INFLUENCE OF SURFACE MORPHOLOGY TO THE PROTEIN ADSORPTION ON POLYCAPROLACTONE FILM

Vipawee Yamassatien

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
2012

Thesis Title:	Influence of Surface Morphology to the Protein Adsorption on Polycaprolactone Film
By:	Vipawee Yamassatien
Program:	Polymer Science
Thesis Advisors:	Prof. Dr. Pitt Supaphol

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

..... Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:

.....
(Prof. Dr. Pitt Supaphol)

.....
(Prof. Dr. Prasit Pavasant)

.....
(Asst. Prof. Dr. Hathaikarn Manuspiya)

.....
(Dr. Boontharika Chuenjitkuntaworn)

ABSTRACT

5372033063: Polymer Science Program
Vipawee Yamassatien: Influence of Surface Morphology to the Protein Adsorption on Polycaprolactone Film.
Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol 90 pp.
Keywords: Polycaprolactone/ Bovine serum albumin/ Surface morphology/ Protein adsorption

Protein adsorption is the first phenomena that would occur when the foreign materials are inserted into the body. The materials used in biomedical application can have different surface topology. It is important to know the effect of surface to protein adsorption. The main objectives of this study were to prepare the polycaprolactone (PCL) film of different surface topology and different degree of crystallinity. The protein adsorption on various surface characteristics was studied. Surface of polycaprolactone was made to have different topology by different phase separation using solvents of various solubility parameters. The solvents applied in this study were chloroform, acetone, tetrahydrofuran (THF) and ethanol. The degree of crystallinity was varied by different annealing time. Surface of polycaprolactone film could be modified for better protein adsorption by aminolysis, using 1,6-hexamethylenediamine (HMD). Then, the amino groups were activated by N,N'-disuccinimidyl carbonate (DSC) before the immobilization of protein called bovine serum albumin (BSA). The PCL films of different surface topology and the protein-adsorbed PCL films will be studied for their degree of crystallinity, hydrophobicity, functional group on the surface, surface roughness and cytotoxicity. It was found that degree of crystallinity does not affect the amount of protein adsorbed. The result from atomic force microscope (AFM) showed that the film casted from 40:60 (v/v) EtOH:THF had the roughest surface and the protein assay proved that it had significantly higher amount of protein adsorbed. The potential use of the film was evaluated by mouse-calvaria derived pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1). The indirect cytotoxicity test showed that the materials were not harmful to the cells and cells proliferated best on the roughest surface.

บทคัดย่อ

วิภาวี ยามัสเสถียร : ผลกระทบจากสัณฐานพื้นผิวต่อการยึดเกาะของโปรตีนบนแผ่นฟิล์มพอลิคาโปรแลคโตน (Influence of Surface Morphology to the Protein Adsorption on Polycaprolactone Film) อ.ที่ปรึกษา : ศ. ดร. พิชญ์ ศุภผล 90 หน้า

การยึดเกาะของโปรตีนเป็นปรากฏการณ์แรกที่เกิดขึ้นเมื่อมีการใส่วัสดุอื่นเข้าไปภายในร่างกาย ในเมื่อวัสดุที่ใช้ในทางการแพทย์สามารถมีสภาพพื้นผิวที่แตกต่างกันดังนั้นการทราบถึงผลกระทบของพื้นผิวต่อการยึดเกาะของโปรตีนจึงเป็นสิ่งสำคัญ การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อเตรียมแผ่นฟิล์มพอลิคาโปรแลคโตนให้มีสัณฐานพื้นผิวและความเป็นผลึกที่แตกต่างกัน รวมถึงการตรวจสอบการยึดเกาะของโปรตีนบนพื้นผิวเหล่านั้น ผิวของแผ่นฟิล์มพอลิคาโปรแลคโตนสามารถถูกทำให้มีลักษณะที่แตกต่างกันได้โดยอาศัยหลักการแยกเฟสของตัวทำละลายซึ่งมีค่าดัชนีการละลายที่ไม่เหมือนกัน ตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม อะซีโตน เตตระไฮโดรฟูราน (THF) และ เอทานอล การผันแปรความเป็นผลึกทำโดยการอบแผ่นฟิล์มที่เวลาแตกต่างกัน นอกจากนี้แล้วพื้นผิวของพอลิคาโปรแลคโตนยังสามารถถูกดัดแปรให้เกิดการยึดเกาะของโปรตีนที่ดีขึ้นได้ด้วยวิธีอะมิโนไลซิสโดยการทำปฏิกิริยากับเฮกซะเมทิลีนไดเอมีน (1,6-hexamethylenediamine) จากนั้นกลุ่มอะมิโนจะถูกกระตุ้นโดยไดซัคซินิมิดิลคาร์บอเนต (N,N'-disuccinimidyl carbonate) ก่อนที่จะใช้โปรตีนชนิดโบวิน เซรั่ม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ไปยึดเกาะ แผ่นฟิล์มที่มีพื้นผิวและการเกาะของโปรตีนที่แตกต่างกันจะถูกศึกษาในแง่ของความเป็นผลึก การวัดมุมสัมผัสกับน้ำ หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิว ความขรุขระของพื้นผิว และความเป็นพิษต่อเซลล์ จากการศึกษาพบว่า ความแตกต่างความเป็นผลึกไม่ส่งผลกระทบต่อการยึดเกาะของโปรตีน และผลจากกล้องจุลทรรศ์พลังอะตอม (atomic force microscope) แสดงให้เห็นว่าแผ่นฟิล์มที่ใช้ 40:60 เอทานอล : เตตระไฮโดรฟูราน (โดยปริมาตร) เป็นตัวทำละลายมีพื้นผิวที่ขรุขระมากที่สุดและผลจากการวัดโปรตีนพิสูจน์ว่าแผ่นฟิล์มชนิดนี้มีจำนวนโปรตีนยึดเกาะมากที่สุด การทดสอบความสามารถในการเป็นวัสดุโครงสร้างสำหรับกระดูกทำโดยการใช้เซลล์กระดูกหนู (MC3T3-E1) จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อมพบว่าแผ่นฟิล์มทุกชนิดไม่เป็นพิษต่อเซลล์และเซลล์เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนพื้นผิวที่มีความขรุขระ

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to thank my thesis advisor, Prof. Dr. Pitt Supaphol, for his professional suggestions, guidance, support, and kind encouragement that helped me through any obstacles in my research project. Also, many thanks for the prayer book which he gave me at the beginning of my project. I found it amazingly effective because my cell culture stopped getting contaminated once I started praying from that book every day. I really appreciate the experience of this year research and I am honored to have him as my advisor. I would not wish to have it any other way.

I would like to pay my gratitude to Prof. Dr. 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 Asst. Prof. Hathaikarn Manuspiya and Dr. Boontharika Chuenjitkuntaworn for being my thesis committees.

I am thankful for all of my friends and my seniors at the Petroleum and Petrochemical College for their help and for cheering me up throughout my year here. I want to say thank you very much, P' Pook and P' Earng, for your suggestions on cell culture techniques. Especially, P' Ton, I want to thank you a million times for your help on everything. I know I would not be able to make it without you.

I am grateful for the full scholarship and funding of the thesis work provided by the Petroleum and Petrochemical College, and by the Center of Excellence on Petrochemical and Materials Technology, Thailand. Moreover, I appreciate the experience I have with all professors and staff members here and I am glad that we had a chance to spend this precious moment together.

Last but not least, I would like to thank the most important ones in my life. I would like to express my appreciation to my parents and P' Note, who always love me, believe in me, and always be there for me.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**