

**ROLE OF SURFACE TOPOGRAPHY AND PROTEIN ADSORPTION ON
POLYCAPROLACTONE FILM SCAFFOLDS ON BONE CELLS
BEHAVIOR**

Khwanjai Anujarawat

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

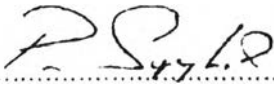
I28372451


Thesis Title: Role of Surface Topography and Protein Adsorption on
Film Scaffolds on Bone Cells Behavior
By: Khwanjai Anujarawat
Program: Polymer Science
Thesis Advisors: Prof. Pitt Supaphol

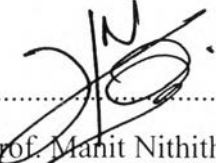
Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn
University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of
Science.

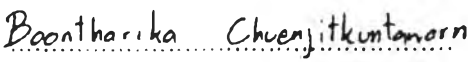

..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:


.....
(Prof. Pitt Supaphol)


.....
(Prof. Prasit Pavasant)


.....
(Asst. Prof. Manit Nithithanakul)


.....
(Dr. Boontharika Chuenjitkuntaworn)

ABSTRACT

5472021063: Polymer Science Program
Khwanjai Anujarawat: Role of Surface Topography and Protein
Adsorption on Film Scaffolds on Bone Cells Behavior
Thesis Advisors: Prof. Pitt Supaphol 54 pp.
Keywords: Polycaprolactone/ Bovine serum albumin/Collagen/ Surface
topography/ Protein adsorption

The treatment of bone defects requires an appropriate scaffold to regenerate bone tissue. Polycaprolactone films were prepared by solvent-casting technique in different solvents. Polycaprolactone is attractive because it has non-toxic by-products, low cost, and is biocompatible and biodegradable. The hydrophilicity of polycaprolactone can be improved by introducing amino groups via aminolysis, then immobilization the proteins (collagen and albumin) on the surface to improve cell attachment and proliferation. This work focused on the effect of pre-adsorption of albumin (200, 1500 and 3000 $\mu\text{g/mL}$) and adsorption of collagen (100 $\mu\text{g/mL}$) on the surface as well as the response to attachment and proliferation of the mouse osteoblastic cells. Polycaprolactone films were characterized for surface morphology by Scanning electron microscope and Atomic force microscope, Identification functional group of polycaprolactone by Fourier transform infrared spectrometer, protein adsorption determination by UV-Vis spectrophotometer and surface wettability by contact angle measurements. Biological characterizations investigated indirect cytotoxicity evaluation via methylthiazol tetrazolium assay, and observation of cell attachment and proliferation using scanning electron microscope. The results concluded that the surface-modified films were not harmful to cells. PCL film casted from EtOH/THF had higher cells attachment and proliferation than film casted from chloroform because porous surface affected to promote cell. Furthermore, the BSA system was able to support the cell growth while other systems did not encourage the cell growth as well as BSA system did. Therefore, collagen that had been adsorbed on the surface in the second step, it did not support to cell growth.

บทคัดย่อ

ขวัญใจ อนุจารวัฒน์ : บทบาทจากภูมิลักษณะผิวหน้าทางกายภาพและการยึดเกาะของโปรตีนบนโครงเลี้ยงเซลล์พอลิคาโพรแลคโตนฟิล์มต่อพฤติกรรมของเซลล์กระดูก (Role of Surface Topography and Protein Adsorption on Polycaprolactone Films Scaffolds on Bone Cells Behavior) อ. ที่ปรึกษา: ศ. ดร. พิชญ์ สุภผล 54 หน้า

การรักษากระดูกที่หักแตกร้าวต้องการ โครงเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมที่จะสร้างเนื้อเยื่อกระดูก แผ่นฟิล์มพอลิคาโพรแลคโตนถูกเตรียมโดยเทคนิคหล่อแบบด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน พอลิคาโพรแลคโตนเป็นที่น่าสนใจเพราะมีสมบัติไม่ปล่อยสารพิษ ราคาถูก มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและย่อยสลายทางชีวภาพ ความชอบน้ำของพอลิคาโพรแลคโตนสามารถถูกปรับปรุงได้ด้วยวิธีอะมิโนไลซิส และตรึงผิวหน้าด้วยโปรตีน (คอลลาเจนหรือโบวิน เซรัม อัลบูมิน) เพื่อที่จะปรับปรุงการยึดติดและการเจริญเติบโตของเซลล์ จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาผลของการดูดซับอัลบูมิน (ความเข้มข้น 200, 1500 และ 3000 $\mu\text{g/mL}$) ก่อนตามด้วยการดูดซับคอลลาเจน (100 $\mu\text{g/mL}$) บนพื้นผิวและเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกหนู (MC3T3-E1) ซึ่งแผ่นฟิล์มพอลิคาโพรแลคโตนจะถูกศึกษาลักษณะพื้นผิวโดยใช้เครื่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและกล้องจุลทรรศน์ฟลักซ์อะตอม หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวโดยเครื่องมือวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด การยึดเกาะโปรตีนโดยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงและการวัดมุมสัมผัสความชอบน้ำโดยเครื่องวัดมุมสัมผัส คุณสมบัติทางชีววิทยาตรวจสอบความเป็นพิษ วัดจำนวนเซลล์ที่ดำรงอยู่ได้โดยใช้ methylthiazol tetrazolium assay คุณลักษณะการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด และจากผลทดสอบพบว่า แผ่นฟิล์มที่ถูกปรับผิวหน้าไม่เป็นพิษต่อเซลล์และแผ่นฟิล์มที่เตรียมจากตัวทำละลายเอทานอล/เตตระไฮโดรฟูแรน มีการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์สูงกว่าแผ่นฟิล์มที่เตรียมจากตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม เพราะผิวหน้าที่มีรูพรุนส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ยิ่งไปกว่านั้นในระบบที่มีโปรตีนโบวินเซรัมอัลบูมินสามารถที่จะสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ ในขณะที่โปรตีนระบบอื่นไม่สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตเทียบเท่าโปรตีนโบวินเซรัมอัลบูมินทำได้ ดังนั้น การยึดเกาะของคอลลาเจนในชั้นที่สองไม่ได้สนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank my thesis advisor, Prof. Pitt Supaphol, for his suggestions, support and encouragement. I would like to say many thanks to Prof. Prasit Pavasant for all of his suggestions and comments on cell culture, and for providing me with a laboratory and all the equipments needed. I would like to give thanks to Dr. Boontharika Chuenjitkuntaworn and Asst. Prof. Manit Nithithanakul for being my thesis committee.

Thank for all of my friends at the Petroleum and Petrochemical College for their help and for support to me. I want to say thank you, Ton and Pook, for your suggestions on cell culture techniques.

Many thanks for Gene that give me many suggestions and I could follow the experiment she did.

I am thankful for all of my friends at Mahidol University salaya campus. Especially, my friend is Jui, she helps and cheers me up. Furthermore, my family encourages and supports me.

This thesis work is funded by the Petroleum and Petrochemical College; and the National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Thailand.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	ix
List of Figures	xi
 CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEW	3
2.1 Tissue Engineering	3
2.2 Poly(caprolactone)	3
2.3 Bovine Serum Albumin (BSA)	4
2.4 Collagen	4
2.5 Protein	5
2.6 Protein function	7
2.7 Extracellular matrix	8
2.8 RGD sequence	9
2.9 Integrin	9
2.10 Surface topography	10
2.10.1 Measurement of the nanoscale roughness	10
2.10.2 The influence of different preparation to surface topology	12
2.10.3 The effect of different solvents to surface topology	13

CHAPTER	PAGE
2.11 Protein adsorption on various polymer surface topography	13
III EXPERIMENTAL	16
3.1 Materials	16
3.1.1 Polymers and Solvents Used for Film Casting	16
3.1.2 Reagents Used for Surface Modification	16
3.1.3 Materials Used for Cell Culture Experiment	16
3.2 Equipments	17
3.2.1 Contact Angle Measurement	17
3.2.2 Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectrometer	17
3.2.3 Scanning Electron Microscope	18
3.2.4 Atomic Force Microscope	18
3.2.5 Microplate Reader	18
3.3 Methodology	18
3.3.1 The Effect of PCL Surface Topography to Protein Adsorption	18
3.3.2 Biological Experiments	20
3.4 Statistical Analysis	23
IV RESULTS AND DISCUSSION	24
4.1 The Effect of Solvent to Surface Topology of PCL Film	24
4.1.1 Surface Morphology of Neat Polycaprolactone Film	24
4.1.2 Roughness of PCL Surface	25
4.1.3 Surface Wettability	27

CHAPTER	PAGE
4.2 The Effect of PCL Surface Topography to Protein Adsorption	28
4.2.1 Protein Adsorption Test	28
4.2.2 Surface Chemical Analysis	31
4.2.3 Surface Wettability	33
4.3 Biological Characterization	35
4.3.1 Indirect Cytotoxicity Evaluation	35
4.3.2 Cell Attachment and Proliferation	36
4.3.3 Cell Morphology Observation	38
4.3.4 Alkaline Phosphatase (ALP) Activity	41
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	43
REFERENCES	45
APPENDICES	47
Appendix A Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay)	47
Appendix B Experimental Data of Biological Characterizations	50
CURRICULUM VITAE	54

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
4.1 The solubility parameters	25
4.2 Value of roughness parameter	25
4.3 SEM images of MC3T3-E1 that were cultured on the surfaces of control (glass) and the different proteins adsorbed films casted from chloroform as a function with seeding time	38
4.4 SEM images of MC3T3-E1 that were cultured on the surfaces of control (glass) and the different proteins adsorbed films casted from 40:60 (v/v) EtOH/THF as a function with seeding time	39
A1 The absorbance of Bovine Serum Albumin (BSA) standard in PBS	47
A2 The adsorption isotherm of the adsorbed bovine serum albumin on the neat PCL films (diameter = 1.5 cm) casted from chloroform at equilibrium protein concentration	48
A3 The adsorption isotherm of the adsorbed bovine serum albumin on the neat PCL films (diameter = 1.5 cm) casted from 40:60 (v/v) EtOH/THF at equilibrium protein concentration	48
A4 The adsorption isotherm of the adsorbed bovine serum albumin on the modified PCL films (diameter = 1.5 cm) casted from chloroform at equilibrium protein concentration	49
A5 The adsorption isotherm of the adsorbed bovine serum albumin on the modified PCL films (diameter = 1.5 cm) casted from 40:60 (v/v) EtOH/THF at equilibrium protein concentration	49
B1 Indirect cytotoxicity evaluation of the materials casted from chloroform shown by the percent viability of cells by MTT assay	50
B2 Indirect cytotoxicity evaluation of the materials casted from 40:60 (v/v) EtOH/THF shown by the percent viability of cells by MTT assay	51

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
B3	Attachment and proliferation of MC3T3-E1 that were cultured on the materials casted from chloroform at seeding time for 4 hrs, 1 d and 3 d.	52
B4	Attachment and proliferation of MC3T3-E1 that were cultured on the materials casted from 40:60 EtOH/THF at seeding time for 4 hrs, 1 d and 3 d.	53
B5	ALP activities of MC3T3-E1 that were cultured on the materials casted from chloroform and 40:60 EtOH/THF at seeding time for 7 d.	53

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Schematic route to Polycaprolactone.	4
2.2 The structure of collagen.	5
2.3 Protein conformation in water system.	6
2.4 Protein binding site.	7
2.5 Extracellular matrix (ECM) of an animal cell.	9
2.6 Contact mode.	11
2.7 Intermittent-contact mode or tapping mode.	11
2.8 Non-contact mode.	11
2.9 Profile of a surface (Z).	12
2.10 The aminolysis and immobilization of biomolecules on polyester surface.	14
4.1 SEM images of the surface of PCL film.	24
4.2 AFM pictures of TCPS and the surfaces of PCL films.	26
4.3 Water drop and value of contact angle on the surface of PCL films. casted from chloroform and EtOH/THF.	27
4.4 The adsorption isotherm of the adsorbed bovine serum albumin, neat PCL (a) and modified PCL (b).	28
4.5 The adsorption isotherm of the adsorbed bovine serum albumin neat and modified PCL films casted chloroform (a), and neat and modified PCL films casted EtOH/THF (b).	30
4.6 ATR-FTIR spectra of neat PCL films casted from chloroform and 40:60 (v/v) EtOH:THF.	31
4.7 ATR-FTIR spectra of neat PCL films casted from chloroform (a) and 40:60 (v/v) EtOH:THF (b) ; on different proteins adsorbed films.	32

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
4.8 Water drop and value of contact angle on the surface of PCL films casted from chloroform and EtOH/THF on different proteins adsorbed films.	34
4.9 The percent viability of MC3T3-E1 on the control (TCPS) and the extract solution of different proteins adsorbed films casted from chloroform.	35
4.10 The percent viability of MC3T3-E1 on the control (TCPS) and the extract solution of different proteins adsorbed films casted from 40:60 EtOH/THF.	36
4.11 The percent viability of MC3T3-E1 on the control (TCPS) and the different proteins adsorbed films from casted chloroform as a function with seeding time.	37
4.12 The percent viability of MC3T3-E1 on the control (TCPS) and the different proteins adsorbed films from casted 40:60 EtOH/THF as a function with seeding time.	37
4.13 ALP activities of MC3T3-E1 that was cultured on the surfaces of the control (TCPS) and the different proteins adsorbed films casted from chloroform and 40:60 EtOH/THF.	42
A1 The calibration curve of BSA standard in PBS.	47