

## РАЗРАБОТКА ПОЛИМЕРНОЙ ПОДЛОЖКИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

© Ю. А. Швед,<sup>1,\*</sup> Л. В. Кухарева,<sup>2</sup> И. М. Зорин,<sup>1</sup> А. Ю. Соловьев,<sup>3</sup> М. И. Блинова,<sup>2</sup>  
А. Ю. Билибин,<sup>1</sup> Г. П. Пинаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра химии высокомолекулярных соединений С.-Петербургского государственного университета,

<sup>2</sup> Институт цитологии РАН и <sup>3</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург;

\* электронный адрес: [ulychka@rambler.ru](mailto:ulychka@rambler.ru)

Исследовали влияние гидрофильности пленок полимолочной кислоты на поведение культивируемых на них фибробластов кожи человека. Получен ряд пленок из полимолочной кислоты, на которых выращивали фибробласты. Для увеличения гидрофильности поверхности в процессе получения пленок варьировали растворители — ацетон и хлористый метилен. Из полярного растворителя — ацетона — получались пленки, которые обладают гидрофильной поверхностью в отличие от пленок, полученных из хлористого метилена. Производили оценку гидрофобности поверхности. Свойства пленок, существенные для культивирования клеток, оценивали по морфологии, адгезии и пролиферации клеток на этих пленках. Более гидрофильная пленка, полученная из ацетона, оказалась для фибробластов более благоприятной — клетки на ней лучше прикрепляются, распластаются и пролиферируют.

Ключевые слова: полимолочная кислота, ацетон, хлористый метилен, фибробласты.

Клеточная заместительная терапия — область медицины, в которой в настоящее время широко применяются культивируемые клетки для лечения поврежденных органов и тканей. Одним из этапов этой биомедицинской технологии является перенос культивируемых клеток из специальных сосудов на поврежденный участок органа или ткани. Как правило, большинство клеток культивируют на твердых подложках (Zacchi et al., 1998; Nutmacher, 2000; Miralles et al., 2001; Khor et al., 2002; Schantz et al., 2002). Для отделения выращенного *in vitro* пласта клеток от твердой подложки используют протеолитические ферменты. В результате переноса клеточного пласта повреждаются белковые молекулы, расположенные на клеточной поверхности, включая адгезионные рецепторы. Поэтому частично поврежденные клетки, перенесенные в рану, требуют времени для восстановления своих функций, прежде чем смогут включиться в процесс заживления раны. Необходимость восстановления функциональной активности имплантированных клеток снижает скорость и эффективность их участия в процессах восстановления структурной целостности ткани.

Для этих целей оптимальным было бы перенесение на поврежденный участок выращенного клеточного пласта вместе с подложкой, на которой культивировали клетки. В дальнейшем эта подложка должна рассасываться, не причиняя вреда ни клеткам, ни всему организму. Такая подложка должна удовлетворять следующим требованиям: она должна быть биodeградируемой, иметь достаточную механическую прочность и способствовать адгезии и росту клеток в культуре (Vert, 1989; Engleberg, Kohn, 1991; Nutmacher et al., 2001). Кроме того, подложка и продукты ее деградации не должны быть токсичны-

ми для клеток и не должны вызывать защитную иммунную реакцию организма (Tice et al., 1982; Nakamura et al., 1989). И наконец, подложка не должна препятствовать восстановлению нормальной структуры ткани (Park, 1994; Uchida et al., 1995). Этим требованиям может отвечать биodeградируемая подложка, полученная из полимеров молочной кислоты (ПМК) (Vert, 1989; Park, 1994; Shin, 1995; Kiss, Vargha-Butler, 1999). Прежде всего, такая подложка обладает высокой механической прочностью, которую можно регулировать, изменяя химический состав полимера. Кроме того, варьируя условия получения полимера, можно изменять физико-химические характеристики подложки. ПМК полностью безвредна для клеток, а продукт деградации этого полимера — молочная кислота — является продуктом метаболизма млекопитающих. Зная время образования клеточного пласта и время заживления раны, можно подобрать оптимальные состав, структуру и сроки деградации полимерной подложки.

Известно, что культивируемые клетки хорошо взаимодействуют с гидрофильными поверхностями, на которых они лучше распластаются и растут. Однако большинство биodeградируемых полимеров, в том числе и ПМК, являются гидрофобными, что мешает клеточной адгезии. В литературе предлагают разные способы гидрофилизации поверхности: обработка плазмой различных газов (Grisser et al., 1994; Ma Zuwei et al., 2002), изменение химического состава полимера (Epaillard et al., 1994), покрытие гидрофильным полимером (Ajayaghosh, Das, 1992) или белками внеклеточного матрикса (Chaderi, Carlfors, 1997) и т. д. Каждый метод имеет свои достоинства и недостатки, но универсального способа до сих

пор не существует. Кроме того, надо учитывать, что условия формирования подложки, в том числе растворитель полимера, влияют на ее свойства.

Целью настоящей работы является изучение влияния полярности растворителя, используемого для формирования пленок, на поверхностные свойства полученного субстрата. Полимерные пленки формировали из раствора в ацетоне и хлористом метиле. Оценивали гидрофильность пленок и пригодность их для культивирования фибробластов кожи человека.

### Материал и методика

**Получение ПМК.** Поликонденсацией молочной кислоты был получен олигомерный полилактид, пиролиз которого в вакууме при  $250^\circ\text{C}$  приводит к формированию циклического димера — лактида. При многократной перекристаллизации из этилацетата получали продукт достаточной чистоты для полимеризации. В ампулу для полимеризации помещали 10 г лактида, тщательно перемешанного с 10 мг лактата цинка. Ампулу запаивали в вакууме водоструйного насоса (10 мм рт. ст.) и помещали в печь при температуре  $165 \pm 5^\circ\text{C}$  на 4 сут. Величина характеристической вязкости полученного полимера в хлороформе  $[\eta] = 0.5$  дл/г, что соответствует мол. массе 57 000 Да.

**Приготовление образцов пленок.** ПМК растворяли в ацетоне или хлористом метиле в концентрации 30 мг/мл. На покровное стекло размером  $15 \times 15$  мм наносили 30 мкл раствора полимера таким образом, чтобы концентрация полимера на стекле составляла  $1.4$  мкг/мм<sup>2</sup>. Приготовленные покровные стекла с полимером высушивали и стерилизовали 2 ч, облучая ультрафиолетовым светом.

В эксперименте использовали гидрофильные покровные стекла (предварительно обработанные концентрированной азотной кислотой) и гидрофобные стекла, обработанные Repell-Silan (Farmacia, Швеция).

**Определение гидрофобности пленок.** Определение степени гидрофобности пленок полимера на стеклах проводили измерением контактного угла при смачивании водой по общепринятому методу пластинки

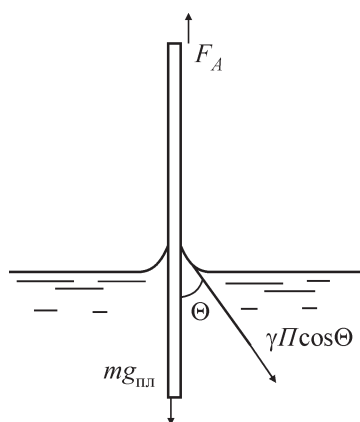


Рис. 1. Схема, показывающая силы, действующие на пластинку Вильгельми при смачивании ее жидкостью.

$F_A$  — Архимедова сила выталкивания,  $mg_{\text{пл}}$  — массе пластинки при погружении,  $\gamma\Pi\cos\Theta$  — сила поверхностного натяжения при равновесии фаз «твердое тело—жидкость—пар»,  $\Theta$  — угол смачивания.

Вильгельми. Покровное стекло с нанесенным с обеих сторон полимером в вертикальном положении взвешивали на торсионных весах до и после погружения в жидкость (воду). Масса покровного стекла меняется при этом в соответствии с уравнением

$$m_{\text{общ.г}} = m_{\text{пл.г}} + \gamma\Pi\cos\Theta,$$

где  $m_{\text{общ.}}$  — измеряемая масса при погружении пластинки в жидкость,  $m_{\text{пл.}}$  — масса сухой пластинки,  $\Pi$  — смачиваемый периметр пластинки,  $\gamma$  — поверхностное натяжение жидкости,  $\Theta$  — угол смачивания. Расчет краевых углов проводили по формуле

$$\cos\Theta = (m_{\text{общ.}} - m_{\text{пл.}})g / \gamma\Pi,$$

где в числителе — изменение массы пластинки,  $\gamma$  — поверхностное натяжение воды ( $\gamma = 72.8$  мН/м). Схема измерения представлена на рис. 1. Величина краевого угла является мерой гидрофобности поверхности, с увеличением гидрофобности краевой угол смачиваемости увеличивается.

**Адгезия фибробластов на подложке из ПМК.** Фибробласты кожи человека были получены из кусочков кожи, взятой от здоровых доноров в ходе косметологических операций. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки в атмосфере 5 %  $\text{CO}_2$  при  $37^\circ\text{C}$ . Питательную среду меняли каждые 3 сут. В опыт брали клетки после 4—6 пассажей культивирования.

Суспензию фибробластов в концентрации  $3 \cdot 10^4$  кл./мл наносили на покровные стекла (8—10 тыс. кл./см<sup>2</sup>), покрытые ПМК, и помещали в чашки Петри. Перед нанесением клетки дважды промывали средой DMEM без сыворотки, чтобы исключить неспецифическое влияние белков сыворотки на их прикрепление к субстрату. По истечении 20, 40 и 90 мин питательную среду и неприкрепившиеся клетки удаляли, а стекла промывали 2 раза физиологическим фосфатным буферным раствором. Прикрепившиеся клетки фиксировали 70%-ным этанолом в течение 10 мин, а затем окрашивали в течение 10 мин толуидиновым синим. Число прикрепившихся клеток подсчитывали визуально под микроскопом в 10 полях зрения. Затем определяли процентное соотношение числа клеток на полимере к их числу в контрольном варианте. В качестве контроля было взято чистое гидрофильное покровное стекло.

Оценка состояния клеток на полимерных пленках. Одним из критериев взаимодействия клеток с полимером служит морфология клеток. За изменением формы клеток в процессе культивирования их на полимере наблюдали под инвертированным микроскопом. Кроме того, оценивали скорость пролиферации клеток путем подсчета их в камере Горяева через 1 или 2 нед после посева. Контролем в этой серии экспериментов служили клетки, культивировавшиеся на поверхности полистирольных чашек Петри (Nunk) в среде с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки.

### Результаты и обсуждение

Для исследования поведения клеток на поверхности ПМК первоначально были изготовлены полимерные пленки различной толщины (20, 50, 75 и 100 мкм).

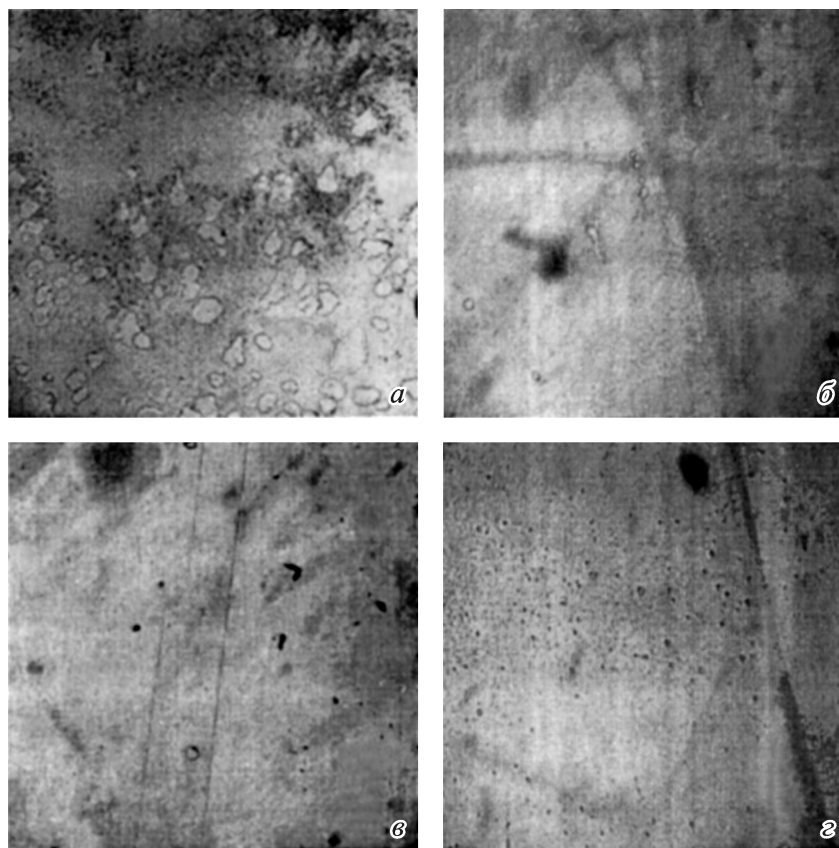


Рис. 2. Внешний вид поверхности полимерных пленок под микроскопом.

Пленка из ПМК, растворенная в ацетоне (а, б), в хлористом метилене (в, г), нанесенная на гидрофобные (а, в) и гидрофильные (б, г) покровные стекла. Об. 6.3×, ок. 10×.

Оказалось, однако, что при помещении в водные растворы такие пленки мутнели, что делало невозможным микроскопическое наблюдение за состоянием клеток на полимерной пленке. Кроме того, пленки давали усадку, и поверхность становилась рельефной, что неблагоприятно сказывалось на распластывании клеток на поверхности пленок. Для получения пленок оптимальной толщины и прозрачности на покровные стекла наносили раствор полимера при разных концентрациях. Концентрацию раствора и его объем варьировали в пределах 20—100 мг/мл и 10—50 мкл соответственно. Было найдено, что оптимальной является концентрация раствора полимера 30 мг/мл при нанесении 1.4 мкл на 1 мм<sup>2</sup> поверхности стекла; при этом количество полимера на стекле в готовой пленке составляло 278 мкг/см<sup>2</sup>.

При нанесении полимера на покровное стекло было отмечено, что ПМК из раствора в ацетоне неравномерно распределяется на гидрофобном стекле и на поверхности такого стекла образуются участки, не покрытые полимером. Пример подобного неравномерного покрытия полимером гидрофобного стекла представлен на рис. 2, а. В этом случае наблюдали волнистый водный мениск и получали самое высокое значение угла смачивания по сравнению с другими образцами (см. таблицу). Клетки не прикреплялись на не покрытые полимером участки гидрофобного стекла, что проиллюстрировало на приведенных фотографиях (рис. 3, б). Напротив, при нанесении раствора полимера в ацетоне на гидрофильное стекло полимер покрывал поверхность равномерно. В случае нанесения раствора ПМК в хлористом метилене на гид-

рофобное и гидрофильное стекла видимой разницы не наблюдали. Общий вид поверхности ПМК из растворов в хлористом метилене и ацетоне как на гидрофобном, так и на гидрофильном стеклах представлен на рис. 2.

Известно, что клетки прикрепляются и распластываются на гидрофильных поверхностях и практически не взаимодействуют с гидрофобными подложками. Поэтому перед нанесением клеток на полученные полимерные пленки оценивали степень их гидрофильности, определяя контактный угол при смачивании водой поверхности intactных образцов пленок. Чем он меньше, тем гидро-

#### Значения водных контактных углов смачивания полимерных пленок, нанесенных на разные поверхности

Образец	Угол смачивания $\theta$ , град
Чистое покровное стекло (ПС)	62 ± 4
Гидрофобизированное РС	104 ± 4
ПС, покрытое полилактидом из раствора в ацетоне	78 ± 4
Гидрофобизированное РС, покрытое полимером из раствора в ацетоне	88 ± 4
ПС, покрытое полимером из раствора в хлористом метилене	84 ± 4
Гидрофобизированное РС, покрытое полимером из раствора в хлористом метилене	82 ± 4

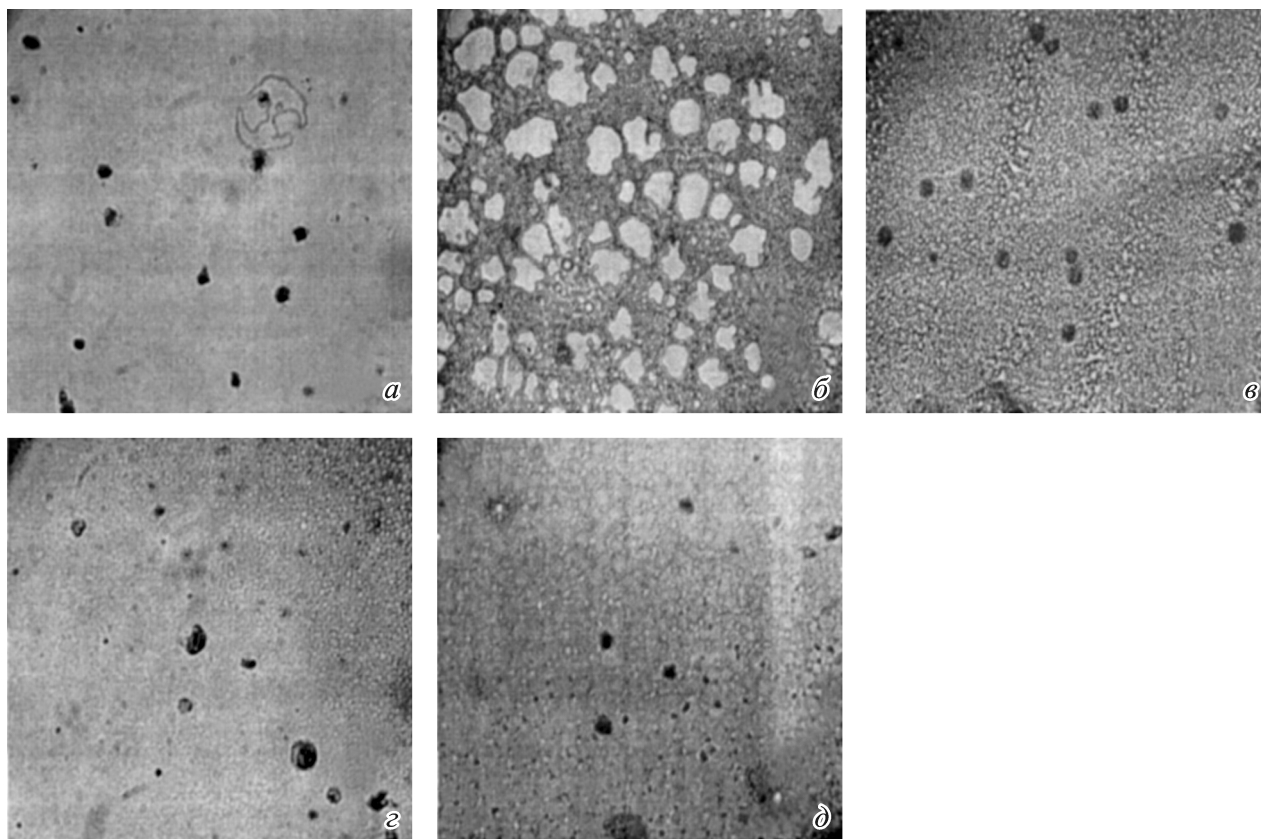


Рис. 3. Фибробласты кожи человека, окрашенные толуидиновым синим, через 2 ч после посева в среде, не содержащей эмбриональной телячьей сыворотки.

*a* — контроль (полистирольная чашка); *б* — пленка из ПМК, полученная из раствора в ацетоне на гидрофобном стекле; *в* — то же, но на гидрофильном стекле; *г* — пленка из ПМК, полученная из раствора в хлористом метилена на гидрофобном стекле; *д* — то же, но на гидрофильном стекле. Об. 6.3×, ок. 10×.

фильнее является подложка. Результаты измерений, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что наибольшей степенью гидрофильности обладает полимер, полученный из раствора в ацетоне и нанесенный на гидрофильное стекло, в то время как полимер, полученный из такого же раствора, но нанесенный на гидрофобное стекло, имеет большие значения угла смачивания. Величины угла полимера, полученного из раствора в хлористом метилена и нанесенного как на гидрофобное, так и на гидрофильное стекла, практически не различаются и свидетельствуют о более высокой гидрофобности поверхности данной пленки по сравнению с полимерной пленкой, полученной в ацетоне на гидрофильном стекле. Таким образом, следует ожидать, что наиболее подходящей подложкой для адгезии клеток может быть полимер, растворенный в ацетоне и нанесенный на гидрофильное стекло.

Для того чтобы установить, какая из полученных пленок обладает наибольшей биосовместимостью, оценивали прикрепление, расплывание и рост фибробластов, культивируемых на этих подложках. Суспензию фибробластов в питательной среде без сыворотки наносили на пленки. Через 20, 40 или 90 мин препараты фиксировали и окрашивали толуидиновым синим и подсчитывали число прикрепившихся клеток.

На рис. 3, *в* видно, что по числу прикрепившихся клеток ближе всего к контролю находится пленка из ПМК, полученная из раствора в ацетоне на гидрофильной подложке. На подложке, полученной из раствора по-

лимера в хлористом метилена, число прикрепившихся клеток существенно меньше, причем разницы между гидрофильной и гидрофобной подложками не наблюдали (рис. 3, *г*, *д*). На полимере, полученном из раствора в ацетоне на гидрофобной подложке, прикрепившихся клеток очень мало. При этом прикрепившиеся клетки находятся только на участках, покрытых ПМК, что подтверждает предположение о том, что раствор полимера в ацетоне неравномерно покрывает гидрофобную поверхность. Следует отметить, что размеры участков гидрофобного стекла, не покрытые полимером, увеличиваются со временем пребывания пленки в питательной среде. Результаты подсчета клеток, прикрепившихся к разным подложкам, представлены на рис. 4.

В течение коротких сроков инкубации (20—90 мин) фибробласты в среде без сыворотки прикрепляются к полимерным подложкам, но не расплываются на них. При этом, как было отмечено, существенной разницы между количеством клеток, прикрепившихся к полимерной пленке, полученной в хлористом метилена на гидрофильном и гидрофобном стеклах, не наблюдали. А количество клеток, прикрепившихся к полимерной пленке, полученной в ацетоне на гидрофильном стекле, существенно отличается от количества клеток, прикрепившихся к полимерной пленке, полученной в ацетоне на гидрофобном стекле.

Кроме того, наблюдали существенную разницу в поведении клеток при культивировании их на поверхности

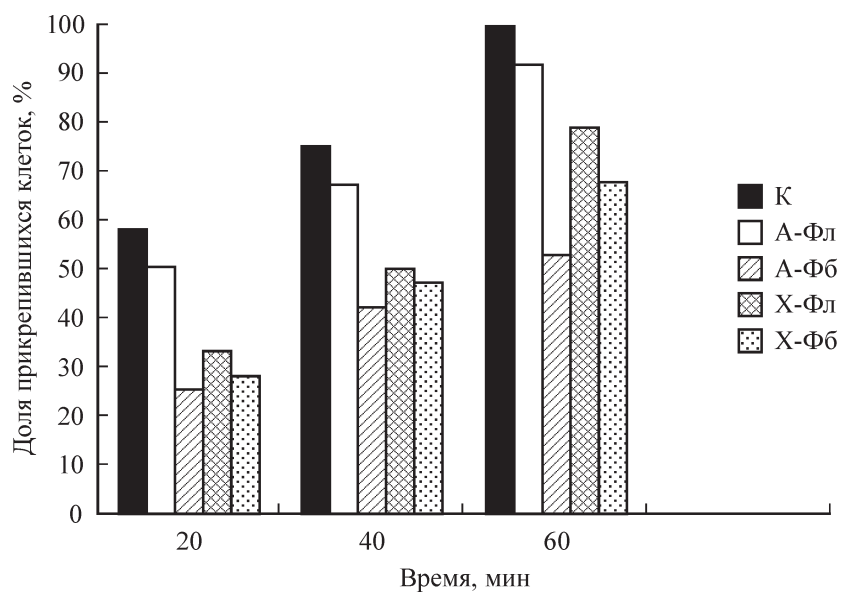


Рис. 4. Зависимость прикрепления фибробластов к полимерной пленке от способа ее получения через 20, 40 или 90 мин. К — контроль (полистирольная чашка), А-Фл — пленка из ПМК, полученная из раствора в ацетоне на гидрофильном стекле; А-Фб — то же, но на гидрофобном стекле; Х-Фл — пленка из ПМК, полученная из раствора в хлористом метилена на гидрофильном стекле; Х-Фб — то же, но на гидрофобном стекле.

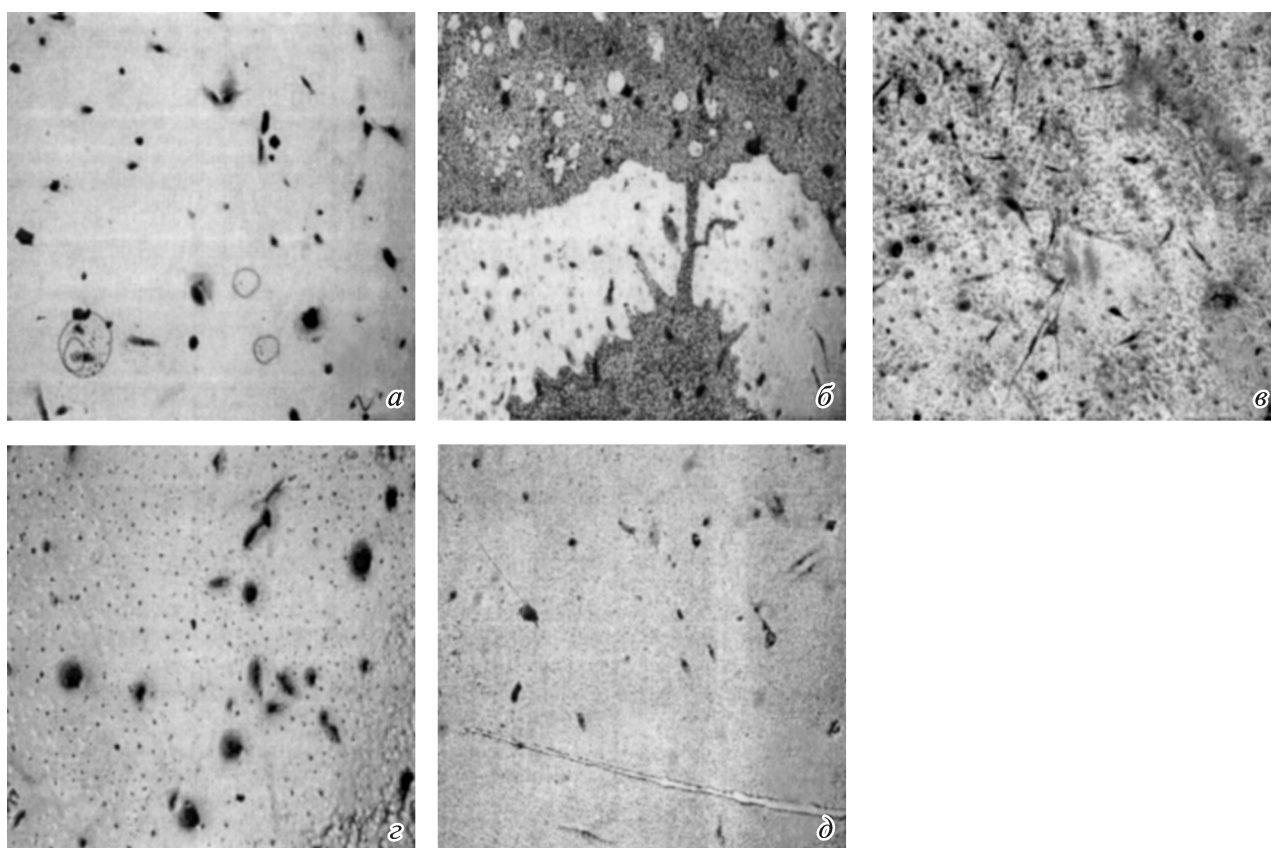


Рис. 5. Фибробласты кожи, окрашенные толуидиновым синим, через 24 ч культивирования в среде без сыворотки. Обозначения и увеличение те же, что и на рис. 3.

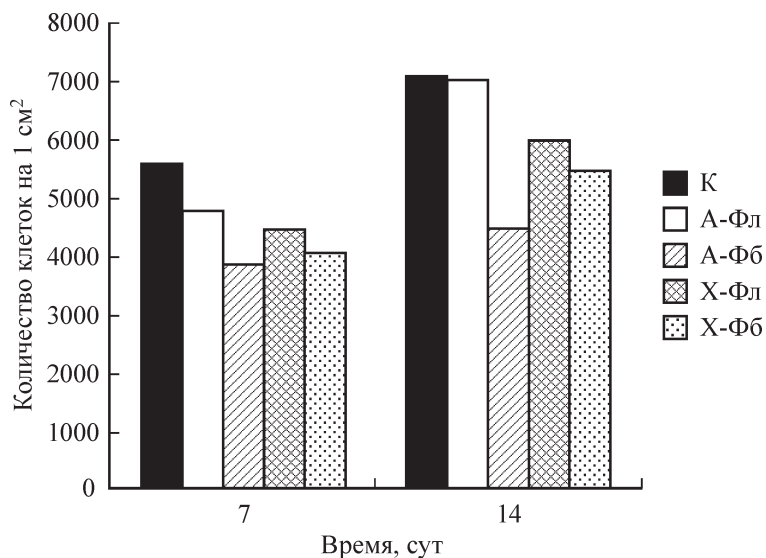


Рис. 6. Зависимость роста фибробластов на полимерной пленке от способа ее получения через 7 и 14 сут. Обозначения те же, что и на рис. 4.

полимерных пленок из ПМК, полученных различными способами (рис. 5). Через 24 ч культивирования клеток в питательной среде без сыворотки на полистирольной чашке (рис. 5, а), на полимерной пленке, полученной в ацетоне на гидрофобном стекле (рис. 5, в), на полимерной пленке, полученной в хлористом метиле как на

гидрофильном, так и на гидрофобном стеклах, фибробласты остаются округлой формы. Но на полимерной пленке, полученной в ацетоне на гидрофильном стекле (рис. 5, б), они распластаются и приобретают вытянутую форму. По-видимому, это можно объяснить более интенсивной секрецией клетками элементов внеклеточ-

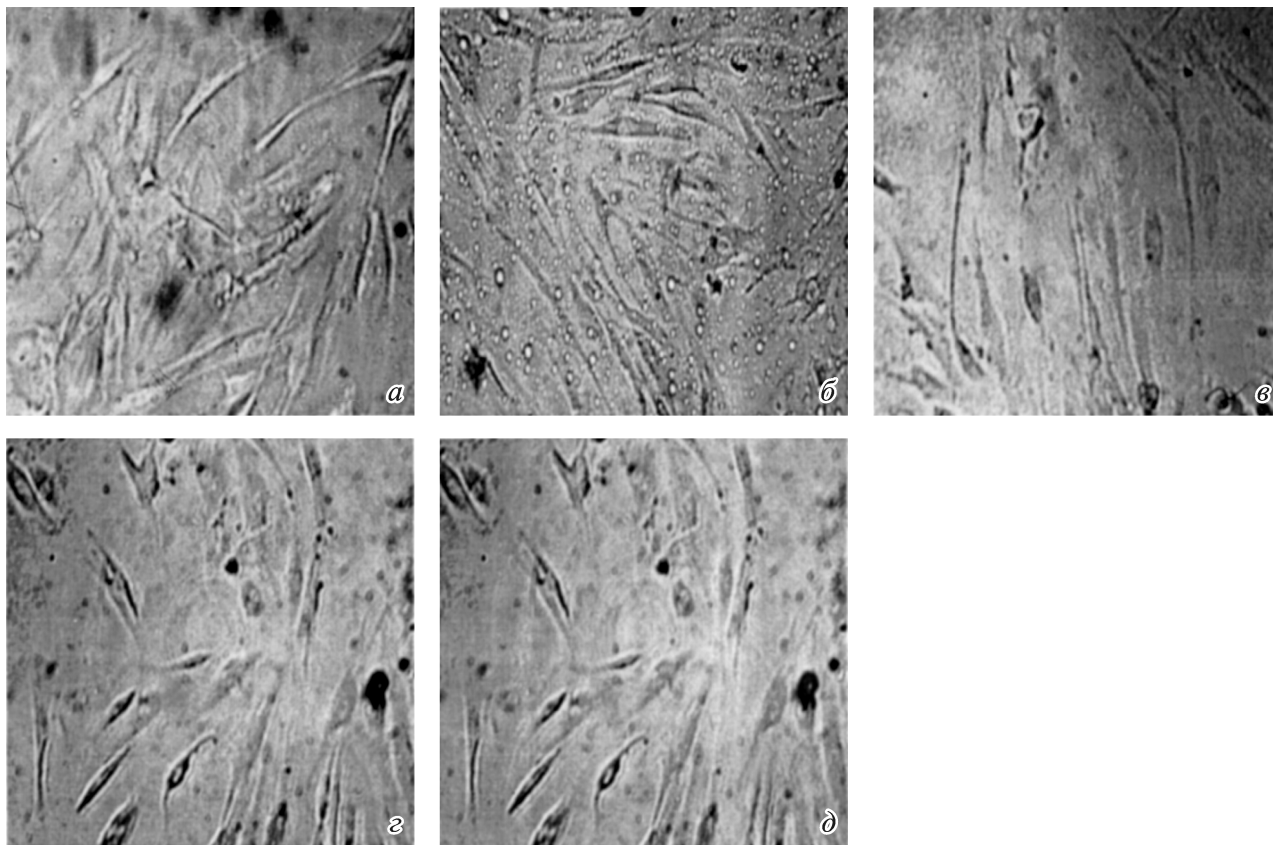


Рис. 7. Фибробласты через 7 сут культивирования на полимерных подложках, полученных разными способами. Обозначения и увеличение те же, что и на рис. 3.

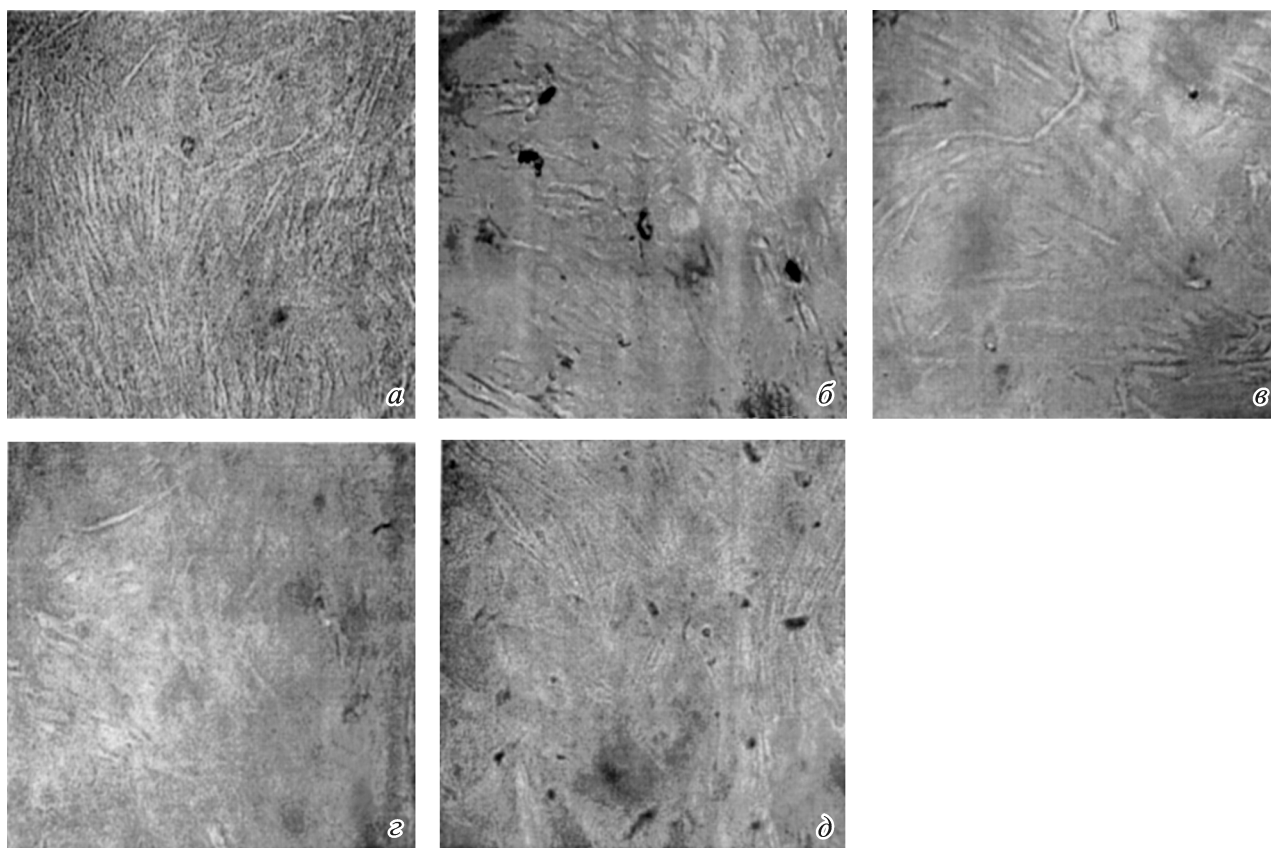


Рис. 8. Фибробласты через 14 сут культивирования на полимерных подложках, полученных разными способами. Обозначения и увеличение те же, что и на рис. 3.

ного матрикса на полимерной пленке, полученной из раствора в ацетоне на гидрофильном стекле, по сравнению с остальными подложками.

Необходимо было выяснить, способны ли клетки, прикрепившиеся и распластавшиеся на пленках, к пролиферации. С этой целью подсчитывали число клеток на  $1 \text{ см}^2$  через 7 и 14 сут культивирования (посевная доза составляла  $3 \cdot 10^3$  кл./ $\text{см}^2$ ). Контролем служили фибробласты, посеянные на чистое гидрофильное покровное стекло. Как видно на рис. 6, рост культуры происходил на всех исследованных пленках, но наибольшая интенсивность пролиферации клеток, практически не отличающаяся от контроля, наблюдалась в случае пленок, полученных из раствора в ацетоне на гидрофильном стекле.

В течение всего времени культивирования существенных морфологических различий клеток на полимерных пленках, полученных в обоих растворителях на гидрофильном стекле, не наблюдали, но клетки на пленке, полученной из раствора в ацетоне на гидрофобной подложке, все же имеют более округлую форму даже по истечении длительного временного периода (2 нед; рис. 7, 8).

Таким образом, была предпринята попытка получения полимерных пленок с оптимальными поверхностными свойствами для культивирования клеток. Проведенные эксперименты базировались на предположении о том, что такой параметр, как растворитель полимера, будет влиять на гидрофильность полимерной пленки. Предполагалось, что полярность растворителя, исполь-

зуемого в процессе получения пленок, будет влиять на величину поверхностной энергии полимера, которую можно вычислить, измеряя угол смачивания поверхности. Действительно, оказалось, что угол смачивания пленки, отлитой из полярного растворителя (ацетон), меньше (гидрофильность соответственно больше), чем угол смачивания пленки, полученной из растворителя с меньшей степенью полярности (хлористый метилен). Оказалось также, что еще одним немаловажным фактором является гидрофильность подложки, на которой формируется полимерная пленка. Было показано, что на гидрофобном стекле пленка из раствора в ацетоне распределяется неравномерно, поэтому при дальнейшем получении пленок необходимо наносить полимер из раствора в ацетоне на гидрофильное стекло. Для раствора в хлористом метиле гидрофильность подложки не влияет на равномерность распределения полимера.

Заключительным и самым главным этапом настоящего исследования была проверка состояния клеток при взаимодействии с полученными полимерными пленками. Было показано, что растворитель, использованный при получении пленки, действительно влияет на адгезию и пролиферацию фибробластов. Сопоставимой с контролем оказалась полимерная пленка, полученная из раствора в ацетоне на гидрофильном стекле. Даже при удалении из культуральной среды сыворотки клетки способны распластываться на ПМК из раствора в ацетоне через 24 ч, в то время как в этих же условиях они не распластываются не только на полимере из раствора в хлористом метиле, но и на поверхности контрольных поли-

стирольных чашек. Причину подобного явления предстоит еще выяснить.

Таким образом, из четырех исследованных вариантов оптимальной является полимерная подложка, полученная из раствора в ацетоне на гидрофильном стекле. Тем не менее степень адгезии клеток к такой подложке все-таки недостаточно высока по сравнению с контролем, поэтому в дальнейшем следует модифицировать поверхность полимерной пленки для улучшения адгезии и пролиферации клеток. Различия между вариантами полимеров выявляются только на коротких сроках взаимодействия клеток с субстратом. По истечении 7 сут культивирования существенных различий между клетками, растущими на полимерных образцах и в контроле, уже не наблюдали. Это может объясняться тем, что при длительном культивировании клетки секретируют в среду собственные белки внеклеточного матрикса, способствующие их росту на субстрате, в результате чего исчезает зависимость их роста от типа полимерной подложки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Администрации Санкт-Петербурга (грант КЦФЕ № PDOS-1.3-149).

#### Список литературы

- Ajayaghosh A., Das S.* 1992. Photografting of acrylic monomers on polystyrene support. *J. Appl. Polym. Sci.* 45 : 1617.
- Chaderi R., Carlfors J.* 1997. Biological activity of lysozyme after entrapment in poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharm. Res.* 14 : 1556—1562.
- Engleberg I., Kohn J.* 1991. Physico-chemical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. *Biomaterials.* 12 : 292—304.
- Epaillard F. P., Chevet B., Brosse J. C.* 1994. Modification of isotactic polypropylene by a cold plasma or an electron beam and grafting of the acrylic acid onto these activated polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 53 : 12191—1306.
- Griser H. J., Chatelier R. C., Gengenbach T. R., Johnson G. S., Steele J. G.* 1994. Growth of human all on plasma polymers: putative role of amine and amide groups. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 5 : 531—554.
- Hutmacher D. W.* 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 21 : 2529—2543.
- Hutmacher D. W., Schantz J. T., Zein I., Ng K. W., Teoh S. H., Tan K. G.* 2001. Mechanical properties and cell cultural response of poly-caprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J. Biomed. Mater. Res.* 55 : 203—216.
- Khor H. L., Ng K. W., Schantz J. T., Phan T. T., Lim T. G., Teoh S. H., Hutmacher D. W.* 2002. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering an epidermal equivalent. *Mater. Sci. Eng. C.* 20 : 71—75.
- Kiss E., Vargha-Butler E. I.* 1999. Novel method to characterize the hydrolytic decomposition of biopolymer surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerface.* 15 : 181—1993.
- Ma Zuwei, Gao Changyou, Ji Jian, Shen Jiacong.* 2002. Protein immobilization on the surface of poly-L-lactic acid films for improvement of cellular interactions. *Eur. Polymer J.* 38 : 2279—2284.
- Miralles G., Baudoin R., Dumas D., Baptiste D., Hubert P., Stoltz J. F., Dellacherie E., Mainard D., Netter P. E.* 2001. Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: *in vitro* engineering of cartilage. *J. Biomed. Mater. Res.* 57 : 268—278.
- Nakamura T., Hitomi S., Watanabe S., Shimizu Y., Jamshidi K., Hyon S. H., Ikada Y.* 1989. Bioabsorption of polylactides with different molecular properties. *J. Biomed. Mater. Res.* 23 : 1115—1130.
- Park T. G.* 1994. Degradation of poly (D,L-lactide acid) microspheres: effect of the molecular weight. *J. Control. Release.* 30 : 161—173.
- Schantz J. T., Hutmacher D. W., Ng K. W., Khor H. L., Lim T. G., Teoh S. H.* 2002. Evaluation of a tissue engineering membrane-cell construct for guided bone regeneration. *Int. J. Oral. Max. Implants.* 17 : 161—174.
- Shin C.* 1995. Calculation of Hydrolytic rate constants of poly (-ortho ester)s from molecular weights determined by gel permeation chromatography. *Pharm. Res.* 12 : 2041—2048.
- Tice T. R., Lewiw D. H., Dunn R. L., Meyers W. E., Casper R. A., Coswar D. R.* 1982. Biodegradation of microcapsules and biomedical devices prepared with resorbable polyesters. *Proc. Int. Control. Release Bioact. Mater.* 9 : 21—26.
- Uchida T., Yoshida K., Ninomiya A., Goto S.* 1995. Optimization of preparative conditions for polylactide (PLA) microspheres containing ovalbumin (OVA). *Chem. Pharm. Bull.* 43 : 1569—1573.
- Vert M.* 1989. Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications. *Angey. Makromol. Chem.* 166 : 155—158.
- Zacchi V., Soranzo G., Cortivo R., Radice M., Brum P., Abatangelo G.* 1998. *In vitro* engineering of human skin-like tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* 40 : 187—194.

Поступила 3 X 2005

#### ELABORATION OF BIODEGRADABLE POLYMER SUBSTRATE FOR CULTIVATION OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

Yu. A. Shved,<sup>1,\*</sup> L. V. Kukhareva,<sup>2</sup> I. M. Zorin,<sup>1</sup> A. Yu. Solovjov,<sup>3</sup> M. I. Blinova,<sup>2</sup> A. Yu. Bilibin,<sup>1</sup> G. P. Pinaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Chemical Faculty, St. Petersburg State University, <sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, and <sup>3</sup> Institute of High Molecular Compounds RAS, St. Petersburg;

\* e-mail: ulychka@rambler.ru

The influence of polylactic acid (PLA) surface films on the pattern of cell behavior was studied. The human dermal fibroblasts were cultivated on PLA covered glasses. The hydrophobic nature of PLA films depends on the availability of polymer solvent in the film preparation. PLA films obtained from a more polar solvent — acetone — appeared to be more hydrophilic than those obtained from methylene chloride. More hydrophilic polymer films also appeared to be more preferable for cell cultivation, and human dermal fibroblasts demonstrated a better adhesion and proliferation on hydrophilic rather than on hydrophobic PLA films.

Key words: polylactic acid, acetone, methylene chloride, fibroblasts.