SURFACE MODIFICATION OF POLY(STYRENE/ETHYLENE GLYCOL DIMETHACRYLATE) HIPE LOADED WITH HYDROXYAPATITE AS A SCAFFOLD FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATION

Kornkanok Noulta

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

2014

Thesis Title: Surface Modification of Poly(Styrene/Ethylene Glycol

Dimethacrylate) HIPE Loaded with Hydroxyapatite as a

Scaffold for Tissue Engineering Application

By: Kornkanok Noulta

Program: Polymer Science

Thesis Advisors: Asst. Prof. Manit Nithitanakul

Asst. Prof. Pomthong Malakul

Dr. Stephan T. Dubas

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:

(Asst. Prof. Marit Nithitanakul)

(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

(Dr. Stephan T. Dubas)

Thought Ch

(Asst. Prof. Thanyalak Chaisuwan)

(Dr. Pornsri Pakeyangkoon)

ABSTRACT

5572009063: Polymer Science Program

Kornkanok Noulta: Surface Modification of Poly(S/EGDMA) HIPE

Loaded with Hydroxyapatite as a Scaffold for Tissue Engineering

Application.

Thesis Advisors: Asist. Prof. Manit Nithitanakul, Asst. Prof.

Pomthong Malakul, and Dr. Stephan T. Dubas 43 pp.

Keywords: High internal phase emulsion/ Scaffold/ Layer-by-layer technique/

Tissue engineering

Poly(High Internal Phase Emulsion) (PolyHIPE) foam is a material that is good candidate for used in tissue engineering application due to its 3D structure and highly porous with interconnected pore. The PolyHIPE was prepared from poly(styrene/ethylene glycol dimethacrylate; 80/20) through high internal phase emulsion polymerization technique and loaded with hydroxyapatite (HA) to improve biocompatibility. In this study, improvement of hydrophilicity of the polyHIPE was carried out by Layer-by-Layer method. Three types of chemicals were used for coating on the surface of polyHIPE such as poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS), gelatin, and alginic acid. The change of surface properties of the modified polyHIPE was characterized by contact angle measurement. It was found that hydrophilicity of the surface increase after coating as observed by decrease in contact angle degree. The effect of type of coating on cell attachment and cell proliferation was also studied. The PSS modified polyHIPE showed the highest efficiency of attachment of the L929 fibroblast cells and an amount of cell increased up to 138% when compare with unmodified the polyHIPE. Moreover, the PSS modified polyHIPE also exhibited the highest efficiency of proliferation of the L929 fibroblast cells. Therefore, PSS modified polyHIPE was suitable for using in tissue engineering application.

บทคัดย่อ

กรกนก นวลตา : การคัดแปรผิวหน้าของพอลิฮีพที่มีการเติมไฮครอกซีแอปาไทต์สำหรับ ประยุกต์ใช้เป็น โครงเลี้ยงเซลล์ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Surface Modification of Poly(S/EGDMA)HIPE Loaded with Hydroxyapatite as a Scaffold for Tissue Engineering Application) อ. ที่ปรึกษา ผศ. คร. มานิตย์ นิธิธนากุล ผศ. คร. ปมทอง มาลากุล ณ อยุธยา และ คร. สเตฟาน ทีคูบาส จำนวน 43 หน้า

พอลิฮีพเป็นวัสคุที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สามารถนำมาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจาก พอลิฮีพมีโครงสร้างเป็นสามมิติ และมีรูพรุนมากและต่อเนื่องกัน พอลิฮีพถูกเตรียมจากสไตรีน และเอทิลีนไกลคอลไดเมทาไครเลตในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยใช้วิธีพอลิเมอไรเซชันของ อิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในสูง และมีการเติมไฮครอกซีแอปาไทต์เพื่อเพิ่มความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ ในร่างกาย ในงานวิจัยนี้ ทำการปรับปรุงคุณสมบัติความชอบน้ำของพอลิฮีพโดยใช้วิธีเลเยอร์ บายเลเยอร์ สารเคมีที่ใช้ในการคัดแปรผิวหน้าของพอลิฮีพมี 3 ชนิค ได้แก่ พอลิสไตรีนซัลโฟเนต เจลาดิน และอัลจินิก แอซิค คุณสมบัติของผิวหน้าที่เปลี่ยนไปของพอลิฮีพตรวจสอบโดยใช้เครื่อง ทคสอบมุมสัมผัส พบว่าความชอบน้ำของผิวหน้าพี่มีขึ้นหลังจากมีการคัดแปรผิวหน้าซึ่งสังเกตได้ จากองสาของมุมสัมผัสลดลง นอกจากนี้ยังได้สึกษาผลของสารที่ใช้ในการคัดแปรผิวหน้าที่มีต่อ การยึคติดของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่าพอลิฮีพที่ทำการคัดแปรผิวหน้าด้วย พอลิสไตรีนซัลโฟเนตมีจำนวนเซลล์ยึคติดสูงที่สุด และมีปริมาณเซลล์ยึคติดเพิ่มขึ้น 138 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิฮีพที่ไม่ได้ทำการคัดแปรผิวหน้า นอกจากนี้ พอลิฮีพที่ทำการคัดแปรผิวหน้าด้วยพอลิสไตรีนซัลโฟเนตยังมีปริมาณการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุดด้วย คังนั้น พอลิฮีพที่คัดแปรผิวหน้าด้วยพอลิสไตรีนซัลโฟเนตยังมีปริมาณการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุดด้วย คังนั้น พอลิฮีพที่คัดแปรผิวหน้าด้วยพอลิสไตรีนซัลโฟเนตยังมีปริมาณการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุดด้วย คังนั้น พอลิฮีพที่คัดแปรผิวหน้าด้วยพอลิสไตรีนซัลโฟเนตยังมีปริมาณการเพิ่มจำนวนจางรรมเนื้อเชื่อ

ACKNOWLEDGEMENTS

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

I would like to express my sincere thanks to my thesis advisor, Asst. Prof. Manit Nithitanakul for his advices and constant encouragement throughout the research. I would not have achieved this far and this thesis would not have been completed without all the support that I have always received from him.

I would like to extend our sincere thanks to Dr. Pornsri Pakeyangkoon for her valuable time and priceless advices. She sacrificed her time to teach and help me in this work. She has always given greatful comment and encouraged me when I have problem. I would also like to thank Dr.Stephan for his helpful and constructive suggestion.

Furthermore, I would especially like to thank Asst. Prof. Pomthong Malakul Asst. Prof. Thanyalak Chaisuwan for insightful comments, and useful question.

Finally, I would like to take opportunity for thankfulness to my family for their whole support and encouragement. And I also would like to thank MN group and my friends for their help, constructive suggestion, and cheerfulness.

TABLE OF CONTENTS

			PAGE
	Title	Page	i
	Abst	ract (in English)	iii
	Abst	ract (in Thai)	iv
	Ackn	owledgements -	v
	Table	e of Contents	vi
	List	of Tables	ix
	List	of Figures	х
		4	
СНА	PTEF	R	
	I	INTRODUCTION	1
	II	LITERATURE REVIEW	3
		2.1- Tissue Engineering and Scaffold Materials	3
		2.1.1 Tissue Engineering	3
		2.2.2 Scaffold Materials	4
		2.2.3 MTT Assay	5
		2.2 High Internal Phase Emulsion Polymer (PolyHIPE)	5
		2.2.1 Controlling the Morphology and Properties of	
		PolyHIPE	7
		2.2.2 PolyHIPE for Tissue Engineering Application	8
		2.3 Layer-by-Layer Technique	10
		2.4 General Properties of Chemical that Used in this Research	11
		2.4.1 Polystyrene (PS)	11
		2.4.2 Ethylene Glycol Dimathacrylate (EGDMA)	12
		2.4.3 Polystyrenesulfonate (PSS)	13
		2.4.4 Poly(Diallyldimethylammonium Chloride)	
		(PDADMAC)	13

CH	APTEI	₹	PAGE
	III	EXPERIMENTAL	15
		3.1 Materials	15
		3.2 Methodology	15
		3.2.1 Preparation of Poly(S/EGDMA)HIPE Loaded with	
		Hydroxyapatite	15 -
		3.2.2 Layer-by-Layer (LbL) Surface Modification	16
•		3.2.3 Characterization of Poly(S/EGDMA) HIPE Loaded	
		with Hydroxyapatite -	16
		3.2.4 Cell Culture	17
		10 -	
	IV	SURFACE MODIFICATION OF POLY(STYRENE/	
		ETHYLENE GLYCOL DIMETHACRYLATE) HIPE	
		LOADED WITH HYDROXYAPATITE AS A SCAFFOLD	
		FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATION	21
		4.1 Abstract	21
		4.2 Introduction	22
		4.3 Experimental	23
		4.3.1 Materials	23
		4.3.2 Preparation of Poly(S/EGDMA) HIPE Loaded with	
		Hydroxyapatite	23
		4.3.3 Layer-by-Layer (LbL) Surface Modification	24
		4.3.4 Characterization of Poly(S/EGDMA) HIPE Loaded	
		with Hydroxyapatite	24
		4.3.5 Cell Culture	25
		4.4 Results and Discussion	28
		4.4.1 Characterization of Poly(S/EGDMA) HIPE Loaded	
		with Hydroxyapatite	28
		4.4.2 Determination of Optimum Layers on	
		Poly(S/EGDMA) HIPE Loaded with Hydroxyapatite	28

CHAPTER		PAGE
	4.4.3 Effect of LbL Surface Modification on Chemical	
	Composition, and Wettability of Poly(S/EGDMA)	
	HIPE Loaded with Hydroxyapatite	29
	4.4.4 Cytotoxicity Test	30
	4.4.5 Cell Attachment and Proliferation	30
	4.4.6 Cell Morphology	31
	4.5 Conclusions	31
	4.6 Acknowledgements	32
	4.7 References	32
V	CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	40
	5.1 Conclusions	40
	5.2 Recommendations	40
		-
	REFERENCES	41
	APPENDIX	44
	CURRICULUM VITAE	51

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE	
4.1	Characteristics of the poly(S/EGDMA)HIPE load with		
	hydroxyapatite porous foam	39	
Al	Multipoint BET surface area of poly(S/EGDMA)HIPE loaded with		
	hydroxyapatite	44	
A2	Mechanical properties of poly(S/EGDMA)HIPE loaded with		
	hydroxyapatite	44	
A3	Chemical composition of poly(S/EGDMA)HIPE loaded with		
	hydroxyapatite from scanning electron microscope/energy dispersive	:	
	using X-Ray (analysis)	45	
A4	UV-Absorbance of poly(S/EGDMA)HIPE loaded with		
	hydroxyapatite modified with and without Layer-by-Layer (LbL)		
	surface modification at wavelength 570 nm	46	
A5	UV-Absorbance of poly(S/EGDMA)HIPE loaded with		
	hydroxyapatite modified with and without Layer-by-Layer (LbL)		
	surface modification for cell attachment study (i.e. 1 h, 4 h, and 24 h)	
	at wavelength 570 nm	47	
A6	UV-Absorbance of poly(S/EGDMA)HIPE loaded with		
	hydroxyapatite modified with and without Layer-by-Layer (LbL)		
	surface modification for cell proliferation study (i.e. 4 h, 1 day,		
	3 days, and 7 days) at wavelength 570 nm	48	

LIST OF FIGURES

FIGURE			PAGE	
	2.1	Basic principle of tissue engineering.	4	
	2.2	Scheme for typical preparation of polyHIPE.	6	
	2.3	SEM picture showing typical structure of polyHIPE monolith.	7	
	2.4	(A) Schematic of the film deposition process using slides and beaker	rs.	
		(B) Simplified molecular picture of the first two adsorption steps,		
		depicting film deposition starting with a positively charged substrate		
		(C) Chemical structures of two typical polyions, the sodium salt of		
		poly(styrene sulfonate) and poly(allylamine hydrochloride).	10	
	2.5	Free radical vinyl polymerization reaction of polystyrene.	12	
	2.6	Structure of ethylene glycol dimathacrylate.	13	
	2.7	Structure of polystyrenesulfonate.	13	
	2.8	Structure of Poly(diallyldimethylammonium chloride).	14	
	4.1	SEM micrographs of poly(S/DVB)HIPEs loaded with		
		hydroxyapatite.	33	
	4.2	Absorbance as a function of the number of layers for PDAD/PSS		
		coated on poly(S/ EGDMA)HIPE loaded with hydroxyapatite.	33	
	4.3	Photograph of poly(S/ EGDMA)HIPE loaded with hydroxyapatite		
		modified surface with PDAD/PSS and followed by indigo dye;		
		(a) no coating, (b) 1 layer, (c) 3 layers, (d) 5 layers, (e) 7 layers,		
		and (f) 9 layers.	34	
	4.4	ATR-IR spectra of poly(S/EGDMA)HIPE loaded with		
		hydroxyapatite; a) uncoated, b) PSS coated, c) ALG coated,		
		and d) GEL coated.	34	
	4.5	Static water sensible drops on poly(S/EGDMA)HIPE loaded with		
		hydroxyapatite; a) uncoated; b) PSS coated; c) ALG coated; and		
		d) GEL coated.	35	

FIGURE		PAGE
4.	6 Cytotoxicity of the poly(S/EGDMA)HIPE foam of before	
	(uncoated) and after (coated) LbL surface modification.	36
4.	Cell attachment of L929 fibroblast-like cells on the poly(S/EGDMA)	ı
	HIPE foam in coated and uncoated with LbL surface modification,	
	after 1, 4, and 24 h of cell culture periods.	36
4.	Cell proliferation of L929 fibroblast-like cells on the poly(S/EGDMA	A)
	HIPE foam in coated and uncoated with LbL surface modification,	
	after 4 h, and 1, 3, and 7 days of cell culture periods.	37
4.	SEM image of the L929 fibroblast-like cells on poly(S/EGDMA)HIP	E
	loaded with hydroxyapatite; a-c) uncoated; d-f) PSS coated;	
	g-i) ALG coated; and j-l) GEL coated.	38
A	FTIR spectrum of poly(S/EGDMA) with and without	
	hydroxyapatite.	49
A.	UV spectrum of poly(S/EGDMA) loaded with hydroxyapatite	
	coated surface with Indigo dye at 1, 3, 5, 7, and 9 layers.	50