SURFACE MODIFICATION OF POLY(LACTIC ACID) FIBERS VIA AMINOLYSIS AND TYPE-I COLLAGEN IMMOBILIZATION FOR BONE TISSUE ENGINEERING

Ms. Palita U-prasitwong

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
2009

Thesis Title:	Surface Modification of Poly(lactic acid) Fibers via Aminolysis and Type-I Collagen Immobilization for Bone Tissue Engineering
By:	Palita U-prasitwong
Program:	Polymer Science
Thesis Advisor:	Assoc. 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:

....

(Assoc. Prof. Pitt Supaphol) (Assoc. Prof. Prasit Pavasant)

....

(Asst. Prof. Voravee P. Hoven) (Asst. Prof. Hathaikarn Manuspiya)

.....

(Asst. Prof. Chidchanok Meechaisue)

ABSTRACT

5072010063: Polymer Science Program
Palita U-prasitwong: Surface Modification of Poly(lactic acid) Fibers via Aminolysis and Type-I Collagen Immobilization for Bone Tissue Engineering.
Thesis Advisor: Assoc. Prof. Pitt Supaphol 66 pp.
Keywords: Electrospinning/ Poly(lactic acid)/ Collagen/ Immobilization

By the reaction of poly(lactic acid) (PLA) in the form of electrospun fibrous membranes with 1,6-hexanediamine (HMD), free amino groups were introduced onto PLA surface, through which a biocompatible macromolecule, collagen, was covalently immobilized by employing *N,N'*-disuccinimidylcarbonate (DSC) as a coupling agent. The existence of the free amino groups on the aminolyzed PLA surface was verified quantitatively by the ninhydrin analysis method, which revealed that the free amino group density were influenced by the HMD concentration and aminolyzing time. Water contact angle measurement confirmed that the hydrophilicity of the PLA fibrous membranes was enhanced with the aminolysis and the further immobilization of collagen. In addition, surface alteration of modified e-spun fibrous scaffolds was also studied by ATR-FTIR and XPS techniques. *In vitro* indirect cytotoxicity evaluation performed with mouse fibroblast (L929) and pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1) revealed that both the neat and the modified PLA fibrous scaffolds 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 all types of the modified PLA fibrous surface even at 4 h after cell seeding. The culture MC3T3-E1 *in vitro* proved that the cell proliferation and cell activity of modified PLA e-spun fibers were improved compared with the neat PLA fibers. Among the various types of modified PLA scaffolds, collagen-immobilized PLA showed the greatest ability to support cell proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity. Therefore, it is promising material to accelerate bone regeneration.

บทคัดย่อ

ปาลิตา อู่ประสิทธิ์วงศ์ : การดัดแปลงพื้นผิวของเส้นใยพอลิแลคติกแอซิดโดยอะมิโนไลซีสและการติดคอลลาเจนเพื่อใช้สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อสำหรับกระดูก (Surface Modificaion of Poly(lactic acid) fibers via Aminolysis and Type-I Collagen Immobilization for Bone Tissue Engineering) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. พิชญ์ ศุภผล 66 หน้า

หมู่อะมิโนอิสระถูกเติมลงบนพื้นผิวของพอลิแลคติกแอซิด โดยการทำปฏิกริยาของแผ่นเส้นใยพอลิแลคติกแอซิดที่เตรียมจากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (Electrospinning) กับเฮกซะเมทิลีนไดเอมีน (1,6-hexanediamine) ดังนั้นสารชีวโมเลกุล (เช่น คอลลาเจน) จึงสามารถเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่ดังกล่าวโดยใช้ ไดซัคซินิมิดิลคาร์บอเนต (*N,N'*-disuccinimidyl-carbonate) เป็นสารคู่ควบการวิเคราะห์หาปริมาณของหมู่อะมิโนอิสระบนผิวพอลิแลคติกแอซิดสามารถทำได้โดยใช้นินไฮดริน (Ninhydrin) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของไดเอมีนที่ใช้ และเวลาในการทำปฏิกิริยาอะมิโนไลซีส มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของหมู่อะมิโนอิสระที่ถูกเติม จากผลของการวัดมุมสัมผัสของน้ำ สามารถยืนยันได้ว่าความชอบน้ำของแผ่นเส้นใยพอลิแลคติกแอซิดเพิ่มขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยาอะมิโนไลซีส และการตรึงคอลลาเจน ตามลำดับ นอกจากเทคนิคดังที่กล่าวมาแล้ว ในงานวิจัยนี้ยังใช้เทคนิค ATR-FTIR และ XPS เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวหลังทำปฏิกิริยาด้วย จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธีอ้อม พบว่าแผ่นเส้นใยทุกชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ การถ่ายภาพของพื้นผิววัสดุโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่าเซลล์สร้างกระดูกชนิด MC3T3-E1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง บนวัสดุที่ดัดแปลงพื้นผิวแล้ว มีการแผ่ขยายของ cytoplasm นอกจากนั้นได้ศึกษาสมบัติในการใช้เป็นวัสดุโครงสร้างสำหรับกระดูกในสภาวะนอกร่างกายด้วยเซลล์สร้างกระดูกชนิด MC3T3-E1 การเจริญเติบโต และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี้ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นเส้นใยที่ผ่านการดัดแปลงพื้นผิวแล้วทุกชนิดดีกว่าแผ่นเส้นใยที่ยังไม่ดัดแปลงพื้นผิว ในบรรดาวัสดุที่ดัดพื้นผิวแล้วทุกชนิดพบว่า แผ่นเส้นใยพอลิแลคติกแอซิดที่ติดคอลลาเจน เกื้อหนุนต่อการเจริญเติบโต และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี้ของเซลล์มากที่สุด ดังนั้นเส้นใยพอลิแลคติกแอซิดที่ติดคอลลาเจนจึงเป็นวัสดุที่น่าสนใจในการใช้เป็นวัสดุโครง สร้างสำหรับกระดูก

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her sincere gratefulness to her advisor, Assoc. Prof. Pitt Supaphol, for his guidance, useful advices, kind and constructive criticism, inspiration and great encouragement throughout this thesis.

The author would like to give her thankfulness to Assoc. Prof. Prasit Pavasant, Asst. Prof. Voravee P. Hoven, Asst. Prof. Hathaikarn Manuspiya, and Asst. Prof. Chidchanok Meechaisue for being as her thesis committees and giving her the useful comments and suggestions. Highly gratitude goes to Assoc. Prof. Prasit Pavasant and Ms. Thidarat Angwarawong for their kindness in giving her valuable theoretical and technical knowledges in cell culture and providing her the instruments and the convenient laboratory room. The author deeply thanks to Asst. Prof. Varong Pavarajarn, Department of chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University for serving X-ray photoelectron spectrometer and giving her the useful suggestions. The author is also greatly appreciated to Asst. Prof. Voravee P. Hoven for kindness in giving her valuable suggestions about surface modification.

The author is very grateful for the partial scholarship and partial funding of the thesis work provided by the Petroleum and Petrochemical College (PPC), Chulalongkorn University; and the Center of for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Thailand.

The author would like to thank the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for being such a great place where the author has gained the precious knowledge in the polymer science program and the author greatly appreciates all professors, lecturers and staffs who have tendered knowledge and technical support during her stay in this college. The author also appreciates for friendship, helpfulness and creative suggestions from all of her friends at the PPC and at Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University.

Last and most of all, the author would like to express her deep gratitude to her family for their love, caring, understanding, and encouragement her at all times.

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER **PAGE**

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**