

**POLYPYRROLE-COATED POLY(LACTIC ACID) ELECTROSPUN
FIBROUS SCAFFOLD: EFFECT OF THE COATING LAYER ON
ELECTRICAL CONDUCTIVITY AND NEURAL CELL GROWTH**

Thitima Sudwilai

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

2011


Thesis Title: Polypyrrole-coated Poly(lactic acid) Electrospun Fibrous Scaffold: Effect of the Coating Layer on Electrical Conductivity and Neural Cell Growth

By: Thitima Sudwilai

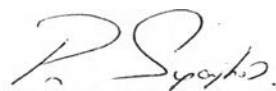
Program: Polymer Science

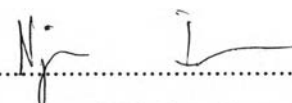
Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol


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

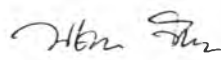

..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:


.....
(Prof. Pitt Supaphol)


.....
(Asst. Prof. Niphan Israsena)


.....
(Prof. Anuvat Sirivat)


.....
(Dr. Patcharaporn Thitiwongsawet)

ABSTRACT

5272031063: Polymer Science Program

Tthitma Sudwilai: Polypyrrole-coated Poly(lactic acid) Electrospun
Fibrous Scaffold: Effect of the Coating Layer on Electrical
Conductivity and Neural Cell Growth

Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol 93 pp.

Keywords: Polypyrrole/ Poly(lactic acid)/ Electrospinning/ Scaffold/ Nerve cell/
Electrical conductivity/Admicellar polymerization

Poly(lactic acid) (PLA) solution dissolved in chloroform was electrospun to produce nano-fibrous meshes as the fibrous scaffold. The average diameter of aligned and random of PLA fiber meshes were $1.744 \pm 0.795 \mu\text{m}$ and $2.069 \pm 0.577 \mu\text{m}$ respectively. Polypyrrole (PPy) was coated on the PLA fiber meshes via admicellar polymerization of pyrrole (Py) monomer, carried out using 0.8 mM. (below CMC) aqueous DBSA solution at pH 4 (adjusted by using HCl) as surfactant. The average diameter of PPy-coated aligned and random PLA fiber meshes were increased. Furthermore, important physical properties of PPy-coated PLA fiber meshes was surface conductivity found that the conductivity at condition DBSA:Py monomer (1:8) PPy-coated PLA fiber meshes were increased in range 25-30 S/cm. In Biological characterizations found that cytocompatibility on PPy-coated PLA fiber meshes were examined using Neuro 2a as reference cell. Experimental results from MTT assay showed that PPy-coated PLA fiber meshes did not release substances toxicity and also indicated cell attachment on fiber meshes. In addition, PPy-coated aligned PLA fiber meshes were improve by Laminin coated on the electrospun fiber mesh found that increase cells interact with scaffolds. In electrical stimulation at 100 mV for 2 hours, Laminin coated on (PPy-coated aligned fiber meshes) is showed expression c-Fos gene of rat hippocampal neural stem cell increase compare to non-electrical stimulation.

บทคัดย่อ

ธิดิมา สุควิลัย : การประยุกต์วัสดุโครงร่างใช้ โพลีพิโรลเคลือบบนเส้นใยโพลีแลคติก แอซิดที่ได้จากการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต ศึกษากระบวนการกระตุ้นเซลล์ประสาทภายใต้สนามไฟฟ้า (Polypyrrole-coated Poly(lactic acid) Electrospun Fibrous Scaffold: Effect of the Coating Layer on Electrical Conductivity and Neural Cell Growth)
 อ. ที่ปรึกษา : ศ. ดร. พิชญ์ สุภผล 93 หน้า

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเตรียมเส้นใยนำไฟฟ้า โดยวิธีแอ็ดไมเซลล์ลาพอลิเมอร์เซชัน เพื่อมาใช้ในกระบวนการกระตุ้นเซลล์ประสาทภายใต้สนามไฟฟ้า วิธีดังกล่าว ชั้นที่มีลักษณะบางของพอลิเมอร์นำไฟฟ้าคือ โพลีพิโรลถูกเคลือบบนเส้นใยโพลีแลคติก แอซิดที่ได้จากการเตรียมด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิว โดยงานวิจัยจะทำการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อสัญญาณวิทยาและขนาดของเส้นใยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเส้นใยนำไฟฟ้า จากการศึกษาพบว่าเส้นใยนำไฟฟ้าที่ผ่านการเคลือบส่งผลให้ขนาดของเส้นใยเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนความเข้มข้นของมอนอเมอร์ต่อความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด จากนั้นจึงทำการศึกษาค่าการนำไฟฟ้าเชิงพื้นที่ของเส้นใยนำไฟฟ้า พบว่าค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนความเข้มข้นของโมโนเมอร์ต่อความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวในช่วง 1:4-1:8 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเส้นใยนำไฟฟ้าจะถูกประเมินความเป็นไปได้ในการใช้เป็นวัสดุโครงร่างด้วยการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์และความสามารถในการยึดเกาะ โดยใช้เซลล์ประสาทเป็นเซลล์ทดสอบ ผลจากการศึกษาพบว่าเส้นใยนำไฟฟ้าไม่มีการปลดปล่อยสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ทดสอบ และมีความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ จากนั้นศึกษาการกระตุ้นเซลล์ประสาทภายใต้สนามไฟฟ้าบนวัสดุเส้นใยนำไฟฟ้า ที่ความต่างศักย์ 100 มิลลิโวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ประสาทมีการเปลี่ยนแปลงของ c-Fos ยีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her sincere gratitude to her advisors and committees, Prof. Pitt Supaphol and Asst. Prof. Dr. Niphan Israsena, for their kindness and support. They are giving me the interesting aspects in the field conducting polymer for biomedical and their sincere help. Particularly, they have provided the very useful guidance and the great encouragement throughout this research.

The author would like to extend her thanks to Assoc. Prof. Anuvat Sirivat and Asst. Prof. Dr. Niphan's working group in laboratory for assistance with electrical conductivity measurement and knowledge of the neuropharmacology and their useful suggestions.

The author would like to thank the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University where the author has received the invaluable knowledge in the Polymer Science program and the author tremendously appreciates all professors, lecturers and staffs who have affectionated knowledge and technical support during her study in this college.

The author also would like to sincerely thank all of her friends and her senior students for their help and suggestions.

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

Ultimately, the author would like to express extremely her deepest thankfulness to her beloved family, understanding and encouragement during her studies and research work.

TABLE OF CONTENTS

		PAGE
	Title Page	I
	Abstract (in English)	iii
	Abstract (in Thai)	iv
	Acknowledgements	v
	Table of Contents	vi
	List of Tables	viii
	List of Figures	ix
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
II	LITERATURE REVIEW	3
2.1	Electrospinning	3
2.1.1	Electrospinning Theory	3
2.1.2	Various Parameters	4
2.1.3	Alignment Fibers and Fiber Collection Methods	5
2.1.4	Polymer Types	5
2.2	Conductive Polymers	6
2.2.1	Conducting Polymer Used for Biomedical Applications	7
2.3	Admicellar Polymerization	9
2.4	Nerve Regeneration	15
2.4.1	Physiology of Nerve System	15
2.4.2	Nerve Graft in Advance Fabrication Technique	16
2.4.3	Support Cells	17
2.4.4	Extracellular Matrix	17

III	METHODOLOGY	18
	3.1 Procedure Method	18
	3.1.1 Electrospinning of Aligned and Random Scaffold	18
	3.1.2 Polypyrrole Coating by Admicellar Polymerization	19
	3.1.3 Testing and Characterization	21
	3.2 Biological Characterizations	24
	3.2.1 Materials Used for Cell Culture	24
	3.2.2 Cytotoxicity Tests	25
	3.2.3 Quantification of Viable Cells by MTT Assay	25
	3.2.3 Cell Attachment Tests	26
	3.2.4 <i>In Vitro</i> Electrical Stimulation	27
	3.2.5 Real Time -Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis	28
IV	RESULTS AND DISCUSSION	29
	4.1 Electrospun Fabrication of Aligned and Random Scaffold	29
	4.2 Determination of Surfactant Adsorption Isotherm	31
	4.3 Polypyrrole Coating Fabrication by Admicellar Polymerization	32
	4.4 Surface Conductivity	36
	4.5 Surface Wettability	38
	4.6 Chemical Analysis of Surface	40
	4.7 Elemental Composition of the Surface	41
	4.8 Biological Characterizations	44
	4.8.1 Cytotoxicity Test	44
	4.8.2 RT-PCR Analysis	47

CHAPTER		PAGE
V	CONCLUSIONS	48
	REFERENCES	50
	APPENDICES	55
	Appendix A Average Fiber Diameter of Poly(lactic acid) fibers	55
	Appendix B Calibration Curve of Standard DBSA	61
	Appendix C Determination of Surfactant Adsorption Isotherm	63
	Appendix D Average Fiber Diameter of Polyrrole-coated Poly(lactic acid)	64
	Appendix E Average The Geometric Correction Factor (K)	69
	Appendix F Average of Surface Conductivity	71
	Appendix G Indirect Cytotoxicity	91
	Appendix H Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	92
	CURRICULUM VITAE	93

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
CHAPTER II		
2.1	Comparison of chemical and electrochemical CPs polymerization	7
CHAPTER IV		
4.1	Scanning electron micrographs of electrospun PPy-coated PLA fibers	34
4.2	Average contact angle of PLA fiber meshes and PPy-coated PLA fiber meshes	39
4.3	Average contact angle of PPy-coated aligned PLA fiber meshes and Laminin coated on (PPy-coated aligned PLA fiber meshes)	40
4.4	Elemental compositions and doping levels of both aligned PLA and PPy-coated PLA fiber meshes using XPS analysis	42
4.5	N_{1s}/C_{1s} ratios of the PLA and PPy-coated PLA aligned fiber meshes	42
4.6	SEM images of Neural Stem Cell on various scaffold materials at different time in the culture	46

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
CHAPTER II		
2.1	Schematic of the electrospinning set-up.	4
2.2	Schematic of the four steps of admicellar polymerization technique.	9
2.3	Typical adsorption isotherm of ionic surfactant on a substrate.	10
2.4	Peripheral motor neuron (a) the cell body (b) a cross section of the neuron.	16
2.5	Properties of the ideal nerve conduits.	16
CHAPTER III		
3.1	Measurement for electrical stimulation.	27
CHAPTER IV		
4.1	Scanning electron micrographs of electrospun PLA fibers, aligned fibers (AF) and random fibers (RF).	29
4.2	For degree of fiber orientation in aligned PLA fibers.	30
4.3	Adsorption isotherm of DBSA on PLA fibers.	31
4.4	SEM micrograph of untreated aligned PLA fibers, untreated random PLA fibers, PPy-coated aligned PLA fibers, and PPy-coated random PLA fibers.	32
4.5	The pictures illustrated the coloring of PPy-coated aligned PLA fibers by varied the ratio of DBSA: Py monomer.	33
4.6	Relation between average diameter of fiber and pyrrole monomer.	35

FIGURE		PAGE
4.7	Degree of fiber orientation in PPy-coated on aligned PLA fibers.	35
4.8	Conductivity of PPy-coated aligned PLA fibers (PPy-coated PLA AF) and PPy-coated random PLA fibers (PPy-coated PLA RF).	37
4.9	Conductivities of PPy-coated aligned PLA fibers at ratio 1:8 and Ferric chloride:oxidant ratio of 1:1.	38
4.10	Water dropped on the surface of aligned PLA fiber meshes, random PLA fiber meshes, and PPy-coated aligned PLA fiber meshes, and PPy-coated random PLA fiber meshes.	39
4.11	Water dropped on the surface of PPy-coated aligned PLA fiber meshes and laminin coated on (PPy-coated random PLA fiber meshes)	39
4.12	ATR-FTIR spectra of PLA aligned fiber meshes, PPy-coated PLA aligned fiber meshes and laminin coated on (PPy-coated aligned PLA fiber meshes).	41
4.13	XPS high resolution spectra of C _{1s} .	43
4.14	XPS high resolution spectra of N _{1s} .	43
4.15	XPS survey spectrum obtained on as-received aligned PLA fiber meshes and PPy-coated aligned fiber meshes.	44
4.16	Indirect cytotoxicity evaluation of various electrospun fiber meshes.	45
4.17	Expression of c-Fos gene in rat hippocampal neural stem cell on electrical stimulation 2 hours cultured on the surfaces of laminin coated on (PPy-coated aligned PLA fiber meshes).	47