# การดัดแปรผิวเส้นใยอิเล็กโทรสปันด้วยฟิล์มบางหลายชั้นของพอลิอิเล็กโทรไลต์เพื่อปรับปรุงการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์

นางสาวปวีณ์นุช กิตติธีรนันท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# SURFACE MODIFICATION OF ELECTROSPUN FIBERS WITH POLYELECTROLYTE MULTILAYER THIN FILMS TO IMPROVE ANIMAL-TISSUE CELL ADHESION

Miss Paveenuch Kittitheeranun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Applied Polymer Science and Textile Technology
Department of Materials Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492202

| | |
|---|---|
| **Thesis title** | Surface modification of electrospun fibers with polyelectrolyte multilayer thin films to improve animal-tissue cell adhesion |
| **By** | Miss Paveenuch Kittitheeranun |
| **Field of study** | Applied Polymer Science and Textile Technology |
| **Thesis Advisor** | Associate Professor Pranut Potiyaraj, Ph.D. |
| **Thesis Co-advisor** | Mr. Stephan T. Dubas |

---

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree.

.....Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Saowaroj Chuayjuljit)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Pranut Potiyaraj, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Mr. Stephan T. Dubas)

.....Member

(Associate Professor Paiparn Santisuk)

.....Member

(Associate Professor Khemchai Hemachandra, Ph.D.)

ปวีณ์นุช กิตติธีรนันท์ : การดัดแปรผิวเส้นใยอิเล็กโทรสปันด้วยฟิล์มบางหลายชั้นของพอลิอิเล็กโทรไลต์เพื่อปรับปรุงการยึดติดของเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ (SURFACE MODIFICATION OF ELECTROSPUN FIBERS WITH POLYELECTROLYTE MULTILAYER THIN FILMS TO IMPROVE ANIMAL-TISSUE CELL ADHESION) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร.ประณัฐ โพธิยะราช และ อ.ที่ปรึกษาร่วม: Mr. Stephan T. Dubas 92 หน้า

การยึดติดของเซลล์ L929 ไฟโบบลาสต์จากเนื้อเยื่อหนูบนวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งทำจากเส้นใยพีซีแอล (poly ε-caprolactone, PCL) ที่มีขนาดในระดับนาโน ถูกปรับปรุงให้ดีขึ้นโดยการเคลือบวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยฟิล์มบางหลายชั้นของพอลิอิเล็กโทรไลต์ (พีอีเอ็ม) ซึ่งเตรียมขึ้นด้วยเทคนิคเลเยอร์บายเลเยอร์ เริ่มจากการสร้างพีอีเอ็มสามชนิดบนกระจกสไลด์ ซิลิคอนเวเฟอร์ และพีซีแอลฟิล์ม คู่พอลิอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้ได้แก่ พีดีเอดีเอ็มเอซี (poly(diallydimethyl ammonium chloride), PDADMAC) กับพีเอสเอส (poly(sodium 4-styrene sulfonate, PSS), พีดีเอดีเอ็มเอซีกับเจลาติน และไคโตซานกับเจลาติน เมื่อนำพีอีเอ็มมาตรวจสอบความหนารวมทั้งสมบัติความชอบหรือไม่ชอบน้ำ พบว่าพีอีเอ็มที่เตรียมจากพีดีเอดีเอ็มเอซีกับพีเอสเอสมีความหนามากที่สุดเนื่องจากเป็นพีอีเอ็มที่เตรียมจากคู่พอลิอิเล็กโทรไลต์ที่แตกตัวได้ดี และยังพบอีกว่าพีอีเอ็มที่เตรียมจากพีดีเอดีเอ็มเอซีกับเจลาตินมีความเสถียรในสารละลายเพาะเลี้ยงเซลล์มากกว่าพีอีเอ็มที่เตรียมจากไคโตซานกับเจลาติน เมื่อนำกระจกปิดสไลด์มาเคลือบด้วยพีอีเอ็มที่เตรียมจากพีดีเอดีเอ็มเอซีกับพีเอสเอสเป็นชั้นรองก่อนเคลือบทับด้วยพีอีเอ็มที่เตรียมจากพีดีเอดีเอ็มเอซีกับเจลาติน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ L929 จากนั้นตรวจสอบด้วยเทคนิค MTT assay และกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์สามารถมีชีวิตรอด เจริญเติบโต และแผ่ขยายได้บนพีอีเอ็มทุกชนิด โดยเฉพาะเมื่อฟิล์มชั้นบนสุดของพีอีเอ็มเป็นเจลาตินที่มีประจุลบ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากการมีชีวิตรอด การเจริญเติบโต และการแผ่ขยายของเซลล์ พบว่าการยึดติดของเซลล์บนพีอีเอ็มที่เตรียมจากพีดีเอดีเอ็มเอซีกับเจลาตินดีกว่าการยึดติดของเซลล์บนพีอีเอ็มที่เตรียมจากไคโตซานกับเจลาติน เมื่อนำพีซีแอลมาปั่นด้วยกระแสไฟฟ้าให้เป็นเส้นใยที่มีขนาดนาโนเพื่อนำมาใช้เป็นวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์แล้วเคลือบด้วยพีอีเอ็มที่เตรียมจากพีดีเอดีเอ็มเอซีกับพีเอสเอสเป็นชั้นรองก่อนเคลือบทับด้วยพีอีเอ็มที่เตรียมจากพีดีเอดีเอ็มเอซีกับเจลาติน พบว่าสามารถปรับปรุงการมีชีวิตรอด การเจริญเติบโต และการแผ่ขยายของเซลล์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเทียบกับวัสดุโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เคลือบและที่เคลือบด้วยพีอีเอ็มที่เตรียมจากพีดีเอดีเอ็มเอซีกับพีเอสเอสเพียงอย่างเดียว

ภาควิชา.....วัสดุศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....Paveenuch Kittitheeranun.....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....Pramut Ptiyaraj.....

ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....S. Dubas.....

## 4872367023 : MAJOR APPLIED POLYMER SCIENCE AND TEXTILE TECHNOLOGY
KEY WORD: TISSUE ENGINEERING / ELECTROSPINNING FIBER / LAYER-BY-LAYER TECHNIQUE

MISS PAVEENUCH KITTITHEERANUN: SURFACE MODIFICATION OF ELECTROSPUN FIBERS WITH POLYELECTROLYTE MULTILAYER THIN FILMS TO IMPROVE ANIMAL-TISSUE CELL ADHESION. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.PRANUT POTIYARAJ, Ph.D., THESIS COADVISOR: MR. STEPHAN T. DUBAS, 92 pp.

The adhesion of L929 cells from mouse fibroblast on poly ε-caprolactone (PCL) nanofibrous scaffolds was successfully improved by coating the scaffolds with polyelectrolyte multilayer thin films (PEMs) prepared by the layer-by-layer deposition method. Initially, three PEMs were constructed from poly(diallydimethyl ammonium chloride) (PDADMAC) and poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS), PDADMAC/gelatin and chitosan/gelatin on glass slides, silicon wafers and PCL films. Their thickness and hydrophobic/hydrophilic property were investigated. Being constructed by two strong polyelectrolytes, PDADMAC/PSS was the thickest among the three, at the same number of layers. In addition, it was found that, in culture medium solution, the stability of PDADMAC/gelatin was unsurpassed by that of chitosan/gelatin. The *in vitro* L929 cell behaviors on glass cover slips coated with PDADMAC/PSS as the primer and PDADMAC/gelatin and chitosan/gelatin as the top coats were evaluated by the MTT assay and a microscope. The results indicated that, although the cells were able to grow on all prepared PEMs, those with negatively charged gelatin at the outermost layer were the most effective in terms of cell viability, proliferation and spreading. Cell adhesion, as considered by cell viability, proliferation and spreading, on PDADMAC/gelatin was better than that on chitosan/gelatin. Eventually, PCL was electrospun into nanofibrous scaffolds before coating with PDADMAC/PSS as the primer and PDADMAC/gelatin as the top coat. The results as revealed by the MTT assay and a scanning electron microscope suggested that use of PDADMAC/gelatin as the top coat significantly enhanced cell viability, proliferation as well as spreading comparing with the uncoated scaffolds and scaffolds coated with PDADMAC/PSS.

Department.....Materials Science..... Student's signature.....Paveenuch Kittitheeranun

Field of study Applied Polymer Science and Textile Technology Advisor's signature.....Pranut Potiyaraj

Academic year.....2006..... Co-advisor's signature.....Dubas

# ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her utmost gratitude to all instructors who have given her knowledge and invaluable guidance. Those in particular are Associate Professor Dr. Pranut Potiyaraj and Mr. Stephan T. Dubas, her advisors, for their inspiring ideas about the present topic and for their incessant moral support that was proved to be most valuable to the author.

The author would like to thank Assistant Professor Dr. Neeracha Sanchavanakit for her help, invaluable suggestions and provide the laboratory site for this research work. Helpful suggestion from Dr.Ratthapol Rangkupan is also acknowledged.

The author wish to extend her sincere thanks to Associate Professor Saowaroj Chuayjuljit, Associate Professor Paiparn Santisuk, and Associate Professor Dr. Khemchai Hemachandra for their advice, motivating comments, participation as thesis committees and assistance for her study and the Department of Materials Science, Chulalongkorn University for graduate courses.

Unforgettable thanks go to Metallurgy and Materials Science Research Institute, Chulalongkorn University for valuable equipment and chemical support. Special thanks are also extended to some Ph.D. students at the nanoscience and technology program, namely Miss Chularat Iamsamai and Miss Panittamat Kumlangdudsana for their assistance and friendship.

This thesis would not be possible to accomplish without the financial support from Graduate School, Chulalongkorn University through the 90$^{th}$ Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadphiseksomphot Endowment Fund).

Finally, and the most of all, the author would like to express her deepest appreciation to all the members in her family for their unconditionly love, moral support, and understanding. Without theirs, this research work could never be completed.

# CONTENTS


Page

ABSTRACT (IN THAI)..... iv

ABSTRACT (IN ENGLISH)..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... xi

LIST OF FIGURES..... xii

**CHAPTER**

I INTRODUCTION..... 1

II THEORY AND LITERATURE REVIEW..... 4

2.1 Fundamentals of Tissue engineering..... 4

2.1.1 Control of cell function by the extracellular matrix..... 6

2.1.2 Scaffold and natural material for tissue engineering..... 8

2.2 Electrospinning fiber..... 10

2.2.1 Principle of electrospinning..... 10

2.2.2 Electrospinning for biomedical applications..... 13

2.2.3 Poly (ε -caprolactone) (PCL)..... 15

2.2.4 Surface treatment of electrospun fibers with polyelectrolyte multilayer..... 18

2.3 Polyelectrolyte multilayer thin films (PEMs)..... 19

2.3.1 Definition and general description of polyelectrolyte..... 19

2.3.2 Formation of PEMs..... 23

2.3.3 Application of PEMs for cell adhesion..... 25

2.3.4 Natural Polyelectrolyte for cell adhesion ..... 26

**CHAPTER** **Page**

2.3.4.1 Gelatin ..... 27
2.3.4.2 Chitosan ..... 30

III EXPERIMENTAL ..... 32
3.1 Research Methodology ..... 32
3.2 Materials and Chemicals ..... 34
3.2.1 Substrates ..... 34
3.2.2 MTT assay kits ..... 35
3.2.3 Chemicals ..... 35
3.2.4 Animal tissue cell ..... 37
3.3 Instruments ..... 37
3.4 Experimental procedures ..... 37
3.4.1 Study of the PEMs formation and their properties ..... 37
3.4.1.1 Preparation of coated substrates ..... 37
3.4.1.2 Electrostatic self-assembly of PEMs on Substrate ..... 38
3.4.1.3 Measuring the film thickness ..... 39
3.4.1.4 Investigating hydrophilic/hydrophobic property ..... 40
3.4.1.5 Determining the stability of the PEMs coated in culture medium solution ..... 40
3.4.1.6 Determining loss of surface thickness after exposure to culture medium solution ..... 40
3.4.2 Study of cell behaviors on PEMs coated glass cover slips ..... 41
3.4.2.1 Preparation of glass cover slips ..... 41
3.4.2.2 Electrostatic self-assembly on Substrate ..... 41
3.4.2.3 Cell cultured ..... 43
3.4.2.4 Cell viability and proliferation test ..... 43
3.4.2.5 Cell spreading and morphology ..... 43

**CHAPTER** **Page**

3.4.3 Study of cell behavior on PEMs coated fibrous scaffolds..... 44
3.4.3.1 Preparation of PCL solution..... 44
3.4.3.2 Preparation of electrospun fibers..... 45
3.4.3.3 Electrostatic self-assembly on electrospun nanofibers... 46
3.4.3.4 Cell culturing and seeding ..... 46
3.4.3.5 Cell-scaffold morphology..... 46

IV RESULTS AND DISCUSSION..... 48
4.1 Properties of the prepared PEMs..... 48
4.1.1 Film thickness..... 48
4.1.2 Hydrophilic/hydrophobic property..... 51
4.1.3 Film stability..... 54
4.2 Cell behaviors on PEMs coated glass cover slips..... 56
4.2.1 Viability of L929 cell on different PEMs coated..... 56
4.2.2 Proliferation of L929 cell on different PEMs coated..... 59
4.2.3 Cell morphology and spreading..... 62
4.3 Cell behavior on PEMs coated fibrous scaffolds..... 66
4.3.1 Preparation of PCL solution..... 66
4.3.2 Viability and proliferation of L929 cell on fibrous scaffold.. 68
4.3.3 Cell-scaffold morphology..... 70

V CONCLUSIONS..... 74

REFERENCES..... 76

APPENDICES..... 81
APPENDIX A..... 82

**CHAPTER** **Page**

APPENDIX B..... 84

APPENDIX C..... 87

APPENDIX D..... 90

BIOGRAPHY..... 92

# LIST OF TABLES

**TABLE** **Page**


| | | |
|---|---|---|
| 2.1 | Applications of tissue engineering ..... | 6 |
| 2.2 | Selected classes of polyelectrolytes ..... | 22 |
| 2.3 | Parameters controlling the growth of PEMs..... | 25 |
| 3.1 | Chemical used in this research..... | 35 |
| 3.2 | Instruments used in this research..... | 37 |
| 3.3 | Experimental condition for constructing PEMs on substrates..... | 39 |
| 3.4 | Experimental parameters for constructing PEMs in order to study the effects of the outermost layer on cell behaviors..... | 42 |
| 3.5 | Experimental parameters for constructing PEM in order to study the effects of number of layers on cell behaviors..... | 42 |
| 3.6 | Experimental parameters for constructing PEM on electrospun fibers..... | 46 |
| 4.1 | Average thickness of different PEMs coated glass slide..... | 50 |

# LIST OF FIGURES

**FIGURE** **Page**


| | | |
|---|---|---|
| 2.1 | Tissue engineering approaches | 5 |
| 2.2 | Three dimension matrix structure. (A) plane matrices can be settled by cells. (B) and then roll up. (C) form a three dimension. | 7 |
| 2.3 | Scaffold-guided tissue regeneration | 9 |
| 2.4 | Schematic of the electrospinning setup | 11 |
| 2.5 | Nanofibers with specific topology | 12 |
| 2.6 | Molecular structure of PCL | 16 |
| 2.7 | Structure of (a) PSS as an anionic polyelectrolyte and (b) {DADMAC as an cationic polyelectrolyte | 20 |
| 2.8 | Dissociation equilibrium of the weak polyelectrolyte (a) Poly (acrylic acid) and (b) Poly (ethylene imine) | 20 |
| 2.9 | Chemical structure of a maleic acid-diallylamine copolymer | 21 |
| 2.10 | Schematic of the electrostatic self-assembly | 24 |
| 2.11 | The general structure of gelatin | 28 |
| 2.12 | Molecular structure of Chitosan | 30 |
| 3.1 | Framework of the research (Part I) | 32 |
| 3.2 | Framework of the research (Part II) | 33 |
| 3.3 | Framework of the research (Part III) | 34 |
| 3.4 | a) Glass cover slips (b) Glass slide (c) 24-well tissue culture plate | 34 |
| 3.5 | (a) 24-well tissue culture plate (b) Micropipettes (c) Microlit tips for Micropipettes | 35 |
| 3.6 | Substrate onto stainless steel holder | 38 |
| 3.7 | Schematic of the layer-by-layer deposition technique | 38 |
| 3.8 | Atomic Force microscope, nano scope IIIa | 40 |
| 3.9 | Light microscope, Olympus CK2 | 44 |
| 3.10 | Brookfield DV-III programmable viscometer | 44 |
| 3.11 | Surface tension meter, DCAT 11 | 45 |
| 3.12 | The electrospinning set up | 45 |

**FIGURE** **Page**


3.13 Scanning electron microscope, JEOL JSM-6400..... 47

4.1 A three-dimensional AFM surface topographic image showing how the film thickness is measured..... 48

4.2 Two-dimensional AFM surface topographic images of (a) $(PDADMACMAC /PSS)_{10}$ (b) $(PDADMACMAC /gelatin)_{10}$ and (c) $(chitosan/gelatin)_{10}$..... 49

4.3 Thickness of $(PDADMAC/gelatin)_n$ on glass slide..... 51

4.4 Water contact angle (sessile drop) of PEMs coated glass slide..... 53

4.5 Water contact angle (sessile drop) of PEMs coated PCL films..... 53

4.6 The normalized thickness as a function of dipping time in culture medium solution pH7.4..... 54

4.7 pH-sensitive of chitosan..... 55

4.8 The normalized contact angle as a function of dipping in culture medium solution..... 56

4.9 Molecular structure of MTT reagent..... 57

4.10 Viability of L929 cell cultures on the different outermost layers at 24 hr..... 58

4.11 Viability of L929 cell culture on the different number of layers at 24 hr..... 59

4.12 Process of cell proliferation..... 60

4.13 Proliferation of L929 cell cultured on the different outermost layers at 4, 8, 24, 48 hour, as determined by the activity of viable cells 61

4.14 Proliferation of L929 cell cultured on the different number of layers at 8, 24, 48 hour, as determined by the activity of viable cells... 61

4.15 The morphology of L929 cell on the different outermost layers after 4,8, 24 and 48 hr by light microscope (the magnification is20x)..... 64

4.16 The morphology of L929 cell on the different number of layers after

**FIGURE** **Page**

8, 24 and 48 hr by light microscope (the magnification is 20x)..... 65

4.17 SEM micrograph of electrospun nonwoven fiber obtained from 1.5% w/v PCL solution in methanol: chloroform (v/v 1:3). The collection time was 1 hr. (a) Low magnification view at 400× (scale bar = 50) (b) High magnification view at 5000× (scale bar = 5)..... 67

4.18 Viability of L929 cell culture on fibrous scaffold at 24 hr..... 68

4.19 Proliferation of L929 cell cultured on fibrous scaffold at 4, 8, 24, 48 hour as determined by the activity of viable cells..... 69

4.20 SEM micrographs of the L929 cell on nanofibrous scaffolds after 4, 8, 24 and 48 hr at 500× (scale bar = 50 μm, 500X.)..... 72

4.21 SEM micrographs of L929 cell on nanofibrous scaffolds after 4, 8, 24 and 48hr at 2000× (scale bar = 10 μm, 2000X.)..... 73