

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК КОЖИ С РАЗНЫМИ СТРУКТУРНЫМИ ФОРМАМИ КОЛЛАГЕНА, НАНЕСЕННОГО НА ПОЛИЛАКТИДНУЮ МАТРИЦУ

© Ю. А. Швед,^{1,*} Л. В. Кухарева,² И. М. Зорин,¹ М. И. Блинова,²
А. Ю. Билибин,¹ Г. П. Пинаев²

¹ Кафедра химии высокомолекулярных соединений С.-Петербургского государственного университета
и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
* электронный адрес: ulychka@mail.ru

С целью оптимизации свойств поверхности полилактидной пленки, предназначенной для культивирования кератиноцитов человека, увеличивали ее гидрофильность путем нанесения на ее коллагена I-го типа. Эксперименты показали, что равномерность покрытия полимерной матрицы и формирование на ней различных структур коллагена зависят от способа нанесения белка. Выявленные различия в полимерной подложке, модифицированной коллагеном, оказывают влияние на рост кератиноцитов в культуре. Анализ распределения кератиноцитов на полимерной матрице с нанесенным коллагеном, а также организации их актинового цитоскелета показал, что фибриллярная структура коллагена способствует более равномерному распределению кератиноцитов в процессе культивирования по сравнению с распределением кератиноцитов на молекулярном коллагене.

К л ю ч е в ы е с л о в а: заместительная клеточная терапия, биodeградируемые полимеры, полилактид, фибриллярная и молекулярная структура коллагена, кератиноциты, актиновый цитоскелет.

Разработка технологий лечения поврежденных органов и тканей методами заместительной клеточной терапии является перспективным направлением современной регенеративной медицины. В основе этого метода лежит введение в организм пациента культивируемых стволовых или дифференцированных клеток.

Восстановление структурной и функциональной целостности кожных покровов методами клеточной терапии уже в настоящее время находит широкое применение (Ruszczak, 2000; Boyce, Warden, 2002). Культивируемые клетки кожи — базальные кератиноциты и дермальные фибробласты — являются основой для создания клеточных продуктов, используемых в клинике (Nishiyama et al., 1998). Для отделения от подложки и переноса на рану сформированного многослойного пласта кератиноцитов его предварительно обрабатывают протеолитическими ферментами. В процессе такой обработки повреждаются поверхностные рецепторы клеток и только часть клеток после трансплантации на рану остается жизнеспособной и выполняет свою функцию. Для того чтобы сохранить исходные свойства и жизнеспособность большинства клеток, необходимо разработать способ переноса сформированного пласта кератиноцитов без предварительной обработки клеток ферментами. Эта проблема может быть решена путем культивирования клеток на матрице, приготовленной из биodeградируемого полимера. Клеточный пласт, сформированный на такой полимерной матрице, можно перенести вместе с ней на пораженный участок кожи без какой-либо предварительной обработки. Под влиянием раневого микроокру-

жения полимер станет постепенно деградировать, а клетки сохранят способность выполнять свои функции по восстановлению поврежденных тканей.

В настоящее время в мире разрабатывается ряд биodeградируемых и биосовместимых полимеров, которые обладают как достоинствами, так и недостатками при использовании в качестве матрицы для культивирования клеток (Nishiyama et al., 1998). Одним из таких перспективных полимеров является полилактид, приготовленный на основе молочной кислоты, которая является продуктом метаболизма млекопитающих. В процессе предыдущих исследований были найдены оптимальные условия изготовления такой матрицы и проверена ее пригодность для культивирования фибробластов кожи человека (Швед и др., 2006).

Несмотря на все достоинства полилактида, его недостатком является гидрофобность поверхности приготовленной на его основе матрицы, что затрудняет адгезию и рост на ней культивируемых клеток. Поэтому для улучшения свойств поверхности такой матрицы, к которым особенно чувствительны культивируемые кератиноциты, необходима предварительная модификация полимера.

Одним из способов модификации поверхности полимера может быть нанесение на нее белков внеклеточного матрикса, которые кроме повышения гидрофильности поверхности имеют сайты для специфического взаимодействия с поверхностными рецепторами клеток (Dawson et al., 1996; Kitajima, 1998). Наиболее часто используемым для этой цели покрытием является коллаген —

основной структурный элемент дермы кожи и собственно базальной мембраны, на которой *in vivo* располагаются базальные кератиноциты (Tjia et al., 1999; Dai et al., 2004). После нанесения на поверхность коллаген может в зависимости от способа нанесения находиться в одном из двух структурных состояний — в молекулярной или фибриллярной форме. Молекулярный коллаген — отдельные трехспиральные молекулы, а фибриллярный представляет собой организованные структуры со ступенчатым расположением молекул коллагена со сдвигом на четверть их длины (Djabourov et al., 1993). Фибриллярный коллаген является структурой, аналогичной существующей *in vivo*, и наиболее благоприятен для клеток. Было показано, в частности, что от структуры нанесенного на подложку коллагена зависят форма и организация активного цитоскелета у культивируемых фибробластов (Mercier et al., 1996; Sato et al., 2003).

Целью настоящей работы было выяснить, как влияет способ нанесения коллагена на его структурирование на подложке и в какой мере формирование разных структур будет влиять на взаимодействие кератиноцитов с субстратом и на их рост в процессе культивирования.

Материал и методика

Получение полилактида. Поликонденсацией молочной кислоты был получен олигомерный полилактид, пиролиз которого в вакууме при 250 °С приводит к формированию циклического димера — лактида. Путем 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 165 °С на 4 сут. Величина характеристической вязкости полученного полимера в хлороформе равна $[\eta] = 0.5$ дл/г, что соответствует мол. массе 57 000 Да (Швед и др., 2006).

Приготовление образцов пленок. Полилактид растворяли в хлористом метиле в концентрации 50 мг/мл. На покровное стекло размером 18 × 18 мм наносили 85 мкл раствора полимера. Приготовленные покровные стекла с полимерным покрытием высушивали на воздухе и стерилизовали в течение 2 ч, облучая УФ-светом. В экспериментах использовали гидрофильные покровные стекла (предварительно обработанные концентрированной азотной кислотой).

Получение коллагена 1-го типа. Коллаген 1-го типа экстрагировали 0.5 М уксусной кислотой из сухожилий крысиных хвостов, предварительно промытых физиологическим раствором (0.9 % NaCl). После перехода коллагена в раствор его осаждали добавлением сухого NaCl до конечной концентрации 0.9 М. Для удаления соли раствор коллагена подвергали диализу против раствора уксусной кислоты с последовательным увеличением концентрации кислоты (от 0.1 до 0.5 М). После растворения коллагена в кислоте его повторно осаждали диализом против 0.08 М Na₂HPO₄. Полученный осадок растворяли в 0.5 М уксусной кислоте, стерилизовали диализом против 0.5%-ного раствора хлороформа в той же кислоте и постепенно переводили диализом в раствор уксусной кислоты (1 : 1000) (Chandrakasan et al., 1967).

Нанесение коллагена на полимерный субстрат. Из литературы известны три основных спо-

соба нанесения коллагена на подложку (Strom, Michalopoulos, 1982; Mercier et al., 1996). Было показано, что в зависимости от условий нанесения коллагена он приобретает определенную структуру — фибриллярную или молекулярную. При общепринятом способе нанесения коллагена на субстрат (далее — способ 1) характер структуры, образуемой коллагеном на подложке, до настоящего времени не исследовали.

Способ 1. (Обычный лабораторный способ, применяемый при культивировании многих типов клеток.) Покровное стекло с полимерной пленкой помещали в чашку Петри, куда затем вносили раствор коллагена в концентрации 100 мг/мл. Через 30 мин инкубации при комнатной температуре раствор удаляли и стекла дважды промывали PBS (субстрат 1). В случае трехкратного нанесения раствора коллагена образец после каждого нанесения дважды промывали PBS.

Способ 2. На полимерную подложку наносили 30 мкл раствора коллагена в 0.1%-ной уксусной кислоте (100 мг/мл). После нанесения раствора пленки высушивали на воздухе в течение 1 сут при комнатной температуре (субстрат 2) (Mercier et al., 1996).

Способ 3. В раствор коллагена в концентрации 2 мг/мл добавляли NaH₂PO₄ (1 М) до конечной концентрации 20 мМ, pH 7.4. Полученную смесь немедленно наносили на полимерную пленку и помещали в атмосферу аммиака на 15 мин для полимеризации коллагена. Такой способ нанесения коллагена должен приводить к формированию коллагеновых фибрилл. После инкубации образцы дважды промывали PBS и стерилизовали УФ-облучением в течение 2 ч (субстрат 3) (Mercier et al., 1996).

Выявление структуры нанесенного коллагена. Коллаген после нанесения на пленку фиксировали в течение 10 мин 4%-ным раствором формальдегида. Затем на поверхность наносили моноклональные антитела против нативного коллагена (Sigma, США) на 45 мин. После трехкратного промывания наносили антимышинные антитела, меченные FITC. Препараты для флуоресцентного анализа готовили с пропилгалатом. Структуру коллагенового покрытия наблюдали с помощью конфокального микроскопа.

Выделение кератиноцитов. Первичная культура кератиноцитов человека была получена из кожи здоровых взрослых доноров, подвергшихся косметической операции. Выделение кератиноцитов проводили по модифицированной методике (Rheinwald, 1980). Кожу промывали PBS и после отделения подкожной клетчатки нарезали на небольшие (5—10 мм) фрагменты и помещали на 14—16 ч при 4 °С в раствор PBS, содержащий 0.2 % коллагеназы гидробионтов (ОАО «Технология», Санкт-Петербург) и 0.5 % диспазы (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Германия). После обработки ферментами эпидермис отделяли и инкубировали в растворе, содержащем 0.125 % трипсина и 0.02 % версена («Биолот», Санкт-Петербург), в течение 7 мин при 37 °С. Фермент инактивировали путем добавления 10 % сыворотки и оставляли еще на 20 мин. Суспензию клеток 20 раз пипетировали с помощью пипетки с широким отверстием. Затем ее фильтровали через нейлоновую сетку, после чего клетки осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в смеси сред DMEM и F 12 (3 : 1) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров. Суспензию клеток вносили в чашки Петри диаметром 3 см из расчета 2.5—3.0 млн кл. на чашку.

Выделенные кератиноциты культивировали в смеси сред DMEM и F12 (3 : 1) с добавлением 10 % FBS, 5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл гидрокортизона, 10 нг/мл эпидермального фактора роста, холерного токсина (10^{-10} М; Sigma, США), 5 мг/мл трансферрина, $1,8 \cdot 10^{-4}$ М аденина (ISN-Flow, США) и $2 \cdot 10^{-11}$ М лиотиронина (Koch-Light, США). Питательную среду меняли через 2—3 сут.

Для исследования структуры актинового цитоскелета кератиноциты после культивирования в течение 1,5 нед снимали смесью растворов трипсина и версена (1 : 1). Для того чтобы удалить супрабазальные слои, культуру клеток переводили на 24—48 ч на среду с пониженным содержанием ионов кальция, после чего дифференцированные клетки легко снимались пипетированием (Jensen, Bolund, 1988).

Анализ структуры актинового цитоскелета. Кератиноциты снимали с поверхности сосудов смесью растворов трипсина и версена, дважды промывали средой без сыворотки, наносили на приготовленные субстраты и оставляли прикрепляться при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 1 ч. После указанного времени неприкрепившиеся клетки удаляли, а прикрепившиеся к субстрату промывали PBS. Клетки фиксировали 4%-ным раствором формалина в течение 10 мин и трижды промывали PBS. Затем их обрабатывали 0,1%-ным Тритон-ом Х-100 в течение 15 мин и после аналогичной промывки PBS препараты окрашивали в течение 10 мин Тритс-фаллоидином. Организацию актинового цитоскелета наблюдали с помощью конфокального микроскопа.

Результаты

Из данных литературы известны три основных способа нанесения коллагена на субстрат, которые и были использованы в настоящем исследовании (Strom, Michalopoulos, 1982; Mercier et al., 1996).

В связи с существенными различиями в структуре коллагена, полученного после нанесения на матрицу разными способами, важно было установить, в какой мере эти различия будут влиять на взаимодействие кератиноцитов с субстратом и на их рост в процессе культивирования. Эксперименты показали, что через 4 сут после посева начинают выявляться особенности в характере роста и распределения клеток на поверхности исследуемых субстратов (рис. 1). Наименьшее число прикрепившихся и распластанных клеток обнаруживается на полимере без нанесенного коллагена (рис. 1, а). На коллагеновых субстратах, полученных всеми тремя способами, на фоне распластанных клеток видны их колонии, характерные для дифференцирующихся клеток (рис. 1, б—д), причем на субстрате 1 колонии с большой площадью связаны между собой филоподиальными структурами (рис. 1, б, в). Размер и количество образовавшихся колоний наименьшие на субстрате 3 (рис. 1, д).

На 9-е сут культивирования продолжается процесс формирования и роста агрегатов на всех субстратах (рис. 2). При этом на субстрате 1 образуется развитая сеть связанных между собой клеточных скоплений (рис. 2, б, в). В то же время на субстрате 2 формируется большое число достаточно крупных, но не связанных между собой агрегатов (рис. 2, г). Напротив, для субстрата 3 характерно наличие сравнительно небольшого числа (и при этом только мелких) агрегатов, а остальная часть поверхности покрыта монослоем распластанных

клеток (рис. 2, д). Субстрат 3, по-видимому, способствует большей пролиферативной активности клеточной популяции лишь с частичным переходом клеток в дифференцированное состояние.

Так как распределение клеток на коллагене после нанесения на полимер разными способами существенно различалось, необходимо было установить, какую структурную организацию он приобретает в каждом случае. Окраска специфическими антителами показала, что коллаген после нанесения наиболее часто применяемым методом (способ 1) покрывает полимерную подложку неравномерно. Белок выявляется только на части поверхности в виде сгустков без определенной структуры (рис. 3, а). Нанесение коллагена способом 2 приводит к более равномерному покрытию полимерной подложки. При этом белок представлен многочисленными мелкими агрегатами, но без определенных сформированных структур (рис. 3, б).

После нанесения коллагена способом 3 на полимерной поверхности обнаруживаются крупные связанные между собой белковые структуры, состоящие из сети взаимодействующих коллагеновых фибрилл (рис. 3, в). Но и в этом случае абсолютно ровного покрытия поверхности не происходит, остаются пространства, не заполненные белком.

Далее необходимо было установить, насколько прочно взаимодействует коллаген с полимерным субстратом в процессе длительного пребывания в культуральной среде. С этой целью полимерный субстрат после нанесения коллагена всеми тремя способами инкубировали в питательной среде в течение 3 сут в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Эксперименты показали, что в течение этого срока инкубации коллаген после нанесения способом 1 полностью открепляется от субстрата и переходит в среду, о чем свидетельствует отсутствие специфического окрашивания препарата антителами (рис. 4, а). Для образцов, полученных способами 2 и 3, наблюдался только частичный переход коллагена в раствор, но основная структура нанесенного белка сохранялась (рис. 4, б, в). Из этих результатов следует, что наиболее приемлемым способом нанесения коллагена на подложку является способ 2 или 3.

При наблюдении за пространственной организацией клеточной популяции под инвертированным микроскопом при малом увеличении трудно выявить морфологические различия у клеток, распластанных на разных субстратах. Поэтому зафиксированные и окрашенные Тритс-фаллоидином клетки анализировали с помощью конфокального микроскопа для выявления особенностей пространственной организации актинового цитоскелета, структура которого, как было показано ранее, зависит от типа иммобилизованных лигандов (Sato et al., 2003).

Кератиноциты, нанесенные на 1 ч на полимерную матрицу без коллагенового покрытия, практически не распластаны и поэтому имеют преимущественно округлую форму (рис. 5, а). Актин сосредоточен под клеточной мембраной без видимых структур, а также в виде агрегатов неправильной формы в центральной части цитоплазмы (рис. 5, б). Клетки, прикрепившиеся к коллагену после нанесения по способу 1, распластаны в большей степени (рис. 5, в). Небольшая часть из них имеет хорошо развитый цитоскелет, представленный пучками актиновых филаментов, ориентированных вдоль длинной оси клеток, а также большое число радиальных пучков фибриллярного актина, являющегося основой микроворси-

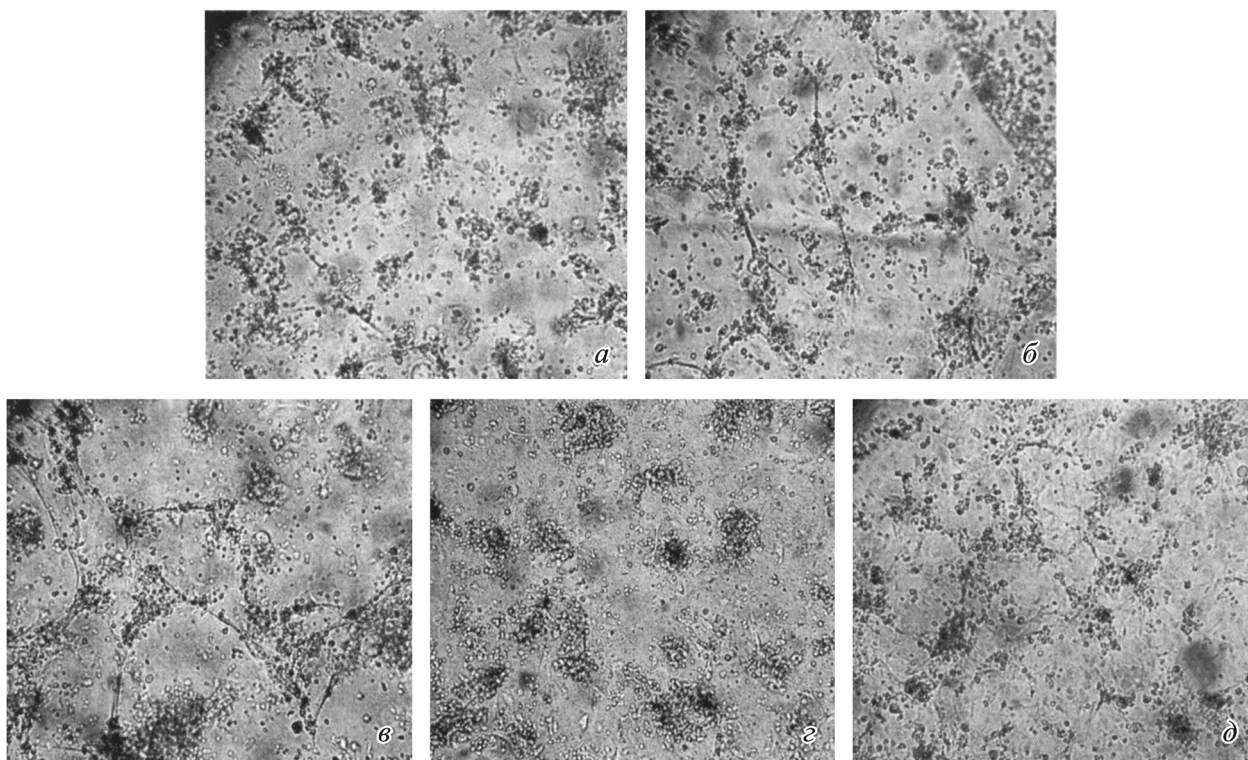


Рис. 1. Распределение кератиноцитов на полилактидной пленке, покрытой коллагеном разными способами, через 4 сут культивирования.

a — стекло, покрытое пленкой полимера, но без коллагена; *б* — чистое покровное стекло, покрытое коллагеном способом 1; *в* — то же, что и на фото *a*, но коллаген нанесен способом 1; *г* — то же, что и на фото *a*, но коллаген нанесен способом 2; *д* — то же, что и на фото *a*, но коллаген нанесен способом 3.

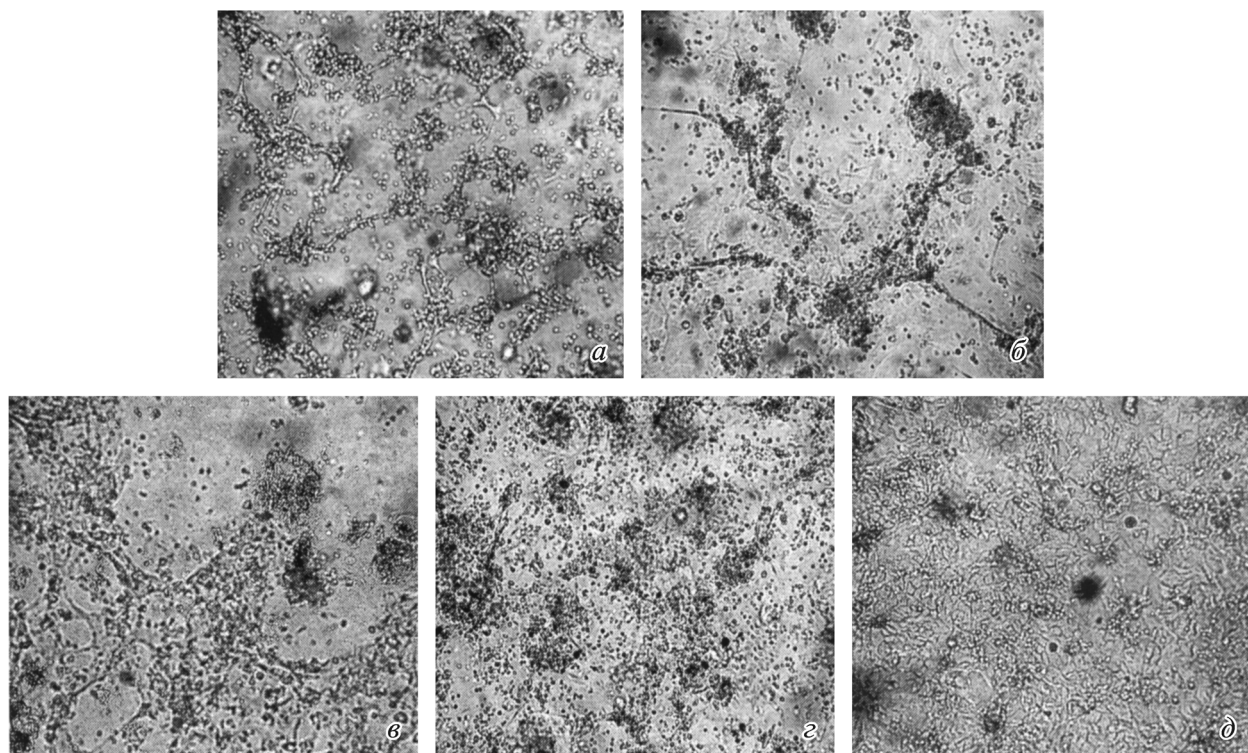


Рис. 2. Распределение кератиноцитов на полилактидной пленке, покрытой коллагеном разными способами, через 9 сут культивирования.

a—д — то же, что и на рис. 1.

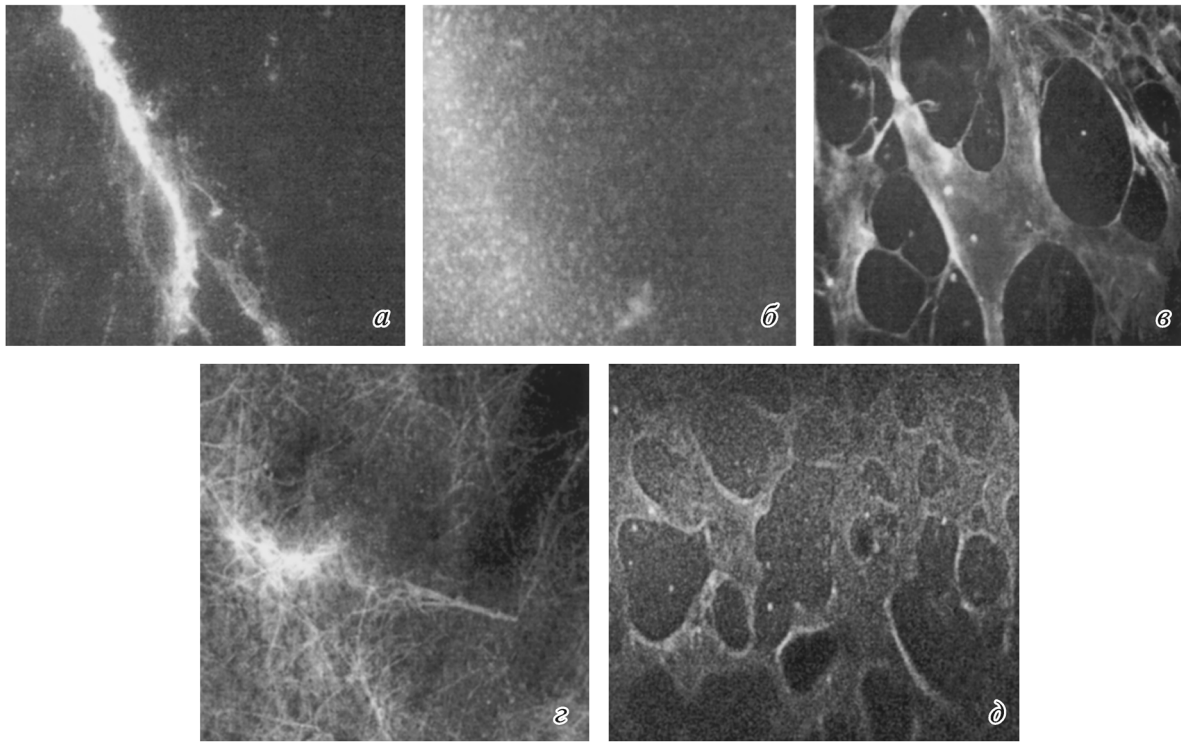


Рис. 3. Распределение коллагена при нанесении его на субстрат способом 1 (а, д), 2 (б) или 3 (в, г).

Увел.: а–в, д — 60×; г — 100×.

нок (рис. 5, г). Большинство клеток имеет форму эллипсоидов с периферическим распределением актина, но с уже выраженными микрофиламентными структурами (рис. 5, д). Среди кератиноцитов, распластанных на коллагеновом покрытии, полученном способом 2, выявляются клетки не только с периферическим распределением актиновых структур, но также с длинными пучками микрофиламентов, пересекающих тело клетки (рис. 5, в, ж, з). Многие из них поляризованы. Мощный циркулярный слой пучков микрофиламентов распространяется от периферии к центральной части цитоплазмы, многочисленными, но короткие микроворсинки покрывают поверхность клеток (рис. 5, ж, з). Для кератиноцитов, прикрепленных к коллагену после нанесения способом 3, характерно образование длинных цепочек округлых клеток, контактирующих между собой, по-видимому, вдоль об-

разованных коллагеновых фибрилл (рис. 5, и). Подавляющая часть контактирующих между собой округлых клеток заполнена циркулярными пучками актиновых структур (рис. 5, к). Места контактов также заполнены актиновыми микрофиламентами (рис. 5, л). Встречаются лишь отдельные хорошо распластанные клетки с типичным для них развитым цитоскелетом, заполняющим всю цитоплазму и широкие ламеллы на ведущем крае клетки.

Обсуждение

Задачей настоящей работы являлось модифицирование гидрофобной поверхности полимерной матрицы с целью создания оптимальных условий для культивирования на ней кератиноцитов. В предыдущей работе

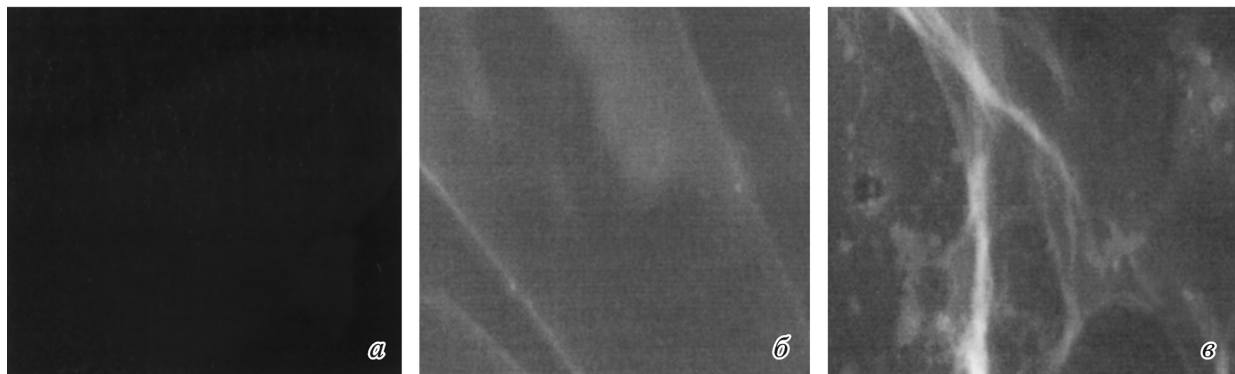


Рис. 4. Коллагеновое покрытие на полимерной матрице после инкубирования в культуральной среде в течение 3 сут.

Коллаген нанесен способом 1 (а), 2 (б) или 3 (в).

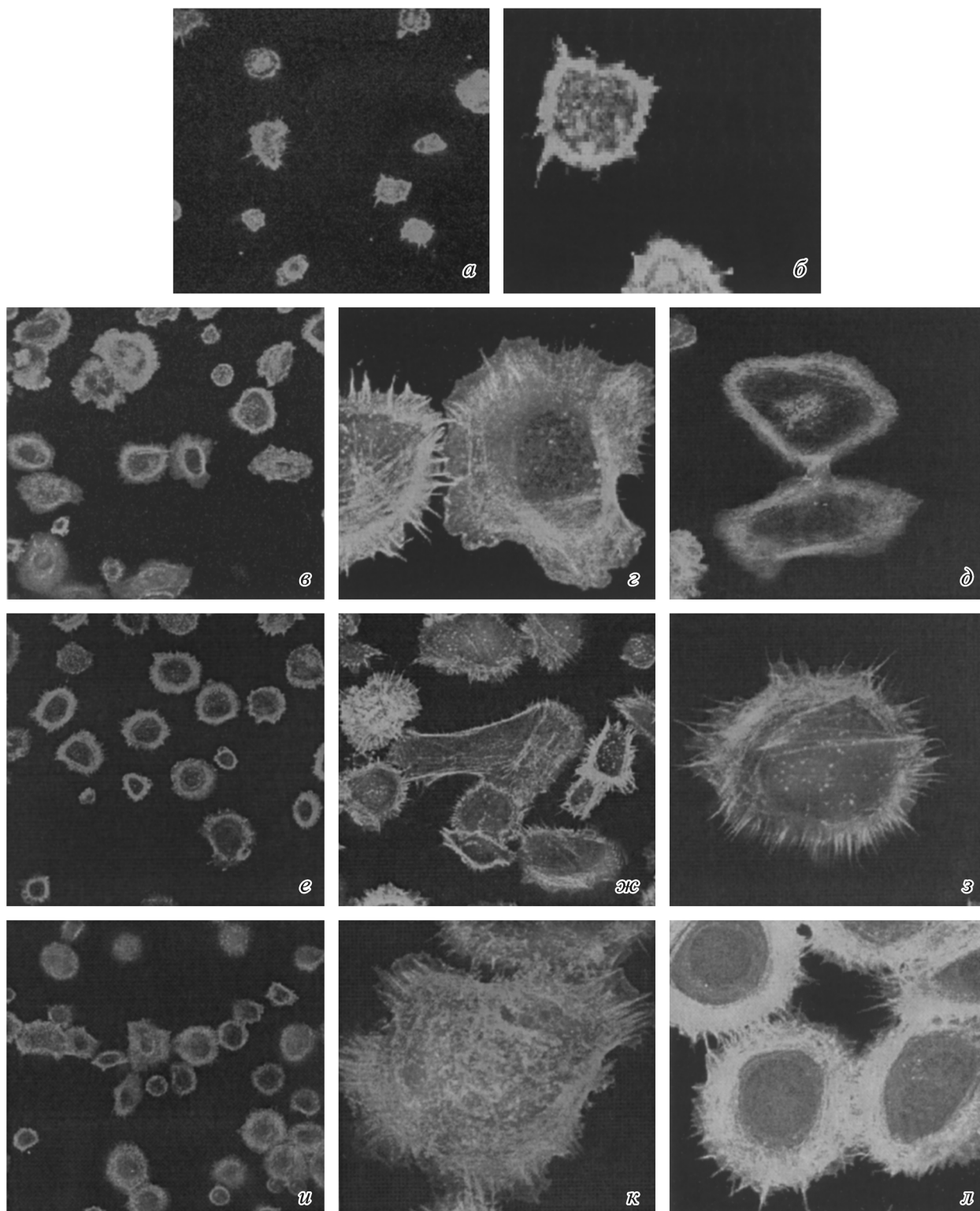


Рис. 5. Организация актинового цитоскелета кератиноцитов, распластанных на полимере (а, б) или на коллагеновом субстрате, нанесенном на полимер способом 1 (в—д), 2 (е—з) или 3 (и—л).

Увел.: а, в, е, и — 40×; б, г, д, ж, з, к, л — 60×.

(Швед и др., 2006) было показано, что дермальные фибробласты человека способны прикрепляться, распластываться и пролиферировать на полилактидной пленке. Кератиноциты, однако, более чувствительны к свойствам субстрата и условиям культивирования. Одним из рас-

пространственных способов модификации поверхности, предназначенной для культивирования кератиноцитов, является нанесение на нее белков внеклеточного матрикса, в частности коллагенов. Им покрывают в том числе и поверхности культуральных сосудов, предназначенных

для выращивания монослоя кератиноцитов. По этой причине в настоящей работе для модификации полилактидной матрицы также был выбран коллаген.

Согласно имеющимся в литературе данным, в настоящее время существует ряд способов нанесения коллагена на поверхности (Strom, Michalopoulos, 1982; Mercier et al., 1996). Показано при этом, что в зависимости от способа нанесения коллагена на подложку он приобретает различную пространственную структуру и форму. Представлялось важным выяснить, в какой степени эти различия влияют на взаимодействие кератиноцитов с исследуемой матрицей. В процессе проведенных исследований выяснилось, однако, что нанесение коллагена на исследуемую поверхность тремя разными способами не обеспечивает ее равномерного покрытия. В имеющейся литературе нам не удалось обнаружить работ, посвященных изучению равномерности покрытия белками каких-либо поверхностей, предназначенных для культивирования клеток. При оценке полученных результатов естественно возникает вопрос о причинах избирательного взаимодействия коллагена с отдельными участками поверхности. Это, конечно, может быть связано с различным характером поверхностных свойств самой полимерной матрицы, но более вероятно, что одними из причин неравномерности покрытия белком являются структура нанесенного белка и его концентрация. И действительно, предварительные эксперименты показали, что трехкратное, последовательное нанесение коллагена способом 1 позволяет получить поверхность, достаточно равномерно покрытую белком (рис. 3, з). Поэтому в дальнейшем целесообразно продолжить совершенствование способов нанесения коллагена на полимерную матрицу и выяснить, как время и температура инкубирования белка на данной поверхности и его концентрация влияют на взаимодействие с ним клеток.

Таким образом, распределение кератиноцитов и их размножение на полимерных матрицах могут зависеть как от равномерности покрытия поверхности коллагеном, так и от структуры самого белка.

Данные Мерсье и ее коллег (Mercier et al., 1996) о том, что структура нанесенного на поверхность коллагена влияет на распределение фибробластов и организацию их цитоскелета, служат в пользу нашего предположения. Результаты, полученные в настоящей работе, также продемонстрировали зависимость распределения кератиноцитов на полимерной матрице от структуры коллагена. При этом, на наш взгляд, наиболее приемлемой для культивирования кератиноцитов *in vitro* является его фибриллярная форма. Об этом свидетельствуют более равномерное распределение клеток на субстрате после нанесения фибриллярного коллагена, отсутствие крупных клеточных агрегатов и связывающих их структур, характерных для дифференцирующихся клеток (рис. 1, д; 2, д).

Кроме того, исходя из общей картины формирования цитоскелета в процессе взаимодействия клеток с субстратом можно предполагать, что хорошо распластанные на коллагене кератиноциты относятся к части популяции, вступившей в процесс дифференцировки. Если это предположение справедливо, то будет выяснено в процессе дальнейших исследований, то большое число округлых клеток, выявляемых на фибриллярном коллагене, сформированном на полимерной матрице после нанесения способом 3, может относиться к активно пролиферирующим стволовым или транзиторным кератиноцитам.

Оказалось также, что способ нанесения коллагена на полимерную матрицу влияет на прочность его взаимодействия с субстратом, о чем свидетельствуют данные, полученные в результате анализа субстратов, инкубированных в среде без клеток (рис. 4). Более прочное связывание белка, нанесенного способом 2, можно объяснить образованием гликозидных связей между молекулами коллагена в процессе высушивания. Прочность связывания коллагена, нанесенного способом 3, может быть следствием образования связей между отдельными коллагеновыми фибриллами, имеющих гидрофобный и электростатический характер (рис. 4, в).

Таким образом, модификация полимерной матрицы разными структурными формами коллагена дает возможность выбрать оптимальный вариант для формирования пласта кератиноцитов. В наших экспериментах оптимальной структурой коллагена для модификации полимерной поверхности является фибриллярная форма, которая наиболее близка к его состоянию в тканях организма. Поэтому в дальнейшем при культивировании кератиноцитов *in vitro* целесообразно использовать коллаген в фибриллярной форме. При этом, однако, техника нанесения белка на субстрат с получением равномерного покрытия требует доработки. В дальнейшем мы планируем оптимизировать способ нанесения коллагена, с тем чтобы получить субстрат, максимально приближенный по своим свойствам к микроокружению клеток *in vivo*.

Список литературы

- Швед Ю. А., Кухарева Л. В., Зорин И. М., Соловьев А. Ю., Блинова М. И., Билибин А. Ю., Пинаев Г. П. 2006. Разработка биodeградируемых полимерных подложек для культивирования фибробластов кожи человека. Цитология. 48 (2): 161—168.
- Boyce S. T., Warden G. D. 2002. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. Amer. J. Surgery. 183 : 445—456.
- Brekke J. H. 1995. Architectural principles applied to three-dimensional therapeutic implants composed of bioresorbable polymers. In: Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering. Pt A. Materials. New York: Marcel Dekker Inc. 1 : 689—731.
- Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251 : 6062—6067.
- Dai N. T., Williamson M. R., Khammo N., Adams E. F., Coombes A. G. A. 2004. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin. Biomaterials. 25 : 4263—4271.
- Dawson R. A., Goberdhan N. J., Freedlander E., MacNeil S. 1996. Influence of extracellular matrix proteins on human keratinocyte attachment, proliferation and transfer to a dermal wound model. Burns. 22 : 93—100.
- Djaborov M., Lechaire J.-P., Gaill F. 1993. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. Bioreology. 30 : 191—205.
- Garric X., Moles J.-P., Garreau H., Guilhou J.-J., Vert M. 2005. Human skin cell cultures onto PLA₅₀ (PDLA) bioresorbable polymers: influence of chemical and morphological surface modifications. Biomed. Mater. Res. 72A : 180—189.
- Jensen P., Bolund L. 1988. Low Ca²⁺ stripping of differentiating cell layers in human epidermal cultures: an *in vitro* model of epidermal regeneration. Exp. Cell Res. 175 : 63—73.
- Kim B.-S., Mooney D. J. 1998. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. Trends Biotechnol. 16 : 224—230.
- Kitajima Y. 1998. Protein metabolism during the stratum corneum formation: molecular aspects of keratinization, cell adhesion

and cytoskeletons. In: *Skin: interface of a living system*. London: Excerpta Medica, Europe. 145—163.

Langer R., Vacanti J. P. 1993. *Tissue engineering*. Science. 260 : 920—926.

Mercier I., Lechaire J.-P., Desmouulier A., Gaill F., Aumailley M. 1996. Interactions of human skin fibroblasts with monomeric or fibrillar collagens induce different organization of the cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 225 : 245—256.

Nishiyama T., Tsunenaga M., Akutsu N., Amano S., Nakayama Y. 1998. Role of dermal — epidermal communication on regulation of skin structure and function. In: *Skin: interface of a living system*. London: Excerpta Medica, Europe. 55—72.

Rheinwald J. G. 1980. Serial cultivation of normal epidermal keratinocytes. *Meth. Cell Biol.* 21A: 229—254.

Ruszczak Z. B. 2000. Modern aspects of wound healing: an update. *Dermatol. Surg.* 26 : 219—229.

Sato K., Hattori S., Irie S., Kawashima S. 2003. Spike formation by fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel. In: *Cell structure and function*. 28 : 229—241.

Strom S. C., Michalopoulos G. 1982. Collagen as a substrate for cell growth and differentiation. *Meth. Enzymol.* 82 : 544—555.

Tjia J. S., Aneskievich B. J., Moghe P. V. 1999. Substrate-adsorbed collagen and cell secreted fibronectin concertedly induce cell migration on poly(lactide-glucolide) substrates. *Biomaterials.* 20 : 2223—2233.

Поступила 13 VI 2006

CULTURED SKIN CELLS INTERACTION WITH POLYLACTIDE SURFACE COATED BY DIFFERENT COLLAGEN STRUCTURES

Yu. A. Shved,^{1,*} L. V. Kukhareva,² I. M. Zorin,¹ M. I. Blinova,² A. Yu. Bilibin,¹ G. P. Pinaev²

¹ Chemical faculty of St. Petersburg State University, and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

* e-mail: ulychka@mail.ru

The purpose of this work was an optimization of polylactide film surfaces designed for human keratinocytes cultivation. The polylactide films were coated by collagen I. The experiments showed that uniform covering of polymer surface by collagen, and formation of different collagen structures depend on the mode of the protein application. The differences in collagen distribution on the polymer surface influenced the keratinocytes growth in culture. Analysis of keratinocytes alignment, as well as cytoskeleton organization demonstrated that fibrillar collagen promoted more even keratinocytes distribution in comparison with the distribution on molecular collagen.

Key words: cell therapy, biodegradable polymers, polylactide, fibrillar and molecular collagen, keratinocytes, actin cytoskeleton.