebacterium Amycolatum*. *Sci Rep* 2017, 7, 13862, doi:10.1038/s41598-017-14383-z.

126. Weidinger, S.; Novak, N. Atopic Dermatitis. *The Lancet* 2016, **387**, 1109–1122, doi:10.1016/S0140-6736(15)00149-X.
127. David Boothe, W.; Tarbox, J.A.; Tarbox, M.B. Atopic Dermatitis: Pathophysiology. In; 2017; pp. 21–37.
128. Emmert, H.; Rademacher, F.; Gläser, R.; Harder, J. Skin Microbiota Analysis in Human 3D Skin Models—“Free Your Mice.” *Exp Dermatol* 2020, **29**, 1133–1139, doi:10.1111/exd.14164.
129. Mildner, M.; Jin, J.; Eckhart, L.; Kezic, S.; Gruber, F.; Barresi, C.; Stremnitzer, C.; Buchberger, M.; Mlitz, V.; Ballaun, C.; et al. Knockdown of Filaggrin Impairs Diffusion Barrier Function and Increases UV Sensitivity in a Human Skin Model. *Journal of Investigative Dermatology* 2010, **130**, 2286–2294, doi:10.1038/jid.2010.115.
130. van Drongelen, V.; Haisma, E.M.; Out-Luiting, J.J.; Nibbering, P.H.; El Ghalbzouri, A. Reduced Filaggrin Expression Is Accompanied by Increased *Staphylococcus Aureus* Colonization of Epidermal Skin Models. *Clinical & Experimental Allergy* 2014, **44**, 1515–1524, doi:10.1111/cea.12443.
131. Niehues, H.; Schalkwijk, J.; van Vlijmen-Willems, I.M.J.J.; Rodijk-Olthuis, D.; van Rossum, M.M.; Wladykowski, E.; Brandner, J.M.; van den Bogaard, E.H.J.; Zeeuwen, P.L.J.M. Epidermal Equivalents of Filaggrin Null Keratinocytes Do Not Show Impaired Skin Barrier Function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017, **139**, 1979-1981.e13, doi:10.1016/j.jaci.2016.09.016.
132. Myles, I.A.; Williams, K.W.; Reckhow, J.D.; Jammeh, M.L.; Pincus, N.B.; Sastalla, I.; Saleem, D.; Stone, K.D.; Datta, S.K. Transplantation of Human Skin Microbiota in Models of Atopic Dermatitis. *JCI Insight* 2016, **1**, doi:10.1172/jci.insight.86955.
133. Baurecht, H.; Rühlemann, M.C.; Rodríguez, E.; Thielking, F.; Harder, I.; Erkens, A.-S.; Stölzl, D.; Ellinghaus, E.; Hotze, M.; Lieb, W.; et al. Epidermal Lipid Composition, Barrier Integrity, and Eczematous Inflammation Are Associated with Skin Microbiome Configuration. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018, **141**, 1668-1676.e16, doi:10.1016/j.jaci.2018.01.019.
134. Nodake, Y.; Matsumoto, S.; Miura, R.; Honda, H.; Ishibashi, G.; Matsumoto, S.; Dekio, I.; Sakakibara, R. Pilot Study on Novel Skin Care Method by Augmentation with *Staphylococcus Epidermidis*, an Autologous Skin Microbe – A Blinded Randomized Clinical Trial. *J Dermatol Sci* 2015, **79**, 119–126, doi:10.1016/j.jdermsci.2015.05.001.
135. Nakatsuji, T.; Chen, T.H.; Narala, S.; Chun, K.A.; Two, A.M.; Yun, T.; Shafiq, F.; Kotol, P.F.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; et al. Antimicrobials from Human Skin Commensal Bacteria Protect against *Staphylococcus Aureus* and Are Deficient in Atopic Dermatitis. *Sci Transl Med* 2017, **9**, doi:10.1126/scitranslmed.aah4680.

136. Myles, I.A.; Earland, N.J.; Anderson, E.D.; Moore, I.N.; Kieh, M.D.; Williams, K.W.; Saleem, A.; Fontecilla, N.M.; Welch, P.A.; Darnell, D.A.; et al. First-in-Human Topical Microbiome Transplantation with *Roseomonas Mucosa* for Atopic Dermatitis. *JCI Insight* 2018, 3, doi:10.1172/jci.insight.120608.
137. Schmidt, C. Out of Your Skin. *Nat Biotechnol* 2020, 38, 392–397, doi:10.1038/s41587-020-0473-8.
138. Desmet, E.; Van Gele, M.; Grine, L.; Remaut, K.; Lambert, J. Towards the Development of a <scp>RNA</Scp> I-based Topical Treatment for Psoriasis: Proof-of-concept in a 3D Psoriasis Skin Model. *Exp Dermatol* 2018, 27, 463–469, doi:10.1111/exd.13414.
139. Sun, H.; Zhang, Y.-X.; Li, Y.-M. Generation of Skin Organoids: Potential Opportunities and Challenges. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9, doi:10.3389/fcell.2021.709824.
140. Shi, Y.; Inoue, H.; Wu, J.C.; Yamanaka, S. Induced Pluripotent Stem Cell Technology: A Decade of Progress. *Nat Rev Drug Discov* 2017, 16, 115–130, doi:10.1038/nrd.2016.245.
141. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006, 126, 663–676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
142. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007, 131, 861–872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
143. Rossi, G.; Manfrin, A.; Lutolf, M.P. Progress and Potential in Organoid Research. *Nat Rev Genet* 2018, 19, 671–687, doi:10.1038/s41576-018-0051-9.
144. Dutta, D.; Heo, I.; Clevers, H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol Med* 2017, 23, 393–410, doi:10.1016/j.molmed.2017.02.007.
145. Kim, Y.; Ju, J.H. Generation of 3D Skin Organoid from Cord Blood-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments* 2019, doi:10.3791/59297.
146. Lee, J.; Böske, R.; Tang, P.-C.; Hartman, B.H.; Heller, S.; Koehler, K.R. Hair Follicle Development in Mouse Pluripotent Stem Cell-Derived Skin Organoids. *Cell Rep* 2018, 22, 242–254, doi:10.1016/j.celrep.2017.12.007.
147. Lee, J.; Rabbani, C.C.; Gao, H.; Steinhart, M.R.; Woodruff, B.M.; Pflum, Z.E.; Kim, A.; Heller, S.; Liu, Y.; Shipchandler, T.Z.; et al. Hair-Bearing Human Skin Generated Entirely from Pluripotent Stem Cells. *Nature* 2020, 582, 399–404, doi:10.1038/s41586-020-2352-3.

148. Yin, X.; Mead, B.E.; Safaee, H.; Langer, R.; Karp, J.M.; Levy, O. Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell* 2016, *18*, 25–38, doi:10.1016/j.stem.2015.12.005.
149. Mahmoudi, S.; Brunet, A. Aging and Reprogramming: A Two-Way Street. *Curr Opin Cell Biol* 2012, *24*, 744–756, doi:10.1016/j.ceb.2012.10.004.
150. Hsu, Y.-C.; Li, L.; Fuchs, E. Emerging Interactions between Skin Stem Cells and Their Niches. *Nat Med* 2014, *20*, 847–856, doi:10.1038/nm.3643.
151. Diao, J.; Liu, J.; Wang, S.; Chang, M.; Wang, X.; Guo, B.; Yu, Q.; Yan, F.; Su, Y.; Wang, Y. Sweat Gland Organoids Contribute to Cutaneous Wound Healing and Sweat Gland Regeneration. *Cell Death Dis* 2019, *10*, 238, doi:10.1038/s41419-019-1485-5.
152. Higgins, C.A.; Chen, J.C.; Cerise, J.E.; Jahoda, C.A.B.; Christiano, A.M. Microenvironmental Reprogramming by Three-Dimensional Culture Enables Dermal Papilla Cells to Induce de Novo Human Hair-Follicle Growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013, *110*, 19679–19688, doi:10.1073/pnas.1309970110.
153. Boonekamp, K.E.; Kretschmar, K.; Wiener, D.J.; Asra, P.; Derakhshan, S.; Puschhof, J.; López-Iglesias, C.; Peters, P.J.; Basak, O.; Clevers, H. Long-Term Expansion and Differentiation of Adult Murine Epidermal Stem Cells in 3D Organoid Cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019, *116*, 14630–14638, doi:10.1073/pnas.1715272116.
154. Mora, C.; Serzanti, M.; Consiglio, A.; Memo, M.; Dell’Era, P. Clinical Potentials of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Biol Toxicol* 2017, *33*, 351–360, doi:10.1007/s10565-017-9384-y.
155. Kim, Y.; Park, N.; Rim, Y.A.; Nam, Y.; Jung, H.; Lee, K.; Ju, J.H. Establishment of a Complex Skin Structure via Layered Co-Culture of Keratinocytes and Fibroblasts Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Res Ther* 2018, *9*, 217, doi:10.1186/s13287-018-0958-2.
156. Lee, A.S.; Tang, C.; Rao, M.S.; Weissman, I.L.; Wu, J.C. Tumorigenicity as a Clinical Hurdle for Pluripotent Stem Cell Therapies. *Nat Med* 2013, *19*, 998–1004, doi:10.1038/nm.3267.
157. Hong, Z.-X.; Zhu, S.-T.; Li, H.; Luo, J.-Z.; Yang, Y.; An, Y.; Wang, X.; Wang, K. Bioengineered Skin Organoids: From Development to Applications. *Mil Med Res* 2023, *10*, 40, doi:10.1186/s40779-023-00475-7.
158. Fournière, M.; Latire, T.; Souak, D.; Feuilloley, M.G.J.; Bedoux, G. Staphylococcus Epidermidis and Cutibacterium Acnes: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics. *Microorganisms* 2020, *8*, 1752, doi:10.3390/microorganisms8111752.
159. Quan, Q.; Weng, D.; Li, X.; An, Q.; Yang, Y.; Yu, B.; Ma, Y.; Wang, J. Analysis of Drug Efficacy for Inflammatory Skin on an Organ-Chip System. *Front Bioeng Biotechnol* 2022, *10*, doi:10.3389/fbioe.2022.939629.

160. Clevers, H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 2016, *165*, 1586–1597, doi:10.1016/j.cell.2016.05.082.
161. Jung, S.; You, H.J.; Kim, M.-J.; Ko, G.; Lee, S.; Kang, K.-S. Wnt-Activating Human Skin Organoid Model of Atopic Dermatitis Induced by Staphylococcus Aureus and Its Protective Effects by Cutibacterium Acnes. *iScience* 2022, *25*, 105150, doi:10.1016/j.isci.2022.105150.
162. Elias, M.S.; Wright, S.C.; Nicholson, W. V.; Morrison, K.D.; Prescott, A.R.; Ten Have, S.; Whitfield, P.D.; Lamond, A.I.; Brown, S.J. Functional and Proteomic Analysis of a Full Thickness Filaggrin-Deficient Skin Organoid Model. *Wellcome Open Res* 2019, *4*, 134, doi:10.12688/wellcomeopenres.15405.2.
163. Lancaster, M.A.; Knoblich, J.A. Generation of Cerebral Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. *Nat Protoc* 2014, *9*, 2329–2340, doi:10.1038/nprot.2014.158.
164. Barrila, J.; Radtke, A.L.; Crabbé, A.; Sarker, S.F.; Herbst-Kralovetz, M.M.; Ott, C.M.; Nickerson, C.A. Organotypic 3D Cell Culture Models: Using the Rotating Wall Vessel to Study Host–Pathogen Interactions. *Nat Rev Microbiol* 2010, *8*, 791–801, doi:10.1038/nrmicro2423.
165. Schutgens, F.; Clevers, H. Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2020, *15*, 211–234, doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611.
166. Lloyd-Price, J.; Mahurkar, A.; Rahnavard, G.; Crabtree, J.; Orvis, J.; Hall, A.B.; Brady, A.; Creasy, H.H.; McCracken, C.; Giglio, M.G.; et al. Strains, Functions and Dynamics in the Expanded Human Microbiome Project. *Nature* 2017, *550*, 61–66, doi:10.1038/nature23889.
167. Dotti, I.; Salas, A. Potential Use of Human Stem Cell-Derived Intestinal Organoids to Study Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2018, *24*, 2501–2509, doi:10.1093/ibd/izy275.
168. Puschhof, J.; Pleguezuelos-Manzano, C.; Martinez-Silgado, A.; Akkerman, N.; Saftien, A.; Boot, C.; de Waal, A.; Beumer, J.; Dutta, D.; Heo, I.; et al. Intestinal Organoid Cocultures with Microbes. *Nat Protoc* 2021, *16*, 4633–4649, doi:10.1038/s41596-021-00589-z.
169. Fair, K.L.; Colquhoun, J.; Hannan, N.R.F. Intestinal Organoids for Modelling Intestinal Development and Disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018, *373*, doi:10.1098/rstb.2017.0217.
170. Andrews, M.G.; Kriegstein, A.R. Challenges of Organoid Research. *Annu Rev Neurosci* 2022, *45*, 23–39, doi:10.1146/annurev-neuro-111020-090812.
171. Bhatia, S.N.; Ingber, D.E. Microfluidic Organs-on-Chips. *Nat Biotechnol* 2014, *32*, 760–772, doi:10.1038/nbt.2989.

172. Risueño, I.; Valencia, L.; Jorcano, J.L.; Velasco, D. Skin-on-a-Chip Models: General Overview and Future Perspectives. *APL Bioeng* 2021, 5, 030901, doi:10.1063/5.0046376.
173. Zhang, Q.; Sito, L.; Mao, M.; He, J.; Zhang, Y.S.; Zhao, X. Current Advances in Skin-on-a-Chip Models for Drug Testing. *Microphysiol Syst* 2018, 2, doi:10.21037/mps.2018.08.01.
174. Kim, J.J.; Ellett, F.; Thomas, C.N.; Jalali, F.; Anderson, R.R.; Irimia, D.; Raff, A.B. A Microscale, Full-Thickness, Human Skin on a Chip Assay Simulating Neutrophil Responses to Skin Infection and Antibiotic Treatments. *Lab Chip* 2019, 19, 3094–3103, doi:10.1039/C9LC00399A.
175. Abaci, H.E.; Gledhill, K.; Guo, Z.; Christiano, A.M.; Shuler, M.L. Pumpless Microfluidic Platform for Drug Testing on Human Skin Equivalents. *Lab Chip* 2015, 15, 882–888, doi:10.1039/C4LC00999A.
176. Alexander, F.A.; Eggert, S.; Wiest, J. Skin-on-a-Chip: Transepithelial Electrical Resistance and Extracellular Acidification Measurements through an Automated Air-Liquid Interface. *Genes (Basel)* 2018, 9, 114, doi:10.3390/genes9020114.
177. Lee, S.; Jin, S.-P.; Kim, Y.K.; Sung, G.Y.; Chung, J.H.; Sung, J.H. Construction of 3D Multicellular Microfluidic Chip for an *in Vitro* Skin Model. *Biomed Microdevices* 2017, 19, 22, doi:10.1007/s10544-017-0156-5.
178. Song, H.J.; Lim, H.Y.; Chun, W.; Choi, K.C.; Sung, J.H.; Sung, G.Y. Fabrication of a Pumpless, Microfluidic Skin Chip from Different Collagen Sources. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2017, 56, 375–381, doi:10.1016/j.jiec.2017.07.034.
179. Jeon, H.M.; Kim, K.; Choi, K.C.; Sung, G.Y. Side-Effect Test of Sorafenib Using 3-D Skin Equivalent Based on Microfluidic Skin-on-a-Chip. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2020, 82, 71–80, doi:10.1016/j.jiec.2019.09.044.
180. Kim, K.; Jeon, H.M.; Choi, K.C.; Sung, G.Y. Testing the Effectiveness of Curcuma Longa Leaf Extract on a Skin Equivalent Using a Pumpless Skin-on-a-Chip Model. *Int J Mol Sci* 2020, 21, 3898, doi:10.3390/ijms21113898.
181. Lim, H.Y.; Kim, J.; Song, H.J.; Kim, K.; Choi, K.C.; Park, S.; Sung, G.Y. Development of Wrinkled Skin-on-a-Chip (WSOC) by Cyclic Uniaxial Stretching. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2018, 68, 238–245, doi:10.1016/j.jiec.2018.07.050.
182. Sriram, G.; Alberti, M.; Dancik, Y.; Wu, B.; Wu, R.; Feng, Z.; Ramasamy, S.; Bigliardi, P.L.; Bigliardi-Qi, M.; Wang, Z. Full-Thickness Human Skin-on-Chip with Enhanced Epidermal Morphogenesis and Barrier Function. *Materials Today* 2018, 21, 326–340, doi:10.1016/j.mattod.2017.11.002.

183. Sasaki, N.; Tsuchiya, K.; Kobayashi, H. Photolithography-Free Skin-on-a-Chip for Parallel Permeation Assays. *Sensors and Materials* 2019, *31*, 107, doi:10.18494/SAM.2019.2125.
184. Ramadan, Q.; Ting, F.C.W. *In Vitro* Micro-Physiological Immune-Competent Model of the Human Skin. *Lab Chip* 2016, *16*, 1899–1908, doi:10.1039/C6LC00229C.
185. Wufuer, M.; Lee, G.; Hur, W.; Jeon, B.; Kim, B.J.; Choi, T.H.; Lee, S. Skin-on-a-Chip Model Simulating Inflammation, Edema and Drug-Based Treatment. *Sci Rep* 2016, *6*, 37471, doi:10.1038/srep37471.
186. Risueño, I.; Valencia, L.; Holgado, M.; Jorcano, J.L.; Velasco, D. Generation of a Simplified Three-Dimensional Skin-on-a-Chip Model in a Micromachined Microfluidic Platform. *Journal of Visualized Experiments* 2021, doi:10.3791/62353.
187. Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M.; Hinderer, S.; Schenke-Layland, K. Skin Tissue Engineering — *In Vivo* and *In Vitro* Applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2011, *63*, 352–366, doi:10.1016/j.addr.2011.01.005.
188. Kostic, A.D.; Chun, E.; Robertson, L.; Glickman, J.N.; Gallini, C.A.; Michaud, M.; Clancy, T.E.; Chung, D.C.; Lochhead, P.; Hold, G.L.; et al. *Fusobacterium Nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host Microbe* 2013, *14*, 207–215, doi:10.1016/j.chom.2013.07.007.
189. Huh, D.; Matthews, B.D.; Mammoto, A.; Montoya-Zavala, M.; Hsin, H.Y.; Ingber, D.E. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science (1979)* 2010, *328*, 1662–1668, doi:10.1126/science.1188302.
190. Herzog, J.; Franke, L.; Lai, Y.; Gomez Rossi, P.; Sachtleben, J.; Weuster-Botz, D. 3D Bioprinting of Microorganisms: Principles and Applications. *Bioprocess Biosyst Eng* 2024, *47*, 443–461, doi:10.1007/s00449-023-02965-3.
191. Ventola, C.L. Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *P T* 2014, *39*, 704–711.
192. Javaid, M.; Haleem, A. 3D Bioprinting Applications for the Printing of Skin: A Brief Study. *Sensors International* 2021, *2*, 100123, doi:10.1016/j.sintl.2021.100123.
193. Mason, J.; Visintini, S.; Quay, T. *An Overview of Clinical Applications of 3-D Printing and Bioprinting*; 2016;
194. Marconi, S.; Pugliese, L.; Botti, M.; Peri, A.; Cavazzi, E.; Latteri, S.; Auricchio, F.; Pietrabissa, A. Value of 3D Printing for the Comprehension of Surgical Anatomy. *Surg Endosc* 2017, *31*, 4102–4110, doi:10.1007/s00464-017-5457-5.
195. Murphy, S. V; Atala, A. 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Nat Biotechnol* 2014, *32*, 773–785, doi:10.1038/nbt.2958.

196. Moroni, L.; Boland, T.; Burdick, J.A.; De Maria, C.; Derby, B.; Forgacs, G.; Groll, J.; Li, Q.; Malda, J.; Mironov, V.A.; et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol* 2018, 36, 384–402, doi:10.1016/j.tibtech.2017.10.015.
197. Ahn, M.; Cho, W.-W.; Park, W.; Lee, J.-S.; Choi, M.-J.; Gao, Q.; Gao, G.; Cho, D.-W.; Kim, B.S. 3D Biofabrication of Diseased Human Skin Models *in Vitro*. *Biomater Res* 2023, 27, doi:10.1186/s40824-023-00415-5.
198. Hospodiuk, M.; Dey, M.; Sosnoski, D.; Ozbolat, I.T. The Bioink: A Comprehensive Review on Bioprintable Materials. *Biotechnol Adv* 2017, 35, 217–239, doi:10.1016/j.biotechadv.2016.12.006.
199. Gu, Q.; Hao, J.; Lu, Y.; Wang, L.; Wallace, G.G.; Zhou, Q. Three-Dimensional Bio-Printing. *Sci China Life Sci* 2015, 58, 411–419, doi:10.1007/s11427-015-4850-3.
200. Ozbolat, I.T. Bioprinting Scale-up Tissue and Organ Constructs for Transplantation. *Trends Biotechnol* 2015, 33, 395–400, doi:10.1016/j.tibtech.2015.04.005.
201. Shafiee, A.; Atala, A. Printing Technologies for Medical Applications. *Trends Mol Med* 2016, 22, 254–265, doi:10.1016/j.molmed.2016.01.003.
202. Olejnik, A.; Semba, J.A.; Kulpa, A.; Dańczak-Pazdrowska, A.; Rybka, J.D.; Gornowicz-Porowska, J. 3D Bioprinting in Skin Related Research: Recent Achievements and Application Perspectives. *ACS Synth Biol* 2022, 11, 26–38, doi:10.1021/acssynbio.1c00547.
203. Lee, W.; Debasitis, J.C.; Lee, V.K.; Lee, J.-H.; Fischer, K.; Edminster, K.; Park, J.-K.; Yoo, S.-S. Multi-Layered Culture of Human Skin Fibroblasts and Keratinocytes through Three-Dimensional Freeform Fabrication. *Biomaterials* 2009, 30, 1587–1595, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.009.
204. Koch, L.; Kuhn, S.; Sorg, H.; Gruene, M.; Schlie, S.; Gaebel, R.; Polchow, B.; Reimers, K.; Stoelting, S.; Ma, N.; et al. Laser Printing of Skin Cells and Human Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2010, 16, 847–854, doi:10.1089/ten.tec.2009.0397.
205. Binder, K.W.; Zhao, W.; Aboushwareb, T.; Dice, D.; Atala, A.; Yoo, J.J. In Situ Bioprinting of the Skin for Burns. *J Am Coll Surg* 2010, 211, S76, doi:10.1016/j.jamcollsurg.2010.06.198.
206. Jakab, K.; Damon, B.; Neagu, A.; Kachurin, A.; Forgacs, G. Three-Dimensional Tissue Constructs Built by Bioprinting. *Biorheology* 2006, 43, 509–513.
207. Chang, R.; Nam, J.; Sun, W. Effects of Dispensing Pressure and Nozzle Diameter on Cell Survival from Solid Freeform Fabrication–Based Direct Cell Writing. *Tissue Eng Part A* 2008, 14, 41–48, doi:10.1089/ten.a.2007.0004.

208. Pati, F.; Jang, J.; Lee, J.W.; Cho, D.-W. Extrusion Bioprinting. In *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*; Elsevier, 2015; pp. 123–152.
209. Hinton, T.J.; Jallerat, Q.; Palchesko, R.N.; Park, J.H.; Grodzicki, M.S.; Shue, H.-J.; Ramadan, M.H.; Hudson, A.R.; Feinberg, A.W. Three-Dimensional Printing of Complex Biological Structures by Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels. *Sci Adv* 2015, *1*, doi:10.1126/sciadv.1500758.
210. Chen, D.X.B. Extrusion Bioprinting of Scaffolds. In *Extrusion Bioprinting of Scaffolds for Tissue Engineering Applications*; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp. 117–145.
211. Chen, Y.; Xiong, X.; Liu, X.; Cui, R.; Wang, C.; Zhao, G.; Zhi, W.; Lu, M.; Duan, K.; Weng, J.; et al. 3D Bioprinting of Shear-Thinning Hybrid Bioinks with Excellent Bioactivity Derived from Gellan/Alginate and Thixotropic Magnesium Phosphate-Based Gels. *J Mater Chem B* 2020, *8*, 5500–5514, doi:10.1039/D0TB00060D.
212. Loebel, C.; Rodell, C.B.; Chen, M.H.; Burdick, J.A. Shear-Thinning and Self-Healing Hydrogels as Injectable Therapeutics and for 3D-Printing. *Nat Protoc* 2017, *12*, 1521–1541, doi:10.1038/nprot.2017.053.
213. Paxton, N.; Smolan, W.; Böck, T.; Melchels, F.; Groll, J.; Jungst, T. Proposal to Assess Printability of Bioinks for Extrusion-Based Bioprinting and Evaluation of Rheological Properties Governing Bioprintability. *Biofabrication* 2017, *9*, 044107, doi:10.1088/1758-5090/aa8dd8.
214. Pardo, L.; Wilson, W.C.; Boland, T. Characterization of Patterned Self-Assembled Monolayers and Protein Arrays Generated by the Ink-Jet Method. *Langmuir* 2003, *19*, 1462–1466, doi:10.1021/la026171u.
215. Choudhury, D.; Anand, S.; Naing, M.W. The Arrival of Commercial Bioprinters – Towards 3D Bioprinting Revolution! *Int J Bioprint* 2018, *4*, 1–20, doi:10.18063/ijb.v4i2.139.
216. Calvert, P. Inkjet Printing for Materials and Devices. *Chemistry of Materials* 2001, *13*, 3299–3305, doi:10.1021/cm0101632.
217. Xu, T.; Jin, J.; Gregory, C.; Hickman, J.J.; Boland, T. Inkjet Printing of Viable Mammalian Cells. *Biomaterials* 2005, *26*, 93–99, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.04.011.
218. Cui, X.; Dean, D.; Ruggeri, Z.M.; Boland, T. Cell Damage Evaluation of Thermal Inkjet Printed Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnol Bioeng* 2010, *106*, 963–969, doi:10.1002/bit.22762.
219. Okamoto, T.; Suzuki, T.; Yamamoto, N. Microarray Fabrication with Covalent Attachment of DNA Using Bubble Jet Technology. *Nat Biotechnol* 2000, *18*, 438–441, doi:10.1038/74507.
220. Nakamura, M.; Kobayashi, A.; Takagi, F.; Watanabe, A.; Hiruma, Y.; Ohuchi, K.; Iwasaki, Y.; Horie, M.; Morita, I.; Takatani, S. Biocompatible Inkjet Printing

- Technique for Designed Seeding of Individual Living Cells. *Tissue Eng* 2005, 11, 1658–1666, doi:10.1089/ten.2005.11.1658.
221. Li, W.; Wang, M.; Ma, H.; Chapa-Villarreal, F.A.; Lobo, A.O.; Zhang, Y.S. Stereolithography Apparatus and Digital Light Processing-Based 3D Bioprinting for Tissue Fabrication. *iScience* 2023, 26, 106039, doi:10.1016/j.isci.2023.106039.
222. Raman, R.; Bashir, R. Stereolithographic 3D Bioprinting for Biomedical Applications. In *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*; Elsevier, 2015; pp. 89–121.
223. Wang, Z.; Abdulla, R.; Parker, B.; Samanipour, R.; Ghosh, S.; Kim, K. A Simple and High-Resolution Stereolithography-Based 3D Bioprinting System Using Visible Light Crosslinkable Bioinks. *Biofabrication* 2015, 7, 045009, doi:10.1088/1758-5090/7/4/045009.
224. Ng, W.L.; Lee, J.M.; Zhou, M.; Chen, Y.-W.; Lee, K.-X.A.; Yeong, W.Y.; Shen, Y.-F. Vat Polymerization-Based Bioprinting—Process, Materials, Applications and Regulatory Challenges. *Biofabrication* 2020, 12, 022001, doi:10.1088/1758-5090/ab6034.
225. Raman, R.; Bhaduri, B.; Mir, M.; Shkumatov, A.; Lee, M.K.; Popescu, G.; Kong, H.; Bashir, R. High-Resolution Projection Microstereolithography for Patterning of Neovasculature. *Adv Healthc Mater* 2016, 5, 610–619, doi:10.1002/adhm.201500721.
226. Serra, P.; Piqué, A. Laser-Induced Forward Transfer: Fundamentals and Applications. *Adv Mater Technol* 2019, 4, doi:10.1002/admt.201800099.
227. Ovsianikov, A.; Gruene, M.; Pflaum, M.; Koch, L.; Maiorana, F.; Wilhelmi, M.; Haverich, A.; Chichkov, B. Laser Printing of Cells into 3D Scaffolds. *Biofabrication* 2010, 2, 014104, doi:10.1088/1758-5082/2/1/014104.
228. Cheptsov, V.; Zhigarkov, V.; Maximova, I.; Minaev, N.; Yusupov, V. Laser-Assisted Bioprinting of Microorganisms with Hydrogel Microdroplets: Peculiarities of Ascomycota and Basidiomycota Yeast Transfer. *World J Microbiol Biotechnol* 2023, 39, 29, doi:10.1007/s11274-022-03478-z.
229. Catros, S.; Fricain, J.-C.; Guillotin, B.; Pippenger, B.; Bareille, R.; Remy, M.; Lebraud, E.; Desbat, B.; Amédée, J.; Guillemot, F. Laser-Assisted Bioprinting for Creating on-Demand Patterns of Human Osteoprogenitor Cells and Nano-Hydroxyapatite. *Biofabrication* 2011, 3, 025001, doi:10.1088/1758-5082/3/2/025001.
230. Kryou, C.; Leva, V.; Chatzipetrou, M.; Zergioti, I. Bioprinting for Liver Transplantation. *Bioengineering* 2019, 6, 95, doi:10.3390/bioengineering6040095.
231. Jones, N. Science in Three Dimensions: The Print Revolution. *Nature* 2012, 487, 22–23, doi:10.1038/487022a.

232. Guillemot, F.; Souquet, A.; Catros, S.; Guillotin, B. Laser-Assisted Cell Printing: Principle, Physical Parameters Versus Cell Fate and Perspectives in Tissue Engineering. *Nanomedicine* 2010, 5, 507–515, doi:10.2217/nnm.10.14.
233. Cheptsov, V.S.; Churbanova, E.S.; Yusupov, V.I.; Gorlenko, M.V.; Lysak, L.V.; Minaev, N.V.; Bagratashvili, V.N.; Chichkov, B.N. Laser Printing of Microbial Systems: Effect of Absorbing Metal Film. *Lett Appl Microbiol* 2018, 67, 544–549, doi:10.1111/lam.13074.
234. Cheptsov, V.S.; Tsykina, S.I.; Minaev, N. V.; Yusupov, V.I.; Chichkov, B.N. New Microorganism Isolation Techniques with Emphasis on Laser Printing. *Int J Bioprint* 2018, 5, 1–12, doi:10.18063/ijb.v5i1.165.
235. Lin, Y.; Huang, Y.; Chrisey, D.B. Metallic Foil-Assisted Laser Cell Printing. *J Biomech Eng* 2011, 133, doi:10.1115/1.4003132.
236. Semba, J.A.; Mieloch, A.A.; Rybka, J.D. Introduction to the State-of-the-Art 3D Bioprinting Methods, Design, and Applications in Orthopedics. *Bioprinting* 2020, 18, e00070, doi:10.1016/j.bprint.2019.e00070.
237. Derr, K.; Zou, J.; Luo, K.; Song, M.J.; Sittampalam, G.S.; Zhou, C.; Michael, S.; Ferrer, M.; Derr, P. Fully Three-Dimensional Bioprinted Skin Equivalent Constructs with Validated Morphology and Barrier Function. *Tissue Eng Part C Methods* 2019, 25, 334–343, doi:10.1089/ten.tec.2018.0318.
238. Liu, X.; Michael, S.; Bharti, K.; Ferrer, M.; Song, M.J. A Biofabricated Vascularized Skin Model of Atopic Dermatitis for Preclinical Studies. *Biofabrication* 2020, 12, 035002, doi:10.1088/1758-5090/ab76a1.
239. Zidarič, T.; Milojević, M.; Gradišnik, L.; Stana Kleinschek, K.; Maver, U.; Maver, T. Polysaccharide-Based Bioink Formulation for 3D Bioprinting of an *In Vitro* Model of the Human Dermis. *Nanomaterials* 2020, 10, 733, doi:10.3390/nano10040733.
240. Shi, Y.; Xing, T.L.; Zhang, H.B.; Yin, R.X.; Yang, S.M.; Wei, J.; Zhang, W.J. Tyrosinase-Doped Bioink for 3D Bioprinting of Living Skin Constructs. *Biomedical Materials* 2018, 13, 035008, doi:10.1088/1748-605X/aaa5b6.
241. Admane, P.; Gupta, A.C.; Jois, P.; Roy, S.; Chandrasekharan Lakshmanan, C.; Kalsi, G.; Bandyopadhyay, B.; Ghosh, S. Direct 3D Bioprinted Full-Thickness Skin Constructs Recapitulate Regulatory Signaling Pathways and Physiology of Human Skin. *Bioprinting* 2019, 15, e00051, doi:10.1016/j.bprint.2019.e00051.
242. Kim, B.S.; Kwon, Y.W.; Kong, J.-S.; Park, G.T.; Gao, G.; Han, W.; Kim, M.-B.; Lee, H.; Kim, J.H.; Cho, D.-W. 3D Cell Printing of *in Vitro* Stabilized Skin Model and *in Vivo* Pre-Vascularized Skin Patch Using Tissue-Specific Extracellular Matrix Bioink: A Step towards Advanced Skin Tissue Engineering. *Biomaterials* 2018, 168, 38–53, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.03.040.

243. Baltazar, T.; Merola, J.; Catarino, C.; Xie, C.B.; Kirkiles-Smith, N.C.; Lee, V.; Hotta, S.; Dai, G.; Xu, X.; Ferreira, F.C.; et al. Three Dimensional Bioprinting of a Vascularized and Perfusable Skin Graft Using Human Keratinocytes, Fibroblasts, Pericytes, and Endothelial Cells. *Tissue Eng Part A* 2020, 26, 227–238, doi:10.1089/ten.tea.2019.0201.
244. Jorgensen, A.M.; Varkey, M.; Gorkun, A.; Clouse, C.; Xu, L.; Chou, Z.; Murphy, S. V.; Molnar, J.; Lee, S.J.; Yoo, J.J.; et al. Bioprinted Skin Recapitulates Normal Collagen Remodeling in Full-Thickness Wounds. *Tissue Eng Part A* 2020, 26, 512–526, doi:10.1089/ten.tea.2019.0319.
245. Kim, B.S.; Gao, G.; Kim, J.Y.; Cho, D. 3D Cell Printing of Perfusable Vascularized Human Skin Equivalent Composed of Epidermis, Dermis, and Hypodermis for Better Structural Recapitulation of Native Skin. *Adv Healthc Mater* 2019, 8, doi:10.1002/adhm.201801019.
246. Pourchet, L.J.; Thepot, A.; Albouy, M.; Courtial, E.J.; Boher, A.; Blum, L.J.; Marquette, C.A. Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach. *Adv Healthc Mater* 2017, 6, doi:10.1002/adhm.201601101.
247. Cubo, N.; Garcia, M.; del Cañizo, J.F.; Velasco, D.; Jorcano, J.L. 3D Bioprinting of Functional Human Skin: Production and *in Vivo* Analysis. *Biofabrication* 2016, 9, 015006, doi:10.1088/1758-5090/9/1/015006.
248. Lee, V.; Singh, 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, 473–484, doi:10.1089/ten.tec.2013.0335.
249. Ng, W.L.; Yeong, W.Y.; Naing, M.W. Polyelectrolyte Gelatin-Chitosan Hydrogel Optimized for 3D Bioprinting in Skin Tissue Engineering. *Int J Bioprint* 2015, 2, 53–62, doi:10.18063/IJB.2016.01.009.
250. Rimann, M.; Bono, E.; Annaheim, H.; Bleisch, M.; Graf-Hausner, U. Standardized 3D Bioprinting of Soft Tissue Models with Human Primary Cells. *SLAS Technol* 2016, 21, 496–509, doi:10.1177/2211068214567146.
251. Min, D.; Lee, W.; Bae, I.; Lee, T.R.; Croce, P.; Yoo, S. Bioprinting of Biomimetic Skin Containing Melanocytes. *Exp Dermatol* 2018, 27, 453–459, doi:10.1111/exd.13376.
252. Kim, B.S.; Lee, J.-S.; Gao, G.; Cho, D.-W. Direct 3D Cell-Printing of Human Skin with Functional Transwell System. *Biofabrication* 2017, 9, 025034, doi:10.1088/1758-5090/aa71c8.
253. Hakimi, N.; Cheng, R.; Leng, L.; Sotoudehfar, M.; Ba, P.Q.; Bakhtyar, N.; Amini-Nik, S.; Jeschke, M.G.; Günther, A. Handheld Skin Printer: *In Situ* Formation of Planar Biomaterials and Tissues. *Lab Chip* 2018, 18, 1440–1451, doi:10.1039/C7LC01236E.
254. Gorkun, A.; Mahajan, N.; Willson, K.; Jorgensen, A.M.; Wagner, G.A.; Kasula, V.R.; Jacobson, A.; Atala, A.; Soker, S. Fabrication of Ready-to-Use *Ex Vivo*

- Human Skin Models for Chemical Testing: Current Status and Challenges. In *Skin 3-D Models and Cosmetics Toxicity*; Springer Nature Singapore: Singapore, 2023; pp. 19–37.
255. Khalida Fakhruddin; Mohd Sukri, N.S.; Muhammad Shahril, A.Z.; Nafrizam, N.F.A.; Md Khalid, F.A.; Ahmad Mazian, M.; Jamaludin, M.I. Bioprinting of Skin Tissues: From Concept to Clinical Applications. *Journal of Medical Device Technology* 2023, 2, 86–90, doi:10.11113/jmeditec.v2n2.40.
 256. Rosenberg, E.S.; Dufort, E.M.; Udo, T.; Wilberschied, L.A.; Kumar, J.; Tesoriero, J.; Weinberg, P.; Kirkwood, J.; Muse, A.; DeHovitz, J.; et al. Association of Treatment With Hydroxychloroquine or Azithromycin With In-Hospital Mortality in Patients With COVID-19 in New York State. *JAMA* 2020, 323, 2493, doi:10.1001/jama.2020.8630.
 257. Cui, X.; Boland, T.; D.D'Lima, D.; K. Lotz, M. Thermal Inkjet Printing in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2012, 6, 149–155, doi:10.2174/187221112800672949.
 258. Ng, W.L.; Wang, S.; Yeong, W.Y.; Naing, M.W. Skin Bioprinting: Impending Reality or Fantasy? *Trends Biotechnol* 2016, 34, 689–699, doi:10.1016/j.tibtech.2016.04.006.
 259. Parrado, C.; Mercado-Saenz, S.; Perez-Davo, A.; Gilaberte, Y.; Gonzalez, S.; Juarranz, A. Environmental Stressors on Skin Aging. Mechanistic Insights. *Front Pharmacol* 2019, 10, doi:10.3389/fphar.2019.00759.
 260. Vijayavenkataraman, S.; Lu, W.F.; Fuh, J.Y.H. 3D Bioprinting – An Ethical, Legal and Social Aspects (ELSA) Framework. *Bioprinting* 2016, 1–2, 11–21, doi:10.1016/j.bprint.2016.08.001.
 261. Mandrycky, C.; Wang, Z.; Kim, K.; Kim, D.-H. 3D Bioprinting for Engineering Complex Tissues. *Biotechnol Adv* 2016, 34, 422–434, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.12.011.
 262. Itoh, T.; Xia, J.; Magavi, R.; Nishihata, T.; Rytting, J.H. Use of Shed Snake Skin as a Model Membrane for *in Vitro* Percutaneous Penetration Studies. *Pharm Res* 1990, 07, 1042–1047, doi:10.1023/A:1015943200982.
 263. Rigg, P.C.; Barry, B.W. Shed Snake Skin and Hairless Mouse Skin as Model Membranes for Human Skin During Permeation Studies. *Journal of Investigative Dermatology* 1990, 94, 235–240, doi:10.1111/1523-1747.ep12874561.
 264. Cappelozza, E.; Zanzoni, S.; Malatesta, M.; Calderan, L. Integrated Microscopy and Metabolomics to Test an Innovative Fluid Dynamic System for Skin Explants *In Vitro*. *Microscopy and Microanalysis* 2021, 27, 923–934, doi:10.1017/S1431927621012010.
 265. Cappelozza, E.; Zanzoni, S.; Malatesta, M.; Calderan, L. Integrated Microscopy and Metabolomics to Test an Innovative Fluid Dynamic System

- for Skin Explants *In Vitro. Microscopy and Microanalysis* 2021, 27, 923–934, doi:10.1017/S1431927621012010.
266. Corzo-León, D.E.; Munro, C.A.; MacCallum, D.M. An *Ex Vivo* Human Skin Model to Study Superficial Fungal Infections. *Front Microbiol* 2019, 10, doi:10.3389/fmicb.2019.01172.
 267. Nasiri, M.I.; Vora, L.K.; Ershaid, J.A.; Peng, K.; Tekko, I.A.; Donnelly, R.F. Nanoemulsion-Based Dissolving Microneedle Arrays for Enhanced Intradermal and Transdermal Delivery. *Drug Deliv Transl Res* 2022, 12, 881–896, doi:10.1007/s13346-021-01107-0.
 268. Herbig, M.E.; Houdek, P.; Gorissen, S.; Zorn-Kruppa, M.; Wladykowski, E.; Volksdorf, T.; Grzybowski, S.; Kolios, G.; Willers, C.; Mallwitz, H.; et al. A Custom Tailored Model to Investigate Skin Penetration in Porcine Skin and Its Comparison with Human Skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015, 95, 99–109, doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.030.
 269. Xiang, H.; Xu, S.; Zhang, W.; Li, Y.; Zhou, Y.; Miao, X. Skin Permeation of Curcumin Nanocrystals: Effect of Particle Size, Delivery Vehicles, and Permeation Enhancer. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2023, 224, 113203, doi:10.1016/j.colsurfb.2023.113203.
 270. Galvan, A.; Cappelozza, E.; Pellequer, Y.; Conti, A.; Pozza, E.D.; Vigato, E.; Malatesta, M.; Calderan, L. An Innovative Fluid Dynamic System to Model Inflammation in Human Skin Explants. *Int J Mol Sci* 2023, 24, 6284, doi:10.3390/ijms24076284.
 271. Esposito, E.; Calderan, L.; Galvan, A.; Cappelozza, E.; Drechsler, M.; Mariani, P.; Pepe, A.; Sguizzato, M.; Vigato, E.; Dalla Pozza, E.; et al. *Ex Vivo* Evaluation of Ethosomes and Transethosomes Applied on Human Skin: A Comparative Study. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 15112, doi:10.3390/ijms232315112.
 272. Eberlin, S.; Silva, M.S. da; Facchini, G.; Silva, G.H. da; Pinheiro, A.L.T.A.; Eberlin, S.; Pinheiro, A. da S. The *Ex Vivo* Skin Model as an Alternative Tool for the Efficacy and Safety Evaluation of Topical Products. *Alternatives to Laboratory Animals* 2020, 48, 10–22, doi:10.1177/0261192920914193.
 273. Neil, J.E.; Brown, M.B.; Williams, A.C. Human Skin Explant Model for the Investigation of Topical Therapeutics. *Sci Rep* 2020, 10, 21192, doi:10.1038/s41598-020-78292-4.
 274. Neil, J.E.; Brown, M.B.; Lenn, J.D.; Williams, A.C. Accelerating Topical Formulation Development for Inflammatory Dermatoses; an *Ex Vivo* Human Skin Culture Model Consistent with Clinical Therapeutics. *Int J Pharm* 2022, 618, 121648, doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121648.
 275. Anitua, E.; Pino, A.; Aspe, L.; Martínez, M.; García, A.; Goñi, F.; Troya, M. Anti-Inflammatory Effect of Different PRGF Formulations on Cutaneous Surface. *J Tissue Viability* 2021, 30, 183–189, doi:10.1016/j.jtv.2021.02.011.

276. Jourdan, E.; Trompezinski, S.; Weber, S.; Cadars, B.; Larue, F.; Ardiet, N.; Chavagnac-Bonneville, M.; Sayag, M. Assessment of a New Biological Complex Efficacy on Dysseborrhea, Inflammation, and *Propionibacterium Acnes* Proliferation. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2016, Volume 9, 233–239, doi:10.2147/CCID.S110655.
277. Meurens, F.; Summerfield, A.; Nauwynck, H.; Saif, L.; Gerdt, V. The Pig: A Model for Human Infectious Diseases. *Trends Microbiol* 2012, 20, 50–57, doi:10.1016/j.tim.2011.11.002.
278. Barbero, A.M.; Frasc, H.F. Pig and Guinea Pig Skin as Surrogates for Human *in Vitro* Penetration Studies: A Quantitative Review. *Toxicology in Vitro* 2009, 23, 1–13, doi:10.1016/j.tiv.2008.10.008.
279. Heard, C.M. An *Ex Vivo* Skin Model to Probe Modulation of Local Cutaneous Arachidonic Acid Inflammation Pathway. *J Biol Methods* 2020, 7, e138, doi:10.14440/jbm.2020.319.
280. Hwang, J.; Jeong, H.; Lee, N.; Hur, S.; Lee, N.; Han, J.J.; Jang, H.W.; Choi, W.K.; Nam, K.T.; Lim, K.-M. *Ex Vivo* Live Full-Thickness Porcine Skin Model as a Versatile *In Vitro* Testing Method for Skin Barrier Research. *Int J Mol Sci* 2021, 22, 657, doi:10.3390/ijms22020657.
281. Ouitas, N.A.; Heard, C.M. A Novel *Ex Vivo* Skin Model for the Assessment of the Potential Transcutaneous Anti-Inflammatory Effect of Topically Applied *Harpagophytum Procumbens* Extract. *Int J Pharm* 2009, 376, 63–68, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.017.
282. Houston, D.M.J.; Bugert, J.; Denyer, S.P.; Heard, C.M. Anti-Inflammatory Activity of *Punica Granatum* L. (Pomegranate) Rind Extracts Applied Topically to *Ex Vivo* Skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2017, 112, 30–37, doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.014.
283. Wang, H.; Agrawal, A.; Wang, Y.; Crawford, D.W.; Siler, Z.D.; Peterson, M.L.; Woofter, R.T.; Labib, M.; Shin, H.Y.; Baumann, A.P.; et al. An *Ex Vivo* Model of Medical Device-Mediated Bacterial Skin Translocation. *Sci Rep* 2021, 11, 5746, doi:10.1038/s41598-021-84826-1.
284. B. Coupe, M.P.E.P.E.B.A.B.P.D. *A Fully Functional Ex Vivo Human Skin Model to Study Human Skin Microbiome USING HYPOSKIN EX VIVO SKIN MODEL*;
285. *The NativeSkin® Live Human Skin Model - A Cruelty-Free Highly Predictive Model for Relevant Study Results*;
286. Percival, S.L.; Hill, K.E.; Williams, D.W.; Hooper, S.J.; Thomas, D.W.; Costerton, J.W. A Review of the Scientific Evidence for Biofilms in Wounds. *Wound Repair and Regeneration* 2012, 20, 647–657, doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x.

287. Kravvas, G.; Veitch, D.; Al-Niaimi, F. The Increasing Relevance of Biofilms in Common Dermatological Conditions. *Journal of Dermatological Treatment* 2018, *29*, 202–207, doi:10.1080/09546634.2017.1360989.
288. Nusbaum, A.G.; Kirsner, R.S.; Charles, C.A. Biofilms in Dermatology. *Skin Therapy Lett* 2012, *17*, 1–5.
289. Donlan, R.M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases* 2001, *33*, 1387–1392, doi:10.1086/322972.
290. Moore, S.A.; Moore, A.Y. The Role of Biofilms and the Microbiome. In; 2021; pp. 203–213.
291. Attinger, C.; Wolcott, R. Clinically Addressing Biofilm in Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2012, *1*, 127–132, doi:10.1089/wound.2011.0333.
292. Hughes, G.; Webber, M.A. Novel Approaches to the Treatment of Bacterial Biofilm Infections. *Br J Pharmacol* 2017, *174*, 2237–2246, doi:10.1111/bph.13706.
293. Bowler, P.G. Antibiotic Resistance and Biofilm Tolerance: A Combined Threat in the Treatment of Chronic Infections. *J Wound Care* 2018, *27*, 273–277, doi:10.12968/jowc.2018.27.5.273.
294. Joshi, C.; Kothari, V. Methods Used for Studying Human Microbiome. In *Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Postbiotics*; Springer Nature Singapore: Singapore, 2023; pp. 29–48.
295. Ferretti, P.; Farina, S.; Cristofolini, M.; Girolomoni, G.; Tett, A.; Segata, N. Experimental Metagenomics and Ribosomal Profiling of the Human Skin Microbiome. *Exp Dermatol* 2017, *26*, 211–219, doi:10.1111/exd.13210.
296. Sandhu, S.S.; Pourang, A.; Sivamani, R.K. A Review of next Generation Sequencing Technologies Used in the Evaluation of the Skin Microbiome: What a Time to Be Alive. *Dermatol Online J* 2019, *25*.
297. Handelsman, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004, *68*, 669–685, doi:10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004.
298. Meisel, J.S.; Hannigan, G.D.; Tyldsley, A.S.; SanMiguel, A.J.; Hodkinson, B.P.; Zheng, Q.; Grice, E.A. Skin Microbiome Surveys Are Strongly Influenced by Experimental Design. *Journal of Investigative Dermatology* 2016, *136*, 947–956, doi:10.1016/j.jid.2016.01.016.
299. Kong, H.H.; Segre, J.A. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Investigating the Skin Microbiome. *Journal of Investigative Dermatology* 2017, *137*, e119–e122, doi:10.1016/j.jid.2016.07.045.

300. De Filippis, F.; Laiola, M.; Blaiotta, G.; Ercolini, D. Different Amplicon Targets for Sequencing-Based Studies of Fungal Diversity. *Appl Environ Microbiol* 2017, *83*, doi:10.1128/AEM.00905-17.
301. Jo, J.-H.; Kennedy, E.A.; Kong, H.H. Research Techniques Made Simple: Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing in Cutaneous Research. *Journal of Investigative Dermatology* 2016, *136*, e23–e27, doi:10.1016/j.jid.2016.01.005.
302. Jovel, J.; Patterson, J.; Wang, W.; Hotte, N.; O’Keefe, S.; Mitchel, T.; Perry, T.; Kao, D.; Mason, A.L.; Madsen, K.L.; et al. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front Microbiol* 2016, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.00459.
303. Ranjan, R.; Rani, A.; Metwally, A.; McGee, H.S.; Perkins, D.L. Analysis of the Microbiome: Advantages of Whole Genome Shotgun versus 16S Amplicon Sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, *469*, 967–977, doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.083.
304. Bashiardes, S.; Zilberman-Schapira, G.; Elinav, E. Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *Bioinform Biol Insights* 2016, *10*, BBI.S34610, doi:10.4137/BBI.S34610.
305. Mathieu, A.; Vogel, T.M.; Simonet, P. The Future of Skin Metagenomics. *Res Microbiol* 2014, *165*, 69–76, doi:10.1016/j.resmic.2013.12.002.
306. Kelly, D.; Yang, L.; Pei, Z. A Review of the Oesophageal Microbiome in Health and Disease. In; 2017; pp. 19–35.
307. Franzosa, E.A.; Hsu, T.; Sirota-Madi, A.; Shafquat, A.; Abu-Ali, G.; Morgan, X.C.; Huttenhower, C. Sequencing and beyond: Integrating Molecular “omics” for Microbial Community Profiling. *Nat Rev Microbiol* 2015, *13*, 360–372, doi:10.1038/nrmicro3451.
308. Bikel, S.; Valdez-Lara, A.; Cornejo-Granados, F.; Rico, K.; Canizales-Quinteros, S.; Soberón, X.; Del Pozo-Yauner, L.; Ochoa-Leyva, A. Combining Metagenomics, Metatranscriptomics and Viromics to Explore Novel Microbial Interactions: Towards a Systems-Level Understanding of Human Microbiome. *Comput Struct Biotechnol J* 2015, *13*, 390–401, doi:10.1016/j.csbj.2015.06.001.
309. Benítez-Páez, A.; Belda-Ferre, P.; Simón-Soro, A.; Mira, A. Microbiota Diversity and Gene Expression Dynamics in Human Oral Biofilms. *BMC Genomics* 2014, *15*, 311, doi:10.1186/1471-2164-15-311.
310. Wilmes, P.; Heintz-Buschart, A.; Bond, P.L. A Decade of Metaproteomics: Where We Stand and What the Future Holds. *Proteomics* 2015, *15*, 3409–3417, doi:10.1002/pmic.201500183.
311. Zhang, X.; Chen, W.; Ning, Z.; Mayne, J.; Mack, D.; Stintzi, A.; Tian, R.; Figeys, D. Deep Metaproteomics Approach for the Study of Human

- Microbiomes. *Anal Chem* 2017, 89, 9407–9415, doi:10.1021/acs.analchem.7b02224.
312. Heyer, R.; Schallert, K.; Zoun, R.; Becher, B.; Saake, G.; Benndorf, D. Challenges and Perspectives of Metaproteomic Data Analysis. *J Biotechnol* 2017, 261, 24–36, doi:10.1016/j.jbiotec.2017.06.1201.
 313. Van Den Bossche, T.; Arntzen, M.Ø.; Becher, D.; Benndorf, D.; Eijssink, V.G.H.; Henry, C.; Jagtap, P.D.; Jehmlich, N.; Juste, C.; Kunath, B.J.; et al. The Metaproteomics Initiative: A Coordinated Approach for Propelling the Functional Characterization of Microbiomes. *Microbiome* 2021, 9, 243, doi:10.1186/s40168-021-01176-w.
 314. Armengaud, J. Metaproteomics to Understand How Microbiota Function: The Crystal Ball Predicts a Promising Future. *Environ Microbiol* 2023, 25, 115–125, doi:10.1111/1462-2920.16238.
 315. Heintz-Buschart, A.; Wilmes, P. Human Gut Microbiome: Function Matters. *Trends Microbiol* 2018, 26, 563–574, doi:10.1016/j.tim.2017.11.002.
 316. Grenga, L.; Pible, O.; Miotello, G.; Culotta, K.; Ruat, S.; Roncato, M.; Gas, F.; Bellanger, L.; Claret, P.; Dunyach-Remy, C.; et al. Taxonomical and Functional Changes in <sc>COVID</Sc> -19 Faecal Microbiome Could Be Related to <sc>SARS-CoV</Sc> -2 Faecal Load. *Environ Microbiol* 2022, 24, 4299–4316, doi:10.1111/1462-2920.16028.
 317. Cheng, L.; Qi, C.; Yang, H.; Lu, M.; Cai, Y.; Fu, T.; Ren, J.; Jin, Q.; Zhang, X. GutMGene: A Comprehensive Database for Target Genes of Gut Microbes and Microbial Metabolites. *Nucleic Acids Res* 2022, 50, D795–D800, doi:10.1093/nar/gkab786.
 318. Xiong, W.; Abraham, P.E.; Li, Z.; Pan, C.; Hettich, R.L. Microbial Metaproteomics for Characterizing the Range of Metabolic Functions and Activities of Human Gut Microbiota. *Proteomics* 2015, 15, 3424–3438, doi:10.1002/pmic.201400571.
 319. Xiao, M.; Yang, J.; Feng, Y.; Zhu, Y.; Chai, X.; Wang, Y. Metaproteomic Strategies and Applications for Gut Microbial Research. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017, 101, 3077–3088, doi:10.1007/s00253-017-8215-7.
 320. Aguiar-Pulido, V.; Huang, W.; Suarez-Ulloa, V.; Cickovski, T.; Mathee, K.; Narasimhan, G. Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 2016, 12s1, EBO.S36436, doi:10.4137/EBO.S36436.
 321. Kuehne, A.; Hildebrand, J.; Soehle, J.; Wenck, H.; Terstegen, L.; Gallinat, S.; Knott, A.; Winnefeld, M.; Zamboni, N. An Integrative Metabolomics and Transcriptomics Study to Identify Metabolic Alterations in Aged Skin of Humans in Vivo. *BMC Genomics* 2017, 18, 169, doi:10.1186/s12864-017-3547-3.

322. Zeng, C.; Wen, B.; Hou, G.; Lei, L.; Mei, Z.; Jia, X.; Chen, X.; Zhu, W.; Li, J.; Kuang, Y.; et al. Lipidomics Profiling Reveals the Role of Glycerophospholipid Metabolism in Psoriasis. *Gigascience* 2017, 6, 1–11, doi:10.1093/gigascience/gix087.
323. Kong, H.H.; Andersson, B.; Clavel, T.; Common, J.E.; Jackson, S.A.; Olson, N.D.; Segre, J.A.; Traidl-Hoffmann, C. Performing Skin Microbiome Research: A Method to the Madness. *Journal of Investigative Dermatology* 2017, 137, 561–568, doi:10.1016/j.jid.2016.10.033.
324. Gupta, S.; Mortensen, M.S.; Schjørring, S.; Trivedi, U.; Vestergaard, G.; Stokholm, J.; Bisgaard, H.; Krogh, K.A.; Sørensen, S.J. Amplicon Sequencing Provides More Accurate Microbiome Information in Healthy Children Compared to Culturing. *Commun Biol* 2019, 2, 291, doi:10.1038/s42003-019-0540-1.
325. Botterel, F.; Angebault, C.; Cabaret, O.; Stressmann, F.A.; Costa, J.-M.; Wallet, F.; Wallaert, B.; Bruce, K.; Delhaes, L. Fungal and Bacterial Diversity of Airway Microbiota in Adults with Cystic Fibrosis: Concordance Between Conventional Methods and Ultra-Deep Sequencing, and Their Practical Use in the Clinical Laboratory. *Mycopathologia* 2018, 183, 171–183, doi:10.1007/s11046-017-0185-x.
326. Mahnic, A.; Breznik, V.; Bombek Ihan, M.; Rupnik, M. Comparison Between Cultivation and Sequencing Based Approaches for Microbiota Analysis in Swabs and Biopsies of Chronic Wounds. *Front Med (Lausanne)* 2021, 8, doi:10.3389/fmed.2021.607255.
327. Timm, C.M.; Loomis, K.; Stone, W.; Mehoke, T.; Brensinger, B.; Pellicore, M.; Staniczenko, P.P.A.; Charles, C.; Nayak, S.; Karig, D.K. Isolation and Characterization of Diverse Microbial Representatives from the Human Skin Microbiome. *Microbiome* 2020, 8, 58, doi:10.1186/s40168-020-00831-y.
328. Bauer, E.; Zimmermann, J.; Baldini, F.; Thiele, I.; Kaleta, C. BacArena: Individual-Based Metabolic Modeling of Heterogeneous Microbes in Complex Communities. *PLoS Comput Biol* 2017, 13, e1005544, doi:10.1371/journal.pcbi.1005544.
329. Li, L.; Sohn, J.; Genco, R.J.; Wactawski-Wende, J.; Goodison, S.; Diaz, P.I.; Sun, Y. Computational Approach to Modeling Microbiome Landscapes Associated with Chronic Human Disease Progression. *PLoS Comput Biol* 2022, 18, e1010373, doi:10.1371/journal.pcbi.1010373.
330. Schloss, P.D.; Gevers, D.; Westcott, S.L. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS One* 2011, 6, e27310, doi:10.1371/journal.pone.0027310.
331. Poulsen, C.S.; Ekstrøm, C.T.; Aarestrup, F.M.; Pamp, S.J. Library Preparation and Sequencing Platform Introduce Bias in Metagenomic-Based Characterizations of Microbiomes. *Microbiol Spectr* 2022, 10, doi:10.1128/spectrum.00090-22.

332. Brooks, J.P.; Edwards, D.J.; Harwich, M.D.; Rivera, M.C.; Fettweis, J.M.; Serrano, M.G.; Reris, R.A.; Sheth, N.U.; Huang, B.; Girerd, P.; et al. The Truth about Metagenomics: Quantifying and Counteracting Bias in 16S RRNA Studies. *BMC Microbiol* 2015, 15, 66, doi:10.1186/s12866-015-0351-6.
333. Byrd, A.L.; Deming, C.; Cassidy, S.K.B.; Harrison, O.J.; Ng, W.-I.; Conlan, S.; Belkaid, Y.; Segre, J.A.; Kong, H.H. *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Epidermidis* Strain Diversity Underlying Pediatric Atopic Dermatitis. *Sci Transl Med* 2017, 9, doi:10.1126/scitranslmed.aal4651.
334. Kong, H.H. Skin Microbiome: Genomics-Based Insights into the Diversity and Role of Skin Microbes. *Trends Mol Med* 2011, 17, 320–328, doi:10.1016/j.molmed.2011.01.013.
335. Marizzoni, M.; Gurry, T.; Provasi, S.; Greub, G.; Lopizzo, N.; Ribaldi, F.; Festari, C.; Mazzelli, M.; Mombelli, E.; Salvatore, M.; et al. Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S RRNA Gene Amplicon Sequences in Human Fecal Samples. *Front Microbiol* 2020, 11, doi:10.3389/fmicb.2020.01262.
336. Pearman, W.S.; Freed, N.E.; Silander, O.K. Testing the Advantages and Disadvantages of Short- and Long- Read Eukaryotic Metagenomics Using Simulated Reads. *BMC Bioinformatics* 2020, 21, 220, doi:10.1186/s12859-020-3528-4.
337. McLaren, M.R.; Willis, A.D.; Callahan, B.J. Consistent and Correctable Bias in Metagenomic Sequencing Experiments. *Elife* 2019, 8, doi:10.7554/eLife.46923.
338. Acosta, E.M.; Little, K.A.; Bratton, B.P.; Lopez, J.G.; Mao, X.; Payne, A.S.; Donia, M.; Devenport, D.; Gitai, Z. Bacterial DNA on the Skin Surface Overrepresents the Viable Skin Microbiome. *Elife* 2023, 12, doi:10.7554/eLife.87192.2.
339. Chen, L.; Zhao, N.; Cao, J.; Liu, X.; Xu, J.; Ma, Y.; Yu, Y.; Zhang, X.; Zhang, W.; Guan, X.; et al. Short- and Long-Read Metagenomics Expand Individualized Structural Variations in Gut Microbiomes. *Nat Commun* 2022, 13, 3175, doi:10.1038/s41467-022-30857-9.
340. Xia, Y.; Li, X.; Wu, Z.; Nie, C.; Cheng, Z.; Sun, Y.; Liu, L.; Zhang, T. Strategies and Tools in Illumina and Nanopore-integrated Metagenomic Analysis of Microbiome Data. *iMeta* 2023, 2, doi:10.1002/imt2.72.
341. Spittaels, K.-J.; Ongena, R.; Zouboulis, C.C.; Crabbé, A.; Coenye, T. Cutibacterium Acnes Phylotype I and II Strains Interact Differently With Human Skin Cells. *Front Cell Infect Microbiol* 2020, 10, doi:10.3389/fcimb.2020.575164.
342. Yu, Y.; Champer, J.; Agak, G.W.; Kao, S.; Modlin, R.L.; Kim, J. Different Propionibacterium Acnes Phylotypes Induce Distinct Immune Responses and

- Express Unique Surface and Secreted Proteomes. *Journal of Investigative Dermatology* 2016, 136, 2221–2228, doi:10.1016/j.jid.2016.06.615.
343. Saheb Kashaf, S.; Proctor, D.M.; Deming, C.; Saary, P.; Hölzer, M.; Mullikin, J.; Thomas, J.; Young, A.; Bouffard, G.; Barnabas, B.; et al. Integrating Cultivation and Metagenomics for a Multi-Kingdom View of Skin Microbiome Diversity and Functions. *Nat Microbiol* 2021, 7, 169–179, doi:10.1038/s41564-021-01011-w.
 344. Thingholm, L.B.; Rühlemann, M.C.; Koch, M.; Fuqua, B.; Laucke, G.; Boehm, R.; Bang, C.; Franzosa, E.A.; Hübenthal, M.; Rahnavard, A.; et al. Obese Individuals with and without Type 2 Diabetes Show Different Gut Microbial Functional Capacity and Composition. *Cell Host Microbe* 2019, 26, 252–264.e10, doi:10.1016/j.chom.2019.07.004.
 345. Zhou, W.; Spoto, M.; Hardy, R.; Guan, C.; Fleming, E.; Larson, P.J.; Brown, J.S.; Oh, J. Host-Specific Evolutionary and Transmission Dynamics Shape the Functional Diversification of Staphylococcus Epidermidis in Human Skin. *Cell* 2020, 180, 454–470.e18, doi:10.1016/j.cell.2020.01.006.
 346. Zheng, W.; Zhao, S.; Yin, Y.; Zhang, H.; Needham, D.M.; Evans, E.D.; Dai, C.L.; Lu, P.J.; Alm, E.J.; Weitz, D.A. High-Throughput, Single-Microbe Genomics with Strain Resolution, Applied to a Human Gut Microbiome. *Science (1979)* 2022, 376, doi:10.1126/science.abm1483.
 347. Gotschlich, E.C.; Colbert, R.A.; Gill, T. Methods in Microbiome Research: Past, Present, and Future. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2019, 33, 101498, doi:10.1016/j.berh.2020.101498.
 348. Ruiz-Perez, C.A.; Conrad, R.E.; Konstantinidis, K.T. MicrobeAnnotator: A User-Friendly, Comprehensive Functional Annotation Pipeline for Microbial Genomes. *BMC Bioinformatics* 2021, 22, 11, doi:10.1186/s12859-020-03940-5.
 349. Wemheuer, F.; Taylor, J.A.; Daniel, R.; Johnston, E.; Meinicke, P.; Thomas, T.; Wemheuer, B. Tax4Fun2: Prediction of Habitat-Specific Functional Profiles and Functional Redundancy Based on 16S rRNA Gene Sequences. *Environ Microbiome* 2020, 15, 11, doi:10.1186/s40793-020-00358-7.
 350. Parks, D.H.; Tyson, G.W.; Hugenholtz, P.; Beiko, R.G. STAMP: Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles. *Bioinformatics* 2014, 30, 3123–3124, doi:10.1093/bioinformatics/btu494.
 351. Martin, S.; Heavens, D.; Lan, Y.; Horsfield, S.; Clark, M.D.; Leggett, R.M. Nanopore Adaptive Sampling: A Tool for Enrichment of Low Abundance Species in Metagenomic Samples. *Genome Biol* 2022, 23, 11, doi:10.1186/s13059-021-02582-x.
 352. Peabody, M.A.; Van Rossum, T.; Lo, R.; Brinkman, F.S.L. Evaluation of Shotgun Metagenomics Sequence Classification Methods Using in Silico and

- in Vitro* Simulated Communities. *BMC Bioinformatics* 2015, 16, 362, doi:10.1186/s12859-015-0788-5.
353. Sinha, R.; Abu-Ali, G.; Vogtmann, E.; Fodor, A.A.; Ren, B.; Amir, A.; Schwager, E.; Crabtree, J.; Ma, S.; Abnet, C.C.; et al. Assessment of Variation in Microbial Community Amplicon Sequencing by the Microbiome Quality Control (MBQC) Project Consortium. *Nat Biotechnol* 2017, 35, 1077–1086, doi:10.1038/nbt.3981.
 354. Wilkinson, H.N.; Guinn, B.-A.; Hardman, M.J. Combined Metallomics/Transcriptomics Profiling Reveals a Major Role for Metals in Wound Repair. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9, doi:10.3389/fcell.2021.788596.
 355. Belkaid, Y.; Harrison, O.J. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* 2017, 46, 562–576, doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008.
 356. Larson, P.J.; Chong, D.; Fleming, E.; Oh, J. Challenges in Developing a Human Model System for Skin Microbiome Research. *Journal of Investigative Dermatology* 2021, 141, 228-231.e4, doi:10.1016/j.jid.2020.05.096.
 357. Wilkinson, H.N.; McBain, A.J.; Stephenson, C.; Hardman, M.J. Comparing the Effectiveness of Polymer Debriding Devices Using a Porcine Wound Biofilm Model. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016, 5, 475–485, doi:10.1089/wound.2015.0683.
 358. Kohda, K.; Li, X.; Soga, N.; Nagura, R.; Duerna, T.; Nakajima, S.; Nakagawa, I.; Ito, M.; Ikeuchi, A. An *In Vitro* Mixed Infection Model With Commensal and Pathogenic Staphylococci for the Exploration of Interspecific Interactions and Their Impacts on Skin Physiology. *Front Cell Infect Microbiol* 2021, 11, doi:10.3389/fcimb.2021.712360.
 359. Di Grazia, A.; Luca, V.; Segev-Zarko, L.T.; Shai, Y.; Mangoni, M.L. Temporins A and B Stimulate Migration of HaCaT Keratinocytes and Kill Intracellular Staphylococcus Aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58, 2520–2527, doi:10.1128/AAC.02801-13.
 360. Williams, M.R.; Nakatsuji, T.; Sanford, J.A.; Vrbanac, A.F.; Gallo, R.L. Staphylococcus Aureus Induces Increased Serine Protease Activity in Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2017, 137, 377–384, doi:10.1016/j.jid.2016.10.008.
 361. Rademacher, F.; Simanski, M.; Hesse, B.; Dombrowsky, G.; Vent, N.; Gläser, R.; Harder, J. Staphylococcus Epidermidis Activates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling in Human Keratinocytes: Implications for Cutaneous Defense. *J Innate Immun* 2019, 11, 125–135, doi:10.1159/000492162.
 362. McKee, T.J.; Komarova, S. V. Is It Time to Reinvent Basic Cell Culture Medium? *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2017, 312, C624–C626, doi:10.1152/ajpcell.00336.2016.

363. Viano, M.; Alotto, D.; Aillon, A.; Castagnoli, C.; Silvagno, F. A Thermal Gradient Modulates the Oxidative Metabolism and Growth of Human Keratinocytes. *FEBS Open Bio* 2017, 7, 1843–1853, doi:10.1002/2211-5463.12303.
364. Krieken, D.; Ederveen, T.; Hijum, S.; Jansen, P.; Melchers, W.; Scheepers, P.; Schalkwijk, J.; Zeeuwen, P. An *In Vitro* Model for Bacterial Growth on Human Stratum Corneum. *Acta Dermato Venereologica* 2016, 96, 873–879, doi:10.2340/00015555-2401.
365. Clément, V.; Roy, V.; Paré, B.; Goulet, C.R.; Deschênes, L.T.; Berthod, F.; Bolduc, S.; Gros-Louis, F. Tridimensional Cell Culture of Dermal Fibroblasts Promotes Exosome-Mediated Secretion of Extracellular Matrix Proteins. *Sci Rep* 2022, 12, 19786, doi:10.1038/s41598-022-23433-0.
366. Mieremet, A.; Rietveld, M.; Absalah, S.; van Smeden, J.; Bouwstra, J.A.; El Ghalbzouri, A. Improved Epidermal Barrier Formation in Human Skin Models by Chitosan Modulated Dermal Matrices. *PLoS One* 2017, 12, e0174478, doi:10.1371/journal.pone.0174478.
367. Zhang, Z.; Michniak-Kohn, B.B. Tissue Engineered Human Skin Equivalents. *Pharmaceutics* 2012, 4, 26–41, doi:10.3390/pharmaceutics4010026.
368. Loomis, K.H.; Wu, S.K.; Ernlund, A.; Zudock, K.; Reno, A.; Blount, K.; Karig, D.K. A Mixed Community of Skin Microbiome Representatives Influences Cutaneous Processes More than Individual Members. *Microbiome* 2021, 9, 22, doi:10.1186/s40168-020-00963-1.
369. Wilkinson, H.N.; Hardman, M.J. Wound Healing: Cellular Mechanisms and Pathological Outcomes. *Open Biol* 2020, 10, doi:10.1098/rsob.200223.
370. Lemoine, L.; Dieckmann, R.; Al Dahouk, S.; Vincze, S.; Luch, A.; Tralau, T. Microbially Competent 3D Skin: A Test System That Reveals Insight into Host–Microbe Interactions and Their Potential Toxicological Impact. *Arch Toxicol* 2020, 94, 3487–3502, doi:10.1007/s00204-020-02841-z.
371. Abaci, H.E.; Guo, Z.; Coffman, A.; Gillette, B.; Lee, W.; Sia, S.K.; Christiano, A.M. Human Skin Constructs with Spatially Controlled Vasculature Using Primary and iPSC-Derived Endothelial Cells. *Adv Healthc Mater* 2016, 5, 1800–1807, doi:10.1002/adhm.201500936.
372. Abaci, H.E.; Coffman, A.; Doucet, Y.; Chen, J.; Jacków, J.; Wang, E.; Guo, Z.; Shin, J.U.; Jahoda, C.A.; Christiano, A.M. Tissue Engineering of Human Hair Follicles Using a Biomimetic Developmental Approach. *Nat Commun* 2018, 9, 5301, doi:10.1038/s41467-018-07579-y.
373. Griffoni, C.; Neidhart, B.; Yang, K.; Groeber-Becker, F.; Maniura-Weber, K.; Dandekar, T.; Walles, H.; Rottmar, M. *In Vitro* Skin Culture Media Influence the Viability and Inflammatory Response of Primary Macrophages. *Sci Rep* 2021, 11, 7070, doi:10.1038/s41598-021-86486-7.
374. Shin, J.U.; Abaci, H.E.; Herron, L.; Guo, Z.; Sallee, B.; Pappalardo, A.; Jackow, J.; Wang, E.H.C.; Doucet, Y.; Christiano, A.M. Recapitulating T Cell

- Infiltration in 3D Psoriatic Skin Models for Patient-Specific Drug Testing. *Sci Rep* 2020, 10, 4123, doi:10.1038/s41598-020-60275-0.
375. Rakita, A.; Nikolić, N.; Mildner, M.; Matiassek, J.; Elbe-Bürger, A. Re-Epithelialization and Immune Cell Behaviour in an *Ex Vivo* Human Skin Model. *Sci Rep* 2020, 10, 1, doi:10.1038/s41598-019-56847-4.
376. Wilkinson, H.N.; Kidd, A.S.; Roberts, E.R.; Hardman, M.J. Human *Ex Vivo* Wound Model and Whole-Mount Staining Approach to Accurately Evaluate Skin Repair. *Journal of Visualized Experiments* 2021, doi:10.3791/62326.
377. Lebonvallet, N.; Jeanmaire, C.; Danoux, L.; Sibille, P.; Pauly, G.; Misery, L. The Evolution and Use of Skin Explants: Potential and Limitations for Dermatological Research. *Eur J Dermatol* 2010, 20, 671–684, doi:10.1684/ejd.2010.1054.
378. Larouche, J.; Sheoran, S.; Maruyama, K.; Martino, M.M. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2018, 7, 209–231, doi:10.1089/wound.2017.0761.
379. Zimmermann, C.; Troeltzsch, D.; Giménez-Rivera, V.A.; Galli, S.J.; Metz, M.; Maurer, M.; Siebenhaar, F. Mast Cells Are Critical for Controlling the Bacterial Burden and the Healing of Infected Wounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019, 116, 20500–20504, doi:10.1073/pnas.1908816116.
380. Ataç, B.; Wagner, I.; Horland, R.; Lauster, R.; Marx, U.; Tonevitsky, A.G.; Azar, R.P.; Lindner, G. Skin and Hair On-a-Chip: *In Vitro* Skin Models versus *Ex Vivo* Tissue Maintenance with Dynamic Perfusion. *Lab Chip* 2013, 13, 3555, doi:10.1039/c3lc50227a.
381. Lee, S.; Ko, J.; Park, D.; Lee, S.-R.; Chung, M.; Lee, Y.; Jeon, N.L. Microfluidic-Based Vascularized Microphysiological Systems. *Lab Chip* 2018, 18, 2686–2709, doi:10.1039/C8LC00285A.
382. Ovchinnikov, K. V.; Kranjec, C.; Telke, A.; Kjos, M.; Thorstensen, T.; Scherer, S.; Carlsen, H.; Diep, D.B. A Strong Synergy Between the Thiopeptide Bacteriocin Micrococcin P1 and Rifampicin Against MRSA in a Murine Skin Infection Model. *Front Immunol* 2021, 12, doi:10.3389/fimmu.2021.676534.
383. O'Neill, A.M.; Nakatsuji, T.; Hayachi, A.; Williams, M.R.; Mills, R.H.; Gonzalez, D.J.; Gallo, R.L. Identification of a Human Skin Commensal Bacterium That Selectively Kills *Cutibacterium Acnes*. *Journal of Investigative Dermatology* 2020, 140, 1619-1628.e2, doi:10.1016/j.jid.2019.12.026.
384. O'Sullivan, J.N.; Rea, M.C.; O'Connor, P.M.; Hill, C.; Ross, R.P. Human Skin Microbiota Is a Rich Source of Bacteriocin-Producing Staphylococci That Kill Human Pathogens. *FEMS Microbiol Ecol* 2019, 95, doi:10.1093/femsec/fiy241.

385. Ni, Y.; Yang, X.; Zheng, L.; Wang, Z.; Wu, L.; Jiang, J.; Yang, T.; Ma, L.; Fu, Z. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Improves Physiological Function and Cognitive Ability in Aged Mice by the Regulation of Gut Microbiota. *Mol Nutr Food Res* 2019, *63*, doi:10.1002/mnfr.201900603.
386. Huang, S.-Y.; Chen, L.-H.; Wang, M.-F.; Hsu, C.-C.; Chan, C.-H.; Li, J.-X.; Huang, H.-Y. *Lactobacillus Paracasei* PS23 Delays Progression of Age-Related Cognitive Decline in Senescence Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8) Mice. *Nutrients* 2018, *10*, 894, doi:10.3390/nu10070894.
387. Morita, Y.; Jounai, K.; Sakamoto, A.; Tomita, Y.; Sugihara, Y.; Suzuki, H.; Ohshio, K.; Otake, M.; Fujiwara, D.; Kanauchi, O.; et al. Long-Term Intake of *Lactobacillus Paracasei* KW3110 Prevents Age-Related Chronic Inflammation and Retinal Cell Loss in Physiologically Aged Mice. *Aging* 2018, *10*, 2723–2740, doi:10.18632/aging.101583.
388. Mohtashami, M.; Mohamadi, M.; Azimi-Nezhad, M.; Saeidi, J.; Nia, F.F.; Ghasemi, A. *Lactobacillus Bulgaricus* and *Lactobacillus Plantarum* Improve Diabetic Wound Healing through Modulating Inflammatory Factors. *Biotechnol Appl Biochem* 2020, bab.2064, doi:10.1002/bab.2064.
389. Nam, Y.; Kim, J.; Baek, J.; Kim, W. Improvement of Cutaneous Wound Healing via Topical Application of Heat-Killed *Lactococcus Chungangensis* CAU 1447 on Diabetic Mice. *Nutrients* 2021, *13*, 2666, doi:10.3390/nu13082666.
390. Zhang, J.; Liu, W.; Simayijiang, H.; Hu, P.; Yan, J. Application of Microbiome in Forensics. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2023, *21*, 97–107, doi:10.1016/j.gpb.2022.07.007.
391. Carmona-Cruz, S.; Orozco-Covarrubias, L.; Sáez-de-Ocariz, M. The Human Skin Microbiome in Selected Cutaneous Diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 2022, *12*, doi:10.3389/fcimb.2022.834135.
392. Chen, Y.E.; Tsao, H. The Skin Microbiome: Current Perspectives and Future Challenges. *J Am Acad Dermatol* 2013, *69*, 143-155.e3, doi:10.1016/j.jaad.2013.01.016.
393. Cho, H.-W.; Eom, Y.-B. Forensic Analysis of Human Microbiome in Skin and Body Fluids Based on Geographic Location. *Front Cell Infect Microbiol* 2021, *11*, doi:10.3389/fcimb.2021.695191.
394. Fierer, N.; Lauber, C.L.; Zhou, N.; McDonald, D.; Costello, E.K.; Knight, R. Forensic Identification Using Skin Bacterial Communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, *107*, 6477–6481, doi:10.1073/pnas.1000162107.
395. Neckovic, A.; van Oorschot, R.A.H.; Szkuta, B.; Durdle, A. Investigation of Direct and Indirect Transfer of Microbiomes between Individuals. *Forensic Sci Int Genet* 2020, *45*, 102212, doi:10.1016/j.fsigen.2019.102212.
396. Hernando-Amado, S.; Coque, T.M.; Baquero, F.; Martínez, J.L. Defining and Combating Antibiotic Resistance from One Health and Global Health

- Perspectives. *Nat Microbiol* 2019, 4, 1432–1442, doi:10.1038/s41564-019-0503-9.
397. de Nies, L.; Busi, S.B.; Tsenkova, M.; Halder, R.; Letellier, E.; Wilmes, P. Evolution of the Murine Gut Resistome Following Broad-Spectrum Antibiotic Treatment. *Nat Commun* 2022, 13, 2296, doi:10.1038/s41467-022-29919-9.
398. Josefsdottir, K.S.; Baldrige, M.T.; Kadmon, C.S.; King, K.Y. Antibiotics Impair Murine Hematopoiesis by Depleting the Intestinal Microbiota. *Blood* 2017, 129, 729–739, doi:10.1182/blood-2016-03-708594.
399. Ovchinnikov, K. V.; Kranjec, C.; Thorstensen, T.; Carlsen, H.; Diep, D.B. Successful Development of Bacteriocins into Therapeutic Formulation for Treatment of MRSA Skin Infection in a Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother* 2020, 64, doi:10.1128/AAC.00829-20.

Παράρτημα:

Πίνακας 1: Θέση των μικροοργανισμών στο ανθρώπινο δέρμα.2

Πίνακας 2: Συσχέτιση ασθενειών του δέρματος με μικροοργανισμούς.5

Εικόνα 1: Διάφορες εναλλακτικές του άξονα εντέρου – δέρματος στην ατοπική δερματίτιδα.5

Εικόνα 2: Μια συνοπτική παρουσίαση των 2D και 3D *in vitro* μοντέλων του ανθρώπινου δέρματος.12

Εικόνα 3: Δημιουργία οργανοειδών. Σχηματική επισκόπηση καλλιέργειας.23

Εικόνα 4: Επισκόπηση της διαδικασίας κατασκευής τρισδιάστατου δέρματος και των κύριων εφαρμογών.39

Εικόνα 5: Εχ νίνο μοντέλο που προσομοιώνει την ανάπτυξη μιας διαρκούς λοίμωξης συνδεδεμένης με ιατρική συσκευή.45