

**INFLUENCE OF BLEND COMPOSITIONS OF POLY(CAPROLACTONE)/
POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE)
FILMS ON PROTEIN ADSORPTION**

Ruethaipat Sirisinha


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
2012


Thesis Title: Influence of Blend Compositions of Poly(caprolactone)/
Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Films on
Protein Adsorption
By: Ruethaipat Sirisinha
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.

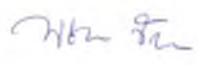

..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:


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


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


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


.....
(Dr. Patcharaporn Thitiwongsawet)

ABSTRACT

5372023063: Polymer Science Program
Ruethaipat Sirisinha: Influence of Blend Compositions of
Poly(caprolactone)/ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
Films on Protein Adsorption.
Thesis Advisor: Prof. Dr. Pitt Supaphol 54 pp.
Keywords: Polycaprolactone/ Poly(3-hydroxybutyrate-co-2-hydroxyvalerate)/
Protein adsorption

Solution casting of polycaprolactone (PCL) and poly(3-hydroxybutyrate-co-2-hydroxyvalerate) (PHBV) in various ratios with coated and uncoated bioactive proteins were studied for potential use as bone scaffolds. The crystallinity evaluation of these solution-cast film scaffolds indicated that the miscibility behavior which decreased as PHBV content increased, resulted in increased protein adsorption. The potential for these fiber mats as bone scaffolds was further assessed *in vitro* in terms of the attachment and proliferation of mouse-calvaria-derived preosteoblastic cells(MC3T3-E1) that were seeded or cultured at different times. All of the coated scaffolds exhibited much better support for cell attachment and proliferation than the uncoated bioactive proteins. Among the various coated scaffolds investigated, the PCL/50PHBV blend showed the highest cellular attachment and proliferation. These results imply a high potential for these cast film mats as bone scaffolds.

บทคัดย่อ

ฤทัยพัชร สิริสิงห : การศึกษาเชิงเปรียบเทียบขององค์ประกอบของการผสมผสานระหว่างพอลิคาโพรแลคโตนและพอลิไฮดรอกซีบิวทริกแอซิดโคไฮดรอกซีวาลิริกแอซิดของแผ่นฟิล์มต่อการดูดซับของโปรตีน (Influence of Blending Compositions of Polycaprolactone/ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Films on Protein Adsorption.) อ.ที่ปรึกษา : ศ.ดร. พิชญ์ สุภผล 54หน้า

โครงเลี้ยงเซลล์กระดูก (Scaffold) จากวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีความสำคัญในกระบวนการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยทำหน้าที่เป็นโครงที่ให้เซลล์มายึดเกาะและเจริญเติบโต ซึ่งในการยึดเกาะดังกล่าวต้องอาศัยปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่ถูกดูดซับอยู่บนพื้นผิวของโครงสร้างเลี้ยงกระดูกและเซลล์ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์ชนิดพอลิคาโพรแลคโตน (PCL) และพอลิไฮดรอกซีบิวทริกเรดโคไฮดรอกซีวาลิเรด(PHBV) ซึ่งเป็นวัสดุสังเคราะห์จำพวกพอลิเอสเทอร์ที่มีความเข้ากันได้กับร่างกายและย่อยสลายทางชีวภาพ โดยการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของการผสมผสาน (Blending) ด้วยวิธีการหล่อแบบสารละลาย (Solution Casting) จากการศึกษาพบว่าการพอลิเมอร์ผสมดังกล่าวมีความไม่เข้ากันจึงทำให้ปริมาณผลึกลดลง ในทางกลับกันการดูดซับโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทริกเรดโคไฮดรอกซีวาลิเรดเพิ่มขึ้น เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นวัสดุโครงร่างสำหรับกระดูก โดยใช้เซลล์กระดูกของหนู (MC3T3-E1) จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธีอ้อม พบว่าแผ่นฟิล์มทุกชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ต่อเซลล์พบว่าเซลล์สามารถเกาะและแบ่งตัวได้ดีกว่าบนผิวโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรตีนติดอยู่บนพื้นผิวเมื่อเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีโปรตีนติดอยู่ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผิวโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรตีนติดอยู่บนพื้นผิวพบว่าเซลล์พบว่าเซลล์สามารถเกาะและแบ่งตัวได้ดีที่สุดบนแผ่นฟิล์มผสมผสานที่มีชนิดพอลิคาโพรแลคโตนและพอลิไฮดรอกซีบิวทริกเรดโคไฮดรอกซีวาลิเรดผสมอยู่ในอัตราส่วนร้อยละ 50

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 would like to thank Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn Univerisy for not only the partial scholarship but also the valuable knowledge. Moreover, the author appreciates all professors, lecturers, staffs here.

The author is glad to know friends and seniors at PPC and take the memorable time together and wishes to give thanks to all of her friend for their help and suggestions.

Lastly, the author would like to express her appreciation for greatest love, understanding and supporting which she received all from her father and her mother.

This thesis work is funded by the Petroleum and Petrochemical College, and by the Center of Excellence on Petrochemicals and Technology, Thailand.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Acceptance	ii
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	ix
List of Figures	x
 CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	3
III EXPERIMENTAL	
3.1 Materials	12
3.1.1 Polymers	12
3.1.2 Solvents	12
3.2 Equipment	12
3.3 Methodology	13
3.3.1 Preparation of Film Mats	13
3.3.2 Coating Film Mats with Protein	14
3.4 Surface characterizations	14
3.4.1 Water Contact Angle Measurements	14
3.4.2 Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectrometer (ATR-FTIR)	14

CHAPTER	PAGE
3.4.3 Scanning Electron Microscope (SEM)	15
3.4.4 Differential Scanning Calorimeter (DSC)	15
3.4.5 Atomic Force Microscope (AFM)	1
3.4.6 X-ray Diffraction techniques (XRD)	16
3.5 Protein Adsorption	16
3.6 Biological Characterizations	18
3.6.1 Materials Preparation for Cell Seeding and Cell Culturing	18
3.6.2 Indirect Cytotoxic Evaluation	18
3.6.3 Cell Attachment and Cell Proliferation Study	18
3.6.3 MTT Assay	19
3.6.4 Morphology Observation of Cultured Cell	19
3.6.5 Actin Staining	20
3.6.6 Mineralization Analysis	20
3.7 Statistical Analysis	21
IV RESULTS AND DISCUSSION	
4.1 Preparation of Film Mats	22
4.2 Surface Characterizations	25
4.2.1 Thermal Behaviors	25
4.2.2 Chemical Analysis of Surface	26
4.2.3 Degree of Crystallinity	27
4.2.4 Surface Wettability	28
4.3 Protein Adsorption	30
4.5 Biological Characterizations	31
4.3.1 Indirect Cytotoxicity Evaluation	31
4.3.2 Cell Attachment and Proliferation	32
4.4.3 Cell Morphology	36
4.4.4 Mineralization	41

CHAPTER	PAGE
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	42
REFERENCES	44
APPENDICES	
Appendix A Protein Adsorption	48
Appendix B Experimental Data of Biological Characterizations	50
CURRICULUM VITAE	54

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
3.1	Blending compositions of PCL and PHBV	13
4.1	Roughness values of neat and blended films by using AFM	24
4.2	The degree of crystallinity by using XRD	28
4.3	The water contact angle of the neat and all blended films measured by the sessile drop method	28
4.4	Representative SEM images of MC3T3-E1 that were seeded/cultured on the surface of a glass substrate at difference time points)	36
4.5	Representative SEM images of MC3T3-E1 those were seeded on the surface of various uncoated substrates at difference time points.	37
4.6	Representative SEM images of MC3T3-E1 those were cultured on the surface of various coated substrates at difference time points	38
4.7	Representative FM images of MC3T3-E1 those were seeded/cultured on the surface of a glass substrates at difference time points	39
4.8	Representative FM images of MC3T3-E1 those were seeded/cultured on the surface of various uncoated and coated substrates at difference time points	40

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Concept of cell growth on the scaffold.	4
2.2	Schematic representation of the interaction between surfaces, proteins, and cells.	6
2.3	Chemical structure of Poly(caprolactone) (PCL) .	8
2.4	Chemical structure of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV).	9
3.1	Schematic derivation of R_a and R_q surface roughness values.	15
4.1	SEM micrographs of PCL and PHBV films.	22
4.2	SEM micrographs of blended films.	23
4.3	AFM images of neat films.	23
4.4	AFM images of blended films.	24
4.5	DSC thermograms of the obtained film substrates.	25
4.6	ATR-FTIR spectra of neat and blended films.	26
4.7	XRD pattern from neat and blended films.	27
4.8	Contact angles of neat and blended films.	29
4.9	Protein adsorption of different types of substrates.	30
4.10	Indirect cytotoxicity evaluation of uncoated and coated films.	31
4.11	Attachment of MC3T3-E1 that was seeded onto the surfaces of TCPS and various uncoated and coated types of substrates as function of the cell seeding time.	33
4.12	Proliferation of MC3T3-E1 that was cultured onto the surfaces of TCPS and various uncoated and coated types of substrates as function of the cell culturing time.	34