SURFACE MODIFICATION OF POLYCAPROLACTONE MEMBRANE VIA AMINOLYSIS AND PROTEIN-IMMOBILIZATION FOR PROMOTING BONE CELL GROWTH

Sirichanok Satianyanond

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
2011

I28374745

Thesis Title:	Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Protein-Immobilization for Promoting Bone Cell Growth
By:	Sirichanok Satianyanond
Program:	Polymer Science
Thesis Advisor:	Prof. Pitt Supaphol

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

..... College Dean

(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:

.....

(Prof. Pitt Supaphol)

.....

(Assoc. Prof. Prasit Pavasant)

.....

(Asst. Prof. Hathaikarn Manuspiya)

.....

(Dr. Patcharaporn Thitiwongsawet)

ABSTRACT

5272026063: Polymer Science Program
Sirichanok Satianyanond: Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Protein- Immobilization for Promoting Bone Cell Growth.
Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol 54 pp.
Keywords: Polycaprolactone/ Crude bone protein/Bovine serum albumin/ Immobilization

In order to make polycaprolactone (PCL) more preferable for tissue engineering, the study aims to improve the cytocompatibility, hydrophilicity as well as cellular responsibility of PCL membrane by surface modification. PCL films were firstly aminolyzed by reacting with 1,6-hexamethylene diamine (HMD) and followed by immobilizing with crude bone protein (CBP) and bovine serum albumin (BSA) by using *N'N* disuccinimidyl (DSC) as a coupling agent. Several techniques; UV-VIS Spectroscopy, water contact angle ATR-FTIR, and XPS, were used to confirm the existence of functional group on the surface of PCL after modification occurred. The potential use of the modified materials as bone tissue engineering was evaluated by mouse-calvaria derived pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1). *In vitro* indirect cytotoxicity evaluation performed revealed that both the neat and the modified PCL film mats released no substances at levels that were harmful to these cells. Scanning electron microscopy observation showed an evidence of the extension of cell cytoplasm on protein-immobilized PCL films surface even at 6 h after cell seeding. The culture MC3T3-E1 proved that the cell proliferation was improved remarkably on the protein-immobilization, especially the BSA-immobilized PCL film mats which showed the greatest proliferation after cell culture as well as the highest ALP activity. In mineralization, the deposition of minerals was highest on the BSA-immobilized PCL film. All the obtained results suggested that the improvements of bone cell growth can be achieved by immobilization of CBP and BSA on the surface of PCL, which is an attractive method for bone tissue engineering.

บทคัดย่อ

สิริชนก เสถียรยานนท์ : การดัดแปรพื้นผิวฟิล์มของพอลิคาโปรแลคโตนโดยวิธีอะมิโนไลซีสและการติดโปรตีนเพื่อใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ (Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Protein-Immobilization for Promoting Bone Cell Growth.) อ.ที่ปรึกษา : ศ. ดร. พิชญ์ ศุภผล 54 หน้า

เพื่อที่จะทำให้พอลิคาโปรแลคโตนมีความเหมาะสมในทางเนื้อเยื่อวิศวกรรมมากขึ้น การศึกษานี้ประสงค์ที่จะพัฒนาพื้นผิวแผ่นฟิล์มของพอลิคโปรแลคโตนให้มีความเข้ากับเซลล์ ความเข้ากับน้ำ และเพิ่มการตอบสนองของเซลล์โดยวิธีการปรับปรุงพื้นผิว แผ่นฟิล์มพอลิคาโปรแลคโตนถูกอะมิโนไลซ์โดยการทำปฏิกิริยากับเฮกซะเมทิลีนไดเอมีน (1,6-hexanediamine) และตามด้วยการติดกับโปรตีนที่สกัดจากกระดูก (crude bone protein) หรือ โบวิน เซรั่ม อัลบูมิน (bovine serum albumin) โดยใช้ไดซัคซินิมิดิลคาร์บอเนต (*N,N'*-disuccinimidyl-carbonate) เป็นสารคู่ควบ เครื่องยูวี วิสสิเบิล สเปกโตรสโกปี (UV-VIS Spectroscopy), การวัดมุมสัมผัสกับน้ำ, เทคนิคเอทีอาร์เอฟที-ไออาร์ สเปกโทรสโกปี (ATR-FTIR), และเอกซเรย์โฟโตอิเล็กตรอนสเปกโทรสโกปี (XPS) ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการปรากฏของหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของแผ่นฟิล์มพอลิคาโปรแลคโตนหลังจากการปรับปรุงพื้นผิวเกิดขึ้น แผ่นฟิล์มพอลิคาโปรแลคโตนที่ถูกปรับสภาพพื้นผิวถูกนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นวัสดุโครงร่างสำหรับกระดูก โดยใช้เซลล์กระดูกของหนู (MC3T3-E1) จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธีอ้อม พบว่าแผ่นฟิล์มทุกชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ การถ่ายภาพของพื้นผิววัสดุโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่าเซลล์สร้างกระดูกชนิด MC3T3-E1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง บนวัสดุที่ดัดแปลงพื้นผิวโดยการติดโปรตีนแล้วมีการแผ่ขยายของ cytoplasm การเจริญเติบโตของเซลล์ถูกพัฒนาขึ้นอย่างชัดเจนกับเซลล์ที่เลี้ยงบนฟิล์มที่ดัดแปรพื้นผิวโดยการติดโปรตีน โดยเฉพาะแผ่นฟิล์มที่ติดโบวิน เซรั่ม อัลบูมินที่แสดงค่าการเจริญเติบโตของเซลล์มากที่สุด พร้อมทั้งให้ค่าและอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี้มากที่สุดเช่นกัน ในการทดลองหาปริมาณแร่ธาตุที่เซลล์สร้างขึ้น เซลล์มีการสร้างแร่ธาตุมากที่สุดบนแผ่นฟิล์มพอลิคาโปรแลคโตนที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยโบวิน เซรั่ม อัลบูมิน ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเซลล์สามารถพัฒนาได้บนฟิล์มพอลิคาโปรแลคโตนที่ได้รับการดัดแปรพื้นผิวด้วยโปรตีนสกัดจากกระดูก และโบวิน เซรั่ม อัลบูมิน ซึ่งเป็นวัสดุที่น่าสนใจในการนำไปทำวัสดุโครงร่างสำหรับเซลล์กระดูก

ACKNOWLEDGEMENTS

Firstly, the author would like to express the gratitude to her advisor, Prof. Dr. Pitt Supaphol, for his useful suggestions, constructive advices and guidance, kindness and encouragement throughout her one-year thesis.

The author would like to give her thankfulness to Assoc. Prof. Dr. Prasit Pavasant, Asst. Prof. Hathaikarn Manuspiya, and Dr. Patcharaporn Thitiwongsawet for being her committees. Highly thankfulness goes to Assoc. Prof. Dr. Prasit Pavasant for any suggestions, comments, valuable knowledge in cell culture and also providing a laboratory room and all necessary instruments.

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

The author would like to thank for the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for being a great place and the author appreciates all professors, lecturers and staffs who have tendered knowledge and technical support. The author also appreciates for friendship, helpfulness and creative suggestions from all of her friends at the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University.

Last but not least, the author would like to thank God for everything He has always done for her. The important ones in her life, her family, the author would like to thank them all from the bottom of her heart for always being with, truly encouragement, understanding, warm hug, and trustily praying for her.

TABLE OF CONTENTS

		PAGE
Table of Contents		vi
List of Tables		ix
List of Figures		x
CHAPTER		
I	**INTRODUCTION**	1
II	**LITERATURE REVIEW**	2
III	**EXPERIMENTAL**	
	3.1 Materials	17
	3.1.1 Materials used for Casting Film Mat	17
	3.1.2 Material used in the Surface Modification	17
	3.1.3 Materials used for Cell Culture Study	18
	3.2 Equipment	18
	3.3 Methodology	19
	3.3.1 Preparation of Polycaprolactone Film Mat	19
	3.3.2 Surface Modification of PCL	19
	3.3.3 Preparation of Crude Bone Protein	20
	3.4 Surface Characterization	20
	3.4.1 UV-VIS Spectrophotometer	20
	3.4.2 Water Contact Angle Measurements	21
	3.4.3 Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infared Spectrometer (ATR-FTIR)	21
	3.4.4 Scanning Electron Microscope	21
	3.4.5 X-ray Photoelectron Spectrometer	21

CHAPTER **PAGE**

3.5 Biological Characteriazation 22
3.5.1 Materials Preparation for Cell Seeding and cell Culturing 22
3.5.2 Indirect Cytotoxic Evaluation 22
3.5.3 Cell Attachment and Cell Proliferation Study 23
3.5.3 MTT Assay 23
3.5.4 Morphology Observation of Cultured Cell 24
3.5.5 Alkali Phosphate Analysis (ALP) 24
3.5.6 Mineralization Analysis 25
3.6 Statistical Analysis 25

IV RESULTS AND DISCUSSION 27
4.1 Preparation of PCL Film Mat 27
4.2 Surface Characterizations 27
4.2.1 Quantification of Amino Groups 29
4.2.2 Surface Wettability 31
4.2.3 Chemical Analysis of Surface 31
4.2.4 Elemental Composition of Surface 31
4.3 Biological Characteriazations 32
4.3.1 Indirect Cytotoxicity Evaluation 32
4.3.2 Cell Attachment and Proliferation 33
4.4.3 Cell Morphology 35
4.4.4 Alkaline Phosphatase (ALP) Activity 37
4.4.5 Mineralization 40

V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS 43

REFERENCES 45

CHAPTER **PAGE**

APPENDICES 48

Appendix A Ninhydrin Analysis 48

Appendix B X-ray Photoelectron Spectrometer (XPS) 50

Appendix C Experimental Data of Biological Characterizations 51

CURRICULUM VITAE 54

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
4.1	NH_2 density on the surface of the modified PCL film mats	29
4.2	The water contact angle of the control and all modified PCL films measured by the sessile drop method	30
4.3	N_{1s}/C_{1s} ratios of the control and modified PCL films	32
4.4	Selected SEM images of cultured specimens; glass, neat PCL, aminolyzed PCL, crude bone protein-immobilized PCL and bovine serum albumin-immobilized PCL film mats at various time points after MC3T3-E1 were seeded on their surfaces (magnification = 1,500X; scale bar = 10 μm)	38
4.5	Selected SEM images of cultured specimens; glass, neat PCL, aminolyzed PCL, and crude bone protein- and bovine serum albumin-immobilized PCL film mats at various time points after MC3T3-E1 were seeded on their surfaces (magnification = 1,500X; scale bar = 10 μm)	39

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	The major types of bone cell.	3
2.2	The Extracellular Matrix.	5
2.3	Bone Remodeling Cycle.	6
2.4	Concept of cell growth on the scaffold.	7
2.5	Chemical structure of Poly (caprolactone) (PCL).	8
2.6	Concept of biological surface modification.	9
2.7	Poly(caprolactone) undergoing hydrolysis of its ester linkages.	10
2.8	Aminolysis and further immobilization of biomolecule on PCL Membrane.	11
2.9	Chemical pathway for the immobilization of different biomolecules.	16
4.1	Selected SEM image of surface of PCL and aminolyzed PCL.	27
4.2	The chemical pathway for the immobilization of proteins.	28
4.3	Water dropped on the surface of materials.	30
4.4	ATR-FTIR spectra of neat and modified PCL film mats.	31
4.5	Indirect cytotoxic evaluation of neat PCL film mats and modified PLA film mats based on viability of pre-osteoblast (MC3T3-E1).	33
4.6	Attachment of MC3T3-E1 at 6 h and 24 h on TCPS, neat and modified PCL film mats.	34
4.7	Proliferation of MC3T3-E1 at 1, 2 and 3 d on TCPS, neat and modified PCL film mats.	36
4.8	Alkaline phosphatase (ALP) activity of MC3T3-E1 cultured on the surfaces of TCPS, neat PLA and modified film mats.	40

FIGURE **PAGE**

4.9 Quantification of mineral deposition in MC3T3-E1 at 21 d by the method of Alizarin Red-S staining. 41

4.10 Image of Alizarin Red-S staining for the mineralization in MC3T3-E1 cells for 21 d on TCPS, neat PCL and modified PCL film mats. 42