OSTEOBLASTIC CELL GROWTH AND ENZYMATIC DEGRADATION OF DIFFERENT ALIPHATIC POLYESTER SCAFFOLDS

Attaphon Prasansuklarb

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma and
Case Western Reserve University
2008

510304

Thesis Title:	Osteoblastic Cell Growth and Enzymatic Degradation of Different Aliphatic Polyester Scaffolds
By:	Attaphon Prasansuklarb
Program:	Polymer Science
Thesis Advisors:	Assoc. Prof. Pitt Supaphol

Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science.

..... College Director
(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

Thesis Committee:

.....
(Assoc. Prof. Pitt Supaphol)

.....
(Assoc. Prof. Prasit Pavasant)

.....
(Assist. Prof. Chidchanok Meechaisue)

.....
(Dr. Damrong Damrongsri)

ABSTRACT

4972003063: Polymer Science Program
Attaphon Prasansuklarb: Osteoblastic Cell Growth and Enzymatic Degradation of Different Aliphatic Polyester Scaffolds
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Pitt Supaphol 82 pp.
Keywords: Solvent Casting and Particulate Leaching / Scaffold/ Aliphatic polyester/ Enzymatic degradation/ Osteoblast

Scaffolds are key components in tissue engineering. In bone regeneration, it serves as a template for cell interactions and for the formation of the bone-extracellular matrix to provide structural support to the newly formed bone tissue. Aliphatic polyesters are the most interesting materials for use as the scaffolds because of their controllable chemical and physical properties. Although the degradation behavior of the polyester scaffolds has been widely studied, comparative studies of the properties of scaffolds from different polyesters are rare. In this study, 5 types of aliphatic polyesters—polycaprolactone (PCL), poly(1,4-butylene succinate) extended with 1,6-diisocyanatohexane (PBSu-DCH), poly(lactic acid) (PLA), poly(3-hydroxybutyric acid) (PHB), and poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) (PHBV)—were fabricated into porous scaffolds by solvent casting and salt particulate leaching at a 30:1 NaCl/polymer weight ratio. Scanning electron microscopy (SEM) images confirmed that the channels in the scaffolds had directional connection, equal distribution, and a uniform pore size of 400-500 μm. The degradation of the three-dimensional scaffolds was investigated up to 13 weeks in a lipase/phosphate buffered saline solution at 37°C. Remaining weight, mechanical properties, morphology, and crystallinity measurements were monitored to determine the degradation of the scaffolds. Moreover, the potential of use these scaffolds in bone regeneration application was evaluated *in vitro* with human osteoblasts (SaOS-2).

บทคัดย่อ

อรรถพล ประสารสุขลาภ : ศึกษาเชิงเปรียบเทียบการเสื่อมสลายของโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจากสารพอลีเอสเตอร์ชนิดต่างๆด้วยเอมไซน์ไลเปส (Osteoblastic Cell Growth and Enzymatic Degradation of Different Aliphatic Polyester Scaffolds)
อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.พิชญ์ ศุภผล 82 หน้า

โครงเลี้ยงเซลล์กระดูกนับเป็นองค์ประกอบสำคัญในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกจะมีหน้าที่เสมือนเป็นเมตริกซ์นอกเซลล์ ทั้งยังเป็นโครงสร้างให้เซลล์ได้ยึดเกาะและชักนำให้เกิดการตอบสนองของชีวกลไกที่เอื้อต่อการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ในปัจจุบันพอลิเอสเตอร์ถูกนำมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์กระดูกเนื่องจากพอลิเอสเตอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ มีกลสมบัติที่เพียงพอต่อการรองรับแรงที่เกิดจากน้ำหนักของเนื้อเยื่อ และสามารถเสื่อมสลายไปตามกลไกภายในร่างกาย ในงานวิจัยนี้พอลิเอสเตอร์ 5 ชนิดได้แก่ พอลิคาโปรแลคโตน (PCL) พอลิบิวทิวลีนซัคซิเนท (PBSu-DCH) พอลิแลคติกแอซิด (PLA) พอลิไฮดรอกซีบิวทิวริกแอซิด (PHB) และพอลิไฮดรอกซีบิวทิวริกแอซิดโคไฮดรอกซีวาลิริกแอซิด (PHBV) ถูกนำมาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกระบวนการหล่อและใช้เกลือเป็นสารที่ทำให้เกิดความพรุน โดยใช้อัตราส่วนที่ผสมระหว่างพอลิเอสเตอร์ต่อเกลือคือ 1 ต่อ 30 โดยน้ำหนัก พบว่ารูพรุนที่เกิดบนโครงเลี้ยงเซลล์มีลักษณะเชื่อมต่อกันเป็นอย่างดีและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 400-500 ไมโครเมตร มีความเป็นรูพรุนอยู่ในช่วง 93-96 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนำโครงเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบการเสื่อมสลายในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซึ่งผสมเอมไซน์ไลเปสเป็นเวลา 13 สัปดาห์ พบว่าเอมไซม์ไลเปสมีผลต่อการเร่งการเสื่อมสลายของโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิคาโปรแลคโตนและพอลิไฮดรอกซีบิวทิวริกแอซิดโคไฮดรอกซีวาลิริกแอซิดและอัตราการเสื่อมสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ผสมไลเปสสามารถเรียงตามลำดับดังนี้ PBSu-DCH>PCL>PHB>PHBV>PLA นอกจากนี้ งานวิจัยได้ศึกษาถึงความเป็นพิษและการตอบสนองทางชีววิทยาของโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเอสเตอร์ พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเอสเตอร์ทั้ง 5 ชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 และผลของการทดสอบความเข้ากันได้ต่อเซลล์ออสทีโอบลาสจากกระดูกของมนุษย์ (SaOS-2) พบว่าเซลล์สามารถเกาะและแบ่งตัวได้ดีบนผิวโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิคาโปรแลคโตนและพอลิบิวทิวลีนซัคซิเนท

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express his sincere gratitude to his advisors and committees, Assoc. Prof. Pitt Supaphol, Assoc. Prof. Prasit Pavasant, Assist. Prof. Chidchanok Meechaisue and Dr. Damrong Damrongsri for their sincere assistances. They have provided the very useful guidance and the great encouragement throughout this research.

The author would like to express many thanks to all of his colleagues, staff and teachers in the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University who helped his greatly during his studies.

The author is grateful for the scholarship and funding of the thesis work provided by the Petroleum and Petrochemical College; and the National Excellence Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Thailand.

The author wishes to give thanks to all of his friends for their helps and suggestions.

Finally, the author would like to express his appreciation for greatest love and supporting which he received all of his life from his family, especially his father and his mother.

TABLE OF CONTENTS

		PAGE
Title Page		i
Abstract (in English)		iii
Abstract (in Thai)		iv
Acknowledgements		v
Table of Contents		vi
List of Tables		viii
List of Figures		ix
Abbreviations		x
List of Symbols		x
CHAPTER		
I	**INTRODUCTION**	1
II	**LITERATURE REVIEW**	3
III	**EXPERIMENTAL**	25
	3.1 Materials	25
	3.2 Equipment	25
	3.3 Methodology	26
	3.3.1 Preparation of Polyester Scaffolds	26
	3.3.2 Degradation Experiment	26
	3.3.3 Characterization of Porous Scaffolds	27
	3.3.3.1 Porosity Pore Volume and Pore Size	27
	3.3.3.2 Water Absorption Capability	27
	3.3.3.3 Remaining Weight of Porous Scaffolds	28
	3.3.3.4 Morphology of Porous Scaffolds	28
	3.3.3.5 Compressive modulus of Porous Scaffolds	28
	3.3.3.6 Thermal Properties of Porous Scaffolds	29

CHAPTER		PAGE
	3.3.4 Cell Culture	29
	3.3.4.1 Indirect Cytotoxic Study	29
	3.3.4.2 Cell Attachment and Cell Proliferation Study	30
	3.3.4.3 Alkaline Phosphate Analysis (ALP)	30
	3.3.4.4 Morphological Observation of Cultured Cells	31
	3.3.5 Statistic Analysis	31
IV	**RESULTS AND DISCUSSION**	32
	4.1 Preparation and Characterization of Porous Scaffolds	32
	4.1.1 Microstructure Observation	33
	4.1.2 Density, Porosity, Pore volume and Pore size	35
	4.1.3 Water Absorption Capability	36
	4.2 Degradation Study of Porous Scaffolds	37
	4.2.1 Weight Remaining After Degradation	39
	4.2.2 Compressive Modulus	41
	4.2.3 Thermal Properties	43
	4.3 Cytotoxicity	45
	4.4 Cell Attachment and Proliferation	46
	4.5 Morphological Observation of Cultured Cells	48
	4.6 Alkaline Phosphatase (ALP) Activity	50
V	**CONCLUSION**	51
	REFERENCES	52
	APPENDICES	57
	Appendix A Characterization of Porous Scaffolds	57
	Appendix B Degradation of Porous Scaffolds	63
	Appendix C Cell Culture	80
	CURRICULUM VITAE	82

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Ideal structural parameters of tissue engineering scaffolds	4
2.2	Currently applied three dimensional scaffold fabrication technologies	6
2.3	Conventional scaffold processing techniques for tissue engineering	10
2.4	The composition of bone	12
2.5	Biomechanical properties of bone	13
2.6	The research program for tissue engineering bone and cartilage	14
2.7	Classification of biomaterials for bone graftings	15
2.8	Definition given by Vert	17
4.1	Density, percentage of porosity, pore volume and pore size of the scaffolds	35
4.2	SEM images illustrate microstructure of the scaffolds after degrading in lipase/PBS solution for 5, 9 and 13 weeks	38
4.3	Compressive modulus of degraded scaffolds in PBS solution	42
4.4	Compressive modulus of degraded scaffolds in lipase/PBS solution	42
4.5	Thermal characteristics and apparent crystallinity of porous scaffolds before degradation study	43
4.6	Change of apparent crystallinity and melting temperature of porous scaffolds after immersion in lipase/PBS for 13 week	44
4.7	Selected SEM images SaOS-2 cultured on porous scaffolds and glass at 1 and 7 days in culture	49

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	SEM micrograph of various scaffold	5
2.2	The hierarchical structure of bone	14
2.3	The structure of polycaprolactone	18
2.4	The structure of polylactic acid	19
2.5	The structure of poly(1,4-butylene succinate), extended with 1,6-diisocyanatohexane	20
2.6	The structure of Poly(3-hydroxybutyric acid)	21
2.7	Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)	21
2.8	Principle of microbial polyester degradation	24
4.1	The three-dimensional structure of the polycaprolactone porous scaffolds	32
4.2	SEM images illustrate microstructure of the scaffolds on the cross-sections	34
4.3	Water absorption capability of the scaffolds	36
4.4	Change of shape and dimension of porous scaffolds after immersion in lipase/PBS with incubation time	37
4.5	Remaining weight of the scaffolds after 13 weeks degradation	40
4.6	Compressive modulus of the degraded PCL scaffold in PBS containing with and without lipase	41
4.7	Indirect cytotoxic evaluation of porous scaffolds	45
4.8	Attachment of SaOS2 on TCPS and porous scaffolds	46
4.9	Proliferation of SaOS2 on TCPS and porous scaffolds	47
4.10	ALP activity of SaOS2 cultured on porous scaffolds	50

ABBREVIATIONS

Polycaprolactone	PCL
Poly(1,4-butylene succinate), extended with 1,6-diisocyanatohexane	PBSu-DCH
Poly(lactic acid)	PLA
Poly(3-hydroxybutyric acid)	PHB
Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)	PHBV
Phosphate buffered saline	PBS
Human osteoblasts	SaOS-2

LIST OF SYMBOLS

Micrometer	μm
Angstrom	A^{o}
Degree	^{o}
Milligram	mg
Microliter	μl
Mililiter	ml
Minute	min
Hour	h
Microliter	μl