

# ANALIZA TOPOGRAFII POWIERZCHNI MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH, STOSOWANYCH JAKO PODŁOŻA DO HODOWLI CHONDROCYTÓW TECHNIKĄ AFM

JOANNA SZCZERBA<sup>1</sup>, ARKADIUSZ ORCHEL<sup>1</sup>,  
KATARZYNA JELONEK<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
JAN JURUSIK<sup>2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>, IRENEUSZ BIELECKI<sup>3</sup>,  
ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
UL. NARCYZÓW 1, SOSNOWIEC 41-200, POLSKA

<sup>2</sup> POLSKA AKADEMIA NAUK,  
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, ZABRZE 41-819, POLSKA

<sup>3</sup> ODDZIAŁ LARYNGOLOGII SPSK NR 6, GÓRNOŚLĄSKIE CENTRUM  
ZDROWIA DZIECKA I MATKI W KATOWICACH,  
UL. MEDYKÓW 16, 40-752 KATOWICE, POLSKA

## Streszczenie

Przy pomocy mikroskopu sił atomowych przeprowadzono analizę topografii powierzchni materiałów polimerowych w aspekcie badań adhezji i proliferacji komórek chondrocytów. Hodowle komórkowe prowadzono na płytkach opłaszczonych kopolimerami laktydu z glikolidem lub laktydu z trimetylenowęglanem. Kopolimer statystyczny laktydu z glikolidem 85/15 otrzymany w kopolimeryzacji wobec inicjatora cyrkonowego okazał się obiecującym materiałem o potencjalnym zastosowaniu jako nośnika chondrocytów w terapii defektów tkanki chrzęstnej.

[*Inżynieria Biomateriałów, 63-64, (2007), 55-59*]

## Wprowadzenie

Jednym z największych wyzwań w badaniach z zakresu medycyny regeneracyjnej dotyczących chrząstki szklistej jest odtworzenie, w warunkach in vitro tkanki, której macierz pozakomórkowa charakteryzowałaby się właściwościami biochemicznymi oraz biomechanicznymi zbliżonymi do tkanki natywnej. Ważnym czynnikiem wpływającym na różnicowanie się komórek do pożądanego fenotypu jest dobór biokompatybilnego nośnika o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych oraz strukturze przestrzennej. Właściwości nośnika powinny sprzyjać zasiedlaniu go przez komórki oraz ich namnażaniu i różnicowaniu do takiej postaci, aby mogły pełnić pożądaną funkcję. Interakcje z podłożem wpływają na aktywność oraz fenotyp komórek, a dobór materiału z jakiego będzie ono wykonane daje możliwość kontrolowania procesów różnicowania chondrocytów oraz ich zachowania.

Celem pracy była analiza topografii powierzchni nośników polimerowych w aspekcie zjawisk adhezji i proliferacji komórek tkanki chrzęstnej.

## Materiały i metody

Chondrocyty izolowano z chrzęstnego fragmentu żebra 3 letniego chłopca i umieszczono w pożywce MEM (Sigma) z dodatkiem 10% FBS. Hodowlę prowadzono w polistyrene-

# ANALYSIS OF THE SURFACE TOPOGRAPHY OF POLYMERIC SUBSTRATA FOR CHONDROCYTE CULTURE USING THE AFM TECHNIQUE

JOANNA SZCZERBA<sup>1</sup>, ARKADIUSZ ORCHEL<sup>1</sup>,  
KATARZYNA JELONEK<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
JAN JURUSIK<sup>2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>, IRENEUSZ BIELECKI<sup>3</sup>,  
ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
NARCYZÓW 1, SOSNOWIEC 41-200, POLAND

<sup>2</sup> POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY,  
M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, ZABRZE 41-819, POLAND

<sup>3</sup> DEPARTMENT OF OTOLARYNGOLOGY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
MEDYKÓW 16, KATOWICE 40-752, POLAND

## Abstract

*The analysis of the surface topography of polymeric materials in aspect of chondrocyte adhesion and proliferation was performed using atomic force microscopy technique. Dishes coated with biodegradable copolymers of lactide with glycolide and lactide with trimetylenocarbonate were used in cell culture. Random poly(L-lactide-co-glycolide) 85/15 obtained in the copolymerization with zirconium initiator proved the promising material, which can be used as the carrier of chondrocytes in therapy of the cartilaginous tissues defects.*

[*Engineering of Biomaterials, 63-64, (2007), 55-59*]

## Introduction

One of the greatest challenges of regenerative medicine researches is the reconstruction in vitro of hyaline cartilage with extracellular matrix characterized by biochemical and biomechanical properties similar to the native tissue. The most essential item is a selection of biocompatible cell carrier with appropriate physicochemical properties and the spatial architecture, stimulating cell differentiation and acquisition of desirable phenotype. Properties of the carrier should promote its colonization by cells and stimulate their proliferation. Interactions of cells with the substrate influence the activity and phenotype of cells. Selection of appropriate material to prepare of the cell carrier gives ability to control processes of differentiation and activity of chondrocytes.

The aim of the work was the analysis of the surface topography of polymeric materials in aspect of the phenomena of chondrocyte adhesion and proliferation.

## Materials and methods

The cells were isolated from costal cartilage from a rib of a three-year-old patient. Isolated cells were cultured in polystyrene flasks at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Chondrocytes were seeded on cell culture dishes coated with copolymers of L-lactide, glycolide and trimethylene carbonate. The first material used was a copolymer of glycolide and L-lactide with a molar ratio of monomers 85:15. The second copolymer

nowych naczyń w temperaturze 37°C, w atmosferze 95% powietrza i 5%CO<sub>2</sub>. Jako podłoża dla chondrocytów wykorzystano kopolimery glikolidu, laktydu oraz trimetylenowęglanu (TMC). Podłoże 1 wykonano z kopolimeru L-laktydu z glikolidem o udziale molowym jednostek komonomerycznych 85/15, a podłoże 2 wykonano z kopolimeru L-laktydu z TMC o udziale jednostek komonomerycznych 70/30. Próbę kontrolną stanowiły chondrocyty rosnące na niemodyfikowanym plastikowym podłożu polistyrenowym.

Topografia powierzchni podłoży oceniana była przy pomocy mikroskopu sił atomowych TopoMetrix Explorer AFM, pracującego w trybie kontaktowym.

Oceny morfologii chondrocytów dokonano po 96h hodowli przy pomocy mikroskopu odwróconego OLYMPUS-IX 70, zaś szybkość proliferacji komórek badano z wykorzystaniem zestawu CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit. Ten sam zestaw umożliwił ocenę procesu zakotwiczenia się chondrocytów na badanych podłożach. Zasada testu opiera się na pomiarze fluorescencji emitowanej przez barwnik CyQUANT GR, wiążący się z kwasami nukleinowymi komórek. Ekspresję podjednostek integrynowych  $\alpha 5$  oraz  $\beta 1$  badano z wykorzystaniem immunoblotingu.

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta, przy użyciu programu STATISTICA 6.0.

## Wyniki i dyskusja

Kluczowe znaczenie dla wdrożenia nowych metod leczenia ubytków tkanki chrzęstnej ma opracowanie biodegradabilnych nośników, które mogłyby być wykorzystywane do wytwarzania trójwymiarowych, resorbowalnych podłoży o mikrostrukturze i właściwościach sprzyjających zasiedlaniu ich przez komórki. Podłoże powinno także zapewnić środowisko, w którym komórki mogą utrzymać zróżnicowany fenotyp, syntetyzować wymagane białka i molekuly macierzy zewnątrzkomórkowej.

Wpływ na zachowanie i morfologię komórek ma nie tylko skład chemiczny podłoża, ale także jego cechy fizyko-chemiczne, między innymi topografia powierzchni i porowatość. Komórki prawidłowe reagują z bardzo dużą czułością na rzeźbę powierzchni, która wpływa na stopień zakotwiczenia komórek do podłoża. Adhezja z kolei odgrywa istotną rolę w wielu procesach takich jak: proliferacja, różnicowanie komórek, ich apoptoza, migracja, a nawet ekspresja genów i kurczliwość komórek [1,2]. Tylko komórki przytwierdzone do podłoża podejmują syntezę DNA i proliferują, natomiast utrata tego kontaktu powoduje zahamowanie wzrostu i w wielu przypadkach śmierć apoptyczną [3].

Kontrola nad różnicowaniem się i proliferacją komórek jest niezwykle ważna w inżynierii tkankowej, dlatego celem prezentowanej pracy była ocena wpływu mikrostruktury dwóch podłoży polimerowych, na zdolność adhezji, proliferację oraz morfologię chondrocytów.

Po 96h od założenia hodowli, obserwowano jak zastosowane podłoża wpływają na morfologię dojrzałych chondrocytów, które mają tendencję do odróżnicowywania się w warunkach *in vitro* [4]. Tuż po uwolnieniu z tkanki chondrocyty przybierały postać kulistą swobodnie pływając w pożywce, jednak w ciągu kilku godzin ulegały adhezji do podłoża. Zakotwiczone komórki ulegały rozplaszczeniu na dnie naczynia i traciły kulisty kształt (RYS.1), po czym

was 70:30 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate). The control material was standard tissue culture polystyrene. The surface morphology investigations of the polymeric films were performed in air using the atomic force microscope (TopoMetrix Explorer) in contact mode. The morphology of cells was analyzed using the inverted OLYMPUS IX70 microscope. Cell proliferation and adhesion were quantified by means of CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes). The basis for this assay is the use of the green fluorescent dye (CyQUANT GR dye), which exhibits strong fluorescence enhancement when bound to cellular nucleic acids.  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  integrin subunits expression was measured by Western blotting.

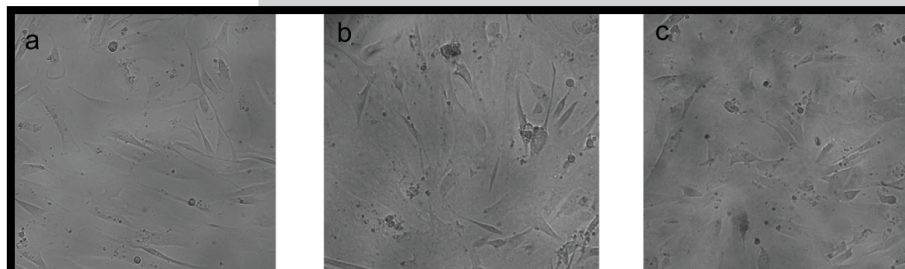
## Results and discussion

Finding new biocompatible carriers, which could be used for production of three-dimensional, resorbable scaffolds with the microstructure and properties supporting colonization by chondrocytes is of crucial importance for implementation of new procedures of therapy against cartilage defects. These scaffolds should provide the environment in which the cells can maintain differentiated phenotype, synthesize required proteins and molecules of the extracellular matrix.

Apart from chemical composition of the substrate, its physical features as well as the topography of surface and its porosity can influence on the behavior and the morphology of cells. The normal cells react with the great sensitivity on the relief of surface, which influences on the amount of cells anchored to the substrate. On the other hand adhesion plays an essential role in many processes such as: proliferation, differentiation, apoptosis, migration and even contractility of the cells and gene expression [1,2]. Only the cells attached to the substratum carry out the DNA synthesis and proliferate, and loss of this contact causes inhibition of growth and in many cases apoptotic death [3].

The precise control of differentiation and proliferation of the cells is extremely important in tissue engineering, and therefore, the aim of the presented work was the evaluation of the impact of microstructure of two polymeric materials on the adhesion, proliferation and morphology of human chondrocytes.

After 96h from starting a culture, the influence of polymeric substrata on morphology of mature chondrocytes was analyzed, the cells that have a tendency to dedifferentiate during *in vitro* propagation [4]. After release of chondrocytes from tissue, they take spherical shape freely floating in medium, however within few hours the cells underwent the adhesion to the substratum. Attached cells underwent flattening at the bottom of the cell culture dish. They lost the spherical shape (FIG.1) and underwent proliferation. The proliferation on the materials studied was only slightly



**RYS.1.** Obraz hodowli chondrocytów po 96 godzinach inkubacji na podłożu a) polistyrenowym, b) opłaszczonym polimerem 1, c) opłaszczonym polimerem 2 (powiększenie  $\times 100$ ).

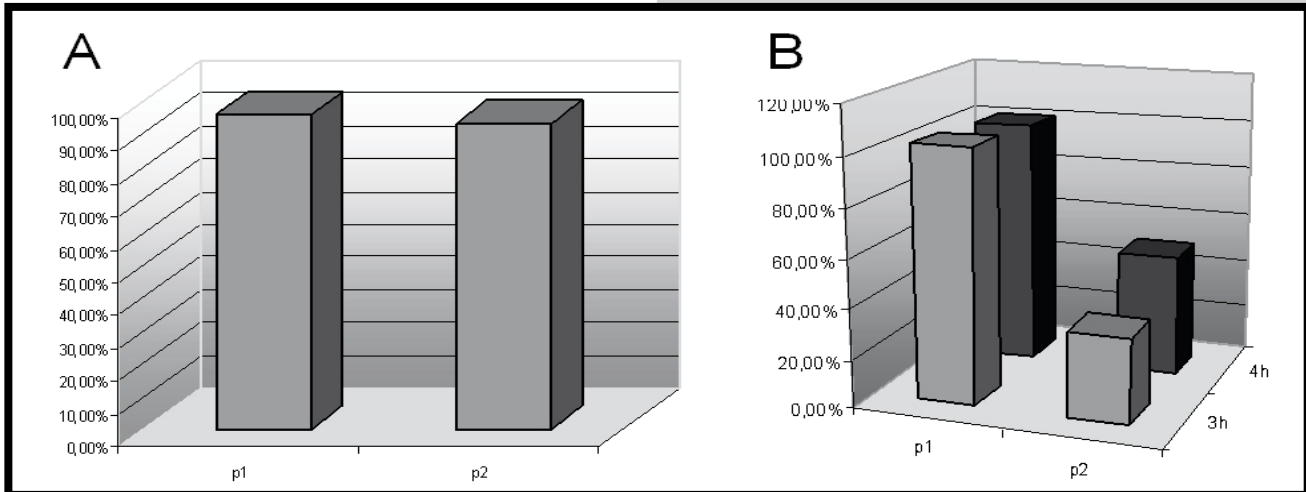
**FIG.1.** Image of chondrocytes after 96 h of the incubation in culture on a) polystyrene, b) 85:15 poly(L-lactide-co-glycolide), c) 70:30 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate (100 $\times$  enlargement).

podejmowały proliferację. Proliferacja na zastosowanych podłożach polimerowych była tylko nieznacznie mniejsza w porównaniu do jej szybkości na powierzchni polistyrenowej (RYS.2a). Tak dobry wzrost chondrocytów na tych biomateriałach można tłumaczyć znaczną ilością segmentów laktydylowych łańcucha kopolimerowego w podłożu. Potwierdzają to również wyniki badań Pamuły i wsp. [5], a także Hondy i wsp. [6], którzy sugerują lepszą kompatybilność polimerów zawierających w swoim składzie łańcuchy polilaktydowe w porównaniu z innymi poliestrami.

Z kolei ilość zaadsorbowanych chondrocytów po 3 i 4 godzinach hodowli na podłożach polimerowych różniła się istotnie (RYS.2b). Na podłożu 1 liczba zakotwiczonych chondrocytów była zbliżona do ich liczby w hodowli kontrolnej (RYS.2b). Natomiast na podłożu 2 zakotwiczanie komórek zachodziło znacznie wolniej niż w kontroli (RYS.2b).

decreased compared to the polystyrene surface (FIG.2a). Good growth of chondrocytes on these biomaterials can be explained by the abundance of lactide segments of polymeric chains. The findings of Pamuła et al. [5] as well as of Honda et al. [6] are generally in concordance with our results, moreover these authors suggest the better compatibility of polymers containing polylactid chains in their composition compared with the others polyesters.

On the other hand, the amount of attached chondrocytes after 3 and 4 h incubation on the polymeric materials differed significantly (FIG.2b). On the substratum 1 the amount of attached chondrocytes was similar as in control (FIG.2b). However, on the substratum 2 the anchoring of the cells occurred much slower than in the control (FIG.2b). Striking differences in the surface topography of both substrata could be an important factor influencing the rate of cell an-



**RYS.2. a) liczba chondrocytów po 96 godzinach hodowli na podłożach polimerowych 1 oraz 2 (% kontroli), b) liczba chondrocytów które uległy adhezji (po 3 oraz 4 h inkubacji) do podłoża polimerowego 1 oraz 2 w odniesieniu do hodowli kontrolnej na podłożu polistyrenowym (%).**

**FIG.2. a) Number of the cell after 96 h incubation on the polymer 1 and 2 (% of control), b) number of anchored chondrocytes (3 and 4 h incubation) to the polymer 1 and 2 (% of control on polystyrene base)**

Czynnikami, który mógł mieć znaczący wpływ na szybkość zakotwiczania się komórek były różnice w topografii obu podłoży (RYS.3b,c). Chropowatość w dużym stopniu wpływa na różnice w zdolności zakotwiczania się chondrocytów [7]. Na zachowanie i wygląd komórek mają wpływ nawet bardzo drobne rysy powierzchni o głębokości 6 nm [8]. Podłoże 1 charakteryzowało się gładką powierzchnią z rzadką występującymi wgłębieniami (RYS.3b), natomiast na powierzchni materiału 2 widoczne były stosunkowo płytkie lecz liczne i ostre uwypuklenia i zagłębienia (RYS.3c). Niektórzy autorzy sądzą, że nierówności podłoża o ostrych kształtach mogą mechanicznie uszkadzać komórki [9]. Powierzchnia podłoża 2 wyglądała jak naszpikowana ostro zakończonymi stożkami (RYS.3c), co mogło utrudniać komórkom zakotwiczenie się. Podłoże 1 ze względu na swoją topografię (RYS.3b) pozwoliło najprawdopodobniej na wytworzenie większej ilości połączeń między jego powierzchnią, a integralnymi zakotwiczonymi w błonie komórkowej chondrocytów. Białka te odgrywają kluczową rolę w procesach adhezji komórek. Wiążą one białka cytoszkieletu z białkami substancji międzykomórkowej, co uruchamia kaskadę reakcji wewnątrzkomórkowych decydujących o morfologii oraz aktywności metabolicznej komórek, tym samym wpływając na procesy ich różnicowania.

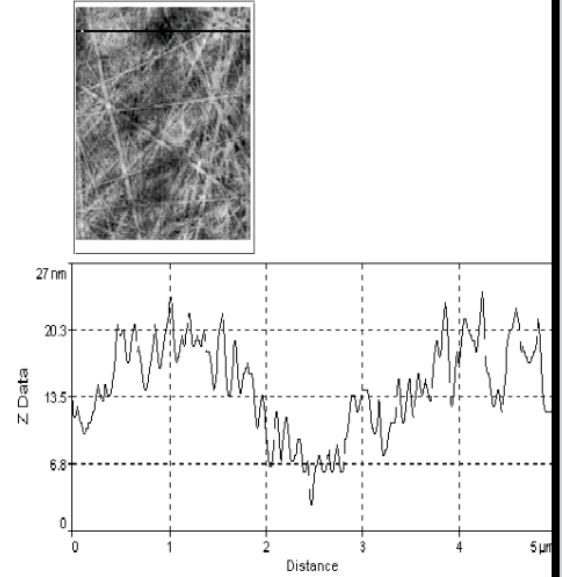
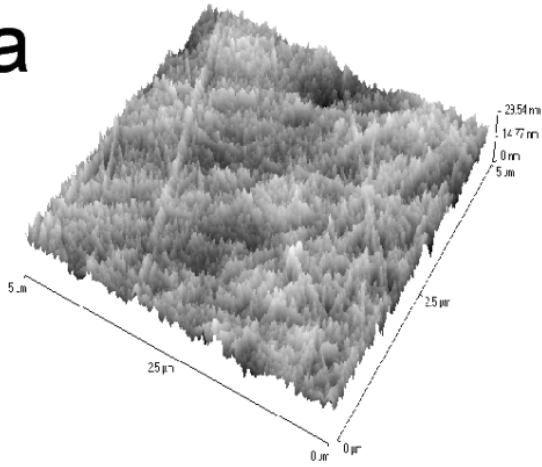
Zdolność adhezji do danego podłoża w dużej mierze zależy także od składu poszczególnych podjednostek integralnych [10]. Integralny  $\alpha 5\beta 1$  odgrywa istotną rolę w kon-

choring (FIG.3b,c). The roughness of surface significantly influences the ability of chondrocytes to attach [7]. Even slight scratches of the surface (6nm depths) can affect behavior and morphology of the cells [8]. The substratum 1 was characterized by a smooth surface with sparsely appearing hollows (FIG.3b). However, on the surface of polymer 2 relatively shallow but numerous and sharp heights and hollows were visible (FIG.3c). Some authors suggest that the sharp irregularities of surface can mechanically damage the cells (9). The surface of material 2 looked as larded with sharp ended cones (FIG.3c), what could make it difficult for cells to attach. The substratum 1 with regard to its topography (FIG.3b) most probably permitted for larger amounts of connections between its surface and integrins, the integral plasma membrane proteins of chondrocytes, than the material 2. These proteins act the key role in the attachment of a cell to the extracellular matrix (ECM) and in signal transduction from the ECM to the cell. They are combining proteins of cytoskeleton with proteins of intercellular substance, what is starting the cascade of intracellular reactions crucial for morphology and metabolic activity of the cells and influencing processes of differentiation. The ability of the cell to adhere to the substrate largely depends on the composition of individual subunits of integrins [10].

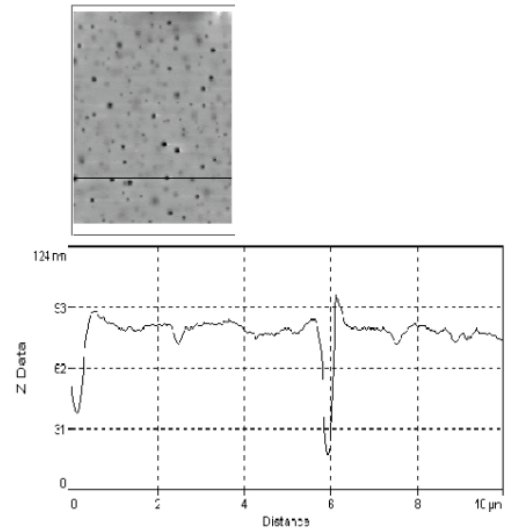
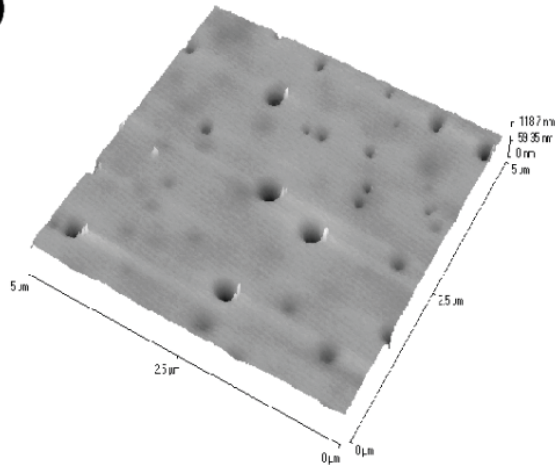
Integrins  $\alpha 5\beta 1$  play an essential role in the control of the process differentiation of chondrocytes. Acting as mechanoreceptors they mediate the influence of mechanical



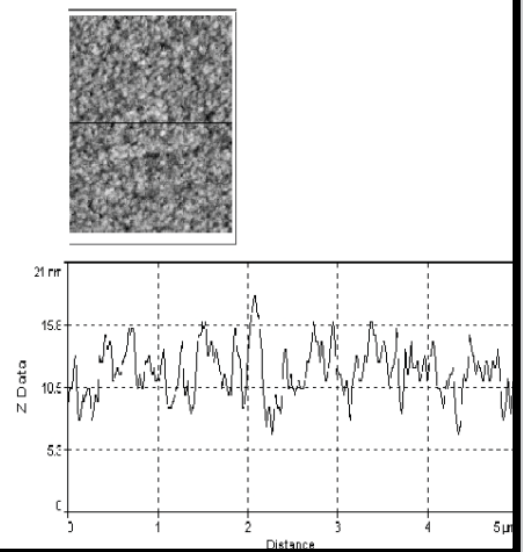
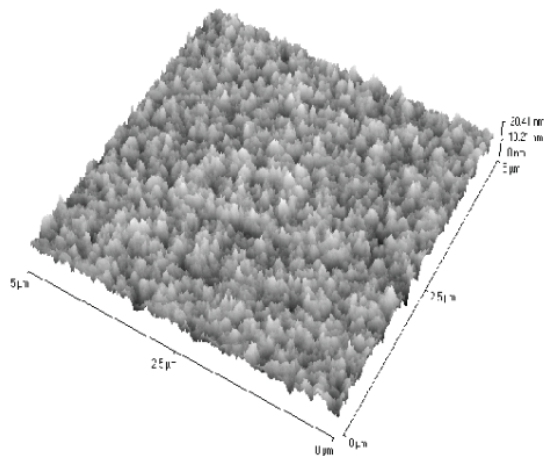
a



b



c



**RYS.3.** Topografia powierzchni podłoży: a) polistyrenowego, b) polimer 1 (85 % L-Laktyd/ 15% Glikolid), c) polimer 2 (70% L-Laktyd/30% TMC). Obraz uzyskany z mikroskopu sił atomowych.  
**FIG.3.** Topology of bases surfaces: a) polystyrene, b) 85:15 poly(L-lactide-co-glycolide), c) 70:30 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate). Atomic force microscope image.

troli procesu różnicowania chondrocytów. Działając jako mechanoreceptory pośredniczą one w oddziaływaniu bodźców mechanicznych na fenotyp tych komórek [11]. W obecnej pracy wykazano, że chondrocyty hodowane na powierzchni badanych biomateriałów utrzymywały na wysokim poziomie ekspresję podjednostek integrynowych  $\alpha 5$  oraz  $\beta 1$

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki możemy stwierdzić iż podłoże 1 (85:15 poli(L-laktydo-ko-glikolid) stanowi obiecujący materiał, który może być wykorzystany jako nośnik chondrocytów w leczeniu ubytków tkanki chrzęstnej. Ponadto technika AFM jest użytecznym narzędziem w badaniu topografii podłoży hodowlanych wykonanych z poliestrów alifatycznych.

## Podziękowania

Praca finansowana z grantu MNiSW: N51800731/0433 oraz NN-2-086/07

stimuli on the phenotype of these cells (11). In the current work it was shown that the chondrocytes cultured on the surface of investigated biomaterials had kept the expression of integrin subunits  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  on the high level.

Considering received results we can conclude that polymer 1 (85:15 poly(L-lactide-co-glycolide) is the promising material, which can be used as the carrier of chondrocytes in therapy of the cartilaginous tissues defects. Moreover, the AFM technique appeared as a useful tool in the investigations of topography of the solid substrata made from aliphatic polyesters.

## Acknowledgements

*This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education (Grant No: N51800731/0433 and NN-2-086/07)*

## Piśmiennictwo

- [1] Yamada K.M., Geiger B.: *Curr Opin Cell Biol.*, 9, (1997), 76-85.
- [2] Gallant N.D., Michael K.E., Garcia A. J.: *Mol Biol Cell.*, 16, (2005), 4329-4340.
- [3] Frisch S.M., Ruoslahti E.: *Curr Opin Cell Biol.*, 9, (1997), 701-706.
- [4] Villar-Suarez V., Calles-Venal I., Bravo I.G., Fernandez-Alvarez J.G., Fernandez-Caso M., Villar-Lacilla J.M.: *J Biomed Biotechnol.*, 2, (2004), 86-92.
- [5] Pamuła E., Dobrzynski P., Bero M., Paluszkiewicz C.: *J. Mol. Structure.*, (2005), 744-747
- [6] Honda M.J., Yada T., Ueda M., Kimata K.: *J Oral Maxillofac Surg.*, 62, (2004), 1510-1516.

## References

- [7] Ishaug-Riley S.L., Okun L.E., Prado G., Applegate M.A., Ratcliffe A.: *Biomaterials.*, 20, (1999), 2245-2256.
- [8] Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoła J.: *Podstawy Cytofizjologii* PWN Warszawa (1998).
- [9] Bacakova L., Filova E., Rypacek F., Svorcik V., Stary V.: *Physiol Res.*, 53, (2004), 35-45.
- [10] El-Amin S.F., Attawia M., Lu H.H., Shah A.K., Chang R., Hickok N.J., Tuan R.S., Laurencin C.T.: *J. Orthop. Res.*, 20, (2002), 20-28.
- [11] Wright M.O., Nishida K., Bavington C., Godolphin J.L., Dunne E., Walmsley S., Jobanputra P., Nuki G., Salter D.M. *J Orthop Res.* 15 (1997) 742-747. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 2003, 14,109-12.