# DEGRADATION AND BIOLOGICAL EVALUATION OF IMMOBILIZED-ELECTROSPUN POLYCAPROLACTONE FOR BONE TISSUE ENGINEERING

Piyada Poomsurard

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,

Case Western Reserve University, and Institut Français du Pétrole

2013

Thesis Title: Degradation and Biological Evaluation of Immobilized-

Electrospun Polycaprolactone for Bone Tissue Engineering

By: Piyada Poomsurard

Program: Polymer Science

Thesis Advisors: 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)

Propert Paral.

(Prof. Prasit Pavasant)

(Asst. Prof. Manit Nithithanakul)

Boonthorika Chienjitkuntanorn

(Dr. Boontharika Chuenjitkuntaworn)

#### **ABSTRACT**

5472031063: Polymer Science Program

Piyada Poomsurard: Degradation and Biological Evaluation of

Immobilized-Electrospun Polycaprolactone for Bone Tissue

Engineering.

Thesis Advisors: Prof. Pitt Supaphol 46 pp.

Keywords: Polycaprolactone/ Electrospinning/ Degradation/ Bovine Serum

Albumin

Polymeric scaffolds for bone tissue engineering application have been produced and developed to mimic the native extracellular matrix (ECM). In this study, polycaprolactone (PCL), the promising biodegradable polymer candidate in this field, have been used to produce fibrous scaffolds, fabricated by electrospinning technique. The obtained PCL fiber mats were first modified the surface to promote biocompatibility and the subsequent immobilization of bovine serum albumin (BSA) onto their surfaces. The result shows that the aminolyzing time did not influence on the mechanical properties of PCL fibrous scaffolds. In order to meet the concept of being scaffolds, biomaterials are expected to have the rate of degradation matching the rate of tissue regeneration. Hence, the degradation behaviours play an important role in the tissue engineering. In this study, PCL nanofibrous scaffolds have been systematically investigated up to 30 days in enzymatic solution at 37°C. The scaffolds were examined in terms of weight loss and pH change, also using Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Scanning Electron Microscopy (SEM) were investigated. Moreover, the PCL fibrous scaffolds were evaluated in vitro with mouse calvaria-derived preosteoblastic cells (MC3T3-E1). The biological evaluation illustrated that no toxic was released and harm to cells.

## บทคัดย่อ

ปียดา ภูมิสุราษฎร์ : การสถายตัวและการทดสอบทางชีวภาพของเส้นใยอิเล็กโทรสปัน พอลิคาโปรแลคโตนที่มีการตรึงโปรตีนสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (Degradation and Biological Evaluation of Immobilized-Electrospun Polycaprolactone for Bone Tissue Engineering) อ.ที่ปรึกษา: ศ. คร. พิชญ์ ศุภผล 46 หน้า

โครงเนื้อเยื่อ (scaffolds) จากพอลิเมอร์ถูกนำมาใช้และพัฒนาเพื่อจำลองและเลียนแบบ พฤติกรรมของสารเคลือบเซลล์ (extracellular matrix) ในงานวิจัยนี้ พอลิคาโปรแลคโตน (PCL) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้ถูกนำมาผลิตเป็น เส้นใยอิเล็กโทรสปัน โดย วิธีปั่นเส้นใยค้วยไฟฟ้าสถิต เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางการแพทย์ เส้นใยอิเล็กโทรสปันที่ได้ จะถูกนำไปปรับปรุงพื้นผิว เพื่อให้วัสคุมีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ (biocompatibility) และจาก การทคลอง พบว่า เวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพื้นผิวของวัสคุ ไม่ส่งผลต่อสมบัติเชิงกลของวัสคุ หลังจากนั้น จึงนำโปรตีนโบวีน เซรั่ม อัลบูมิน มาตรึงที่ผิวของวัสดุ และเพื่อที่จะตอบสนอง แนวคิดของการเป็นโครงเนื้อเยื่อ วัสดุชีวภาพดังกล่าวจึงควรมีอัตราการสลายตัวที่เหมาะสมกับ อัตราการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อ จะเห็นได้ว่าพฤติกรรมการสลายตัวของวัสคุ มีบทบาทสำคัญในด้าน วิศวกรรมเนื้อเยื่อ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาพฤติกรรมการสลายตัวของวัสดุชีวภาพใน สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์ไลเปส ที่อุณหภูมิ 37°Cเป็นเวลา 30 วัน วัสคุจะถูกศึกษาในแง่ของ การสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงค่า pH และการเก็บรักษาน้ำ นอกจากนี้ ยังศึกษาสมบัติทาง ความร้อน โดยใช้ DSC และ ศึกษาสมบัติทางกายภาพ จาก SEM นอกจากนั้นยังได้ นำวัสดุไป ทดสอบทางชีวภาพ ด้วยเซลล์ mouse calvaria-derived preosteoblastic (MC3T3-E1) เพื่อศึกษา ความเป็นพิษของวัสดุ และพบว่า สารที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากวัสดุ ไม่มีความเป็นพิษ หรือเป็น อันตรายต่อเซลล์

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

First of all, I would like to express my sincere thanks to my thesis advisor, Prof. Pitt Supaphol, for his professional suggestions, guidance and support that helped me through any obstacles in my research project. I am most grateful for his teaching and advice not only the methodologies research but also many other methodologies in life. This thesis would not be completed without all the support that I have always received from him.

I would like to thanks to Prof. Prasit Pavasant for all of his suggestions, and comments on cell culture which is a new thing for me. Thank you for providing me with a laboratory and all the equipments needed. I would like to give thanks to Dr. Boontharika Chuenjitkuntaworn for being my thesis committees.

In addition, I would also like to thank everyone at the laboratory of the Petroleum and Petrochemical College for their help and hospitality throughout my year here. I want to say thank you very much, P'Pook, P'Jib and P'Jate for your suggestions on cell culture techniques. Especially, P'Ton, I want to thank you so much for everything. I really don't have enough words to say except I will never forget your kindness.

My thanks also go to the Petroleum and Petrochemical College for providing research fund and laboratory facilities throughout my year here.

Last but not least, I would also like to thank my parents and my friends in PS group who always encourage, support and beside me throughout the period of this research.

### TABLE OF CONTENTS

		PAGE
Titl	e Page	i
Abs	stract (in English)	iii
Abs	stract (in Thai)	iv
Ack	knowledgements	v
Tab	ole of Contents	vi
List	t of Tables	ix
List	t of Figures	x
Abl	previations	xi
СНАРТІ	ER	
I	INTRODUCTION	1
II	LITERATURE REVIEW	3
III	EXPERIMENTAL	12
	3.1 Materials	12
	3.1.1 Materials Used for Fabrication of the Fibrous	
	Scaffolds	12
	3.1.2 Materials Used for Surface Modification	12
	3.1.3 Materials Used for Cell Culture	12
	3.2 Equipment	13
	3.2.1 Equipment for Electrospinning Process	13
	3.2.2 Equipment for Characterization of Materials	13
	3.2.3 Equipment for Cell Culture Study	13
	3.3 Methodology	14
	3.3.1 Preparation of Electrospun Fiber Mats	14
	3.3.2 Surface Modification of Fibrous Scaffolds via	
	Aminolysis and Immobilization of Protein	14

CHAPTER	CHAPTER	
	3.3.3 Degradation Experiment	16
	3.3.4 Fibrous Scaffolds Characterization	16
	3.3.5 Biological Characterizations	19
	3.4 Statistical Analysis	20
IV	RESULTS AND DISCUSSION	21
	4.1 Preparation of Polymeric Fibrous Scaffolds	21
	4.2 Scaffold Characterization	22
	4.2.1 Surface Wettability	22
	4.2.2 Chemical Analysis of Surface	23
	4.2.3 Elemental Composition of the Surface	24
	4.2.4 Protein Adsorption Test	26
	4.2.5 Mechanical Properties	27
	4.3 Degradation Study	28
	4.3.1 Surface Analysis of PCL Fibrous Scaffolds	28
	4.3.2 Weight Remaining After Degradation	30
	4.3.3 Thermal Properties	31
	4.3.4 pH Measurements	33
	4.4 Biological Characterizations	34
	4.4.1 Cytotoxicity	34
V	CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	36
	REFERENCES	37
	APPENDICES	41
	Appendix A Bicinchoninic Acid Protein Assay	
	(BCA Analysis)	41

CHAPTER		PAGE
Appendix B Mechanical Characterizations		42
Appendix C Degradation of PCL Fibrous Scaffold	ds	43
Appendix D Biological Characterization		45
CURRICULUM VITAE	A.	46

# LIST OF TABLES

ΓABLE		PAGE
2.1	Ideal structural parameters of tissue engineering scaffolds	4
4.1	Water contact angles of the control and modified PCL	
	fibrous scaffolds	23
4.2	N <sub>1s</sub> /C <sub>1s</sub> ratios as a function of aminolyzing time	25
4.3	$N_{1s}/C_{1s}$ ratios of the unmodified and modified PCL fibrous	
	scaffolds	25
4.4	Mechanical properties of aminolyzed PCL fibrous scaffolds	
	prepared at different time	27
4.5	SEM analysis of degraded electrospun fibrous scaffolds in	
	lipase/PBS solution for 0, 5, 15, 30 days (magnification =	
	$2000x$ ; scale bar = $20\mu m$ )	29
4.6	Thermal characteristics and apparent crystallinity of PCL	
	fibrous scaffolds after degradation study	31
Al	Bovine Serum Albumin (BSA) standards and their net	
	absorbance	39
B1	Mechanical Integrity of PCL fibrous scaffolds	40
C1	Remaining weight of degraded scaffolds in PBS solution	
	without lipase at 37°C	42
C2	Remaining weight of degraded scaffolds in lipase/PBS	
	solution at 37°C	42
D1	Raw data of cytotoxic test of fibrous scaffolds which	
	evaluated from the absorbance at 570 nm by MTT method	43

### LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Structure of polycaprolactone.	5
2.2	Typical electrospinning setup.	6
2.3	General mechanism of plastic biodegradation under	
	aerobic conditions	8
2.4	Schematic illustration of three types of erosion	
	phenomenon	9
3.1	The chemical pathway for the immobilization of protein	
	onto polymeric fibrous scaffolds.	15
4.1	Selected SEM image of PCL electrospun fibrous scaffolds	
	(magnification = $5000x$ ; scale bar = $10 \mu m$ ).	21
4.2	Water dropped on the surface of neat PCL fibrous	
	scaffolds	22
4.3	ATR-FTIR spectra of neat and modified PCL fibrous	
	scaffolds.	24
4.4	The adsorption isotherm of the adsorbed bovine serum	
	albumin on the neat and modified PCL fibrous scaffolds	
	(diameter =1.5 cm).	26
4.5	Degradation profile of the scaffolds after 30 days	
	degradation	30
4.6	DSC traces of the first heat cycle showing the variation in	
	melting point (°C) and Enthalpy of fusion for samples of	
	PCL fibrous scaffolds over time.	32
4.7	pH values of the degradation buffer during the degradation	
	of the PCL fibrous scaffolds.	33
4.8	Indirect cytotoxic evaluation of neat, aminolyzed,	
	activated, BSA immobilized PCL fibrous scaffolds based	
	on viability of pre-osteoblast (MC3T3-E1).	34
Αl	The calibration curve for BSA using the standard	39

### **ABBREVIATIONS**

ATR-FTIR Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared

Spectroscopy

BSA Bovine Serum Albumin

DC Direct Current

DCM Dichloromethane

DMF N,N'-dimethylformamide

DSC Differential Scanning Calorimetry

HMD 1,6-Hexamethylenediamine

IPA Isopropanol

PCL Polycaprolactone

PBS Phosphate Buffer Saline

SEM Scanning Electron Microscopy

SFM Serum Free Media

TCPS Tissue Culture Polystyrene

T<sub>g</sub> Glass Transition Temperature

T<sub>m</sub> Melting Temperature

UV-vis Ultraviolet-visible

XPS X-ray Photoelectron Spectroscopy